

**ETABLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
EINER DREIDIMENSIONALEN ENDOTHEL-
GLATTMUSKELZELL-KOKULTUR ZUR
UNTERSUCHUNG PULMONALER
ANGIOGENESE *IN VITRO*.**

JENS UWE ALBRECHT

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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Etablierung und Charakterisierung einer dreidimensionalen
Endothel-Glattmuskelzell-Kokultur zur Untersuchung
pulmonaler Angiogenese *in vitro*.**

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

vorgelegt von

Jens Uwe Albrecht

aus Gießen

Gießen 2006

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Leiter: Prof. Dr. Werner Seeger

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,

Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. W. Seeger

Gutachterin: Frau PD Dr. K. Lips.

Tag der Disputation: 04.10.2006

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	4
2	Abkürzungsverzeichnis	7
3	Einleitung	9
3.1	Begriffserläuterung.....	9
3.2	Vaskulogenese im Embryo, die Rolle von Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen	9
3.3	Differenzierung der Endothelzellen	10
3.3.1	Arterio-venöse Differenzierung	10
3.3.2	Organspezifische Differenzierung	10
3.4	Die Rolle der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte	12
3.5	Rolle der extrazellulären Matrix	13
3.6	Stabilisierung der Endothelsprossen	14
3.7	Hypoxie als Angiogenesestimulus, die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF).....	14
3.7.1	Struktur, Funktion und Regulation von HIF	16
3.8	In dieser Arbeit verwendete Wachstumsfaktoren und deren Rolle bei der Angiogenese.	19
3.8.1	Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF	19
3.8.2	Der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, FGF-2).....	25
3.8.3	Der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β)	27
3.9	Weitere Angiogenese-relevante Wachstumsfaktoren	28
3.9.1	Die Angiopoietine	28
4	Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen	30
5	Material und Methoden	31
5.1	Material	31
5.1.1	Zellkulturmaterial.....	31
5.1.2	Wachstumsfaktoren für die Zellkultur	32
5.1.3	Zellkulturmedien	33
5.1.4	Material für die Versuchsanordnungen	34
5.1.5	Wachstumsfaktoren.....	34
5.1.6	Assaymedien	34
5.1.7	Farbstoffe	34
5.1.8	Antikörper	35
5.1.9	Zellen.....	35

5.2	Methoden.....	36
5.2.1	Isolation der HULMEC.....	36
5.2.2	Sphäroidassay.....	37
5.2.3	Anfertigung von Kryoschnitten.....	41
5.2.4	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	41
5.2.5	Immunhistologie.....	41
6	Resultate	42
6.1	Etablierung des Sphäroidmodells.....	42
6.1.1	Reinheit der isolierten Endothelzellen.....	42
6.1.2	Zellkulturparameter.....	42
6.1.3	Vorgehen bei der Auswertung.....	44
6.2	Untersuchung pulmonaler Angiogenese in vitro an Monokultursphäroiden bestehend aus 1000 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC).....	45
6.2.1	VEGF und bFGF induzieren im Sphäroid-Monokulturassay pulmonale in vitro Angiogenese.....	46
6.2.2	TGF- β in hoher Konzentration inhibiert die VEGF-induzierte pulmonale in vitro Angiogenese im Sphäroid-Monokulturassay.....	47
6.2.3	TGF- β hat keinen Einfluss auf die bFGF-induzierte pulmonale in vitro Angiogenese im Sphäroid-Monokulturassay.....	48
6.3	Untersuchung pulmonaler Angiogenese in vitro an Kokultursphäroiden bestehend aus jeweils 500 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC).....	49
6.3.1	VEGF und bFGF induzieren pulmonale in vitro Angiogenese im Sphäroid-Kokulturassay.....	50
6.3.2	TGF- β in niedriger Konzentration induziert die pulmonale in vitro Angiogenese im Sphäroid-Kokulturassay.....	51
6.3.3	TGF- β in niedriger Konzentration verstärkt die VEGF-induzierte pulmonale in vitro Angiogenese im Sphäroid-Kokulturassay.....	52
6.3.4	TGF- β hat keinen Einfluss auf die bFGF-induzierte pulmonale in vitro Angiogenese im Sphäroid-Kokulturassay.....	53
6.3.5	Die Kombination der Wachstumsfaktoren bFGF und TGF- β wirkt angiogen auf Kokultursphäroide.....	54
6.3.6	bFGF wirkt in gleicher Konzentration stärker angiogen als VEGF.....	55
6.4	Kokultursphäroide zeigen im dreidimensionalen Fibringel eine gegenüber Monokultursphäroiden signifikant höhere Spontanangiogenese.....	56

6.5	In Kokultursphäroiden aus humanen mikrovaskulären Endothelzellen und humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen ist die VEGF-induzierte Angiogenese schwächer als in Monokultursphäroiden aus Endothelzellen (HULMEC).....	57
6.6	TGF- β wirkt in geringer Konzentration auf Kokultursphäroide aus humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC) und humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) stärker angiogen als auf Monokultursphäroide aus Endothelzellen (HULMEC)	58
6.7	Untersuchung systemischer Angiogenese in vitro an Kokultursphäroiden bestehend aus 500 humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC).....	59
6.8	Die systemische und die pulmonale in vitro Angiogenese unterscheiden sich im dreidimensionalen Sphäroidassay nicht.	60
6.9	Immunfluoreszenz-Untersuchungen von Zellsphäroiden	61
6.9.1	Untersuchung der Sphäroide vor der Einbettung in die dreidimensionale Gelmatrix	61
6.9.2	Paraffinschnitte von eingebetteten Sphäroiden.....	63
7	Diskussion	65
7.1	Diskussion des Modells.....	65
7.2	Zelluläre Zusammensetzung der Sphäroide	67
7.3	In vitro Angiogenese der Mono- und Kokultursphäroide	68
7.3.1	Effekte von VEGF.....	68
7.3.2	Effekte von bFGF.....	69
7.3.3	Effekte von TGF- β	70
7.3.4	Effekte der Kombination von TGF- β mit VEGF und bFGF.....	71
7.3.5	Vergleich der Mono- und Kokultursphäroide	72
7.3.6	Der Kokultur-Sphäroidassay mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen und PASMC	74
8	Zusammenfassung	75
9	Summary	77
10	Literaturverzeichnis	79
11	Danksagung	Fehler! Tex

2 Abkürzungsverzeichnis

Benutzte Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
Ang2	Angiopoietin 2
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	bone morphogenic protein
BMPR	bone morphogenic protein receptor
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ECGS	Endothelzellen Wachstumszusatz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EBSS	Earl's gepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamtetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EG-VEGF	Endokrine Drüsen-VEGF
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
et al	et altera
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR,	FGF-Rezeptor
FIH	HIF-inhibierender Faktor
g	Gramm
HAOSMC	Humane aortale glatte Muskelzellen
HULMEC	Humane pulmonale mikrovaskulären Endothelzellen
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
INS	Intraokulares neovaskuläres Syndrom
kDA	Kilodalton
KDR	Kinase insert domain region, Synonym für VEGFr-2
KGF	Keratinocyten Wachstumsfaktor
NRP-1	Neuropilin-1
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MEK = MAPKK	Mitogen-aktivierte Kinasekinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
n	Anzahl
nm	Nanometer
O ₂	Molekularer Sauerstoff
PASMC	Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Plättchenhergeleiteter Wachstumsfaktor
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-kinase
PLGF	Placentaler Wachstumsfaktor
P/S	Penicillin / Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SMC	glatte Muskelzelle
SMA	Glatt-Muskel-Actin
TGFbeta	Transformierender Wachstumsfaktor β
TSP-1	Thrombospondin-1
UpM = rpm	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
vWF	Von-Willebrand-Faktor
VHL	Von-Hippel-Lindau E3-Ubiquitin-Ligasekomplex
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
μ	mikro
®	Eingetragene Marke
%	pro cent

3 Einleitung

3.1 Begriffserläuterung

Als sehr frühes Organsystem entsteht im Embryo das Blutgefäßsystem, welches für die weitere Entwicklung des Organismus notwendige Voraussetzung zur Versorgung aller Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen ist. Es werden bei der Blutgefäßentstehung drei unterschiedliche Mechanismen beobachtet, die Vaskulogenese, die Angiogenese und die Arteriogenese.

Vaskulogenese beschreibt die in situ-Differenzierung endothelialer Progenitorzellen (Angioblasten) zu Endothelzellen. Diese bilden ein zunächst vergleichsweise ungeordnetes Netzwerk aus, welches in weiteren Schritten der Entwicklung in Arterien, Venen und Kapillaren organisiert wird. Angiogenese beschreibt den Mechanismus des sprossenden Auswachsens (Sprouting) von neuen Gefäßen aus bestehenden Gefäßen. Arteriogenese definiert im adulten Organismus das konzentrische Wachstum schon bestehender Gefäße als Anpassung an einen größeren Blutfluss, z.B. im Falle des Kollateralwachstums bei lokalen Gefäßverschlüssen¹.

3.2 Vaskulogenese im Embryo, die Rolle von Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen

Bei der Vaskulogenese in der Embryonalentwicklung spielen endotheliale Progenitorzellen eine entscheidende Rolle. Sie differenzieren sich zu Endothelzellen, die zunächst ein primitives Gefäßlabyrinth bilden. Im Embryo differenzieren sich Endothelzellen aus dem pluripotenten Angioblasten. Im erwachsenen Knochenmark differenzieren sie sich aus zahlreichen differenzierteren Vorläuferzellen (endotheliale Progenitorzelle, Mesangioblast, erwachsene Progenitorzelle sowie Seitenpopulationen)².

Einige Anzeichen sprechen dafür, dass Endothelzellen mit den Blutzellen einen gemeinsamen Ursprung im Hämangioblasten teilen³. Sie zeichnen sich durch gemeinsame Zellmarker, gemeinsame Signale und einen nicht unerheblichen Einfluss auf einander aus. Lange Zeit war die Wissenschaft der Meinung, Gefäßbildung aus endothelialen Progenitorzellen sei nur im Embryo vorhanden, während der entscheidende Mechanismus im Erwachsenen der des Aussprossens aus reifen Blutgefäßen sei. Neuere Untersuchungen belegen aber ganz klar, dass endotheliale Progenitorzellen sowohl im Embryo, als auch im ischämischen oder bösartig bzw. entzündlich veränderten Organismus ebenfalls eine Rolle spielen.

3.3 Differenzierung der Endothelzellen

3.3.1 Arterio-venöse Differenzierung

Ein entscheidender Schritt nach der Differenzierung der endothelialen Progenitorzellen zu Endothelzellen ist die weitere Organisation und Spezifizierung des primordialen Gefäßsystems und seine Polarisierung hinsichtlich Zu- und Abfluss des Blutes. Hierbei spielt das Ephrin-/ Eph-Rezeptor-System eine zentrale Rolle. EphrinB2 wird von arteriellen Endothelzellen und Glattmuskelzellen gebildet, während EphB4, ein Rezeptor für EphrinB2, ausschließlich in Venen exprimiert wird. Damit ist das Ephrin-/Eph-Rezeptor-System entscheidend für die arterio-venöse Differenzierung⁴⁻⁸. Diese Identifikation hat auch die lange vorherrschende Meinung widerlegt, Kapillaren seien hinsichtlich einer arteriellen oder venösen Differenzierung „neutral“. Die Expression von EphrinB2 endet genau in der Mitte der Strecke zwischen Arteriole und postkapilärer Venole, was dafür spricht, dass selbst Kapillarabschnitte hinsichtlich arterio-venöser Differenzierung heterogener Natur sind¹.

Arterien und Venen unterscheiden sich wahrscheinlich nicht nur hinsichtlich ihres Wandaufbaus und des Druckes, dem sie ausgesetzt sind, vielmehr stellen die sie auskleidenden Endothelzellen und die sie umgebenden glatten Muskelzellen eigene Zellpopulationen dar. Belegt sind beispielsweise Unterschiede hinsichtlich der geweblichen Herkunft von glatten Muskelzellen unterschiedlicher Gefäßareale: Die glatten Muskelzellen, die die großen thorakalen Gefäße umgeben, entstammen dem Neuroektoderm, während die glatte Muskulatur der Koronararterien beispielsweise epicardialer Herkunft und andere Gefäßmuskulatur mesenchymalen Ursprungs ist⁹.

3.3.2 Organspezifische Differenzierung

Die Population der Endothelzellen ist heterogen. Die Unterschiede können organspezifisch, gefäßgrößenspezifisch oder altersspezifisch hervortreten. Diese Vielfalt macht Sinn, da sie die Grundlage für die Kommunikation der Endothelzelle mit dem sie umgebenden Organgewebe darstellt und Blutgefäße verschiedener Organe sehr unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen haben¹⁰. Die Unterschiede sind teils morphologischer Natur. Endothelzellen können je nach Aufgabe im Gefäß fenestriert, kontinuierlich oder diskontinuierlich angeordnet sein, ihre Größe variiert erheblich. Hinsichtlich der Ausprägung von interendothelialen Adhäsionsmolekülen, des Vorhandenseins oder Fehlens von Membranen an den Fenestrationsstellen oder der Zusammensetzung der Gefäßwand hat die Aussage bestanden, dass es fast so viele Variationen wie Organe oder Gewebe gibt¹¹.

Noch weiter ist das Spektrum der Variationen, wenn man nicht die morphologischen, sondern die funktionellen Unterschiede sucht. Endothelzellen spielen wichtige Rollen bei Vorgängen wie Vasokonstriktion und Vasodilatation, Blutgerinnung und Fibrinolyse, Leukozytenchemotaxis und –Diapedese, Entzündung und Wundheilung, Atherogenese und Lipoproteinkatabolismus sowie bei der Antigenpräsentation im Immunsystem¹². Diese funktionelle Vielfalt spiegelt sich in einer Vielfalt organspezifischer Antigene von Endothelzellen wider¹³. Neuere Untersuchungen mittels in vivo Phagendarstellung haben zur Identifizierung dieser Oberflächenmoleküle geführt^{14,15}.

Bezogen auf die organspezifischen Funktionen erstreckt sich das Spektrum vom Aufbau einer dichten Barriere zwischen Blutgefäßsystem und Organ (Blut-Hirn-Schranke) bis hin zur Bildung von hochgradig fenestrierten Sinusoiden in der Leber, deren Aufgabe ein größtmöglicher Austausch von Metaboliten und Giftstoffen zwischen Kupferschen Sternzellen, den Portalvenenästen und den Hepatozyten ist^{16,17}.

Aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, wie es dazu kommt, dass eine aus einer pluripotenten Progenitorzelle entstandene Endothelzelle organspezifische Eigenschaften erhält. Ein wichtiger Schlüsselbegriff hier ist sicherlich der des Microenvironments, also der Lokalen Voraussetzungen hinsichtlich Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren und interzellulärer Kommunikation. Belegt wird die These der interzellulären Kommunikation vor allem durch heterotope Transplantationsversuche. Werden beispielsweise zerebrale Blutgefäße in periphere Gewebe transplantiert, reduzieren sie die Zahl ihrer tight-junctions, öffnen also die interzellulären Kontakte, während Gefäße aus peripheren Geweben, implantiert ins Gehirn, für zerebrale Gefäße charakteristische tight-junctions im Sinne einer Blut-Hirn-Schranke entwickeln¹⁸. Analoge Ergebnisse fanden sich bei Versuchen, in denen Herzgewebe ins Ohr transplantiert wurde. Die einsprossenden Gefäße bildeten Von-Willebrand-Faktor, welcher normalerweise von aurikulären Gefäßen nicht exprimiert wird¹⁹.

Eine andere interessante Entdeckung hinsichtlich endothelialer Differenzierungsmechanismen ist die Entdeckung eines Wachstumsfaktors, der ausschließlich von endokrinen Drüsen gebildet wird. Das VEGF der endokrinen Drüsen (EG-VEGF) ist funktionell ähnlich, aber strukturell unterschiedlich zum VEGF-A und agiert wahrscheinlich über unterschiedliche Rezeptoren. Es wird ausschließlich von steroidalen Drüsen gebildet, wirkt mitogen, motogen und morphogen auf Endothelzellen aus dem adrenalen Kortex und hat bislang keinen Einfluss auf aortale Endothelzellen gezeigt²⁰.

Aus dieser Entdeckung heraus erwächst die Frage, welche weiteren, organspezifischen angiogenen Moleküle noch existieren und ob deren medikamentöse Manipulation ein möglicher Weg zur zum Beispiel organspezifischen Tumorthherapie sein kann.

Eine weitere Frage ist, inwieweit Endothelzellen mit dem sie umgebenden Gewebe aktiv kommunizieren. Ihre Rolle als Signalempfänger konnte anhand einiger Beispiele belegt werden. Doch wie sieht es hinsichtlich endothelialer Signale an das sie umgebende Gewebe aus? Endothelzellen kommunizieren über die Produktion zahlreicher humoraler und Wachstumsfaktoren, Zytokinen und durch die Expression von Oberflächenmolekülen mit den sie umgebenden Zellen²¹. So führt die Unterbrechung des VEGF-Signalweges in der Niere zur Verkleinerung der glomerulären Knäule und Reduktion der Anzahl der Nephrone, während eine Induktion der Expression von VEGF im Mesenchym der Lunge zur Größenzunahme zentraler Gefäße bei Reduktion terminaler Knospen und Störung der Differenzierung von Typ-I-Alveolarmakrophagen führt²²⁻²⁴. Diese Beispiele deuten auf reziproke endotheliale Signale hin, schließen aber keinesfalls indirekte Effekte durch die Veränderung von Perfusion und Nutrition aus¹⁰.

3.4 Die Rolle der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte

Endothelzellen erscheinen sehr lang, dünn und vulnerabel. Dennoch sind sie die entscheidenden Bausteine der Gefäße, sorgen sie doch für ausreichenden Bluttransport im ganzen Körper. Sie haben Lebenszeiten von mehreren Jahren und können bei entsprechendem Reiz schnell und koordiniert aussprossen oder Defekte regenerieren. Diese Fähigkeiten beruhen auf Kommunikation untereinander und mit den Zellen innerhalb und außerhalb der Gefäße. Endothelzellen nehmen Unterschiede von Blutfluss und -druck wahr und interagieren mit der sie umgebenden Gefäßwand, also glatten Muskelzellen, Perizyten und der extrazellulären Matrix (ECM). Die interzellulären Kontakte der Endothelzellen über Cadherine, adherens-junctions und Claudine, sowie Occludin und Jam-I in tight-junctions sorgen für mechanische Belastbarkeit und bilden eine Permeabilitätsbarriere. Beim Aussprossen von Endothelzellen müssen alle diese Verbindungen gelöst und nach Bildung des Sprosses wieder aufgebaut werden. Es hat sich herausgestellt, dass die Unterbindung der Reorganisation dieser Zell-Zell-Kontakte die tumorinduzierte Angiogenese unterbinden kann. Dabei konnte insbesondere gezeigt werden, dass VEGF und Angiopoietin-2 einen destabilisierenden, Angiopoietin-1 einen stabilisierenden Effekt auf diese Zell-Zell-Kontakte hat. Aus dieser Erkenntnis ergeben sich die therapeutischen Potentiale der angiostatischen, sowie der angiogenen Therapie von Krankheiten wie Sepsis, Entzündung, Schlaganfall oder Tumorkrankheiten²⁵. Neben TGF- β exprimieren glatte Muskelzellen Angiopoietin-1 (Ang-1), welches als Inhibitor der Angiogenese und als Stabilisator eines ruhenden, stabilen Gefäßes agiert. Seine Wirkung entfaltet Ang-1 über die Rezeptortyrosinkinase Tie-2. Unterbrechung des Ang-1-Tie-2-Systems führt im Embryo zu letalen Gefäßdefekten mit gestörter Rekrutierung von glatten Muskelzellen²⁶⁻²⁸. Das Ang-1-Tie-2-

System wird als wesentlicher Kommunikationsweg zwischen Endothelzelle und Perizyt/Glattmuskelzelle angesehen. Neben Ang-1 bindet an Tie-2 Angiopoietin-2 (Ang-2) und wirkt dort kompetitiv antagonistisch zu Ang-1. Ang-2 spielt eine wesentliche Rolle bei pathologischen Angiogenesevorgängen. Während Ang-1 im Wesentlichen von glatten Muskelzellen gebildet wird und parakrin auf Endothelzellen wirkt, wird Ang-2 hauptsächlich von Endothelzellen, aber auch von Perizyten und mesenchymalen Zellen gebildet. Im Sinne einer autokrinen Aktivierung inhibiert es die Gefäßstabilisierende Wirkung von Ang-1 und wirkt angiogen auf Endothelzellen. Beschrieben sind allerdings auch konzentrations- und einwirkdauerabhängige agonistische Effekte zu Ang-1 auf mesenchymale Zellen²⁹. In 2003 wurde gezeigt, dass murale Vorläuferzellen Tie-2 exprimieren, was zuvor als den Endothelzellen vorbehalten geglaubt wurde³⁰. Diese Fähigkeit scheinen die muralen Zellen im Laufe Ihrer Reifung zu verlieren, da reife Perizyten und Glattmuskelzellen keine Expression des Tie-2-Rezeptors mehr zeigen.

3.5 Rolle der extrazellulären Matrix

Einen ebenfalls entscheidenden Einfluss auf die Angiogenese hat die extrazelluläre Matrix (ECM), in der zum einen sekretorische Substanzen der Nachbarzellen auf die Endothelzelle wirken, die zum anderen durch die Endothelzelle selbst durch Sekretion angiogener Substanzen beeinflusst wird. Beispielsweise ergibt sich eine molekulare Erklärung für die anatomische Tatsache, dass Nerven und Arterien regelmäßig beieinander laufen darin, dass periphere Nerven die Proliferation von Endothelzellen und die arterielle Differenzierung der gebildeten Gefäße dadurch positiv beeinflussen, dass sie unter anderem VEGF in die sie umgebende extrazelluläre Matrix abgeben³¹.

In fast jedem Organ haben Blutgefäße eine spezielle Aufgabe, für welche die sie auskleidenden Endothelzellen mit bestimmten Eigenschaften ausgestattet sind. Die unterschiedliche Endothelfunktion wird aber nur zum Teil direkt durch Eigenschaften der Endothelzellen determiniert. Vielmehr ergeben sich in den einzelnen Organen erhebliche Unterschiede hinsichtlich der vorhandenen Konzentrationen an elementaren Angiogenesefaktoren wie VEGF oder Angiopoietin-1 (Ang-1). Dazu kommt, dass in den einzelnen Organen spezifische Substanzen mit Wirkung auf die dort ansässigen Endothelzellen gebildet werden²⁰.

Zur Ausbildung eines Endothelsprosses aus einem ruhenden Gefäß ist nicht nur die Lösung von interzellulären Kontakten der Endothelzellen notwendig, vielmehr hat auch die extrazelluläre Matrix einen regulierenden Einfluss auf die Bildung dieser Gefäßsprossen. Im ruhenden Gefäß umgibt das Endothel eine Basalmembran aus Kollagen IV, Laminin und anderen Komponenten,

die ebenfalls die muralen Zellen einhüllt. Zwischen den muralen Zellen bedingt eine interstitielle Matrix aus Kollagen I und Elastin eine gewisse Elastizität und Stabilität. Um das Aussprossen zu ermöglichen, muss diese ECM proteolytisch gespalten werden. Das Resultat ist eine neue Zusammensetzung der ECM nach dem Aussprossen von Endothelzellen. Sie enthält normalerweise in der Struktur des Kollagens versteckte Epitope des Kollagen IV, monomeres Kollagen und andere Substanzen, die wiederum die Migration von glatten Muskelzellen und Endothelzellen induzieren³².

So hat die proteolytische Zersetzung der ECM einen angiogenen Effekt. Dieser wird dadurch verstärkt, dass die Proteinase in der ECM gebundene Angiogenese-Aktivatoren wie den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), VEGF oder den transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β) freisetzen.

Da durch die Proteinase aber auch matrixgebundene Angiogeneseinhibitoren (TSP-1, Canstatin, Tumstatin, Endostatin, Plättchenfaktor-4) freigesetzt werden, erklärt sich der stark kontext- und konzentrationsabhängige Effekt der Proteinase auf die Angiogenese¹.

3.6 Stabilisierung der Endothelsprossen

Ebenso wichtig für die Angiogenese wie das endotheliale Aussprossen ist die folgende Stabilisierung der Sprossen durch Perizyten und Glattmuskelzellen mit der resultierenden Regulation von Proliferation, Blutfluss und Permeabilität. Hier haben der plättchenhergeleitete Wachstumsfaktor (PDGF)-B und sein Rezeptor PDGFR- β entscheidenden Einfluss auf die Rekrutierung muraler Zellen³³. Eine fehlende oder fehlerhafte Stabilisierung der Endothelschläuche aufgrund Fehlens von PDGF- β führt bei Embryos zur Erweiterung der Gefäße, zu Blutungen und Hypoxie³⁴. Es ist mittlerweile unbestritten, dass der Zell-Zell-Kontakt zwischen Endothelzelle und Pericyt oder glatter Muskelzelle im Sinne einer Interaktion zu verstehen ist. Gut belegt ist der Einfluss von endothelial gebildetem TGF- β auf Wachstum und Differenzierung von sie umgebenden Perizyten oder glatten Muskelzellen³⁵. Ebenso konnte in umgekehrter Richtung ein Effekt hinsichtlich dem Endothelzellüberleben für pericytär gebildetes VEGF nachgewiesen werden, welches klinisch z.B. bei der Neugeborenenretinopathie eine Rolle spielt³⁶.

3.7 Hypoxie als Angiogenesestimulus, die Hypoxie-induzierbaren Faktoren (HIF)

Im entstehenden Gefäßbett ist neben der Stabilisierung und Polarisierung die Expansion die dritte große Entwicklungsachse. Hierbei ist Hypoxie der entscheidende Stimulus. Während in frühen

Entwicklungsstadien alle Zellen noch durch Diffusion ausreichend oxigeniert werden können, wird mit zunehmender Größe des Embryos die Perfusion notwendig. Der zentrale Faktor der Auslösung und Steuerung von Angiogenese durch Hypoxie ist der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF-1)³⁷.

Bereits vor mehr als 80 Jahren haben Wissenschaftler sich mit dem Zusammenhang von muskulärer Aktivität und der Kapillardichte im Muskel beschäftigt³⁸. Diese Ergebnisse wurden durch Arbeiten unterstützt, in denen aktiv Einfluss auf die metabolische Aktivität der Muskulatur genommen wurde und der Effekt auf die Kapillardichte gemessen wurde^{39,40}.

Ein Krankheitsbild, bei dem zum einen der Zusammenhang zwischen Kapillardichte und Sauerstoffversorgung, zum anderen der wichtige Stabilisierungseffekt muraler Zellen auf primäre Gefäßsprossen deutlich wird, ist die beatmungsassoziierte Blindheit bei unreifen Neugeborenen oder Frühgeborenen-Retinopathie. Hier kommt es nach Absetzen einer Beatmung mit hohen Sauerstoffpartialdrücken reaktiv zu einer pathologischen Angiogenese mit retrolentikulärer Fibroplasie und konsekutiver Blindheit oder erheblicher Sehstörung⁴¹.

Der Hintergrund dieser Erkrankung ist ein Zwei-Phasen-Prozess, der im Zeitfenster zwischen Gefäßentstehung und Reifung der Gefäßvorläufer abläuft, also dem Zeitraum, in dem unstabilisierte Endothelsprossen die Retina mit Sauerstoff versorgen.

Je nach dem, wann die Frühgeburtlichkeit die physiologischen Abläufe stört, resultiert ein unterschiedlicher Grad der Sehstörung. Physiologischerweise wandern Blutgefäße von der optischen Scheibe zur ora serrata ca. ab der 16. Schwangerschaftswoche⁴². Die Vaskulogenese in der Retina erstreckt sich im Folgenden von der nasalen ora serrata (36. Woche) bis zur Temporalen ora serrata (39.-1. Woche). Die Unterbrechung dieser Vorgänge hat je nach Zeitpunkt der Frühgeburtlichkeit Folgen unterschiedlichen Ausmaßes⁴³.

In der ersten Phase der Erkrankung kommt es zu einer hyperoxischen Vasoobliteration der entstehenden Gefäße, die durch Sauerstoffpartialdrücke ausgelöst sind, die höher als in-utero sind. Dieser in seinem Ausmaß übermäßige Untergang von Blutgefäßen resultiert in einer retinalen Hypoxie mit Aktivierung angiogener Signale (VEGF, bFGF, TGF- α , TNF- α), wobei der Aktivierung von VEGF sicherlich eine Hauptrolle zukommt. Durch diese Aktivierung wird die zweite, die proliferative Phase der Erkrankung ausgelöst⁴⁴.

Grundlage dieses Phänomens ist die Anpassung der Vaskularisierung an den Sauerstoffbedarf und die erhöhte Abhängigkeit nicht stabilisierter Gefäßvorläufer von angiogenen Signalen.

Weitere Beispiele für hypoxie-induzierte Angiogenese finden sich in der Tumorentstehung, auch wenn die Hypoxie hier sicherlich nicht den einzigen Stimulus darstellt. Trotzdem zeigten auch

hier frühe Arbeiten, dass sich in zahlreichen Tumoren eine schwere Hypoxie entwickelt, und dass zahlreiche angiogene Faktoren gebildet und sezerniert werden^{45,46}.

Ebenso belegen Untersuchungen auf dem Gebiet der Wundheilung, dass der Schaden im Kapillarnetz bei Wunden eine Gewebshypoxie zur Folge hat, die zum Anstoß von Wundheilungsmechanismen führt. Eine Beeinflussung des Sauerstoffdrucks im Wundbett führt zur Beeinflussung der Wundheilung⁴⁷. In späteren Untersuchungen ließ sich dieser Mechanismus auch auf die Kultur von medullären Makrophagen in Hypoxie übertragen, die unter anderem durch die Bildung angiogener Faktoren maßgeblich an der Wundheilung beteiligt sind⁴⁸.

Die frühen Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Hypoxie und Angiogenese ließen zunächst offen, ob der Sauerstoff selbst oder der Einfluss der Hypoxie auf den Metabolismus und damit beispielsweise die Anhäufung anaerober Stoffwechselprodukte der Trigger der Angiogenese war⁴⁹. Die Tatsache, dass die hormonelle Antwort auf Hypoxie, wie sie bei der Regulation der Sauerstofftransportkapazität über das Hormon Erythropoietin zu finden ist, einen außerordentlich dynamischen Charakter mit einem hundertfachen Anstieg innerhalb von Stunden nach hypoxischer Stimulation hat, spricht für einen sehr reagiblen, dynamischen Prozess der Sauerstoffmessung in den Zellen⁵⁰. Die weitere Untersuchung der Freisetzung von Erythropoietin als Hypoxiereaktion brachte eine Reihe interessanter Ergebnisse. So konnte sie nicht durch Inhibitoren der mitochondrialen Atmungskette, wohl aber durch Ionen der Übergangsmetalle wie Kobalt induziert werden^{51,52}.

Die weitere Erforschung dieses Komplexes machte das Vorhandensein eines allgemeinen Sauerstoffsensors, der die nachfolgenden Reaktionen triggert, wahrscheinlich. Dieser gemeinsame Prozess wurde als transkriptionaler Komplex HIF-1 identifiziert und stellt die gemeinsame Kontrolle der transkriptionalen Regulation sowohl des Erythropoietins als auch der Schlüsselsubstanzen der Angiogenese dar. Das Ergebnis der Arbeiten zu diesem Komplex war, dass die Sauerstoffspannung selbst den Auslöser für die hypoxiebedingten Reaktionen darstellt, vermittelt und reguliert über HIF-1⁵³⁻⁵⁶.

3.7.1 Struktur, Funktion und Regulation von HIF

Der DNA-bindende Transkriptionsfaktor HIF-1, ist ein $\alpha\beta$ -Heterodimer, welches u.a. die hypoxievermittelte Aktivität des Erythropoietin³-Verstärkers vermittelt^{57,58}. Generell gilt das HIF-System als Schlüsselregulator zahlreicher sauerstoffabhängiger Prozesse. Dazu zählen neben der Angiogenese zahlreiche zelluläre und systemische Antworten auf Hypoxie^{59,60}.

Die beiden Untereinheiten von HIF-1, HIF-1 α und HIF-1 β existieren in einer Serie von Isoformen, die an verschiedenen Genorten codiert werden. HIF-1 β -Untereinheiten sind reguläre nukleäre Proteine, während HIF-1 α -Untereinheiten hypoxieinduzierbar sind. Unter den drei HIF-

α -Isoformen erscheinen HIF-1 α und HIF-2 α eng verwandt und sind beide in der Lage, mit Hypoxie-Responsiven-Elementen (HRE) in Genpromotoren zu interagieren^{61,62}. HIF-3 α dagegen scheint in die negative Regulation der Hypoxieantwort involviert zu sein. Dies geschieht wahrscheinlich über ein alternatives Splicingprodukt, welches als inhibitorisches PAS-Domänen-Protein bezeichnet wird⁶³. Die Regulation der Aktivität der HIF- α -Untereinheiten geschieht in einem mehrschrittigen Prozess, in dem sich Veränderungen hinsichtlich Aktivität, Abbau, mRNA-Splicing und subzellulärer Lokalisation vereinen⁶⁰. Neuere Untersuchungen konnten eine unerwartet direkte Regulation der Aktivität von HIF- α Untereinheiten durch Sauerstoff zeigen. Die Aktivität der HIF- α -Untereinheiten wird durch eine Reihe von eisenabhängigen, nicht-Häm-Oxygenasen durch spezifische, sauerstoffabhängige Hydroxylierung reguliert. Die Abhängigkeit der Hydroxylierung von Sauerstoff stellt hierbei den eigentlichen Angriffspunkt für Sauerstoff in die Regulation von HIF-1 dar⁶⁴⁻⁷². In den Oxygenasen ist Fe(II) im katalytischen Zentrum lose gebunden, was zur leichten Austauschbarkeit durch andere Ionen, z.B. Kobalt führt. Dieser Austausch erklärt die oben erwähnte Induzierbarkeit der Hypoxieantwort durch Kobaltionen. Der durch die Hydroxylasen vermittelte Abbau von HIF kann nach Einbau von Kobalt in das aktive Zentrum der Oxygenasen nicht stattfinden, die Akkumulation von HIF führt zur hypoxischen Reaktion.

Die sauerstoffabhängige Hydroxylierung von zwei Prolinresten (Pro402 und Pro564 in humanem HIF-1 α) vermittelt die Interaktion mit dem Von-Hippel-Lindau E3-Ubiquitin-Ligasekomplex (VHL), der HIF-1 α für den proteasomalen Abbau freigibt^{66,70-72}. Der extrem zügige Abbau von HIF-1 α in oxigenierten Zellen lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass jeder der beiden Prolinreste unabhängig mit VHL E3 interagieren kann, was zur extrem schnellen Proteolyse von HIF-1 α führen kann⁶⁶.

Ein weiterer Angriffspunkt für die Regulation der Aktivität von HIF-1 α neben dessen proteolytischer Zerstörung ist die Inhibierung der transkriptionalen Aktivität von HIF-1 α .

Hier führt die β -Hydroxylierung eines Asparaginrestes an der C-terminalen Aktivierungsdomäne von HIF- α (Asn803), katalysiert durch eine HIF-Asparaginyhydroxylase (FIH, HIF-inhibierender Faktor), zur Blockierung der C-terminalen Aktivierungsdomäne. Damit wird die für die transkriptionale Aktivierung entscheidende Interaktion mit dem Koaktivator P300 inhibiert^{64,73}.

Als Beispiel für den Effekt von HIF sei dessen Einfluss auf Bildung, Abbau und Funktion von VEGF genannt. Die Transkription von VEGF wird bei Hypoxie durch HIF heraufreguliert^{55,56}. Die Stabilität der VEGF mRNA wird durch die Bindung von Proteinen an spezifische Sequenzen im 3'UTR beeinflusst⁷⁴. Des Weiteren wird die Wirkung von VEGF durch die

hypoxieinduzierbare Expression des VEGF-Rezeptors Flt-1, und die post-transkriptionale Regulation des KDR-Rezeptors reguliert^{75,76}.

3.8 In dieser Arbeit verwendete Wachstumsfaktoren und deren Rolle bei der Angiogenese

3.8.1 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF

3.8.1.1 Die biologische Wirkung von VEGF

Der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) ist eine Schlüsselsubstanz sowohl der physiologischen, als auch der pathologischen Angiogenese^{77,78}. Die biologischen Effekte können über mehrere Rezeptortyrosinkinasen (RTK) vermittelt werden, von denen die VEGF-Rezeptoren (VEGFR) VEGFR-1 und VEGFR-2 zentrale Rollen bei der Angiogenese einnehmen. Die Inhibition des VEGF-Effekts ist Gegenstand vieler Untersuchungen zur angiostatischen Therapie unter anderem malignen Erkrankungen.

Die Abkürzung VEGF wird in der vorliegenden Arbeit synonym zu VEGF-A benutzt. Das VEGF-Homolog VEGF-A gehört zu einer Familie von Substanzen, zu der neben „placental growth factor“ (PLGF) die VEGF-Homologe VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D und VEGF-E gehören. VEGF-A kommt dabei die Rolle der Schlüsselsubstanz beim Wachstum von Blutgefäßen zu, VEGF-C und VEGF-D regulieren überwiegend die lymphatische Angiogenese^{79,80}.

VEGF ist ein zentraler Wachstums- und Überlebensfaktor für Endothelzellen, was in zahlreichen in-vivo- und in-vitro-Experimenten gezeigt werden konnte⁸¹. In-vitro wurde gezeigt, dass VEGF Endothelzellen vor Apoptose schützen kann. Diese Fähigkeit wird hauptsächlich über den Phosphatidylinositol (PI)-3 Kinase Signalweg vermittelt. Des weiteren induziert VEGF die Bildung des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 und A1 in endothelialen Zellen^{81,82}. In vivo sind die Effekte von VEGF als Überlebensfaktor entwicklungsabhängig. In neugeborenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass VEGF-Inhibition zu erheblichen apoptosebedingten Veränderungen im Gefäßsystem führte, während sich dieser Effekt in erwachsenen Mäusen nicht zeigte²².

Ein weiteres Beispiel für die VEGF-Abhängigkeit von Endothelzellen hat sich bei frisch entwickelten, aber noch nicht stabilisierten Gefäßen in Tumoren gezeigt. Die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zu Perizyten und die dadurch entstehende Stabilisierung des primitiven Endothelschlauches scheint das Schlüsselereignis zu sein, welches die Endothelzellen in ihrem Überleben unabhängig von VEGF macht^{83,84}.

Wenngleich die Endothelzellen ein zentrales Ziel von VEGF sind, so sind sie nicht die einzigen Zellen, auf die VEGF einen Effekt hat. Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass VEGF beispielsweise die Surfactantproduktion in alveolären Typ-II-Zellen stimuliert⁸⁵.

Ebenfalls Zielgruppe des VEGF sind die knochenmarksoriginären Zellen. VEGF fördert beispielsweise die Chemotaxis von Monocyten⁸⁶ und induziert die Bildung von Kolonien durch reife granulozytär-makrophagoide Progenitorzellen⁸⁷.

Neben diesen Effekten, die hinsichtlich des Effektes auf hämatopoietische Stammzellen weit reichender sind, als es hier ausgeführt werden kann, hat VEGF auch einen erheblichen Einfluss auf die Gefäßpermeabilität. Es ist in der Lage, die Permeabilität von Gefäßen bis hin zur Undichtigkeit zu erhöhen^{88,89}.

3.8.1.2 Isoformen des VEGF

Das menschliche VEGF-A-Gen besteht aus acht Exons, die von sieben Introns getrennt werden^{90,91}. Alternatives Splicing führt zur Translation von vier verschiedenen VEGF-A Isoformen (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆), die jeweils entsprechend ihres Suffix aus 121, 165, 189 und 206 Aminosäuren bestehen. Die häufigste Splicevariante ist das VEGF₁₆₅, welchem das Exon 6 fehlt. Dem VEGF₁₂₁ fehlen die Exons 6 und 7. Es gibt Berichte über seltenere Splicevarianten, wie ein VEGF₁₄₅ oder VEGF₁₈₃⁹².

Natives VEGF ist ein heparinbindendes, homodimeres Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 45kDa⁹³. Die Eigenschaften von nativem VEGF entsprechen weitgehend denen von VEGF₁₆₅; hinsichtlich Heparinaffinität und Löslichkeit in der Extrazellulären Matrix und nimmt es eine Mittelstellung innerhalb der Isoformen ein⁹⁴. Die kurze Isoform hat keine Heparinbindungsdomäne und ist frei diffusibel, wohingegen mit steigender Molekülgröße die Heparinbindung zunimmt, so dass die langen Formen an die extrazelluläre Matrix fixiert vorliegen und kaum diffundieren. Dieses ist wichtig für den Aufbau und die Fixierung von Gewebegradienten von VEGF.

Den beiden Isoformen, VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅ wird die Hauptrolle bei Angiogenese und Proliferation von Endothelzellen zugesprochen, wobei VEGF₁₂₁ ausschließlich an VEGFR-2 bindet⁹⁵.

3.8.1.3 Regulation der VEGF-Genexpression

Entscheidender Faktor für die Regulation der Expression des VEGF-Gens ist die Sauerstoffspannung. Die Expression von VEGF-Messenger-RNA (VEGF-mRNA) ist durch niedrige Sauerstoffspannung unter diversen pathophysiologischen Umständen induzierbar⁹⁶. Gut belegt ist, dass HIF-1 ein Schlüsselfaktor bei der Genregulation durch Hypoxie ist⁹⁷.

Die Expression von VEGF-mRNA wird durch zahlreiche Wachstumsfaktoren erhöht. Dazu zählen der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), TGF- α und TGF- β , der Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) und plättchenhergeleitete Wachstumsfaktor (PDGF). Die Vorstellung dabei ist, dass die parakrine oder autokrine Freisetzung dieser Substanzen synergistisch mit einer lokalen Hypoxie hinsichtlich der Freisetzung von VEGF in die Zellumgebung wirkt^{77,92}.

Des Weiteren wird die Produktion von VEGF von verschiedenen Zellen (beispielsweise synoviale Fibroblasten) durch zahlreiche inflammatorische Mediatoren induziert. Dazu zählen Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-6 (IL-6). Diese Beobachtung unterstützt die Rolle des VEGF als Mediator der inflammatorischen Angiogenese und Permeabilitätserhöhung⁹².

Einen weiteren wichtigen Einflussfaktor auf die Produktion von VEGF stellen onkogene Mutationen dar. Die onkogene Mutation oder Amplifikation von Ras führt zur vermehrten Expression von VEGF^{98,99} und stellt somit einen wichtigen, wenngleich auch nicht autonomen Faktor für progressives Tumorwachstum *in vivo* dar.

3.8.1.4 Die VEGF-Rezeptoren

3.8.1.4.1 VEGFR-1

Die Identifizierung VEGF-bindender Regionen geschah initial *in vivo* wie *in vitro* an der Zelloberfläche von vaskulären Endothelzellen¹⁰⁰. Später stellte sich heraus, dass diese Rezeptoren auch auf der Oberfläche von aus dem Knochenmark stammenden Zellen zu finden sind⁷⁷.

Wie weiter oben bereits kurz erwähnt wurde, wird die Wirkung von VEGF an Endothelzellen über die zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR im humanen System, Flk-1 im murinen System) vermittelt. Im Folgenden sollen die Abläufe an diesen Rezeptoren genauer betrachtet werden. Beide Rezeptoren haben sieben immunoglobulinartige Domänen im extrazellulären Anteil, eine singuläre transmembranäre Region und eine intrazelluläre Tyrosinkinasensequenz, die durch eine „kinase-insert-domain“ unterbrochen wird^{101,102}.

VEGFR-3, ebenfalls eine Rezeptortyrosinkinase, gehört zur selben Rezeptorfamilie, ist jedoch kein Rezeptor für VEGF-A. Es bindet vielmehr VEGF-C und VEGF-D und ist auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert⁷⁹. Neben den RTK interagiert VEGF mit Neuropilin.

VEGFR-1 (Flt-1) wurde als erster VEGF-Rezeptor entdeckt. Obwohl seine Beschreibung schon mehr als 10 Jahre zurückliegt, ist seine genaue Funktion noch immer umstritten¹⁰³. Das mag daran liegen, dass die Funktion und die Eigenschaften dieses Rezeptors eng mit dem Entwicklungsstadium des Individuums und dem Zelltyp der den Rezeptor tragenden Zelle verbunden sind (Endothelzelle vs. Knochenmarkzelle).

Die Expression von VEGFR-1 wird bei Hypoxie HIF-abhängig heraufreguliert⁷⁵.

VEGFR-1 bindet neben VEGF auch PLGF und VEGF-B, VEGFR-2 bindet neben VEGF noch VEGF-E, VEGF-C und VEGF-D^{100,104,105}. Die Bindungsregion auf VEGFR-1 für VEGF liegt in der zweiten immunoglobulinartigen Domäne¹⁰⁶. Als Antwort auf die Bindung von VEGF unterläuft VEGFR-1 einer schwachen Tyrosin-Autophosphorylierung^{103,107}. Von Park *et al.* wurde die These aufgestellt, VEGFR-1 sei kein Rezeptor von dem ein mitogenes Signal ausgehe. Vielmehr beschrieb er VEGFR-1 als eine Art „Köder“, der regulierend auf die Bindung von VEGF an VEGFR-2 wirkt¹⁰⁴. So ist auch die potenzierende Wirkung von PLGF auf den VEGF-Effekt zumindest partiell zu erklären. VEGF wird teilweise an der Bindung an VEGFR-1 gehindert und steht in größerem Maße für die Bindung an VEGFR-2 zu Verfügung. Diese modellhafte Vorstellung deckt sich mit der in vivo beobachteten, synergistischen Wirkung von VEGF und PLGF.

Es existiert eine lösliche Form des VEGFR-1, der die VEGF Wirkung inhibieren kann und auf den die Vorstellung einer „Köderfunktion“ ebenfalls anwendbar ist¹⁰⁸.

Betrachtet man die Rolle des VEGFR-1 in der Vaskulogenese, so zeigt sich, dass VEGFR-1-Knockout-Mäuse, zwischen dem 8. und 9. Lebenstag sterben. Endothelzellen entwickeln sich, bilden aber keine vaskulären Kanäle. Daneben fällt eine exzessive Proliferation von Angioblasten auf^{109,110}. Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass VEGFR-1 während der Embryonalentwicklung die VEGF-Effekte moduliert. Diese Einschätzung wird dadurch bekräftigt, dass eine Mutation, die im Fehlen der Tyrosinkinase-Domäne bei erhaltenem VEGF-Bindungsvermögen des VEGFR-1 besteht, nicht zum Abort oder zu Defekten führt¹¹¹. Allerdings ist die durch VEGF induzierbare Migration von Monozyten, welche ausschließlich Flt-1 exprimieren, bei dieser Mutation aufgehoben.^{111,112}

3.8.1.4.2 VEGFR-2

VEGFR-2 ist im humanen System synonym mit KDR (kinase insert domain region) und im murinen System mit Flk-1 (fms-like kinase-1). VEGFR-2 spielt eine zentrale Rolle in embryonaler Vaskulogenese, Angiogenese und Hämatopoese, was durch das völlige Fehlen von Vaskulogenese und eine fehlerhafte Ausbildung von Blutinseln und organisierten Blutgefäßen in Flk-1-gendefizienten Mäusen und Letalität am 8. bis 9. embryonalen Tag eindrucksvoll bewiesen wird¹¹³. Die mitogenen, angiogenen und permeabilitätssteigernden Effekte von VEGF werden hauptsächlich durch VEGFR-2 vermittelt. VEGFR-2 unterläuft, je nach Ligandenbindung, einer Dimerisierung und ligandenabhängigen Phosphorylierung, was in einem mitogenen, chemotaktischen und antiapoptischen Signal resultiert¹¹⁴.

In der Endothelzelle wird durch VEGF die Phosphorylierung zahlreicher Proteine induziert¹¹⁵. Dazu zählen Phospholipase C- γ , PI-3 Kinase, Ras GTP-Kinase-aktivierendes Protein und die Src-Familie^{115,116}. Endothelzellwachstum wird durch Aktivierung des Raf-Mek-Erk-Weges durch VEGF induziert. VEGFR-2-spezifisch, aber ungewöhnlich ist, dass für die Aktivierung dieses Weges nicht Ras, sondern Proteinkinase-C benötigt wird¹¹⁷.

VEGF-E, welches spezifisch VEGFR-2 bindet, entfaltet die volle mitogene, und permeabilitätssteigernde Wirkung von VEGF auf Endothelzellen, während PLGF, das selektiv VEGFR-1 bindet, beide Wirkungen komplett fehlen¹¹⁷. VEGFR-2, nicht aber VEGFR-1 ist notwendig, um die antiapoptische Wirkung von VEGF auf Umbilikalvenen-ECs zu vermitteln⁸². Diese Wirkung wird über den PI-3-Kinase-Akt-Weg vermittelt⁸².

3.8.1.4.3 Neuropilin

Bereits ältere Untersuchungen zeigten, dass Endothelzellen und bestimmte Tumorzellen VEGF-Bindungsstellen besitzen, die sich hinsichtlich Affinität und Molekülmasse von den beiden bekannten Rezeptortyrosinkinasen unterscheiden. An diesen Rezeptoren bindet VEGF₁₂₁ nicht, was dafür spricht, dass Basissequenzen, die von Exon 7 kodiert werden, für die Bindung an diesem Rezeptor benötigt werden¹¹⁸. Dieser Isoform-spezifische VEGF-Rezeptor wurde von Soker *et al.* als Neuropilin-1 (NRP-1) identifiziert¹¹⁹. Neuropilin-1 ist ein Rezeptor für Semaphorine, Proteine die eine wichtige Rolle bei der Organisation des neuronalen Axonwachstums spielen. Dort, wo NRP-1 mit VEGFR-2 ko-exprimiert war, erhöhte NRP-1 die Bindung von VEGF₁₆₅ an VEGFR-2 und die VEGF₁₆₅-vermittelte Chemotaxis. Die Vorstellung dabei ist, dass NRP-1 VEGF₁₆₅ so präsentiert, dass die VEGFR-2 vermittelte Signaltransduktion effektiver ablaufen kann¹¹⁹.

So erklärt die Existenz von NRP-1 zumindest teilweise die gegenüber VEGF₁₂₁ höhere mitogene Potenz von VEGF₁₆₅. Bisher gibt es keinen Beweis für eine Signalkaskade von NRP-1 nach

Bindung von VEGF. Die Rolle von NRP-1 in der Embryonalentwicklung wurde durch NRP-1-Knockout-Mäuse gezeigt, die zahlreiche Störungen in der Entwicklung des Gefäßsystems und embryonalen Abort zeigten¹²⁰.

3.8.1.5 VEGF in Physiologischer Angiogenese

Die zentrale Rolle von VEGF bei der embryonalen Vaskulogenese und Angiogenese wurde 1996 durch zwei Studien gezeigt. Die Deletion eines singulären Allels des VEGF-Gens führte zum Abort der VEGF^{+/-}-Mäuseembryos am 11 bis 12. Tag^{121,122}. Die Inaktivierung des Gens für PLGF bzw. VEGF-B führte zu keinen offensichtlichen Entwicklungsstörungen im Embryo^{123,124}.

Ebenso wie in der Embryonalphase, spielt VEGF auch in der Postnatalperiode eine essentielle Rolle. Die Inhibition von VEGF bei Mäusen führte zu Wachstumsstopp mit konsekutiver Sterblichkeit, hauptsächlich wegen Nierenversagens¹²⁵. Der Einsatz von VEGF-Antikörpern führte zu gestörter glomerulärer Entwicklung²⁴. Die Inhibition der VEGF-Rezeptortyrosinkinase mittels eines niedermolekularen Inhibitors (SU5416) bei Ratten führt zu gestörtem Lungenwachstum und Lungen-selektiver Endothelapoptose mit konsekutiver pulmonaler Hypertonie¹²⁶.

Interessanterweise zeigte die postnatale Neutralisierung von VEGF bei Primaten, abgesehen von gestörtem Längenwachstum und gestörter ovarieller Angiogenese, keine entscheidenden Defekte.¹²⁷ Die Störung des Längenwachstums bei Primaten lässt sich folgendermaßen erklären: Die enchondrale Ossifikation ist der entscheidende Mechanismus beim Längenwachstum der langen Röhrenknochen. Die Chondrozyten der Epiphysenfuge zeigen eine exzessive Produktion von VEGF. An dem resultierenden VEGF-Gradienten entsprossen metaphysäre Blutgefäße in die Wachstumsfuge ein. Wird die VEGF-Wirkung blockiert, findet praktisch keine Blutgefäßinvasion und konsekutiv kein Längenwachstum des Knochens statt^{127,128}.

3.8.1.6 VEGF in pathologischer Angiogenese

Die In-situ-Hybridisierung zahlreicher menschlicher Tumoren für VEGF zeigte eine deutliche Hochregulierung von VEGF mRNA^{77,129}. 1993 zeigten Kim *et al.*, dass sich bei Nacktmäusen das Wachstum verschiedener Tumore durch die Gabe von neutralisierenden VEGF-Antikörpern inhibieren ließ¹³⁰. Seither zeigte die Inhibition der VEGF-Wirkung bei vielen anderen Tumorzelllinien eine Wachstumsinhibition⁷⁷. Die VEGF-Inhibition ist ein vielversprechender neuer Therapieansatz der biologischen Tumorthherapie sowohl solider, als auch hämatologischer maligner Erkrankungen.

Wie am Anfang der Einleitung erwähnt wurde, spielt die VEGF-getriggerte Angiogenese auch bei intraokularen neovaskulären Syndromen (INS) eine Rolle. Die Hauptursachen dieser Syndrome

sind Diabetes mellitus, Verschluss der retinalen Zentralvene oder Frühgeburtlichkeit mit erforderlicher Sauerstofftherapie. Das Erscheinungsbild des INS reicht von Glaskörperhämorrhagien über Netzhautablösungen bis zum Glaukom oder zur Blindheit¹³¹. Unabhängig von der Ursache des INS ist die retinale Hypoxie der entscheidende pathogenetische Mechanismus. Das Resultat sind erhöhte VEGF-Konzentrationen, und folgende Neovaskularisierung¹³²⁻¹³⁴.

Da VEGF neben der angiogenen Wirkung auch die Gefäßpermeabilität erhöht, ist es ein Mediator entzündlicher Vorgänge¹²⁹. Epidermale Keratinozyten exprimieren bei der Wundheilung und bei Psoriasis, also Bedingungen angiogener Aktivierung und Permeabilität, in hohem Maße VEGF¹³⁵. Interessanterweise führte die transgene Überexpression von VEGF in dermalen Keratinozyten zur Bildung geschlängelter postkapillarer Venolen, an denen gesteigerte Leukozytenreaktion (Rollen und Adhäsion) nachweisbar war, nicht jedoch zu einer augenscheinlichen Veränderung der Lymphgefäße¹³⁶.

Untersuchungen von ischämischen Hirninfarkten an verschiedenen Tiermodellen zeigten eine deutliche Zunahme der VEGF-Expression und eine Abhängigkeit von Infarktgröße und Ausdehnung des Hirnödems von VEGF. VEGF-Blockade konnte beide Parameter reduzieren^{137,138}.

3.8.2 Der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF, FGF-2)

3.8.2.1 Die Biologische Wirkung von FGF

Die biologische Wirkung von FGF besteht in der Induktion von Überleben, Proliferation Migration und Differenzierung primärer und stabiler Endothelzellen, wobei die genaue Wirkung stark vom genauen Typ der Endothelzelllinie abhängig ist¹³⁹.

FGF ist, genau wie VEGF in der Lage, Angiogenese in der chorioallantoischen Membran des Hühnerembryos zu induzieren. Untersuchungen hierzu ergaben, dass hierzu der Ras-MEK-MAPK-Signalweg entscheidend ist, da dessen spezifische Blockierung die FGF-induzierte Angiogenese inhibieren konnte¹⁴⁰.

3.8.2.2 Struktur und Transport von FGF

Der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor, auch als FGF-2 bekannt, ist das erste identifizierte angiogene Molekül überhaupt.¹⁴¹ Zur FGF-Familie gehören heute mindestens 20 verschiedene Faktoren, die sich hinsichtlich ihrer Primärstruktur zu 30-70% gleichen¹³⁹. Der saure Fibroblasten-Wachstumsfaktor, FGF-1, und FGF-2 sind die klassischen sekretorischen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Ihr transmembranärer Transport unterscheidet sie von den anderen sekretorischen Wachstumsfaktoren und geschieht im Gegensatz zu diesen nicht über den klassischen sekretorischen Apparat der Zellen, da die beiden FGF's im Gegensatz zu anderen sekretorischen Wachstumsfaktoren keine typischen cytoplasmatischen Signalsequenzen für den Transport nach extrazellulär besitzen¹⁴². Für die 18kDa-Isoform von FGF-2 wurde ein energieabhängiger Transportweg entdeckt, der exklusiv für FGF-2 und gänzlich unterschiedlich zu der Signalpeptid-vermittelten Exkretion anderer sekretorischer Peptide ist¹⁴³.

FGF hat eine hohe Affinität zu Heparansulfat-Proteoglykanen, die auf der Oberfläche der meisten Zellen und in der extrazellulären Matrix lokalisiert sind¹⁴⁴. Die Freigabe des in der ECM lokalisierten Pools an FGF ist von der Aktivität von Heparanasen abhängig und wird über diese reguliert. In.vivo- und in-vitro-Versuche haben gezeigt, dass die Heparansulfat-Proteoglykane auch als Korezeptoren für FGF wirken und Einfluss auf dessen Effekt haben können¹⁴⁵.

3.8.2.3 Die FGF-Rezeptoren

Der biologische Effekt von FGF wird über vier strukturverwandte Rezeptortyrosinkinasen (FGFR-1, -2, -3, -4) vermittelt, die breite Expressionsmuster aufweisen. Durch alternatives Splicing entstehen zahlreiche Rezeptorvarianten, die eine Vielzahl von Rezeptor-Ligand-Interaktionen vorstellbar machen¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

Da die Unterbrechung der für FGFR-1 und FGFR-2 codierenden Gene zum Untergang des Embryos noch vor der Gastrulation führen¹⁴⁹, war die Untersuchung ihrer spezifischen Wirkung auf die spätere Embryonalentwicklung und Angiogenese bislang nicht möglich.

Neuere Arbeiten konnten jedoch mittels Adenovirus-vermittelter Expression dominant FGFR-1-negativer Mäuse zeigen, dass FGFR-1 für Entwicklung und Unterhalt des Gefäßsystems des Embryos essentiell ist¹⁵⁰. Im Gegensatz dazu führte bei Mäusen die Inaktivierung der Gene, die für FGF-2 codieren, nur zu vermindertem Gefäßtonus und Blutdruck und nicht zu morphologischen Auffälligkeiten¹⁵¹.

Die Inaktivierung des Gens, welches für FGFR-3 codiert, führte zur Ausbildung skelettaler Abnormalitäten und Innenohrschäden mit Taubheit bei Mäusen¹⁵².

Bezüglich der Bindung von FGF-2 an FGFR-1 gibt es eine Reihe interessanter Interaktionen mit Heparin und Heparansulfat, welche die Affinität zum Rezeptor deutlich steigern. In deren Anwesenheit kommt es zur Ausbildung eines Komplexes aus zwei FGF-Molekülen mit zwei Rezeptoren¹⁵³. Diese Rezeptordimerisation führt zur intermolekulären Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinkinase und zur Aktivierung unterschiedlicher Signalkaskaden. Dazu gehören unter anderem der Ras-Signalweg, die Src-Tyrosinkinase-Familie, Phosphoinositid-3-kinase (PI3K) und der PLC Signalweg¹³⁹. Für FGFR-1 sind mindestens sieben solcher Phosphorylierungsstellen bekannt¹⁵⁴.

3.8.3 Der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β)

Eine große Gruppe von Substanzen mit Einfluss auf die angiogene Aktivität von Endothel- und anderen Gefäßzellen stellt die Familie der Transformierenden Wachstumsfaktoren- β (TGF- β) Moleküle dar. Der meist untersuchte Ligand aus dieser Familie ist TGF- β 1. Es trägt in niedriger Konzentration zur Angiogenese bei, indem es angiogene Faktoren und Proteinase induziert. In hoher Konzentration hemmt TGF- β 1 das Wachstum von Endothelzellen, fördert die Stabilisierung der Basalmembran und stimuliert Differenzierung und Rekrutierung von glatten Muskelzellen¹.

Wie bei vielen anderen Substanzen mit Einfluss auf die Angiogenese sind auch bei der TGF- β -Superfamilie mutationsassoziierte Krankheitsbilder bekannt. So führen verschiedene Mutationen im „bone morphogenic protein receptor“ (BMPR-2, ein Rezeptor der TGF-Rezeptorfamilie) zur primären pulmonalen Hypertonie, bei der histopathologisch pulmonale Arteriolen durch nach intraluminal wachsende Endothelzellen und glatte Muskelzellen stenotisch und okkludiert werden¹⁵⁵. Es gibt Befunde, die auf eine gemeinsame Beteiligung des Angiopoietin- und des BMP-Systems an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie hinweisen.

Erhöhte Ang1-Expression der glatten Muskulatur der Pulmonalarterien bei pulmonaler Hypertonie führen demnach zur Herabregulation von BMPR-1A in Endothelzellen und damit zu einer funktionellen Abschaltung des BMPR-Signalweges analog zu einer BMPR-2 Mutation¹⁵⁶. Als weitere vaskuläre Erkrankung, hervorgerufen durch Störungen des TGF-Systems, ist die Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (M. Osler) zu nennen, bei der die Mutation der TGF-Rezeptoren Endoglin sowie Alk-1 gezeigt wurden¹⁵⁷.

3.9 Weitere Angiogenese-relevante Wachstumsfaktoren

3.9.1 Die Angiopoietine

Auf die Stabilisierung und den Erhalt der neu entstandenen Gefäßsprossen hat neben PDGF mindestens ein weiteres System entscheidenden Einfluss. Der Tie2-Rezeptor bindet die Liganden Angiopoietin (Ang)-1 und Angiopoietin (Ang)-2. Ang-2 bindet spezifisch an Tie-2 und führt zu verschiedenen intrazellulären Signalen, je nach Zellpopulation. Ang-2 war ursprünglich nicht die Fähigkeit der Rezeptoraktivierung zugeordnet worden, da die zellulären Reaktionen in der Regel gering sind. Ang-1 führt zur Transphosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase und im weiteren Verlauf zur Phosphorylierung intrazellulärer Signalproteine. Unterbrechung des Ang-1-Tie-2-Systems führt im Embryo zu letalen Gefäßdefekten mit gestörter Rekrutierung von glatten Muskelzellen²⁶⁻²⁸. Ang-1 und Tie-2 gendefiziente Tiere sterben früh embryonal an einem Defekt des vaskulären Systems mit fehlender Organisation der primitiven Gefäßnetze¹⁵⁸. In 2003 wurde gezeigt, dass murale Vorläuferzellen Tie-2 exprimieren, was zuvor als den Endothelzellen vorbehalten geglaubt wurde³⁰. Diese Fähigkeit scheinen die muralen Zellen im Laufe Ihrer Reifung zu verlieren, da reife Perizyten und Glattmuskelzellen keine Expressierung des Tie-2-Rezeptors mehr zeigen.

Ein angiogener Effekt von Ang-1 kann unter anderem bei Gefäßwachstum in der Haut, minderdurchbluteten Gliedmaßen, Magengeschwüren und einigen Tumoren beobachtet werden. Vermutlich kann Ang-1 als endothelialer Überlebensfaktor angesehen werden. Darüber hinaus mobilisiert Ang-1 endotheliale Progenitorzellen (EPC) und hämatopoietische Stammzellen (HSC)¹⁵⁹. Interessanterweise gibt es Befunde über angiostatische Wirkungen von Ang-1 bei Angiogenese im Herzen und einigen Tumoren^{160,161}.

Dieser angiostatische Effekt von Ang-1 beruht wahrscheinlich auf einer Stabilisierung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte²⁵.

Ang-2 wird ein stimulierender Effekt auf unreife, wenig oder nicht stabilisierte Endothelzellen, wie sie in Tumorgefäßen zu finden sind, zugesprochen. Seine Wirkung besteht in der Lösung von Zell-Zell-Kontakten innerendothelial und zu den muralen Zellen, entgegengesetzt zur Wirkung von Ang-1^{162,163}. Die Wirkung von Ang-2 ist ebenfalls nicht einheitlich, sondern vom Kontext abhängig. Die Initiierung von Angiogenese in vivo durch VEGF z.B. scheint notwendig an das gleichzeitige Vorhandensein von Ang-2 gebunden zu sein, welches durch Lösung der Zellkontakte die Endothelzellen in einen angiogenen Phänotyp transformiert, welche sodann einem VEGF-Gradienten folgend aussprossen können. So kann Ang-2 synergistisch mit VEGF die Angiogenese, beispielsweise im Herzen stimulieren¹⁶⁴.

Fehlen aber andere angiogene Signale, führt Ang-2 zum Zelltod der Endothelzellen und zur Gefäßregression^{165,166,167}. Während Ang-1 im Wesentlichen von glatten Muskelzellen gebildet wird und parakrin auf Endothelzellen wirkt, wird Ang-2 hauptsächlich von Endothelzellen, aber auch von Perizyten und mesenchymalen Zellen gebildet. Im Sinne einer autokrinen Aktivierung inhibiert es die Gefäßstabilisierende Wirkung von Ang-1 und wirkt angiogen auf Endothelzellen. Beschrieben sind allerdings auch konzentrations- und einwirkdauerabhängige agonistische Effekte zu Ang-1 auf mesenchymale Zellen²⁹.

4 Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Mechanismen pulmonaler Angiogenese *in vitro* an primären, humanen, mikrovaskulären Lungenendothelzellen (HULMEC) allein, sowie in Kokultur mit primären, humanen, pulmonalvaskulären glatten Muskelzellen (PASMC). Voraussetzung dafür war die Etablierung und Charakterisierung eines dreidimensionalen Sphäroid-Zellkultursystems, welches Untersuchungen der *in vitro* Angiogenese erlaubte.

Folgende Ziele wurden bearbeitet:

- I. Etablierung des dreidimensionalen Sphäroid-Zellkultursystems mit den o.g. Zelltypen.
- II. Induktion der *in vitro* Angiogenese und histologische sowie Immunfluoreszenz-Charakterisierung der angiogenen Sprossen im Hinblick auf Morphologie und zelluläre Zusammensetzung.
- III. Vergleichende Untersuchungen der *in vitro* Angiogenese von Endothel Monokultur-Sphäroiden und Endothel-SMC-Kokultur-Sphäroiden unter Verwendung etablierter angiogener Faktoren.
- IV. Vergleichende Untersuchungen der *in vitro* Angiogenese von primären pulmonalen vaskulären Zellen und primären systemischen vaskulären Zellen.
- V. Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die pulmonale Angiogenese *in vitro*.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Zellkulturmaterial

- Zellkulturflasche 75cm² „Cell Star“ mit Filterdeckel, GREINER, Frickenhausen, Deutschland
- Zellkulturflasche 75cm² „Cell Star“ mit Beschichtung zur Suspensionskultur, mit Deckel, GREINER, Frickenhausen, Deutschland
- Zellkulturflasche 25cm² mit Filterdeckel, CORNING, Schiphol-Rijk, Holland
- Zellkulturschale 50cm² mit Deckel, CORNING, Schiphol-Rijk, Holland
- Konisches Röhrchen, Polypropylen, steril, 50 ml FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Konisches Röhrchen, Polypropylen, steril, 15 ml FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Flaschenaufsatzfilter, Porengröße 22 µm mit verschiedenen Gewindegrößen, MILLIPORE
- Cell Scraper, Griff 25cm, Klinge 1,8cm, CORNING, Schiphol-Rijk, Holland
- Serologische Pipette, steril, mit Spitze, 2 ml, FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Serologische Pipette, steril, mit Spitze, 5 ml, FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Serologische Pipette, steril, mit Spitze, 10 ml, FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Serologische Pipette, steril, mit Spitze, 25 ml, FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Serologische Pipette, steril, mit Spitze, 50 ml, FALCON, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Spritzenaufsatzfilter, steril, Porengröße 0,2 µm, PALL
- Pipettenspitze, blau, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitze, gelb, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitze, weiß, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Einkanalpipette, 0,5-10 µl, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Einkanalpipette, 10-100 µl, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Einkanalpipette, 100-1000 µl, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland

- Multipipette, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Aufsatz für Multipipette, 0,5 ml, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Aufsatz für Multipipette, 2,5 ml, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Aufsatz für Multipipette, 5 ml, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Aufsatz für Multipipette, 12,5 ml, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Reagiergefäß, 0,5 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
- Reagiergefäß, 1,0 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
- Reagiergefäß, 1,5 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
- Reagiergefäß, 2,0 ml, SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
- Zellkulturschrank Hera Cell, HERAEUS, Hanau, Deutschland
- Zentrifuge Micro 22R, HETTICH, Tuttlingen, Deutschland
- Zentrifuge Rotina 46R, HETTICH, Tuttlingen, Deutschland
- Inverses Mikroskop Wilovert, HUND, Wetzlar, Deutschland
- Dynabeads CD 31, endothelial cell, DYNAL, Hamburg, Deutschland
- Filtergaze Sefar Nitex, 20 µm, SEFAR, Neuenburg/Rhein, Deutschland
- Filtergaze Sefar Nitex, 100 µm, SEFAR, Neuenburg/Rhein, Deutschland
- Dispase 1,04 IE/mg, Bacillus Polymyxa, GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Dynal Magnetpartikelkonzentrator, für 2 ml-Gefäß, DYNAL, Hamburg, Deutschland
- Dynal Magnetpartikelkonzentrator, für 15 ml-Gefäß, DYNAL, Hamburg, Deutschland

5.1.2 Wachstumsfaktoren für die Zellkultur

- Fetales Kälberserum, PROMO CELL, Heidelberg, Deutschland
- Humanserum, PROMO CELL, Heidelberg, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin, PAN BIOTECH, Sydney, Australien
- L-Glutamin, PAN BIOTECH, Sydney, Australien
- VEGF, PROMO CELL, Heidelberg, Deutschland
- ECGS, PROMO CELL, Heidelberg, Deutschland
- Heparin, aus Schweinemucosa, SIGMA, München, Deutschland

5.1.3 Zellkulturmedien

- PBS ohne Calcium/Magnesium, 10x, SIGMA, München, Deutschland
- PBS mit Calcium/Magnesium, 10x, SIGMA, München, Deutschland
- Zellkulturwasser, steril, endotoxinfrei, SIGMA, München, Deutschland
- Gelatine, Research Grade, SERVA
- Trypsin/EDTA, 10x, PAN BIOTECH
- Dimethylsulfoxid, SIGMA, München, Deutschland
- EBSS 10x, SIGMA, München, Deutschland
- **Kulturmedium für HULMEC:**
 - MCDB 131 ohne L-Glutamin, GIBCO GmbH, Karlsruhe, Deutschland
 - 5% Humanserum
 - 5% FCS (Sigma F-7524, Lot 76H3300)
 - 1% P/S (Penicillin/Streptomycin)
 - 2% Glutamin
 - 90 mg/l Heparin
 - 5 ml/l ECGS
 - 0,1 ng/ml VEGF
- **Kulturmedium für PASMC**
 - Smooth Muscle Cell Growth Medium 2, Low Serum, PROMO CELL, Heidelberg, Deutschland
 - Supplement Mix C-39267 für SMC-Medium 2, PROMO CELL, Heidelberg, Deutschland
- **Methylcellulosemedium**
 - Basismedium für HULMEC
 - 20% Methylcellulose
- **Verdau-Medium zur Isolation der HULMEC:**
 - MCDB 131
 - 5% PBS, 5% Humanserum
 - 90 µg/ml Heparin
 - 0,5% ECGS
 - 0,1 ng/ml VEGF
 - 2 U/ml Dispase

5.1.4 Material für die Versuchsanordnungen

- 96-Loch-Platte für Suspensionskultur, U-Form, steril, mit Deckel, GREINER, Frickenhausen, Deutschland
- 24-Loch-Platte für Gewebekultur, steril, mit Deckel, CORNING, Schiphol-Rijk, Holland
- Mehrkanalpipette, 30-300µl, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Reagens-Reservoir für Mehrkanalpipette, steril, COSTAR, CORNING, Schiphol-Rijk, Holland
- Pipettenspitze, gelb, Eppendorf, abgeschnitten, EPPENDORF, Hamburg, Deutschland
- Sigmacote, SIGMA, München, Deutschland
- Tissue Tec Einbettmedium, SAKURA, Zoeterwoude, Holland
- Mowiol, CALBIOCHEM, San Diego, Californien, USA

5.1.5 Wachstumsfaktoren

- Recombinat Human FGF-basic, RELIA TECH, Braunschweig, Deutschland
- Recombinant Human TGF-β1, RELIA TECH, Braunschweig, Deutschland
- RECOMBINANT Human Angiopoietin-2, R&D SYSTEMS, Mineapolis, USA
- Mowiol, CALBIOCHEM, San Diego, Californien, USA

5.1.6 Assaymedien

- Methylcellulose, SIGMA, München, Deutschland
- Fibrinogen, bovin, SIGMA, München, Deutschland
- Thrombin, bovin, SIGMA, München, Deutschland
- Trasylol, Bayer, Leverkusen, Deutschland
- FACS-Puffer: (PBS + 2,5% Kälberserum + 0,1% NaN₃)
- Block-Puffer: (PBS + 2,5% Kälberserum + 10% Ziegen Serum)

5.1.7 Farbstoffe

- PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit For General Cell Membrane Labelling, SIGMA, München, Deutschland
- PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit For General Cell Membrane Labelling, SIGMA, München, Deutschland
- Propidium Iodid, SIGMA, München, Deutschland
- HOECHST 33342 Kernfarbstoff, HOECHST, Frankfurt

5.1.8 Antikörper

5.1.8.1 Erstantikörper

- Anti-Humanes CD31, IgG1, aus Mausaszites, CYMBUS BIOTECHNOLOGY
- Anti-Endothelzellen-CD146, (P1H12), CHEMICON INTERNATIONAL
- Anti-Collagen Typ IV, (COL-94), aus Mausascites, SIGMA, München, Deutschland
- Anti-Laminin, (LAM-89), aus Mausascites, SIGMA, München, Deutschland
- Anti-Von-Willebrand-Faktor, aus Kaninchen
- Anti- α -Glatt-Muskel-Zell-Actin, aus Mausascites, SIGMA IMMUNO CHEMICALS

5.1.8.2 Zweitantikörper

- Alexa Fluor 488 Ziege gegen Maus-IgG, MOBITEC
- Alexa Fluor 555 Ziege gegen Kaninchen-IgG, MOBITEC
- Anti Maus-IgG, FITC konjugiert, Human-IgG adsorbiert, SIGMA, München, Deutschland
- Anti Maus-IgG, Cy-3-konjugiert, aus der Ziege, JACKSON IMMUNO RESEARCH LABORATORIES

5.1.9 Zellen

- Humane aortale glatte Muskelzellen (HAOSMC), PROMO CELL
- Humane pulmonalerterielle glatte Muskelzellen (PASMC), PROMO CELL

5.2 Methoden

5.2.1 Isolation der HULMEC

Die Präparation des humanen Lungengewebes wurde bei 4°C vorgenommen. Die Lunge wurde in kaltem PBS⁻ mit 2%Penicillin/Streptomycin-Zusatz gespült. Für die Isolation von mikrovaskulären Endothelzellen wurden ausschließlich periphere, pleuranahe Lungenareale verwendet. Zunächst wurde die Pleura mit einer feinen Schere abpräpariert. Dann wurden sicht- und tastbare Gefäß- und Bronchusstümpfe entfernt, sodass nur Gefäße deutlich unter 1mm Durchmesser im Gewebe verblieben. Die so präparierten Gewebestücke wurden mit mehreren gebogenen Scheren in einem sterilen Gefäß zerkleinert, bis ein homogener Brei entstand. Der Gewebebrei wurde durch eine 20 µm Filtergaze filtriert, um Erythrozyten und Debris zu entfernen. Dazu wurde der Gewebebrei solange mit PBS- auf dem Netz gespült, bis das Gewebe auf der Filtergaze blutfrei war. Das Gewebe wurde nun in 75cm²-Suspensionszellkulturflaschen gegeben, mit dem Verdau-Medium vermischt und ca. 16h bei 37°C und 5% CO₂ verdaut. Das verdaute Gewebe wurde am nächsten Tag aus den Flaschen entnommen und 10 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet kräftig mit frischem HULMEC-Medium resuspendiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde durch die 100 µm-Filtergaze filtriert und das Filtrat auf mit 0,5%iger Gelatinelösung beschichtete Platten aufgebracht. Nach 1-2 Stunden wurde das Medium gewechselt und so die früh-adhärenten Endothelzellen vorselektiert. Wenn größere Endothelzellnester ausgewachsen waren, erfolgte die Aufreinigung der Endothelzellen mittels anti-CD31-beschichteten Dynabeads.

Hierzu wurden die Zellen mit Trypsin von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst und nach dem Zentrifugieren so im Trennpuffer resuspendiert, dass die Zellzahl bei 2 Mio. pro ml lag. Die Trennkügelchen wurden vorbereitend im Waschpuffer gewaschen. Dann wurden jeweils 10µl der Trennkügelchen pro Milliliter mit der Zellsuspension gemischt und im Kühlraum auf dem Rotationsmischer für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in den Trennmagneten gestellt und nach zwei Minuten das Medium abgesaugt. Dieser Waschvorgang wiederholte sich noch dreimal.

Am Ende wurden die gereinigten Zellen wieder in HULMEC-Medium resuspendiert, in gelatinierte Gewebekulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank bebrütet.

5.2.1.1 FACS-Analyse der isolierten Zellen

Stichprobenartig wurden die Zellen in unterschiedlichen Passagen mittels FACS-Analyse auf ihre Reinheit getestet. Hierzu wurden die Zellen aus den Kulturschalen genommen und mit Antikörpern gegen das Oberflächenmerkmal CD31 markiert. Anschließend erfolgte die Testung mittels FACS-Analyse (siehe Abb. 2)

5.2.2 Sphäroidassay

5.2.2.1 Herstellung der Methylcellulose-Stammlösung

Alle beim Sphäroidassay verwendeten Medien enthielten 20% einer Methylcelluloselösung, deren Herstellung im Folgenden kurz erläutert wird:

6g Methocel (Methylcellulose) wurden in eine 500 ml Flasche eingewogen, ein sauberer Magnetrührer dazugegeben und autoklaviert. 500 ml Medium (MCDB131) wurden in 2x250 ml aufgeteilt. 250 ml wurden kurz auf 60°C erwärmt, in die anderen 250 ml je nach Ansatz FCS, P/S, etc. zugefügt. In die angewärmte, die sterile Methylcellulose enthaltende Flasche wurde das 60°C warme Medium eingefüllt und 20min bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer gerührt. Danach wurde das restliche Medium eingefüllt, und nochmals eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C gerührt. Es entstand eine trübe Lösung, welche auf 50 ml Falconröhrchen verteilt und bei 5000UpM zwei Stunden bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Das sich bildende Pellet enthielt ungelöste Methylzellulose, die für den Assay nicht verwendet werden durfte. Daher wurden die letzten 5-10 ml des Röhrchens verworfen. Die Aufbewahrung der Aliquots geschah bei 4°C.

5.2.2.2 Herstellung der Sphäroide

Die Zellen wurden mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und nach dem Abstoppen bei 400 x g 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium plus 20% Methylcelluloselösung resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Dann wurde die Zellzahl dem geplanten Versuch entsprechend eingestellt. Bei allen Versuchen wurde eine Zellzahl von 1000 pro Sphäroid in einem Volumen von 100µl eingestellt, (10.000 pro ml) bei Kokulturversuchen jeweils 500 Zellen beider Arten (Endothel und SMC). Die Zellsuspension wurde mittels Mehrkanalpipette in eine 96-Lochplatte (Rundboden-Suspensionsplatte) eingebracht, je Loch wurden 100µl Suspension mit jeweils 1000 Zellen eingefüllt und die Platte für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

5.2.2.3 „Ernten“ der Sphäroide

Für das „Ernten“ der Sphäroide aus der 96-Lochplatte wurden gelbe Pipettenspitzen um ca. 3 Millimeter gekürzt, um die Sphäroide nicht durch das Ansaugen zu zerstören. Die im Medium schwimmenden Sphäroide wurden 3 Minuten bei 200 x g abzentrifugiert und je nachdem, welche Gelmatrix verwendet werden sollte, entweder in Zellkulturmedium ohne Wachstumsfaktoren oder in einer Fibrinlösung aufgenommen.

5.2.2.4 Einbettung der Sphäroide

5.2.2.4.1 Einbettung der Sphäroide in eine Fibrin-Gel-Matrix

5.2.2.4.1.1 Herstellung der Fibrinlösung

1g humanes Fibrinogen wurde in 100 ml PBS⁻ aufgenommen und bei 4°C über Nacht gerührt. Die trübe Lösung wurde 10min bei 10000UpM und 4°C in der Zentrifuge abgefahren, der Überstand mit Ammoniumsulfat präzipitiert. Unter Rühren wurde bei 4°C über 60-90min 16,5g Ammoniumsulfat pro 1g Fibrinogen zugesetzt. In der Zentrifuge wurde das Präzipitat 30min bei 12000rpm (20000x g) unter 4°C ohne Bremse abgefahren. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in insgesamt 60 ml PBS⁻ aufgenommen.

Die Fibrinogenlösung wurde in Dialyseschläuche eingefüllt und 3-mal gegen 1 Liter PBS⁻ über Nacht bei 4°C dialysiert. Danach wurde die Lösung nochmals 10min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert, um eventuelle Gerinnsel zu entfernen. Der Lösung wurden 200 U/ml Trasylol zugesetzt, die Lösung sterilfiltriert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Ein Aliquot wurde zur Proteinbestimmung zurückgehalten.

5.2.2.4.1.2 Proteinbestimmung der Fibrinlösung mittels BCA Protein determination assay

Um eine konstante Konzentration in der verwendeten Fibrinlösung zu erhalten, wurde im Anschluss an die Aufreinigung eine Proteinbestimmung durchgeführt. Hierzu wurde der BCA-Protein determination assay der Firma SIGMA verwendet.

Lösung A (SIGMA B9643 – Bicinchoninsäure) wurde 50:1 mit Lösung B (Kupfer-II-Sulfat) gemischt. Als Kontrolle diente eine Rinderalbumin-Verdünnungsreihe. Jeweils 10µl verschiedener Verdünnungen der Proteinlösung wurden in eine Vertiefung einer 96-Lochplatte pipettiert und 200µl der Testlösung dazugegeben. Als Leerwert diente H₂O. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und 30 Minuten bei 37° inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde im Photometer die Absorption bei 560nm gemessen. Die Endkonzentration der verwendeten Fibrinlösung wurde auf 1,5 mg/ ml eingestellt.

5.2.2.4.1.3 Einbettung der Sphäroide

Die Fibrinogenlösung wurde, je nach Fibringehalt der Stammlösung, auf 1,5 mg/ml mit PBS⁺⁺ verdünnt. Den Lösungen wurden 20µl Trasylool je ml Lösung zugegeben. Die verdünnte Fibrinogenlösung wurde nochmals filtriert, um eventuelle Gerinnsel zu entfernen. Je Ansatz (Loch einer 24-Lochplatte) wurden 500µl Fibrinogenlösung benötigt, in der die Sphäroide aufgenommen wurden. Jeder Ansatz wurde in eine Vertiefung einer 24-Lochplatte pipettiert, mit jeweils 35µl Thrombinlösung (0,125U/µl) versetzt und kurz geschwenkt. Nach 10 Minuten wurden die Gele mit 1 ml Medium (MCDB131), welches 0,028 mg Trasylool® pro Milliliter enthielt, überschichtet. Nach einer Stunde wurde dieses Medium abgesaugt und gegen jeweils 1 ml Medium ersetzt, welches außer Wachstumsfaktoren in dem jeweiligen Ansatz entsprechenden Konzentrationen enthielt.

5.2.2.4.2 Einbettung der Sphäroide in Kollagen-Gel

5.2.2.4.2.1 Herstellung der Kollagenlösung

Rattenschwänze wurden für 5 Minuten in 70%iger Ethanollösung desinfiziert. Die weiteren Schritte geschahen im Ethanolbad unter der Sterilarbeitsbank. Als Auffanglösung für die gewonnenen Kollagen-Sehnenfäden dienten 100 ml einer 0,1%igen Eisessiglösung. Zunächst wurde die Schwanzspitze abgeschnitten. Dann wurde das proximale Ende des Schwanzes mit einer Klemme fest gefasst und von distal her mit einer zweiten Klemme Segment für Segment abgebrochen, die Kollagenfäden herausgezogen und in die Eisessiglösung überführt. Über Nacht wurde bei 4°C das Kollagen aus den Sehnenfäden herausgelöst. Nach 24h wurde das unlösliche Sehnenmaterial abzentrifugiert (20 Minuten bei 5000 UpM), die Kollagenlösung aliquotiert und im Kühlschrank aufbewahrt.

5.2.2.4.2.2 Einbettung der Sphäroide

Pro 2 ml Kollagenlösung wurden 250µl EBSS 10x zugegeben. Die Sphäroide wurden pro Ansatz in 500µl Methocel-Medium aufgenommen. Die Kollagenlösung wurde mit 0,2N NaOH bis zum Indikatorumschlag nach pink neutralisiert. Dann wurden zügig 500µl Kollagenlösung und 500µl Sphäroidlösung gemischt und in eine Vertiefung einer 24-Lochplatte überführt. Diese wurde 30min im Brutschrank inkubiert, dann mit 1 Tropfen Medium überschichtet.

5.2.2.5 Auswertung

Nach 24 Stunden wurden 10 zufällig ausgewählte Sphäroide pro well mittels eines inversen Mikroskopes mit integrierter Videoerfassung auf Video aufgenommen, jeder Ansatz wurde doppelt ausgeführt, so dass insgesamt 20 Sphäroide je Ansatz gespeichert wurden. Die Videosequenzen wurden später am Computer digitalisiert und mit Hilfe eines Computerprogramms (programmiert von Jörg M. Albrecht) vermessen. Die Vermessung geschah durch manuelle Nachzeichnung jeder einzelnen Sprosse vom gedachten äußeren Rand des ursprünglichen Sphäroids bis zum Ende des Abzweigs gemessen. Es wurden automatisch Berechnungen ausgeführt, so dass am Ende der Vermessung eines Sphäroids die Gesamtlänge der Sprossen je Sphäroid und die Anzahl der Sprossen je Sphäroid vorlagen. Die erhaltenen Datenreihen wurden zur Auswertung in Microsoft Excel importiert. Die durchschnittliche Sprossenlänge wurde dort rechnerisch ermittelt.

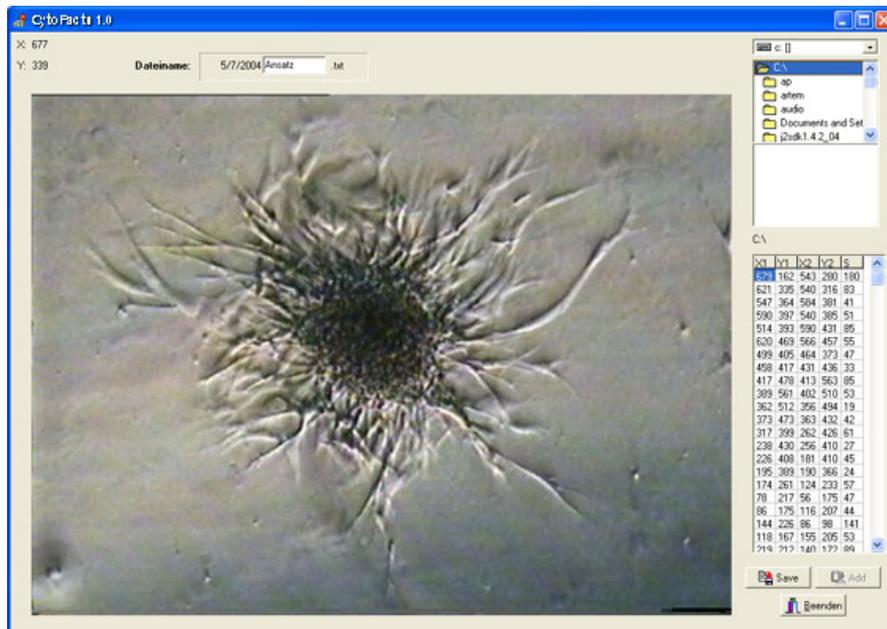


Abb.1:Benutzeroberfläche des Vermessungsprogramms

Das Computerprogramm ermöglicht die Speicherung der Daten in dem Ordner, in dem auch die dazu gehörigen Bilder gespeichert sind, was eine spätere Kontrolle und Korrektur ermöglicht.

5.2.2.6 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Statistische Auswertungen wurden mit zweiseitigem t-Test unter Annahme unterschiedlicher Varianzen durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für alle Vergleiche bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angenommen.

5.2.3 Anfertigung von Kryoschnitten

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Sphäroide wie zum Sphäroidassay „geerntet“. Danach wurden sie in PBS+ gewaschen und abzentrifugiert, um in einem Volumen von ca. 50µl PBS + aufgenommen zu werden. Eine gelbe Pipettenspitze wurde mit Sigmacote® gespült um die Adhärenz der Sphäroide zu mindern. Dann wurden die Sphäroide aufgesaugt und in mehrere Kammern einer Chamberslideplatte überführt. Der PBS-Tropfen mit den Sphäroiden sollte möglichst in der Mitte der Kammer zu liegen kommen. Dann wurde der Tropfen mit TissueTek überschichtet und die Platte bei -20°C eingefroren.

Die Herstellung der Schnitte geschah an einem Kryotom der Firma Leica, es wurden Schnitte von 5-20 µm Dicke hergestellt, die immunhistologisch aufgearbeitet wurden.

5.2.4 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zur Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die ganzen Gele nach der Video-Auswertung mit Paraformaldehyd 3,5%ig fixiert und danach durch Entfernung des Bodens der 24-Lochplatte aus ihr entnommen. Die Einbettung in Paraffin erfolgte automatisch in einem Einbettgerät der Firma Leica. Nach dem Einbetten erfolgte die Anfertigung der Schnitte, die ebenfalls immunhistologisch aufgearbeitet wurden. Die Entfernung des Paraffins aus den Schnitten geschah über eine Alkoholreihe.

5.2.5 Immunhistologie

5.2.5.1 Aufarbeitung der Schnitte

Gefrierschnitte wurden mit Aceton/Methanol-Gemisch (1:1) für 10 Minuten fixiert. Nach Lufttrocknung wurden die Schnitte 5 Minuten mit PBS⁻ rehydriert und unspezifische Bindungsstellen 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Block-Puffer (PBS + 2,5% Kälberserum + 10% Ziegenserum) abgesättigt. Der Erstantikörper, hier meist anti-vWF (1:150), bzw. anti- α -Glattmuskelaktin (1:400) wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Schnitt inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in PBS + 2,5% Kälberserum. Nach Ende der Inkubation wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten gewaschen, bevor der Zweitantikörper (s. Material) zugegeben wurde. Dieser wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Je nach Ansatz erfolgte vor dem letzten Waschen eine Kernfärbung mit Propidiumiodid 10 µg/ml für 5 Minuten, danach die zweimalige 5-minütige Waschschrte mit PBS.

Zum Eindeckeln wurde Mowiol® verwendet.

6 Resultate

6.1 Etablierung des Sphäroidmodells

6.1.1 Reinheit der isolierten Endothelzellen

Wesentliche Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit und Qualität der Zellkulturexperimente war die Charakterisierung bzw. Phänotypisierung der verwendeten Zellen. Trotz Vorliegen der typischen mikroskopischen Morphologie von Endothelzellen wurde deren Reinheit in FACS-Analysen anhand der Expression des CD31-Antigens bestätigt.

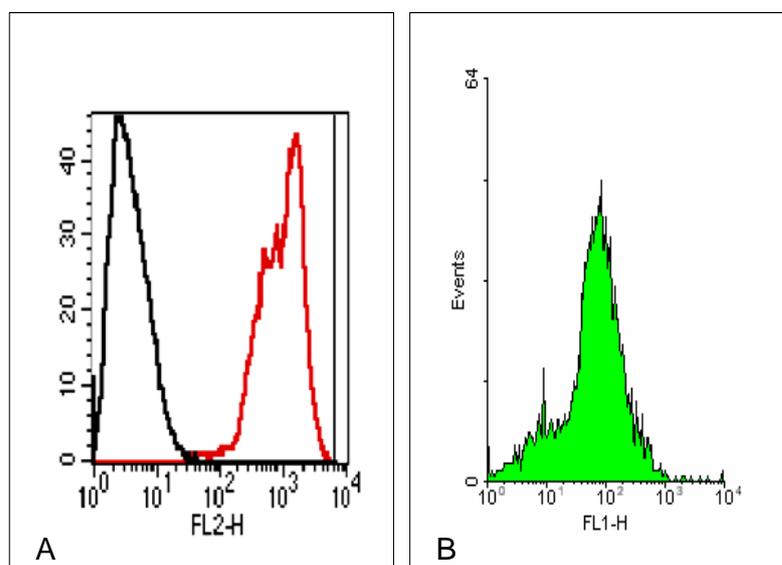


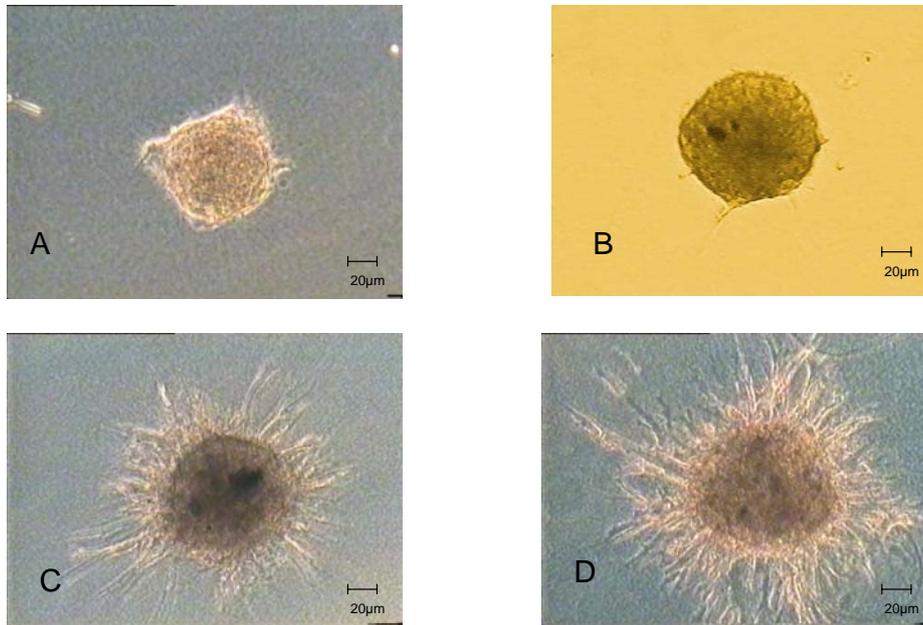
Abb. 2: Repräsentative Histogramme der FACS-Analyse von isolierten humanen mikrovaskulären Lungenendothelzellen. A: Mit grafischer Darstellung der Kontrollgruppe, B ohne Ausgabe der Kontrollgruppe.

6.1.2 Zellkulturparameter

Zur Etablierung der Sphäroidzellkultur wurde der optimale Methylcellulose-Gehalt des Mediums, in dem sich die Sphäroide formieren sollten, sowie die Notwendigkeit des Zusatzes von Wachstums- und Überlebensfaktoren ermittelt. Als ideal zur Kultur glatter, stabiler Sphäroide hat sich MCDB 131 ohne L-Glutamin mit 5% Humanserum, 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 2% Glutamin, 90 mg/l Heparin, und 20% Methylcellulose herausgestellt.

Wurde der Gehalt an Methylcellulose über 20% hinaus gesteigert, war offensichtlich die Viskosität des Mediums zu groß, um den Zellen die Bewegung zueinander und so die Bildung des Sphäroids zu ermöglichen. Bei zu geringem Gehalt an Methylcellulose wirkten die Sphäroide brüchig und zerfielen beim Entfernen aus der Zellkulturschale.

Neben der Suche nach dem idealen Medium stand die Suche nach der geeigneten Größe der Sphäroide ebenfalls am Anfang der Arbeiten. Die Sphäroide sollten so groß wie möglich werden, jedoch sollten alle eingesetzten Zellen in das Sphäroid integriert werden. Eine Zellzahl von 1000, sowohl in der Kokultur als auch in den durchgeführten Monokulturversuchen hat sich als probat erwiesen.



A: Kokultur-Kontrolle

B: Monokultur-Kontrolle

C: Kokultur mit 50ng/ml VEGF

D: Monokultur mit 50ng/ml VEGF

Abb.3: Mikroskopische Darstellung von HULMEC-Monokultursphäroiden (bestehend aus 1000 Zellen; B+D) sowie HULMEC-PASMC-Kokultursphäroiden (bestehend aus je 500 HULMEC und PASMC A+C), eingebettet in einer Fibrinmatrix nach einer Inkubationszeit im Gel von 24h. Die Sphäroide in den Abbildungen 2a und 2b zeigen allenfalls minimale Endothelsprossen (keine angiogenen Faktoren zugesetzt), die Abbildungen 2c und 2d zeigen deutliche *in vitro* Angiogenese nach Zugabe von vaskulärem endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF).

6.1.3 Vorgehen bei der Auswertung

Nachdem die Kulturparameter für die Bildung der Zellsphäroide festgelegt waren, wurden die Kriterien für die Auswertung definiert. Ziel war es, die angiogene Aktivität zu quantifizieren. Hierzu wurden folgende drei Parameter bestimmt, bzw. berechnet:

- Addierte Gesamtsprossenlänge eines Sphäroids,
- Durchschnittliche Sprossenlänge eines Sphäroids
- Sprossenanzahl pro Sphäroid.

Damit sollten verschiedene Einflüsse der Wachstumsfaktoren auf Art und Umfang der angiogenen Aktivität der Sphäroide erkannt werden. Bei der weiteren Auswertung der Versuche hat sich die addierte Gesamtsprossenlänge pro Sphäroid als stabilster und zuverlässigster Parameter herausgestellt.

Um dennoch keine Effekte angebotener Substanzen oder Kulturbedingungen zu übersehen, wurden stets die anderen beiden Angiogenese-Parameter mitbestimmt bzw. berechnet.

Pro Ansatz wurden zehn Sphäroide zufällig im Gel ausgewählt und die Endothelsprossen vermessen, alle Versuche wurden mit doppelten Ansätzen durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt. Um die bei der Verwendung von primär isolierten Zellen auftretenden Schwankungen der intrinsischen angiogenen Aktivität zu berücksichtigen, wurde die basale *in vitro* Angiogenese der nicht stimulierten Kontrollen jeweils als Referenz gesetzt. (=100%), und die Beeinflussung durch die verwendeten Wachstumsfaktoren relativ zur Referenz prozentual angegeben.

Am Ende der Etablierungsphase stand ein hervorragend reproduzierbarer *in vitro*-Assay zur Verfügung.

6.2 Untersuchung pulmonaler Angiogenese *in vitro* an Monokultursphäroiden bestehend aus 1000 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC)

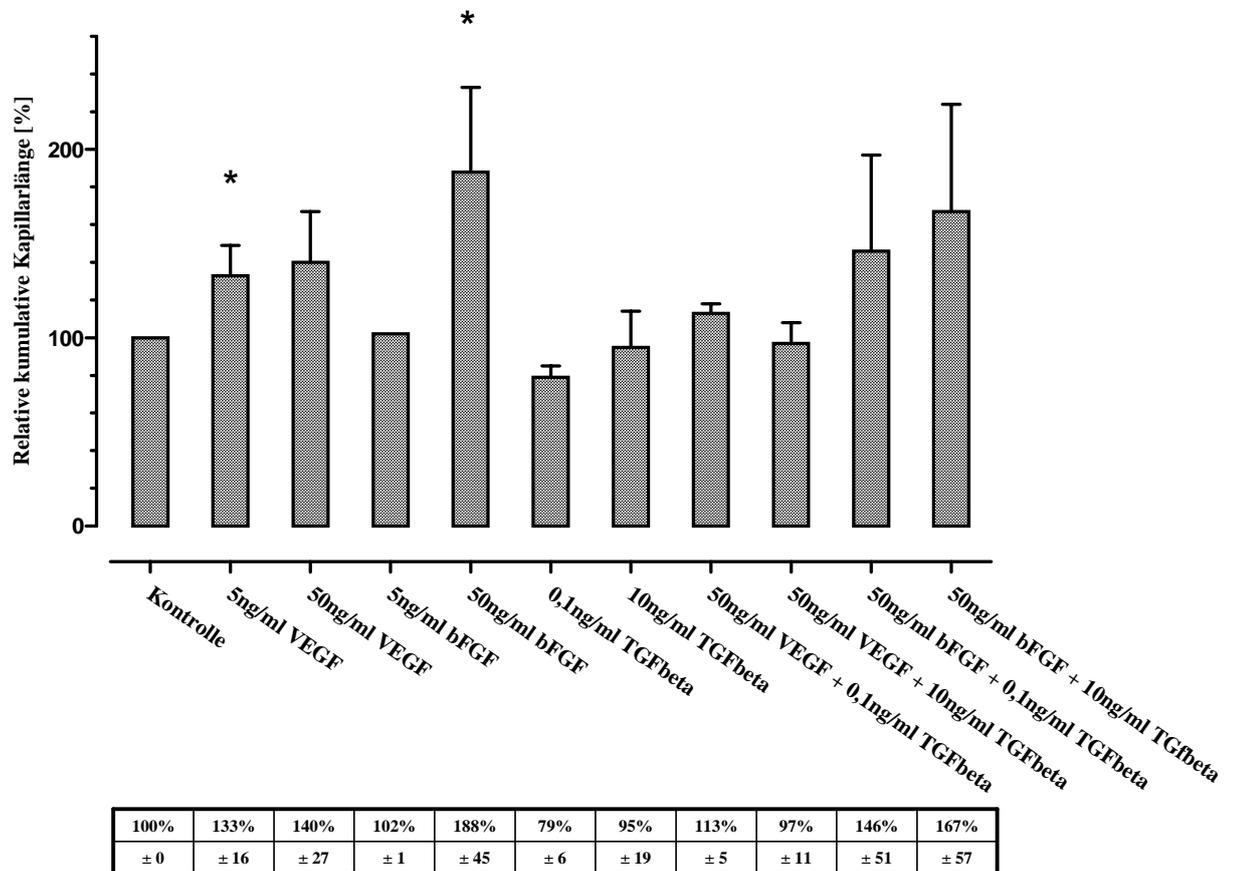


Abb.4: Übersicht der Versuche zur *in vitro* Angiogenese von Monokultur-Sphäroiden bestehend aus jeweils 1000 humanen mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen (HULMEC).

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Die Daten (Mittelwert ± Standartabweichung) repräsentieren mindestens n=20 vermessene Sphäroide. * = signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle, ($p < 0,05$).

6.2.1 VEGF und bFGF induzieren im Sphäroid-Monokulturassay pulmonale *in vitro* Angiogenese

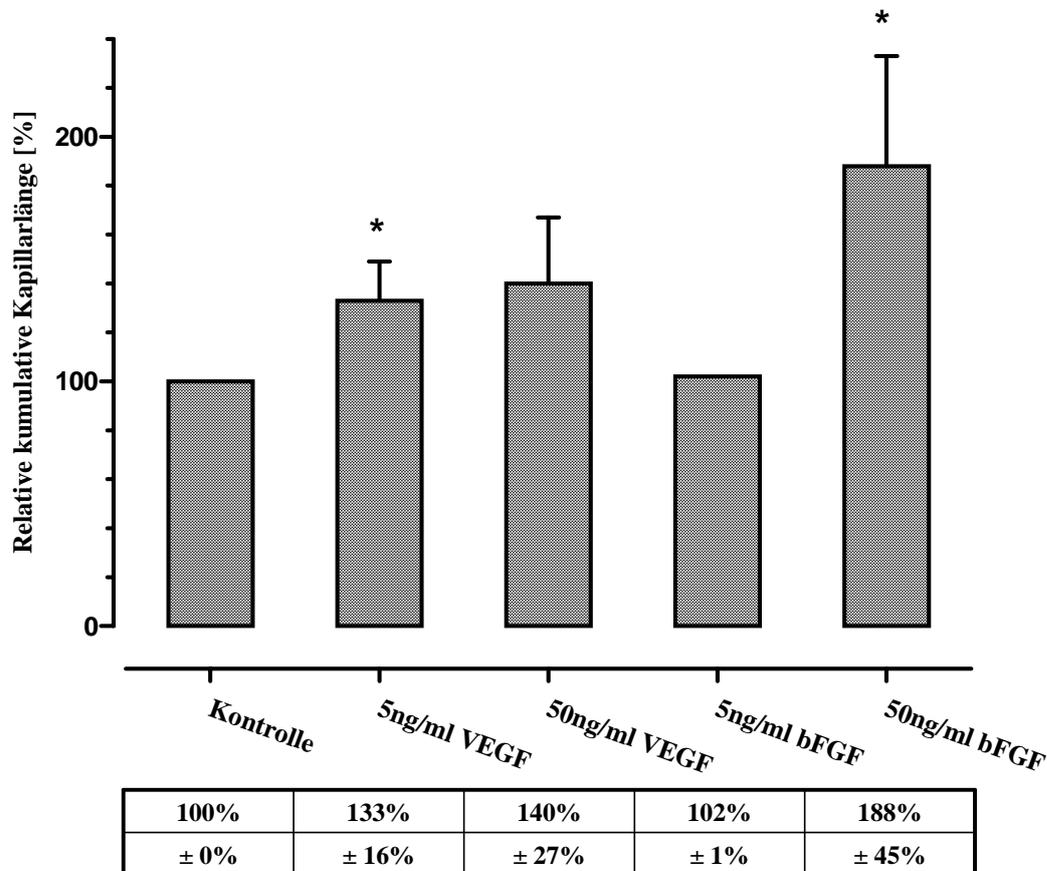


Abb.5: Angiogene Effekte von VEGF und bFGF auf Monokultursphäroide bestehend aus jeweils 1000 humanen mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen (HULMEC).

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibrinigel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%).

Die Zugabe von 5 ng/ml VEGF (n = 60) führte zu einer signifikanten Steigerung der angiogenen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (n = 80). VEGF in der Konzentration von 50 ng/ml hatte keinen signifikanten Effekt (n = 40) Die Zugabe von 50 ng/ml bFGF (n = 80) führte ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der *in vitro* Angiogenese (n = 80). Angabe der Daten als Mittelwert ± Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$.

6.2.2 TGF- β in hoher Konzentration inhibiert die VEGF-induzierte pulmonale *in vitro* Angiogenese im Sphäroid-Monokulturassay

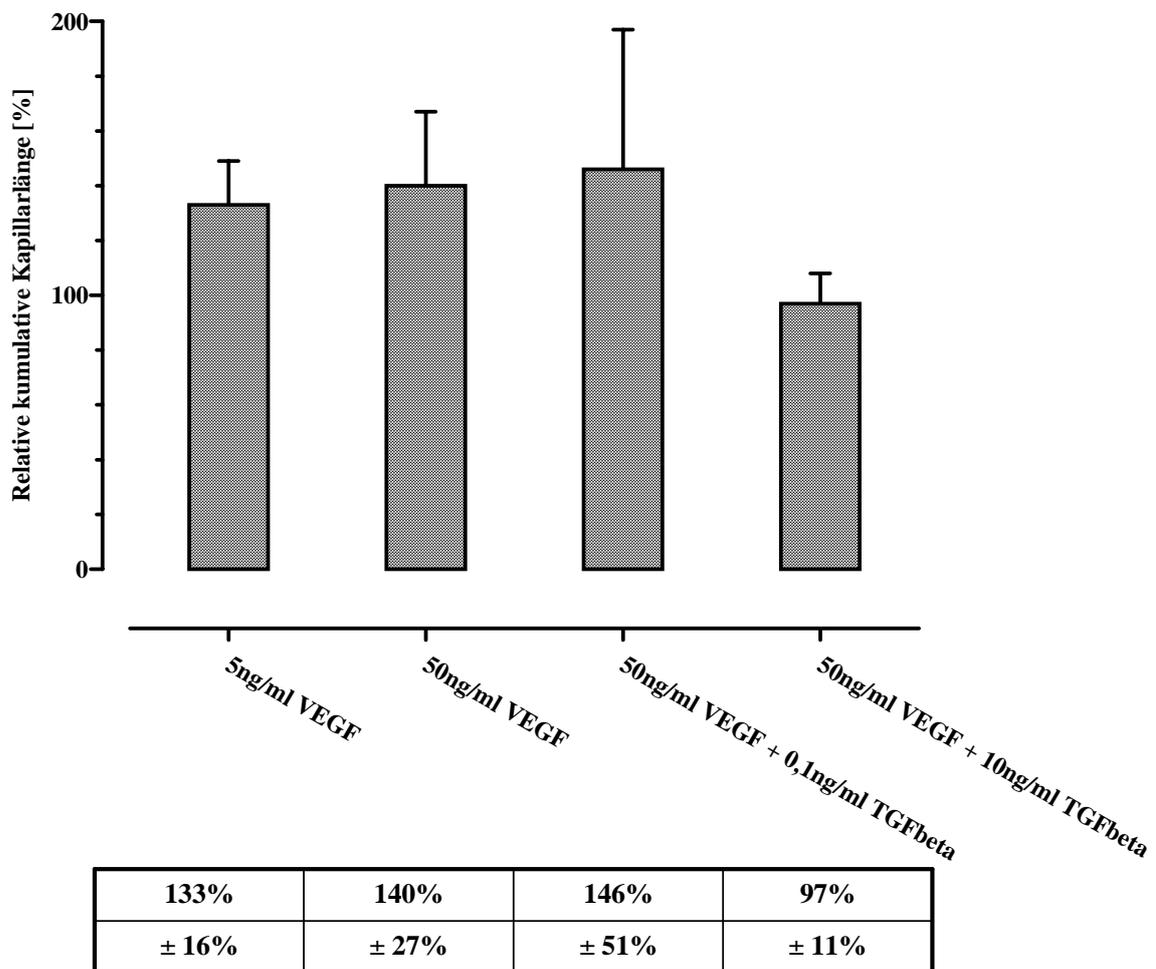


Abb.6: TGF- β -induzierte Hemmung der VEGF-induzierten *in vitro* Angiogenese von Monokultursphäroiden bestehend aus jeweils 1000 humanen mikrovasculären pulmonalen Endothelzellen (HULMEC).

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Die Zugabe von 10 ng/ml TGF- β bewirkte einen Trend zur Inhibition der VEGF-induzierten *in vitro* Angiogenese (n = 20) (p = 0,09). Angabe der Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei p < 0,05.

6.2.3 TGF- β hat keinen Einfluss auf die bFGF-induzierte pulmonale *in vitro* Angiogenese im Sphäroid-Monokulturassay

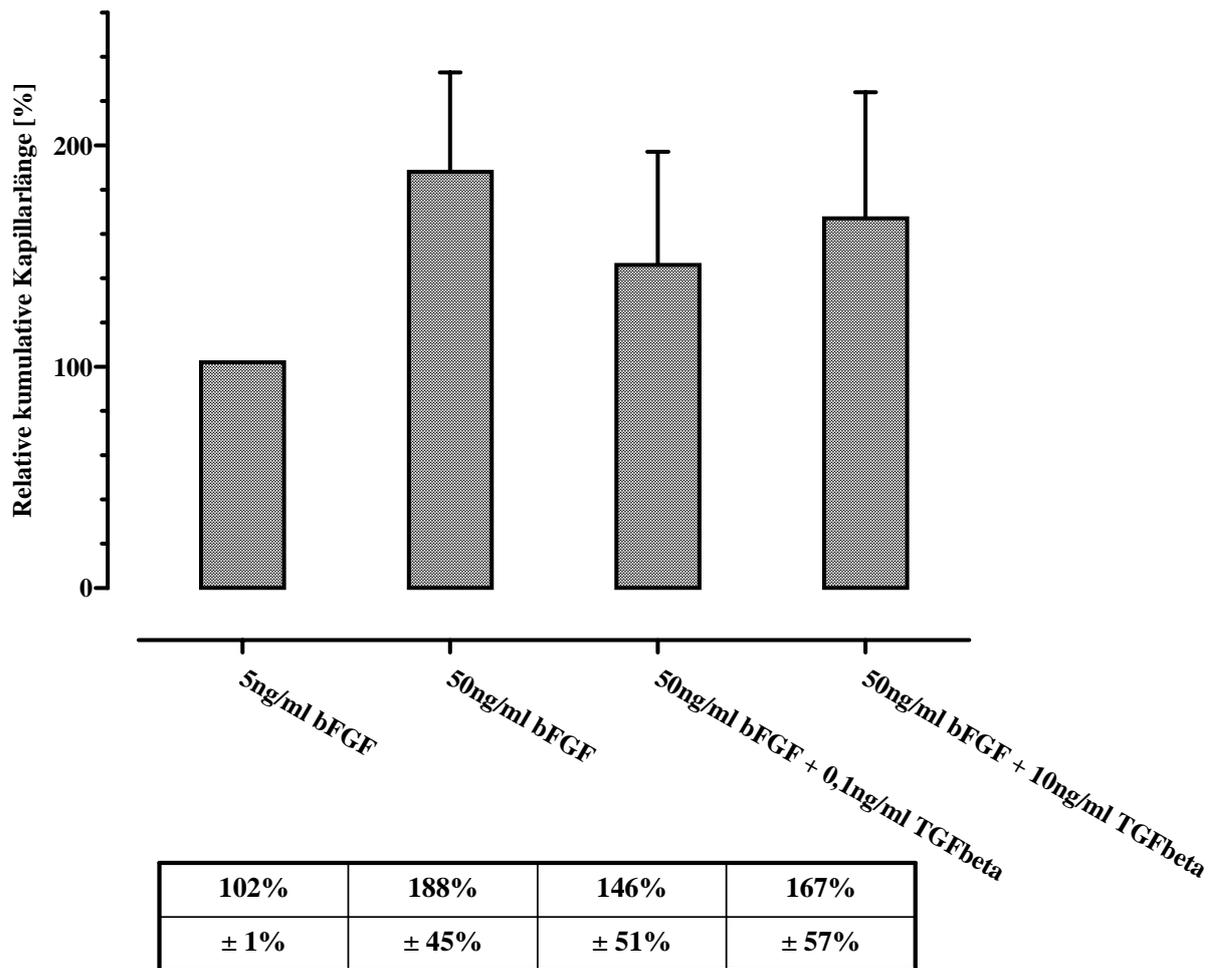


Abb.7: TGF- β bleibt konzentrationsunabhängig ohne signifikanten Effekt auf die bFGF-induzierte *in vitro* Angiogenese von Monokultursphäroiden bestehend aus jeweils 1000 humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC).

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%).

Die Zugabe von TGF- β in den Konzentrationen 0,1 ng/ml (n = 20) und 10 ng/ml (n = 40) hatte keinen signifikanten Effekt auf die bFGF-induzierte *in vitro* Angiogenese. Angabe der Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$.

6.3 Untersuchung pulmonaler Angiogenese *in vitro* an Kokultursphäroiden bestehend aus jeweils 500 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC)

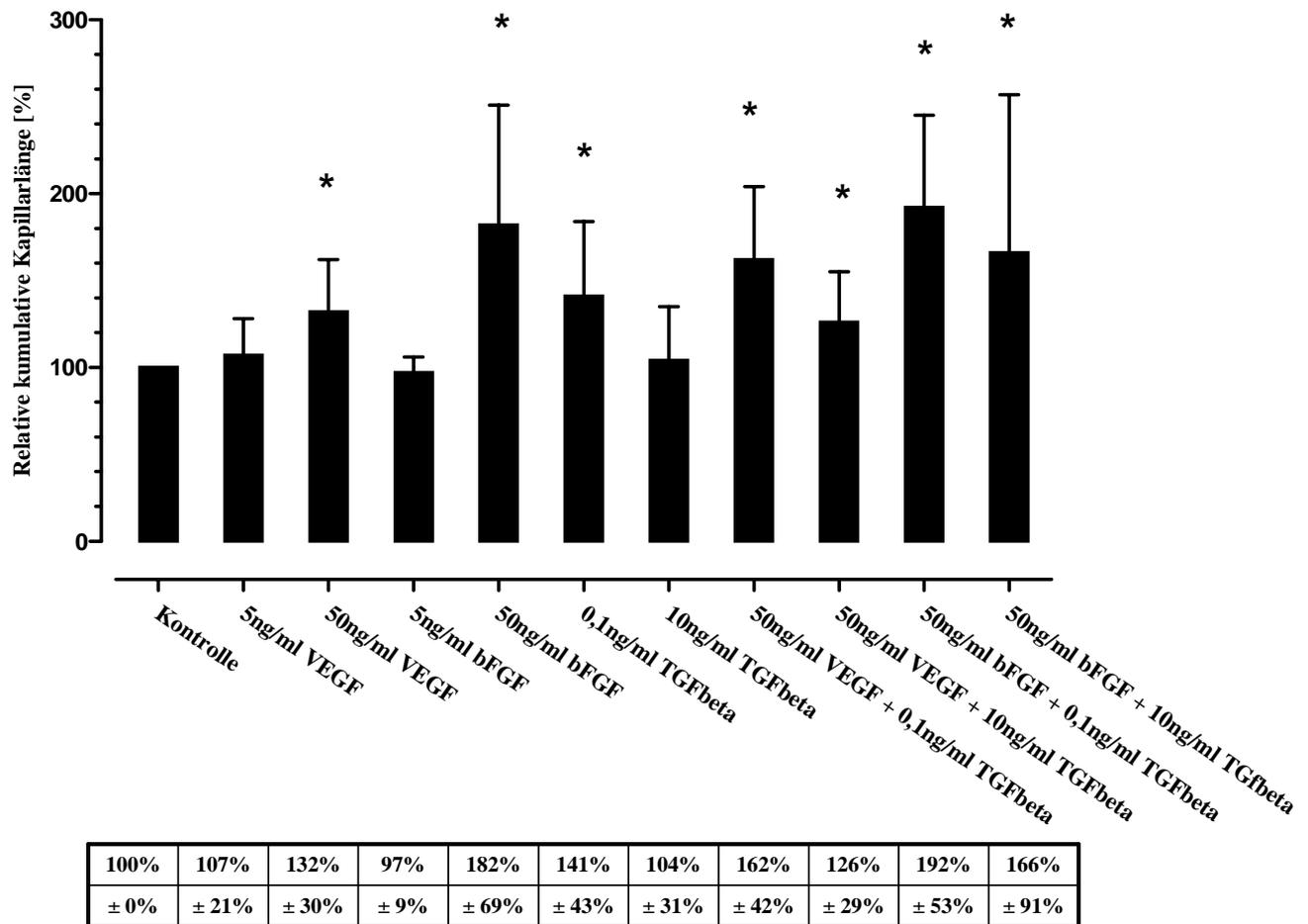


Abb.8: Übersicht der Versuche zur *in vitro* Angiogenese von Kokultursphäroiden bestehend aus jeweils 500 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC)

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24ständiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Die Daten (Mittelwert ± Standartabweichung) repräsentieren mindestens n=80 vermessene Sphäroide. * = signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle, (p < 0,05).

6.3.1 VEGF und bFGF induzieren pulmonale *in vitro* Angiogenese im Sphäroid-Kokulturassay

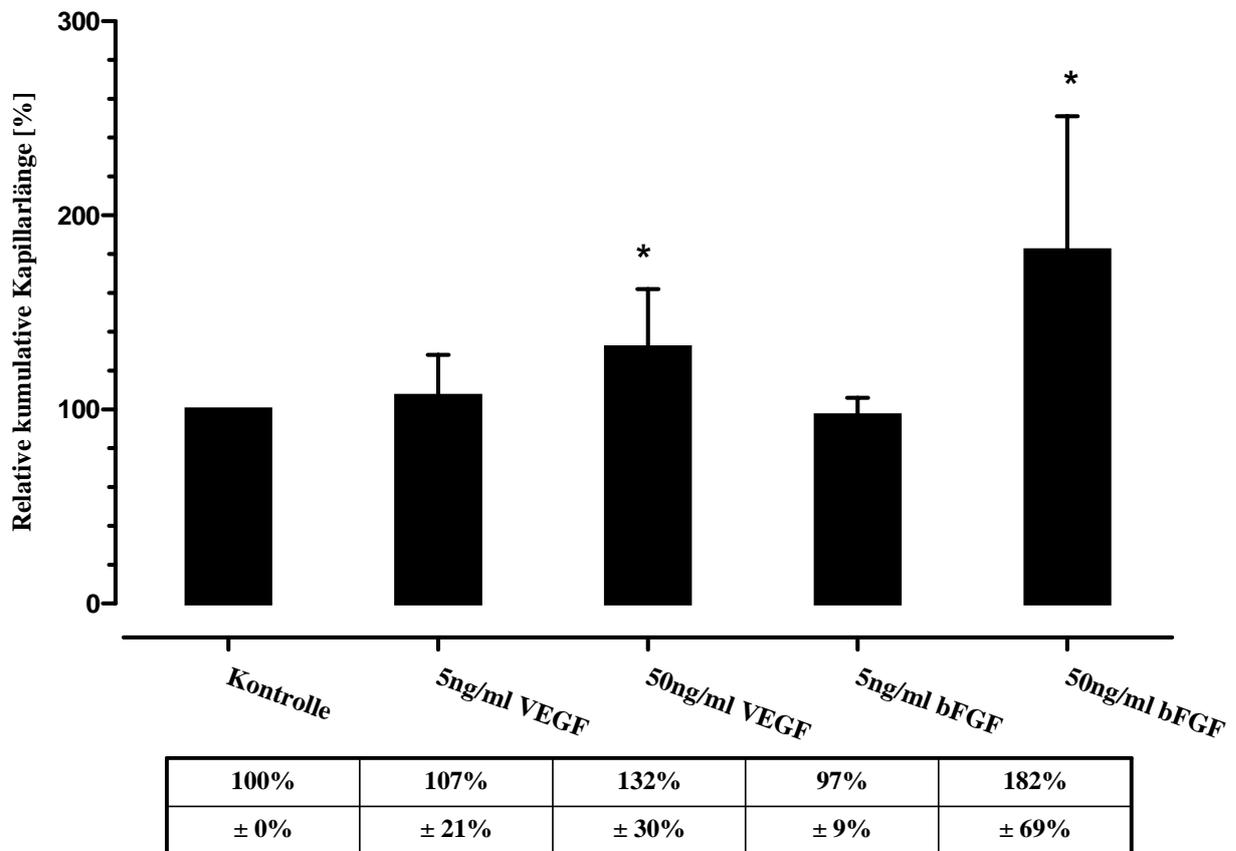


Abb.9: Angiogene Effekte von VEGF und bFGF auf Kokultursphäroide bestehend aus jeweils 500 humanen mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC)

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprosslänge der unstimulierten Kontrolle = 100%).

Die Zugabe von 50 ng/ml VEGF (n = 120) führte zu einer signifikanten Steigerung der angiogenen Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (n = 140). Die Zugabe von 50 ng/ml bFGF führte ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der *in vitro* Angiogenese (n = 140).

VEGF (n = 60) und bFGF (n = 40) in der Konzentration von 5 ng/ml hatten keinen signifikanten Effekt auf die *in vitro* Angiogenese. Angabe der Daten als Mittelwert ± Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$.

6.3.2 TGF- β in niedriger Konzentration induziert die pulmonale *in vitro* Angiogenese im Sphäroid-Kokulturassay

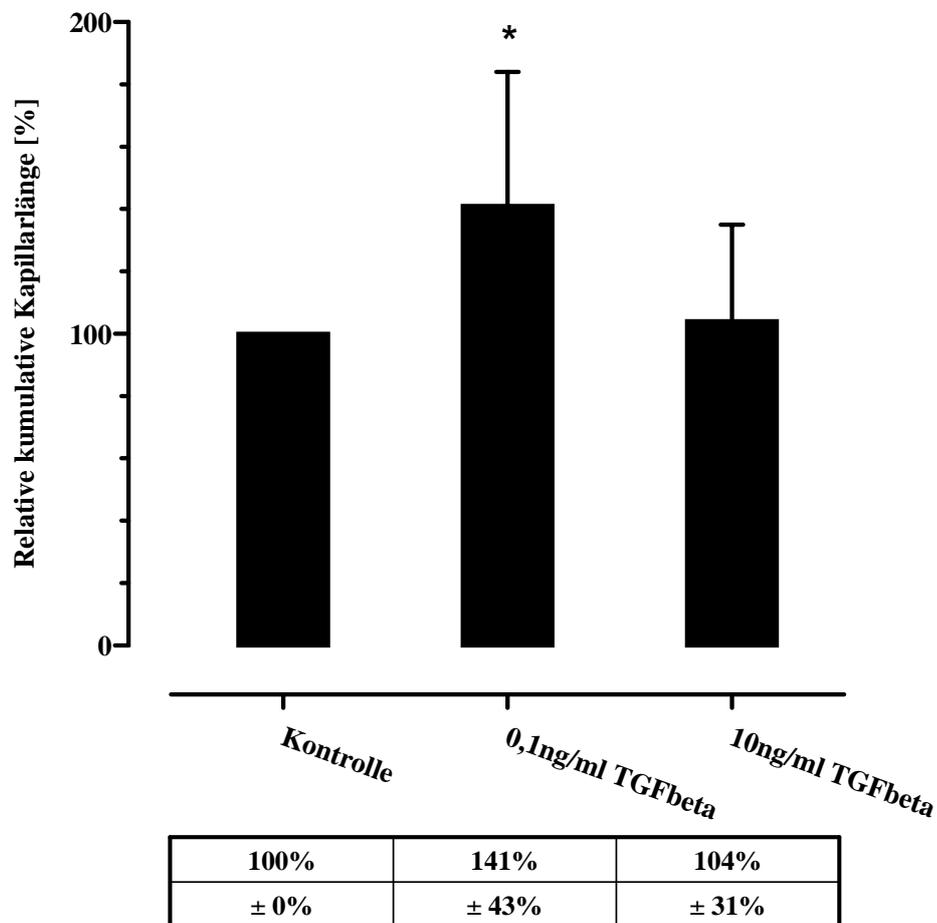


Abb.10: Der angiogenesesteigernde Effekt von TGF- β in niedriger Konzentration auf Kokultursphäroide bestehend aus jeweils 500 humanen mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMIC)

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibrinigel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprosslänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Die Zugabe von 0,1 ng/ml TGF- β (n = 80) bewirkte eine gegenüber der Kontrolle (n = 140) signifikant angiogene Aktivität. Die Zugabe von 10 ng/ml TGF- β (n = 140) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die angiogene Aktivität (n = 140 für Kontrolle , n = 80 für 0,1 ng/ml TGF- β).

6.3.3 TGF- β in niedriger Konzentration verstärkt die VEGF-induzierte pulmonale *in vitro* Angiogenese im Sphäroid-Kokulturassay

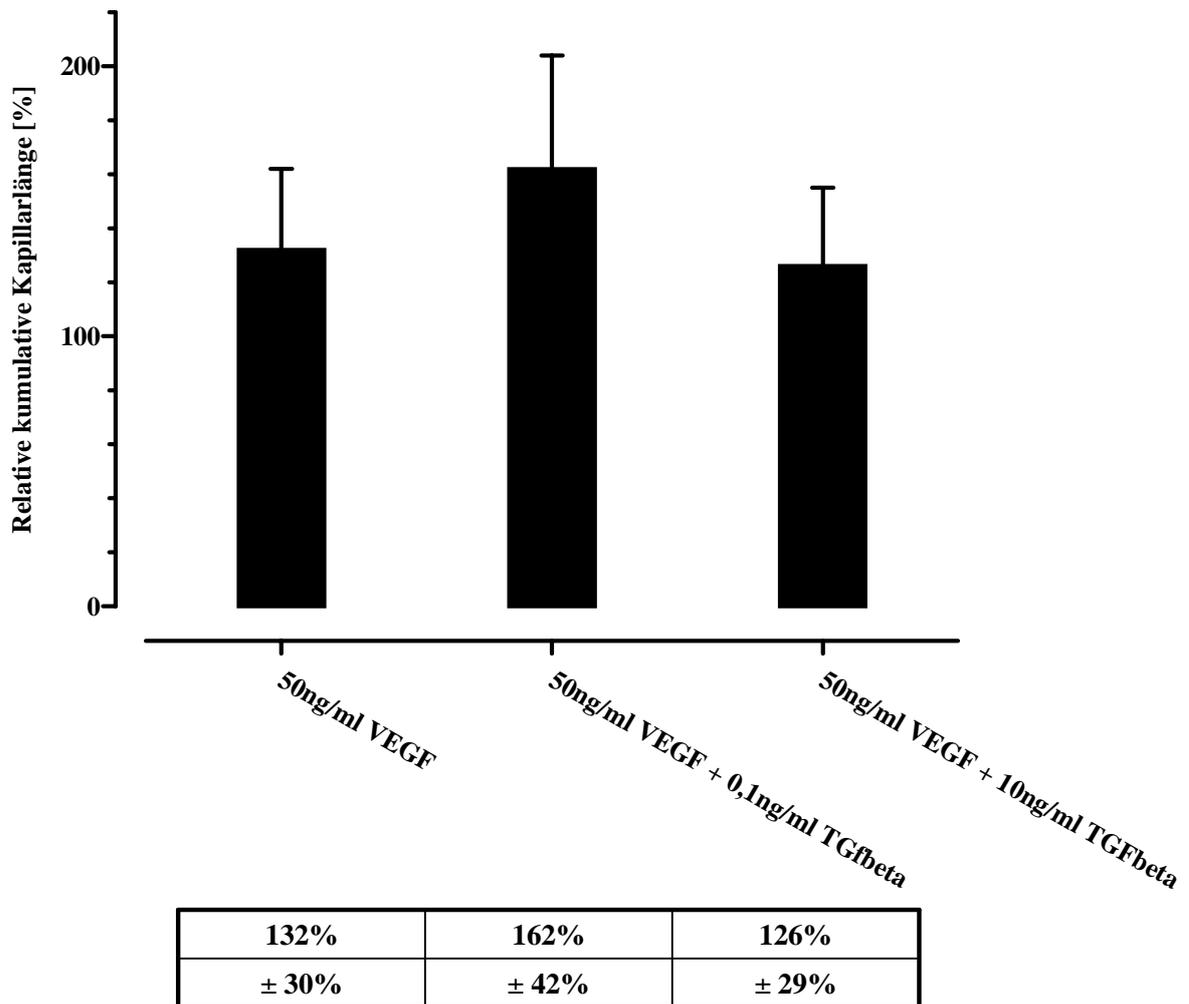


Abb11: TGF- β induzierte Verstärkung des angiogenen Effekts von VEGF auf die pulmonale *in vitro* Angiogenese von Kokultursphäroiden bestehend aus jeweils 500 humanen mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMIC)

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibrinigel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Die Zugabe 0,1 ng/ml TGF- β (n= 80) bewirkte einen Trend zur Verstärkung des angiogenen Effekts von 50 ng/ml VEGF (n = 120), (p = 0,1). Die Zugabe von 10 ng/ml TGF- β (n = 120) hatte keinen Einfluss auf die VEGF-induzierte Angiogenese.

6.3.4 TGF- β hat keinen Einfluss auf die bFGF-induzierte pulmonale *in vitro* Angiogenese im Sphäroid-Kokulturassay

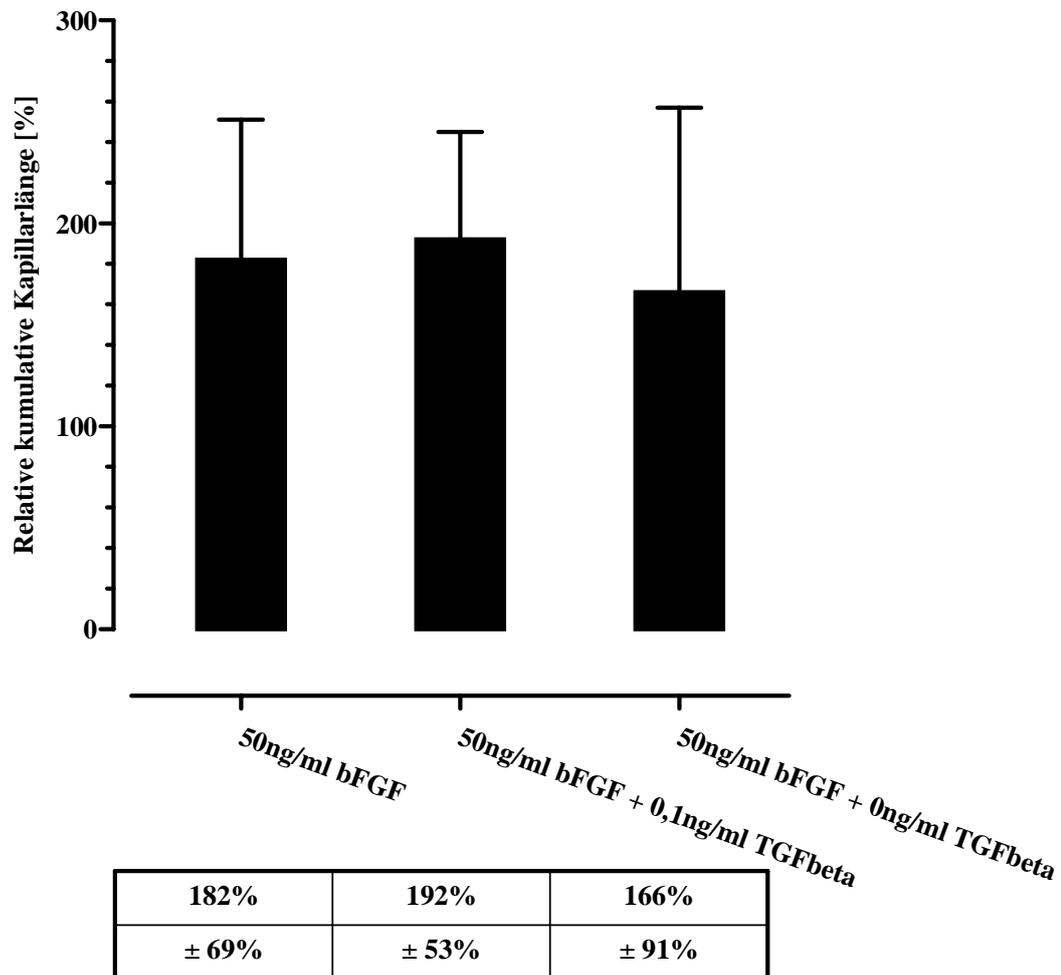


Abb12: TGF- β bleibt konzentrationsunabhängig ohne signifikanten Effekt auf die bFGF-induzierte *in vitro* Angiogenese von Monokultursphäroiden bestehend aus jeweils 500 humanen mikrovasculären pulmonalen Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMIC)

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprosslänge der unstimulierten Kontrolle = 100%).

Die Zugabe von TGF- β in den Konzentrationen 0,1 ng/ml (n = 80) und 10 ng/ml (n = 140) hatte keinen signifikanten Effekt auf die bFGF-induzierte *in vitro* Angiogenese. Angabe der Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$.

6.3.5 Die Kombination der Wachstumsfaktoren bFGF und TGF- β wirkt angiogen auf Kokultursphäroide

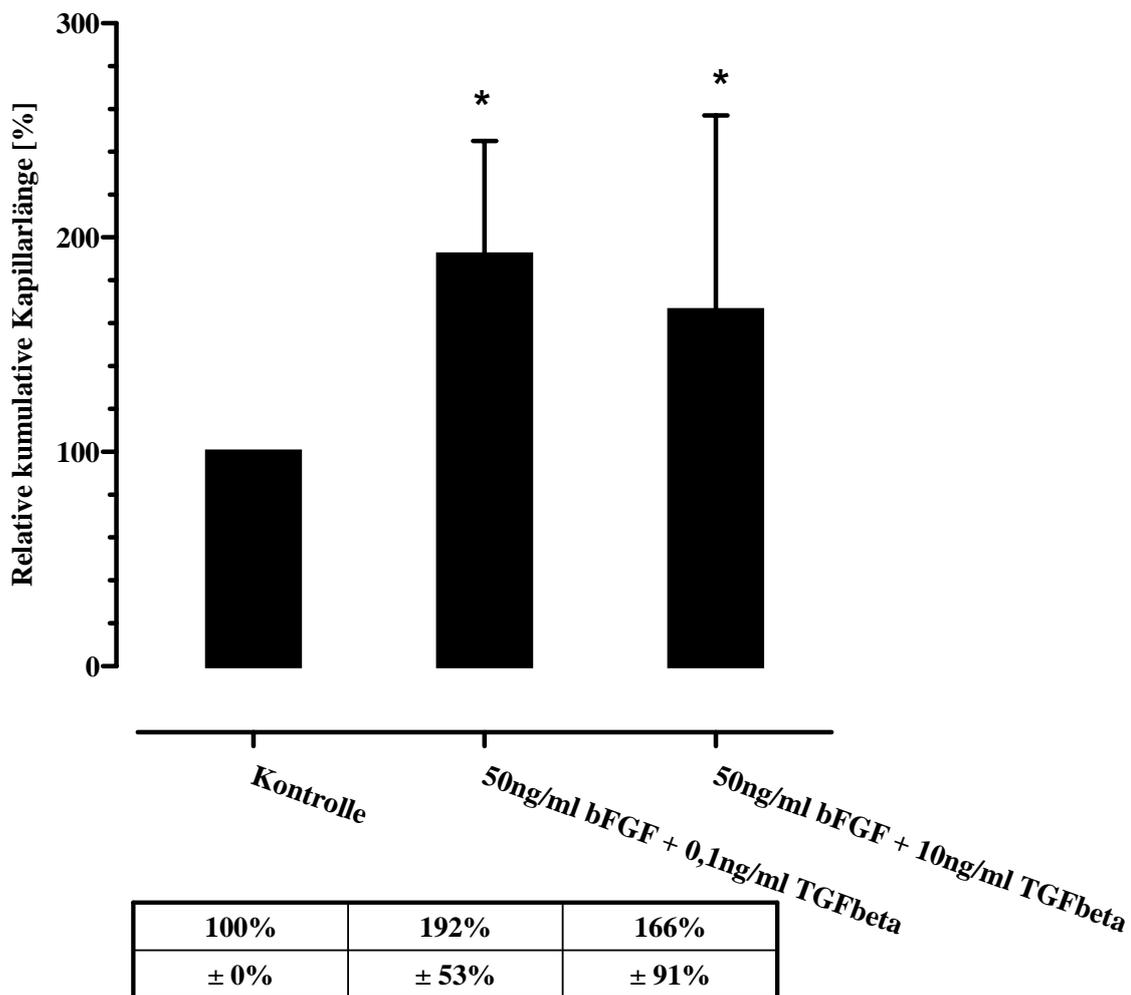


Abb.13: Die Kombination der Wachstumsfaktoren TGF- β und VEGF wirkt angiogen auf Kokultursphäroide bestehend aus jeweils 500 humanen mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) (n = 140 für Kontrolle und bFGF + 10 ng/ml TGF- β , n= 80 für bFGF + 0,1ng/ml TGF- β)

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Angabe der Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$. Durch Kombination beider Wachstumsfaktoren ist eine gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte Angiogenese zu beobachten. Wie auch bei der Kombination von bFGF mit TGF- β angedeutet und ebenfalls nicht signifikant der hemmende Effekt von TGF- β in höheren Konzentrationen.

6.3.6 bFGF wirkt in gleicher Konzentration stärker angiogen als VEGF

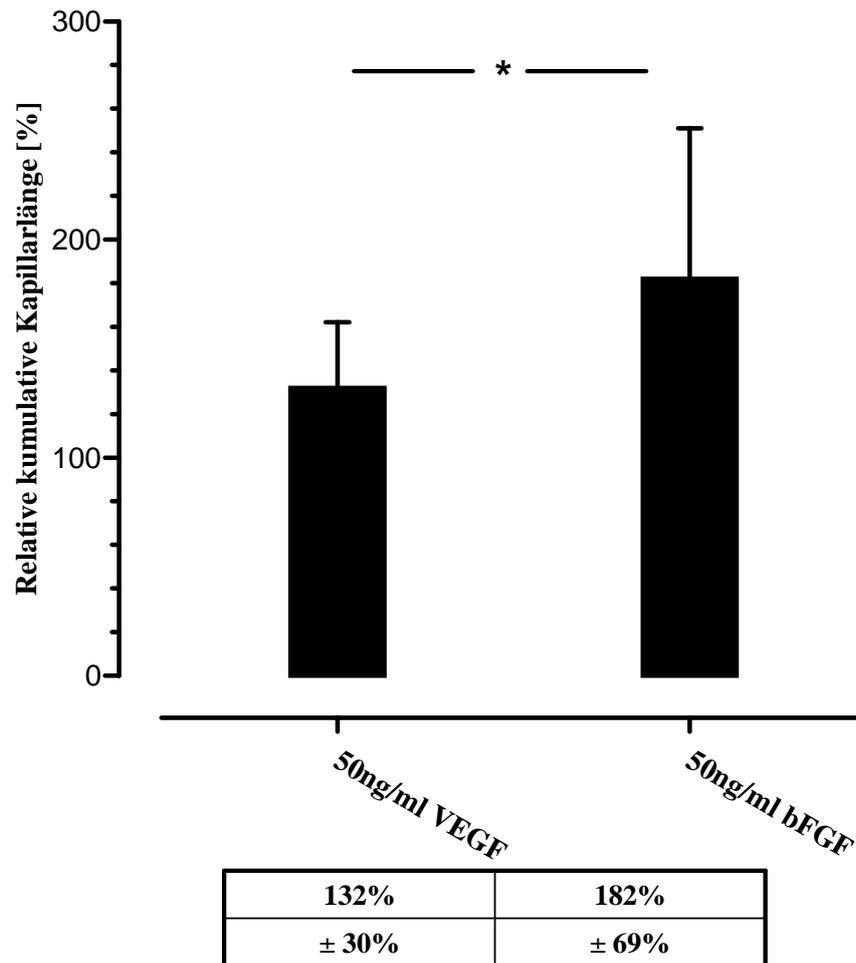


Abb.14: Die angiogene Wirkung von bFGF auf Kokultursphäroide bestehend aus jeweils 500 humanen mikrovaskulären pulmonalen Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) ist bei gleicher Konzentration stärker als die von VEGF (n = 120 für 50 ng/ml VEGF und n = 140 für 50 ng/ml bFGF)

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Angabe der Daten als Mittelwert ± Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$.

6.4 Kokultursphäroide zeigen im dreidimensionalen Fibringel eine gegenüber Monokultursphäroiden signifikant höhere Spontanangiogenese

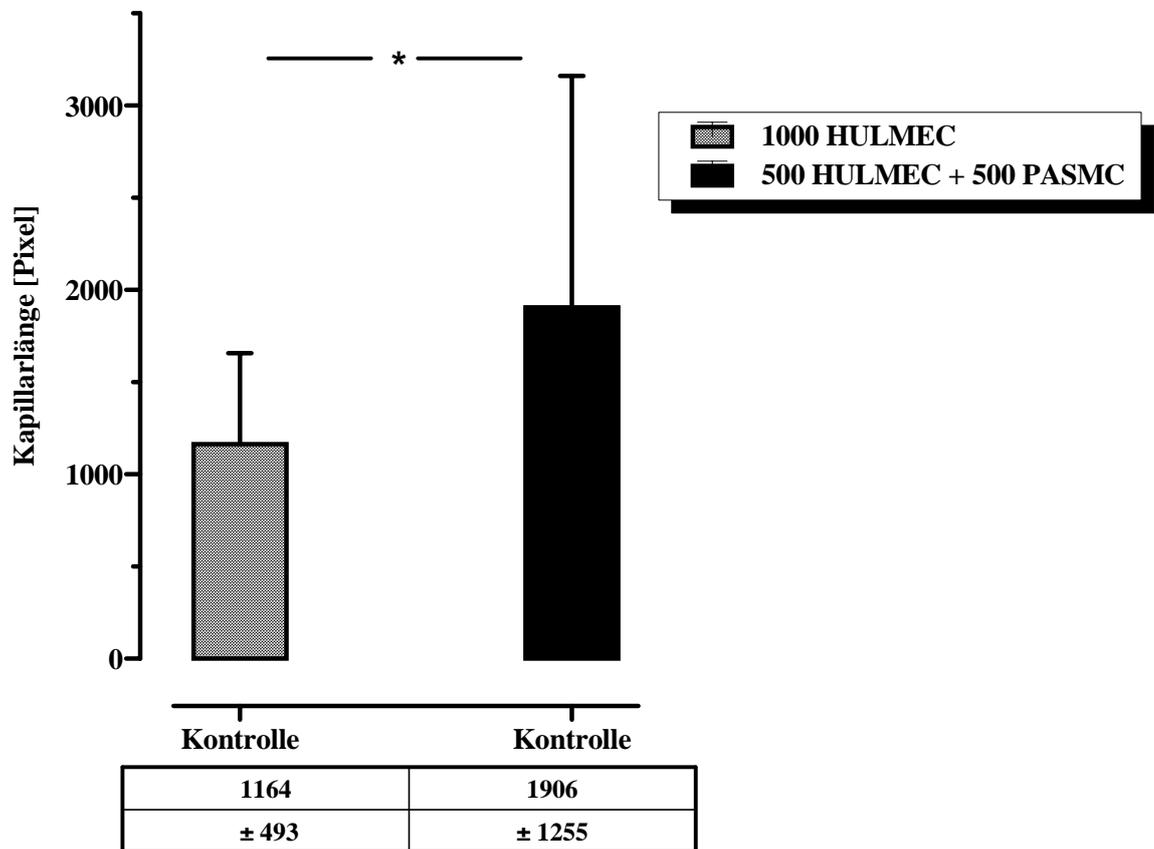


Abb.15: Quantifizierung der Spontanangiogenese von Mono- und Kokultursphäroiden bestehend aus 1000 humanen mikrovaskulären Endothelzellen HULMEC (n = 120) bzw. 500 humanen vaskulären Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASC) (n = 140).

Angegeben ist die absolute kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24ständiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel. Angabe der Daten als Mittelwert ± Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$.

Die Abbildung zeigt die kumulierten Absolutwerte aller durchgeführten Versuche für die Kontrollgruppe. Die Werte der Abszisse stellen die Kapillarlängen in Pixelabständen ohne Einheit dar. Die Kokultur-Sphäroide zeigten bei stärkerer Streuung insgesamt mehr messbare spontane angiogene Aktivität.

6.5 In Kokultursphäroiden aus humanen mikrovaskulären Endothelzellen und humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen ist die VEGF-induzierte Angiogenese schwächer als in Monokultursphäroiden aus Endothelzellen (HULMEC)

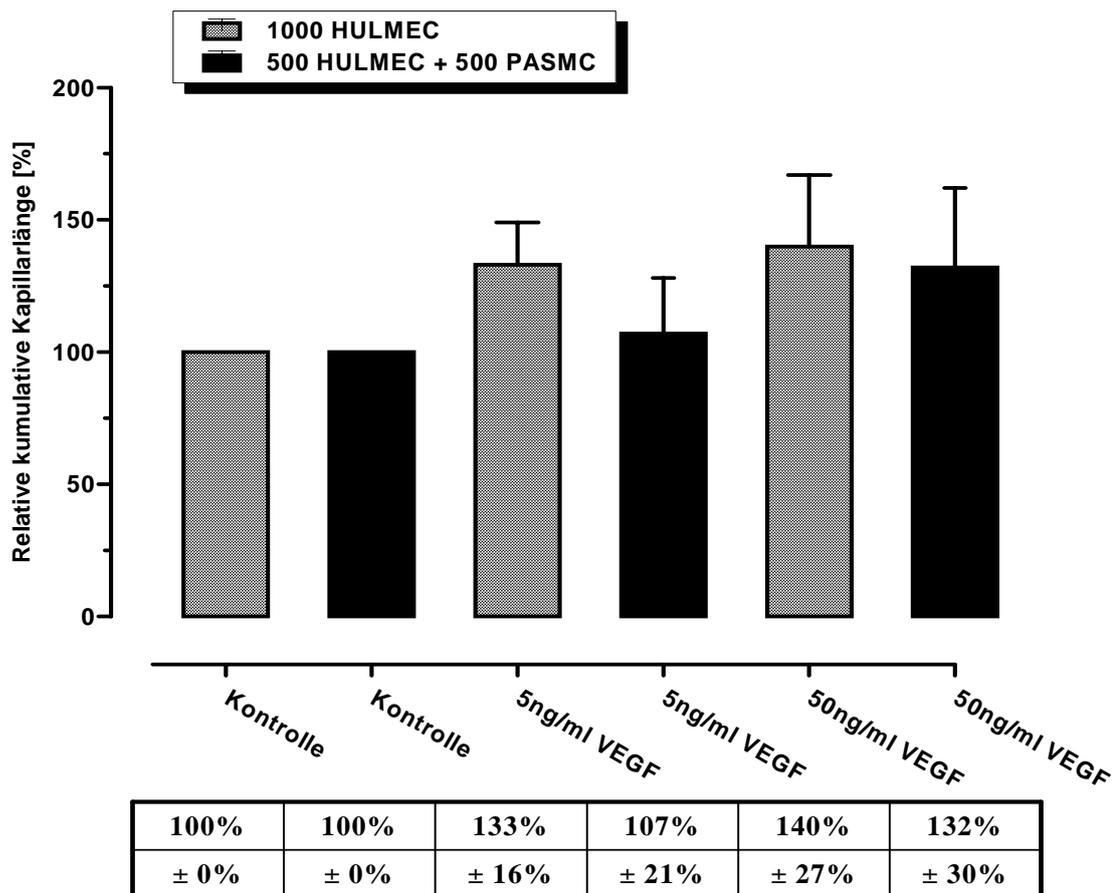


Abb.16: Quantifizierung der VEGF-induzierten Angiogenese von Mono- und Kokultursphäroiden bestehend aus 1000 humanen mikrovaskulären Endothelzellen HULMEC (n mind. ≥ 40) bzw. 500 humanen vaskulären Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) (n ≥ 60).

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Angabe der Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$. Es zeigt sich eine (nicht signifikant) schwächere VEGF-induzierte Angiogenese der Kokultursphäroide vor allem bei niedrigen Konzentrationen von VEGF (5 ng/ml: $p = 0,077$).

6.6 TGF- β wirkt in geringer Konzentration auf Kokultursphäroide aus humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC) und humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) stärker angiogen als auf Monokultursphäroide aus Endothelzellen (HULMEC)

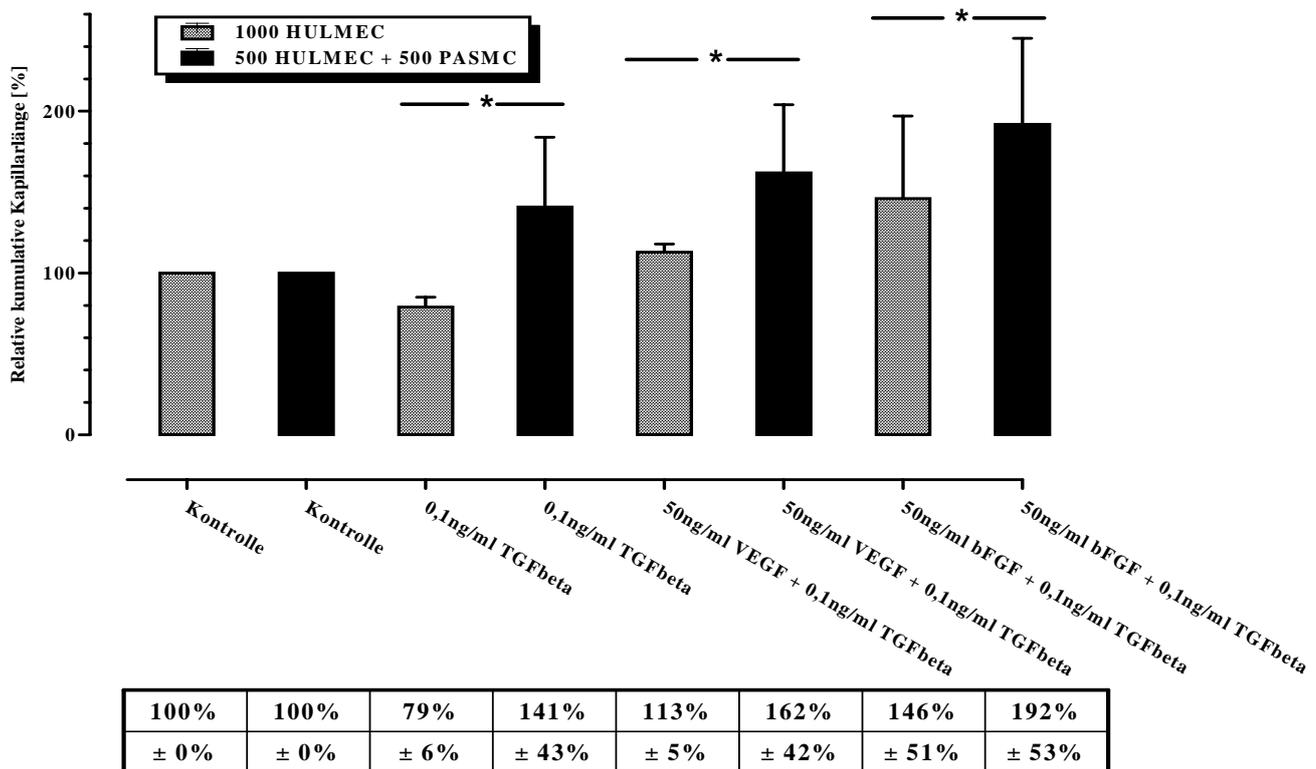


Abb.17: Angiogene Effekte von TGF- β in geringer Konzentration (0,1 ng/ml) auf Monokultursphäroide aus jeweils 1000 humanen pulmonalen Endothelzellen (HULMEC) und Kokultursphäroide aus jeweils 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und 500 HULMEC.

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Angabe der Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$. Die Zugabe von 0,1 ng/ml TGF- β entweder allein oder in Kombination mit VEGF oder bFGF hatte bei den Kokultursphäroiden eine gegenüber den Monokultursphäroiden signifikant stärkere angiogene Aktivität zur Folge.

6.7 Untersuchung systemischer Angiogenese *in vitro* an Kokultursphäroiden bestehend aus 500 humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC)

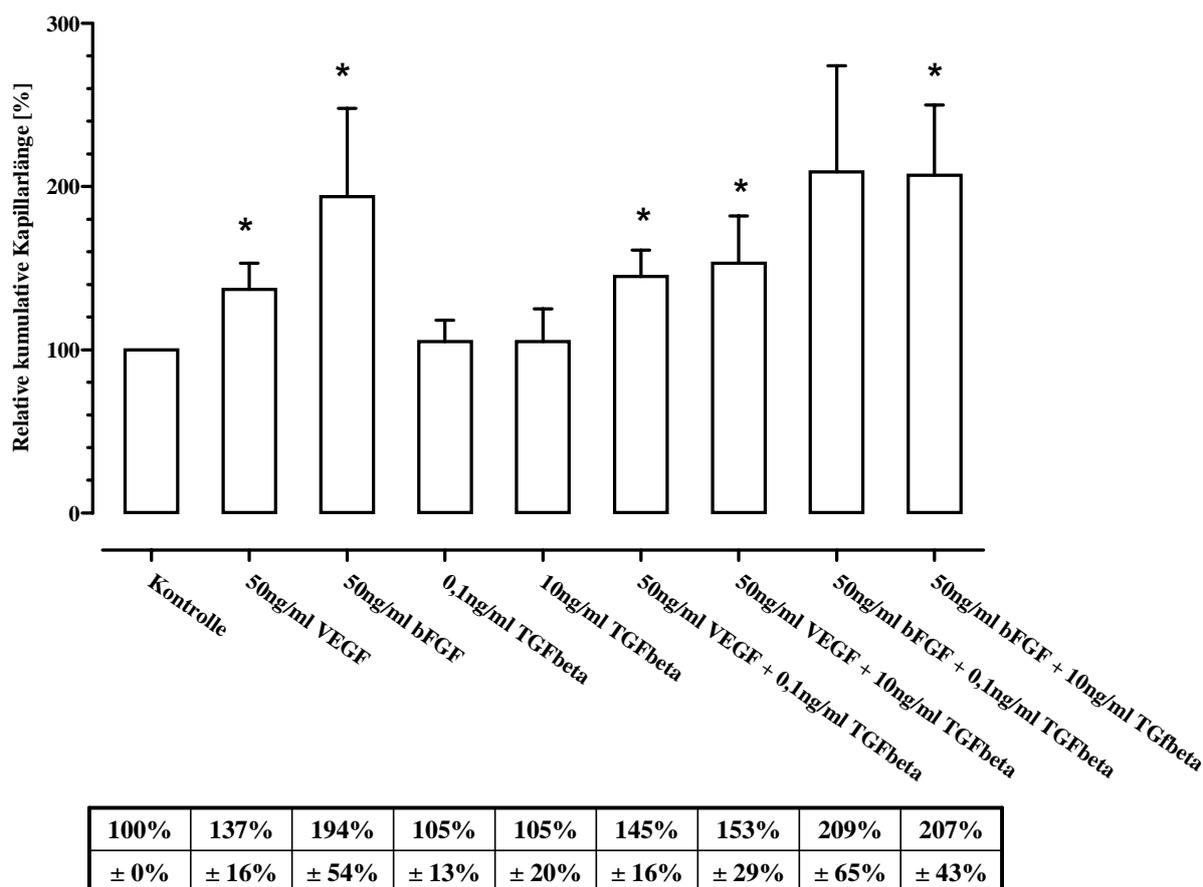


Abb. 18: Übersicht der Versuche zur *in vitro* Angiogenese von Kokultursphäroiden bestehend aus jeweils 500 humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC).

Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprossenlänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Die Daten repräsentieren $n = 80$ Sphäroide. Angabe der Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$.

Die angiogenen Substanzen VEGF und bFGF steigerten in der Konzentration 50 ng/ml die angiogene Aktivität signifikant gegenüber der Kontrolle. TGF- β hatte keinen signifikanten Effekt auf die angiogene Aktivität der Sphäroide.

6.8 Die systemische und die pulmonale *in vitro* Angiogenese unterscheiden sich im dreidimensionalen Sphäroidassay nicht.

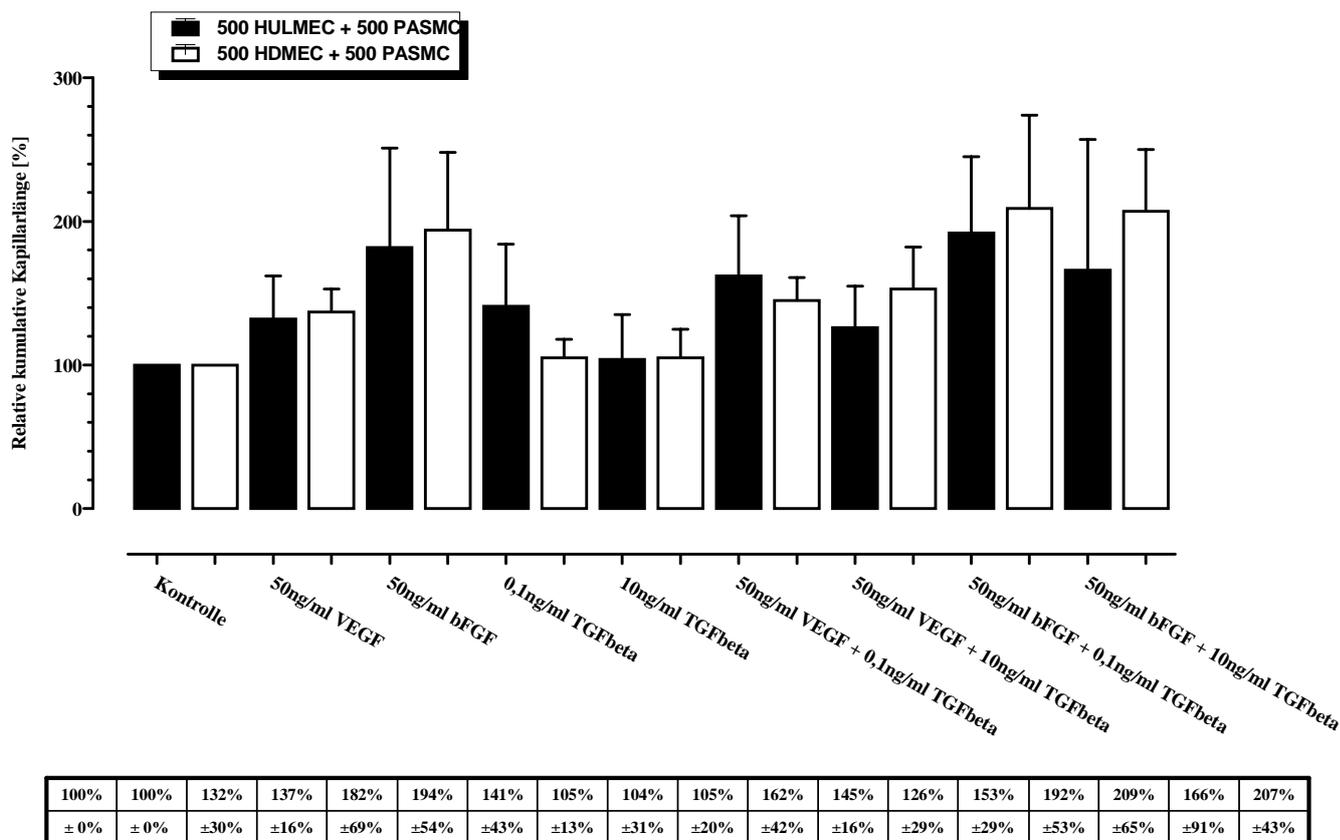


Abb.19: Übersicht der Versuche zur *in vitro* Angiogenese von Kokultursphäroiden bestehend aus jeweils 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASC) und 500 humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) bzw. 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASC) und 500 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen

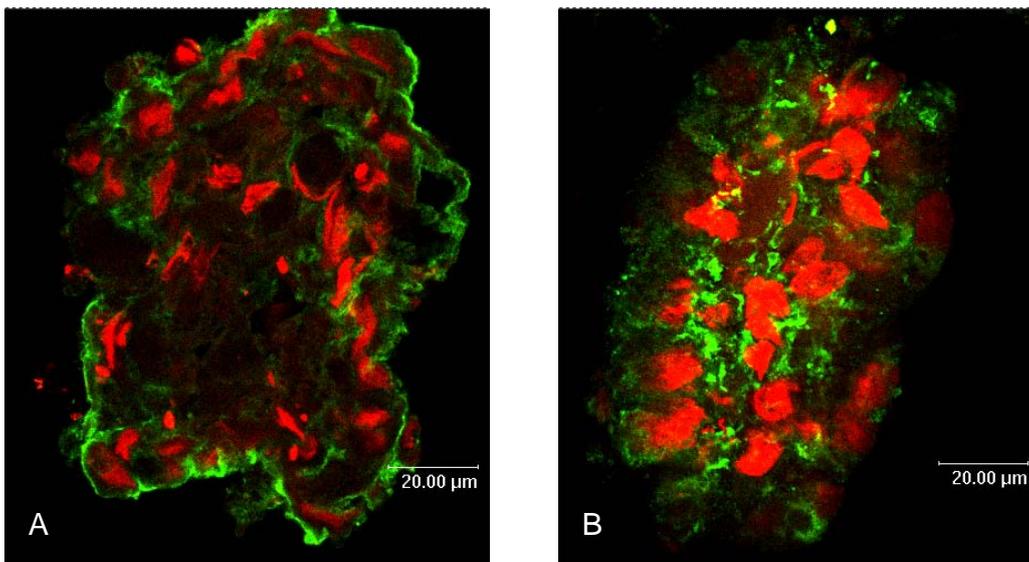
Angegeben ist die relative kumulative Länge der von dem Zellsphäroid ausgehenden Endothelsprossen nach 24stündiger Kultur im dreidimensionalen Fibringel bezogen auf die endogene angiogene Aktivität (kumulative Sprosslänge der unstimulierten Kontrolle = 100%). Die Daten repräsentieren mindestens n = 80 Sphäroide. Angabe der Daten als Mittelwert ± Standardabweichung; Signifikanz angenommen bei $p < 0,05$.

Die *in vitro* Angiogenese systemischer und pulmonaler mikrovaskulärer Endothelzellen in Kokultur mit pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen unterscheiden sich im dreidimensionalen Sphäroidassay nicht voneinander.

6.9 Immunfluoreszenz-Untersuchungen von Zellsphäroiden

6.9.1 Untersuchung der Sphäroide vor der Einbettung in die dreidimensionale Gelmatrix

6.9.1.1 Expression des Endothelantigens CD146 und des Basalmembranantigens Kollagen IV



A: Färbung von Monokultur-sphäroiden gegen CD 146

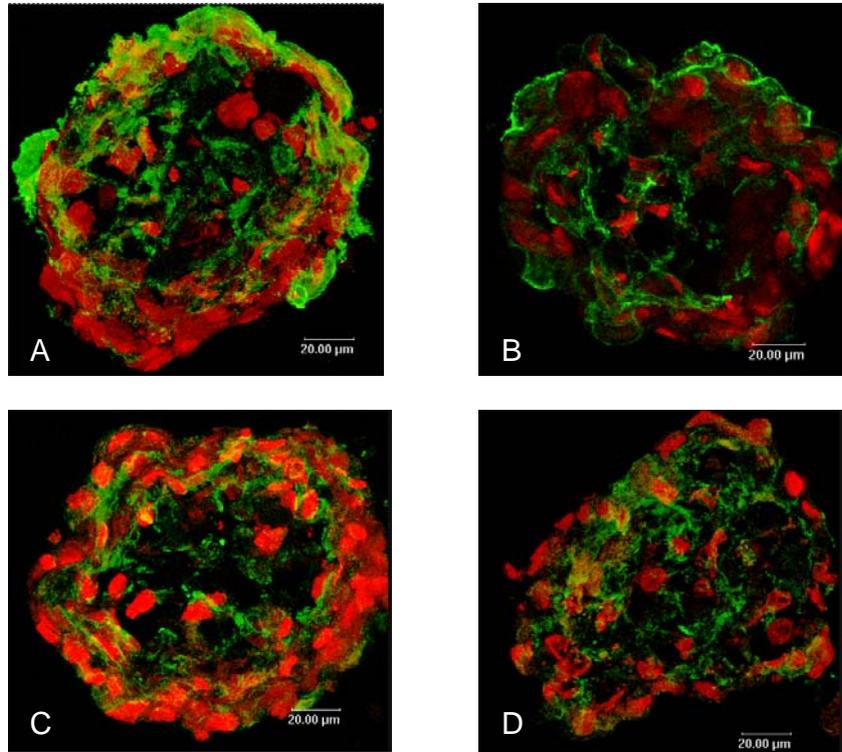
B: Färbung von Monokultur-sphäroiden gegen Kollagen IV

Abb.20

A: Der Endothelmarker CD146 (KlonP1H12) im Monokultur-Endothelzellsphäroid vor Einbettung in die Gelmatrix. Die Abbildung zeigt einen 5 µm-Gefrierschnitt durch ein Endothelzellsphäroid bestehend aus 1000 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC). CD146 (grün) ist im gesamten Sphäroid exprimiert, mit Betonung der Sphäroidoberfläche. Die Zellkerne sind rot markiert (Propidiumiodid)

B: Das Basalmembranantigen Kollagen IV (grün) ist im Monokultur-Endothelzellsphäroid exprimiert. Dies ist ein Hinweis auf eine reguläre Bildung einer Basalmembran zwischen den in die Agglomeratbildung gezwungenen Endothelzellen. Die Zellkerne sind rot markiert (Propidiumiodid).

6.9.1.2 Expression von CD146, Laminin und Kollagen IV in Kokultur-Sphäroiden bestehend aus humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen und humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen.



A/B: Färbung gegen CD 146
C: Färbung gegen Kollagen IV

D: Färbung gegen Laminin

Abb.21

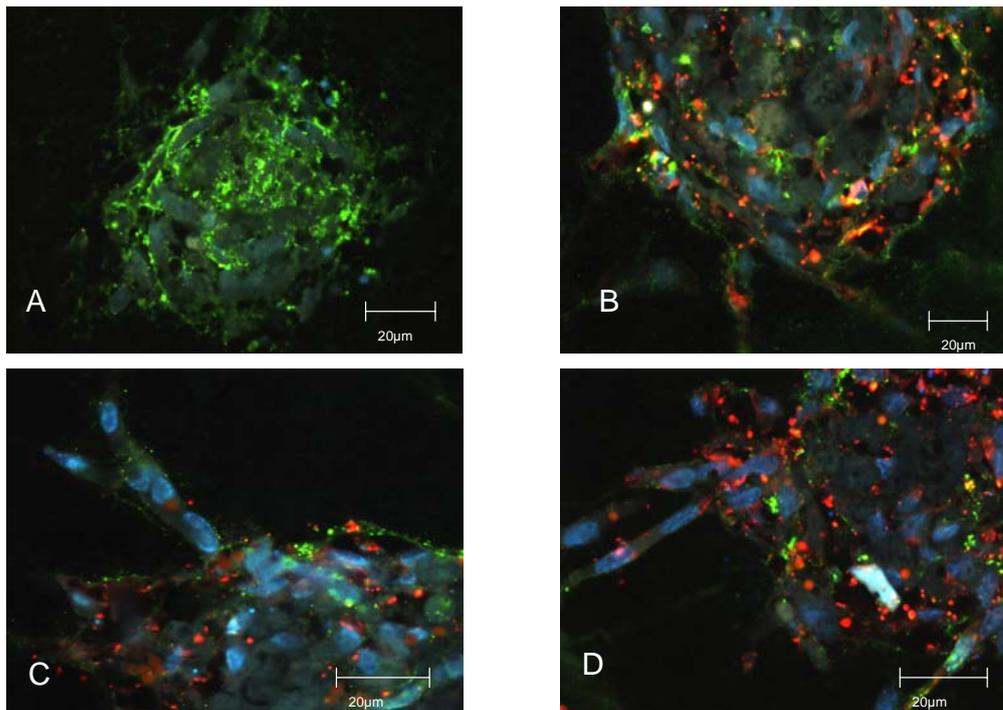
A/B: Der Endothelmarker CD146 (KlonP1H12) Endothel-Glattmuskelzell-Kokultursphäroiden vor Einbettung in die Gelmatrix. Die Abbildungen zeigen 5 µm-Gefrierschnitte durch Endothel-Glattmuskelzell-Kokultursphäroide bestehend aus jeweils 500 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. CD146 (grün) ist im gesamten Sphäroid exprimiert, mit Betonung der Sphäroidoberfläche. Die Zellkerne sind rot markiert (Propidiumiodid) und finden sich vorwiegend in den äußeren Bereichen des Sphäroids.

C: Das Basalmembranantigen Kollagen IV (grün) ist im Endothel-Glattmuskelzell-Kokultursphäroid exprimiert. Deutlicher noch als im Endothelzell-Monokultursphäroid zeigt sich eine membranartige Exprimierung des Basalmembranantigens. Dies ist ein Hinweis auf die reguläre Ausbildung einer Basalmembran innerhalb der Endothelzellen aber auch zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen. Die Zellkerne sind rot markiert (Propidiumiodid).

D: Das Basalmembranantigen Laminin (grün) ist ebenso wie Kollagen IV im Endothel-Glattmuskelzell-Kokultursphäroid exprimiert. Dies unterstreicht die Feststellung, dass regulär Basalmembranproteine innerhalb der Sphäroide gebildet werden. Die Zellkerne sind rot markiert (Propidiumiodid).

6.9.2 Paraffinschnitte von eingebetteten Sphäroiden

6.9.2.1 Färbung gegen vWF, bzw. vWF und α -Actin



A: Monokultursphäroid, gefärbt gegen vWF

B-D: Kokultursphäroide, gefärbt gegen α -Actin und vWF

Abb. 22

A: Der Endothelmarker von-Willebrand-Faktor in Endothel-Glattmuskelzell-Kokultursphäroiden nach Einbettung in die Gelmatrix. Die Abbildungen zeigen 5 μ m-Paraffinschnitte durch Endothel-Glattmuskelzell-Kokultursphäroide bestehend aus jeweils 500 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. vWF (grün) ist im gesamten Sphäroid

exprimiert. Die Zellkerne sind blau markiert (HOECHST 33342). In den angeschnittenen Sprossen finden sich regelmäßig mehrere Zellkerne, d.h. die Sprossen werden von mehreren Zellen gebildet.

B-D: Der Endothelmarker von-Willebrand-Faktor und der Glattmuskelzellmarker α -Actin in Endothel-Glattmuskelzell-Kokultursphäroiden nach Einbettung in die Gelmatrix. Die Abbildungen zeigen 5 μ m-Parafinschnitte durch Endothel-Glattmuskelzell-Kokultursphäroide bestehend aus jeweils 500 humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen (HULMEC) und 500 humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. VWF (grün) ist in nahezu allen angeschnittenen Sprossen exprimiert. α -Actin (rot) ist hauptsächlich im Zentrum der Sphäroide exprimiert. Einige der Angeschnittenen Sprossen zeigen neben der Expression von vWF eine Expression von α -Actin, was der Stabilisierung der Endothelsprossen durch glatte Muskelzellen entspricht. Die Zellkerne sind blau gefärbt (HOECHST 33342). Die Sprossen bestehen durchweg aus mehreren Zellen. Im innersten Zentrum des Sphäroids sind keine vitalen Zellkerne nachweisbar.

7 Diskussion

7.1 Diskussion des Modells

Die Angiogenese spielt eine wesentliche Rolle bei physiologischen Prozessen der Ontogenese, des Organwachstums und der Reproduktion^{1,168} sowie bei pathologischen Prozessen wie Wundheilung, Inflammation und Tumorwachstum^{1,169,170}. Lungengefäße entstehen während der Organentwicklung durch Vaskulogenese im peripheren Mesenchym sowie durch Ausbreitung der großen Gefäße von zentral nach peripher durch Angiogenese¹⁷¹. In der adulten Lunge ist die Bildung neuer Gefäße bei verschiedenen entzündlichen (Asthma, Infektion), neoplastischen (Bronchialkarzinom) sowie fibrosierenden Erkrankungen zu beobachten¹⁷²⁻¹⁷⁴. Interessanterweise entstehen die neu gebildeten Gefäße bei diesen pathologischen Prozessen überwiegend aus dem bronchialarteriellen Gefäßsystem und nicht aus den Vasa publica, dem pulmonalarteriellen oder pulmonalkapillären Gefäßsystem¹⁷⁵. Bei fibrosierenden Erkrankungen wurde vornehmlich die Bildung von Anastomosen zwischen Bronchialarterien und pulmonalem Gefäßbett beobachtet¹⁷⁶. Im Vergleich zur pathologischen Gefäßneubildung, welche so gut wie ausschließlich aus dem bronchialarteriellen Gefäßsystem geschieht, wird bei verschiedenen wichtigen Lungenerkrankungen ein progredienter Untergang von pulmonalarteriellen Gefäßen (pulmonale Hypertonie) sowie von pulmonalkapillären Gefäßen (COPD, Emphysem) beobachtet¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

Alle Blutgefäße unseres Körpers sind mit einem einschichtigen Endothel ausgekleidet. Für einen 70kg schweren Menschen macht das „Organ“ Endothel eine Fläche von über 1000m² aus und wird auf ein Gesamtgewicht von ungefähr 100g geschätzt¹⁸⁰. Werden Endothelzellen kultiviert, behalten sie die Eigenschaft, einschichtig als so genannter Monolayer zu wachsen, bei¹⁸¹. Endothelzellen stellen eine heterogene Zellentität dar, sind sie doch in unterschiedlichen Organen mit unterschiedlichen, teilweise diametralen Aufgaben betraut. Während sie im ZNS einen möglichst dichten Verband bilden, um die Blut-Hirn-Schranke zu etablieren und aufrecht zu erhalten, stellen sie beispielsweise in der Leber durch Fenestrierung die Grundlage für die Blutentgiftung durch die Hepatozyten dar, indem sie weite Sinusoide für maximalen Stoffaustausch bilden.^{16,17}

Werden Endothelzellen in ein *in vitro*-Modell integriert, kann die Herkunft der Zellen und ihr Differenzierungsgrad erheblichen Einfluss auf das Verhalten der Zellen im Modell ausüben. Je besser es gelingt, Endothelzellen *in vitro* in ihrem originale Differenzierungsgrad zu erhalten, umso organspezifischer kann das betreffende Modell interpretiert werden¹⁸². Die Isolation und Kultur differenzierter, mikrovaskulärer Endothelzellen ist ungleich schwieriger, als die Isolation beispielsweise von Nabelschnurvenenendothelzellen. Müssen die Zellen vor ihrem

experimentellen Einsatz allerdings erst stark *in vitro* expandiert werden, verlieren sie sicherlich zunehmend spezifische Merkmale, da mikrovaskuläre Endothelzellen physiologischerweise nur eine sehr geringe Zellteilungsrate haben¹⁸³.

Die zentrale Rolle der Endothelzellen bei der Angiogenese ist unbestritten und in zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen belegt. Mechanismen der Angiogenese nur an Endothelzellen zu untersuchen ist adäquat für viele Fragen der Endothelzellbiologie und hat das Verständnis der Angiogenese in den letzten Jahren enorm vertieft. Allerdings wird dabei ein wichtiger Einflussfaktor außer Acht gelassen: Endothelzellen stehen im Blutgefäß in engem räumlichen und funktionellen Kontakt mit den sie umgebenden Perizyten und Glattmuskelzellen. Dass diese interzelluläre Kommunikation erhebliche Auswirkungen auf die Funktion der Endothelzellen und damit auch auf die Angiogenese hat, wurde in zahlreichen Versuchen gezeigt^{35,184}.

Damit erwächst die Notwendigkeit, diese Einflussfaktoren bei einem die pulmonale Angiogenese imitierenden Modell zu berücksichtigen. Das dreidimensionale Kokultursphäroidmodell ist ein experimenteller Ansatz hierzu, und es konnten in den vorgelegten Untersuchungen deutliche Einflüsse der muralen Zellen auf die endotheliale Angiogenese gezeigt werden.

Ein Sphäroidmodell fand bereits Anwendung bei Tumorzellstudien und wurde kürzlich auch in zur Untersuchung der Angiogenese eingesetzt¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Es ermöglicht, aus Geweben isolierte, primäre Zellen in einer künstlichen Extrazellulärmatrix wachsen und ihrer Funktion entsprechend agieren zu lassen.

7.2 Zelluläre Zusammensetzung der Sphäroide

Im Rahmen der Etablierung des dreidimensionalen Kokultursphäroidmodells wurden immunhistologische Untersuchungen an den Sphäroiden vor und nach Einbettung in die Gelmatrix durchgeführt. Die immunhistologische Untersuchung der Sphäroide hatte zwei Ziele:

- Erstens sollte die interne zelluläre und Extrazellulärmatrix-Zusammensetzung der Mono- und Kokultursphäroide analysiert werden.
- Zweitens sollte die zelluläre Zusammensetzung der Kapillarsprossen der Kokultursphäroide analysiert werden, um genaueren Aufschluss über die Interaktion und Lokalisation von Endothel und muralen Zellen zu erhalten.

Die für die Immunfluoreszenz-Färbungen verwendeten Antikörper wurden so ausgewählt, dass die Charakterisierung und Identifizierung des Zelltyps möglich waren.

Zu den, Endothelzell-spezifischen Antigenen zählen unter anderem von Willebrand Faktor (vWF), CD31 und CD146^{180,188}. Antikörper gegen diese Antigene wurden im Rahmen der immunhistologischen Untersuchungen verwendet. Die Färbung der glatten Muskelzellen erfolgte mit Antikörpern gegen α -Glattmuskelzell-Aktin.

Es zeigte sich eine diffuse Verteilung CD146- bzw. vWF-positiver Endothelzellen im Kokultursphäroid (siehe Abb. 21). Die Sphäroidoberfläche wurde fast ausschließlich durch Endothel gebildet. Es zeigte sich eine besonders starke Expression von CD146 bzw. vWF durch Endothelzellen an der Oberfläche des Sphäroids, dieses ist als Zeichen der besonders guten Differenzierung der im Kontakt mit der Gelmatrix stehenden Zellen zu interpretieren, welche den Ausgangspunkt für das kapilläre Aussprossen darstellten. Der interne Aufbau der Kokultursphäroide mit mikrovaskulären Endothelzellen deckte sich nicht mit der von Korff *et al.* beschriebenen klaren Schichtung von zentral lokalisierten Glattmuskelzellen und einer Hüllschicht aus makrovaskulären Nabelschnurvenen-Endothelzellen¹⁸⁷. Diesbezüglich kann eine größere Resistenz mikrovaskulärer Endothelzellen gegen Hypoxie oder Substratmangel im Inneren des Sphäroids postuliert werden, die nicht zu einem frühen Absterben innen liegender Endothelzellen führt.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass das Modell damit eine der physiologischen Situation im Gefäß genau umgekehrte Schichtung von Endothelzellen und Glattmuskelzellen aufwies. Kam es zum Aussprossen einer endothelialen Kapillarstruktur und deren äußere Stabilisation durch glatte Muskelzellen, herrschten für den neu entstandenen Gefäßpross physiologische Bedingungen hinsichtlich der Zellschichtung. Die Immunfluoreszenz von eingebetteten Kokultursphäroiden

zeigte eine Stabilisierung primär endothelialer Sprossen durch α -Aktin-positive glatte Muskelzellen.

Bei der immunhistologischen Untersuchung eingebetteter, bereits ausgesprossener Sphäroide zeigte die Kernfärbung mit Hoechst 33342, dass jeder einzelne Spross aus mehreren Endothelzellen bestand. Es handelte sich also nicht um zytoplasmatische Ausläufer einer Endothelzelle, sondern vielmehr um eine zielgerichtete Migration mehrerer Endothelzellen, wie sie bei der Angiogenese *in vivo* beobachtet wird¹⁸⁹.

7.3 In vitro Angiogenese der Mono- und Kokultursphäroide

7.3.1 Effekte von VEGF

VEGF ist ein Schlüsselmediator der Angiogenese, physiologisch wie pathologisch, nachgewiesen in zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Modellen^{77,190}. Endothelzellen sind existenziell auf das Vorhandensein von VEGF angewiesen. Erst nach Stabilisierung primitiver Endothelsprossen durch Perizyten bzw. glatte Muskelzellen lässt diese vitale Anhängigkeit nach⁸³. Biochemisch ist VEGF ein basisches, dimeres, heparinbindendes Glycoprotein mit struktureller Beziehung zu den plättchenhergeleiteten Wachstumsfaktoren¹⁹¹. Zur VEGF-Familie werden derzeit fünf Mitglieder gezählt, VEGF-A, -B, -C, -D, und -E. Der plazentale Wachstumsfaktor PLGF zählt ebenfalls zu den VEGF-verwandten Substanzen. Den größten Einfluss auf die Angiogenese von Gefäßendothelzellen hat VEGF-A, welches im Körper in fünf aktiven Isoformen mit unterschiedlicher Rezeptoraffinität und Halbwertszeit vorkommt¹⁹². Die Isoform VEGF₁₆₅ ist die im Körper am häufigsten vorkommende und wird deshalb oft schlicht VEGF-A oder nur VEGF genannt. VEGF wird ubiquitär im Körper als Antwort auf einen hypoxischen Reiz gebildet. Einige Untersuchungen belegen sogar die Expression von VEGF in Endothelzellen selbst als Antwort auf Hypoxie¹⁹³. Die Regulation der Expression von VEGF geschieht über die Hypoxie-induzierbaren Faktoren HIF⁹⁷. Die Wirkung von VEGF auf Endothelzellen durch die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 und Neuropilin vermittelt, wobei die angiogenen Effekte überwiegend über VEGFR-2 vermittelt werden¹⁰⁹.

Für die Versuche mit Mono- und Kokultursphäroiden wurde VEGF₁₆₅ verwendet. Die Konzentrationen in den Versuchsreihen betragen (5-50 ng/ml). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass in diesem Dosisbereich die maximale zelluläre Reaktion zu erwarten ist. Sowohl in den Versuchen mit Mono- als auch mit Kokultursphäroiden bewirkte die Zugabe von VEGF eine

gegenüber der Kontrolle signifikant höhere angiogene Aktivität (s. Abb. 5, 9). Ein konzentrationsabhängiger Effekt scheint anhand der gewonnenen Daten wahrscheinlich, konnte jedoch nicht statistisch signifikant belegt werden.

Die Kokultur von Endothelzellen mit glatten Muskelzellen führte zu geringerer angiogener Reaktion der Endothelzellen auf VEGF, wie es von anderen Autoren bereits beobachtet wurde¹⁸⁷ (s. Abb. 16). Bei den Monokulturversuchen zeigte sich eine gegenüber der Kontrolle signifikant höhere angiogene Aktivität bereits nach Zugabe von 5 ng/ml VEGF, während dies bei den Kokulturversuchen erst bei einer Konzentration von 50 ng/ml VEGF der Fall war. Ein solcher Effekt wurde bereits für Nabelschnurvenenendothelzellen in Kokultur mit glatten Muskelzellen gezeigt. In der Kokultur mit Endothelzellen exprimieren glatte Muskelzellen unter anderem aktiviertes TGF- β , welchem antiangiogene, antimigrative und antiproliferative Wirkungen auf Endothelzellen zugeschrieben wurden^{194,195}. In mehreren Experimenten, so auch in den vorliegenden Untersuchungen konnte jedoch kein identischer Effekt durch exogen zugeführtes TGF- β erzielt werden. Der Grund kann zum einen in der fehlenden notwendigen Aktivierung des Proteins, zum anderen in indirekten Effekten, beispielsweise der Induktion von Enzymen der Degradierung der extrazellulären Matrix, als wichtiger Wirkmechanismus vermutet werden.

7.3.2 Effekte von bFGF

Der basische Fibroblastenwachstumsfaktor spielt ebenso wie VEGF eine entscheidende Rolle in der Regulation der Angiogenese, insbesondere der embryonalen Angiogenese¹⁵⁰. Ihm wird unter anderem die wichtige Rolle zugeschrieben, die Induktion der Angioblastenbildung aus dem Mesoderm zu triggern¹⁹⁰. Des Weiteren scheint bFGF essentiell für die Entwicklung und Unterhaltung der Integrität des Blutgefäßsystems des Embryos zu sein¹⁵⁰. Es wird von Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert und kommt daher ubiquitär im Körper vor¹⁹⁶. Im in-vitro-Assay steigert bFGF die Angiogenese von Endothelzellen¹⁹⁷, in glatten Muskelzellen die Expression von VEGF und wirkt demnach direkt und indirekt angiogen auf Endothelzellen¹⁹⁸. In den Vorliegenden Untersuchungen konnte für bFGF ebenso eine klar angiogene Wirkung an humanen mikrovaskulären Endothelzellen gezeigt werden. Diese stellte sich insgesamt deutlich dosisabhängig dar. In einer Konzentration, in der VEGF die Angiogenese bereits deutlich steigerte, hatte bFGF keinen angiogenen Effekt. Die größte angiogene Wirkung aller eingesetzten Wachstumsfaktoren in Monokulturversuchen wurde nach Zugabe von 50 ng/ml bFGF beobachtet. Im Gegensatz zum angiogenen Effekt von VEGF ist der von bFGF nicht durch die enge Nachbarschaft von Endothelzellen und glatten Muskelzellen beeinflusst und zeigt sich in beiden Versuchsgruppen analog.

7.3.3 Effekte von TGF- β

Die transformierenden Wachstumsfaktoren- β , aus deren Reihen das verwendete TGF- β 1 stammt, haben differentielle, konzentrationsabhängige, Effekte auf die Angiogenese¹⁹⁹. In niedriger Konzentration ist über Induktion angiogener Faktoren und Proteinasen ein angiogener Effekt beschrieben, in hoher Konzentration überwiegt ein gefäßstabilisierender Effekt durch Wachstumshemmung der Endothelzellen und Differenzierung und Rekrutierung von glatten Muskelzellen¹. Diese paradoxe Rolle wird über intrazelluläre Signalwege, in welche die Smad-Proteine zentral integriert sind, vermittelt¹⁹⁹. TGF- β -Rezeptoraktivierung führt zur Phosphorylierung von u.a. Smad-2 und -3, diese binden Smad-4, translozieren in den Nukleus und initiieren dort die Smad-abhängige Transkription.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die antiangiogene Wirkung durch Smad-2-abhängige Expression von Thrombospondin, einem antiangiogenem Faktor mit VEGF-inhibierender Wirkung vermittelt wird. Für Thrombospondin, einem heparinbindenden Protein der extrazellulären Matrix, sind zwei Mechanismen der VEGF-Inhibition beschrieben. Grundlage ist die Heparinbindungsfähigkeit von Thrombospondin und dessen Fähigkeit, VEGF konzentrationsabhängig zu binden. Die Inhibition der VEGF-abhängigen Proliferation von Endothelzellen geschieht zum einen über eine kompetitive Verdrängung von VEGF von Heparinsulfat an der Oberfläche der Endothelzellen, zum anderen über eine direkte Bindung von Thrombospondin an der heparinbindenden Region von VEGF, wo ein erheblicher Anteil (35%) der mitogenen Aktivität von VEGF lokalisiert ist²⁰⁰.

Eine angiogene Wirkung von TGF- β wird vermittelt durch Smad-3 u.a. durch Expression von VEGF-A²⁰¹. Des weiteren wird dieser Familie von Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle in der Ätiologie verschiedener Tumorerkrankungen zugesprochen, meist verbunden mit einer Minderfunktion des TGF- β -Systems und folgendem Fehlen einer Zellwachstumskontrolle¹⁹⁹. Eine Wirkung von TGF- β alleine, d.h. nicht in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren auf Endothelzell-Monokulturen wurde in den vorliegenden Untersuchungen nicht beobachtet, was sich mit den Ergebnissen anderer Autoren deckt. Anders ist dies, wenn Wachstumsfaktorkombinationen eingesetzt werden²⁰². In der Kokultur von Endothel- und glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass von Perizyten gebildetes TGF- β eine Induktion der Expression von VEGF-Rezeptor-1 in Endothelzellen hervorruft und diese so vor VEGF-Mangel-induzierter Apoptose, wie sie beispielweise bei der Frühgeborenen-Retinopathie beobachtet wird, schützt²⁰³. Glatte Muskelzellen produzieren, durch TGF- β induziert VEGF und bFGF, was zur Angiogenesesteigerung von Endothelzellen führt²⁰⁴. Dies kann den in den Kokulturversuchen beobachteten und in den Monokulturversuchen nicht vorhandenen angiogenen Effekt von TGF- β erklären. Wie zu Beginn dieses Absatzes erläutert wurde, ist die Wirkung von TGF- β sehr

komplex und die Mechanismen, durch die angiogene und angiostatische Signale erzeugt werden, sind nicht abschließend geklärt. Zur Klärung dieser Mechanismen an dem vorgestellten Sphäroidmodell sind zukünftig weitere Untersuchungen notwendig.

7.3.4 Effekte der Kombination von TGF- β mit VEGF und bFGF

Die komplexen Wirkmechanismen von TGF- β beinhalten unter anderem die Induktion der Expression von VEGF und bFGF in glatten Muskelzellen. Als Reaktion auf Hypoxie bilden glatte Muskelzellen ebenfalls VEGF, jedoch kein bFGF²⁰⁴. In den durchgeführten Monokulturversuchen konnte keine signifikante Modulation der VEGF- bzw. bFGF-induzierten Angiogenese durch TGF- β gezeigt werden. Es fand sich eine stärkere Inhibition der VEGF-induzierten als der bFGF-induzierten Angiogenese der Endothelsphäroide in der hohen Konzentration von 10 ng/ml (Abb. 6,7). Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür liegt in der TGF- β abhängigen, Smad-vermittelten Transkription des VEGF-Antagonisten Thrombospondin. Wie im vorangegangenen Absatz beschrieben wurde, kommt es nach Bindung von TGF- β an seinen Rezeptor zur Phosphorylierung von Smad-3 und hierüber letztlich zur Transkription von Thrombospondin, welches die VEGF-Wirkung auf Endothelzellen über zwei Mechanismen reduziert. Grundlage der Wirkung ist die Heparinbindungsfähigkeit von VEGF, welche entscheidend für dessen Wirkung auf die Endothelzellen ist. Hier wirkt Thrombospondin dank seiner höheren Affinität zu Heparinsulfat kompetitiv antagonistisch. Des Weiteren bindet Thrombospondin an VEGF und reduziert so die mitogene Aktivität von VEGF erheblich. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Thrombospondin inaktives TGF- β direkt im Sinne einer positiven Rückkoppelung aktivieren kann²⁰⁵. Nicht geklärt ist letztlich die Frage, wann TGF- β sein angiogenes und wann es sein angiostatisches Potential entfaltet. Da die angiogenen Effekte in niedriger Konzentration beschrieben, und die angiostatischen Effekte in hoher TGF- β -Konzentration in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnten, scheint die Phosphorylierung von Smad-3 und die darauf folgende Expression von VEGF-A erst ab einer gewissen Mindestkonzentration von TGF- β -abhängig exprimiertem Thrombospondin die angiogenen Effekte zu übertreffen.

Ein die VEGF- bzw. bFGF-induzierte Angiogenese steigernder Effekt durch niedrige Konzentrationen von TGF- β wurde in den Versuchen mit Monokultursphäroiden nicht beobachtet. Bei den Kokultursphäroiden zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Einfluss von TGF- β auf die VEGF-bzw. bFGF-induzierte Angiogenese. Tendenziell wurde eine Steigerung der VEGF-induzierten Angiogenese durch TGF- β in niedriger Konzentration (0,1ng/ml) beobachtet. Hier zeigte sich also ein gegenläufiger TGF- β -Effekt in der Mono- und Kokultur, auf den im

Weiteren noch eingegangen werden wird. Festzuhalten bleibt der deutlichere Effekt auf die VEGF-induzierte als die bFGF-induzierte Angiogenese von Mono- und Kokultursphäroiden.

7.3.5 Vergleich der Mono- und Kokultursphäroide

Eines der für diese Arbeit formulierten Ziele war die Suche nach dem Einfluss interzellulärer Kontakte zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen auf die angiogene Aktivität von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen. Dazu wurden alle Versuchsreihen mit Mono- und Kokultursphäroiden, entweder bestehend aus 1000 Endothelzellen oder aus 500 Endothel- und 500 glatten Muskelzellen durchgeführt und die Ergebnisse verglichen. Die Daten machen eine Dreiteilung der Ergebnisse in der Diskussion sinnvoll:

1. Vergleich der Spontanangiogenese von Mono- und Kokultursphäroiden: Die kumulative Kapillarlänge pro Sphäroid lag bei den Kokultursphäroiden deutlich höher als bei den Monokultursphäroiden (s. Abb. 15). Die Stabilisierung der Endothelsprossen durch glatte Muskelzellen, welche ein besseres Überleben der Endothelzellen in der Gelmatrix bedingen kann, sowie die glattmuskuläre Produktion angiogener Faktoren könnten Erklärungen dafür sein.
2. Vergleich der VEGF- und bFGF-stimulierten Angiogenese von Mono- und Kokultursphäroiden: Die Stimulation der Angiogenese durch VEGF und bFGF führte bei beiden Gruppen, Mono- wie Kokultursphäroiden, zu einer gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhten angiogenen Aktivität. Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur zeigten aber sich vor allem in der höheren VEGF-Sensitivität der Monokultursphäroide, wie sie von anderen Autoren bereits beschrieben wurde¹⁸⁷. Bezüglich der Angiogeneseinduktion durch bFGF wurde ein solcher Effekt nicht beobachtet.
3. Vergleich des Einflusses von TGF- β auf die VEGF- und bFGF-stimulierte Angiogenese von Mono- und Kokultursphäroiden: TGF- β -Applikation allein steigerte die Angiogenese von Kokultursphäroiden signifikant gegenüber der von Monokultursphäroiden nach gleicher Behandlung, nicht aber signifikant gegenüber der Kokultursphäroid-Kontrolle. In Kombination mit VEGF und bFGF ließen sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen Mono- und Kokulturversuchen mit TGF- β herausarbeiten. Die Kokultur von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen mit humanen pulmonalen glatten Muskelzellen bewirkt eine gegenüber der Monokultur dieser Endothelzellen signifikante

Steigerung der VEGF- und bFGF-induzierten Angiogenese durch TGF- β in niedriger Konzentration (0,1ng/ml).

Es handelt sich also offensichtlich um eine Modulation des TGF- β -Effektes durch die glatten Muskelzellen.

Die Wirkung von TGF- β wird über die Bindung an einen aus zwei Rezeptoren bestehenden Rezeptorkomplex vermittelt. Dabei führt die Bindung an den aus Typ-I und Typ-II bestehenden Komplex zur Aktivierung der Typ-I-Serin/Threoninkinase durch Rezeptor Typ-II-abhängige Transphosphorylierung. Diese aktiviert Smad Proteine durch Phosphorylierung, welche sodann an Smad-4 binden und mit diesem als Komplex in den Nukleus translozieren. Hier erfolgt zur Steigerung der DNA-Affinität die Bindung an Transkriptionsfaktoren und schließlich die Regulation der Zielgenexpression.

Für den Typ-I-Rezeptor sind sieben Rezeptorsubtypen bekannt, (ALK-1-7). ALK-5 findet sich als Signalweg in vielen Zellarten, ALK1 ist ausschließlich in Endothelzellen exprimiert. Aktivierung von ALK1 führt über den Smad-1/5/8-Signalweg, Aktivierung von ALK5 über den Smad-2/3-Signalweg zur Translokation von Smad-4 in den Nukleus. Daraus ergibt sich, dass der Smad-1/5/8-Signalweg, welcher unter anderem zur direkten Expression von VEGF-A führt, den Endothelzellen exklusiv vorbehalten ist. Der Smad-1/5/8-Signalweg, aus der Aktivierung von ALK5 folgend, ist ubiquitär in nahezu allen Zellarten zu finden²⁰⁶. In Endothelzellen sind sowohl ALK1 als auch ALK5 exprimiert²⁰⁷. Dabei wirkt ALK5 sowohl agonistisch als auch antagonistisch zu ALK1. Es konnte gezeigt werden, dass ALK-5-Knockoutmäuse ebenfalls eine gestörte ALK1-Funktion aufwiesen. ALK5 vermittelt die TGF- β -abhängige Rekrutierung von ALK1 für den TGF- β -Rezeptorkomplex²⁰⁸. Antagonistisch zum angiogenen Effekt der ALK1-Aktivierung wirkt die ALK5-abhängige Expression von Thrombospondin, welches über zwei direkt VEGF-inhibierende Mechanismen antiangiogen wirkt: zum einen durch die Blockierung der für die mitogene Wirkung auf Endothelzellen wichtigen Heparinbindungsregion am VEGF-Molekül, zum anderen durch kompetitiven Antagonismus an dem auf der Endothelzelle präsentierten Heparansulfat zu VEGF²⁰⁵.

Dies erklärt den uneinheitlichen Effekt von TGF- β auf die Angiogenese von Endothelzellen.

7.3.6 Der Kokultur-Sphäroidassay mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen und PASM

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Unterschiede im Verhalten pulmonaler und systemischer mikrovaskulärer Endothelzellen zu erkennen. Aus diesem Grund erfolgte die Übertragung des Sphäroidassays nach dessen erfolgreicher Etablierung für die pulmonalen Zellen auf mikrovaskuläre dermale Endothelzellen. Diese wurden ebenfalls mit humanen pulmonalarteriellen Glattmuskelzellen kokultiviert. Als ein Ergebnis ist die erfolgreiche Übertragung der Versuchsanordnung auf die systemischen Zellen zu nennen. Die Sphäroidkultur funktionierte unter identischen Bedingungen mit identischer Versuchsanordnung.

Bezogen auf die Wachstumsfaktor-induzierte Angiogenese zeigten die dermalen Endothelzellen das erwartete Verhalten. Auch hier wirkten VEGF und bFGF angiogen, ein signifikanter Effekt von TGF- β lies sich nicht nachweisen.

7.3.6.1 Vergleich der Ergebnisse systemischer und pulmonaler Angiogenese im Sphäroid-Kukulturmodell

Für keinen der durchgeführten Versuchsansätze konnten signifikante oder zumindest deutliche Unterschiede hinsichtlich der spontanen oder der Wachstumsfaktor-induzierten Angiogenese von systemischen oder pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen gefunden werden. Auch wenn zahlreiche Regulationsmechanismen hinsichtlich z.B. Gefäßtonus im systemischen und pulmonalen Gefäßsystem in vivo unterschiedlich reguliert werden, konnte in den hier durchgeführten Versuchen mit dem Sphäroid-Kukulturmodell kein Hinweis auf eine Endothelzell-immanente differentielle Angiogeneseregulation gefunden werden.

8 Zusammenfassung

Ein Lebewesen ist auf die Entwicklung eines Blutgefäßsystems angewiesen, wenn seine Größe die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Metaboliten zur Energiegewinnung durch Diffusion von der Oberfläche nicht mehr suffizient zulässt. Angiogenese, das Aussprossen neuer Blutgefäße aus bereits Bestehenden, nimmt dabei eine zentrale Rolle ein. Sie hat ihren Stellenwert nicht nur in der Organentwicklung, sondern ist auch im adulten Organismus präsent z.B. bei Wundheilung, Infektabwehr und dem weiblichen Zyklus, aber auch bei pathologischem Gefäßwachstum wie es bei malignen Tumoren oder der Frühgeborenen-Retinopathie beobachtet wird. Endothelzellen sind die zentralen Protagonisten der Angiogenese, murale Zellen (glatte Muskelzellen und Fibroblasten) haben ebenfalls Einfluss auf Gefäßwachstum und Homöostase.

Die Angiogenese der Lungengefäße unterliegt möglicherweise einer besonderen Regulation. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung pulmonaler Angiogenese *in vitro* an primären humanen pulmonalen Endothelzellen allein und im Verband mit pulmonalen glatten Muskelzellen.

Folgende Ziele wurden definiert:

1. Etablierung und Charakterisierung eines *in vitro* Sphäroidmodells der Angiogenese humaner pulmonaler mikrovaskulärer Endothelzellen allein und in Kokultur mit humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen, welches angiogenes Aussprossen in einer dreidimensionalen Gelmatrix ermöglicht.
2. Quantifizierung der Angiogenese des Sphäroidmodells unter Einsatz validierter angiogener Faktoren.
3. Vergleich der Angiogenese von Endothel-Monokultursphäroiden und Endothel-Glattmuskelzell Kokultursphäroiden.
4. Vergleich der Angiogenese systemischer mikrovaskulärer Endothelzellen und pulmonaler mikrovaskulärer Endothelzellen.

Das Sphäroidmodell wurde als zuverlässiger und gut reproduzierbarer *in vitro* Assay etabliert. Die Quantifizierung der angiogenen Endothelsprossen erfolgte mittels eines mikroskopischen Video-Imaging Systems und selbst erstellter Software semi-automatisiert.

Die kapillaren Sprossen im dreidimensionalen Gel wurden immunhistologisch als Endothelzellen bzw. Endothelzellen mit peripheren, stabilisierenden glatten Muskelzellen charakterisiert. Es zeigte sich hierbei eine gute Analogie zur *in vivo* Angiogenese.

Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen zeigten sowohl Spontanangiogenese als auch Wachstumsfaktor -induzierte Angiogenese (VEGF, bFGF, TGF- β).

Die zelluläre Interaktion von pulmonalen Endothelzellen und glatten Muskelzellen veränderte die *in vitro* Angiogenese. Die Wachstumsfaktor-induzierte Angiogenese der Kokultursphäroide aus Endothelzellen und Glattmuskelzellen war reduziert gegenüber der Endothel-Monokultursphäroide. Des Weiteren wurde ein signifikant stärkerer angiogener Effekt von TGF- β bei durch VEGF- bzw. bFGF- stimulierten Kokultursphäroiden als bei ebenso stimulierten Monokultursphäroiden beobachtet. Damit konnte die Interaktion von Endothelzellen und glatten Muskelzellen bei der Angiogenese einem bestimmten Wachstumsfaktor zugeordnet werden.

Ein Unterschied der *in vitro* Angiogenese systemischer und pulmonaler Endothelzellen zeigte sich nicht. Die Herauslösung der Endothelzellen aus dem gesamten Organverband könnte hierfür ursächlich sein, weiterführende Untersuchungen in dieser Richtung sind notwendig um Organ-abhängige Unterschiede der Angiogenese zu zeigen.

Zusammenfassend ist es gelungen, ein Sphäroidmodell zur Untersuchung pulmonaler Angiogenese *in vitro* zu etablieren, und eine Basischarakterisierung dieses Modells vorzunehmen.

9 Summary

An organism becomes dependent on the development of a vascular system when its size constricts sufficient supply of the cells with oxygen and metabolites by diffusion. Angiogenesis, i.e. the sprouting of new vessels from existing vasculature, is a central mechanism in organ development and repair. It was not only shown to be important for organogenesis, but it is prevailing in adult organisms for example in wound healing, immune defense and the female cycle but also in pathologic vessel growth, malignancies and the retinopathy of prematurity. Endothelial cells play a central role in angiogenesis but other vascular cells (smooth muscle cells and fibroblasts) also influence vessel growth and homeostasis. Potentially, angiogenesis of pulmonary vessels is differentially regulated compared to vessels of the systemic circulation.

The Aim of this study was the investigation of pulmonary angiogenesis *in vitro* using pulmonary endothelial cells alone and in association with smooth muscle cells.

The following aims were addressed:

- 1.) Establishment and characterization of an *in vitro* spheroid-model for angiogenesis of human pulmonary microvascular endothelial cells alone and in coculture with human pulmonary artery smooth muscle cells, which allows angiogenic sprouting in a three-dimensional gel matrix.
- 2.) Quantification of the angiogenic response in the spheroid model using validated angiogenic growth factors.
- 3.) Comparison of the angiogenesis of endothelial cell monoculture-spheroids and endothelial-smooth muscle cell coculture-spheroids.
- 4.) Comparison of the angiogenesis of systemic microvascular endothelial cells and pulmonary microvascular endothelial cells.

The spheroid model was established as a reliable and well reproducible *in vitro* assay. Quantification of angiogenic endothelial sprouting was performed in a semi-automatic manner using a microscopic imaging system and customized software.

Capillary sprouts in the three-dimensional gel matrix were immunohistologically characterized and consisted of endothelial cells or endothelial cells with peripherally located, stabilizing smooth muscle cells, showing good similarity to *in vivo* angiogenesis.

Human pulmonary microvascular endothelial cells underwent spontaneous angiogenesis as well as growth factor-induced angiogenesis (VEGF, bFGF, TGF- β) in this model. The cellular interactions of pulmonary endothelial cells and smooth muscle cells influenced the *in vitro* angiogenesis: growth factor-induced angiogenesis of coculture-spheroids composed of endothelial

cells and smooth muscle cells was reduced in comparison to pure endothelial cell spheroids. Furthermore, a significantly stronger angiogenic effect of TGF- β on VEGF- and bFGF-stimulated coculture-spheroids than on analogically stimulated monoculture-spheroids was observed. This finding suggested intercellular interactions between endothelial cells and smooth muscle cells that regulate angiogenesis in response to TGF- β . A significant difference of angiogenesis between systemic and pulmonary endothelial cells could not be detected. Extraction of the endothelial cells out of their original environment may be causative for this. To address organ-dependent differences in angiogenesis, further studies will be necessary.

Summarizing, this study documents the successful establishment and fundamental characterization of a spheroid model to investigate pulmonary angiogenesis *in vitro*.

10 Literaturverzeichnis

1. Carmeliet,P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **9**, 653-660 (2003).
2. Reyes,M. *et al.* Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J. Clin. Invest* **109**, 337-346 (2002).
3. Mikkola,H.K. & Orkin,S.H. The search for the hemangioblast. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **11**, 9-17 (2002).
4. Wang,H.U., Chen,Z.F. & Anderson,D.J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93**, 741-753 (1998).
5. Gerety,S.S., Wang,H.U., Chen,Z.F. & Anderson,D.J. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol. Cell* **4**, 403-414 (1999).
6. Zhang,X.Q. *et al.* Stromal cells expressing ephrin-B2 promote the growth and sprouting of ephrin-B2(+) endothelial cells. *Blood* **98**, 1028-1037 (2001).
7. Gale,N.W. *et al.* Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev. Biol.* **230**, 151-160 (2001).
8. Shin,D. *et al.* Expression of ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev. Biol.* **230**, 139-150 (2001).
9. Carmeliet,P. Developmental biology. One cell, two fates. *Nature* **408**, 43, 45 (2000).
10. Cleaver,O. & Melton,D.A. Endothelial signaling during development. *Nat. Med.* **9**, 661-668 (2003).
11. Thorin,E. & Shreeve,S.M. Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol. Ther.* **78**, 155-166 (1998).
12. Gerritsen,M.E. Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2701-2711 (1987).
13. Auerbach,R. Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anti-cancer strategies. *Int. J. Radiat. Biol.* **60**, 1-10 (1991).
14. Pasqualini,R. & Ruoslahti,E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* **380**, 364-366 (1996).
15. Rajotte,D. *et al.* Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J. Clin. Invest* **102**, 430-437 (1998).

16. Kmiec,Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **161**, III-151 (2001).
17. Abbott,N.J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* **200**, 629-638 (2002).
18. Steward,P.A. & Whiley,M.J. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* **84**, 183-192 (1981).
19. Aird,W.C. *et al.* Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J. Cell Biol.* **138**, 1117-1124 (1997).
20. LeCouter,J. *et al.* Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* **412**, 877-884 (2001).
21. Vapaatalo,H. & Mervaala,E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med. Sci. Monit.* **7**, 1075-1085 (2001).
22. Gerber,H.P. *et al.* VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* **126**, 1149-1159 (1999).
23. Zeng,X., Wert,S.E., Federici,R., Peters,K.G. & Whitsett,J.A. VEGF enhances pulmonary vasculogenesis and disrupts lung morphogenesis in vivo. *Dev. Dyn.* **211**, 215-227 (1998).
24. Kitamoto,Y., Tokunaga,H. & Tomita,K. Vascular endothelial growth factor is an essential molecule for mouse kidney development: glomerulogenesis and nephrogenesis. *J. Clin. Invest* **99**, 2351-2357 (1997).
25. Thurston,G. *et al.* Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med.* **6**, 460-463 (2000).
26. Suri,C. *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-1180 (1996).
27. Sato,T.N. *et al.* Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-74 (1995).
28. Davis,S. *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-1169 (1996).
29. Teichert-Kuliszewska,K. *et al.* Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc. Res.* **49**, 659-670 (2001).
30. Iurlaro,M. *et al.* Rat aorta-derived mural precursor cells express the Tie2 receptor and respond directly to stimulation by angiopoietins. *J. Cell Sci.* **116**, 3635-3643 (2003).
31. Mukouyama,Y.S., Shin,D., Britsch,S., Taniguchi,M. & Anderson,D.J. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* **109**, 693-705 (2002).
32. Hangai,M. *et al.* Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **161**, 1429-1437 (2002).

33. Jain,R.K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* **9**, 685-693 (2003).
34. Hellstrom,M. *et al.* Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* **153**, 543-553 (2001).
35. Armulik,A., Abramsson,A. & Betsholtz,C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* **97**, 512-523 (2005).
36. Darland,D.C. *et al.* Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* **264**, 275-288 (2003).
37. Pugh,C.W. & Ratcliffe,P.J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**, 677-684 (2003).
38. Krogh,A. The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J. Physiol. (London)* 409-415 (1919).
39. Hudlicka,O., Dodd,L., Renkin,E.M. & Gray,S.D. Early changes in fiber profile and capillary density in long-term stimulated muscles. *Am. J. Physiol* **243**, H528-H535 (1982).
40. Jozsa,L., Balint,J., Reffy,A., Jarvinen,M. & Kvist,M. Capillary density of tenotomized skeletal muscles. II. Observations on human muscles after spontaneous rupture of tendon. *Eur. J. Appl. Physiol Occup. Physiol* **44**, 183-188 (1980).
41. Ashton,N.W.B. & Serpell,G. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br. J. Ophthalmol.* 397-432 (1954).
42. Ashton,N. Pathophysiology of retinal cotton-wool spots. *Br. Med. Bull.* **26**, 143-150 (1970).
43. Recchia,F.M. & Capone,A., Jr. Contemporary understanding and management of retinopathy of prematurity. *Retina* **24**, 283-292 (2004).
44. Hutcheson,K.A. Retinopathy of prematurity. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **14**, 286-290 (2003).
45. THOMLINSON,R.H. & GRAY,L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer* **9**, 539-549 (1955).
46. Folkman,J., Merler,E., Abernathy,C. & Williams,G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* **133**, 275-288 (1971).
47. Knighton,D.R., Silver,I.A. & Hunt,T.K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* **90**, 262-270 (1981).
48. Knighton,D.R. *et al.* Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* **221**, 1283-1285 (1983).
49. Adair,T.H., Gay,W.J. & Montani,J.P. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *Am. J. Physiol* **259**, R393-R404 (1990).
50. Jelkmann,W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* **72**, 449-489 (1992).

51. Necas,E. & Thorling,E.B. Unresponsiveness of erythropoietin-producing cells to cyanide. *Am. J. Physiol* **222**, 1187-1190 (1972).
52. GOLDWASSER,E., JACOBSON,L.O., FRIED,W. & PLZAK,L.F. Studies on erythropoiesis. V. The effect of cobalt on the production of erythropoietin. *Blood* **13**, 55-60 (1958).
53. Goldberg,M.A. & Schneider,T.J. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **269**, 4355-4359 (1994).
54. Gleadle,J.M., Ebert,B.L., Firth,J.D. & Ratcliffe,P.J. Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am. J. Physiol* **268**, C1362-C1368 (1995).
55. Liu,Y., Cox,S.R., Morita,T. & Kourembanas,S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ. Res.* **77**, 638-643 (1995).
56. Forsythe,J.A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell Biol.* **16**, 4604-4613 (1996).
57. Wang,G.L., Jiang,B.H., Rue,E.A. & Semenza,G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 5510-5514 (1995).
58. Semenza,G.L. & Wang,G.L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* **12**, 5447-5454 (1992).
59. Semenza,G.L. HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* **14**, 1983-1991 (2000).
60. Wenger,R.H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* **16**, 1151-1162 (2002).
61. Tian,H., McKnight,S.L. & Russell,D.W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **11**, 72-82 (1997).
62. Wiesener,M.S. *et al.* Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* **92**, 2260-2268 (1998).
63. Makino,Y. *et al.* Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* **414**, 550-554 (2001).
64. Lando,D., Peet,D.J., Whelan,D.A., Gorman,J.J. & Whitelaw,M.L. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* **295**, 858-861 (2002).
65. Lando,D. *et al.* FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* **16**, 1466-1471 (2002).

66. Masson,N., Willam,C., Maxwell,P.H., Pugh,C.W. & Ratcliffe,P.J. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* **20**, 5197-5206 (2001).
67. Hewitson,K.S. *et al.* Hypoxia-inducible factor (HIF) asparagine hydroxylase is identical to factor inhibiting HIF (FIH) and is related to the cupin structural family. *J. Biol. Chem.* **277**, 26351-26355 (2002).
68. Bruick,R.K. & McKnight,S.L. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* **294**, 1337-1340 (2001).
69. Epstein,A.C. *et al.* C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* **107**, 43-54 (2001).
70. Yu,F., White,S.B., Zhao,Q. & Lee,F.S. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 9630-9635 (2001).
71. Jaakkola,P. *et al.* Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472 (2001).
72. Ivan,M. *et al.* HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464-468 (2001).
73. Mahon,P.C., Hirota,K. & Semenza,G.L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev.* **15**, 2675-2686 (2001).
74. Levy,N.S., Chung,S., Furneaux,H. & Levy,A.P. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* **273**, 6417-6423 (1998).
75. Gerber,H.P., Condorelli,F., Park,J. & Ferrara,N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 23659-23667 (1997).
76. Waltenberger,J., Mayr,U., Pentz,S. & Hombach,V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* **94**, 1647-1654 (1996).
77. Ferrara,N. & Davis-Smyth,T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4-25 (1997).
78. Dvorak,H.F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 233-235 (1995).
79. Karkkainen,M.J., Makinen,T. & Alitalo,K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell Biol.* **4**, E2-E5 (2002).
80. Szuba,A. *et al.* Therapeutic lymphangiogenesis with human recombinant VEGF-C. *FASEB J.* **16**, 1985-1987 (2002).

81. Gerber,H.P., Dixit,V. & Ferrara,N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 13313-13316 (1998).
82. Gerber,H.P. *et al.* Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 30336-30343 (1998).
83. Benjamin,L.E., Golijanin,D., Itin,A., Pode,D. & Keshet,E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest* **103**, 159-165 (1999).
84. Yuan,F. *et al.* Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 14765-14770 (1996).
85. Compernelle,V. *et al.* Loss of HIF-2alpha and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat. Med.* **8**, 702-710 (2002).
86. Clauss,M. *et al.* Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* **172**, 1535-1545 (1990).
87. Broxmeyer,H.E. *et al.* Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int. J. Hematol.* **62**, 203-215 (1995).
88. Senger,D.R. *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-985 (1983).
89. Dvorak,H.F., Brown,L.F., Detmar,M. & Dvorak,A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **146**, 1029-1039 (1995).
90. Houck,K.A. *et al.* The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1806-1814 (1991).
91. Tischer,E. *et al.* The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* **266**, 11947-11954 (1991).
92. Neufeld,G., Cohen,T., Gengrinovitch,S. & Poltorak,Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* **13**, 9-22 (1999).
93. Ferrara,N. & Henzel,W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 851-858 (1989).
94. Houck,K.A., Leung,D.W., Rowland,A.M., Winer,J. & Ferrara,N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* **267**, 26031-26037 (1992).

95. Gitay-Goren,H. *et al.* Selective binding of VEGF121 to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 5519-5523 (1996).
96. Dor,Y., Porat,R. & Keshet,E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **280**, C1367-C1374 (2001).
97. Semenza,G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 993-998 (2002).
98. Grugel,S., Finkenzeller,G., Weindel,K., Barleon,B. & Marme,D. Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 25915-25919 (1995).
99. Okada,F. *et al.* Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 3609-3614 (1998).
100. Ferrara,N., Gerber,H.P. & LeCouter,J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669-676 (2003).
101. Shibuya,M. *et al.* Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* **5**, 519-524 (1990).
102. Terman,B.I. *et al.* Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **6**, 1677-1683 (1991).
103. de Vries,C. *et al.* The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**, 989-991 (1992).
104. Park,J.E., Chen,H.H., Winer,J., Houck,K.A. & Ferrara,N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* **269**, 25646-25654 (1994).
105. Olofsson,B. *et al.* Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 11709-11714 (1998).
106. Davis-Smyth,T., Chen,H., Park,J., Presta,L.G. & Ferrara,N. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J.* **15**, 4919-4927 (1996).
107. Waltenberger,J., Claesson-Welsh,L., Siegbahn,A., Shibuya,M. & Heldin,C.H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **269**, 26988-26995 (1994).
108. Kendall,R.L. & Thomas,K.A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10705-10709 (1993).

109. Fong,G.H., Zhang,L., Bryce,D.M. & Peng,J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* **126**, 3015-3025 (1999).
110. Fong,G.H., Rossant,J., Gertsenstein,M. & Breitman,M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70 (1995).
111. Hiratsuka,S., Minowa,O., Kuno,J., Noda,T. & Shibuya,M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 9349-9354 (1998).
112. Barleon,B. *et al.* Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* **87**, 3336-3343 (1996).
113. Shalabi F. *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* **376**, 62-66 (1995).
114. Matsumoto,T. & Claesson-Welsh,L. VEGF receptor signal transduction. *Sci. STKE*. **2001**, RE21 (2001).
115. Guo,D., Jia,Q., Song,H.Y., Warren,R.S. & Donner,D.B. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **270**, 6729-6733 (1995).
116. Eliceiri,B.P. *et al.* Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Cell* **4**, 915-924 (1999).
117. Takahashi,T., Ueno,H. & Shibuya,M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* **18**, 2221-2230 (1999).
118. Soker,S., Fidler,H., Neufeld,G. & Klagsbrun,M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 5761-5767 (1996).
119. Soker,S., Takashima,S., Miao,H.Q., Neufeld,G. & Klagsbrun,M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* **92**, 735-745 (1998).
120. Kawasaki,T. *et al.* A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* **126**, 4895-4902 (1999).
121. Carmeliet,P. *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439 (1996).
122. Ferrara,N. *et al.* Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442 (1996).
123. Carmeliet,P. *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* **7**, 575-583 (2001).

124. Bellomo,D. *et al.* Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ. Res.* **86**, E29-E35 (2000).
125. Gerber,H.P. *et al.* VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* **126**, 1149-1159 (1999).
126. Voelkel,N.F. *et al.* Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. *Crit Care Med.* **30**, S251-S256 (2002).
127. Ryan,A.M. *et al.* Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol. Pathol.* **27**, 78-86 (1999).
128. Gerber,H.P. *et al.* VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* **5**, 623-628 (1999).
129. Dvorak,H.F., Brown,L.F., Detmar,M. & Dvorak,A.M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **146**, 1029-1039 (1995).
130. Kim,K.J. *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841-844 (1993).
131. Garner,A. Pathobiology of Ocular Disease 2nd edn. Garner,A. & Klintworth,G.K. (eds.), pp. 1625-1710 (Marcel Dekker, New York,1994).
132. Aiello,L.P. *et al.* Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1480-1487 (1994).
133. Aiello,L.P. *et al.* Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 10457-10461 (1995).
134. Aiello,L.P., Northrup,J.M., Keyt,B.A., Takagi,H. & Iwamoto,M.A. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch. Ophthalmol.* **113**, 1538-1544 (1995).
135. Detmar,M. *et al.* Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest Dermatol.* **105**, 44-50 (1995).
136. Detmar,M. *et al.* Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J. Invest Dermatol.* **111**, 1-6 (1998).
137. Kovacs,Z., Ikezaki,K., Samoto,K., Inamura,T. & Fukui,M. VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke* **27**, 1865-1872 (1996).
138. van Bruggen,N. *et al.* VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J. Clin. Invest* **104**, 1613-1620 (1999).
139. Cross,M.J. & Claesson-Welsh,L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 201-207 (2001).

140. Eliceiri,B.P., Klemke,R., Stromblad,S. & Cheresch,D.A. Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J. Cell Biol.* **140**, 1255-1263 (1998).
141. Shing,Y. *et al.* Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* **223**, 1296-1299 (1984).
142. Dow,J.K. & deVere White,R.W. Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* **55**, 800-806 (2000).
143. Florkiewicz,R.Z., Majack,R.A., Buechler,R.D. & Florkiewicz,E. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell Physiol* **162**, 388-399 (1995).
144. Vlodavsky,I., Bar-Shavit,R., Ishai-Michaeli,R., Bashkin,P. & Fuks,Z. Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? *Trends Biochem. Sci.* **16**, 268-271 (1991).
145. Ornitz,D.M. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* **22**, 108-112 (2000).
146. Jaye,M., Schlessinger,J. & Dionne,C.A. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1135**, 185-199 (1992).
147. Johnson,D.E. & Williams,L.T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* **60**, 1-41 (1993).
148. Szebenyi,G. & Fallon,J.F. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int. Rev. Cytol.* **185**, 45-106 (1999).
149. Deng,C.X. *et al.* Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev.* **8**, 3045-3057 (1994).
150. Lee,S.H., Schloss,D.J. & Swain,J.L. Maintenance of vascular integrity in the embryo requires signaling through the fibroblast growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 33679-33687 (2000).
151. Dono,R., Texido,G., Dussel,R., Ehmke,H. & Zeller,R. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J.* **17**, 4213-4225 (1998).
152. Colvin,J.S., Bohne,B.A., Harding,G.W., McEwen,D.G. & Ornitz,D.M. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* **12**, 390-397 (1996).
153. Plotnikov,A.N., Schlessinger,J., Hubbard,S.R. & Mohammadi,M. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* **98**, 641-650 (1999).
154. Klint,P. & Claesson-Welsh,L. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci.* **4**, D165-D177 (1999).
155. Humbert,M. & Trembath,R.C. Genetics of pulmonary hypertension: from bench to bedside. *Eur. Respir. J.* **20**, 741-749 (2002).

156. Du,L. *et al.* Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* **348**, 500-509 (2003).
157. van den Driesche,S., Mummery,C.L. & Westermann,C.J. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor beta signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* **58**, 20-31 (2003).
158. Takagi,H. *et al.* Potential role of the angiopoietin/tie2 system in ischemia-induced retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 393-402 (2003).
159. Hattori K.*et al.* Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. (193), 1005-1014. 2001. *J.Exp. Med.*
- Ref Type: Generic
160. Jain,R.K. Leaky vessels? Call Ang1. Munn, LL. (282), 468-471. *Science.*
- Ref Type: Generic
161. Shim,W.S. *et al.* Angiopoietin 1 promotes tumor angiogenesis and tumor vessel plasticity of human cervical cancer in mice. *Exp. Cell Res.* **279**, 299-309 (2002).
162. Ahmad,S.A. *et al.* The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res.* **61**, 1255-1259 (2001).
163. Gale,N.W. *et al.* Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev. Cell* **3**, 411-423 (2002).
164. Visconti,R.P., Richardson,C.D. & Sato,T.N. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 8219-8224 (2002).
165. Maisonpierre,P.C. *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60 (1997).
166. Hackett,S.F., Wiegand,S., Yancopoulos,G. & Campochiaro,P.A. Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *J. Cell Physiol* **192**, 182-187 (2002).
167. Holash,J. *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**, 1994-1998 (1999).
168. Munoz-Chapuli,R., Quesada,A.R. & Angel,M.M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2224-2243 (2004).
169. Carmeliet,P. & Jain,R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249-257 (2000).
170. Neri,D. & Bicknell,R. Tumour vascular targeting. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 436-446 (2005).
171. Hislop,A. Developmental biology of the pulmonary circulation. *Paediatr. Respir. Rev.* **6**, 35-43 (2005).
172. Herbst,R.S., Onn,A. & Sandler,A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J. Clin. Oncol.* **23**, 3243-3256 (2005).

173. Bai,T.R. & Knight,D.A. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin. Sci. (Lond)* **108**, 463-477 (2005).
174. Douglas,I.S. & Nicolls,M.R. Chemokine-mediated angiogenesis: an essential link in the evolution of airway fibrosis? *J. Clin. Invest* **115**, 1133-1136 (2005).
175. Osaki,T. *et al.* Bronchial arterial infusion is an effective therapeutic modality for centrally located early-stage lung cancer: results of a pilot study. *Chest* **115**, 1424-1428 (1999).
176. Strieter,R.M. Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: the whole story or the last chapter of a long novel. *Chest* **128**, 526S-532S (2005).
177. Kasahara,Y. *et al.* Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **163**, 737-744 (2001).
178. Voelkel,N.F. & Tuder,R.M. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **8**, 2129-2138 (1995).
179. Tuder,R.M., Petrache,I., Elias,J.A., Voelkel,N.F. & Henson,P.M. Apoptosis and emphysema: the missing link. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 551-554 (2003).
180. Manconi,F., Markham,R. & Fraser,I.S. Culturing endothelial cells of microvascular origin. *Methods Cell Sci.* **22**, 89-99 (2000).
181. Scott,P.A. & Bicknell,R. The isolation and culture of microvascular endothelium. *J. Cell Sci.* **105** (Pt 2), 269-273 (1993).
182. Peek,M.J., Fraser,I.S., Johannisson,E. & Markham,R. A new reliable method of culturing and measuring human decidual capillary endothelial cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* **46**, 149-154 (1994).
183. Staton,C.A. *et al.* Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int. J. Exp. Pathol.* **85**, 233-248 (2004).
184. Gerhardt,H. & Betsholtz,C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **314**, 15-23 (2003).
185. Korff,T. & Augustin,H.G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J. Cell Biol.* **143**, 1341-1352 (1998).
186. Korff,T. & Augustin,H.G. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 19), 3249-3258 (1999).
187. Korff,T., Kimmina,S., Martiny-Baron,G. & Augustin,H.G. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J.* **15**, 447-457 (2001).
188. Garlanda,C. & Dejana,E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1193-1202 (1997).
189. Risau,W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674 (1997).
190. Risau,W. & Flamme,I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 73-91 (1995).

191. Ferrara,N., Houck,K., Jakeman,L. & Leung,D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* **13**, 18-32 (1992).
192. Park,J.E., Keller,G.A. & Ferrara,N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell* **4**, 1317-1326 (1993).
193. Namiki,A. *et al.* Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 31189-31195 (1995).
194. Antonelli-Orlidge,A., Saunders,K.B., Smith,S.R. & D'Amore,P.A. An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 4544-4548 (1989).
195. Sato,Y. & Rifkin,D.B. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J. Cell Biol.* **109**, 309-315 (1989).
196. Felmeden,D.C., Blann,A.D. & Lip,G.Y. Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur. Heart J.* **24**, 586-603 (2003).
197. Sun,X.T. *et al.* Angiogenic synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in an in vitro quantitative microcarrier-based three-dimensional fibrin angiogenesis system. *World J. Gastroenterol.* **10**, 2524-2528 (2004).
198. Stavri,G.T., Zachary,I.C., Baskerville,P.A., Martin,J.F. & Erusalimsky,J.D. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* **92**, 11-14 (1995).
199. Miyazono,K., Suzuki,H. & Imamura,T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci.* **94**, 230-234 (2003).
200. Gupta,K., Gupta,P., Wild,R., Ramakrishnan,S. & Hebbel,R.P. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis.* **3**, 147-158 (1999).
201. Nakagawa,T. *et al.* TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney Int.* **66**, 605-613 (2004).
202. Wu,W.C., Kao,Y.H. & Chung,C.H. Effects of growth-factor combinations on vascular endothelial cell growth in vitro. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **20**, 554-562 (2004).
203. Shih,S.C. *et al.* Transforming growth factor beta1 induction of vascular endothelial growth factor receptor 1: mechanism of pericyte-induced vascular survival in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 15859-15864 (2003).
204. Brogi,E., Wu,T., Namiki,A. & Isner,J.M. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* **90**, 649-652 (1994).
205. Schultz-Cherry,S. *et al.* Regulation of transforming growth factor-beta activation by discrete sequences of thrombospondin 1. *J. Biol. Chem.* **270**, 7304-7310 (1995).

206. Bertolino,P., Deckers,M., Lebrin,F. & ten Dijke,P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* **128**, 585S-590S (2005).
207. Goumans,M.J., Lebrin,F. & Valdimarsdottir,G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc. Med.* **13**, 301-307 (2003).
208. Goumans,M.J. *et al.* Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol. Cell* **12**, 817-828 (2003).

Ich danke Herrn Prof. Dr. Werner Seeger für die Möglichkeit, in seinem Labor diese
Dissertationsarbeit durchführen zu dürfen, sowie für die Bereitstellung sämtlicher für die
Dissertation notwendiger Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. med Robert Voswinckel für die ganz ausgezeichnete
Betreuung meiner Doktorarbeit, sowohl in wissenschaftlicher als auch in menschlicher Hinsicht
und die stete Bereitschaft zu Unterstützung und Hilfestellung bei hervorragender Anleitung zu
selbständiger Arbeit.

Außerdem danke ich meinem Bruder Jörg Max Albrecht für die Programmierung und Anpassung
der für diese Arbeit so wertvollen Auswertungssoftware.

Herzlichen Dank meinen Eltern Hildegard und Uwe Albrecht für den dauernden Antrieb und
dafür, dass dies alles möglich wurde.

Nicht zuletzt danke ich meiner Ehefrau Anke für die permanente Unterstützung und Motivation.
Ihr widme ich diese Arbeit.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5087-8



9 783835 950870