

**EVALUATION AUSGEWÄHLTER ANGIOGENESE-INHIBITOREN  
IN EINEM IN VITRO MODELL DER ANGIOGENESE**

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

vorgelegt von Klaus Dieter Wiechmann  
aus Lübeck

Gießen 2004

Aus dem Institut für Biochemie  
(Leiter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner)

des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Preissner

Gutachter: Prof. Dr. Middendorff

Tag der Disputation: 22.11.2005

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Angiogenese	7
1.2. Angiogenese-Mechanismen	8
1.3. Angiogenese-Regulation	9
1.4. Angiogene Faktoren	11
1.4.1. Vascular Endothelial Growth Factor	12
1.4.2. Angiopoetine und Ephrine	12
1.4.3. basic Fibroblast Growth Factor	12
1.4.4. Endothelial Cell Growth Factor	13
1.4.5. Transforming Growth Factor-beta	13
1.4.6. Tumor Nekrose Faktor-alpha	14
1.5. Potenzial angiogener Faktoren	15
1.6. Angiogenese-Inhibition	15
1.7. Mechanismen der Angiogenese-Inhibition	15
1.8. Angiogenese-Inhibitoren	16
1.8.1. Angiostatin	17
1.8.1.1. Angiostatin-Struktur	17
1.8.1.2. Angiostatin-Produktion	18
1.8.1.3. Angiostatin-Wirkung	18
1.8.2. Endostatin	20
1.8.2.1. Endostatin-Struktur	20
1.8.2.2. Endostatin-Entstehung und -Wirkung	20
1.8.3. Transforming Growth Factor-beta als Angiogenese-Inhibitor	21
1.8.4. Integrin-Antagonisten	21
1.9. Potenzial von Angiogenese-Inhibitoren	22
1.10. Angiogenese-Bio-Assays	23
1.11. In vivo Angiogenese-Assays	24
1.12. In vitro Angiogenese-Assays	24
1.12.1. ‚Sprouting‘ Assays	25
1.12.2. Mikrosphären-gestützte ‚Sprouting‘ Assays	26

	Seite
1.13. Vor- und Nachteile von Angiogenese-Bio-Assays	27
1.14. Fragestellung	28
<b>2. Methoden</b>	
2.1. Durchführung des ‚Sprouting‘-Assays mit BREC	30
2.1.1. Kultur und Charakterisierung boviner retinaler Endothelzellen (BREC)	30
2.1.2. Reinigung des Fibrinogens und Vorbereitung der Mikrosphären	31
2.1.3. Kultur der BREC auf den Mikrosphären	32
2.1.4. Inkorporation zelltragender Mikrosphären in die Fibrinmatrix	32
2.1.5. Zellstimulation	33
2.1.6. Auswertung und Statistik	33
2.2. Optimierung des Versuchsaufbaus	34
2.2.1. Einfluss der Serum-Konzentration	34
2.2.2. Applikation der Testsubstanzen: Medium und Matrix?	35
2.2.3. Einfluss von Fibrinogen, Aprotinin, Thrombin	35
2.2.4. Einfluss von pH und Zink	36
2.2.5. Funktionstests mit ECGF/H im ‚Sprouting‘ Assay	37
2.2.6. Einfluss der Matrixzusätze und von ECGF auf BREC-Proliferation	37
2.3. Herstellung und Vergleich von Angiostatin-Formen	37
2.3.1. Tests zur Angiostatin-Produktion durch uPA/SHD	37
2.3.2. Produktion des uPA/SHD-Angiostatins	39
2.3.3. Vergleich von Angiostatin-Varianten	39
2.4. Potentielle Angiogenese-Inhibitoren im ‚Sprouting‘-Assay	40
2.4.1. cRGD und TGF- $\beta$ 1 im ‚Sprouting‘-Assay	40
2.4.2. Funktionstests mit Angiostatin und Endostatin im ‚Sprouting‘-Assay	41
2.4.3. Einsatz der Angiogenese-Inhibitoren bei BREC-Proliferation	42
2.4.4. Einsatz der Angiostatine und Endostatine bei HUVEC-Proliferation	42
<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1. Durchführung des Mikrosphären-‚Sprouting‘ Assays mit BREC	44
3.1.1. Mikroskopische Charakteristika der BREC	44
3.1.2. Angioregulatoren-Wirkung auf BREC-Proliferation	45

	Seite
3.1.3. Immunzytochemische Charakterisierung der BREC	46
3.1.4. Angiogenese-Induktion	48
3.1.5. Identifikation der angiogenen Faktoren	53
3.2. Optimierung des Versuchsaufbaus	55
3.2.1. Angiogener Einfluss der Serumkonzentration	55
3.2.2. Applikation der Testsubstanzen	56
3.2.3. Einfluss von Fibrinogen, Aprotinin, Thrombin auf Angiogenese	57
3.2.4. Einfluss von pH und Zink	59
3.2.5. ECGF/H als angiogener Faktor	63
3.2.6. Einfluss von Fibrinogen, Thrombin, Aprotinin und von ECGF/H auf BREC-Proliferation	65
3.3. Produktion und Vergleich verschiedener Angiostatin-Varianten	66
3.3.1. Validierung der Angiostatin-Produktion durch uPA/SHD	66
3.3.2. Herstellung von uPA/SHD-Angiostatin	70
3.3.3. Vergleich verschiedener Angiostatin-Varianten	71
3.4. Angiogenese-Inhibitoren im ‚Sprouting‘-Assay	74
3.4.1. Zyklisches RGD-Peptid und TGF- $\beta$ 1	74
3.4.2. Einfluss von Angiostatin und Endostatin auf ‚Sprout‘-Bildung	76
3.4.3. Einfluss von Angiostatin und Endostatin auf Proliferation von BREC	80
3.4.4. Wirkung der Angiostatine und Endostatine auf HUVEC-Proliferation	82
 <b>4. Diskussion</b>	
4.1. Charakterisierung der BREC	84
4.2. Etablierung des ‚Sprouting‘ Assay mit BREC	85
4.3. Vorteile des BREC-, ‚Sprouting‘ Assay	88
4.4. Der BREC-, ‚Sprouting‘ Assay als Modell retinaler Angiogenese	90
4.5. Einfluss von Fibrinogen im BREC-, ‚Sprouting‘ Assay	93
4.6. Thrombin-Effekte im BREC-, ‚Sprouting‘ Assay	95
4.7. Aprotinin und Applikation der Substanzen im BREC-, ‚Sprouting‘ Assay	96
4.8. Der pH-Wert als Faktor im Angiogenese-Kontext	98
4.9. ECGF/H ist stärkster angiogener Faktor im BREC-, ‚Sprouting Assay	103
4.10. Angiostatin-Herstellung durch uPA und SHD	104

	Seite
4.11. Vergleich der Angiostatin-Formen	108
4.12. Der Integrin-Antagonist cRGD als potenter Angiogenese-Inhibitor	111
4.13. TGF- $\beta$ 1 als Prototyp Kontext-abhängiger Angiogenese-Effekte	113
4.14. Endostatin und Angiostatin sind ohne Effekt	115
<b>5.1. Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
<b>5.2. Summary</b>	<b>121</b>
<b>6. Anhang</b>	
6.1. Abkürzungsverzeichnis	124
6.2. Material	127
6.3. Referenzen	131
6.4. Erklärung	165
6.5. Lebenslauf	166
6.6. Danksagung	167

# 1. Einleitung

## 1.1. Angiogenese

Bei der Bildung von Blutgefäßen und dem „Remodeling“ von Gefäßen werden Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese voneinander unterschieden (Risau, 1997). Unter Vaskulogenese versteht man die de novo-Entstehung von Blutgefäßen in zuvor nicht vaskularisiertem Gewebe aus sich neu differenzierenden Endothelzellen (EZ) in der Embryonalzeit. Die Stammzellen werden dabei als Hämangioblasten bezeichnet, da ihre Differenzierung sowohl in Endothelzellen wie auch in zirkulierende Zellen des Blutes möglich ist. Unter Angiogenese ist die Entwicklung von vaskulären Strukturen aus bereits bestehenden Gefäßen zu verstehen. Aussprossung von Kapillaren aus einem „Muttergefäß“ und intravasale, lumenseparierende Endothelzellproliferation sind zwei beschriebene Mechanismen (Risau, 1997). Als Arteriogenese wird die Bildung von Kollateralgefäßen aus vorbestehenden arteriolen Anastomosen bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit soll der Mechanismus der Angiogenese betrachtet werden.

Angiogenese findet physiologisch dann statt, wenn eine vaskuläre Infrastruktur zur Erschließung neu entstehenden oder sich reorganisierenden Gewebes notwendig ist. Dies ist z.B. in der Wachstumsperiode, bei der Wundheilung, beim zyklischen Aufbau des Endometriums und bei der Plazentaentstehung der Fall. Adulte Endothelzellen sind prinzipiell teilungsfähig, die Mitoserate im gesunden postnatalen Organismus ist jedoch mit 0,01 % sehr gering (Keshet & Ben-Sasson, 1999). Psoriasis, rheumatoide Arthritis, proliferative Retinopathien, Hämangiome sind Beispiele für Erkrankungen, die durch unkontrollierte und unerwünschte Angiogenese unterhalten werden (Folkman, 1995). Zu erheblichen Forschungsanstrengungen hat die Beobachtung geführt, dass maligne Tumoren nur dann zu klinisch relevanter Größe heranwachsen, wenn sie ein Gefäßsystem zur Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie zum Abtransport der Stoffwechselprodukte ausbilden (Folkman, 1971).

## 1.2. Angiogenese-Mechanismen

Bei der Angiogenese können folgende Schritte beobachtet werden (siehe auch Abb. 1): Aktivierte Endothelzellen lösen ihre Zell-Zell-Kontakte und bilden nach Proteolyse der vaskulären Basalmembran und der Extrazellulärmatrix (EZM) zytoplasmatische Knospen aus. Zellmigration und Zellproliferation sorgen für das Wachstum des „Gefäßsprosses“ („Sprouts“), bis sich ein Gefäßlumen bildet. Zwischen den migrierenden EZ und der EZM und den EZ untereinander vermitteln membranständige Moleküle (z.B. sog. Integrine) zunächst passagere Adhäsionen, die zum Abschluss der Gefäßentstehung ausreifen und permanent werden. Die Gefäßausreifung wird durch das Erscheinen von Perizyten, glatten Muskelzellen und Synthese einer Basalmembran charakterisiert. Die Teilschritte der angiogenen Kaskade (erhöhte Vasopermeabilität, Proteolyse, Migration, Proliferation, Adhäsionsmechanismen und Syntheseleistungen der EZ) müssen dabei harmonisch ineinander übergehen und bedürfen der Regulation.

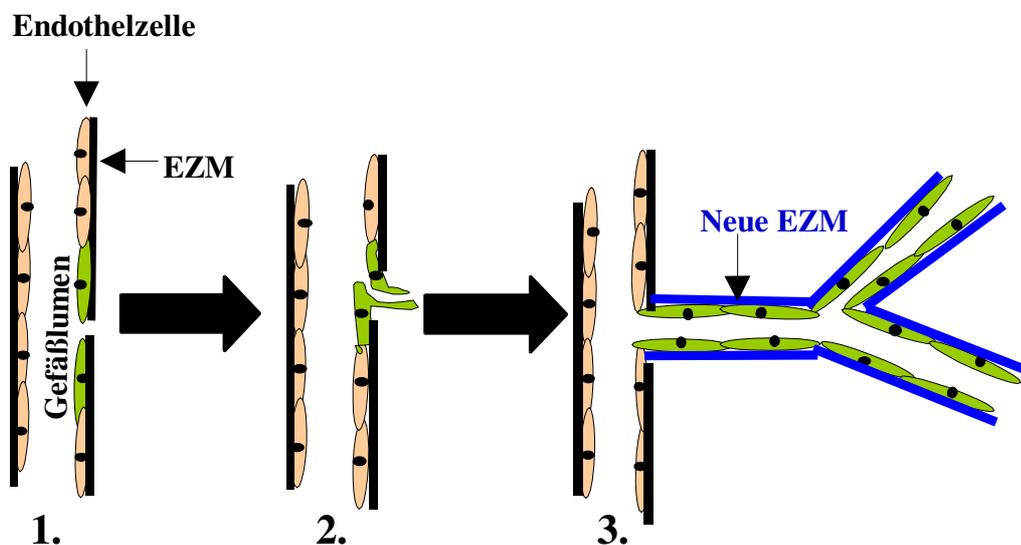


Abb. 1 : Stadien der Angiogenese: 1) **Angiogen aktive Endothelzellen (grün dargestellt)** lösen zunächst ihre Zell-Zell-Kontakte und initiieren eine Proteolyse der umgebenden Extrazellulärmatrix (EZM). 2) Durch Veränderung der Zytoarchitektur kommt es zur Ausbildung zytoplasmatischer Knospen, die in die proteolytisch veränderte EZM vordringen. 3) Den Zellausläufern folgend entstehen durch Zellmigration und -proliferation, durch Bildung neuer Zell-Zell-Kontakte und durch Zell-EZM-Interaktion neue Gefäße. Mit der Synthese einer **spezifischen, gefäßsprosstabilisierenden EZM (blau dargestellt)** wird der Prozess der Angiogenese abgeschlossen.

### 1.3. Angiogenese-Regulation

Angiogenese kann durch angiogene Faktoren (aF) initiiert bzw. Angiogenese-Inhibitoren (AI) unterbrochen werden. Gemeinsames Merkmal vieler aF ist deren Wirkungsvermittlung über Tyrosinkinase-Rezeptoren. Auch für die Mehrzahl der bisher entdeckten endogenen AI scheint ein verbindendes Prinzip zugrunde zu liegen, da sie häufig Spaltprodukte von Proteinen der Extrazellulärmatrix bzw. von Gerinnungsfaktoren sind - s.u. (Sage, 1997). Nach dem Konzept der angiogenen Balance entscheidet nicht die Anwesenheit eines Faktors über Angiogenese-Induktion bzw. -Inhibition. Erst die Summe angiogener und antiangiogener Stimuli entscheidet über die effektiv resultierende Wirkung. Angiogene Tumorzellen zeichnen sich durch erhöhte Produktion angiogener Faktoren bei simultan erniedrigter Freisetzung von Hemmstoffen der Gefäßbildung aus (Folkman, 1995).

Verwandt mit der Hypothese der Balance von Angiogenese-Wirkstoffen ist die Vorstellung der kontext-abhängigen Angiogenese. Danach unterliegt die Potenz eines Angiogenese-Modulators dem Milieu (Mandriota und Pepper, 1997). Bei der Regulation der Angiogenese sind demnach, abgesehen von Angiogenese-Faktoren-Interaktionen, EZM-EZ-Wechselwirkungen, EZM-Angiogenese-Faktoren-Effekten, auch der pH oder Matrixeigenschaften relevant. Durch pH-Wert-Modifikation von pH 7,4 auf pH 7,6 lassen sich die mechanischen Eigenschaften einer Fibrinmatrix verändern, so dass sich die Angiogenese-Rate verdoppelt (Nehls und Herrmann, 1996).

Auch auf der Ebene der Proteolyse-Regulation im Rahmen von Angiogenese ist die Balance angiogener und inhibierender Wirkungen entscheidend (Pepper, 2001). Beim Eindringen in die sie umgebende EZM benötigen angiogen aktive EZ-Proteasen, die zum großen Teil zwei Familien zugehörig sind: den Serin-Proteasen (Plasminogen-Aktivator/Plasmin) und den Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Weitere proteolytische Enzyme sind die Glykanasen (z.B. Heparanasen) und die Cystein-Proteasen (z.B. Cathepsin B) (Pepper, 2001). Dosierte, räumlich exakt begrenzte Proteolyse ist notwendig. Einerseits muss die EZM als Migrationshindernis abgebaut werden, andererseits muss die periendotheliale Matrix der migrierenden EZ als gefäßsprossstabilisierende Leitschiene bestehen bleiben. EZ mit starker

proteolytischer Aktivität können nur in Anwesenheit von Protease-Inhibitoren (z.B. Aprotinin) Gefäße ausbilden (Montesano et al., 1987). Zur lokalen Proteolyse-Regulation dienen endogene Antiproteasen, insbesondere TIMP (,Tissue Inhibitor der Metalloproteasen') und PAI-1 (,Plasminogen Aktivator Inhibitor-1').

Der ,basic Fibroblast Growth Factor' (bFGF), ein aF, führt in vitro zu einer zeitversetzt erhöhten Sekretion von zunächst Urokinase Plasminogen-Aktivator (uPA) und etwas später von PAI-1 durch die EZ (Pepper et al., 1990). Die angiogene EZ produziert bei der Proteolyse der EZM angiostatisch wirksame Faktoren wie Endostatin, das als Kollagen-XVIII-Fragment im Sinne einer negativen Rückkopplung wirken könnte. Wachstumsfaktoren können in der EZM konzentriert werden. Gezielte Proteolyse kann zur Freisetzung aF führen. In Geninaktivierungsexperimenten mit Matrix-Metalloproteinase-9-'Knock-Out'-Mäusen wurde eine Angiogenese-Inhibition beobachtet, die auf fehlende lokale proteolytische Freisetzung von ,Vascular Endothelial Growth Factor' (VEGF) zurückgeführt werden konnte (Bergers et al., 2000).

Die EZ muss Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte ausbilden, um den Gefäßspross zu stabilisieren (vgl. Abb. 1). Neben Cadherinen, Selectinen und der Immunglobulin-Familie stellen die dafür primär verantwortlichen Integrine adhäsionsvermittelnde, zellmembranständige Moleküle dar. Integrine haben zusätzlich Rezeptoreigenschaften und können Signale vom Zellinneren nach außen und vice versa übersetzen. Unterschiedliche Aktivierungsmodi der Integrine sowie eine nach Funktionszustand der EZ variierende Integrinexpression existieren (Hynes, 1992). Die angiogenen EZ zeichnen sich durch selektive Expression der Integrine  $\alpha V\beta 3$  ( $\alpha V\beta 3$ ),  $\alpha V\beta 5$  ( $\alpha V\beta 5$ ),  $\alpha 1\beta 1$  ( $\alpha 1\beta 1$ ) und  $\alpha 2\beta 1$  ( $\alpha 2\beta 1$ ) aus, die nicht bzw. nicht signifikant von ruhenden EZ exprimiert werden (Brooks et al., 1994; Friedländer et al., 1995; Senger et al., 1997). Dabei scheint  $\alpha V\beta 3$  die bFGF-Wirkung zu mediieren, während  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$  vermehrt nach VEGF-Stimulation exprimiert werden (Friedländer et al., 1995). EZM-Proteine wie Fibronectin, Vitronectin und Fibrinogen weisen sog. RGD-Sequenzen auf, die als spezifische Bindungsstellen für  $\alpha V$ -Integrine fungieren (Hynes, 1992). RGD ist ein Tripeptid mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure.

#### 1.4. Angiogene Faktoren

Inzwischen ist eine Vielzahl aF bekannt (siehe Tab. 1). Vaskuläre Wachstumsfaktoren kommen als endothelzellspezifische Faktoren (,Vascular Endothelial Growth Factor', Angiopoetine) wie auch als nicht-gefäßspezifische Mediatoren vor (,Fibroblast Growth Factor', ,Transforming Growth Factor', ,Hepatocyte Growth Factor', ,Insulin-like Growth Factor-1', ,Platelet Derived Growth Factor', ,Tumor Necrose Factor-alpha' ).

<b>Angiogene Faktoren</b>	<b>Angiogenese-Inhibitoren</b>
VEGF 1-4	Angiostatin
aFGF, bFGF, FGF-5	Endostatin
Angiopoetin 1-4	Canstatin
HGF	Tumstatin
Ephrine	Restin
ECGF	Thrombospondin-1
EGF	TGF- $\beta$
TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$	Antithrombin III-Fragment
PDGF	16 kDa-Prolactin
IGF-1	Plättchenfaktor 4-Peptid
TNF- $\alpha$	Kininostatin
SPARC	Vasostatin
Interleukin-8	Interleukin-12
	2-Methoxyöstradiol*
	MMP-Inhibitoren*
	Integrin-Antagonisten*
	Thalidomid*

Tab. 1: Regulatoren der Angiogenese. Die mit \* gekennzeichneten Substanzen sind synthetisch hergestellte Inhibitoren. Siehe auch unter 1.8. Angiogenese-Inhibitoren und Abkürzungsverzeichnis.

### **1.4.1. Vascular Endothelial Growth Factor**

Von zentraler Bedeutung für die Vaskulogenese ist VEGF (,Vascular Endothelial Growth Factor'). Bereits der Verlust eines VEGF-Allels führt zum Tod von Embryonen in Geninaktivierungs- (,Knock-out'-) Experimenten (Ferrara et al., 1996). Das endothelzellspezifische, mitogene Potenzial von VEGF im postnatalen Organismus ist durch zahlreiche Experimente belegt. Inzwischen sind der VEGF - Familie fünf verschiedene Faktoren (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E) zugeordnet (Meyer et al., 1999). VEGF-A wurde in fünf Isoformen nachgewiesen, die sich nach posttranskriptioneller Modifikation durch ihre Größe und Aminosäuresequenz unterscheiden (VEGF-A 121, 145, 165, 189, 206). Die VEGF-Wirkungen werden durch drei Tyrosinkinase-Rezeptoren vermittelt (Flt-1, KDR/Flk-1 und Flt-4), für die die verschiedenen VEGF-Formen in unterschiedlicher Weise Liganden darstellen (De Vries et al., 1992; Hewitt & Murray, 1996; Joukov et al., 1996; Meyer et al., 1999). VEGF-Wirkung erfordert Anwesenheit von endogenem bFGF (Mandriota und Pepper, 1997).

### **1.4.2. Angiopoetine und Ephrine**

Die Angiopoetine (Ang-1 bis Ang-4) medieren ihre die Gefäßreifung und -stabilisierung betreffende Wirkung über die Tyrosinkinasen-Rezeptoren Tie-1 und Tie-2 (Davis et al., 1996) . Ephrine scheinen vornehmlich die venöse bzw. arterielle Ausdifferenzierung neu angelegter Gefäße zu regulieren (Yancopoulos et al., 2000).

### **1.4.3. basic Fibroblast Growth Factor**

Der ,basic Fibroblast Growth Factor' (bFGF, auch FGF-2 genannt) wird als einer der wichtigsten angiogenen Wirkstoffe angesehen (Asplin et al., 2001). bFGF wird in vier verschiedenen Isoformen exprimiert und vermittelt seine Effekte über drei der bekanntesten FGF-Tyrosinkinase-Rezeptoren (FGFR-1 bis FGFR-3) (Galzie et al., 1997). bFGF gehört zu den Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, von denen mittlerweile 19 (FGF-1 bis FGF-19) beschrieben

sind (Nishimura et al., 1999). Tumoren, das Endothel sowie viele nicht-endotheliale Zellen sind als bFGF-Produzenten bekannt (Folkman et al., 1993; Schweigerer et al., 1987). Das angiogene Potential von bFGF ist durch viele in vitro und in vivo Experimente belegt. In vitro stimuliert bFGF die EZ-Proliferation und -Migration und kann die Ausformung von „Sprouts“ (Gefäßsprossen) bewirken (Montesano et al., 1986). bFGF kann synergistisch mit VEGF in dreidimensionalen in vitro Angiogenese Assays wirken (Goto et al., 1993). In einer Arbeit war der angiogene VEGF-Effekt von Endothelzellproduziertem bFGF abhängig, da bFGF-Antikörper VEGF-induzierte Angiogenese inhibieren konnten (Mandriota und Pepper, 1997).

#### **1.4.4. Endothelial Cell Growth Factor**

Als angiogener Regulator ist der ‚Endothelial Cell Growth Factor‘ (ECGF) seit etwa 20 Jahren bekannt. Dabei handelt es sich um ein aus dem Hypothalamus gewonnenes EZ-Mitogen, das als 75 kDa- und als 20 kDa-Form zu existieren scheint (Maciag et al., 1979 und Maciag et al., 1982). ECGF wurde in einem der ersten Angiogenese-Assays verwendet und erwies sich dort als sehr potent (Folkman und Haudenschild, 1980).

#### **1.4.5. Transforming Growth Factor-beta**

Für ‚Transforming Growth Factor-beta‘ (TGF- $\beta$ ), einem weiteren gut charakterisierten Angiogenese-Faktor, sind sowohl angiogene als auch antiangiogene Wirkungen beschrieben worden (Müller et al., 1987; Yang and Moses, 1990). TGF- $\beta$  ist ein 25 kDa Polypeptid, das ubiquitär in gesundem Gewebe wie auch in Tumoren vorhanden zu sein scheint. Sein Vorkommen in Thrombozyten bewirkt die ständige Verfügbarkeit in gut vaskularisierten Organabschnitten. Durch Gefäßläsionen kann TGF- $\beta$  aus Thrombozyten freigesetzt werden (Müller et al., 1987). Tumorzellen können TGF- $\beta$  in großen Mengen produzieren (Huang und Lee, 2003). TGF- $\beta$  wirkt auf EZ in unterschiedlicher Stärke antiangiogen (antiproliferativ), wenn diese auf Matrices verschiedener Art (Laminin, Typ IV-Kollagen, Fibronectin) kultiviert werden. Werden die gleichen EZ in eine Kollagen-Matrix inkorporiert, bleibt deren

Proliferationsrate unbeeinflusst von ansteigenden TGF- $\beta$ -Konzentrationen, wohingegen dosisabhängig ‚Sprouts‘ (Sp) als Ausdruck eines angiogenen Effekts ausgebildet werden (Madri et al., 1988).

TGF- $\beta$  existiert bei Säugetieren in drei Isoformen (TGF- $\beta$ 1 bis TGF $\beta$ 3). Die Interaktionen von TGF- $\beta$  mit anderen Angiogenese-Faktoren sind komplex. So sind Effekte von TGF- $\beta$  auf VEGF- und bFGF-induzierte EZ-Migration beschrieben, die von der verwendeten TGF- $\beta$ -Konzentration abhängen. Während niedrige TGF- $\beta$ -Dosen angiogenesefördernd wirkten, inhibierten höhere Konzentrationen die EZ-Motilität – diese TGF- $\beta$ -Wirkung wurde als biphasisch bezeichnet (Pepper et al., 1993; Robert & Sage, 1999). Für die Dimensionalität eines in vitro Angiogenese Assays (2-D gegenüber 3-D) sind modulierende Wirkungen auf TGF- $\beta$  demonstriert, da TGF- $\beta$  antiangiogen (antiproliferativ) in 2-D-EZ-Kultur und angiogen (Sp-bildend) in 3-D Experimenten wirken kann (Madri et al., 1988). Kürzlich wurde eine regulierende Wirkung von TGF- $\beta$  auf das VEGF/VEGF-Rezeptor-System beschrieben (Breier et al., 2002). TGF- $\beta$  vermindert die Zahl ausgebildeter Gefäße im Rahmen seiner antiangiogenen Wirkung, ohne dabei die Länge bzw. Breite der übrigen (dennoch) entstehenden Gefäße zu beeinflussen (Parsons-Wingerter et al., 2000). Auch TGF- $\beta$ -Inhibitoren können experimentell antiangiogen wirken (Tuxhorn et al., 2002). Die komplexen Wirkungen von TGF- $\beta$  sind exemplarisch hinsichtlich der Kontextabhängigkeit von Angiogenese-Wirkstoffen (Pepper, 1997).

#### **1.4.6. Tumor Nekrose Faktor-alpha**

Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ist eine seit vielen Jahren bekannte Substanz. Seit der Entdeckung von TNF- $\alpha$ -Inhibitoren hat die angioregulative Funktion des Faktors zunehmend Beachtung gefunden (Paleolog, 1997). Bei der Therapie der rheumatoiden Arthritis spielt die Modulation von TNF- $\alpha$  eine bedeutsame Rolle: Durch TNF- $\alpha$ -Blockade ließen sich bereits klinische Erfolge erzielen (Dayer, 2002; Feldmann und Maini, 2002). Auch bei der Regulation von Tumor-Angiogenese wird TNF- $\alpha$  eingesetzt (Ruegg et al., 2002). TNF- $\alpha$  wird zur Induktion von Angiogenese in Assays verwendet (Koolwijk et al., 1996).

### **1.5. Potenzial angiogener Faktoren**

Das therapeutische Potenzial aF bei der Behandlung ischämischer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und apoplektischer Insulte stellt einen Schwerpunkt von Forschungsbemühungen dar. Durch Verabreichung von bFGF bzw. VEGF soll die Angiogenese und Arteriogenese in minderperfundierten Regionen medikamentös induziert werden. Inzwischen gibt es klinische Erfolge, bei denen die intraarterielle Applikation von VEGF-Gen Angiogenese bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit fördern konnte (Isner et al., 1996) . Somit ist grundsätzlich die klinische Anwendbarkeit von aF demonstriert. Multizentrische klinische Studien zur intramyokardialen Gabe von VEGF-Gen im Rahmen von Koronarangiographien werden unternommen (Engelmann und Nikol, 2001). Das Potenzial von bFGF bei der Behandlung akuter ischämischer Insulte wird in klinischen Studien untersucht (Bogousslavsky et al., 2002).

### **1.6. Angiogenese-Inhibition**

Angiogenese-Inhibition findet im gesunden Organismus statt und reguliert wie aF das Gefäßremodeling. Verschiedene AI wurden aus Sekreten gesunder Organismen isoliert (Guan et al., 2003, Kucharz et al., 2003) . Viele AI sind Spaltprodukte aus Vorläuferproteinen mit völlig anderer, teilweise entgegengesetzter Wirkung , z.B. Fragmente von aF und von EZM-Molekülen. Bei der proteolytischen Degradation des Gewebes durch aF können AI als EZM-Fragmente konzentriert werden, so dass AI einen lokal ablaufenden Rückkopplungsmechanismus darstellen können.

### **1.7. Mechanismen der Angiogenese-Inhibition**

Entsprechend der Teilschritte der angiogenen Kaskade kann Angiogenese-Inhibition durch Hemmung der Proliferation, der Migration, der Proteolyse und der Adhäsion stattfinden. Antikörper gegen Gefäßwachstumsfaktoren können verhindern, dass das Signal des aF die EZ erreicht, dies wurde für spezifische Antikörper gegen VEGF oder bFGF demonstriert (Pierce et al., 1995). Rezeptoren für aF vermitteln ihre Signale mehrheitlich über Tyrosinkinase, daher können

Tyrosinkinase-Inhibitoren die intrazelluläre Signalkaskade und damit die angiogene Aktivität der EZ unterbinden. Hemmstoffe der VEGF-Rezeptorphosphorylierung und Antagonisten des Calciumeinstroms stören in vergleichbarer Weise die Übertragung der angiogenen Signale (Fong et al., 1999 und Kohn & Liotta, 1995).

Eine große Zahl der in Tabelle 1 aufgeführten AI beeinflusst die Proliferation und Migration der EZ, ohne dass gesicherte detaillierte Kenntnisse über die Art ihrer Wirkung existieren (Griffioen und Molema, 2000). Die Zahl erkannter Mechanismen nimmt jedoch zu. Angiogenese-Regulatoren beeinflussen die Expression des zellmembranständigen Proteins Caveolin-1 (Liu et al., 1999). TNP-470, ein Derivat vom antibiotisch wirksamen Fumagillin, verhindert das Eintreten der EZ in die G1-Phase des Zellzyklus und wirkt auf diese Weise antiangiogen (Castronovo & Benotti, 1996). Für das 450 kDa Glykoprotein Thrombospondin-1 ist CD 36 als Rezeptor nachgewiesen (Jimenez et al., 2000). Die antiproteolytische Wirkung der MMP-Inhibitoren (Matrix-Metalloproteinasen-Inhibitoren) beeinflusst die Migrationspotenz der EZ.

### **1.8. Angiogenese-Inhibitoren**

Seit 1994 haben über 20 verschiedene AI das Stadium der klinischen Erprobung erreicht (Brem, 1998; Folkman et al., 2001). Eine Übersicht über die wichtigsten AI gibt Tabelle 1. AI sind vielfach Fragmente aus Vorläufermolekülen. Beispiele sind Angiostatin als Plasminogenfragment, Endostatin als Kollagenbruchstück, ein von Plättchenfaktor 4 abgespaltenes Peptid, das 16 kDa-Prolactin als Produkt des hypophysären Hormons (Clapp et al., 1993; O'Reilly et al., 1994; O'Reilly et al., 1997). Solche Proteine werden auch als kryptisch bezeichnet, da ihre angio-inhibitorischen Eigenschaften erst nach Abspaltung aus dem Muttermolekül beobachtet werden. Mit dem Kininogen-Spaltprodukt Kininostatin, dem Calreticulin-Fragment Vasostatin und einer Antithrombinvariante wurden weitere angiostatische Faktoren entdeckt (O'Reilly et al., 1999; Pike et al., 1998; Guo et al., 2001). Neben dem Kollagen XVIII-Fragment Endostatin können auch aus anderen Kollagenarten angioinhibitorische Bruchstücke abgespalten werden: Restin (aus Kollagen IV), Canstatin (aus

Kollagen XV) und Tumstatin (aus Kollagen IV) (Kamphaus et al., 2000; Maeshima et al., 2002; Ramchandran et al., 1999).

### **1.8.1. Angiostatin**

Angiostatin (AS) ist ein internes Bruchstück von Plasminogen. Die Entdeckung dieser Substanz bestätigte die Hypothese, dass Primärtumoren über Metastasen-inhibitorische Eigenschaften verfügen können. Klinisch war beobachtet worden, dass die Entfernung eines Primärtumors zu einem explosionsartigen Wachstum seiner Metastasen führen kann (Warren et al., 1977; Sugarbaker et al., 1977). 1994 gelang es O'Reilly et al., den Mechanismus unterdrückten Metastasenwachstums durch einen Primärtumor zu entschlüsseln: Lewis-Lung-Carcinoma (LLC) tragende Mäuse zeigten nach Primärtumor-Entfernung rasches Metastasenwachstum. Es wurden verschiedene Körperflüssigkeiten der Tiere vor Entfernung des LLC gesammelt und fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihre Potenz getestet, die Proliferation von bFGF-stimulierten kapillären Endothelzellen zu unterdrücken. Mit diesem System gelang die Identifizierung und Isolation von Angiostatin, das auch *in vivo* antiangiogene sowie metastasen-inhibitorische Eigenschaften hat.

#### **1.8.1.1. Angiostatin-Struktur**

Humanes AS wandert laut Erstbeschreiber O'Reilly in der SDS-Gel-Elektrophorese in drei separaten Banden bei 45, 42 und 40 kDa unter nicht-reduzierenden Bindungen (O'Reilly et al., 1994). Es umfasst die Aminosäuren 98 bis 460 des Plasminogens. Die entsprechende N-terminale Sequenz ist KVYLSEXKTG (zur Nomenklatur der Aminosäuren siehe Abkürzungsverzeichnis). Es enthält vier der fünf Kringle-Regionen (cysteindisulfidbrückenhaltige Ring-Strukturen) des Muttermoleküls, die je aus etwa 80 Aminosäuren bestehen. Kringle 1 und 4 enthalten Lysin-Bindungsstellen. Den einzelnen Kringle-Domänen ist ebenfalls eine antiangiogene Aktivität gegeben. Cao et al. gelang 1996 der Nachweis, dass Kringle 1, 2 und 3 isoliert einen antiproliferativen Effekt auf Endothelzellen haben. Diese Wirkung ließ sich für Kringle 4 nicht darstellen. In einer weiteren Studie zeigte auch der Kringle 5

des nach AS-Abspaltung verbleibenden Plasminogenrestes anti-angiogene Wirksamkeit (Cao et al., 1997).

### **1.8.1.2. Angiostatin-Produktion**

AS entsteht durch Plasminogen-Proteolyse, die von Tumorzellen, aber auch von nicht-neoplastischen Zellen wie Makrophagen ausgeht (Falcone et al., 1998; Gately et al., 1996). Abhängig von der Art des Primärtumors scheinen verschiedene Wege der AS-Produktion zu existieren, wie auch die Tumoren nur teilweise die Fähigkeit der enzymatischen AS-Herstellung zu besitzen scheinen (O'Mahoney et al., 1998 und Patterson und Sang, 1997). Zur in vitro Herstellung von AS wurde zuerst Pankreaselastase benutzt (O'Reilly et al., 1994). Die alternative Verwendbarkeit von Plasminogen-Aktivatoren und freien Sulfhydrylgruppen-Donatoren konnte demonstriert werden (Stathakis et al. 1997; Gately et al. 1997). MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12, Cathepsin D und Prostata spezifisches Antigen (PSA) können ebenfalls AS bzw. AS-ähnliche Fragmente aus Plasminogen abspalten (Heidtmann et al., 1999; Lijnen et al., 1998; Morikawa et al., 2000; Patterson und Sang, 1997). Schon bevor man die anti-angiogenen Wirkungen von AS entdeckte, benutzte man Pankreas-Elastase, um den Plasminogenteil zu isolieren, der die sog. Kringle Domänen 1-4 des Muttermoleküls umfasst. Dieser Region entspricht AS (siehe Abb. 2).

### **1.8.1.3. Angiostatin-Wirkung**

Der Wirkmechanismus von AS ist nicht abschließend geklärt, es sind jedoch in den letzten Jahren Interaktionen mit Integrinen ( $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ), mit der ATP-Synthase sowie mit dem ‚Hepatocyte Growth Factor‘ beschrieben worden (Moser et al., 2001; Tarui et al., 2001; Wajih & Sane, 2003). Die Wirkung von AS setzt sich möglicherweise aus einem antiproliferativen, proapoptotischen, antimigratorischen und antiproteolytischen Netto-Effekt zusammen. Kürzlich ist auch gezeigt worden, dass AS über Vasokonstriktion antiangiogene Effekte entfalten kann (Koshida et al., 2003). AS-behandelte EZ weisen als Ausdruck der antiproliferativen Wirkung von AS erhöhtes E-Selectin-Vorkommen auf (Luo et

al., 1998). AS-Wirkung beeinflusst nach VEGF-Stimulation intrazelluläre Signalwege durch p53 sowie durch FasL und Mitochondrienfunktion (Chen et al., 2003). Demgegenüber wurde in einer anderen Arbeit kein Hinweis auf die Modifikation intrazellulärer Signalwege durch AS nach FGF- und VEGF-Behandlung von EZ gefunden (Eriksson et al., 2003).

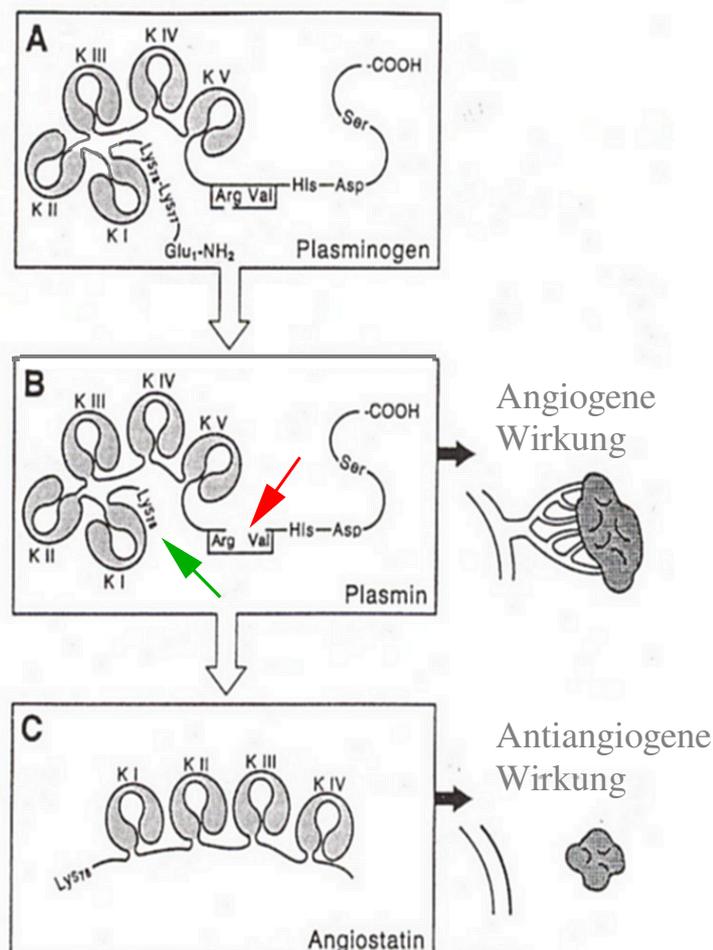


Abb. 2: Schema der Plasminogen (Plg)/Plasmin (Plm)/Angiostatin (AS)-Struktur (modifiziert nach Gately et al., 1997). A) Plasminogen enthält die fünf sog. Kringle-Domänen (KI-KV), die je drei Disulfidbrücken aufweisen. Die jeweils etwa 80 Aminosäuren umfassende Sequenz der einzelnen Kringle-Domänen zeigt einen hohen Grad der Übereinstimmung zueinander. Humanes Plg ist einkettig und hat eine Gesamtlänge von 791 Aminosäuren. B) Plg-Aktivatoren konvertieren Plg durch Hydrolyse der Arginin<sup>561</sup>-Valin<sup>562</sup>-Peptidbrücke in der Serin-Protease-Region (roter Pfeil in B) zu Plm. Autoproteolytisch wird nachfolgend die Lysin<sup>77</sup>-Lysin<sup>78</sup>-Bindung gespalten und damit das N-terminale Peptid freigesetzt (grüner Pfeil in B). Durch seine proteolytische Potenz ist Plm angiogen wirksam. C) Nach Abspalten von Kringle V entsteht AS. AS enthält Kringle I bis IV und wirkt im Gegensatz zum Muttermolekül antiangiogen.

## **1.8.2. Endostatin**

Auch Endostatin (ES), ein etwa 20 kDa großes Kollagen XVIII-Fragment, kann als Beispiel für ein „Molekül-Recycling“ durch Produktion endogener AI aus einem Vorläufer-Protein dienen (O'Reilly et al., 1997). ES wurde fast zeitgleich aus konditioniertem Medium von murinen Haemangi endotheliumzellen und aus menschlichem Hämofiltrat isoliert, zeigt in vitro und in vivo antiangiogene Eigenschaften und kann das Wachstum von Tumoren und Metastasen inhibieren (O'Reilly et al., 1997; Ständker et al., 1997).

### **1.8.2.1. Endostatin-Struktur**

ES entstammt der C-terminalen sog. NC1 (,Non-Collagenous')-Domäne von Kollagen XVIII. Ähnlich wie für Kollagen XVIII selbst (Rehn et al., 1996) sind für ES verschiedene Varianten mit unterschiedlichen N-Termini und Längen beschrieben worden (Sasaki et al., 1998). Es zeigen sich Unterschiede zwischen murinem und humanem Endostatin. Die humanen ES-Formen sind z.B. 12 Aminosäuren kürzer bzw. vier, neun und vierzehn Aminosäuren länger als murines ES (Ständker et al., 1997; Felbor et al., 2000). Diese Beobachtung macht es wahrscheinlich, dass abhängig vom physiologischen Produktionsort unterschiedliche ES-Formen mit eventuell differierender antiangiogener Wirkung hergestellt werden können.

### **1.8.2.2. Endostatin-Entstehung und -Wirkung**

Pankreas-Elastase und Cathepsin L können ES aus der NC1-Domäne von Kollagen XVIII proteolytisch abspalten (Wen et al., 1999; Felbor et al., 2000). Der Mechanismus der antiangiogenen Wirkung von ES ist ungeklärt. ES interagiert mit  $\alpha 5$ - und  $\alpha V$ -Integrinen und wirkt möglicherweise über antiadhäsive Mechanismen (Rehn et al., 2001; Sudhakar et al., 2003). Damit vereinbar ist die Induktion von EZ-Apoptose durch ES. Für die beobachtete Apoptose-fördernde Wirkung von ES wurde die verminderte Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-Xl verantwortlich gemacht (Dhanabal et al., 1999). Das Shb-Adaptor Protein, ein Apoptose-Modulator, könnte für die antiangiogene

Wirkung mitverantwortlich sein (Dixelius et al., 2000). ES bindet an Heparin und Heparansulfate. Für bFGF fungieren Heparansulfate als Co-Rezeptoren, so dass eine kompetitive Hemmung der Wachstumsfaktor-Co-Rezeptoren durch ES diskutiert wurde (Sasaki et al., 1999). Glypikan, ein Zellmembran-Proteoglykan, ist als Heparinase-sensibler Rezeptor für ES beschrieben worden (Karumanchi et al., 2001). ES moduliert die Expression und Präsentation von Plasminogen-Aktivatoren und deren Inhibitoren auf der EZ (Wickström et al., 2001). ES reguliert die katalytische Aktivität der Membran-Typ 1-Matrix Metalloproteinase und der Matrix Metalloproteinase 2 (Kim et al., 2000). ES könnte also auch über die veränderte proteolytische Potenz der EZ antiangiogen wirken. ES und AS erhöhen den intrazellulären Calciumgehalt von EZ und scheinen auf diese Weise die Signalkaskaden angiogener Faktoren modifizieren zu können (Jiang et al., 2001).

### **1.8.3. Transforming Growth Factor-beta als Angiogenese-Inhibitor**

Auf sowohl angiogene wie auch antiangiogene TGF- $\beta$ -Wirkungen wurde bereits hingewiesen. Das Auge kommt als Organ in Betracht, in dem TGF- $\beta$  vornehmlich inhibitorische Effekte erzielt. TGF- $\beta$  bewirkt am Auge in vitro und in vivo eine Angiogenese-Hemmung (Friling et al., 1996). Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie (PDR) weisen erniedrigtes TGF- $\beta$ -Vorkommen in ihren Glaskörpern auf (Spranger et al., 1999). Der Verlust von Perizyten, potenten TGF- $\beta$ -Produzenten, geht der Entwicklung einer PDR voraus (De Oliveira, 1966). TGF- $\beta$  scheint durch Apoptose-fördernde Signale antiangiogen auf retinale EZ zu wirken (Yan und Sage, 1998). Die Kontext-Abhängigkeit von TGF- $\beta$ -Wirkungen ist auch bei Verwendung retinaler EZ demonstriert worden (Yan und Sage, 1998).

### **1.8.4. Integrin-Antagonisten**

Als Hemmstoffe der Zelladhäsion sind Integrin-Antikörper und andere Integrin-Antagonisten beschrieben. Insbesondere  $\alpha$ V-Antagonisten haben sich in vielen Experimenten als gut wirksame AI erwiesen (Eliceiri & Cheresch, 2001). Synthetische RGD-Peptide sind  $\alpha$ V $\beta$ 3-Antagonisten und wirken über Hemmung

der EZ-Bindung an die EZM antiangiogen (Kawaguchi et al., 2001). Mehrere Arbeiten weisen auf die Effektivität von RGD-Peptiden als AI hin (Friedländer et al., 1996; Hammes et al., 1996).

### **1.9. Potenzial von Angiogenese-Inhibitoren**

AI stehen im Blickpunkt onkologischer Forschung, seit gezeigt werden konnte, dass Tumoren nur dann größer als 1-2 mm werden, wenn sie über ein ernährendes Gefäßsystem verfügen (Folkman et al., 1963 und Folkman et al., 1966). AI sollen Neoplasien durch Unterbrechung ihrer Blutzufuhr „aushungern“ (Cheresh, 1998). Da der Wirkort von AI selektiv die angiogen aktive EZ ist, sind unerwünschte Nebenwirkungen der Substanzen im Vergleich zu Zytostatika in deutlich geringerem Ausmaß zu erwarten. Die naheliegendste Nebenwirkung von AI betrifft Störungen der Wundheilung, bei der Neovaskularisationen obligat sind. In experimentellen Untersuchungen konnten solche unerwünschten Effekte bisher nicht beobachtet werden (Berger et al., 2000).

EZ unterliegen im Gegensatz zur Tumorzelle keiner relevanten Mutationsrate, so dass nicht mit einem Wirkungsverlust von AI durch Resistenzentwicklung zu rechnen ist (O'Reilly et al., 1996). Antiangiogene Strategien basieren auf einem neuartigen Angriffspunkt und können daher adjuvant bzw. synergistisch zu den gängigen Tumortherapien eingesetzt werden (Mauceri et al, 1998). Die antiangiogene Potenz von Angiostatin und Endostatin wurde bereits für verschiedene Herstellungsverfahren (Isolation aus Körperflüssigkeiten, proteolytische und rekombinante Produktion) und in mehreren Angiogenesetestsystemen dokumentiert (Übersicht bei Kim, 1998). Sie gehören zu den AI mit dem bisher eindruckvollsten antiangiogenen Wirkprofil (Hanahan, 1998). Allerdings liegen auch Veröffentlichungen vor, in denen das Fehlen einer antiangiogenen Wirkung von AS bzw. ES berichtet wird (Stathakis et al, 1997; Ständker et al., 1997). Dennoch wird ihre Anwendbarkeit in der Tumortherapie auf breiter Ebene diskutiert (Gorman, 1998).

Das Potenzial von AI betrifft jedoch auch viele nicht-onkologische Erkrankungen mit unerwünschter Angiogenese (z.B. rheumatoide Arthritis, Psoriasis, s.o.). Unter ihnen nimmt die diabetische Retinopathie (DR) einen hohen Stellenwert ein, da sie die zweithäufigste Erblindungsursache in Deutschland

darstellt (Graf et al., 1999). Sie durchläuft klinisch zwei Hauptstufen: das nicht-proliferative Stadium (NPDR) und das proliferative Stadium (PDR). Die NPDR ist durch Retinaödem und -blutungen, Mikroaneurysmen und Gefäßokklusionen charakterisiert. Beim Übergang zur PDR kommen vor allem Neovaskularisationen hinzu, die zur Ausbildung von fibrovaskulären Membranen führen können. Diese Membranen können schrumpfen, eine Traktionsablatio der Netzhaut und damit die Erblindung verursachen.

In Studien zeigte sich bei Typ 1-Diabetikern nach 15-jährigem Krankheitsverlauf bei bis zu 86% eine Retinopathie. 37% dieser Patienten zeigten das Vollbild der PDR (Klein et al., 1998). Bei der Entstehung der DR sind angiogene Substanzen wie VEGF und bFGF beteiligt (Armstrong et al., 1998; Mathews et al., 1997; Amin et al., 1997; Burgos et al., 1997; Aiello et al., 1994; Hill et al., 1997 und Frank et al., 1996). Sowohl zur Prävention wie auch zur Therapie der DR wäre daher der Einsatz von AI eine wichtige therapeutische Option.

### **1.10. Angiogenese-Bio-Assays**

Aus dem rasch zunehmenden Interesse an der Erforschung der Angiogenese ergibt sich ein Bedarf an physiologisch validen, in der Durchführung schnellen, leicht handhabbaren, quantifizierbaren, kostengünstigen experimentellen Systemen, die eine Untersuchung angiogen aktiver Substanzen erlauben (Jain et al., 1997). In Angiogenese-Assays sollen im Idealfall die Entdeckung angiogener Faktoren, die Klärung ihres Wirkmechanismus, die Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen und ihrer klinischen Anwendbarkeit möglich sein. Zur Zeit existiert kein Assay der allen o.g. Anforderungen entspricht. Grundsätzlich werden in vivo Modelle von in vitro Assays unterschieden.

### **1.11. In vivo Angiogenese-Assays**

Die am lebenden Organismus durchgeführten Angiogenese-Bio-Assays basieren in erster Linie auf Präparationen von vaskularisiertem Gewebe, Implantationen von polymerer Matrix sowie Untersuchungen an operativ

entnommenem vaskularisiertem Gewebe nach vorhergehender Stimulation durch angiogene Wirkstoffe. Das Prinzip der gefensterten Assays besteht in der Präparation von oberflächlich gelegenenem Gewebe, das nachfolgend durch Lichtmikroskopie die Beurteilung mikrovaskulärer Strukturen gestattet. Das ‚Rabbit Ear Chamber‘ und das ‚Hamster Cheek Pouch Window‘ sind Beispiele. Alternativ zur „Fensterung“ werden angiogen stimulierte Gewebe operativ freigelegt und anschließend mikroskopisch ausgewertet, z.B. die Haut im „Dorsal Skin Assay“, die Mesenterien oder Leber von Nagetieren (Jain et al., 1997).

Polymere Matrix- oder Kollagenimplantate werden mit angiogenen Faktoren und/oder Zellen versehen und in unterschiedliche Gewebe von Tieren implantiert. Je nach Stimulation wird das zuvor avaskuläre Implantat vaskularisiert und Art und Zahl der neuen Gefäße können ausgewertet werden. Solche Implantate finden in „gefenterten“ und „nicht-gefenterten“ Assays Anwendung. Von den in vivo Assays gehören der konventionelle ‚Chicken Chorioallantoic Membrane Assay‘, das ‚Rabbit Corneal Pocket Model‘ und der ‚Hamster Cheek Pouch Window Assay‘ zu den drei am häufigsten eingesetzten Systemen (Brown et al., 1996). Beim ‚Rabbit Corneal Pocket Model‘ werden nach erfolgter Inzision der Kornea Zellen oder Faktoren implantiert und können durch wiederholte Mikroskopie ausgewertet werden. Bei Verwendung von Hühnerembryonen im ‚Chicken Chorioallantoic Membrane Assay‘ wird das Hühnerei in Petrischalen kultiviert und anschließend Kollagengele mit aF aufgebracht.

### **1.12. In vitro Angiogenese-Assays**

Es gibt verschiedene in vitro Angiogenese-Assays. Die einfachsten Verfahren sind EZ-Proliferationsexperimente, bei denen durch automatisierte Zellzählkammern oder durch Zellanfärbung mit photometrischer Detektion der Färbungsintensität das Stattfinden bzw. Ausbleiben einer EZ-Vermehrung festgestellt wird. EZ-Migration ist ein notwendiger Teil der angiogenen Kaskade. Migrationsexperimente werden am häufigsten in der sog. Boyden Kammer durchgeführt. Sowohl Proliferations- wie auch Migrationsexperimente erfassen nur Teilaspekte der Angiogenese. Es liegen Publikationen vor, die das Auftreten

von Angiogenese beschreiben, wenn die Zellvermehrung im wesentlichen unbeeinflusst bleibt (Sholley et al., 1984).

### 1.12.1. ‚Sprouting‘ Assays

Im sog. ‚Sprouting Assay‘ (SpA) kann der komplexe Ablauf physiologischer Angiogenese in vitro simuliert werden (Folkman und Haudenschild, 1980). Dabei werden EZ auf oder in eine EZM gebracht, um durch Stimulation der EZ die Ausbildung von Sp zu induzieren. Der SpA wurde mit wechselnden Matrices (z.B. Gelatine, Kollagen, Fibrin) und mit verschiedenen EZ (mikro- und makrovaskulärer Herkunft, unterschiedlicher Organabstammung) beschrieben. Im SpA sind die einzelnen Schritte der Angiogenese-Kaskade zu beobachten. Das Lösen der EZ aus dem Zellverband, die proteolytische Degradation der EZM, die Migration, die passagere Adhäsion der Zelle an die EZM, die Proliferation und die abschließende stabilisierende Adhäsion an die Matrix mit Ausbildung von Interzellulärkontakten und Gefäßfusionen sind Assaybestandteil.

Die Auswertung des SpA stellt teilweise ein Problem dar. Die Differenzierung der initial vorhandenen Zellen zu den ausgebildeten Sp kann besonders in den häufiger benutzten zweidimensionalen Systemen mikroskopisch schwierig sein. Auch mit Hilfe von computergestützten Bildanalysesystemen erreicht man nur semi-quantitative Evaluationen. Mit der Einführung des ‚Rat Aorta Ring Assays‘ gelang die Beschreibung eines biologisch komplexen, qualitativ gut auswertbaren, dreidimensionalen Testsystems. In Fibrinmatrix eingebettete Abschnitte einer Rattenaorta bildeten nach Stimulation Gefäßstrukturen in die Umgebung aus (Nicosia et al., 1982). Die Durchführung des Assays im serumfreien Milieu gelang erst später (Nicosia und Ottinetti, 1990). Ein Nachteil dieser Versuchsanordnung ist, dass es sich um ein Gemisch von makro- und mikrovaskulären EZ und nicht-endothelialen Zellen handelt, das in die EZM eingebracht wird (Nehls und Drenckhahn, 1995).

### 1.12.2. Microsphären-gestützte ‚Sprouting‘ Assays

Mit der Verwendung von endothelzellbewachsenen Microsphären, die in Fibrinmatrizes inkorporiert wurden, etablierten Nehls und Drenckhahn 1995 einen neuen Versuchsaufbau für SpA. Der experimentelle Ablauf des SpA nach Nehls und Drenckhahn ist in Abb. 3 dargestellt. Bei diesem SpA ist wie beim ‚Rat Aorta Ring Assay‘ die Quantifizierung gut durchführbar, da die Gefäßsprossen, die Sp, in einer ansonsten zellfreien Fibrinmatrix gezählt werden. Dadurch wird ein einfacher, kostengünstiger und schneller Ablauf gewährleistet.

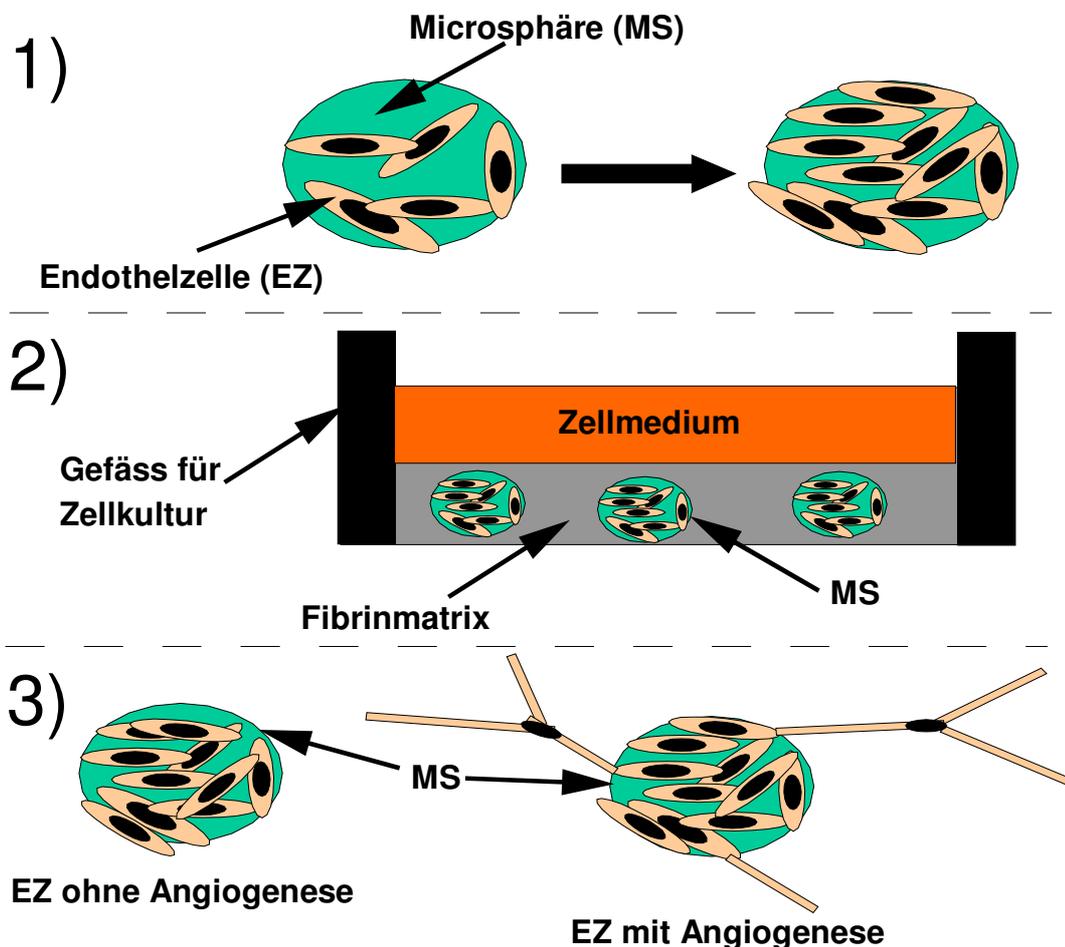


Abb. 3: Prinzip des Sprouting-Assays: 1) Endothelzellen (EZ) werden auf Microsphären (MS) ausgesät und kultiviert, bis sie konfluieren. 2) Die EZ-bewachsenen MS werden in eine Fibrinmatrix integriert und mit Angiogenese-Wirkstoffen behandelt. 3) Nach erfolgreicher Stimulation bilden die EZ ggf. Sprossen in die sie umgebende Fibrinmatrix aus. Mikroskopisch erfolgt die Auswertung und Quantifizierung von MS auf Angiogenese.

Ebenso wie beim ‚Rat Aorta Ring Assay‘ findet beim Microsphären (MS)-SpA die Sp-Ausformung in einer dreidimensionalen (3-D) Matrix statt. Der Drei-Dimensionalität solcher Assays wird zunehmend größere Bedeutung beigemessen, da eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die unter natürlichen Bedingungen 3-D ablaufende Angiogenese angenommen wird (Vernon und Sage, 1999; Williams, 1993). Die Dimensionalität eines Assays kann über das Eintreten bzw. Ausbleiben einer Angiogenese-Wirkung entscheiden (Madri et al., 1988).

### **1.13. Vor- und Nachteile von Angiogenese-Bio-Assays**

Der Vorteil der *in vivo* Angiogenese-Assays ist ihre biologische Komplexität, da sie die verschiedenen Zwischenschritte der Angiogenese (Zellproliferation, Zellmigration, Matrix-Proteolyse, Apoptose, Zelladhäsion, Gefäßsprossausbildung, Gefäßstabilisierung etc.) beinhalten. Häufige Nachteile solcher *in vivo* Systeme sind, dass die Ergebnisse nur semi-quantitativ oder qualitativ erfassbar sind, dass die Applikation und Verteilung der Testsubstanzen Schwierigkeiten bereitet und daher Dosis-Wirkung-Relationen nicht abgeleitet werden können. Weiterhin gehen sie zum Teil mit einem erheblichen experimentellen und zeitlichen Aufwand, hohen Kosten und ethischen Restriktionen einher (Jain et al., 1997). Der ‚Rabbit Ear Chamber Assay‘ ist ein *in vivo* Testsystem, das das Kriterium der Quantifizierbarkeit zufriedenstellend erfüllen kann. Allerdings dauert allein die Versuchsvorbereitung bis zu 6 Wochen, die Methode ist sehr teuer und das Testmilieu ist trotz des großen Aufwands nur eingeschränkt mit spontaner Angiogenese in physiologischem Gewebe vergleichbar (Jain et al., 1997).

*In vitro* Assays sind schneller, einfacher und billiger durchzuführen. Von verschiedenen Autoren wird jedoch die Übertragbarkeit von *in vitro* Daten auf die physiologische Situation angezweifelt (Jain et al., 1997). Dies gilt insbesondere dann, wenn die Testverfahren nur Teilaspekte der Angiogenese reproduzieren. Unter den *in vitro* Assays stellt der SpA das komplexeste und hinsichtlich der Teilaspekte der Angiogenese das „kompletteste“ Verfahren dar. Die gute Quantifizierbarkeit und prinzipielle Durchführbarkeit im serumarmen bzw. -freien Milieu sind Vorteile des MS-SpA (Nehls et al., 1998; Nehls und Drenckhahn, 1995). Gegenüber dem ‚Rat Aorta Ring Assay‘ ist der MS-SpA biologisch

weniger komplex, da er keine Wirkungen in Organfragmenten untersucht und somit Wechselwirkungen nicht-endothelialer Zellen mit EZ nicht erfasst. Im MS-SpA finden die Experimente bei Abwesenheit von Nicht-EZ unter eindeutig definierten Bedingungen statt, da nachgewiesene Effekte immer Folge einer EZ-Antwort auf Stimuli sein müssen. Es konnte gezeigt werden, dass auch nicht-endotheliale Zellen Ausläufer bilden, die mit Sp verwechselt werden können (Nehls et al., 1994). Zusätzlich ist die gezielte Erforschung von Wechselwirkungen nicht-endothelialer Zellen mit EZ durch Co-Kultur-Experimente im MS-SpA möglich (Nehls et al., 1998).

#### **1.14. Fragestellung**

Angiogenese beeinflusst den Verlauf vieler Erkrankungen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl aF und AI entdeckt. Diese Substanzen eröffnen bei der koronaren Herzkrankheit, bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, bei Tumorerkrankungen, bei der diabetischen Retinopathie, aber auch bei vielen anderen Erkrankungen neue therapeutische Perspektiven. Es besteht ein Bedarf an validen Angiogenese-Assays, die die Entdeckung von aF und AI und deren weitere Untersuchung (z.B. zum Wirkmechanismus) gewährleisten. Die hier dargestellten Experimente sollten zunächst die Konditionen für ein Angiogenese-Modell definieren, das die Parameter physiologischer Angiogenese berücksichtigt. Dabei sollte den Forderungen nach einfacher Handhabung, Schnelligkeit, Quantifizierbarkeit, biologischer Komplexität, Dreidimensionalität und Praktikabilität im serumarmen Milieu des Assays Rechnung getragen werden.

Aus diesem Ansatz ergaben sich folgende Experimentvorhaben:

- 1.) Etablierung des MS-SpA bei Verwendung retinaler EZ.
- 2.) Optimierung der Bedingungen des MS-SpA.
- 3.) Tests mit bekannten aF und AI hinsichtlich ihrer Wirksamkeit im MS-SpA.

Zum Zeitpunkt der Experimente wurde erstmalig die Produktion von AS durch uPA/SHD in der Literatur beschrieben. Zusätzlich wurde verschiedene ES-Formen bekannt. Es ergaben sich als weitere Ziele:

- 4.) Validierung von uPA/SHD-Inkubation als Methode zur AS-Herstellung.
- 5.) Vergleich der AS-Varianten durch Elektrophorese und Teilsequenzierung.
- 6.) Tests mit den AS-Varianten und ES-Formen im MS-SpA.

## 2. Methoden

### 2.1. Durchführung des ‚Sprouting-Assays‘ mit BREC

#### 2.1.1. Kultur und Charakterisierung boviner retinaler Endothelzellen

Bovine retinale Endothelzellen (BREc) wurden von Frau Dr. Sigrid Zink (Diabetes-Forschungsinstitut, Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Präparation erfolgte durch pigmentzell-armes Ablösen der Retina aus dem aufgeschnittenen Bulbus mittels Pinzette, anschließendem Zerschneiden und Kollagenase-Verdau der Retina und Zentrifugation der Zellen. Die Primärkultur fand in ‚Dulbecco's Modified Eagle's Medium‘ (DMEM) mit 20 % fötalem Rinderserum (fötalem bovinen Serum, FBS) und Endothelzell-Wachstumsfaktor statt (Schor und Schor,1986; Zink et al.,1995). Zur weiteren Reinigung der EZ von Perizyten, Fibro- und Myozyten und anderen nicht-endothelialen Zellen wurde die Kultivierung in mit EZ-Wachstumsfaktoren ergänztem, 10% FBS-haltigem Endothelzellmedium (‚Endothelial Cell Growth Medium‘, ECGM) fortgeführt. Das ECGM wurde auf sog. MCDB 131-Basis formuliert, welches das Wachstum von Endothelzellen optimiert (Nicosia und Ottinetti, 1990). Das Teilungsverhältnis betrug beim Passagieren 1:3 bis 1:4. Die Zellen wurden mikroskopisch hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und ihrer Morphologie evaluiert.

In Proliferationsexperimenten wurden zur Konfluenz gewachsene BREc durch Trypsin abgelöst. Nach Resuspension der BREc in ECGM (10 % FBS) wurden jeweils 100 µl ( $15-25 \cdot 10^4$  Zellen) in die Vertiefungen einer 96-Loch Zellkulturplatte überführt. Nach 12 bis 24 h Inkubation bei 37°C erfolgte ein Mediumwechsel zu 0,3% FBS-haltigem MCDB 131. Nach weiterer Inkubation für 12 bis 24 h wurde das Medium erneuert und die BREc in Triplikaten stimuliert. bFGF wurde in den Dosen 0,1; 1; 10 und 50 ng/ml und VEGF in Konzentrationen von 4, 40, 100 und 200 ng/ml wurden eingesetzt. Der TGF-β1 wurde in den Dosen von 0,1; 1; 10 und 20 ng/ml getestet. Der Proliferationsversuch wurde nach 48 bis 96 h gestoppt, abgelöste EZ durch Waschen mit Phosphatsalz-Puffer entfernt und die BREc durch 30minütige Inkubation mit 200 µl Methanol-Aceton (1:1) fixiert. Nach Entfernen der

Fixierlösung folgte die Zellanfärbung mit 50 µl Kristallviolett-Lösung (0,5% Kristallviolett, 20 % Methanol, 79,5% H<sub>2</sub>O) für 30 bis 60 min bei Raumtemperatur (RT). Nicht Zell-gebundenes Kristallviolett wurde durch mehrmaliges Waschen mit Aqua dest. entfernt, die Platten getrocknet und 50 µl Kristall-Entfärbelösung (Essigsäure:Methanol:H<sub>2</sub>O = 1:3:6) hinzugegeben. Nach 5-10 min wurde die Absorption bei 590 nm gemessen.

Zur immunzytochemischen Charakterisierung wurden BREC auf gekammerte Glasplatten ausgesät. Nach zwei bis vier Tagen wurden die dann konfluenten Zellen zweimal mit 500 µl/Kammer PBS (Phosphat-Salz-Puffer)-Dulbecco's gewaschen, bevor sie 30 Minuten mit 500 µl eiskaltem Aceton-Methanol (1:1) fixiert wurden. Es folgte die Inkubation mit 0,01%-Thimerosal-haltigem PBS (200 µl/Kammer) bei 4°C über Nacht. Die Kammern wurden für 30 Minuten mit 2,5% Albumin-haltigen PBS-0,01% Tween 20 geblockt. Folgende erste Antikörper in 200 µl 0,25% Albumin-haltigen PBS-0,01% Tween 20 wurden anschließend zu verschiedenen Kammern gegeben: Anti-von Willebrand-Faktor Antikörper, Anti-CD31-Antikörper und Anti-Glattnuskelzell-Aktin-Antikörper. Die Inkubation wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht vorgenommen. Der zweite FITC-konjugierte Schwein Anti-Kaninchen-Antikörper wurde in einer 1:300 Verdünnung zu den Ansätzen sowie in eine Kammer ohne ersten Antikörper gegeben. Schließlich wurde bei den Anti-CD-31-Antikörpern nach einer halben Stunde 0,1µg/ml Propidium-Iodid in 1mg/ml RNase in die Kammern gegeben und für eine weitere halbe Stunde bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10- bis 40facher Vergrößerung. Es erfolgte die Einbeziehung von Experimentergebnissen von Uwe Schubert und Karin Hersemeyer, jeweils Biochemisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen.

### **2.1.2. Reinigung des Fibrinogens und Vorbereitung der Microsphären**

Bovines Fibrinogen wurde im Verhältnis 1:100 zu sterilem PBS gegeben. Das Fibrinogen-PBS-Gemisch wurde mit dem Proteasen-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid in einer Endkonzentration von 1mM versetzt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C gerührt, um einen möglichst großen Teil des Fibrinogens in Lösung zu bringen. Anschließend erfolgte für 10 Minuten die

Zentrifugation bei 18000 g. Der erhaltene Überstand wurde mit 30% (Gew./Vol.) Ammoniumsulfat für 1 h bei 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch nochmalige Zentrifugation bei 18000 g (40 min; 4°C) gewonnen, in PBS gelöst und dreimal 24h gegen 10 l PBS des pH-Wertes 7,4 dialysiert. Schließlich wurde das Fibrinogen sterilfiltriert und in kleinen Aliquots bei -80°C eingefroren. Die Proteinbestimmung (Protein BCA Assay) ergab eine Konzentration von 2,7 mg/ml Fibrinogen. Zur Herstellung eines Vorrats wurden 5mg der Microsphären (MS) in 500 ml PBS aufgenommen und 3 h bei RT aufgeschwemmt. Die Lösung wurde dann mit 0,02% Natrium-azid versetzt und anschließend 20 Minuten bei 110 bar autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

### **2.1.3. Kultur der BREC auf den Microsphären**

Der Vorratsflasche wurden 0,5 ml der sedimentierten MS entnommen, in ein 15 ml Zellkulturgefäß gegeben, dreimal mit EZ-Medium gewaschen und dann in 1 ml EZ-Medium aufgeschwemmt. Die MS wurden auf den Boden einer senkrecht stehenden Flasche für Suspensionszellen überführt. Die Hälfte einer in 5ml resuspendierten BREC einer Zellkulturplatte wurde zu den MS in die immer noch vertikale Flasche gegeben. Zur Verteilung der BREC auf die MS wurde die Flasche vorsichtig um eine horizontal zur Flaschentiefe stehenden Achse geschwenkt. Diese Verteilungsprozedur wurde halbstündlich für eine Gesamtdauer von 4 h wiederholt, wobei die Flasche die gesamte Zeit senkrecht bei 37°C inkubiert wurde. Weitere 3 ml Medium wurden vorsichtig in die Flasche gegeben, welche danach in die Horizontale gekippt wurde. Nach 24-96 h wuchsen die BREC auf den MS zur Konfluenz.

### **2.1.4. Inkorporation zelltragender Microsphären in die Fibrinmatrix**

Das aufgereinigte Fibrinogen wurde mit PBS-Dulbecco's auf eine Endkonzentration von 1,6 mg/ml Fibrinogen eingestellt und mit 200 U/ml Aprotinin versetzt. Eine 12-Loch-Zellkulturplatte wurde mit jeweils 600 µl der Fibrinogenlösung beschickt. Die zellbewachsenen MS wurden in ein 15 ml Falcon überführt und dreimal mit vorgewärmtem PBS-Dulbecco's gewaschen. Je 40µl der dann in 2,5 ml PBS-Dulbecco's aufgeschwemmt MS wurde in die einzelnen

Matrices gegeben. Abschließend wurde die flüssige, MS-haltige Fibrinogenlösung durch Zugabe von 0,65 U/ml Thrombin innerhalb von 20 bis 40 Minuten bei RT zu einer Fibrinmatrix polymerisiert.

### **2.1.5. Zellstimulation**

Die Stimulation erfolgte jeweils in Duplikaten bzw. Triplikaten. Nach Solidwerden des Fibrins wurden die einzelnen Matrices mit 1 ml RT-warmem, 5%-FBS-haltigen MCDB 131-Medium überschichtet. Es folgte die sog. ‚Equilibrierung‘ für 1 h im Inkubator, um die Matrix mit Kulturmedium zu durchsetzen. Nach erfolgtem Mediumwechsel wurden die Testsubstanzen dem Medium zugesetzt. Im ersten Experiment wurde ein Gemisch aus 100 ng/ml VEGF, 50 ng/ml bFGF und 2 ng/ml TNF- $\alpha$  zugegeben. In Folgeexperimenten wurden die Substanzen getrennt voneinander appliziert. Parallel wurden alle Kombinationen getestet (bFGF + VEGF + TNF- $\alpha$ ; bFGF + VEGF; bFGF + TNF- $\alpha$  und VEGF + TNF- $\alpha$ ). Die Erstellung einer Dosis-Wirkung-Kurve für bFGF erfolgte mit Dosen von 0,01 bis 20 ng/ml. VEGF wurde in Dosen von 0,005 bis 30 ng/ml getestet.

Es wurden Versuche zur Fixierung der Matrices nach Versuchsende unternommen. Dazu wurden nach Entfernung des Testmediums die Matrices mit je 200  $\mu$ l 3%-Paraformaldehyd überschichtet und 4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Matrices mit 200  $\mu$ l Kristallviolett-Lösung überschichtet und die Platten 30 Minuten bei RT gefärbt. Das oberflächlich verbliebene Kristallviolett wurde entfernt und die Matrices im Wasserbad für ca. 6-18 Stunden entfärbt, bis nur noch die Zellen Färbung zeigten.

### **2.1.6. Auswertung und Statistik**

Je nach gewählter Stimulation und Ansprechen der BREC erfolgte die mikroskopische Auswertung nach 16-72 h. Zunächst wurden die Ansätze qualitativ und hinsichtlich der Homogenität der Antwort evaluiert. Bereiche oder ganze Matrices, in denen die Polymerisation des Fibrins inhomogen schien, blieben bei der Auswertung unberücksichtigt. Die quantitative Evaluation erfasste 50-100 MS pro Einzelmatrix. Um die mehrfache Berücksichtigung einzelner MS

zu vermeiden, wurden Mikroskopausschnitte im Uhrzeigersinn durchfahren, dabei gaben die Ränder der Kulturplatte die Orientierung. Als Sp wurden nur die gewertet, deren Gesamtlänge mindestens 150 $\mu$ m (durchschnittlicher MS-Durchmesser) betrug.

Als zusätzliche interne Kontrolle erfolgte bei der Quantifizierung nicht nur das Zählen der Gesamtmenge an Sp. Gleichzeitig wurde die Homogenität der eingetretenen Antwort untersucht, indem die Anzahl der insgesamt positiven (Sp-tragenden) MS festgehalten wurde. Dadurch sollte verhindert werden, dass einzelne MS mit weit überdurchschnittlicher Angiogenese-Aktivität das Resultat bei ansonsten mäßiger Antwort verfälschen. Die qualitative Nachbeobachtung der Experimente wurde teilweise über einen längeren Zeitraum (7 bis 10 d) vorgenommen, um die Überlebensdauer der ausgebildeten und die Spätstadien der erzielten Angiogenese festzuhalten. Die Validität der Versuchsergebnisse wurde durch Wiederholungsexperimente überprüft. Die experimentellen Daten entsprechen dem statistischen Mittel der Mehrfachversuche (n ist die Anzahl der in die Daten eingegangenen Werte) oder sind als repräsentatives Experiment dargestellt. Die Signifikanzprüfung für die Experimentergebnisse erfolgte durch den t-Test für verbundene Stichproben. Die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert ist als Standardabweichung bzw. als durchschnittliche Abweichung angegeben.

## **2.2. Optimierung des Versuchsaufbaus**

### **2.2.1 Einfluss der Serum-Konzentration**

Die Durchführbarkeit des SpAs bei Verwendung verschiedener Konzentrationen fötalen Rinderserums (FBS) im Testmedium wurde untersucht. Die Maximalkonzentration war 10 %, andererseits wurde auch in völliger Abwesenheit von FBS getestet. Die Stimulation erfolgte mit 5 ng/ml bFGF. Die Auswertung wurde zum ersten Mal nach 24 h vorgenommen und nach insgesamt 48 h wiederholt.

### **2.2.2. Applikation der Testsubstanzen: Medium und Matrix?**

In der Erstbeschreibung des SpA wurden die Testsubstanzen anteilig sowohl in die Fibrinogenlösung vor deren Polymerisation als auch ins Testmedium gegeben. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob im Versuchsaufbau mit BREC die alleinige Zugabe ins Endmedium suffizient ist. Daher wurde die Dosis von 5 ng/ml bFGF einerseits fraktioniert der Matrix und nach „Equilibrierung“ die restliche Menge dem Testmedium zugesetzt, andererseits wurde parallel dazu einmalig die gleiche Gesamtmenge dem Endmedium zugesetzt. Identisch wurde dieses Vorgehen für VEGF (5ng/ml) gewählt. Die Stimulation erfolgte bei 5% FBS-haltigem Testmedium.

### **2.2.3. Einfluss von Fibrinogen, Aprotinin, Thrombin**

Die zur Matrixherstellung dienenden Teilkomponenten (Fibrinogen, Thrombin, Aprotinin) wurden auf ihre Angiogenese-regulierenden Eigenschaften und damit auf ihre Potenz getestet, Versuchsergebnisse zu beeinflussen. Die Fibrinogenzugabe wurde so variiert, dass es in Endkonzentrationen von 1,7; 2,5; 3,5 und 4,5mg/ml vorlag. Niedrigere Konzentrationen wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen, da sie mit sich nicht verfestigender Matrix einhergingen. Die Stimulation erfolgte bei diesem Ansatz mit 5ng/ml bFGF bei 0,5% FBS im Testmedium. Um die Notwendigkeit einer Aprotinin-Zugabe zu testen, wurden Aprotinin-freie Matrices hergestellt. Parallel wurden verschiedene Aprotinin-Dosen (300, 500 U/ml) durch Vermischen mit der Fibrinogenlösung vor Thrombingabe getestet. Zusätzlich wurden bei aprotininfreier Matrix dem Testmedium Dosen von 300 bis 500 U/ml Aprotinin zugegeben. Die Experimente wurden mit 5% FBS-haltigem Medium bei Stimulation durch 5 ng/ml bFGF durchgeführt.

Thrombin wurde als unerlässlicher Systembestandteil in der Konzentration von 10 nM eingesetzt, um die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen zu veranlassen. Die Dosen 10, 40 und 80 nM wurden als Zugabe zur Fibrinogenlösung getestet. Um die Thrombin-Wirkung auf die Matrixausformung zu beschränken, wurde nach 30 min Hirudin dem „Equilibrierungsmedium“ zugesetzt. Um die Thrombinwirkung verlässlich zu beenden, wurde die dreifach höhere Hirudin-

Dosis als rechnerisch notwendig benutzt (entsprechend 30, 120 und 240 nM Hirudin). Auch dem Testmedium wurden diese Konzentrationen an Hirudin zugesetzt. Parallel wurde 10, 40 und 80 nM Thrombin bei Zugabe ins Testmedium untersucht. Die (mit 10 nM Thrombin generierten) Fibrinkissen wurden vorher einer zweimaligen ‚Equilibrierung‘ für 1 h zugeführt. Die erste diente dabei der Inhibition der Thrombinwirkung durch die entsprechende Menge Hirudin im Medium. Die zweite bezweckte die Entfernung von Hirudin-Restaktivität. Alle Untersuchungen fanden im serum-armen Milieu (0,5% FBS) bei Stimulation durch 5 ng/ml bFGF sowie bei unstimulierten Zellen statt. Es erfolgte eine Auswertung nach 24 bzw. 48 h.

#### **2.2.4. Einfluss von pH und Zink**

Da Testsubstanzen teilweise in Puffern mit unphysiologischem pH gelöst sind, wurde der Einfluss von pH-Änderungen auf die Sp-Ausformung untersucht. Unterschiedlich große Volumina von 1 N Natriumhydroxid (NaOH) bzw. 1 N Salzsäure (HCl) wurden der Fibrinogenmatrix beigemischt bzw. alternativ nach erfolgter Equilibrierung der Matrix ins Testmedium gegeben. Beim Einbringen der Säure (bzw. Base) in das Fibrin wurden Volumina von 0,5; 2 und 5 µl getestet. Aufgrund der höheren Gesamtvolumina wurde bei Zugabe ins Medium mit 0,5; 2 und 10 µl Säure bzw. Base experimentiert. Die Sp-Bildung wurde mit bFGF (5ng/ml) in 5 % FBS induziert. In einem zusätzlichen Experiment wurde der Einfluss von verändertem pH des Mediums in Abhängigkeit unterschiedlicher FBS-Konzentrationen im Medium untersucht. Eingesetzt wurden 10 µl NaOH bzw. HCl in 0,5%; 5% und 20% FBS-Medium. Die eingesetzten Volumina wurden auf ihre pH-verändernde Wirkung in Fibrinogen, im Medium direkt nach Zugabe sowie nach Beendigung des Versuchs gemessen.

Das Spurenelement Zink ( $Zn^{2+}$ ) gilt in höheren Dosen als für EZ toxisch, in einigen Puffern ist es jedoch enthalten.  $Zn^{2+}$  wurde in Dosierungen von 5, 15, 30, 50, und 100 µM getestet, indem es zu mit 5 ng/ml bFGF stimulierten BREC in 5% FBS-haltigem Medium gegeben wurde.

### **2.2.5. Funktionstest mit ECGF/H im ‚Sprouting‘ Assay**

Endothel Cell Growth Factor/Heparin (ECGF/H) wurde in einem Dosis-Wirkungsexperiment (Konzentrationen 1,5 – 30 µg/ml) auf seine angiogene Potenz in 0,5% FBS-haltigem Medium getestet. Um die Wirkungsstärke von ECGF/H mit bFGF und VEGF vergleichen zu können, wurden diese Substanzen in einem weiteren Experiment parallel appliziert. Dabei lagen die verwendeten Konzentrationen im Sättigungsbereich der jeweiligen Dosiswirkungskurve (bFGF: 5 ng/ml; VEGF: 5 ng/ml; ECGF/H: 30 bzw. 60 µg/ml).

### **2.2.6. Einfluss der Matrixzusätze und von ECGF/H auf BREC-Proliferation**

Die zur Matrixherstellung dienenden Substanzen (Fibrinogen, Aprotinin, Thrombin) und Endothelial Cell Growth Factor/Heparin (ECGF/H) wurden im Kristallviolettassay auf ihren Einfluss auf die Proliferation von BREC untersucht, dabei waren die Versuchsbedingungen im wesentlichen wie unter 2.1.1. angegeben. Die Aussaatdichte betrug 12000-20000 BREC/Ansatz, das Versuchsmedium enthielt 0,1% FBS. Die Substanzen wurden in den maximalen bzw. annähernd maximalen SpA-Konzentrationen (Aprotinin 400 U/ml, Thrombin 80 nM) getestet. Bei Fibrinogen wurde als Dosis 220 µg/ml gewählt, da höhere Konzentrationen die Applikation zu großer Volumina erfordert hätte. Untersucht wurde die Wirkung der Substanzen auf unstimulierte und auf mit 10 ng/ml bFGF behandelte BREC. Für ECGF/H wurde der dosisabhängige Effekt (3-150 µg/ml) auf die BREC-Proliferation untersucht, zum Vergleich wurde mit 20 ng/ml bFGF stimuliert.

## **2.3. Herstellung und Vergleich von Angiostatin-Formen**

### **2.3.1. Tests zur Angiostatin-Produktion durch uPA/SHD**

Zur Durchführung der Plasminogenpräparation wurde gepooltes Spenderplasma durch eine Lysin-Sepharose aufbereitet, das Eluat nachfolgend über eine S 300 Säule filtriert und abschließend dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde ermittelt und das Wanderungsverhalten in der SDS-

Elektrophorese überprüft. Ein kleiner Teil des so gewonnenen Plasminogen (Plg) wurden mit Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und Sulfhydryl-Gruppen-Donator (SHD) behandelt. Zur Überprüfung der in der Literatur vorbeschriebenen Herstellungsbedingungen wurden diese wie folgt variiert. Zum Vergleich unterschiedlicher SHD wurden mit 5,5  $\mu\text{M}$  Plg und 10 nM uPA je 100  $\mu\text{M}$  N-Acetyl-Cystein (NAC) bzw. reduziertes Glutathion (GSH) eingesetzt. Als Kontrollansatz wurde Plg allein bzw. mit NAC bzw. GSH inkubiert. Anschließend wurde zur Ermittlung der optimalen NAC-Dosis mit 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 1 mM und 10 mM NAC bei Zugabe von 10 nM uPA getestet.

Die Wirksamkeit verschiedener Urokinase-Formen wurde durch Inkubation von 10 nM uPA-Formen (d1-uPA, d2-uPA und sc-uPA) mit 5,5  $\mu\text{M}$  Plg in An- bzw. Abwesenheit von NAC getestet. Bei den ersten beiden uPA-Formen handelt es sich um zweikettige, aus menschlichem Urin gewonnene uPA-Varianten unterschiedlicher Hersteller (doppelkettiges uPA 1 und 2), die dritte Variante ist einkettiges, in *E. coli* rekombinant hergestelltes uPA (sc-uPA). In einem weiteren Experiment wurden verschiedene uPA-Dosen (0,1-100 nM) getestet. Für alle vorstehend beschriebenen Inkubationen zur AS-Produktion gilt, dass sie in Pufferlösung (50 mM Tris, 20 mM NaCl, pH 9,0) in verschlossenen Eppendorf-Röhrchen bei 37° C für die Dauer von 18 - 21 h stattfanden. Die Analyse auf AS-Produktion erfolgte nach SDS-Gel-Elektrophorese in allen Fällen parallel durch ‚Western-Blot‘ und ‚Coomassie‘-Färbung in nicht-reduzierendem Probenpuffer. Bei der ‚Coomassie‘-Färbung wurden die Gele mit ‚Coomassie‘-Farbstoff über Nacht angefärbt, mit Methanol-Eisessig-H<sub>2</sub>O (Verhältnis 4 zu 1 zu 5) entfärbt und fotografiert.

Beim ‚Western Blot‘ wurden die Proben auf eine Polyvinyliden-Fluorid-Transfer-Membran überführt, diese mit 5%-Milchpulverlösung geblockt und mit biotyniliertem Kaninchen-Anti-Human-Plasminogen-Antikörper (1:1000 in 5% Milchpulverlösung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie fünf mal jeweils 5 Minuten mit 0,01% Tween 20 - TBS gewaschen, bevor Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin in einer 1:2000 Verdünnung in TBS (0,1 % Tween) für 1 h bei RT dazu gegeben wurde. Nach erneutem fünfmaligen Waschen wurden die Membranen mit ‚Western Blot‘ Detektionsreagenz („ECL-Reagenz“) behandelt und die Filme schließlich in üblicher Weise entwickelt.

### 2.3.2. Produktion des uPA/SHD-Angiostatins

Nachdem die experimentellen Bedingungen für die uPA/SHD-AS-Herstellung überprüft waren, sollten größere AS-Mengen produziert werden. Dazu wurden 5,5  $\mu$ M Plg, 10 nM sc-uPA und 100  $\mu$ M NAC für 24 h bei 37° C in einem Gesamtvolumen von 60 ml Pufferlösung inkubiert. In der SDS-Gel-Elektrophorese wurde die AS-Herstellung überprüft; als Kontrolle dienten Plg als Ausgangssubstanz sowie das in Vorversuchen hergestellte AS (siehe 2.3.1.). In der nachfolgenden Affinitätschromatographie mit Lysin-Sepharose wurde die Inkubationslösung gemeinsam mit Bindungspuffer (20 mM Tris, 0,6 M NaCl, pH 7,4) und der Lysin-Sepharose für 2 h in eine Plastikflasche gegeben, um bei RT die AS-Bindung an das Sepharose-Material zu erreichen. Die Sepharose wurde bei 4°C in eine Glassäule überführt und das Auswaschen nicht-bindender Proteine mit Bindungspuffer für 15 h durchgeführt. Die Elution wurde mit Elutionspuffer (20 mM Tris, 2,0 M Na Cl, 0,2 M Epsilon-Aminocaprinsäure) durchgeführt. Proben verschiedener Fraktionen wurden zur Analyse in der SDS-Gel-Elektrophorese entnommen. AS-enthaltende Fraktionen wurden ‚gepoolt‘. Durch Volumenkonzentration wurde die AS-Konzentration erhöht. Abschließend wurde das gewonnene AS 60 h bei mehrmaligem Pufferwechsel gegen PBS (pH 7,4) dialysiert, sterilfiltriert und die Proteinkonzentration durch BCA-Assay (Pierce) bestimmt.

### 2.3.3. Vergleich von Angiostatin-Varianten

Durch Plg-Proteolyse mit Elastase gewonnenes AS (El.-AS) und uPA/SHD-AS) wurden wie unter 2.3.1 beschrieben durch Gelelektrophorese und anschließendem ‚Western Blot‘ verglichen. Es erfolgte die Elektrophorese einerseits mit reduzierendem Probenpuffer, andererseits unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Zusätzlich wurden die AS-Varianten durch Proteinsequenzierung analysiert (Dr. Linder, Biochemisches Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen). Dazu wurden El.-AS und uPA-SHD-AS unter reduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend durch ‚Western Blot‘ auf eine PVDF-Membran überführt. Die Membran wurde 2 min mit ‚Coomassie‘-Farbstoff behandelt, entfärbt, 24 h in Aqua bidest. gewaschen, ausgewählte

Banden wurden ausgeschnitten. Die Sequenzierung wurde auf 9 Aminosäuren des N-Terminus beschränkt. Zusätzlich wurden das N-terminale Ende des nach Elastase-bedingter AS-Abspaltung verbliebene Plg-Restes und die elektrophoretisch vergleichbaren Banden des uPA/SHD-behandelten Plg teilsequenziert.

## **2.4. Potentielle Angiogenese-Inhibitoren im ‚Sprouting‘ Assay**

### **2.4.1. cRGD und TGF- $\beta$ 1 im ‚Sprouting‘-Assay**

Die inhibitorische Potenz des Integrin-Antagonisten cRGD und von TGF- $\beta$ 1 auf die Sp-Bildung wurde untersucht. Die Dosen betragen für TGF- $\beta$ 1 10 ng/ml, für cRGD 10  $\mu$ g/ml und entsprechen damit den in der Literatur als effektiv beschriebenen Konzentrationen. Da cRGD in einem HCl-haltigen Puffer gelöst werden muss, wurde jede cRGD-Probe vor Zugabe ins Testmedium mit 1 N NaOH in den pH-Bereich 7-8 gebracht. Die pH-Wert Adaptation wurde durch pH-Teststreifen kontrolliert. Weil geringfügige pH-Wertverschiebungen jedoch nicht ausgeschlossen werden konnten, wurden in einem Experiment identische Volumina des Lösungspuffer als separate Probe pH-Wert-neutralisiert und zusätzlich getestet. Auch TGF- $\beta$ 1 wurde in einem unphysiologischen Acetonnitrit-Trifluoressigsäure-Puffer gelöst, so dass auch dieser Puffer hinsichtlich eines Effektes im entsprechenden Applikationsvolumen getestet wurde.

In Dosis-Wirkungs-Experimenten wurde cRGD in Dosen von 0,5 bis 10  $\mu$ g, TGF- $\beta$ 1 in Dosen von 0,01 bis 40 ng/ml getestet. Als Kontrolle zum Nachweis der Spezifität der cRGD-Wirkung wurden lineares RGD und lineares RGE (ein Tripeptid, das sich in einer Aminosäure von RGD unterscheidet) parallel mit cRGD in der Dosis von 10  $\mu$ g/ml auf ihre Wirksamkeit getestet. Da lineares RGD und RGE wasserlöslich sind, entfiel die Notwendigkeit einer pH-Wert-Adaptation. Auf inhibitorische Wirkung von cRGD und TGF- $\beta$ 1 wurde sowohl in 0,5% FBS- wie auch 5% FBS-haltigen Ansätzen untersucht, ebenso wurden die Inhibitoren bei Stimulation mit VEGF (5 ng/ml), bFGF (5 ng/ml) und ECGF/H (5  $\mu$ g/ml) appliziert. Für ECGF/H wurde bei 0,5% FBS eine Dosis-Wirkungskurve (1,5 bis 30  $\mu$ g/ml) in Anwesenheit von 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 erstellt.

#### 2.4.2. Funktionstests mit Angiostatin und Endostatin im ‚Sprouting‘ Assay

Die zwei hergestellten Angiostatin-Formen wurden im SpA in einer Konzentration von 20 µg/ml getestet, die Stimulation erfolgte mit 3-5 ng/ml VEGF in 0,5%-5% FBS-haltigem Testmedium. Parallel wurde ein aus wenigen Aminosäuren bestehendes, rekombinant hergestelltes Peptid (PRKLYDY-amid) getestet, das als möglicher antiangiogener Wirkbestandteil des Kringle 5 im Plasminogenrest gilt. Das Fragment wurde freundlicherweise von Dr. Ludger Ständker (Niedersächsisches Institut für Peptidforschung, Hannover) zur Verfügung gestellt. Das im folgenden als Kringle 5-Fragment bezeichnete Oligopeptid wurde in einer Konzentration von 300 pg/ml verwendet. Als Kontrollinhibitoren wurde cRGD (10 µg/ml) eingesetzt.

Um die Ergebnisse der vorstehend beschriebenen Versuche zu kontrollieren, wurden die Assaybedingungen variiert. So wurden statt VEGF auch bFGF (5 ng/ml) und ECGF/H (5 µg/ml) als aF eingesetzt. Die Versuche wurden sowohl in 0,5% FBS- als auch 5% FBS-haltigem Testmedium durchgeführt. Bei weiteren Tests wurde bFGF mit 1 ng/ml in 0,5% FBS eingesetzt, um eine minimale Stimulation zu erreichen. In allen genannten Experimenten diente cRGD (mit Ausnahme der ECGF/H-Stimulation) als Kontrollinhibitor. Die AS-Varianten wurden im Anschluss in Dosis-Wirkungsexperimenten in Konzentrationen von 0,01 bis 100 µg/ml eingesetzt. Als aF wurden 5 ng/ml bFGF in 0,5% bzw. 5% FBS verwendet. Als Kontrollinhibitor diente cRGD.

Escherichia coli exprimiertes ES wurde in zwei verschiedenen kurzen Formen und einer langen Form von Dr. Ludger Ständker (Niedersächsisches Institut für Peptidforschung) hergestellt. Die kurzen ES-Formen wiesen ein Molekulargewicht von 19,896 kDa auf, enthielten am C-Terminus kein K und begannen mit der Sequenz ‚His-tag-VALNS‘ und unterschieden sich nur in der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography; HPLC). Die lange ES-Variante hatte laut HPLC ein Molekulargewicht von 21,940 kDa, war am C-Terminus mit einem K versehen und begann mit der Anfangssequenz ‚His-tag-HSHRDFQPVL‘. Die drei verschiedenen ES-Formen wurden in der Dosis von 1,2 µg/ml im SpA getestet. Dies entspricht etwa dem Dreifachen der in der Literatur beschriebenen effektiven Konzentration. Die Stimulation erfolgte mit 3-5 ng/ml VEGF in 0,5%-5% FBS, als

Kontrollinhibitoren wurde cRGD eingesetzt. Es wurden zur Bestätigung der erhaltenen Resultate identische Zusatzexperimente wie bei der AS-Untersuchung (s.o.) unternommen: VEGF, bFGF und ECGF als Angiogenese-Induktoren und die FBS-Konzentrationen wurden variiert, die Inkorporation der ES-Formen in die Matrix getestet. Es wurden Dosis-Wirkungs-Tests (0,04 bis 1,2 µg/ml) für die lange ES-Variante und eine der kurze Formen vorgenommen.

#### **2.4.3. Einsatz der Angiogenese-Inhibitoren bei BREC-Proliferation**

Die Proliferationsversuche wurden wie unter 2.1.1. beschrieben als Kristallviolettassay durchgeführt. Es wurden jeweils  $15-20 \cdot 10^4$  Zellen pro Ansatz ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium zu 0,1% FBS-haltigem MCDB 131-Medium gewechselt. Die drei ES-Formen wurden bei 1,2 µg/ml getestet, El.-AS bei 100 µg/ml und uPA/SHD-AS bei 20 µg/ml. Kringle 5 - Fragment wurde in der Dosis von 150 ng/ml untersucht. Die Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml bFGF. Alle Substanzen wurden sowohl bei unstimulierten wie auch bei stimulierten BREC untersucht. Als Kontrollinhibitoren dienten cRGD (10 µg/ml) und TGF-β1(10 ng/ml). Nach 2 Tagen wurden die Versuche gestoppt und ausgewertet. Es wurden Dosis-Experimente unternommen. El.-AS und uPA/SHD-AS wurden im Bereich von 1 bis 20 µg/ml, die ES-Varianten wurden in Konzentrationen von 40 ng/ml bis 2 µg/ml eingesetzt.

#### **2.4.4. Einsatz der Angiostatine und Endostatine bei HUVEC-Proliferation**

Die Ergebnisse der Proliferationsexperimente mit AS und ES bei BREC wurden durch zusätzliche Experimente mit anderen EZ kontrolliert. EZ wurden aus humanen Nabelschnurvenen (Human Umbilical Venous Endothelial Cells, HUVEC) gewonnen. HUVEC wurden in 2,5% FBS-haltigem Endothelzellmedium kultiviert und konnten schon nach einmaliger Passage in Proliferationsexperimenten eingesetzt werden. Die Durchführung des mit HUVEC durchgeführten Kristallviolettassays war, abgesehen von den nachgenannten Besonderheiten, wie schon für Proliferationsversuche mit BREC. Die ausgesäte Zellzahl lag bei  $10-15 \cdot 10^4$  HUVEC. Die HUVEC wurden anschließend 12 h im regulären Kulturmedium belassen, bevor sie für 18 – 24 h

mit 0,1% FBS-haltigem MCDB 131 behandelt wurden. Danach erfolgte die Stimulation mit 10 ng/ml bFGF. Die Angiostatine wurde in einer Konzentration von 20 µg/ml, Kringle 5 Fragment mit 150 ng/ml und die Endostatin-Formen mit jeweils 1,2 µg/ml eingesetzt. Die Auswertung erfolgte nach 48 h.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Durchführung des 'Microsphären-,Sprouting' Assays mit BREC

##### 3.1.1. Mikroskopische Charakteristika der BREC

Mikroskopisch zeigten sich die BREC 24 h nach Aussaat als längliche, spindelförmige Zellen, die in inselartigen Grüppchen wuchsen (Abb. 4). Nach 3 bis 5 Tagen fügten sie sich zu einer konfluenten EZ-Schicht zusammen, die an ein Kopfsteinpflaster erinnert (Abb. 5). Nach zwei bis drei Passagen im 'Endothelial Cell Growth Medium' (ECGM) waren die Kulturen mikroskopisch weitgehend frei von Nicht-Endothelzellen und blieben dies größtenteils bis zur 20. Passage. Das Wachstumsverhalten der EZ blieb bei konstantem Teilungsverhältnis (1:3 bis 1:4) gleich.

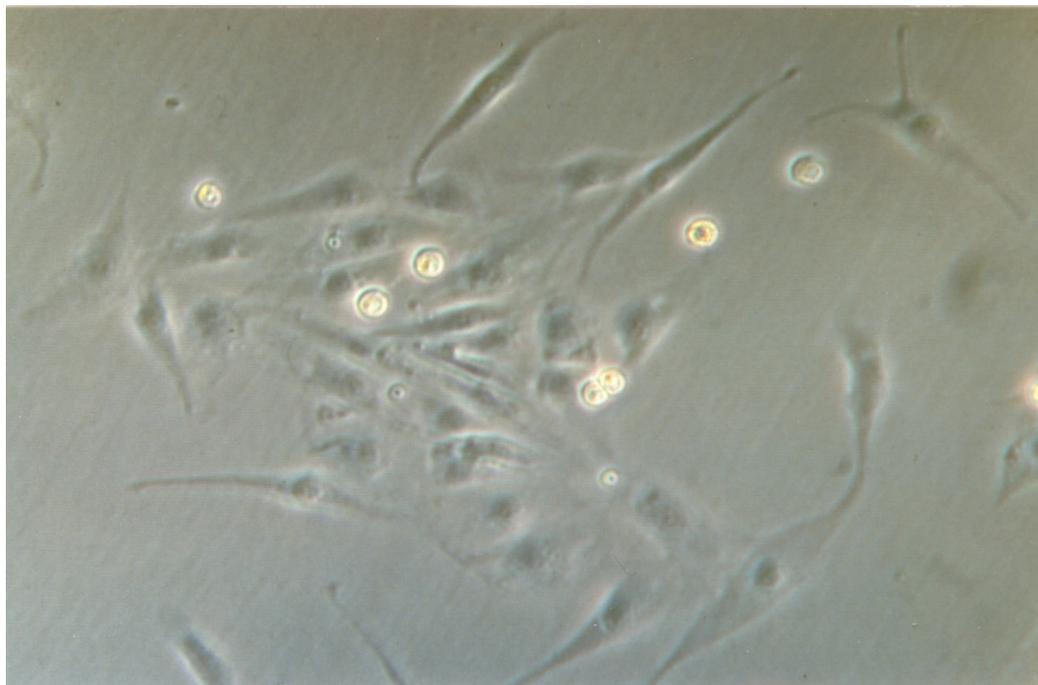


Abb. 4: Bovine retinale Endothelzellen (BRECs) lassen 24 h nach Aussaat zunächst grüppchenförmiges Wachstum erkennen, welches für mikrovaskuläre EZ typisch ist. Die BRECs zeigen überwiegend spindelförmige, längliche Morphologie. Aufnahme bei 20-facher Vergrößerung.

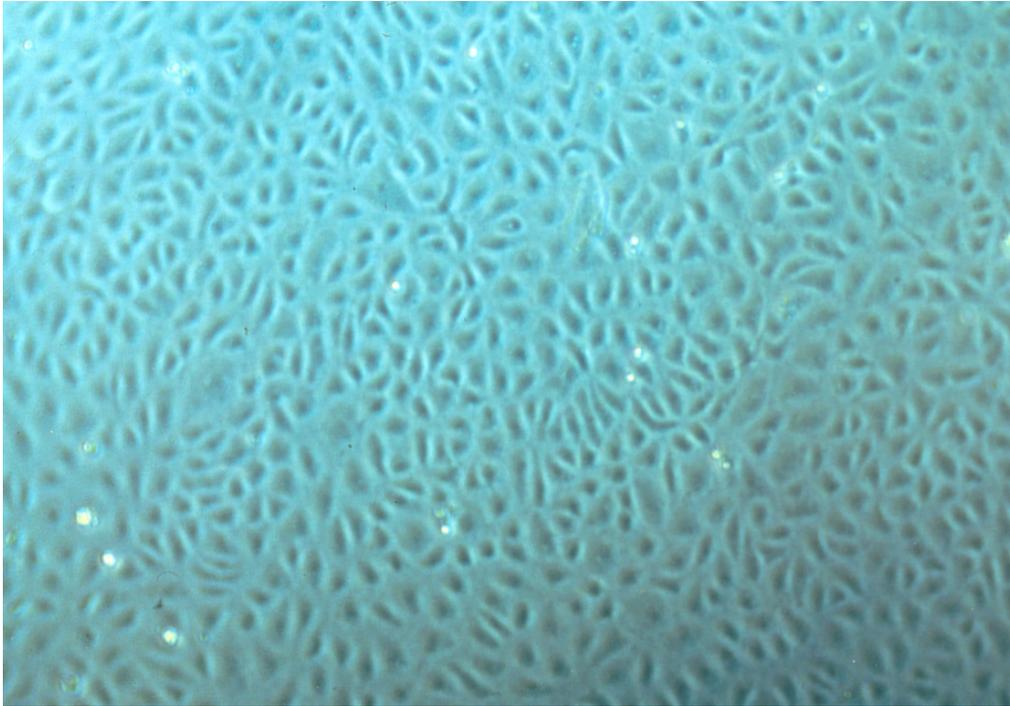


Abb. 8: Zur Konfluenz gewachsene BREC erinnern mikroskopisch an ein Kopfsteinpflaster, dies ist ein Charakteristikum von EZ. Aufnahme bei 10-facher Vergrößerung.

### 3.1.2. Angioregulatoren-Wirkung auf BREC-Proliferation

Mit Angiogenese-wirksamen Faktoren (VEGF, bFGF, TGF- $\beta$ 1) wurden die BREC im Proliferationsassay als EZ charakterisiert. Der Ausgangswert der unbehandelten Kontrolle wurde als 100%-Bezug aufgefasst. In niedriger Dosis (1 ng/ml) ergab sich durch bFGF eine Proliferationsverstärkung auf 145%; bei Zugabe von 10 ng/ml bFGF wurde die Wachstumsrate annähernd verdreifacht (280%), Dosiserhöhung auf 50 ng/ml bFGF ergab keine weitere Verstärkung der Proliferation. VEGF verstärkte das BREC-Wachstum auf 123%, bei Zugabe von 200 ng/ml auf 151%. TGF- $\beta$ 1 schwächte ab 0,1 ng/ml die BREC-Proliferation auf 66%. 1, 10 und 20 ng/ml TGF- $\beta$ 1 verringerten die Zellwachstumsrate auf 46%, 25% und 36% (Abb. 6).

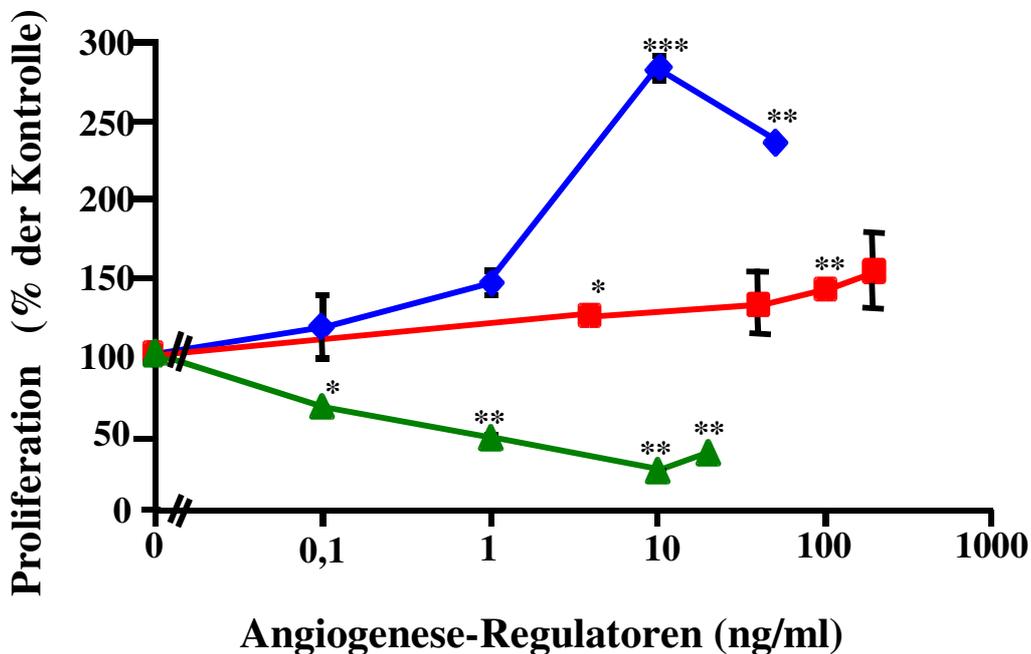


Abb. 6: Charakterisierung der BREC durch Angiogenese-Wirkstoffe (bFGF (◆), VEGF (■) und TGF-β1 (▲) im Proliferationsassay. Das Diagramm zeigt Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) eines repräsentativen Experiments (n = 3). Signifikanz ist mit \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01) und \*\*\* (p < 0,001) im Vergleich zum Referenzwert angegeben.

### 3.1.3. Immunzytochemische Charakterisierung der BREC

Immunzytochemisch wurden die BREC mit Antikörpern gegen von-Willebrand-Faktor (vWF) und gegen CD31 (PECAM; Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) charakterisiert. In Abb. 7 erkennt man eine Ak-Reaktion mit vWF. Abb. 8 stellt die Ergebnisse der CD31-Ak-Behandlung dar. Die parallel verwendete Behandlung mit Propium-Iodid (Pro-Io) hebt die Nuklei der BREC hervor. Dabei ist jeder durch Pro-Io detektierte Nukleus von CD31 umgeben. In einem weiteren Ansatz erfolgte die Behandlung mit Glattmuskelzell-Aktin-Ak. Dabei ergab sich immunzytochemisch keine Reaktion mit den kultivierten BREC (Ergebnisse nicht gezeigt).

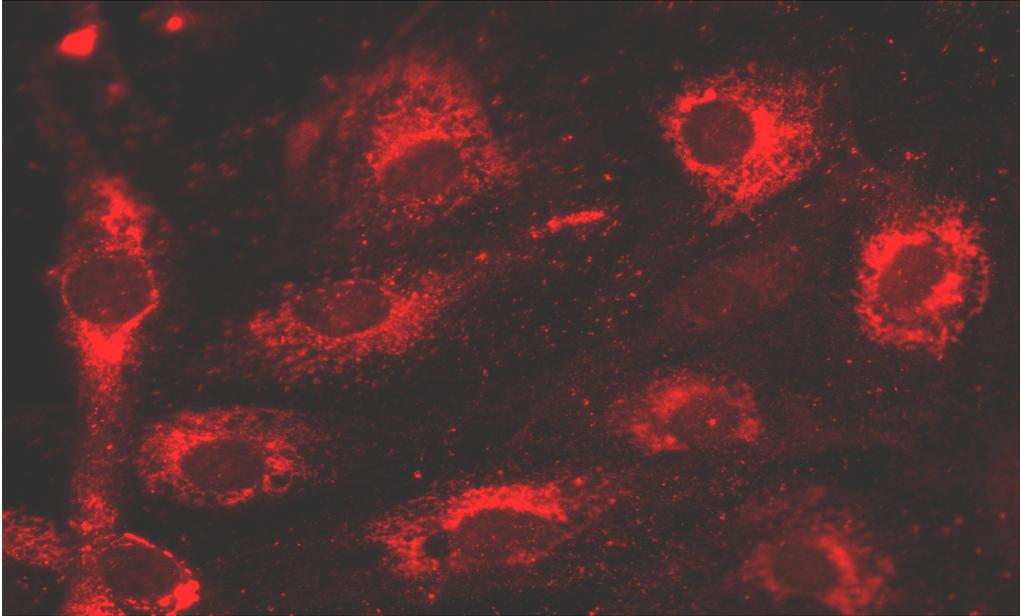


Abb. 7: Immunzytochemische Charakterisierung der BREC durch Anti-vWF-Ak. Es lassen sich VWF-positive Zellen mit sog. „Weibel-palade-bodies“ nachweisen.

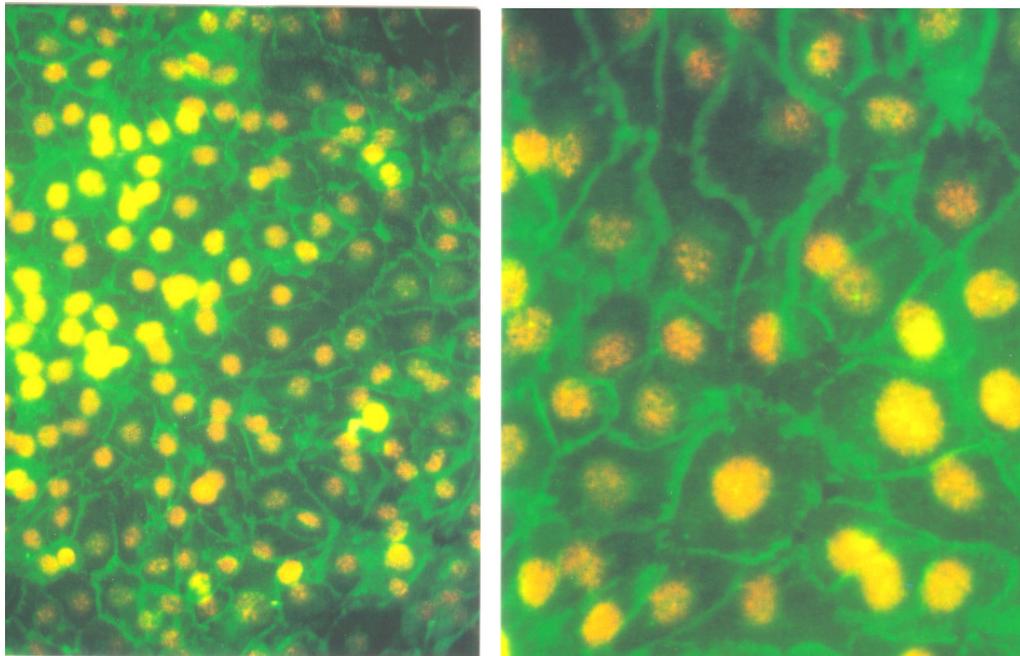


Abb. 8: Immunzytochemische Charakterisierung der BREC durch CD31-Ak. Bei 10-facher Vergrößerung (links oben) lässt sich erkennen, dass alle mit Propidium-Iodid angefärbten Zellkerne von CD31-positiven Zellen umgeben sind. Bei 20-facher Vergrößerung (oben rechts) lässt sich die Ak-Reaktion deutlicher ausmachen.

### 3.1.4. Angiogenese-Induktion

Die BREC traten nach vierstündiger Aussaatprozedur auf den MS nur in geringer Zahl flach-adhären in Erscheinung, die meisten Zellen zeigten trotz MS-Haftung noch gerundete Morphologie. Nach etwa 12 h präsentierten sich die BREC in gewohnter Gestalt. Nach weiterem ein- bis zweitägigem Wachstum wiesen die BREC eine gute MS-Haftung auf, dreimaliges Waschen in PBS und 45-minütige Inkubation bei Raumtemperatur verursachte keine mikroskopisch erkennbare Zellablösung (Abb. 9).

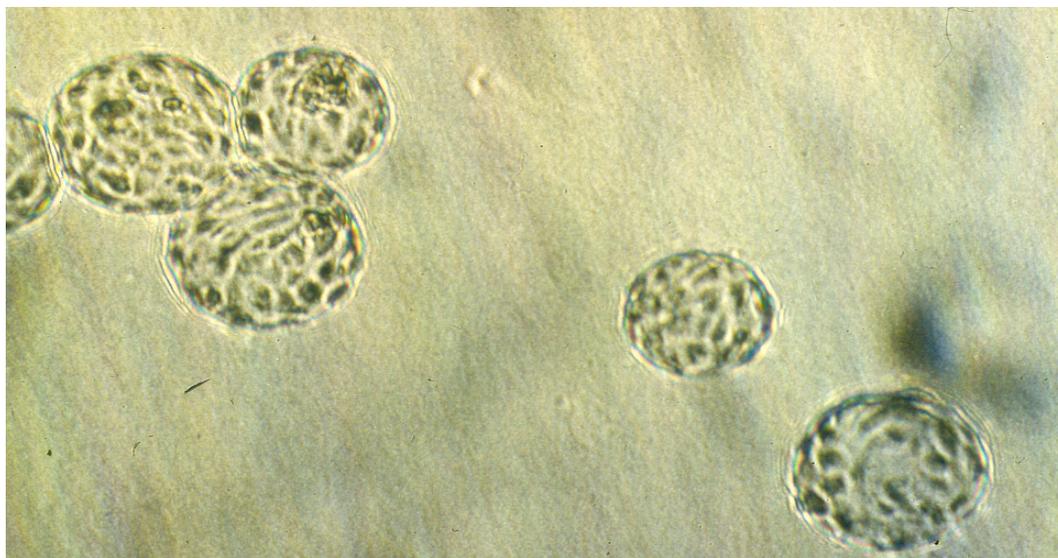


Abb. 9: Nach 45 min Inkubation von BREC-bewachsenen Microsphären in Phosphatsalzpuffer zeigt sich kein erkennbarer Zellverlust.

Durch ein Stimulationsgemisch, bestehend aus 100 ng/ml VEGF, 50 ng/ml bFGF und 2 ng/ml TNF- $\alpha$ , wurde bei den BREC im Angiogenese-Assay nach 24 h Inkubationsdauer die Ausbildung von ‚Sprouts‘ (Sp) induziert. Die Angiogenese-Antwort war homogen. In einem exemplarischen Versuch wurde in der unstimulierten Kontrolle 6 Sp gezählt, während der stimulierte Ansatz 148 Sp enthielt. Bezogen auf die Gesamtmenge der evaluierten MS ergab dies 0,74 Sp/MS bei stimulierten BREC gegenüber 0,03 Sp/MS bei den unbehandelten Zellen. Somit waren bei Stimulation mit der Faktorenmischung drei von vier ausgewerteten MS Sp-Träger. Die in dem Diagramm gezeigten Prozentwerte beziehen sich auf den stimulierten Ansatz, der als 100 % definiert wurde. Der relative Prozentwert des unstimulierten Ansatzes betrug 4% (Abb. 10).

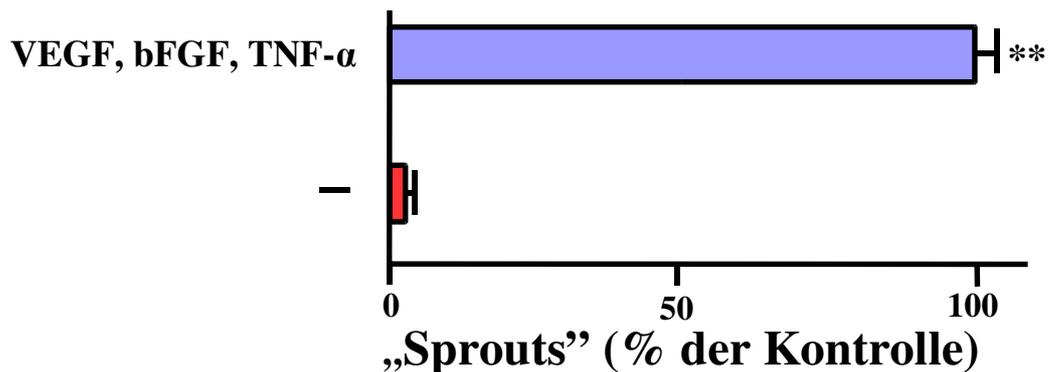


Abb. 10: Sp-Bildung bei BREC durch eine **Mixtur angiogener Faktoren (blau)** im Vergleich zu **unstimulierten BREC (rot)**. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment (n = 3), angegeben sind die Mittelwerte (+/- Standardabweichung). \*\* entspricht einer Signifikanz  $p < 0,01$ .

Mikroskopisch lassen sich nach 24 h bei den angiogen behandelten Zellen viele Sp ausmachen (Abb. 11). Demgegenüber ist keine Sp-Bildung unstimulierter BREC vorhanden (Abb. 12). Bei 20-facher Vergrößerung erkennt man durch die Anwesenheit von mehreren Nuklei (Pfeile in Abb.13), dass die Sp bei einer Länge von etwa  $150\ \mu\text{m}$  mehrzellig sind. In Abb. 14 ist ein Zellkern deutlich zu erkennen.

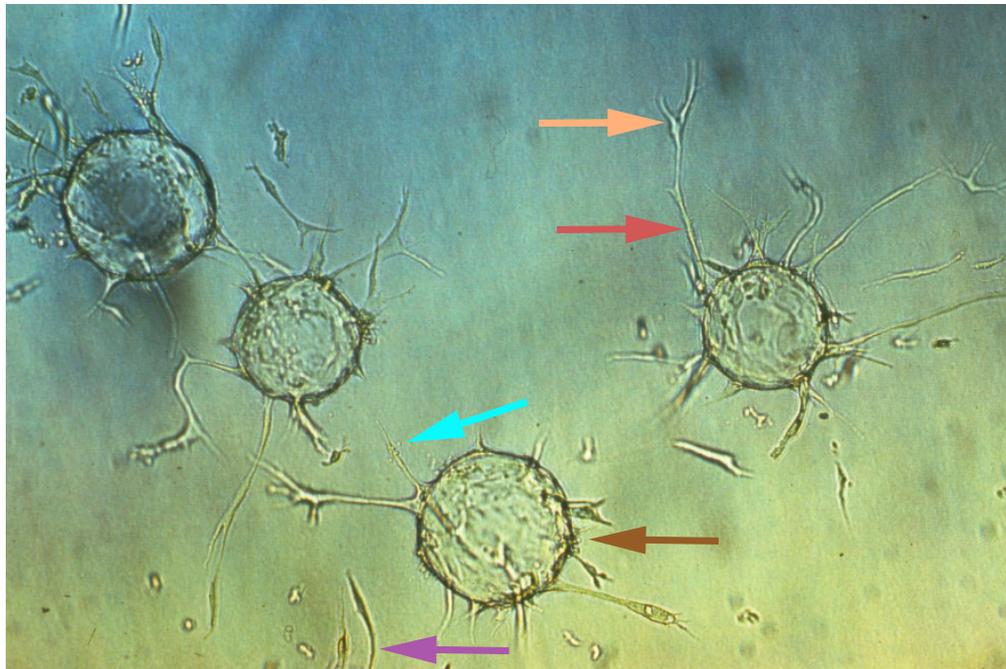


Abb. 11: Nach 24 h weisen stimulierte BREC Sp (**roter Pfeil**) auf, die von den Microspären (MS, **brauner Pfeil**) in die zuvor zellfreie Matrix eindringen. Sp bilden dabei Verzweigungen (**oranger Pfeil**) aus. Nicht als Sp werden kurze zytoplasmatische Ausläufer angesehen, die die erforderliche Mindestlänge eines MS-Durchmessers nicht erreichen (**türkisfarbener Pfeil**). Ebenso werden zelluläre Bestandteile, die den Kontakt zur MS verloren haben, nicht in die Auswertung als Sp einbezogen (**violetter Pfeil**).

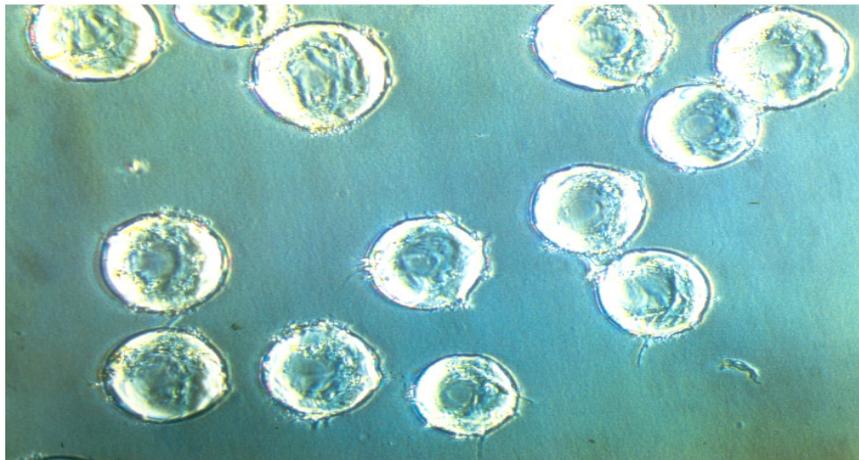


Abb. 12: Nach 24 h sind bei unstimulierten BREC keine Sprouts zu erkennen.

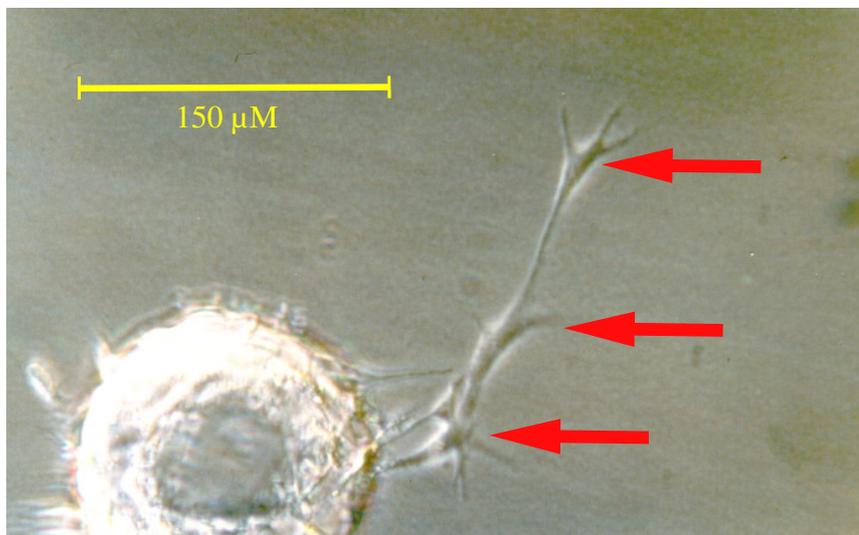


Abb. 13: Sprouts sind ab einer Länge von 150  $\mu\text{m}$  häufig mehrzellig, dies wird durch die Anwesenheit mehrerer Zellkerne (rote Pfeile) in einem Sprout belegt. Aufnahme bei 20-facher Vergrößerung

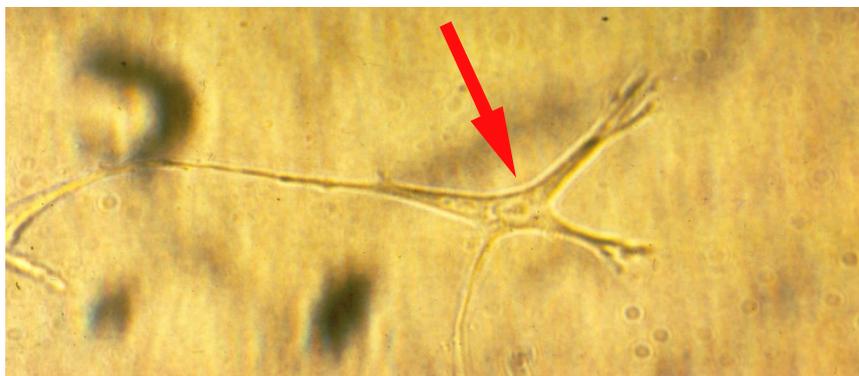


Abb. 14: Die Anwesenheit von Nuklei in Sprouts wird bei 40-facher Vergrößerung deutlich (roter Pfeil). Parallel zeigt sich, dass der Zellkern an Verzweigungen lokalisiert ist.

Auch nach dreitägiger Inkubation weisen BREC ohne aF nur eine geringfügige Sp-Bildung auf (Abb. 15). Demgegenüber haben die Sp im stimulierten Ansatz deutlich an Länge und Dicke zugenommen und fusionieren miteinander (Abb. 16). Bei 20-facher Vergrößerung eines Areals, in dem sich Sp-Geflechte ausgebildet haben, lässt sich erkennen, wie einzelne Sp miteinander verschmelzen und wie sich Sp über- und unterkreuzen (Abb. 17).

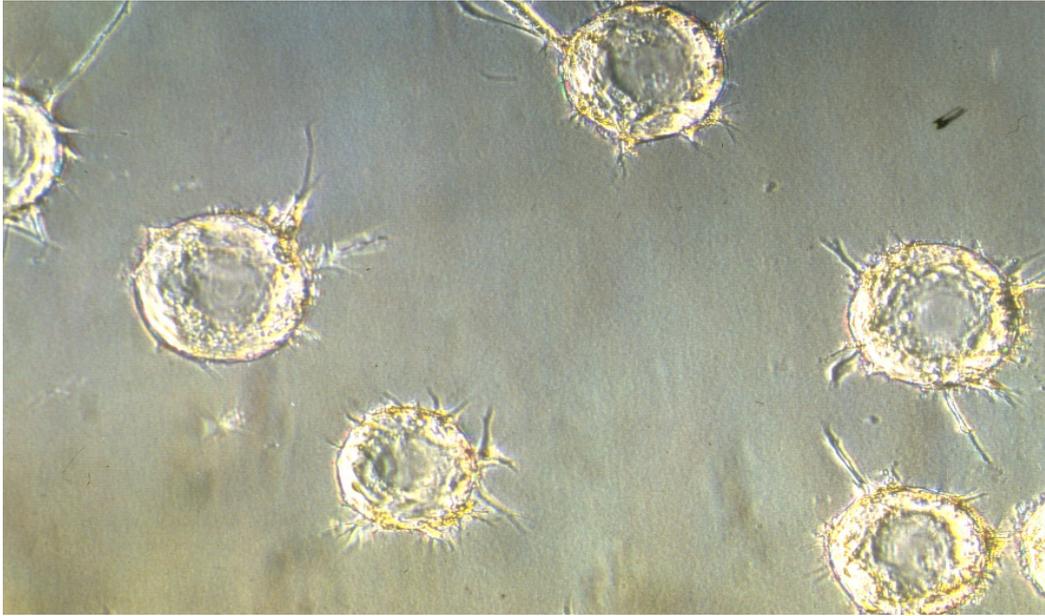


Abb. 15: Unstimulierte BREC weisen auch nach 72 h keine signifikante Zahl an Sprouts auf

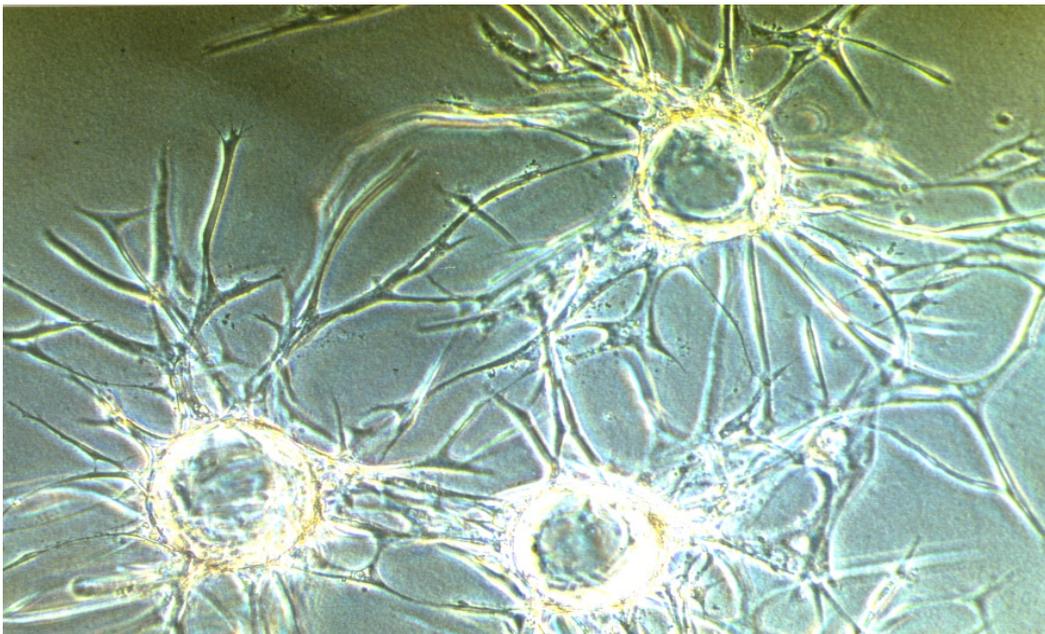


Abb. 16: Nach 72 h haben die Sprouts angiogen stimulierter BREC sowohl an Länge wie auch an Zahl zugenommen. Dabei bilden sich gefäßnetzartige Formationen aus.

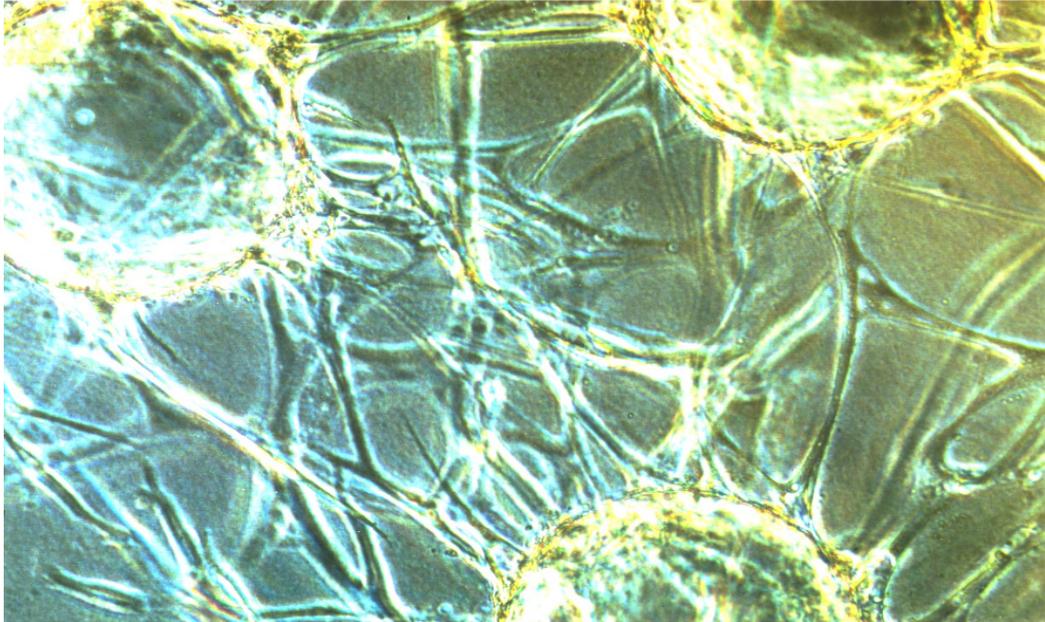


Abb. 17: Bei 20-facher Vergrößerung lässt sich zwischen den als rundlich zu erkennenden Microsphären (MS) ein Netzwerk aus Sprouts erkennen. Es kommt zur Brückenbildung zwischen den MS durch Fusion von Sprouts. Sprouts unter- und überkreuzen einander.

Zur Erleichterung des Assayablaufes wurde die Fixierbarkeit und Anfärbbarkeit der zellulären Bestandteile überprüft. Die gezeigten Fotografien zeigen Sp-tragende Microsphären vor und nach Fixierung mit 3%-Paraformaldehyd und Färbung mit Kristallviolett (Abb. 18). Es ist zu erkennen, dass die Behandlung keinen Einfluss auf die Integrität der Zellstrukturen hat.

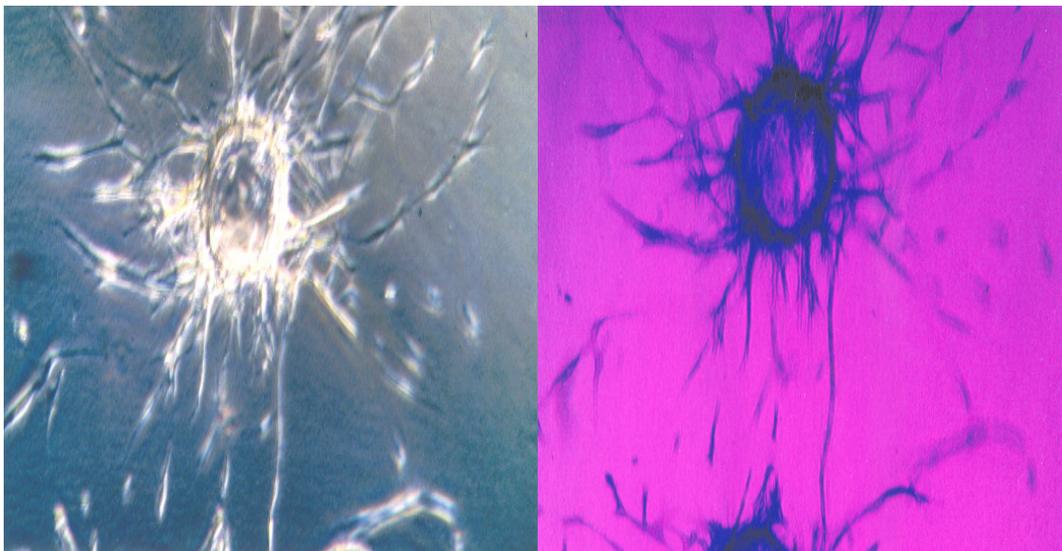


Abb. 18: Eine Microsphäre mit ausgebildeten Sprouts vor (linke Bildhälfte) und nach (rechte Bildhälfte) Fixierung mit Paraformaldehyd sowie Anfärbung mit Kristallviolett.

Bei gleichem Assayaufbau mit HUVEC ließen sich keine Sp induzieren, während bovine kapilläre Hirn-EZ zwar Sp bildeten, die jedoch sowohl spontan als auch bei Stimulation auftraten und sehr kurzlebig waren (nicht gezeigt).

### 3.1.5. Identifikation der angiogenen Faktoren

Bei getrennter Applikation der Bestandteile des initial verwendeten ‚Cocktails‘ von aF zeigten nach 24 h alle bFGF-haltigen Ansätze Sp. Während das Faktorengemisch die Ausbildung von 100% als Vergleichswert gegenüber der unstimulierten Kontrolle (2%) lieferte, erzielte bFGF allein 81%, bFGF mit VEGF 91% und bFGF mit TNF- $\alpha$  66%. Demgegenüber bewirkten VEGF und TNF- $\alpha$  sowie die kombinierte Gabe beider Faktoren keine Ausbildung von Sp (Abb. 19).

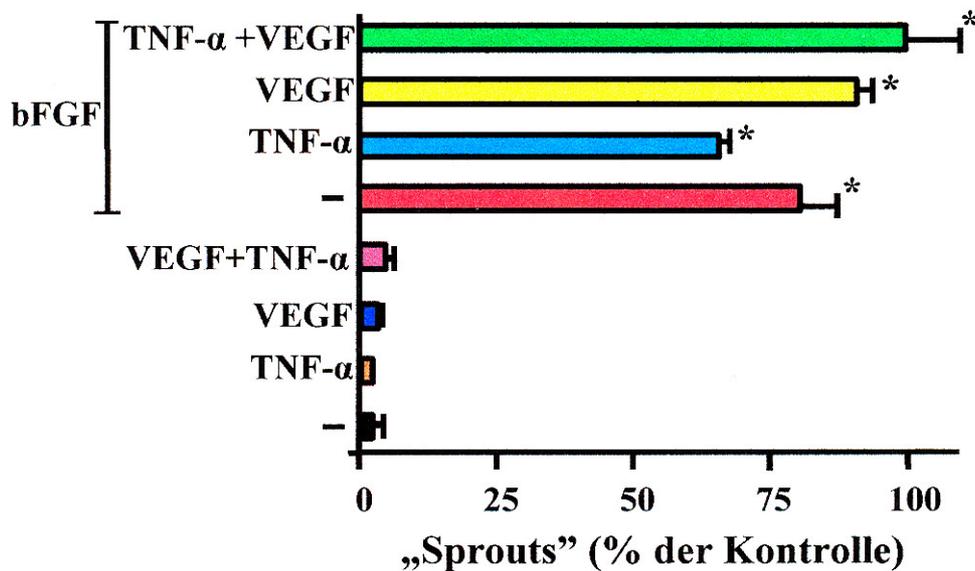


Abb. 19: Applikation der angiogenen Faktoren in den möglichen Mixtur-Varianten zur Ermittlung der im BREC-SpA wirksamen Bestandteile. Die Graphik zeigt Mittelwerte (+Standardabweichungen) eines repräsentativen Experiments, das in Triplikaten durchgeführt wurde (n = 3). Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle: \* = p < 0,05.

Bei Auswertung nach 48 h zeigte auch der VEGF-stimulierte Ansatz eine Sp-Bildung (100 %; Bezugswert der 48h-Auswertung). Der Kontrast gegenüber der unstimulierten Kontrolle (26%) war signifikant vorhanden. Beim Vergleich mit dem 24 h-Wert der bFGF (154 %) war die VEGF-induzierte Angiogenese nach 48 h schwächer als die bFGF-Wirkung. TNF- $\alpha$  bewirkte isoliert (22% ) und in Kombination mit VEGF (95%) auch nach 48 h keine Erhöhung der Angiogenese-Rate (Abb. 20).

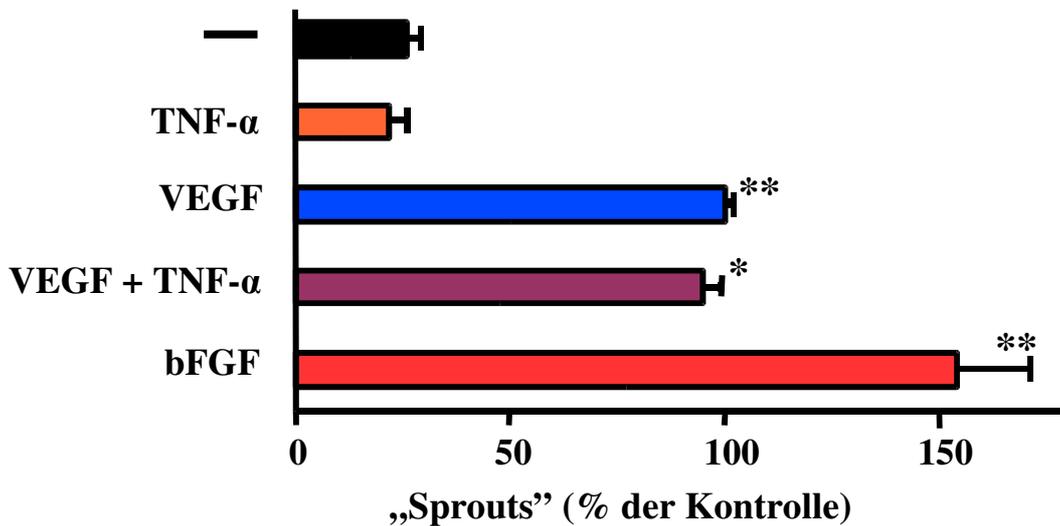


Abb. 20: VEGF-induzierte Angiogenese im Sp-Assay bei Auswertung nach 48 h, im Vergleich Sp-Rate bei bFGF-Stimulation nach 24 h. Die Daten zeigen Mittelwerte (+durchschnittliche Abweichungen) eines repräsentativen Experiments (n = 2). Signifikanz gegenüber der unbehandelten Kontrolle : \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01.

In Dosis-Wirkungsexperimenten mit bFGF ließ sich in Konzentrationen bis 0,1ng/ml keine Sp feststellen. Mit 0,5 ng/ml bFGF war eine signifikante Stimulation zu erreichen (16%), die Stimulation mit 5ng/ml bFGF diente als Bezugswert (100%). Bei 1 ng/ml bFGF zeigte sich eine statistisch hochsignifikante Steigerung der Sp-Rate. 20 ng/ml bFGF führten zu keiner weiteren Erhöhung der Sp-Zahl. Nach 48 h wurden die VEGF-stimulierten BREC ausgewertet. In einer Konzentration von 0,05 ng/ml erhöhte VEGF die Sp-Bildung auf 42% bei spontaner Sp-Rate von 18%. Bereits 0,5 ng/ml VEGF induzierten eine ähnliche Angiogenese-Aktivität (103%) wie 5ng/ml bFGF nach 24 h, weitere Dosiserhöhungen führten zu keiner weiteren Sp-Zunahme (Abb. 21).

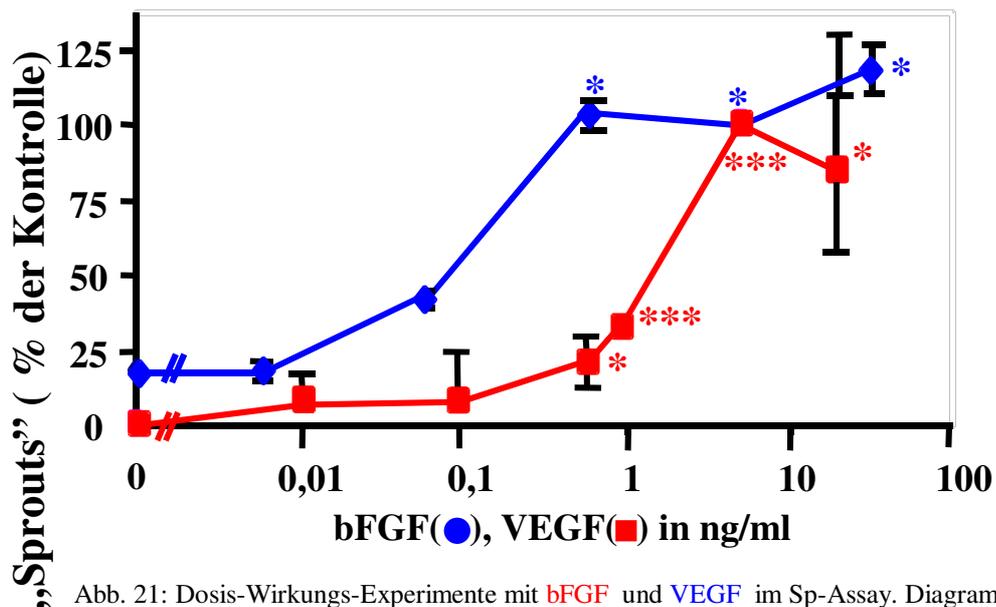


Abb. 21: Dosis-Wirkungs-Experimente mit bFGF und VEGF im Sp-Assay. Diagramm stellt für bFGF Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) aus zwei separaten, in Duplikaten durchgeführten Experimenten dar (n = 4). Die VEGF-Kurve zeigt Mittelwerte (+/- durchschnittliche Abweichungen) eines Experiments (n = 2). Signifikante Abweichungen zur unbehandelten Kontrolle durch Sternsymbole angegeben (\* = p < 0, 05; \*\*\* = p < 0, 001).

## 3.2. Optimierung des Versuchsaufbaus

### 3.2.1. Angiogener Einfluss der Serumkonzentration

Die Serumkonzentration des Mediums wurde zwischen 0% und 10% variiert. Bei bFGF-Behandlung der BREC ergab sich nach 24 h in Abwesenheit von fötalem bovines Serum (FBS) eine geringfügige Angiogenese mit durchschnittlich 5 Sp, diese Rate wurde als Bezugswert (100%) aufgefasst. Mit zunehmender Erhöhung des FBS-Gehalts stieg die Zahl der Sp (258% in 0,5% FBS; 767% in 5% FBS). In 10% FBS nahm die angiogene Aktivität (642%) etwas ab. In den unstimulierten Gegenproben waren keine Sp vorzufinden. Bei Auswertung nach 48 h ließen die bFGF-behandelten, FBS-freien BREC mit 340% Sp erkennen. 0,5% FBS bewirkten eine Erhöhung auf 850% , 5% FBS auf 2530 % und 10% FBS auf 2120% des Ausgangswertes. Auch nach 48 h fand sich bei den unstimulierten Zellen keine signifikante Sp-Bildung (Abb. 22).

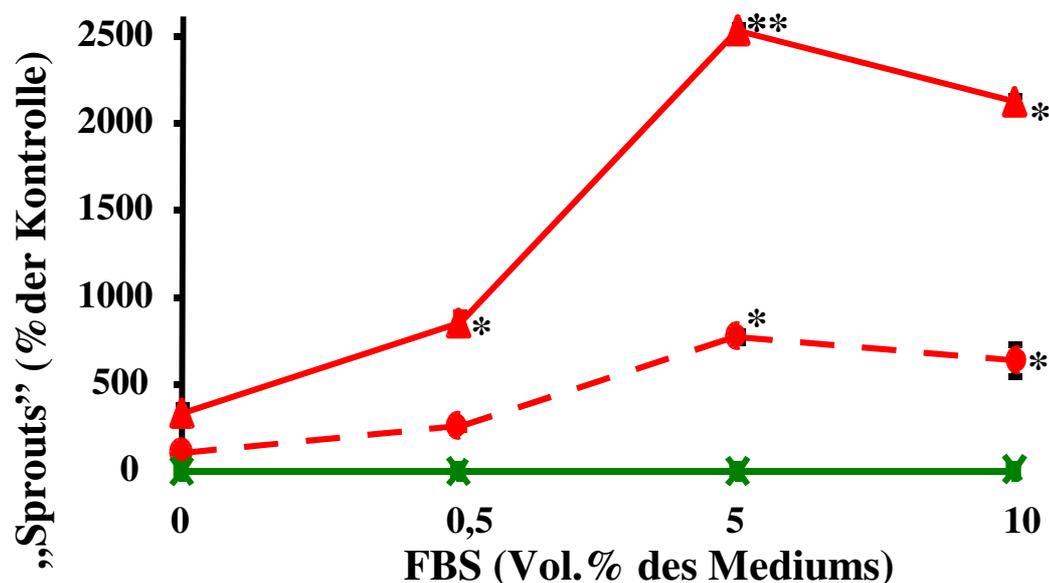


Abb. 22: Auswirkung der FBS-Konzentration auf Sp-Ausbildung bei stimulierten (rot dargestellt) und unstimulierten (grün dargestellt) BREC nach 24 h (●, ×) und 48 h (▲, ■). Diagramm zeigt Mittelwerte (+/- Standardabweichung) aus zwei Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. Signifikanz gegenüber unstimulierter Kontrolle nach 24 h  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ).

Bei Beobachtung über 72 h zeigten sich deutliche Unterschiede in der Überlebensfähigkeit der ausgebildeten Sp. Abb. 23 zeigt Sp-Strukturen in 0% FBS, Abb. 24 in 10% FBS.

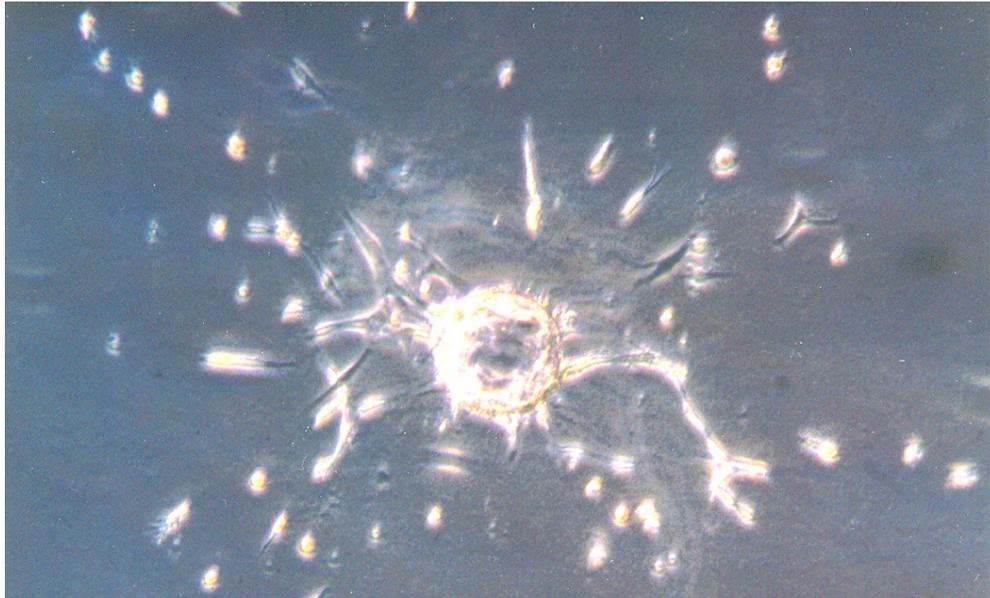


Abb. 23: Nach 72 h sind bei serumfreien Konditionen nur vereinzelt Sp zu erkennen, die Mehrzahl der Sp haben den Kontakt zur MS verloren und sind abgestorben.

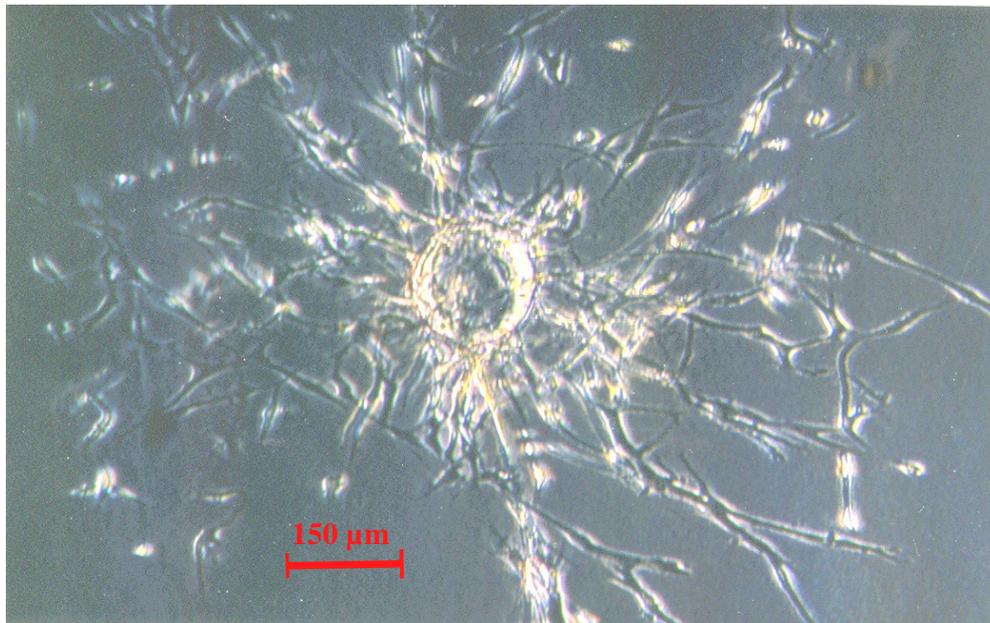


Abb. 24: Bei 10% FBS ist nach 72 h ein Geflecht von Sp nach bFGF-Stimulation zu beobachten. Dabei erreichen einzelne Sp eine Länge von bis zu 400 µm.

### 3.2.2. Applikation der Testsubstanzen

bFGF und VEGF wurden fraktioniert sowohl der Matrix als auch dem Medium zugegeben, zum Vergleich wurden die Faktoren als Zugabe ins Medium in der gleichen Gesamtdosis getestet. Unabhängig von der Art der Applikation waren gleiche Wirkstärken der Faktoren festzustellen, dabei diente die kombinierte Matrix/Medium-Anwendung von bFGF und VEGF als 100%-Bezug. Die Medium-Zugaben ergaben für bFGF 108 % und für VEGF 107% (Abb. 25).

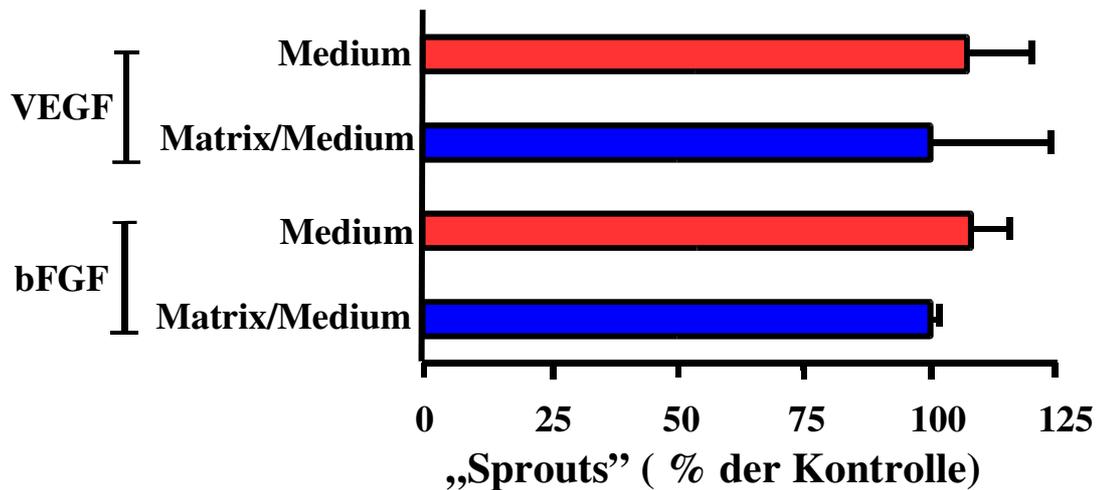


Abb. 25: **Isolierte Medium-Zugabe** angiogener Faktoren gegenüber **fraktionierter Gabe ins Medium und in die Matrix**. Diagramm zeigt Mittelwerte (+ durchschnittliche Abweichungen) eines Experiments, das in Duplikaten durchgeführt wurde (n = 2).

### 3.2.3. Einfluss von Fibrinogen, Aprotinin, Thrombin auf Angiogenese

Durch Experimente mit den Matrixbestandteilen sollte deren Einfluss auf die Ausformung von Sp ermittelt werden. Fibrinogen (Fibg) zeigte in ansteigenden Dosen eine hemmende Wirkung auf die bFGF-stimulierte Sp-Bildung. Dabei wurde die Sp-Rate der Fibg-Konzentration von 1,7 mg/ml als Bezugswert (100%) aufgefasst. 2,5 mg/ml Fibg senkte die Sp-Zahl auf 84%, 3,5 mg/ml auf 78% und 4,5 mg/ml auf 33%. Die unstimulierten BREC waren unabhängig vom Fibg-Gehalt der Matrix ohne Angiogenese-Aktivität (Abb. 26).

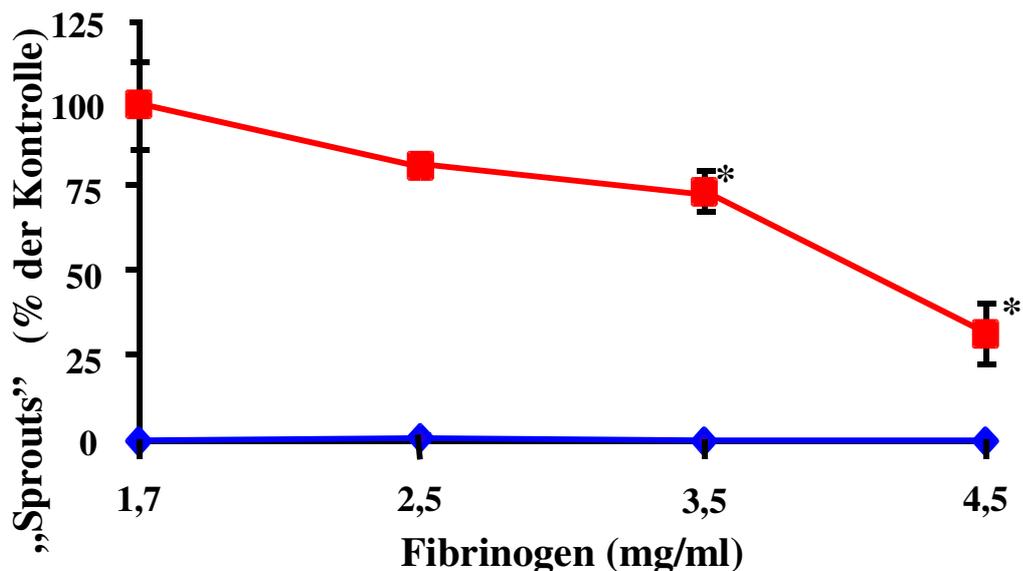


Abb. 26: Wirkung ansteigender Fibrinogen-Konzentration auf Angiogenese bei **bFGF-stimulierten BREC (■)** und **unstimulierten BREC (◆)**. Dargestellt sind Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) aus drei separaten Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (n = 6). Die Dosis von 4,5 mg/ml Fibrinogen wurde als Duplikat in einem der Experimente getestet (n = 2). \* zeigt Signifikanz ( $p < 0,05$ ) bFGF-stimulierter BREC gegenüber der Fibrinogen.-Dosis von 1,7 mg/ml.

Aprotinin zeigte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Sp-Bildung bei bFGF-Stimulation, unabhängig von der Applikationsart (Zugabe in die Matrix gegenüber Anwendung im Testmedium). Im Vergleich zum 100%-Bezugswert in Abwesenheit von Aprotinin entstanden durch Zugabe von 300 U/ml bzw. 500 U/ml in die Matrix 86% bzw. 73% Sp. Dieselben Konzentrationen ergaben bei Applikation im Medium eine Sp-Rate, die 84% bzw. 82% des Ausgangswertes betrug. Bei unstimulierten BREC blieb Aprotinin ohne Effekt (Abb. 27).

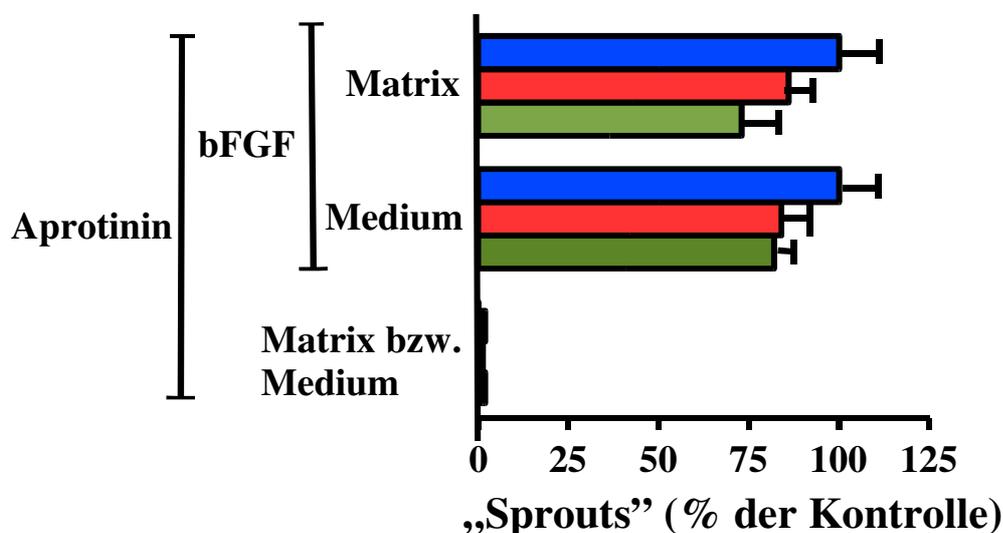


Abb. 27: Aprotinin wurde in den Konzentrationen von 500 U/ml (grüne Balken), 300 U/ml (rote Balken) auf seine Wirkung bei bFGF-stimulierten BREC getestet und mit Aprotinin-freien Ansätzen (blaue Balken) verglichen. Bei unstimulierten BREC zeigte Aprotinin (unabhängig von der Applikationsart, untere Balken) keinen Effekt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte (+ durchschnittliche Abweichungen) aus einem in Duplikaten durchgeführten Experiment (n = 2).

Thrombin wurde bei Angiogenese-Induktion mit bFGF und bei unstimulierten BREC getestet, dabei erfolgte alternativ die Zugabe ins Medium bzw. in die Matrix. Keine der getesteten Konzentrationen bewirkte bei unstimulierten BREC eine Bildung von Sp (Daten nicht gezeigt). Die Erhöhung der routinemäßig verwendeten Thrombin-Konzentration von 10 nM auf 40 bzw. 80 nM bei Matrixapplikation blieb ohne Einfluss auf die bFGF-stimulierte Angiogenese-Rate (100% gegenüber 103 bzw. 114%). Nach 48 h war eine Reduktion der Sp von 100% auf 62% bei Fibrinmatrixherstellung mit 10 nM Thrombin festzustellen. Demgegenüber nicht signifikant unterschiedliche Sp-Raten ergaben sich bei Einsatz von 40 und 80 nM Thrombin (62% und 73%).

Wurde Thrombin dem Medium zugesetzt, ließ sich nach 24 h eine (statistisch nicht signifikante) Angiogenese-Verstärkung durch die 10 nM-

Konzentration auf 146% beobachten. Demgegenüber bewegte sich die Sp-Rate bei Zusatz von 40 und 80 nM Thrombin in das Medium im Bereich des Referenzwertes (97% bzw. 111% - Ergebnisse siehe Abb. 28). Nach 48 h war eine signifikante Erhöhung der Angiogenese-Rate von 62% auf 219% bzw. 203% bei Verwendung von 40 und 80 nM Thrombin im Medium zu verzeichnen. Die 10 nM-Konzentration von Thrombin zeigte bei dieser Applikationsart keinen Effekt (78%).

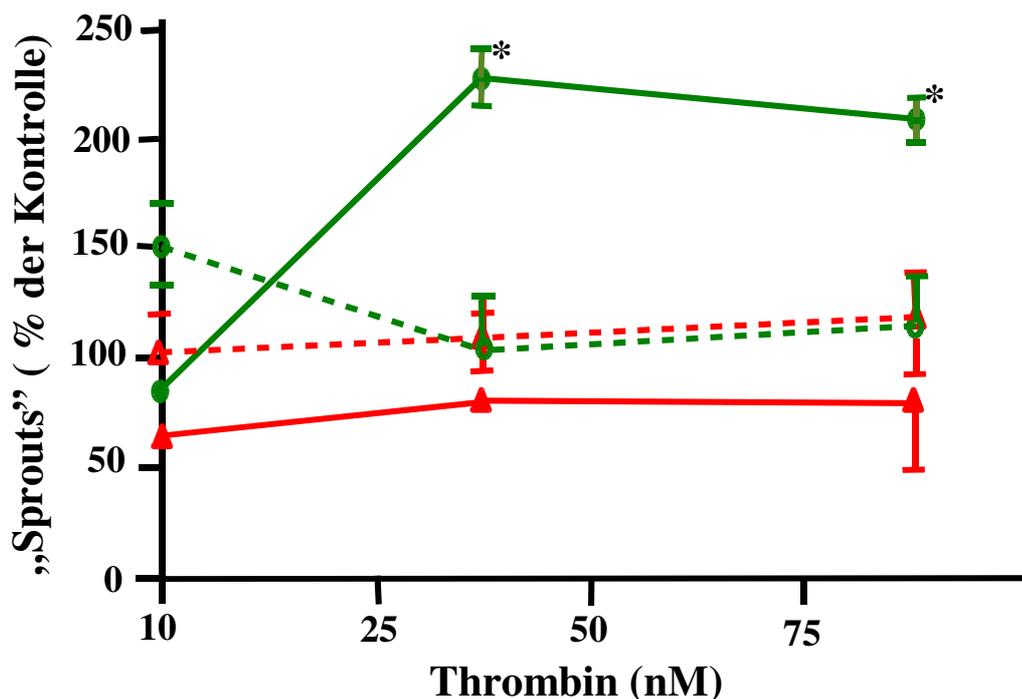


Abb. 28: Einfluss von Thrombin in der Matrix (rot, ▲ u. △) bzw. im Zellkulturmedium (grün, ● u. ○) auf Angiogenese im SpA nach 24h (nicht farbefüllte Symbole) und nach 48h (farbefüllte Symbole) Versuchsdauer. Signifikanz ist für betreffende Werte mit  $p < 0,05$  durch \* symbolisiert. Gezeigt sind Mittelwerte (+/- durchschnittliche Abweichungen) eines in Duplikaten durchgeführten Experiments (n = 2).

### 3.2.4. Einfluss von pH und Zink

pH-Wert-Änderungen auf die Sp-Ausformung unter Stimulation mit bFGF wurden untersucht. Dazu wurden verschiedene Volumina von 1N NaOH und 1 N HCl zur Fibrinmatrix oder in das Testmedium gegeben. Der Ausgangs-pH des Fibg betrug 7,4. Ins Fibg appliziertes HCl bewirkte mit ansteigenden Volumina eine makroskopisch auffällige Trübung der Matrix. NaOH bewirkte eine Transparenzerhöhung der Matrices. Bei 5µl HCl (resultierender pH: 3,4) bzw. NaOH (pH: 10,85) blieben die Matrices trotz Thrombingabe liquide, daher

konnte keine Auswertung erfolgen. Bereits 0,5  $\mu\text{l}$  HCl (resultierender pH: 7,25) verringerten die Sp bei Matrix-Zugabe auf 50% des Ausgangswertes (100%), bei 2  $\mu\text{l}$  (resultierender pH: 6,85) wurden noch 39 % der Sp gesehen. NaOH zeigte sowohl bei Zugabe von 0,5  $\mu\text{l}$  (pH: 7,70) ins Fibrin als auch beim Untermischen von 2  $\mu\text{l}$  (pH: 9,65) eine Verstärkung der Angiogenese auf maximal 155%.

Der Ausgangs-pH des MCDB 131-Mediums lag bei 7,85. Wenn HCl dem Testmedium beigefügt wurde, hemmten 0,5  $\mu\text{l}$  die Sp-Entstehung nicht (100%), 2 $\mu\text{l}$  nicht signifikant (80%) und 10  $\mu\text{l}$  signifikant (60%). Die pH-Messung der zugegebenen Volumina ergab bei 0,5  $\mu\text{l}$  HCl direkt nach Zugabe einen pH von 7,80. Bei 2  $\mu\text{l}$  HCl stellte sich initial ein pH von 7,53 und für 10  $\mu\text{l}$  ein pH von 6,45 ein. Die Sp-Zahlen stiegen, wenn NaOH zum Medium gegeben wurde (0,5 $\mu\text{l}$ : 95%; 2  $\mu\text{l}$ : 122% und 10 $\mu\text{l}$ : 150%). Der pH-Wert des Mediums wurde durch 0,5  $\mu\text{l}$  NaOH auf 8,25, durch 2  $\mu\text{l}$  auf 8,65 und durch 10  $\mu\text{l}$  auf 9,65 angehoben (siehe Abb. 29).

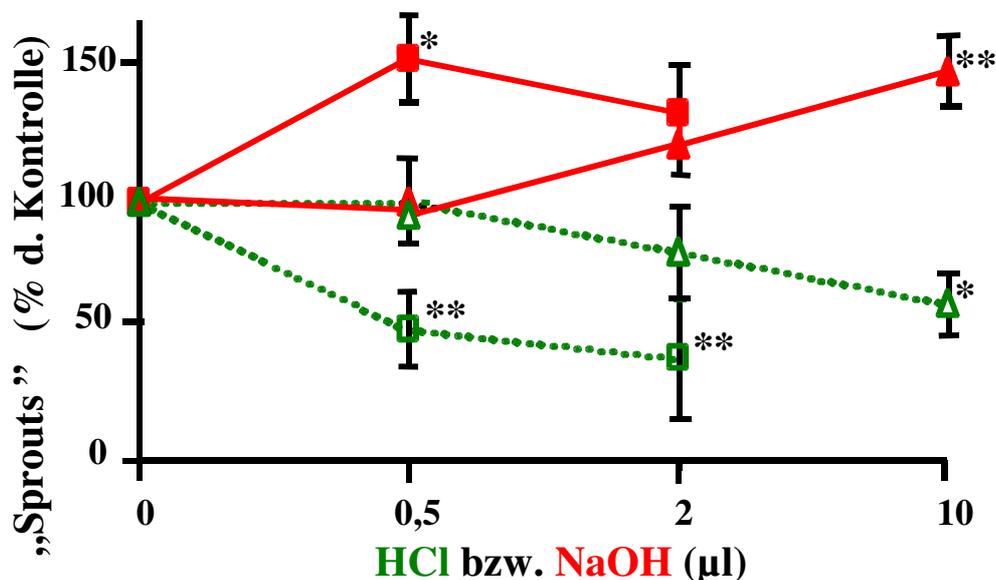


Abb. 29: HCl wurden in die Matrix (■) oder zum Medium (▲) gegeben. Parallel wurde NaOH in der Matrix (■) und im Medium (▲) getestet. Die BREC wurden in diesem Ansatz mit bFGF stimuliert. Im Diagramm sind Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) aus drei Experimenten dargestellt, in denen die Stimulation jeweils in Duplikaten erfolgte (n = 6). Signifikant von der nicht-pH-Wert behandelten Kontrolle abweichende Daten sind mit \* (p < 0,05) bzw. \*\* (p < 0,01) gekennzeichnet.

Unterschiedliche Konzentration an FBS beeinflussten im Zusatzexperiment die Sp-Rate bFGF-stimulierter BREC durch 10  $\mu\text{l}$  HCl bzw. NaOH. Die im vorherigen Absatz aufgeführten pH-Messergebnisse direkt nach HCl- bzw. NaOH-Zugabe ins Medium wurden durch unterschiedlichen FBS-

Gehalt nicht verändert. Nach Beendigung des Experiments wurden das Medium auf Raumtemperatur abgekühlt und einer zweiten pH-Messung unterzogen, dabei wurde der pH-Effekt in unterschiedlichen Serumkonzentrationen getestet. Der Wert bewegte sich je nach FBS-Gehalt zwischen pH 7,71 (20% FBS) und pH 7,93 (0,5% FBS), somit zeigten sich relativ geringe Differenzen. Am Versuchende ergaben Messungen für die mit 10 µl NaOH versetzten Medien unabhängig vom FBS-Gehalt einen pH-Wert von 8,40.

Im Experiment wurde als Bezugswert (100%) die Sp-Rate bei Stimulation mit bFGF in 0,5% FBS nach 24 h Versuchsdauer angesehen. Im Verhältnis dazu traten unter 5% FBS 134% Sp und unter 20% FBS 106% Sp auf. Die Zugabe von 10 µl HCl bewirkte in 0,5% FBS die Reduktion auf ein Drittel (34%) der ursprünglichen Sp-Zahl, während in 5 und 20 % FBS die Sp-Rate um jeweils 50% abgeschwächt war. 10 µl NaOH bewirkten sowohl in 0,5% als auch in 5% FBS eine erhöhte Sp-Rate (131% bzw. 161%), so dass - bezogen auf den unterschiedlichen Ausgangswert - eine jeweilige Steigerung um ca. 30% erfolgte. Demgegenüber zeigte sich in 20% FBS bei NaOH-Zusatz eine Abnahme der Angiogenese auf 80% (Abb. 30).

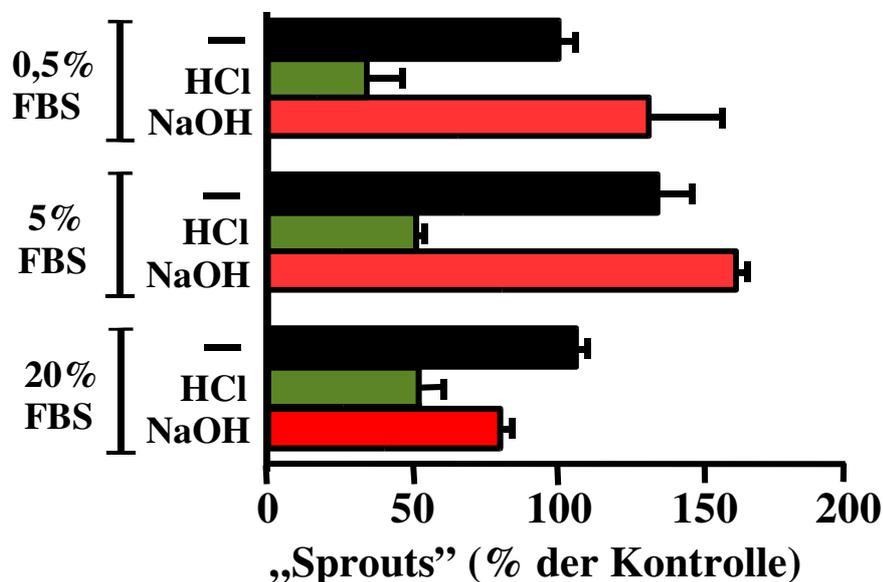


Abb. 30: Wirkung von HCl (grüne Balken) und NaOH (rote Balken) auf bFGF-induzierte Angiogenese in Abhängigkeit von der Serumkonzentration im Medium. Schwarze Balken ohne Säure/Basen-Zusatz. Das Diagramm zeigt Mittelwerte (+ durchschnittliche Abweichungen) eines in Duplikaten durchgeführten Experiments (n = 2).

Es wurde der Einfluss des pH auf unstimulierte BRECs getestet. Übereinstimmend ergab die Auswertung aller unstimulierten Ansätze nach 24 h

keinerlei Sp-Ausformung. Nach 48 h und 72 h wurden die Sp-Raten auf den nach 24 h ausgewerteten, mit bFGF bei 0,5% FBS stimulierten Ansatz (100%) bezogen. Mit steigendem Gehalt des Mediums an FBS ergab sich nach 48 h die geringe Sp-Rate in den nicht-pH-behandelten Versuchsmatrizes von 7% Sp in 0,5% FBS und von 42% Sp in 20% FBS. Unabhängig vom FBS-Anteil zeigten sich nach HCl-Zugabe kaum Sp. Durch NaOH in 0,5% FBS ergab sich eine Sp-Rate von 28%, während in 20% FBS anscheinend weniger Sp im Vergleich zur Referenzzählung zu beobachten waren. Die Auswertung nach 72 h bestätigte diesen Trend. Ohne Säure/Base-Zusatz waren in 0,5% FBS 4% Sp, in 5% FBS 48% Sp und in 20% FBS mit 180% Sp fast das Doppelte der bFGF-Stimulation nach 24 h zu beobachten. Unter HCl zeigte sich unabhängig vom FBS-Gehalt nahezu keine Angiogenese. NaOH bewirkte nach 72 h in 0,5% FBS eine Zunahme auf 85% Sp, in 5% FBS erfolgte keine NaOH-verstärkte Sp-Bildung und in 20% FBS eine fast komplette Sp-Inhibition ( Abb. 31).

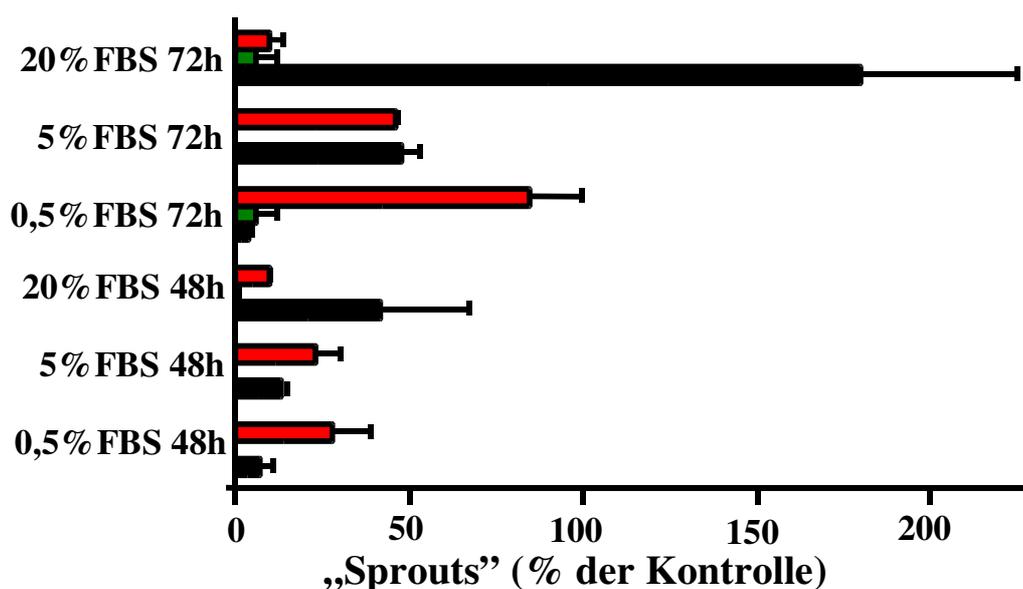


Abb. 31: Auswirkung von pH-Modulation auf unstimulierte BRECs. Gezeigt sind Mittelwerte (+durchschnittliche Abweichung) eines Experiments. Schwarze Balken ohne Säure/Basen-Zusatz, rote Balken symbolisieren Zugabe von NaOH, grüne Balken von HCl. Bezugswert ist die Sp-Rate bei bFGF-stimulierten BRECs in 0,5% FBS nach 24 h.

Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Zink wurde im SpA getestet. bFGF-induzierte Angiogenese (100%) wurde durch Zink gehemmt. 5 bis 100  $\mu$ M Zink ergaben eine dosisabhängige Reduktion der Sp auf minimal 6% des Ausgangswertes bei Verwendung der höchsten Dosis (Abb. 32).

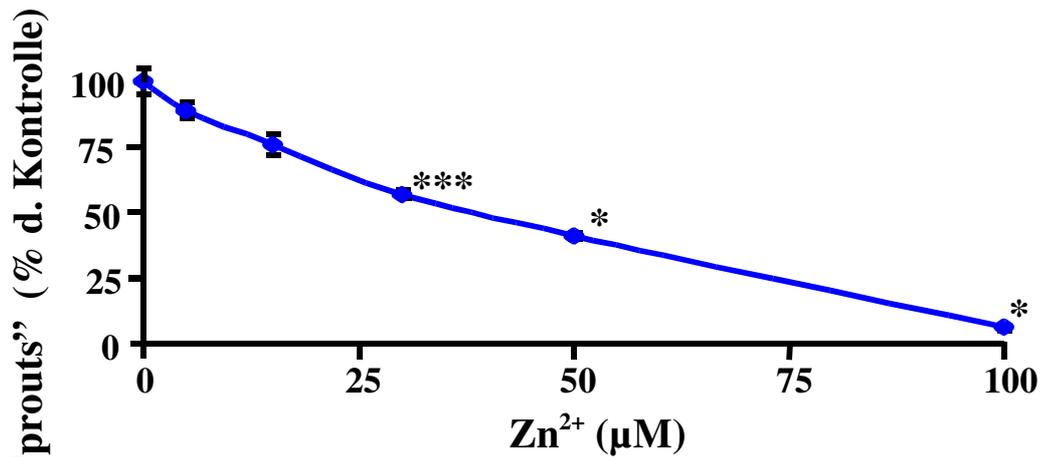


Abb. 32: Einsatz von Zink ( $Zn^{2+}$ ) im Sprout-Assay bei bFGF-stimulierten BREC. Dargestellt sind für 30  $\mu M$   $Zn^{2+}$  Mittelwerte (+/-Standardabweichungen) aus zwei separaten Experimenten ( $n=6$ ). Im übrigen sind Mittelwerte aus einem in Duplikaten durchgeführten Experiment gezeigt ( $n=2$ ). Signifikanz in Relation zum zinkfreien Ansatz durch \* ( $p < 0,05$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ) symbolisiert.

### 3.2.5. ECGF/H als angiogener Faktor

ECGF/H wurde in aufsteigenden Dosen appliziert. Als 100%-Wert wurde nach 24 h Versuchsdauer die parallel erfolgte Stimulation mit bFGF (5 ng/ml) angesehen. 1,5  $\mu g/ml$  ECGF/H führten zu einer mittleren Sp-Rate von 85%. Durch höhere Konzentrationen ließ sich die erzielte Angiogenese auf 155% (7,5  $\mu g/ml$  ECGF/H) bis 170 % (30  $\mu g/ml$  ECGF/H) steigern (Abb. 33).

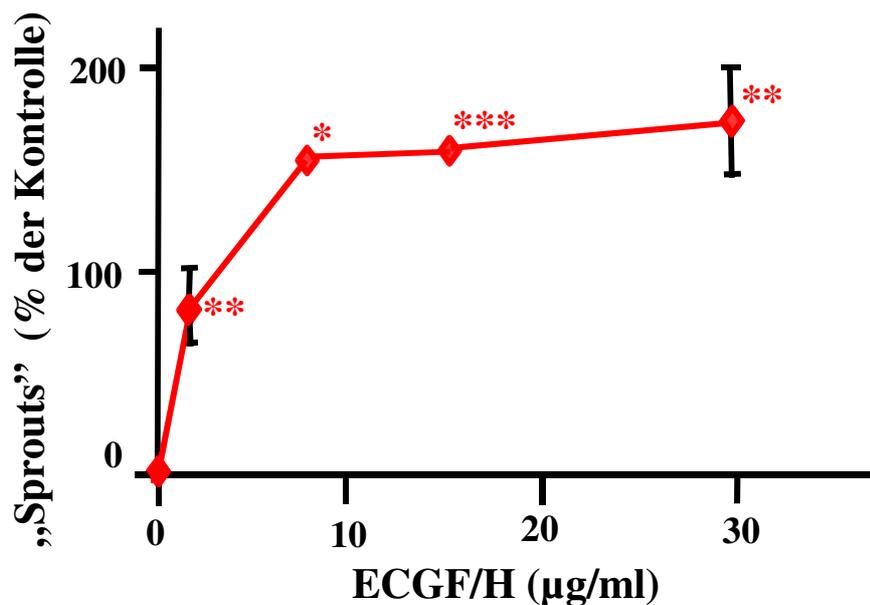


Abb. 33: Dosis-Wirkungskurve mit ECGF/H im Sp-Assay. Gezeigt sind Mittelwerte (+/-Standardabweichungen) aus verschiedenen Experimenten ( $n=4$ ; davon ausgenommen ist der Wert für 7,5  $\mu g/ml$  ECGF/H, dort gilt  $n=2$ ). Signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle durch \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ) angegeben.

Beim Vergleich von bFGF, VEGF und ECGF/H miteinander (in jeweils submaximaler Wirkstärke) wurde bFGF-induzierte Angiogenese nach 24 h als Bezugswert aufgefasst (100%). VEGF bewirkte eine schwächere Sp-Rate (60%), dabei erfolgte die Auswertung nach 72 bzw. 96 h. Mit 202% war ECGF/H mehr als doppelt so effektiv wie bFGF (Abb. 34).

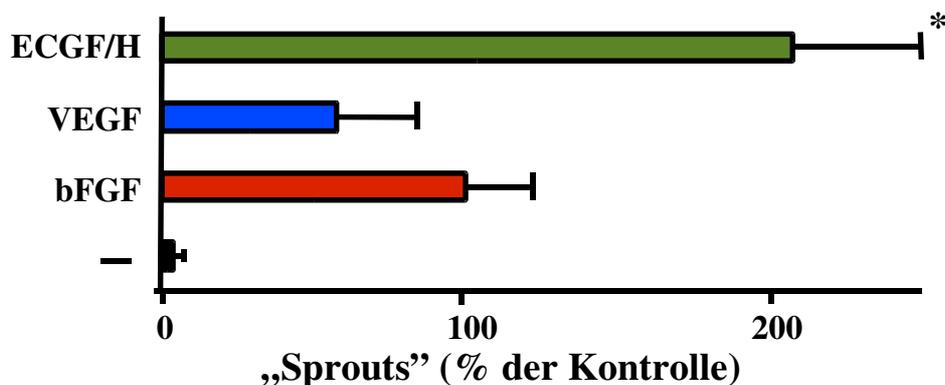


Abb. 34: Wirkungsstärkenvergleich von ECGF/H mit bFGF und VEGF im Sp-Assay mit BREC. Gezeigt sind Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) aus zwei Experimenten mit je zwei Ansätzen pro Substanz bzw. Stimulation (n = 4). Die Signifikanztests erfolgten gegenüber bFGF,  $p < 0,05$  wird durch \* angegeben.

Es zeigten sich vereinzelt Unterschiede in der Morphologie der Sp. Während VEGF und bFGF den bekannten Sp-Typ induzierten, waren die ECGF/H-bedingten Sp zum Teil breiter. Dies war durch MS-nahe Verschmelzung einzelner BREC-, ‚Gefäßknospen‘ bedingt (Abb. 35). Matrixbereiche, die diesen seenartigen Sp-Konglomerate aufwiesen, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Es zeigte sich jedoch überwiegend die bereits beobachtete Angiogenese mit gut differenzierbaren Sp nach ECGF/H-Stimulation.

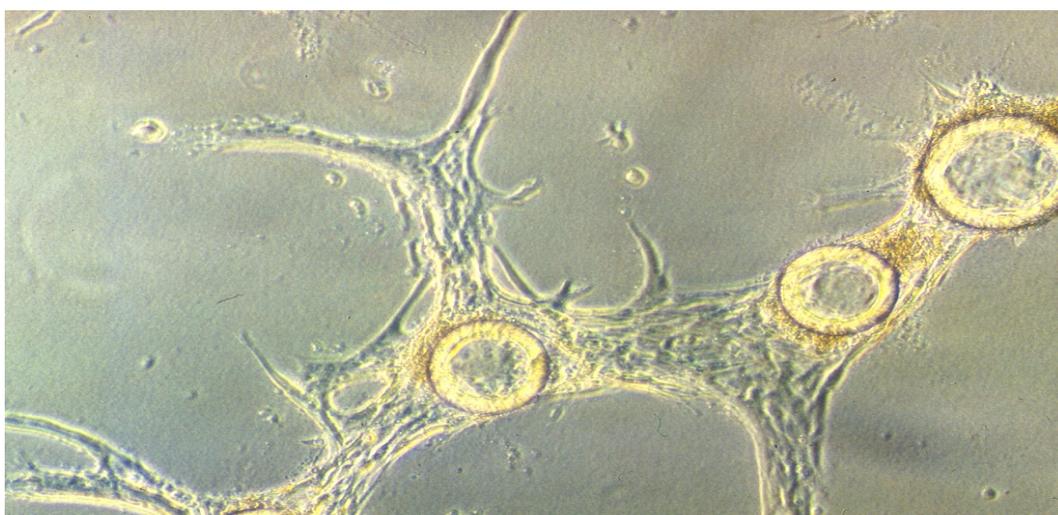


Abb. 35: Vereinzelt zu beobachtende abweichende Morphologie der ECGF/H- induzierten Angiogenese: Microsphärennahe Ausbildung von seenartigen „Sprouts“. Derartige „Sprouts“ wurden nicht in die quantitative Auswertung einbezogen.

### 3.2.6. Einfluss von Fibrinogen, Thrombin, Aprotinin und von ECGF/H auf BREC-Proliferation

Fibg, Aprotinin und Thrombin wurden im Proliferationsexperiment bei unstimulierten und bFGF-behandelten BREC getestet. Als 100%-Vergleichswert wurden unbehandelte BREC angesehen. bFGF steigerte die Wachstumsrate auf 199%. Weder auf unstimulierte BREC noch bei bFGF-Zugabe übten die Matrixsubstanzen eine signifikante Wirkung aus (Fibg: 114% bzw. 209%; Thrombin: 104% bzw. 205%; Aprotinin: 1114% bzw. 230% - siehe Abb. 36).

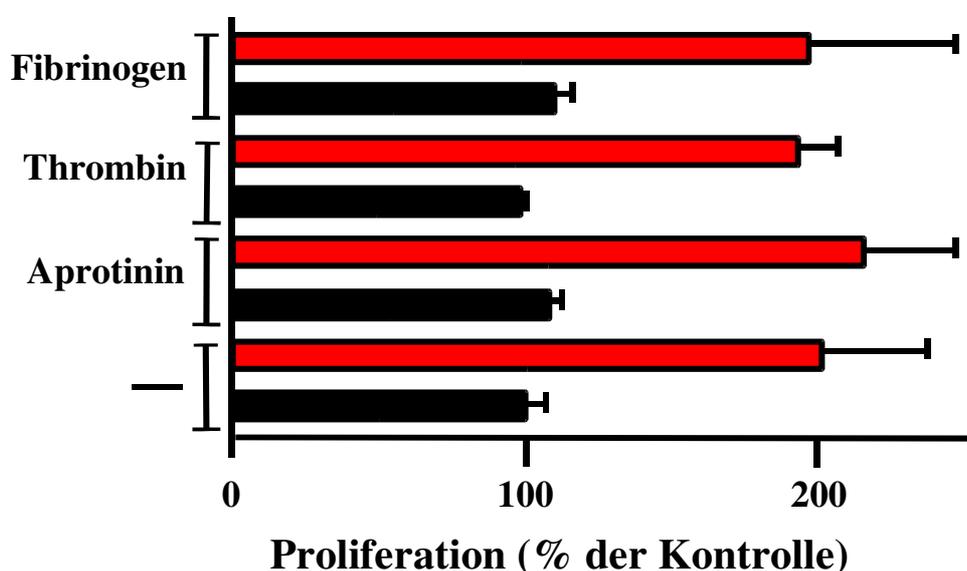


Abb. 36: Einsatz der Matrixsubstanzen des Sp-Assay (Thrombin, Fibrinogen, Aprotinin) im BREC-Proliferations-Assay. Unstimulierte BREC durch schwarze Balken dargestellt, **stimulierte BREC rot (10 ng/ml bFGF)**. Gezeigt sind die Mittelwerte (+ Standardabweichungen) aus zwei separaten, in Triplikaten durchgeführten Experimenten (n = 6).

ECGF/H wurde in Konzentrationen von 3 µg/ml bis 150 µg/ml im Proliferationsassay eingesetzt. Die unstimulierte Kontrolle wurde als Referenzwert (100%) aufgefasst. Konzentrationsabhängig zeigte ECGF/H einen proliferativen Effekt (150%, 310%, 340%, 550%). In der Dosis von 30 µg/ml hatte ECGF/H einen vergleichbar starken Effekt (310%) wie das parallel getestete bFGF (350%). In der höchsten Konzentration (150 µg/ml ECGF/H) hatte sich die gemessene Proliferationsrate der BREC fast versechsfacht (Abb. 37).

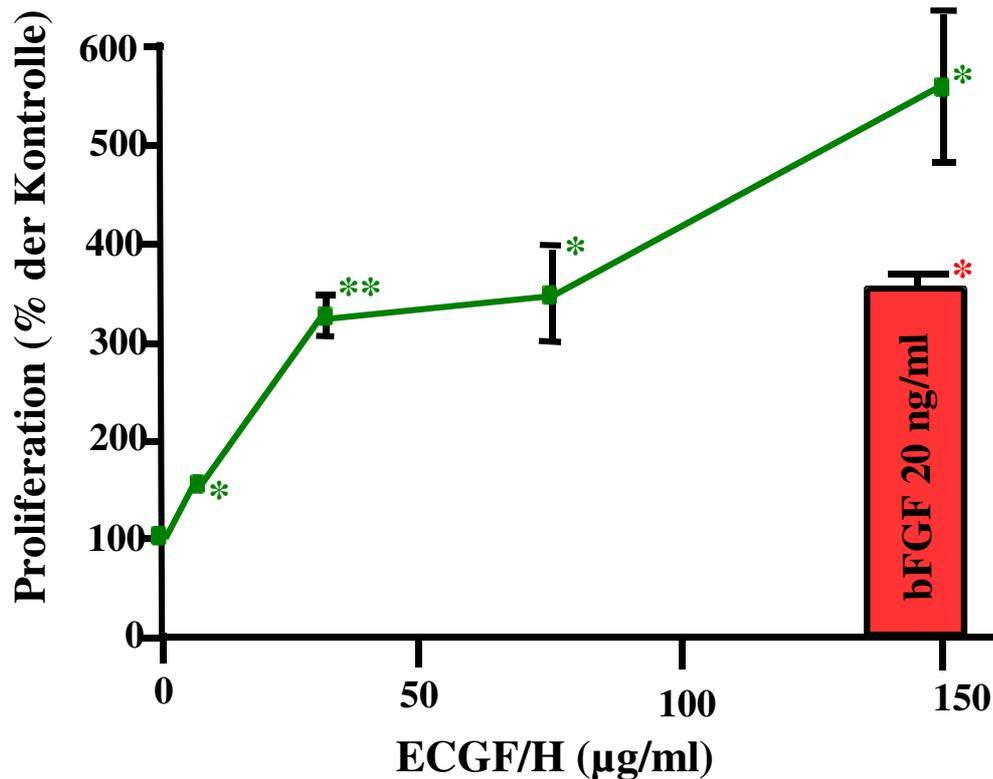


Abb. 37: Dosis-Wirkungstest mit ECGF/H bei BREC-Proliferation. Zum Vergleich wurde die Wirkung von 20 ng/ml bFGF parallel getestet (rote Säule). Das Diagramm zeigt Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) eines Experiments, das in Triplikaten durchgeführt wurde (n = 3). \* entspricht  $p < 0,05$ ; \*\* entspricht  $p < 0,01$  gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

### 3.3. Produktion und Vergleich verschiedener Angiostatin-Varianten

#### 3.3.1. Validierung der Angiostatin-Produktion durch uPA/SHD

Bei Plg-Inkubation mit uPA und verschiedenen SHD entstanden Banden bei etwa 52, 42 und 36 kDa. Es zeigte sich, dass NAC in der gewählten Konzentration von 100 µM das Ausgangsprotein vollständig abbaut. Der schwächeren Wirkung der uPA/GSH-Behandlung entsprechend war ein Zwischenprodukt der AS-Generation bei 65 kDa auszumachen. Die nach uPA/NAC bei 36 kDa auftretende Bande war bei der uPA/GSH-Inkubation nicht vorhanden. Sowohl die unbehandelte Plg-Probe wie auch die Plg-Ansätze, die ausschließlich mit NAC oder GSH inkubiert wurden, zeigten die unveränderte Wanderung des Ausgangsproteins bei 80–90 kDa (Abb. 38).

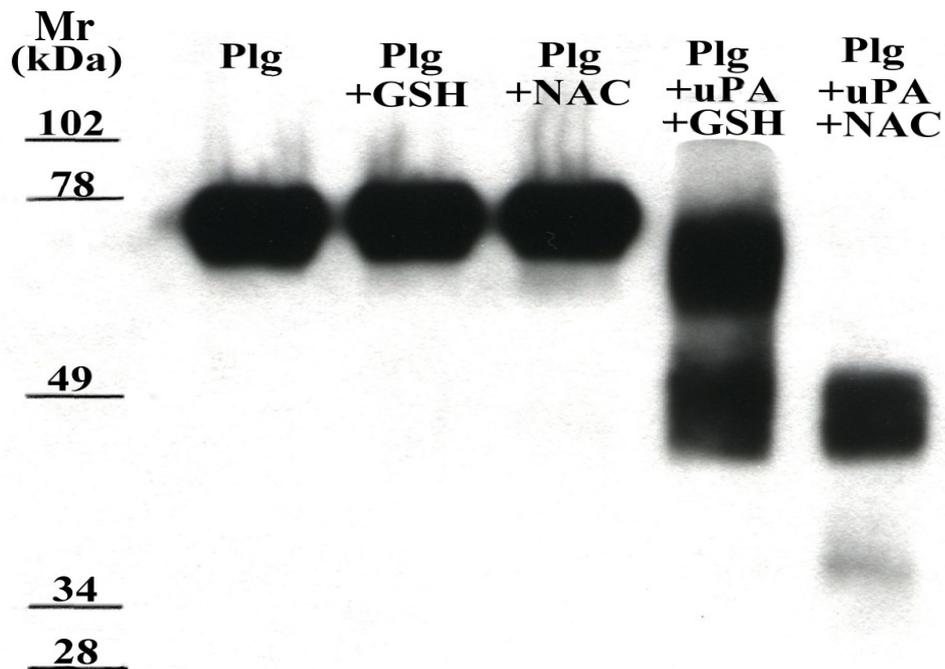


Abb. 38: Produktion von uPA/SHD-Angiostatin durch Inkubation von Plg mit uPA und NAC oder GSH. Die Durchführung der SDS-Gel-Elektrophorese erfolgte unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließendem Western-Blot.

Zur Ermittlung der optimalen NAC-Dosis wurde die NAC-Konzentration variiert. Bei Inkubation von Plg allein und von Plg in isolierter Anwesenheit von 100  $\mu$ M NAC ergaben sich die bekannten Protein-Banden bei 80 und 90 kDa. Bei Zusatz von uPA traten mehrere, nicht abgrenzbare Banden mit Wanderung zwischen 120 und 45 kDa auf. Plg-Behandlung mit 10, 100, 400 und 1000  $\mu$ M NAC in Kombination mit uPA ergab drei separate Banden bei etwa 52, 42 und 36 kDa. Bei 10  $\mu$ M NAC wanderten erhebliche Proteinmengen weiterhin bei 80 kDa, Plg wurde nur unvollständig konvertiert. Bei Verwendung von 100  $\mu$ M NAC zeigte sich die Bande bei 36 kDa am stärksten. 400  $\mu$ M NAC schwächten die drei genannten Banden leicht, 1 mM NAC deutlich ab. Bei Einsatz von 10 mM NAC war kein Protein mehr zu detektieren. Analog dazu zeigte sich eine deutliche Verschmälerung der Plg-Bande, wenn Plg isoliert mit 10 mM NAC inkubiert wurde (Abb. 39).

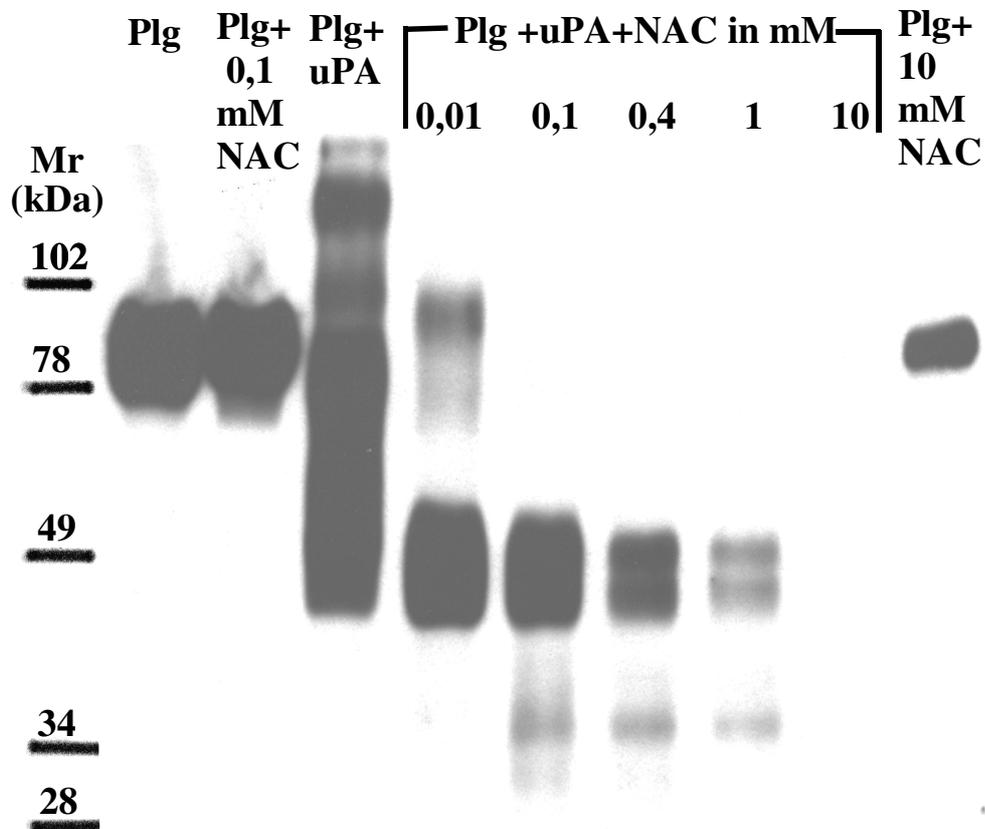


Abb. 39: Dosis-Wirkungsexperiment mit NAC bei der Herstellung von uPA/SHD-Angiostatin. Die ersten drei Spalten sowie die linke Spalte des Western-Blots zeigen Kontrollen. Mittig sind die unterschiedlichen NAC-Konzentrationen aufgetragen.

Verschiedene uPA-Präparationen bzw. Formen (doppelkettiges uPA 1 und 2, d1-uPA und d2-uPA, sowie einkettiges rekombinant hergestelltes uPA, sc-uPA) wurden auf ihre Fähigkeit zur AS-Herstellung untersucht. Übereinstimmend veränderten die drei uPA-Formen ohne NAC-Zusatz das Plg zu Banden zwischen 120 und 52 kDa. Alle Plg-uPA-NAC-Inkubationen resultierten in Banden bei 52, 42 und in der in diesem Experiment übereinstimmend bei jeder uPA-Form fast nicht sichtbaren 36 kDa-Bande. Dabei traten die Banden bei d2-uPA am deutlichsten hervor ( Abb. 40).

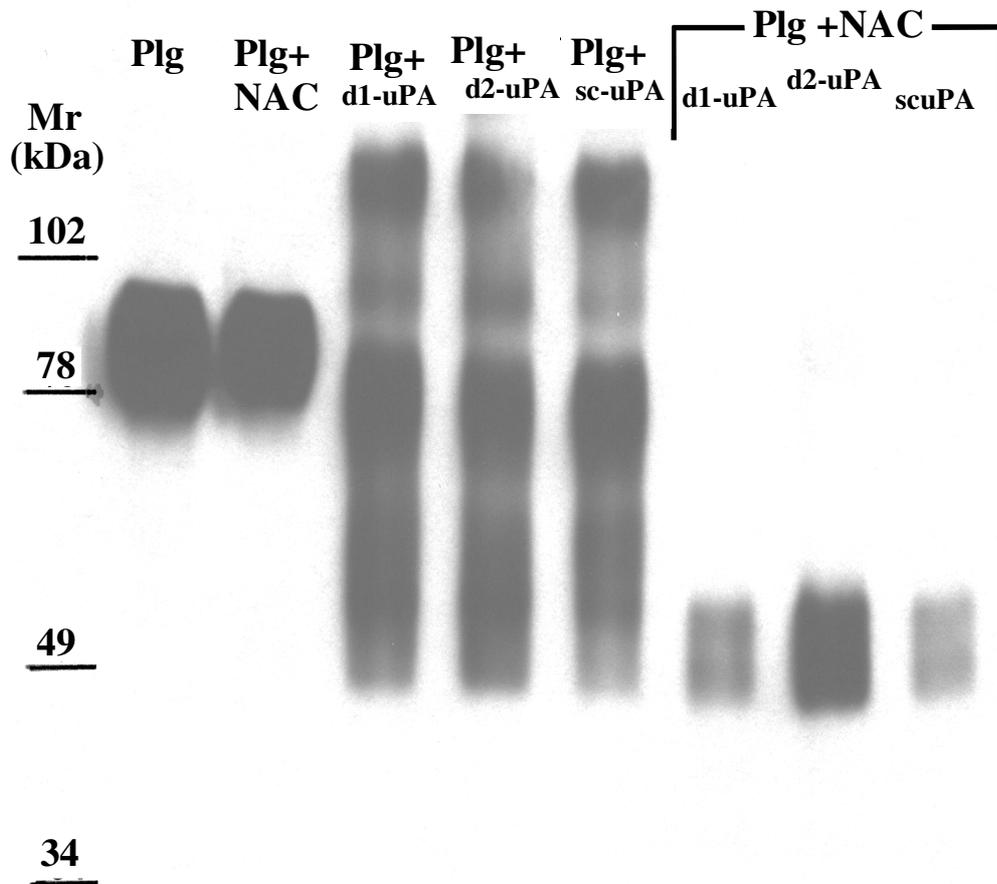


Abb. 40: Einsatz verschiedener uPA-Formen bei der Herstellung von uPA/SHD-Angiostatin. Die ersten beiden uPA-Formen sind doppelkettige Formen unterschiedlicher Hersteller (d1-uPA und d2-uPA). sc-uPA ist eine rekombinant hergestellte, einkettige Variante. Das Ausgangsprotein Plg wurde in Kontrollansätzen isoliert bzw. nur mit NAC bzw. nur mit den verschiedenen uPA-Formen inkubiert (linke Spalten)

uPA wurde in verschiedenen Konzentrationen mit NAC (100 $\mu$ M) zur AS-Gewinnung eingesetzt. Der Kontrollansatz ohne uPA bei alleiniger Plg-Inkubation mit NAC ergab ein unverändert bei 80-90 kDa wanderndes Plg. Alle getesteten uPA-Dosen zeigten Plg-Konversionsaktivität. Während bei 0,1 nM uPA Plg-Spuren erhalten blieben, zeigten sich keine Unterschiede der Konzentrationen 1, 10 und 20 nM. Bei Verwendung von 100 nM uPA kamen die Banden bei 52 und 42 kDa schwächer zur Darstellung ( Abb. 41).

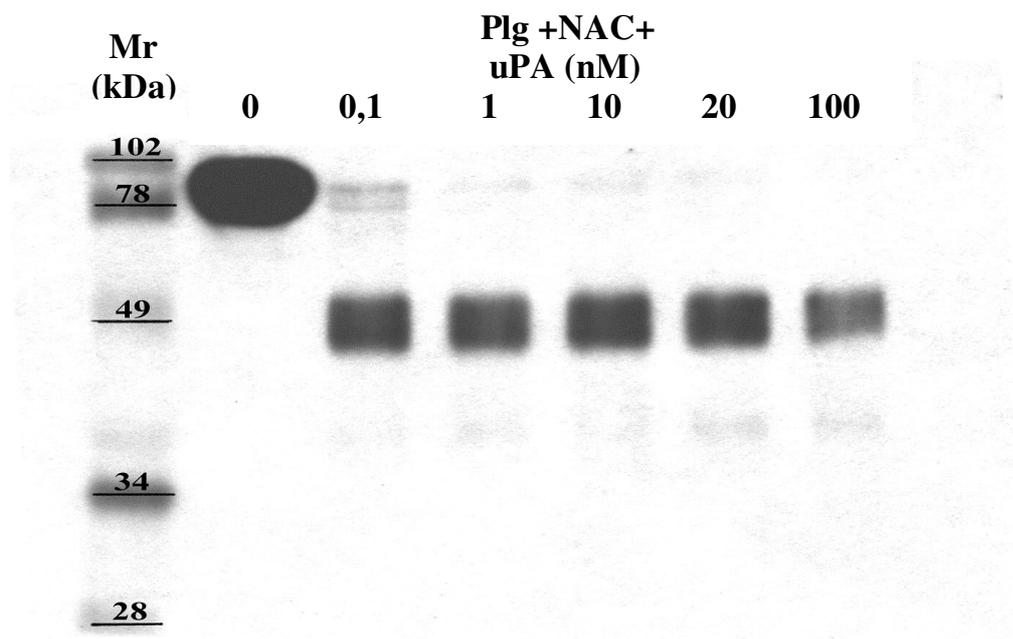


Abb. 41: Dosis-Experiment mit uPA bei der Herstellung von uPA/SHD-Angiostatin. Der dargestellte Western Blot zeigt in der ersten Spalte Plasminogen nach isolierter NAC-Behandlung. Nebenstehend sind die Ergebnisse ansteigender (um Faktor 1000 variiertes) NAC-Dosen zu erkennen.

### 3.3.2. Herstellung von uPA/SHD-Angiostatin

Durch Inkubation von Plg mit uPA (sc-uPA) und NAC als SHD wurde Angiostatin in größeren Mengen hergestellt. Nach 21 h wurde das Experiment bei 37°C gestoppt. Aus zwei verschiedenen Reaktionsgefäßen wurden jeweils 15 ml Probe entnommen und durch ‚Coomassie‘-Färbung analysiert. Als Kontrollsubstanzen dienten Substanzen aus den Vorversuchen (Plg ; Plg mit NAC; Plg mit uPA; Plg mit uPA und NAC). Das Wanderungsverhalten der generierten Banden stimmte mit den Vorversuchen überein (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei der nachfolgend durchgeführten Affinitätschromatographie mit Lysin-Sepharose ergab sich etwa 90 min nach Beginn der Elution ein Proteinaustritt in den Fraktionen 44-56 (nicht gezeigt). Die Elution wurde 5 h fortgesetzt, ohne dass

weiterer Proteinaustritt gemessen wurde. In der Analyse durch Coomassie-Färbung nach SDS-Elektrophorese waren Banden von 52 bis 42 kDA für die genannten Fraktionen festzustellen. Das zum Vergleich parallel getestete uPA/SHD der Vorexperimente zeigte identisches Wanderungsverhalten (Abb. 42).

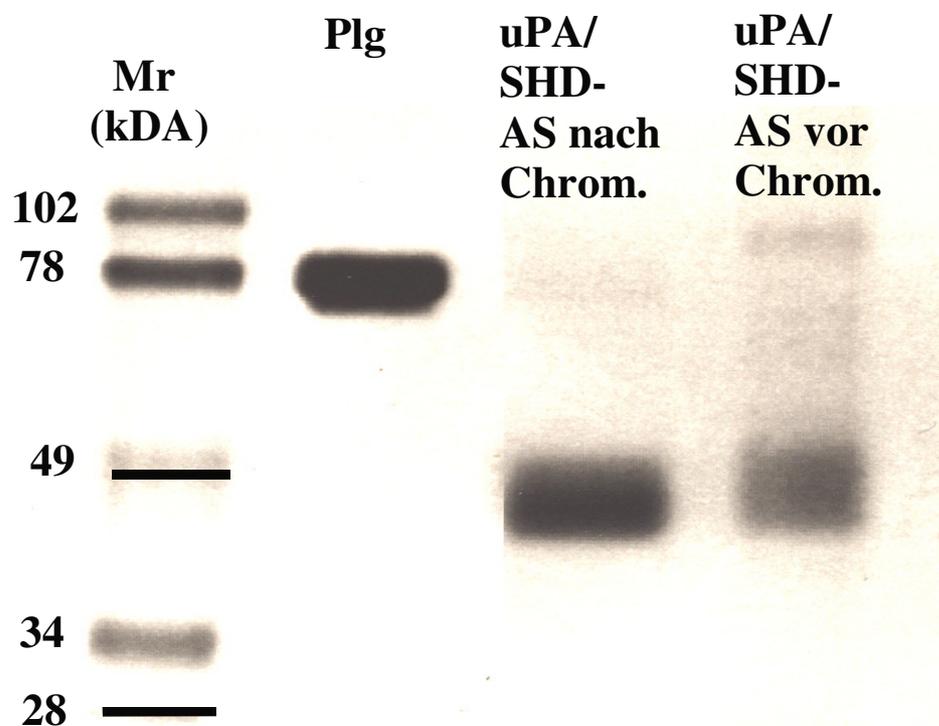


Abb. 42: SDS-Elektrophorese: Vergleich des chromatographisch aufgereinigten uPA/SHD-Angiostatin (Mitte) mit dem uPA/SHD-AS der Vorexperimente (rechts). Links ist zur Kontrolle Plasminogen gezeigt.

Die Fraktionen 42-53 wurden zu einem ‚Pool‘ zusammengefasst. Durch Volumenkonzentration wurde das Volumen auf 4,5 ml reduziert. Die nach 72 h Dialyse gegen PBS (pH 7,4) durchgeführte Bestimmung der Proteinkonzentration ergab einen Wert von 0,55 mg/ml (nicht gezeigt).

### 3.3.3. Vergleich verschiedener Angiostatin-Varianten

AS wurde durch Elastase-Proteolyse von Plg aus humanem Plasma hergestellt und lag nach Affinitätschromatographie durch Lysin-Sepharose und lag nach anschließender Volumeneinengung in einer Konzentration von 1,4 mg/ml vor (Thomas Schmidt, Biochemisches Institut der Justus-Liebig-Universität Giessen). Zur AS-Herstellung wurde Plg einer Proteolyse mit

Pankreas-Elastase unterzogen, nachfolgend wurden chromatographisch die Lysinbindenden Proteine gewonnen. Die eluierten Proteine wurden nach Volumeneinengung durch Gelfiltration aufgetrennt und durch SDS-Elektrophorese untersucht. Durch SDS-Elektrophorese wurden die AS-Formen verglichen. Es zeigten sich unter nicht-reduzierenden Bedingungen für El.-AS (Protein 1) Banden bei 35 und 32 kDa. El.-AS (Protein 2) wanderte bei 29 und 26 kDa. uPA/SHD-AS stellte sich mit Banden bei 52 und 42 kDa dar. Bei reduzierendem Probenpuffer fanden sich die Proteine der El.-AS-Präparation bei 42 kDa und 38 kDa wieder. uPA/SHD-AS wandert unter Probenreduktion bei etwa 65 kDa (Abb. 43).

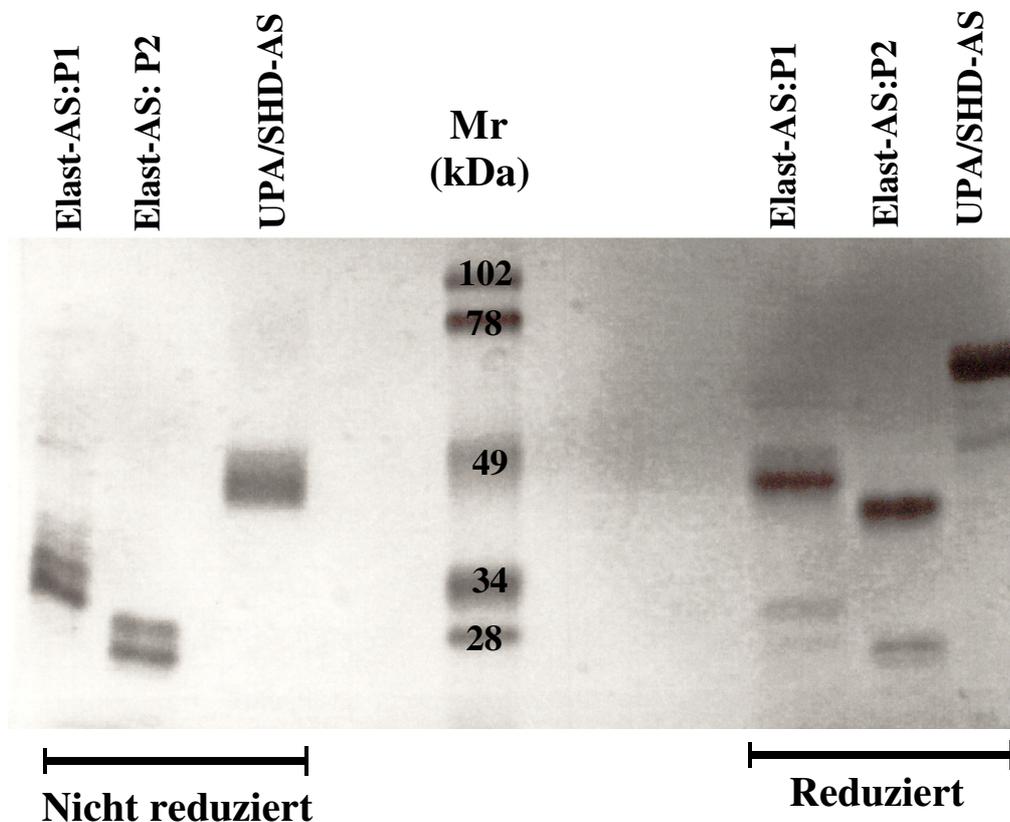


Abb. 43: Elektrophoretischer Vergleich von El.-AS und uPA/NAC-AS bei nicht-reduzierendem und bei reduzierendem Puffer. In den linken drei Elektrophorese-Kammern wurde nicht-reduzierender Probenpuffer, rechts reduzierender Substanzpuffer verwendet.

Zum weiteren Vergleich der AS-Präparationen miteinander wurden die jeweiligen N-terminalen Aminosäuren sequenziert. Die Bestimmung der ersten zehn Aminosäuren ergab für uPA/SHD-AS zwei geringfügig verschiedene N-terminale Anfangssequenzen: KVYLSEXKTG bzw. VYLSEXKTGN und entsprechen damit den Aminosäuren 97-106 bzw. 98-107 des Plg. Dieses Resultat zeigte sich für beide Banden (bei 52 und 42 kDa unter nicht-reduzierenden

Konditionen). Beide Proteine des EL.-AS (42 und 38 kDa unter nicht-reduzierenden Bedingungen) wiesen YLSEXKTGNG als N-Terminus auf (Aminosäuren 99-108 des Plg). Zusätzlich wurde das 14 kDa-Protein der Elastase-Präparation analysiert, dabei ergab sich die N-terminale Aminosäurenfolge VQDXYHGDGQ (374 bis 383 des Plg).

Es wurde der Plg-Rest teilsequenziert, der nach Abspaltung von EL.-AS aus Plg verblieb. Dabei ergaben sich mit VAPPPVLLP, APPPVLLPD und LLPDVETPSE drei unterschiedliche Aminosäurefolgen. Sie entsprachen den Aminosäuren 462-471, 463-472 und 469-478 des humanen Plg. Der Versuch, den Plg-Rest nach Abspaltung von uPA/SHD-AS zu sequenzieren, blieb erfolglos. Es waren nur schwache und uneinheitliche Aminosäuren-Abfolgen zu erkennen, die keine Zuordnung zur Sequenz des humanen Plg zuließen (Abb. 44).

<b>1</b>	<b>21</b>	<b>41</b>
MEHKEVVLLL	LLFLKSGQGE	PLDDYVNTQG ASLFSVTKKQ LGAGSIEECA AKCEEDEEFT
<b>61</b>	<b>81</b>	<b>101</b>
CRAFQYHSKE	QQCVIMAENR	KSSIIIRM RD VVLFEKN <u>KVYL</u> SECKTGNGKN YRGTM SKTKN
<b>121</b>	<b>141</b>	<b>161</b>
GITCQKWSST	SPHRPRFSPA	THPSEGLEEN YCRNPDNDPQ GPWCYTTDPE KRYDYCDILE
<b>181</b>	<b>201</b>	<b>221</b>
CEEECMHCSG	ENYDGKISKT	MSGLECAWD SQSPHAHGYI PSKFPKNL KNYCRNP DRE
<b>241</b>	<b>261</b>	<b>281</b>
LRPWCFTTDP	NKRWELCDIP	RCTTPPPSSG PTYQCLKGTG ENYRGNVAVT VSGHTCQHWS
<b>301</b>	<b>321</b>	<b>341</b>
AQTPHHTNRT	PENFPCKNLD	ENYCRNPDGK RAPWCHTTNS QVRWEYCKIP SCDSSPVSTE
<b>361</b>	<b>381</b>	<b>401</b>
QLAPTAPPEL	TPV <u>VQDCYHG</u> DGOSYRG TSS	TTTTGKKCQS WSSMTPHRHQ KTPENYPNAG
<b>421</b>	<b>441</b>	<b>461</b>
LTMNYCRNPD	ADKGPWCFTT	DPSVRWEYCN LKKCSGTEAS <u>VVAPPPVLL</u> <u>PDVETPSEED</u>
<b>481</b>	<b>501</b>	<b>521</b>
CMFGNGKGYR	GKRATTVTGT	PCQDWAAQEP HRHSIFTPET NPRAGLEKNY CRNPDGDVGG
<b>541</b>	<b>561</b>	<b>581</b>
PWCYTTPNPK	LYDYCDVPQC	AAPSFDCGKP QVEPKKCPGR VVGGCVAHPH SWPWQVSLRT
<b>601</b>	<b>621</b>	<b>641</b>
RFGMHFCGGT	LISPEWVLT A	AHCLEKSPRP SSYKVILGAH QEVNLEPHVQ EIEVSRLFLE
<b>661</b>	<b>681</b>	<b>701</b>
PTRKDIALLK	LSSPAVITDK	VIPACLPSPN YVADRTECF ITGWGETQGT FGAGLLKEAQ
<b>721</b>	<b>741</b>	<b>761</b>
LPVIENKVCN	RYEFLNGRVQ	STELCAGHLA GGT DSCQGDS GGPLVCFEKD KYILQGVTSW
<b>781</b>	<b>801</b>	
GLGCARP NKP	GVYVRVSRFV	TWIEGVMRNN

Abb. 44: Vergleich der Aminosäuresequenzen der hergestellten Angiostatin-Formen. Abgebildet ist die Aminosäurefolge von humanem Plasminogen, die fettgedruckten Angaben beziffern die Aminosäuren zu Beginn der jeweiligen darunter dargestellten 10er Reihe (Leerzeichen am Beginn jeder 10er Reihe). Die **rot unterlegten Buchstaben** stellen zwei alternative Anfänge des hergestellten uPA/SHD-AS dar, die **rote Unterstreichung** zeigt die sequenzierte Aminosäurefolge. **Blau** hervorgehoben ist der Beginn des generierten EL.-AS, die **blaue Unterstreichung** symbolisiert die nachgewiesene Sequenzabfolge. Der **pink unterlegte Buchstabe** markiert den **Start der Aminosäurefolge (pink)** des **bei 14 kDa wandernden Proteins** der Elastase-Präparation. **Grüne Buchstaben/Unterstreichungen** zeigen zwei nachgewiesene Anfangssequenzen des **Plasminogenrestes nach Elastase-Präparation**. Eine **alternative Anfangssequenz des Plasminogenrestes nach Elastase-Proteolyse** ist **orange** hervorgehoben. Bezüglich der Aminosäurenomenklatur siehe Abkürzungsverzeichnis.

### 3.4. Angiogenese-Inhibitoren im ‚Sprouting‘ Assay

#### 3.4.1. Zyklisches RGD-Peptid und TGF- $\beta$ 1

cRGD und TGF- $\beta$ 1 wurden als potentielle Angiogenese-Inhibitoren im SpA getestet. Das Wachstum der Sp wurde mit bFGF induziert (100%-Wert). TGF- $\beta$ 1 und cRGD reduzierten die Sp-Rate auf 26% bzw. 8% (Abb. 45). Die als Gegenprobe verwendeten Pufferlösungen zeigten keine inhibitorische Wirkung (TGF- $\beta$ 1-Puffer: 91%; cRGD-Puffer: 156%).

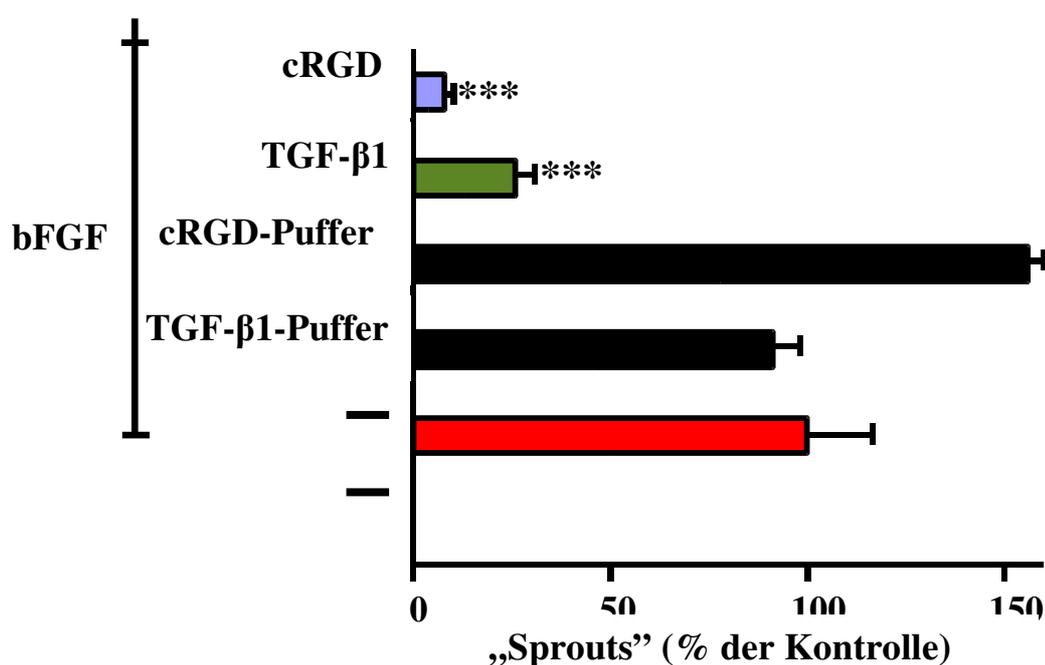


Abb. 45: Einsatz von cRGD und TGF- $\beta$ 1 und deren Pufferlösungen im Sp-Assay. Das Diagramm stellt Mittelwerte (+Standardabweichungen) aus drei Experimenten dar (in Duplikaten durchgeführt; n = 6). Die Puffer-Lösungen wurden in einem Experiment parallel getestet (n = 2). Sternsymbole geben signifikante Inhibition gegenüber bFGF an (p < 0,001: \*\*\*).

Beim Einsatz verschiedener cRGD-Dosen verminderten 0,5  $\mu$ g/ml cRGD die Sp-Entstehung um etwa ein Drittel. 1  $\mu$ g/ml cRGD reduzierten die Angiogenese-Rate auf 27%, 5 und 10  $\mu$ g/ml cRGD jeweils auf 10% des Ausgangswertes (100%). TGF- $\beta$ 1 bewirkte ab der Dosis von 1,0 ng/ml eine Inhibition der Sp-Bildung auf 57%. Mit der höchsten getesteten Dosis (40 ng/ml TGF- $\beta$ 1) ließ sich eine Sp-Rate von etwa einem Fünftel (19%) des Ausgangswertes messen (Abb. 46).

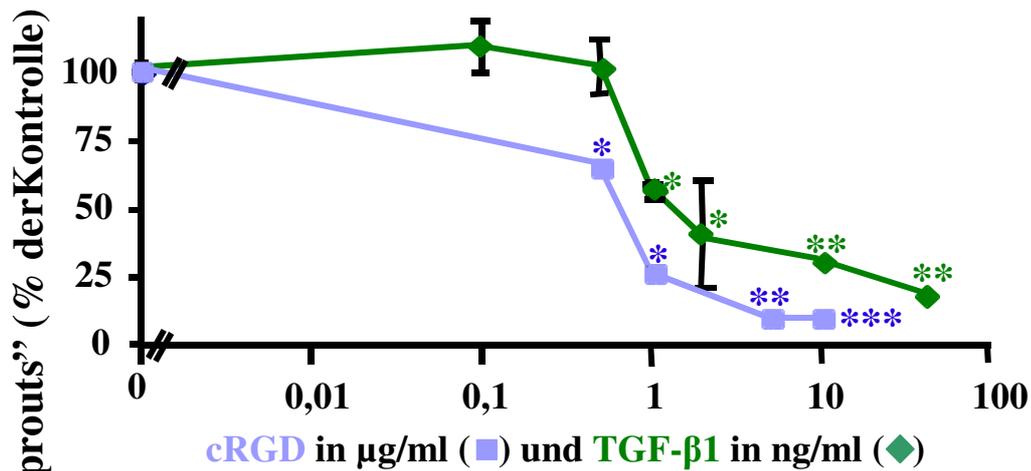


Abb. 46: Dosis-Wirkungsexperiment mit cRGD und TGF-β1 bei Stimulation der BREC mit bFGF. Das Diagramm zeigt Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) aus zwei in Duplikaten durchgeführten Experimenten (n = 4). Für die TGF-β1-Konzentration von 0,5 ng/ml und 40 ng/ml gilt n = 2. Signifikantes Abweichen der Werte vom bFGF-Ausgangswert ist durch \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01) und \*\*\* (p < 0,001) angezeigt).

Beim parallelen Funktionstest (jeweils 10 µg/ml) von cRGD mit linearem RGD-Peptid (linRGD) und linearem RGE-Peptid (linRGE) inhibierte cRGD die bFGF-induzierte (100%) Sp-Entstehung auf 8% und linRGD auf 28%. linRGE (91%) beeinflusste die Ausbildung der Sp nicht signifikant (Abb. 47).

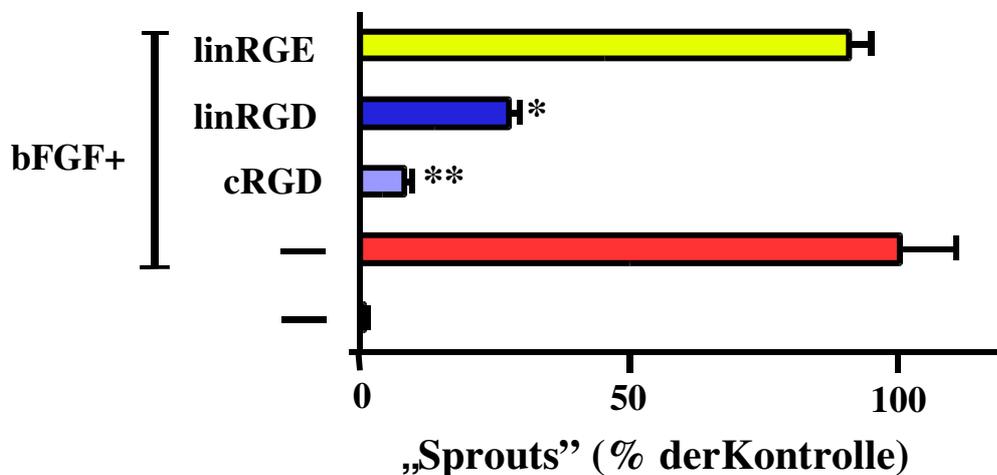


Abb. 47: Tests zur Spezifität der antiangiogenen cRGD-Wirkung. Zyklisches und lineares RGD-Peptid (cRGD; linRGD) wurden parallel mit dem sich in einer Aminosäure unterscheidenden RGE-Tripeptid bei bFGF-stimulierten BREC eingesetzt. Die Balken symbolisieren Mittelwerte (+ Standardabweichungen) aus zwei Experimenten (jeweils in Duplikaten, n = 4). Signifikante Verminderung der Sproutrate gegenüber bFGF durch \* (p < 0,05) bzw. \*\* (p < 0,001) angegeben.

Die inhibitorische Potenz von cRGD ließ sich unabhängig von den Stimulationsbedingungen (bFGF, VEGF, ECGF/H) reproduzieren. Bei Stimulation der BREC durch ECGF/H blieb der erwartete antiangiogene Effekt durch TGF-β1 aus. Es wurde in zwei Experimenten verschiedene Konzentrationen von ECGF/H bei gleichzeitigem Zusatz von 10 ng/ml TGF-β1 getestet.

Nach Stimulation mit ECGF/H (100% Bezugswert: Sp nach 5 ng/ml bFGF) waren nach 24 h durch TGF- $\beta$ 1 keine Änderungen der Angiogenese-Aktivität zu sehen (statistisch nicht signifikante Erhöhung um 50%, 22%, 13% und 22% gegenüber der Vergleichsrate bei 1,5; 7,5  $\mu$ g/ml; 15  $\mu$ g/ml und 30  $\mu$ g/ml ECGF/H). Bei erneuter Auswertung nach 48 h enthielten die TGF- $\beta$ 1- Ansätze in der 1,5  $\mu$ g/ml ECGF/H-Konzentration anscheinend mehr Sp (143% gegenüber 66% Sp bei Fehlen von TGF- $\beta$ 1). Die statistische Überprüfung ergab dabei einen errechneten t-Wert knapp unterhalb des Signifikanzniveaus bei  $n = 4$ . Für die verwendeten höheren ECGF/H-Konzentrationen (7,5; 15 und 30  $\mu$ g/ml ECGF/H) ergaben sich in An- bzw. Abwesenheit ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede (179 gegenüber 95% Sp, 178 % gegenüber 141% Sp und 171% gegenüber 151% Sp – siehe Abb. 48).

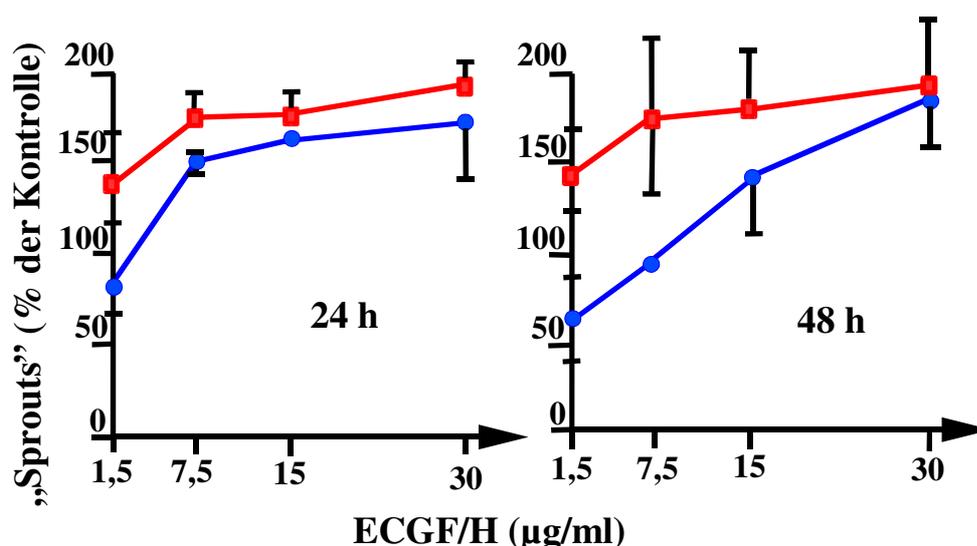


Abb. 48: Dosis-Wirkungstests mit ECGF/H in **Abwesenheit (blaue Kurven)** und **Anwesenheit von 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (rote Kurven)**. Linke Bildhälfte zeigt Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) nach 24 h und rechte Bildhälfte nach 48 h Versuchsdauer. Daten sind in zwei Experimenten ermittelt ( $n = 4$ ), dabei gilt für die 7,5 und 15  $\mu$ g/ml ECGF/H-Werte  $n = 2$  (Mittelwerte +/- durchschnittliche Abweichung).

Die zwei AS-Formen und Kringle 5-Fragment wurden bei Stimulation mit 3-5 ng/ml VEGF in 0,5% FBS-haltigem Medium untersucht. Als Kontrollinhibitor verringerte cRGD (6%) den Sp-Wert auf ein Niveau, das unterhalb dem der unstimulierten Kontrolle lag (13%). Weder uPA/SHD-AS (108%), El.-AS (119%) noch Kringle 5-Fragment (111%) verringerten die Sp-Rate (Abb. 49).

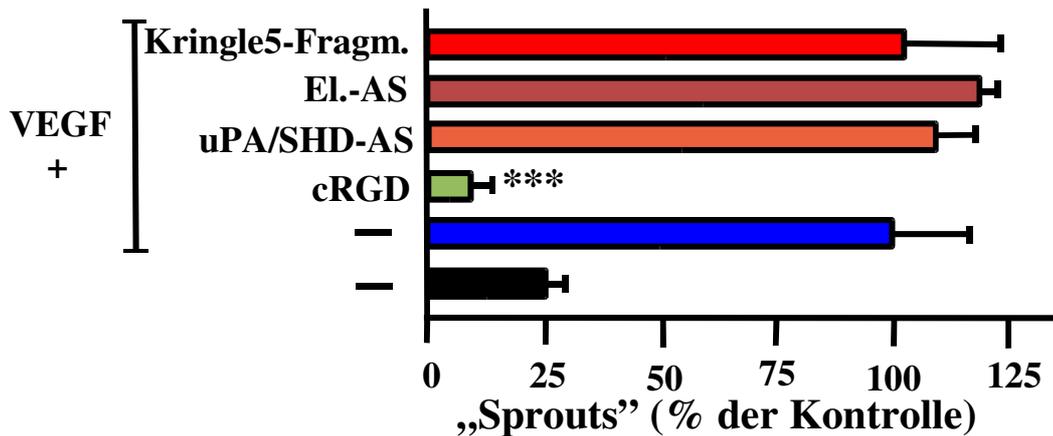


Abb. 49: Funktionstests mit den AS-Varianten und Kringle 5-Fragment im SpA nach Stimulation mit VEGF in 0,5% FBS. Applikation von cRGD als Kontrollsubstanz. Im Diagramm sind die Mittelwerte (+ Standardabweichungen) aus zwei in Duplikaten durchgeführten Experimenten (n = 4, für uPA/SHD-AS gilt n = 2) dargestellt. Signifikante Inhibition durch \*\*\* (p < 0,001) im Vergleich zum VEGF-Ansatz angegeben.

Die gleichen Substanzen wurden bei veränderten Assaykonditionen getestet (Stimulation mit 5 ng/ml bFGF in 0,5-5% FBS). Der unstimulierte Ansatz zeigte keine relevante Sp-Rate, die Inhibition durch cRGD (11%) war hoch signifikant vorhanden. Bei Einsatz von uPA/SHD-AS (105%), El.-AS (109%) und Kringle5-Fragment (113%) wurden Sp-Raten erzielt, die nicht signifikant von dem Wert der bFGF-Stimulation (100%) abwichen (Abb. 50).

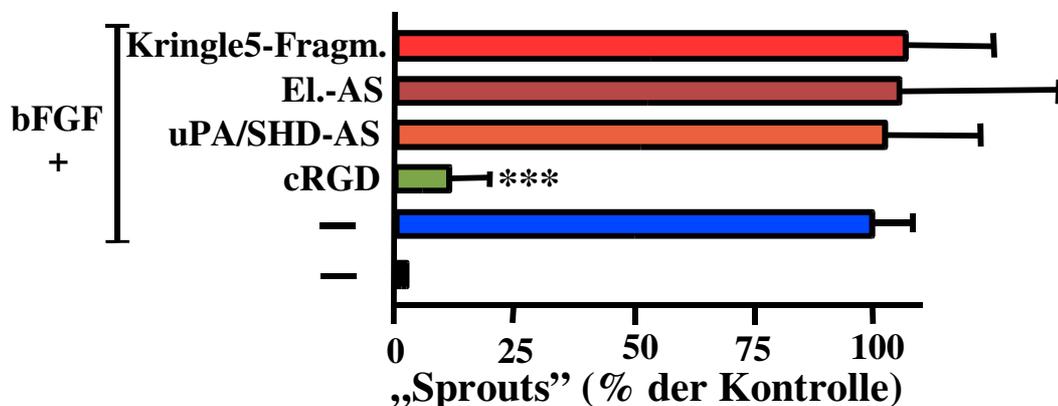


Abb. 50: Einsatz der AS-Varianten und Kringle 5-Fragment im SpA nach Stimulation mit bFGF in 0,5-5% FBS. CRGD diente als Kontrollinhibitor. Das Diagramm stellt Mittelwerte (+ Standardabweichungen) aus drei in Duplikaten durchgeführten Experimenten (n = 6). Durch \*\*\* (p < 0,01) wird signifikante Inhibition im Vergleich zum VEGF-Ansatz angezeigt.

Bei weiterer Modifikation der Assaydurchführung (Stimulation mit bFGF in 0,5% FBS, Sp-Induktion mit VEGF in 5% FBS, Verwendung von ECGF/H, Auswertung nach längeren Zeiträumen, Zugabe von bFGF in der Dosis von 1ng/ml) waren keine prinzipiellen Abweichungen von den gezeigten Resultaten zu sehen. Im Dosis-Wirkungsexperiment zeigte keine der getesteten Dosen der

Angiostatine einen signifikanten Effekt auf die Angiogenese der BREC, während das als Kontrolle applizierte cRGD inhibitorisch war (Abb. 51).

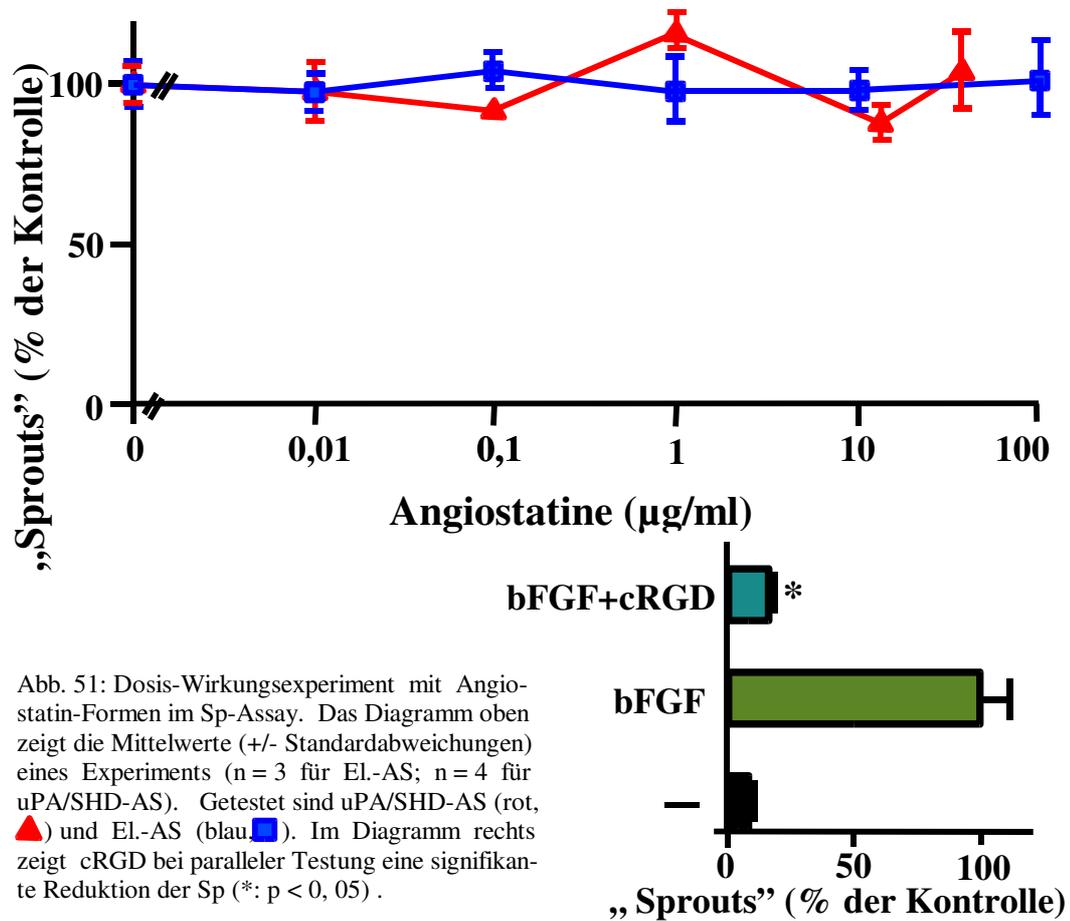


Abb. 51: Dosis-Wirkungsexperiment mit Angiostatin-Formen im Sp-Assay. Das Diagramm oben zeigt die Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) eines Experiments (n=3 für EL-AS; n=4 für uPA/SHD-AS). Getestet sind uPA/SHD-AS (rot, ▲) und EL-AS (blau, ■). Im Diagramm rechts zeigt cRGD bei paralleler Testung eine signifikante Reduktion der Sp (\*: p < 0,05).

Der Einsatz der Endostatin (ES)-Formen im SpA erfolgte zunächst in 0,5% FBS bei VEGF-Stimulation (3 - 5ng/ml). Als Kontrolle dienten die Werte der unstimulierten (20%) und der cRGD-behandelten (14%) BREC. Keine der untersuchten ES-Formen veränderte die Sp-Rate erkennbar (Abb. 52).

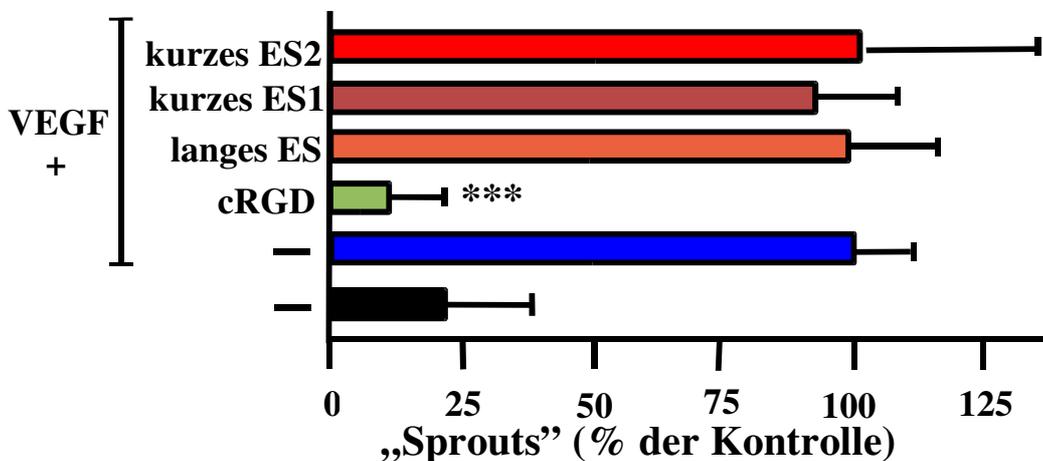


Abb. 52: Einsatz verschiedener Endostatin-Formen (ES) nach Stimulation mit VEGF in 0,5% FBS. cRGD parallel getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte (+Standardabweichungen) aus drei in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführten Experimenten (n = 7; für kurzes ES 2 gilt n = 4). Durch \*\*\* (p < 0,001) ist eine signifikante Hemmung im Vergleich zum VEGF-Ansatz kenntlich gemacht.

Bei bFGF-induzierter Angiogenese in 5% FBS war weder durch langes ES (106%) noch bei Zusatz der kurzen ES-Formen (111% bzw. 106%) eine inhibitorische Wirkung zu beobachten. cRGD verringerte die Sp-Entstehung auf 11% des bFGF-Ansatzes (100%, Referenzwert - Abb. 53).

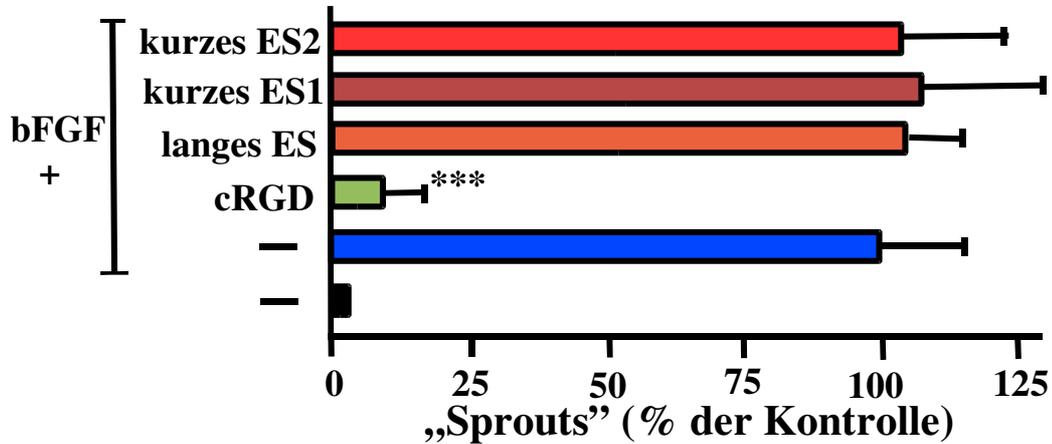


Abb. 54: Tests mit Endostatin-Formen im SpA nach bFGF-Stimulation in 5% FBS (cRGD als Kontrollinhibitor). Die Graphik zeigt Mittelwerte (+Standardabweichungen) aus drei in Duplikaten durchgeführten Experimenten (n = 6; für kurzes ES 2 gilt n = 4). Signifikante Inhibition ist durch \*\*\* (p < 0,001) kenntlich gemacht.

Bei veränderten Stimulationsbedingungen (wie bei Funktionstests mit AS; s.o.) wurde auf antiangiogene Potenz von ES untersucht. Im Dosis-Wirkungsexperiment wichen sowohl bei kurzem ES (89%, 96%, 103%) als auch bei langem ES (89%, 92%, 115%) die Sp-Raten nicht signifikant von der ECGF/H-stimulierten Kontrolle ab (100%, Referenzwert). cRGD (30%) diente als Kontrolle (Abb. 54).

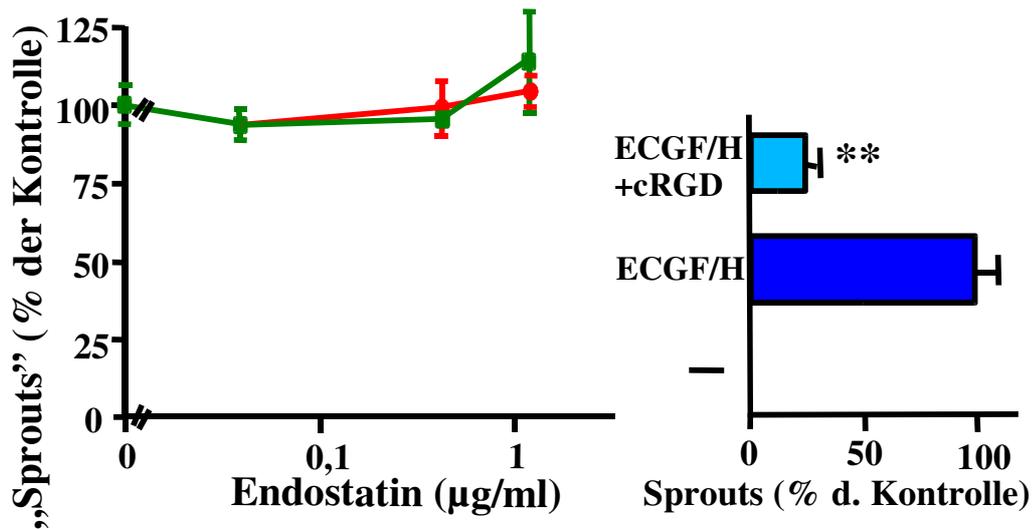


Abb. 54: Dosis -Wirkungsexperiment mit langem ES (grün, ■) und kurzem ES (rot, ●) nach Stimulation mit ECGF/H im SpA. Das Diagramm links zeigt Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) aus zwei in Duplikaten durchgeführten Experimenten (n = 4). Im Balkendiagramm rechts sind die Kontrollen dargestellt: cRGD, unstimulierte BREC. Signifikante Inhibition durch \*\* (p < 0,01) angezeigt.

Ergänzende Dosis-Experimente wurde mit ES-Formen bei Stimulation durch VEGF und bFGF unternommen, ohne dass abweichende Resultate beobachtet wurden (nicht gezeigt).

### 3.4.3. Einfluss von Angiostatin und Endostatin auf Proliferation von BREC

AS und ES wurden im Proliferationsexperiment eingesetzt. Als 100% - Bezug wurde die Wachstumsrate unstimulierter BREC aufgefasst. Weder El.-AS, uPA/SHD-AS noch Kringle 5 – Fragment bewirkten signifikante Veränderungen der Zellzahl (106%, 121%, 101%). Auch die lange ES-Form und die zwei Varianten des kürzeren ES beeinflussten die Proliferationsrate unstimulierter BREC nicht (114%, 108%, 94%). TGF- $\beta$ 1 verringerte das Zellwachstum auf 58% und cRGD auf 76%. bFGF wirkte proliferationsverstärkend und erhöhte die BREC-Zahl auf 186%. TGF- $\beta$ 1 (84%) und cRGD (116%) zeigten in Anwesenheit von bFGF eine deutliche Hemmung des EZ-Wachstums. El.-AS (225%), uPA/SHD-AS (226%), Kringle 5-Fragment (206%), langes ES (191%) und die kurzen ES-Formen (180% und 195%) blieben ohne Effekt (Abb. 55).

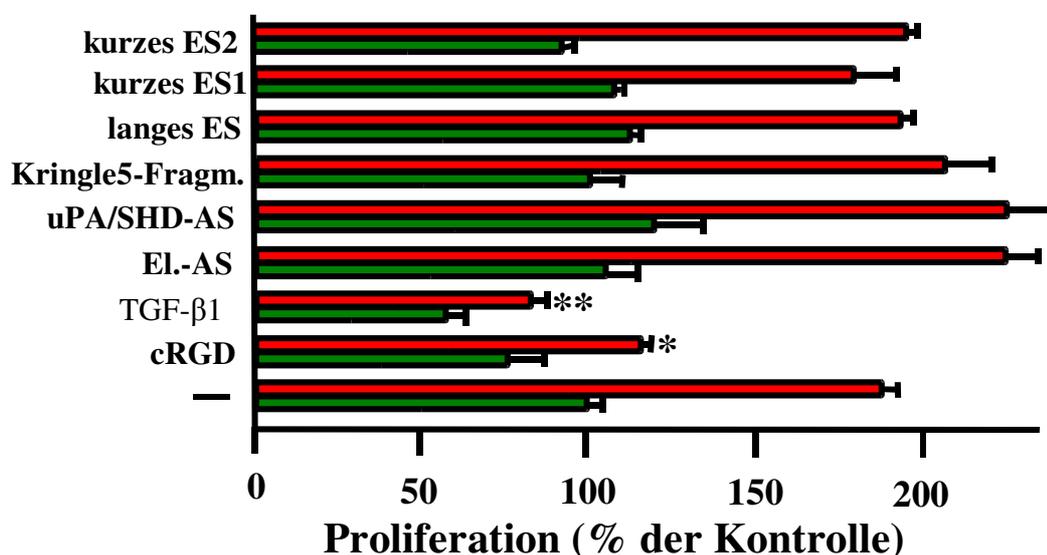


Abb. 55: Endostatin-Formen (ES), Angiostatin (AS)-Varianten und Kringle 5-Fragment wurden bei Stimulation mit bFGF (rote Balken) und bei unstimulierten BREC (grüne Balken) getestet. TGF- $\beta$ 1 und cRGD wurden parallel appliziert. Als Vergleichswert (100%) wurde das Wachstum un behandelter Zellen angesehen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte (+Standardabweichungen) eines in Triplikaten durchgeführten repräsentativen Experiments (n = 3). Sternsymbole zeigen signifikante Hemmung gegenüber der bFGF-Stimulation an (\* : p < 0,05; \*\*: p < 0,01).

In Dosis-Wirkungsuntersuchungen wurden EL.-AS und uPA/SHD-AS in Proliferationsexperimenten mit BREC eingesetzt. Die verwendeten EL.-AS-Konzentrationen von 1  $\mu\text{g/ml}$  (94%), sowie 5 (87%), 10 (99%), 15 (92%) und 20  $\mu\text{g/ml}$  (117%) veränderten das Wachstum unstimulierter BREC (100%) nicht signifikant. bFGF-Stimulation erhöhte das BREC-Wachstum auf 256%. Auch hier erzielte keine der eingesetzten EL.-AS-Konzentrationen Effekte. Ein ähnliches Bild ergab sich in Funktionstests mit uPA/SHD-AS. Gegenüber dem Wert der unstimulierten Kontrolle (100%) blieb jede der angewendeten Dosen (1, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{g/ml}$ ) ohne Einfluss (106%, 109%, 108%, 108%, 107%). Auch bei bFGF-behandelten BREC erzielten die genannten uPA/SHD-AS-Konzentrationen Wachstumsraten, die um den Referenzwert (280%) schwankten (Abb. 56).

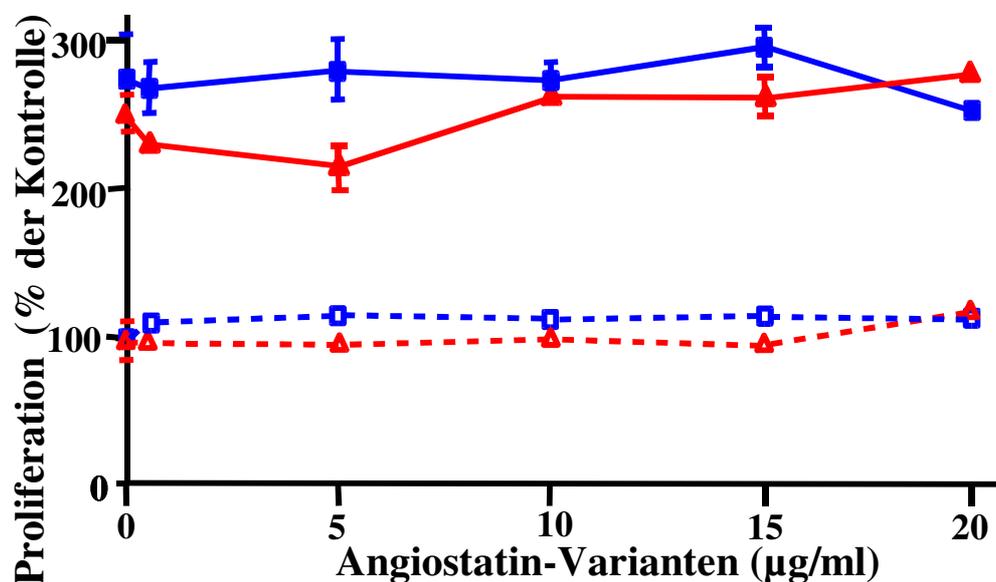


Abb. 56: Dosis-Wirkungsexperiment mit uPA/SHD-Angiostatin (blau) und Elastase-Angiostatin (rot) bei Proliferation unstimulierter (□, △) und bFGF-stimulierter (■, ▲) BREC. Darstellung der Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) eines in Triplikaten durchgeführten Experiments (n = 3).

Langes und kurzes ES wurden in Konzentrationen von 0,04 bis 1,2  $\mu\text{g/ml}$  im Proliferationsexperiment untersucht. Unstimulierte BREC (100%) wurden weder durch langes ES (93-98% des Referenzwertes) noch durch kurzes ES (86-102% des Bezugswertes) signifikant in ihrer Wachstumsrate beeinflusst. Nach bFGF-Zusatz erhöhte sich die Proliferation auf 165%, langes ES zeigte keinen Effekt - in den eingesetzten Konzentrationen ergab sich ein relatives Zellwachstum, das zwischen 163 und 182% schwankte. Im Dosisexperiment mit

kurzem ES war der Bezugswert der bFGF-Stimulation 174%. Bei Einsatz von ES ergab sich eine Wachstumsrate von minimal 154% (0,4  $\mu\text{g/ml}$  kurzes ES) bzw. 157% (4  $\mu\text{g/ml}$  kurzes ES) - siehe Abb. 57.

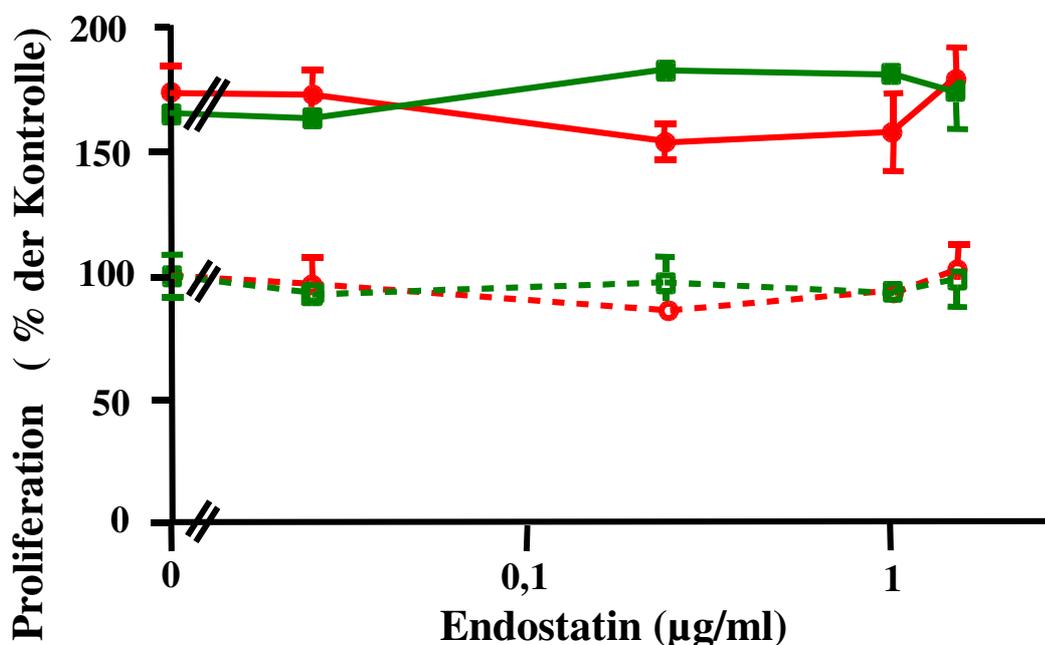


Abb. 57: Dosis-Wirkungsexperiment mit langem ES (grün) und kurzem ES1 (rot) bei Proliferation unstimulierter (■,●) und bFGF-stimulierter (■,●) BREC. Darstellung der Mittelwerte (+/- Standardabweichungen) eines in Triplikaten durchgeführten Experiments (n = 3).

#### 3.4.4. Wirkung der Angiostatine und Endostatine auf HUVEC-Proliferation

Die Wirkung der Angiostatine, von Kringle 5-Fragment sowie der Endostatine auf die Proliferation von HUVEC wurde untersucht. Dabei erfolgte ihr Einsatz bei bFGF-stimulierten und unstimulierten HUVEC. Als Referenzwert wurde die Wachstumsrate unstimulierter HUVEC angesehen (100%). Keine der getesteten Substanzen verringerte die Proliferationsrate unstimulierter HUVEC, die gemessenen relativen Werte schwankten zwischen 104 und 114%. Bei erfolgter bFGF-Stimulation erhöhte sich die Zellzahl auf 188%. Weder EI.-AS (170%), uPA/SHD-AS (183%), Kringle 5-Fragment (177%) noch langes ES (195%) oder kurzes ES (177%) wirkten signifikant antiproliferativ auf HUVEC (Abb. 58).

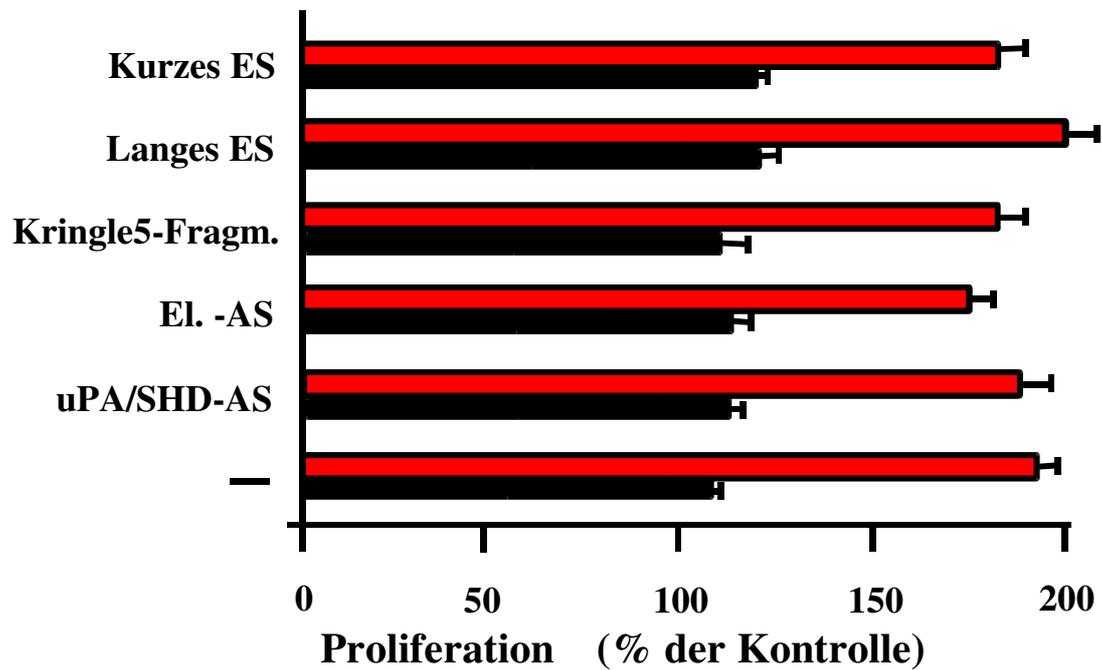


Abb. 59: Im Proliferationsexperiment mit HUVEC wurden die verschiedenen Endostatin-Formen, die Angiostatin-Varianten sowie das Kringel 5-Fragment getestet. Gezeigt sind die Mittelwerte (+Abweichungen) eines repräsentativen Experiments. Die roten Balken symbolisieren bFGF-Stimulation. Die schwarze Balken zeigen unstimulierte HUVEC. Unstimulierte HUVEC ohne jegliche Testsubstanz dienen als Referenzwert (100%).

## 4. Diskussion

### 4.1. Charakterisierung der BREC

Bei der Erstbeschreibung von in vitro Angiogenese wurde Wert auf die eindeutige Charakterisierung der verwendeten Zellen als EZ gelegt (Folkman J und Haudenschild C, 1980). Dies geschah, um Angiogenese als Phänomen isolierter EZ-Aktivität nachzuweisen, das unabhängig von anderen Gefäßwandbildenden Zellen wie glatten Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten stattfinden kann. Einige Veröffentlichungen zeigen, dass auch nicht-endotheliale Zellen Sp ausbilden können, die mit EZ-Sp verwechselt werden können (Brown et al., 1996 und Nehls et al., 1994). Insbesondere glatte Muskelzellen der Gefäßwand können Sp-artige Strukturen ausbilden. Es wurde in der vorliegenden Arbeit Wert auf die Charakterisierung der verwendeten Zellen als EZ gelegt, die mikroskopisch, durch Proliferationsversuche mit typischen Wachstumsfaktoren und immunzytochemisch vorgenommen wurde. Morphologisch und durch ihr Wachstumsverhalten präsentierten sich die BREC als EZ, indem sie die für mikrovaskuläre EZ typische inselartige Proliferation zeigten und sich bei Konfluenz im bekannten Kopfsteinpflaster-Muster präsentierten (Folkman et al., 1979). Mikroskopisch wiesen die Petrischalen keine wesentlichen Kontaminationen mit anderen Zellen auf.

In Proliferationsexperimenten führten bFGF und der EZ-spezifische VEGF zu einem signifikant gesteigerten BREC-Wachstum. Als gut definierte EZ-Mitogene zeigten bFGF und VEGF damit die erwartete Wirkung. Für TGF- $\beta$ 1 ließ sich eine antiproliferative Wirkung nachweisen (vgl. Chaudhury and D'Amore, 1991). Durch Nachweis des vWF und von CD31 in den kultivierten BREC bestätigte sich deren endotheliale Herkunft. Durch gleichzeitige Zellkernanfärbung konnte demonstriert werden, dass es sich um weitgehend Kontaminanten-freie Kulturen handelt, da keine Nuklei nachweisbar waren, in denen CD31-Detektion fehlte. Da Muskelzellen der Gefäßwand Sp-ähnliche Strukturen ausbilden können, erfolgte die immunzytochemische Untersuchung mit spezifischen, gegen Glattmuskelzell-Aktin gerichteten Antikörpern. Dabei ergab sich kein Hinweis auf deren Vorhandensein in den BREC-Kulturen.

Der Begriff der Kontext-abhängigen Angiogenese beschreibt die Wirkung angiogener Regulatoren in Bezug auf das Milieu, indem sie eingesetzt werden (Mandriota und Pepper, 1997). In vitro Angiogenese-Modelle bieten gegenüber in vivo Experimenten die Möglichkeit einer differenzierten Kontextbeschreibung. Aufgrund der genannten Experimente sind die BREC als Kontaminanten-arme EZ-Kultur charakterisiert, damit ist der Kontext in dieser Hinsicht gut definiert. Im Rat Aorta Ring Assay und ähnlichen Testsystemen (vgl. Parish et al., 1996) sind im Anschluss an jede erfolgte Stimulation prinzipiell aufgrund der Heterogenität des in die Matrix eingebrachten Gewebes aufwändige immunzytochemische Zusatzexperimente erforderlich, wenn man den EZ-Charakter der erfolgten Angiogenese-Antwort belegen will. Solche zeitaufwändigen Zusatztests entfallen im hier vorgestellten SpA und unterstreichen seine Eignung als Angiogenese-Assay.

#### **4.2 Etablierung des ‚Sprouting‘ Assay mit BREC**

Die Praktikabilität des SpA nach Nehls unter Verwendung von MS wurde bisher nur für bovine pulmonale EZ (Nehls und Drenckhahn, 1995), für bovine Nebennierenrinden-EZ (Koblizek, et al., 1998) und EZ der Schweine-Aorta (Nehls et al., 1998) experimentell nachgewiesen. Wie verschiedene Veröffentlichungen der letzten Jahre zeigen, ist der Satz „Endothel ist Endothel“ nicht haltbar (Williams, 1993). Abgesehen von schon mikroskopisch und im Wachstumsverhalten erkennbaren Unterschieden der EZ lassen sich individuelle Merkmale für EZ makrovaskulärer, mikrovaskulärer und kapillärer Herkunft ausmachen. Durch ihre differenzierte Ausstattung mit Wachstumsfaktoren, Proteasen und Rezeptor- und Adhäsionsproteinen ergibt sich für verschiedene EZ ein potentiell sehr verschiedenes Verhalten in situ, in Kultur und damit auch in funktionellen Assays (Camera et al., 1998; Mutin et al., 1997; Sheibani und Frazier, 1998; Vailhe et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass unter identischen Assaybedingungen bovine aortale EZ durch bFGF zur Sp-Ausbildung stimuliert werden konnten, während der Faktor bei humanen mikrovaskulären EZ keinen Effekt zeigte. Als Ursache wurde die stark unterschiedliche Induzierbarkeit der EZ-Proteasen benannt (Abe et al., 1993). Zink et al. demonstrierten 1995, dass EZ vom selben Individuum in vitro deutlich verschiedenes Verhalten zeigen

können, je nach Organ, aus dem sie isoliert wurden. Die modulierende Rolle der Extrazellulärmatrix bei der Ausprägung des EZ-Phänotyps ist dabei mehr und mehr in den Blickpunkt gerückt (Madri und Pratt, 1986; Madri et al.; 1988; Ingber und Folkman, 1989).

Die Experimente der vorliegenden Arbeit demonstrieren die Verwendbarkeit von BREC im SpA nach Nehls. Die Aussaat der Zellen auf die MS stellt einen sensiblen Zwischenschritt dar, da die BREC nach vier Stunden als Ausdruck einer inkompletten, vulnerablen MS-Haftung noch gerundete Morphologie aufweisen. Dabei bestehen Parallelen zu ihrem Wachstum in Zellkulturschalen. Auch dort war eine befriedigende Haftung der Zellen oft erst nach mehreren Stunden zu beobachten. Möglicherweise bedingt die Wirkung solcher nicht-permanenter Matrixbindungskräfte und die langsame Ausbildung permanenter Zellbindungen das besonders hohe angiogene Potential von BREC, das sich im MS-SpA zeigte (s.u.). Die zuverlässig stimulierbare Sp-Bildung steht in sehr gutem Kontrast zur Negativkontrolle. Als Sp wurden nur zelluläre Prozesse mit einer Mindestlänge von 150µm gewertet. Dieser Definition liegt die Überlegung zugrunde, dass Sp als Angiogenese-Äquivalent multizelluläre Strukturen sein müssen. Anderenfalls handelte es sich um zytoplasmatische Ausläufer oder migrierende Endothelzellen. Das Kriterium der Plurizellularität ist ab der genannten Länge gegeben (Nehls et al., 1995).

Parallel im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommene Experimente, den SpA mit HUVEC und bovinen kapillären Hirn-EZ zu etablieren, schlugen fehl. Dies bestätigt erneut die Divergenz von Resultaten mit verschiedenen EZ-Typen in vitro, auf die bereits hingewiesen worden ist (Abe et al., 1993). In vitro-Modelle, die nur die Proliferation bzw. Migration von EZ analysieren, erfassen nur Teilspekte der Angiogenese (Jain et al., 1997). Es konnte demonstriert werden, dass Gefäßbildung in vitro auch ohne Proliferation auftreten kann (Sholley et al., 1984).

Nehls und Drenckhahn zeigten 1994, dass EZ-Migration und Ausbildung von Sp als ungleichsinnige Prozesse aufgefasst werden können, da Fibronectin-Zusatz zur Fibrinogenmatrix die Migration von EZ hemmte, aber gleichzeitig die Sp-Entstehung förderte. Bei der Sp-Entstehung im MS-gestützten Assay muss EZ-Migration auftreten, da die Sp in zuvor komplett zellfreier Matrix auftreten. Die Ausbildung von Interzellulärkontakten in Sp-Strukturen und die veränderte

Matrix können jedoch offensichtlich die Migration weiterer EZ verhindern bzw. deren Migration in Richtung der sich ausbildenden Sp lenken (Nehls und Drenckhahn, 1994). Diesem Verständnis zufolge handelt es sich bei Migrationsassays um relativ undifferenzierte Angiogenese-Modelle, die wichtige Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Interaktion nicht erfassen.

Im SpA mit BREC ist die Komplexität angiogener Prozesse mit Proteolyse der Extrazellulärmatrix, Migration, Proliferation, Ausbildung mehrzelliger Sp mit Lumina und die Verzweigung der Sp-Ausläufer und ihre Vernetzung miteinander gegeben. Zwar wurde in frühen Stadien der Sp-Bildung durch BREC der Anteil der Proliferation und Proteolyse am angiogenen Geschehen nicht direkt nachgewiesen. Aufgrund des morphologischen Aspekts mit seiner Vielfalt an Sp und deren Ausdehnung muss jedoch ihre Beteiligung an den Spätstadien gefordert werden.

Wie weiterhin die Anwesenheit von mehreren Nuklei innerhalb einer Sp beweist, handelt es sich bei den schon nach 24 h zu beobachtenden Sp um multizelluläre Strukturen. Damit ist ein wesentliches Kriterium an den Assay als Modell physiologischer Angiogenese erfüllt. Mehrzellige Sp erfordern im Gegensatz zu zytoplasmatischen Vorschüben einzelner EZ komplexere Zell-Zell-Kommunikation. Phagozytose, Vakuolenbildung und Apoptose sind beschriebene Mechanismen bei der Entstehung von Sp (Meyer et al., 1997).

bFGF ist hauptverantwortlicher aF des initial verwendeten „Stimulationscocktails“. Auch für VEGF ließ sich nach 48 h eine angiogene Wirkung feststellen. Der TNF- $\alpha$  erhöhte weder bei kombinierter noch bei isolierter Applikation die Sp-Zahl. In Dosis-Wirkungsexperimenten erreichten sowohl bFGF als auch VEGF bereits mit 5ng/ml das Wirkmaximum. Dies deutet auf die Spezifität der bFGF- bzw. VEGF-Wirkungen. Im Vergleich mit anderen in vitro Angiogenese-Modellen bestätigt sich das individuell differenzierte Ansprechen von EZ verschiedener Herkunft auf Sp-fördernde Stimuli. Bei bovinen pulmonalen EZ erfolgte die Sp-Induktion durch deutlich höhere Konzentrationen von bFGF (30 ng/ml) und VEGF (100 ng/ml) (Nehls und Drenckhahn, 1995). Identisch hohe Dosen von ausschließlich kombiniert angewendeten VEGF und bFGF waren im Modellsystem mit humanen Retina-Explantaten notwendig (Knott et al., 1999).

Gefäßpräparate aus humaner Plazenta entwickelten unter 20%-Serum-Anteil im Medium eine sehr ausgeprägte spontane Angiogenese (Brown et al., 1996). Im Gegensatz dazu zeigten humane mikrovaskuläre EZ in einem sekundär 3-D Assay nur dann eine angiogen bedingte Invasion der unterliegenden Fibrinmatrix, wenn neben bFGF (100 ng/ml) und VEGF (50 ng/ml) gleichzeitig TNF- $\alpha$  (4 ng/ml) zugegeben wurde (Koolwijk et al., 1996). Dieser synergistische Effekt von TNF- $\alpha$  trat im BREC-SpA nicht auf und deutet - ebenso wie die vorgenannten Unterschiede zwischen einzelnen Assays - auf die Kontextabhängigkeit angiogener Regulatoren. Derart ausfallende Vergleiche verschiedener Assays hinsichtlich der mit ihnen erzielten Ergebnisse sind weder neu noch überraschend (vgl. Jain et al., 1997). Dennoch folgt daraus, dass die Allgemeingültigkeit angiogener Mechanismen und insbesondere potentieller Therapieprinzipien nicht a priori angenommen werden darf, sondern für den betreffenden Kontext nachgewiesen werden muss.

#### **4.3. Vorteile des BREC- ‚Sprouting‘ Assay**

In vivo läuft Angiogenese unter 3-D Bedingungen ab. Zunehmend wird die Übertragbarkeit von zweidimensionalen 2-D Angiogenese Assays in Frage gestellt (Goto et al., 1993; Madri et al., 1988; Nehls und Drenckhahn, 1995; Scherberich und Beretz, 2000; Vernon et al., 1995; Williams, 1993). Da die meisten unserer Erkenntnisse über EZ-Funktion aus 2-D Assays stammen (Williams, 1993), besteht ein Bedarf an 3-D Systemen. In den letzten Jahren haben die Bemühungen zur Etablierung von in vitro Angiogenese Modellen zugenommen (Benelli und Albin, 1999; Brown et al., 1996; Chen et al., 1997; Hata-Sugi et al., 2002; Vailhe et al., 1998; Vernon und Sage, 1999). Unter den 3-D Angiogenese-Modellen ist bisher nicht zwischen primärer und sekundärer Dreidimensionalität differenziert worden. Die häufiger verwendeten Assays sind nur sekundär 3-D, dabei werden EZ zunächst auf eine (z.B.) Fibrin- oder Collagenmatrix ausgesät, die sie nachfolgend unter Ausbildung von Sp „infiltrieren“ (Koolwijk et al., 1996).

Der hier vorgestellte Versuchsaufbau ist primär 3-D, da die EZ vom Moment der Fibrinogen-Inkorporation an von Matrix (und zum kleineren Teil von der Mikrosphäre) umgeben sind. Neuere Publikationen weisen darauf hin, dass EZ

signifikante Unterschiede in der Expression von Adhäsionsmolekülen zeigen, je nachdem ob sie auf oder in eine bestimmte Matrix eingebracht werden (Feng et al., 1999). In Bezug auf physiologisch auftretende Angiogenese sind primär 3-D Assays vergleichbarer und damit besser übertragbar. Sog. „Sphäroid-Assays“ werden als 3-D Angiogenese Modelle beschrieben, in denen auch Kokulturrexperimente zwischen EZ und glatten Muskelzellen durchgeführt werden können (Korff et al., 2001). Die Quantifizierbarkeit von Angiogenese Assays ist ein kritisches Qualitätsmerkmal (Guedez et al., 2003; Jain et al., 1997). In 2-D Modellen bilden sich die Sp auf einer EZ-Schicht aus. Da die Sp sich somit ober- oder (bei sekundär dreidimensionalen Systemen) unterhalb einer präformierten EZ-Schicht ausbilden, ist die Quantifizierung schwierig (Williams, 1993).

Bei Verwendung von Mikrosphären im gezeigten Assay resultiert eine sehr klare Unterscheidbarkeit zwischen präexistenten und sich neu herausbildenden Strukturen. Damit kann die quantitative Auswertung auf elegante Weise und ohne die Notwendigkeit komplizierender Bildanalyse-Systeme vorgenommen werden. Die Geschwindigkeit der Sp-Bildung im Assay mit BREC weist dessen gute Eignung als Screeningmodell für Faktoren mit Angiogenese-regulierenden Eigenschaften aus. Schon nach 24 h ist eine Auswertung möglich. Bei Verwendung von bovinen pulmonalen EZ und Zellen der Schweine-Aorta im MS-SpA war die Quantifizierung erst nach 72 h möglich (Nehls und Drenckhahn, 1995; Nehls et al., 1998). In anderen beschriebenen quantitativen, primär 3-D Assays beträgt dieser Zeitraum 5 Tage (Nicosia und Ottinetti, 1990) oder ein bis drei Wochen (Brown et al., 1996). Gleichzeitig zeigen die Sp eine befriedigende Langlebigkeit von 1 bis 2 Wochen, die jedoch vom Gehalt an FBS im Medium beeinflusst wird. Daher können auch Effekte untersucht werden, die Spätstadien der Angiogenese oder die Überlebensfähigkeit der Sp betreffen.

Die Durchführbarkeit des BREC-SpA im serumarmen bzw. -freien Milieu ist ein Vorteil. Unbekannte Testsubstanzen entfalten möglicherweise nur in Anwesenheit von Co-Faktoren bzw. in Abwesenheit von Antagonisten ihre angiogene bzw. antiangiogene Aktivität. Serum kann Co-Faktoren, aber auch Antagonisten der Angiogenese enthalten. Im BREC-SpA ließ sich bei allen getesteten FBS-Konzentrationen eine Sp-Bildung induzieren. Die Steigerung des Serum-Gehaltes führt zu einer Vermehrung der Sp (vgl. Nicosia et al, 1990), jedoch unterliegt diese Wirkung einer Sättigung. Im Sinne einer Eignung als

schnelles, zuverlässiges Screeninginstrument weisen nach 24 h besonders die 0,5% und 5% FBS-Varianten überzeugende Differenzen zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen (jeweils ca. 500-facher Wert nach Stimulation). Zusätzliche Auswertung nach 48 h zeigt insbesondere für die 5% FBS-Ansätze mit etwa 2500-facher Sp-Bildung gegenüber der Negativkontrolle ein breites Fenster zur Evaluation von Substanzen mit geringer Wirkpotenz.

Auch die Experimente in 0,5% FBS konnten aufgrund des deutlichen Kontrastes zwischen unstimulierten und stimulierten BREC überzeugen. Da die Erhöhung auf 10% FBS die Sp-Antwort eher abschwächt als verstärkt, erscheint der routinemäßige Einsatz dieser Konzentration nicht sinnvoll. Dies gilt auch für die serumfreie Variante. Sie liefert zwar nach 48 h signifikante Resultate. Allerdings sind die Differenzen zwischen unstimulierten und stimulierten Ansätzen deutlich geringer als bei den übrigen Testkonditionen. Unterschiedliche FBS-Chargen mit potentiell in variabler Menge enthaltenen aF können die Sp-Bildung verändern. Insofern sind in vitro Angiogenese Assays, die einen sehr hohen FBS-Gehalt voraussetzen, methodisch unterlegen. Bis heute gibt es nur sehr wenige Assays, in denen eine Angiogenese-Induktion bei 0% Serum beschrieben ist (Brown et al., 1996 und Nicosia et al., 1990). Die Variabilität des FBS-Anteils unterstreicht die besonders gute Eignung des BREC-SpA.

#### **4.4. Der BREC-,Sprouting' Assay als Modell retinaler Angiogenese**

Insbesondere durch den Erkenntniszuwachs in der Angiogenese-Forschung der letzten Jahre ergeben sich neue Perspektiven der frühzeitigen Therapie von Augenerkrankungen mit pathologischer Gefäßveränderung (Hammes et al., 1996; Cursiefen und Schönerr, 1997). Aufgrund der Verwendung von retinalen EZ kann der hier vorgestellte Assay als Modell für retinale Neovaskularisationen bei diabetischer Retinopathie, Frühgeborenen-Retinopathie und altersassoziierter Makulopathie dienen. Gegenüber anderen in vitro Modellen vaskulärer Retinopathien hat der BREC-SpA mehrere Vorteile. Es handelt es sich um einen primär 3-D Assay. Ein kürzlich ebenfalls vorgestelltes 2-D Modell zur Erforschung von Retinopathien beinhaltet das Aussäen von BREC auf eine Fibrinogenmatrix (Vailhe et al., 1998). Der Mechanismus der Sp-Ausbildung beruhte unter solchen 2-D Bedingungen auf einer großflächigen Ablösung ganzer

Zellverbände. Die dadurch entstandenen, als „Lakunen“ bezeichneten zellfreien Areale wurden nach einiger Zeit von elongierten, miteinander in Kontakt stehenden BREC umsäumt. Im betreffenden Assay wurde Fibrinabbauprodukte gemessen und als Indiz einer proteolytisch bedingten Sp-Entstehung gewertet, da sie zeitgleich mit den elongierten BREC entstanden (Vailhe et al., 1998). Da zur gleichen Zeit massive Zellablösung stattfand, die auch als Reaktion auf zu exzessive („suizidale“) Proteolyse durch die abgelösten EZ auftreten kann, erscheint diese Interpretation fragwürdig. Die Übertragbarkeit der Zellverlustbedingten Sp-Entstehung auf Angiogenese in situ wird angezweifelt (Boulton et al., 1990). Zusätzlich sind primär 3-D Modelle auch dem physiologischen Milieu in der Retina vergleichbarer (s.o.).

Wie bereits ausgeführt, kann Endothel unterschiedlicher Organ- und Speziesherkunft in funktionellen Assays stark divergierende Resultate zeigen. Insofern wäre der Einsatz von humanen retinalen EZ das beste in vitro Testsystem, um potentielle Angiogenese-Hemmstoffe zu testen, deren geplantes Anwendungsgebiet das menschliche Auge ist. Die Versorgung mit menschlichen Retina-Zellen in größeren Mengen kann jedoch problematisch sein. Als aufwändiges, aber qualitativ gutes Modell ist kürzlich ein SpA mit menschlichem Retina-Material vorgestellt worden (Knott et al., 1999). In jenem System wird komplettes Retina-Gewebe zwischen zwei verschiedenen Lagen von Fibrin eingebettet und durch bFGF- und VEGF-Stimulation zur Sp-Ausformung angeregt. Größte Vorteile dieses Systems sind seine biologische Komplexität, seine Dreidimensionalität sowie die Tatsache, dass es sich um menschliches Material handelt. Dadurch entfallen Übertragbarkeitsprobleme aufgrund von Speziesunterschieden. Als Nachteile sind Schwierigkeiten bei der Versorgung mit Retinae, die lange Versuchsdauer (bis zu 14 d) und die komplizierte, nur qualitative Auswertung mit notwendigen Zusatzexperimenten zur Identifikation der Sp als endotheliale Strukturen (Knott et al., 1999). Der BREC-SpA würde sich mit diesem Modell gut ergänzen, indem die Gültigkeit von Resultaten mit bovinen Zellen in ausgewählten Fällen dort überprüft werden könnte. Der Speziesunterschied und die Veränderung von EZ durch längerfristige Kultur in Petrischalen als Übertragbarkeitsprobleme fallen im Modell mit humanen retinalen EZ weg.

Unter den angiogenen Faktoren wird vor allem VEGF eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung retinaler Neovaskularisationen zugeschrieben (Lu und Adamis, 2002; Wittmer et al., 2003). Für VEGF sind Daten vorhanden, die seine vermehrte Expression in der Retina nach hypoxischer Stimulation belegen (Hata et al., 1995; Pe'er et al., 1995). Perizyten, retinale EZ und retinale Pigmentzellen sind als VEGF-Produzenten charakterisiert (Hata et al., 1995; Sone et al., 1996). Erhöhte Glucose-Konzentrationen und darauffolgender Glucose-Mangel induzieren VEGF-Bildung (Sone et al., 1996). Durch chronische Hyperglykämie entstandene Glykosylierungsprodukte wirken durch vermehrte VEGF-Ausschüttung angiogen (Yamagashi et al., 1997). Erhöhte VEGF-Konzentrationen sind in Netzhäuten von Patienten mit pathologischer retinaler Angiogenese nachgewiesen worden (Aiello et al., 1994; Adamis et al., 1996).

Neben VEGF wird insbesondere die Bedeutung der Fibroblastenwachstumsfaktoren (aFGF und bFGF) für Angiogenese am Auge hervorgehoben (Cursiefen und Schönherr, 1997). Retinale Zellen (Zellen der inneren Körnerschicht, Pigmentepithelzellen, Astrozyten der Ganglienzellschicht) sind zur Bildung von bFGF befähigt (Schweigerer et al., 1987; Zhang et al., 1993). Kürzlich wurde der synergistische Effekt von bFGF und VEGF auf retinale Angiogenese in einem sekundär 3-D SpA beschrieben, dabei wurden die Substanzen auch in Kombination mit ‚Insulin-like Growth Factor I‘ und ‚Platelet-derived Growth Factor‘ appliziert (Castellon, 2002). Auch in den hier vorgestellten Experimenten zeigt sich ein kooperativer Effekt bei gleichzeitiger Applikation von VEGF und bFGF. Die Stimulierbarkeit der BREC zur Sp-Ausformung durch bFGF bzw. VEGF im hier vorgestellten Assay zeugt von der pathophysiologischen Relevanz des Testsystems.

TNF- $\alpha$  hat - wie bereits ausgeführt - im hier vorgestellten Modellsystem keinen angiogenen Effekt. Demgegenüber konnte in einem Angiogenese-Assay mit humanen mikrovaskulären EZ, die aus der menschlichen Vorhaut gewonnen wurden, eine erhöhte Rate an Sp durch Kombination von bFGF und VEGF mit TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden (Koolwijk et al., 1997, van Hinsbergh et al., 2001). In Operationspräparaten von Patienten mit pathologischer retinaler Angiogenese ließ sich in allen Fällen der Nachweis von VEGF führen, während TNF- $\alpha$  nur in etwa der Hälfte der Fälle detektiert werden konnte (Armstrong et al., 1999). Diese Beobachtung könnte auf eine untergeordnete Bedeutung von TNF- $\alpha$  für

retinale Angiogenese hinweisen. Hypoxische Stimuli sorgen jedoch in vivo für eine erhöhte retinale TNF- $\alpha$ -Produktion (Majka et al., 2002), so dass eine fehlende angiogene Wirkung von TNF- $\alpha$  nur für das hier beschriebene Modell retinaler Angiogenese (für diesen Kontext, vgl. oben) konstatiert werden kann.

#### **4.5. Einfluss von Fibrinogen im BREC-,Sprouting' Assay**

Der Einfluss der EZM auf Angiogenese ist seit Jahren bekannt (Ingber und Folkman, 1989; Madri und Pratt, 1986). Fibg wurde in verschiedenen Konzentrationen auf seine Fähigkeit untersucht, die angiogene Aktivität der BREC zu beeinflussen. Mit zunehmenden Fibg-Konzentrationen ließ sich die Sp-Rate vermindern, die in der höchsten getesteten Fibg-Dosis (4,5 mg/ml) nur noch ein knappes Drittel des Ausgangswertes betrug. Somit ist allein die Variation der Proteinkonzentration in einer weitgehend uniformen Matrix ein effektiver Regulator der Angiogenese. Der Serumwert von Fibg beträgt beim Gesunden zwischen 1,5-4 mg/ml. Die getesteten Dosen bewegen sich also im physiologischen Bereich. Die relativ geringe Erhöhung der Fibg-Konzentration auf das etwa 2,5-fache und die einhergehende drastische Reduktion der Sp-Zahl weist die EZ-Matrix-Interaktion als sensiblen Teil des Angiogenese-Kontextes aus.

In Tumoren und Wunden ist ein perivaskuläres Fibg-Fibronectin-Gemisch als potentieller Ausgangspunkt von Angiogenese regelmäßig zu beobachten (Brown et al., 1988; Zacharski et al., 1983 ). Fibg kann aus verletzten Gefäßen austreten bzw. sich aufgrund erhöhter Gefäßpermeabilität perivaskulär anreichern. Gesteigerte Gefäßdurchlässigkeit kann als Folge von VEGF-Wirkung auftreten (Bayless et al., 1998). Die Synthese von Fibg durch Tumorzellen ist beschrieben (Simpson-Haidaris und Rybarczyk, 2001). Gesteigerte Gefäßdurchlässigkeit wiederum kann als Folge von VEGF-Wirkung auftreten (Bayless et al., 1998). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Fibg wurde nicht von den regelmäßig in Spuren enthaltenen Fibg-Kontaminanten Fibronectin, Vitronectin, Faktor XIII und Plasminogen befreit. Allerdings sind diese als physiologische Begleitkomponenten des Fibg bei in situ ablaufender Angiogenese ebenfalls colokalisiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen in Kontrast zu einer Veröffentlichung, in der erhöhte Fibg-Mengen angiogen wirkten. Vailhe et al. berichteten 1998 über ein sekundär 3-D in vitro Testsystem, in dem BREC auf eine Fibg-Matrix ausgesät wurden. Erst ab Konzentrationen von 8 mg/ml Fibg zeigten sie unter diesen Bedingungen angiogene Aktivität, während niedrigere Fibg-Dosen mit Proteolyse-bedingter Zellablösung einhergingen (Vailhe et al., 1998). In jenem experimentellen Aufbau ließe sich die exzessive Proteolyse als fehldosierter und damit „frustranter“ Versuch der EZ betrachten, Angiogenese zu initiieren. Nimmt man an, dass der Rückgang der Sp-Zahlen im hier vorgestellten BREC-SpA auf verminderte proteolytische Wirkung in einer dichteren Matrix beruht, lassen sich die Resultate miteinander in Einklang bringen. Gleichzeitig unterstreicht die Diskrepanz der notwendigen Fibg-Dosen die bereits diskutierte notwendige Berücksichtigung des Assay-Kontextes. In Übereinstimmung mit den hier präsentierten Resultaten wurde über eine Reduktion der Anzahl von Sp durch ansteigende Fibg-Dosis in anderen Experimenten berichtet (Vailhe et al., 1997).

In einer Kollagen Typ I-Matrix wirkt die Zugabe von Fibrin (1mg/ml) angiogen (Takei et al., 1995). Fibg-Adhäsion von EZ wird durch  $\alpha V\beta 3$ -Integrine vermittelt (Cheresh etl., 1989; Vailhe et al., 1997).  $\alpha V\beta 3$  wird an Spitzen von Sp exprimiert, wenn Sp in eine fibrinreiche Matrix einsprossen (Clark et al., 1996). In Kultivierungsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass humane mikrovaskuläre EZ  $\alpha V\beta 3$ -mRNA in vielfach höheren Konzentrationen produzieren, wenn sie in einer Fibrinmatrix statt in einer Kollagenmatrix wachsen (Feng et al., 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass  $\alpha V$ -mRNA-Synthese von innerhalb einer Kollagenmatrix wachsenden EZ deutlich niedriger war als die einer auf Kollagen wachsenden EZ-Population (Feng et al., 1999). Dies zeigt erneut die notwendige Differenzierung zwischen 2-D und 3-D Angiogenese-Assays hin.

Es sind mehrere Mechanismen beschrieben worden, durch die die EZM Angiogenese modulieren kann. Die EZM stellt zunächst eine strukturelle Barriere dar, in die EZ je nach Ausstattung mit proteolytischen Enzymen unterschiedlich gut eindringen können. Proteine der EZM sind dabei in der Lage, die proteolytische Potenz der EZ zu beeinflussen, indem sie Proteasen konzentrieren und der EZ präsentieren (Chavakis et al., 1998). Eine ähnliche Depotfunktion bzw. lokal gezielte Freisetzung durch die EZM ist bereits seit einigen Jahren für aF bekannt (Vlodavsky et al., 1991). Fibrin und Fibg können VEGF binden und

damit die EZ-Proliferation regulieren (Sahni und Francis, 2000). Rein mechanische Eigenschaften fibrillärer Matrices sind „Wegweiser“ angiogener Aktivität: Künstlich erzeugte Spannungskräfte innerhalb einer Kollagenmatrix dirigierten durch Ausrichtung der Matrixproteine das Auswachsen entstehender Sp (Korff und Augustin, 1999). Mechanische Eigenschaften von Fibrinmatrices regulieren ebenfalls Angiogenese-Aktivität (Vailhe et al., 1997; van Hinsbergh et al., 2001). Für Fibrinmatrices sind auch pH-bedingte strukturelle Veränderungen als Einflussfaktor auf angiogene Aktivität nachgewiesen (Collen et al., 1998 – vgl. unten). Darüber hinaus sind - wie oben bereits erörtert - EZ-EZM-Interaktionen auf der Ebene der Integrine bekannt (Ruoslahti & Engvall, 1997).

#### **4.6. Thrombin-Effekte im BREC-,Sprouting' Assay**

Für Thrombin wurden bereits angiogene Effekte beschrieben (Van Hinsbergh et al., 1987; Nehls und Herrmann, 1996). In menschlichem Tumorgewebe lässt sich ein erhöhtes Vorkommen von Thrombin feststellen (Zacharski et al., 1995). Thrombin dient zur Fibrinherstellung im BREC-SpA. Erhöhung der Thrombin-Dosen kann zu einer Zunahme der Sp-Rate durch veränderte Matrixstruktur führen (Nehls und Herrmann, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Dosen Thrombin zur Fibrinherstellung eingesetzt. Thrombin wurde anschließend sofort durch Hirudin-Beigabe ins ‚Equilibrationsmedium‘ antagonisiert.

Es ließ sich weder ein signifikanter angiogener noch ein antiangiogener Effekt ansteigender Thrombin-Dosen bei Matrixzugabe feststellen. Demgegenüber ist für bovine pulmonale EZ ein angiogener Einfluss höherer Thrombin-Matrix-Konzentrationen beschrieben (Nehls und Herrmann, 1996). Wurde Thrombin im BREC-SpA dem Medium zugesetzt, zeigte es in höheren Dosen nach 48 h eine Steigerung des Ausgangswertes auf über das Dreifache. Aufgrund der Resultate entfällt im BREC-SpA die Notwendigkeit einer routinemäßigen Thrombin-Antagonisierung durch Hirudin, da die Standarddosis (10 nM) weder in der Matrix noch als Zusatz zum Testmedium signifikante Effekte zeigt. Da unter den gewählten serum-armen Bedingungen erheblicher Sp-Verlust zwischen 24 h und 48 h zu verzeichnen war, erwies sich höherdosiertes

Thrombin als Angiogenese-modulierender Faktor, der die Überlebensrate von Sp bei bFGF-Stimulation erhöht.

Matrix-modulierende Effekte durch Thrombin sind auch bei Zugabe von Thrombin ins Medium möglich, da Thrombin durch Diffusion die Matrix erreicht. Noch nicht proteolytisch abgespaltene Fibrinogenmoleküle können somit erreicht werden und eine weitergehende Fibrinpolymerisation stattfinden, die wiederum eine Veränderung der Matrixdichte nach sich zöge. 8-fach höher als die Standarddosis konzentriertes Matrix-Thrombin blieb jedoch in den hier vorgestellten Experimenten auch bei Versuchsbeobachtung über 48 h ohne jeglichen Effekt, dabei wurde das molekulare Verhältnis des Thrombin zu Fibrinogen von 1 zu 50 auf 1 zu 6 erhöht. In Anbetracht des deutlich angiogenen Einflusses hoher Konzentrationen an Medium-Thrombin spricht dies eher für einen matrixunabhängigen angiogenen Thrombin-Effekt.

In anderen MS-SpA wurde der angiogene Einfluss von Thrombin Matrix-modifizierenden Eigenschaften zugeschrieben (Nehls und Herrmann, 1996). Diese wurde aus der Beobachtung abgeleitet, dass Hirudin-Zugabe die angiogene Wirkung von Matrix-integriertem Thrombin nicht hemmen konnte. Allerdings fehlen nähere Angaben über Dosis und Applikationszeitpunkt des Thrombin-Antagonisten. Ein matrixunabhängiger, angiogener Einfluss von Thrombin ist mehrfach beschrieben worden. Dabei zeigte im „Chick Chorioallantoic Assay“ gamma-Thrombin, das keine Potenz zur Fibrinpolymerisation besitzt, einen gleich starken angiogenen Effekt wie gerinnungsaktives alpha-Thrombin (Tsopanoglou et al., 1993). Es wurde die Aktivierung der Proteinkinase C als Mechanismus der angiogenen Eigenschaft von Thrombin postuliert (Haralabopoulos et al., 1997). Thrombin-stimulierten HUVEC zeigen über diesen intrazellulären Signalweg sowie über Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen eine erhöhte Expression der VEGF-Rezeptoren flk-1 undflt-1 (Tsopanoglou und Maragoudakis, 1999). Thrombin erhöht auch die bFGF mRNA-Expression von EZ (Weich et al., 1991).

#### **4.7. Aprotinin und Applikation der Substanzen im BREC-,Sprouting' Assay**

Aprotinin wurde in ersten Experimenten der Matrix zugegeben, um exzessive Proteolyse durch die BREC zu verhindern (vgl. Nehls und Drenckhahn, 1995). Zu starke proteolytische EZ-Aktivität hatte in verschiedenen Assays

antiangiogene bzw. zellablösende Wirkungen nach sich gezogen (Montesano et al., 1987 und Pepper et al., 1996). Aprotinin zeigte in den verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten angiogenen Einfluss. In Aprotinin-freien Ansätzen im BREC-SpA wurde keine unerwünscht starke Proteolyse und keine Degradation der Fibrinmatrix beobachtet. In anderen SpA wurden BREC auf Fibrinmatrices zur Angiogenese stimuliert. In jenen SpA war Aprotinin unentbehrlich, da seine Abwesenheit zu proteolytisch bedingter Ablösung der BREC führte (Vailhe et al., 1998). Die Kontrolle exzessiver Proteolyse fungierte dort als Stabilisator der Zell-Matrix-Adhäsion und damit als angiogener Mechanismus (Montesano et al., 1987) beschrieben.

Als Ursache der Aprotinin-Redundanz im hier vorgestellten SpA ist der postulierte Unterschied zwischen primär und sekundär 3-D Angiogenese-Assays relevant. EZ-Adhäsion an eine Fibg-Matrix wird von der Synthese endogen produzierter Matrix-Proteine wie Fibronectin und Vitronectin sowie von Integrinen vermittelt (Clark et al., 1996; Dejana et al., 1990). Die Adhäsion an eine Fibg-Matrix durch deren Vermittlung dauert etwa vier Stunden (Dejana et al., 1990). Proteolytische Aktivität hingegen kann in EZ schon nach kürzerer Zeitdauer auftreten (Pepper et al., 1990). Dieses zeitliche Verhältnis zwischen Adhäsionsvermittlung und EZM-Degradation kann sich demnach auf Oberflächen-adhärierende EZ anders als auf Matrix-inkorporierte EZ auswirken: Bei Verlust der Oberflächen-Haftung in 2-D Angiogenese-Assays durch zu starke Proteolyse wirken Protease-Inhibitoren einer Zellablösung entgegen.

Abweichende EZ-vermittelte Proteolyse wird durch Isolations-, Kultur- und organbedingte Unterschiede im EZ-Phänotyp beeinflusst. Humane mikrovaskuläre EZ können auch in Abwesenheit von Aprotinin auf Fibrinmatrices eingesetzt werden (Koolwijk et al., 1996). Aprotinin-Abwesenheit kann nicht nur zur Zellablösung, sondern auch zum Verdau von Fibrinmatrices führen (Montesano et al., 1987); dies macht eine unterschiedliche proteolytische Potenz von EZ offensichtlich. Möglicherweise moduliert auch die EZM je nach Dimensionalität des Testsystems unterschiedlich. Aprotinin ist in Publikationen als potenter Inhibitor von in vitro Angiogenese beschrieben worden (Koolwijk et al., 1996; Lansink et al., 1998; Montesano et al., 1987; Montesano et al., 1990; Vailhe et al., 1998). Im BREC-SpA ist keine signifikante Inhibition festzustellen.

Proteolyse könnte im BREC-SpA von untergeordneter Bedeutung sein, wenn die Fibrinmatrices permissiv genug sind für angiogen aktive EZ. Proteolysemechanismen könnten unter lokaler Kontrolle der EZ ablaufen, so dass eine „exogene“ Inhibition erschwert wird. Dabei könnte der verlängerte Diffusionsweg von Aprotinin im primär 3-D System von Relevanz sein, zumal die oben zitierten Studien alle in sekundär 3-D Systemen vorgenommen wurden. Gegen diese Interpretation spricht, dass auch Matrix-eingebettetes Aprotinin keine potentere Inhibition zeigt. Weiterhin erscheint die Beteiligung von nicht-Aprotinin-sensiblen Proteasen denkbar. In dieser Hinsicht ist von Bedeutung, dass kürzlich Fibg als Substrat von Matrix Metalloproteinasen nachgewiesen werden konnte (Bini et al., 1999). Festzuhalten bleibt, dass bei fehlenden Aprotinin-Effekten im BREC-SpA routinemäßiger Einsatz der Substanz nicht notwendig ist.

Zur weiteren arbeitstechnischen Vereinfachung wurde die partielle Einbettung der Testsubstanzen in die Fibrinmatrices mit ihrer einmaligen, kompletten Applikation im Testmedium verglichen (vgl. Nehls et al., 1996). Es ergab sich für die isolierte Medium-Zugabe von bFGF und VEGF keine signifikante Änderung ihrer Wirkung. Somit kann die isolierte Medium-Applikation der Wirkstoffen routinemäßig erfolgen; dies vereinfacht das experimentelle Procedere.

Bei Einbettung der Wirkstoffe ins Fibrin wird die sensible Phase vor Polymerisation verlängert, da vor Thrombinzugabe zu verschiedenen Matrices die Pipettenspitze gewechselt werden musste, um keine Testsubstanzen zu „verschleppen“. Die bei dieser Vorgehensweise häufiger beobachteten inhomogenen Fibrinkissen werden bei alleiniger Medium-Zugabe sehr viel seltener beobachtet und damit eine Fehlerquelle unspezifischer Effekte auf die Sp-Rate eliminiert. Voraussetzung für die Beigabe von Wirkstoffen ins Medium ist deren Fähigkeit zur Diffusion, die allerdings für die meisten der bisher bekannten Angiogenese-wirksamen Substanzen gegeben bzw. für potenziell klinisch einzusetzende Stoffe zu fordern ist.

#### **4.8. Der pH-Wert als Faktor im Angiogenese-Kontext**

Um die Störanfälligkeit des SpAs zu testen, wurde der pH verändert. Hierbei wurde bewusst das Applikationsvolumen als Vergleichsgröße

herangezogen, da sich die anwendungsorientierte Fragestellung auf die Ermittlung der Volumina bezog, die - je nach Applikationsform - keinen oder nur geringen unspezifischen Einfluss auf die Sp-Bildung ausüben. Darüber hinaus wird der resultierende pH von der variablen Temperatur (Raumtemperatur bei Fibrinherstellung und 37°C bei EZ-Wachstum), der CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre des Inkubators, der Zeit (Versuchanfang gegenüber Versuchende) und den Puffersystemen des Mediums beeinflusst.

Schon bei der Fibrinmatrixproduktion zeigte sich, dass Matrix-Zugabe pH-wirksamer Substanzen ein größeres Fehlerpotential beinhaltet als deren Zugabe in das Medium. Bei einem Volumen von 5 µl HCl bzw. NaOH (resultierender pH bei 3,4 bzw. 10,85) war die Konversion von Fibrinogen zu Fibrin gestört, so dass kein Solide-Werden der Matrix mehr erfolgte. Dies überrascht angesichts der drastischen pH-Änderungen nicht. Hierbei ist jedoch von Bedeutung, dass bei Funktionstests mit potentiellen Angiogenese-Wirkstoffen deren Applikation in Volumina erfolgt, die das der genannten Mengen teilweise deutlich überschreiten. Beispielsweise wurde zyklisches RGD-Peptid, welches in Essigsäure löslich ist (aber in den betreffenden Experimenten pH-neutralisiert wurde), in einem Volumen von 16 µl eingesetzt. Bei fraktionierter Matrix-Medium-Applikation hätte dies den Einsatz von 6 µl in der Matrix bedeutet. Auch die kleineren Volumina von 0,5 µl HCl bzw. NaOH (resultierender pH 7,25 bzw. 7,70) bewirkten bei Matrix-Zugabe signifikante Änderungen der Sp-Aktivität. Die pH-Wirkung war nur in der Phase der Fibrin-Herstellung durch Thrombin gegeben, da nach 30 min die Matrix-,Equilibrierung' mit MCDB 131 (pH 7,8) erfolgte. Somit ist das Zeitfenster möglicher direkter pH-Effekte auf den EZ-Zustand relativ kurz. Makroskopisch änderte sich die Struktur der Fibrinmatrices: Bei HCl-Zugabe wurde sie milchig-trübe und bei NaOH-Einsatz transparenter und verformbarer. Absorptionsmessungen mit Fibg-Matrices, die in verschiedenen pH-Bereichen polymerisiert wurden, zeigten im Bereich von pH 6,5 bis pH 7,2 deutlich höhere Absorptionswerte (>1,3 bei 350nm) als die im pH von 7,6 bis 8,0 (<1,0 bei 350 nm) (Nehls et al., 1996). Parallel wurde demonstriert, dass solche pH-bedingten Änderungen der Fibrinmatrix die Angiogenese-Rate beeinflussen (Nehls et al., 1996).

In den letzten Jahren wurden Einflüsse von pH-Wert-Änderungen auf Angiogenese vermehrt untersucht (Burbridge et al., 1999; Collen et al., 1998; Hall

et al., 2001; Wahl. et al., 2002). Es wurde über verminderte Angiogenese im azidotischen Milieu einer Kollagenmatrix berichtet (Burbridge et al., 1999). Die gesteigerte Ausbildung von Sp in pH 7,0 geformten Fibrinmatrices gegenüber in pH 7,4 hergestellten Fibrinmatrices wurde nachgewiesen (Collen et al., 1998). Im Vergleich mit dem hier vorgestellten primär 3-D Assay mit BREC wurden dabei humane mikrovaskuläre EZ auf eine Fibrinmatrix ausgesät, von deren Oberfläche sie Sp in die Matrix bildeten – also ein sekundär 3-D Angiogenese-Assay (Collen et al., 1998). Bei Verwendung boviner pulmomaler EZ in primär 3-D wurden antiangiogene Effekte in azidotisch generierten Fibrinmatrices (pH 7,0) und angiogene Wirkungen in alkalischem Fibrinmilieu (pH 7,6) festgestellt (Nehls et al., 1996). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente im primär 3-D BREC-SpAs zeigen ebenfalls antiangiogene Effekte einer im Sauren hergestellten Fibrinschicht sowie Angiogenese-Förderung durch ‚basische‘ Matrixproduktion.

Ob Speziesunterschiede der verwendeten EZ, die primäre 3-D gegenüber der sekundär 3-D der Assays oder sich unterscheidende Stimulationsbedingungen verantwortlich für die sich teilweise kontrastierenden Ergebnisse sind, bleibt unklar. Im Hinblick auf die physiologische Situation sind nicht nur die Art der Matrix-Proteine und ihr Mischungsverhältnis zueinander wichtig, sondern für perivaskuläre Fibrinablagerungen auch dessen Entstehungsmilieu, das unter anderem durch den pH determiniert ist. Tumoren weisen im Vergleich zu normalem Gewebe einen niedrigeren extrazellulären pH auf (Gerweck, 1998; Kozin et al., 2001). Dabei ist der Tumor-pH laut kernspintomographischen Studien durchschnittlich 0,2 pH-Einheiten saurer (Stubbs et al., 1999). Entsprechend findet Matrixdeposition in Tumorgewebe im azidotischen Milieu statt und hat Auswirkungen auf den Angiogenese-Kontext, da die entstehende EZM Angiogenese reguliert. In kernspintomographischen Studien wurde die Beziehung des extrazellulären Tumor-pH zum Ausmaß der Tumolvaskularisierung untersucht (Bhujwalla et al., 2002). Der pH der Retina unterliegt Schwankungen (Dmitriev und Mangel, 2001). Die hier vorgestellten Experimente belegen, dass retinale Angiogenese durch den pH-Wert beeinflusst werden kann. Im hier vorgestellten SpA konnte die Sp-Rate auch durch Säure/Basen-Zusatz zum Medium beeinflusst werden. In einem anderen Assay hatten nur pH-Modifikationen der Matrix eine Veränderung der Angiogenese-

Rate zur Folge, dabei wurden die Mediumzusätze jedoch nur für die Dauer einer Stunde appliziert (Nehls et al., 1996).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden insbesondere unter dem Aspekt der Assay-Störanfälligkeit durchgeführt. Entsprechend wurden die HCl- und NaOH-Volumina ins endgültige Testmedium gegeben, da auch nicht pH-neutrale Puffer mit den Testsubstanzen mehrere Tage verbleiben würden. Obwohl Anwendung von HCl im Medium eine Angiogenese-Inhibition bewirkte, fiel diese deutlich schwächer aus als bei Matrixzugabe. Bei Zugabe von 2 µl HCl reduzierte sich die Sp-Rate nur auf 80%. Dabei war das relative Volumen (0,6 ml bezogen auf das Gesamtvolumen der Matrix bzw. 1,6 ml bezogen auf Matrix und Medium zusammen) 1,5-fach größer war als bei Zugabe von 0,5 µl HCl in die Matrix, was eine Inhibition auf 50% zur Folge hatte. Ebenso bewirkten bei Mediumzugabe 10 µl HCl trotz initial massiver pH-Senkung auf 6,45 eine geringere Abnahme der Angiogenese-Aktivität als 2µl HCl in der Matrix. Dabei betrug das relative Volumen der Medium-Beigabe fast das Doppelte der ins Fibrin gegebenen HCl-Menge. Die Experimente mit NaOH lieferten in der Tendenz ähnliche Effekte in Bezug auf die Applikationsart.

Testsubstanzen im SpA sollten somit in bekannten, möglichst physiologischen Puffern appliziert werden bzw. Puffer pH-Wert neutralisiert werden. Bei eingetretenen Effekten vermeintlicher Angiogenese-wirksamer Substanzen muss die Möglichkeit einer Puffer-bedingten Ergebnis-Modifikation ausgeschlossen werden. Bei alleiniger Zugabe der Testsubstanzen ins Medium sind unspezifische pH-bedingte Effekte seltener (vgl. Nehls et al., 1996). Neben pH-bedingter Matrix-Modifikation ist Angiogenese-Regulierung auch durch direkte pH-Effekte auf die EZ beschrieben. Dabei wirken azidotische Zellmedien antiangiogen in 3-D Assays, bleiben jedoch ohne Wirkung in 2-D Assays (Burbridge et al., 1999). Solche pH-Einflüsse wurden spekulativ auf die pH-bedingte Veränderung der proteolytischen Kapazität von EZ zurückgeführt (Burbridge et al., 1999). Z.B. liegt das pH-Optimum von Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) im alkalischen Milieu (Yabushita, 1988).

Die pH-Abhängigkeit der Produktion und Wirkung von angiogenen und antiangiogenen Faktoren wird diskutiert. VEGF-Entstehung ist im sauren pH-Wert-Bereich verstärkt (Xu et al., 2002). VEGF und bFGF induzierten in 3-D Angiogenese Assay Sp-Bildung vor allem im azidotischem Milieu (Burbridge et

al., 1999). Kürzlich wurde über stärkere VEGF-Bindungskapazität an EZ unter sauren Bedingungen berichtet (Goerges und Nugent, 2003). Der Angiogenese-Inhibitor AS wirkt verstärkt im Niedrig-pH-Bereich und kann selbst intrazelluläre Azidose der EZ induzieren (Wahl et al., 2002; Wahl und Grant, 2000). VEGF-Produktion retinaler Müller-Zellen kann durch kombinierte pH-Wert-Erniedrigung und Hypoxie, nicht jedoch durch pH-Wert-Erniedrigung allein induziert werden (Brooks et al, 1998).

Serumproteine verfügen über Pufferkapazität. Im BREC-SpA wurde die Wirkung unterschiedlicher pH-Werte in Abhängigkeit von verschiedenen FBS-Konzentrationen untersucht (0,5%; 5%; 20%). Übereinstimmend zeigte sich für alle gewählten FBS-Konzentration sowohl für bFGF-behandelte als auch für unstimulierte BREC der Angiogenese-hemmende Effekt von HCl-Zugabe. Die NaOH-bedingte Steigerung der Sp-Rate war vom FBS-Gehalt des Mediums abhängig. In 0,5% FBS bewirkte NaOH sowohl bei bFGF-stimulierten als auch bei unbehandelten BREC eine sehr potente Sp-Steigerung. Mit zunehmendem FBS-Gehalt fiel dieser Effekt geringer aus bzw. war nicht mehr vorhanden. In 20% FBS zeigte sich im Kontrast dazu eine sehr deutliche Abnahme der Sp-Aktivität durch NaOH-Zugabe. Im Hinblick auf die abnehmende Angiogenese-Rate bei hohem Serum-Anteil im alkalischen Milieu sind folgende Überlegungen interessant: Da durch höheren Serum-Gehalt sowohl die Anzahl der überlebenden Zellen als auch der Gehalt an Plg zunimmt, sollte im alkalischen Milieu vermehrte perizelluläre Proteolyse stattfinden. Diese proteolytische Aktivität kann auch dadurch verstärkt werden, dass das pH-Optimum von uPA bei 9,0 liegt (Yabushita, 1988).

Exzessive Proteolyse von EZM kann antiangiogen wirken, indem sehr zellnahe EZM als notwendige adhäsionsvermittelnde, gefäßsprosstabilisierende Leitstruktur in nicht ausreichendem Maß erhalten bleibt (Montesano et al., 1987). Somit könnte die verminderte Sp-Zahl unter den genannten Stimulationsbedingungen durch zu starke proteolytische Aktivität erklärt sein, die sich im Resultat antiangiogen auswirkt. Passend zu dieser Hypothese ist die starke Zunahme der Angiogenese-Aktivität bei unstimulierten BREC im alkalischen. Dies lässt sich damit erklären, dass die proteolytische Potenz einer geringeren Anzahl von Zellen durch pH-Wert-Modifikation so stark erhöht wurde, dass ein angiogenes Milieu entsteht.

Ebenfalls unter dem Blickpunkt der Assay-Störanfalligkeit wurde  $Zn^{2+}$  in unterschiedlichen Konzentrationen im SpA untersucht.  $Zn^{2+}$  ist nicht selten Bestandteil von Substanzpuffern.  $Zn^{2+}$  hatte hier eine potente antiangiogene Wirkung. Für  $Zn^{2+}$  sind toxische Effekte auf EZ gut bekannt. Dadurch wird die Notwendigkeit einer differenzierten Ergebnisanalyse bei angiogenen bzw. antiangiogenen Effekten unterstrichen – es muss immer ein unspezifischer Puffereffekt ausgeschlossen werden.

#### **4.9. ECGF/H ist stärkster angiogener Faktor im BREC-,Sprouting' Assay**

ECGF/H wurde als aF getestet. Es ließ sich seine potente angiogene Wirkung im hier vorgestellten Modell feststellen. Die Erstbeschreibung von ECGF gelang schon vor über 20 Jahren (Maciag et al., 1979). ECGF existiert in einer hochmolekularen (>70 kDa) wie auch in einer niedrigmolekularen Form (15-25 kDa), dabei ist die Konversion der hochmolekularen in die niedrigmolekulare Form möglich (Maciag et al., 1982). ECGF findet insbesondere in der Forschung mit humanen EZ breite Anwendung, dies ist auch auf seine stark mitogene Potenz zurückzuführen (Greisler et al., 1987). Trotz seiner Verwendung seit über 20 Jahren ist die Substanz relativ schlecht definiert, es existieren beispielsweise keine detaillierten Kenntnisse über seinen Wirkmechanismus. Hypothalamus-Präparationen werden als ECGF definiert, ohne dass andere, im Hypothalamus vorkommende Wachstums-Faktoren zuvor entzogen worden sind. Auch bei dem in dieser Arbeit eingesetzten ECGF/H handelt es sich um einen „unreinen“ Hypothalamus-Extrakt. Aufgrund der vorgenannten Probleme sollte der Einsatz von ECGF/H besonderen Fragestellungen vorbehalten bleiben. Beim Vergleich von ECGF/H mit bFGF und VEGF war ECGF/H das stärkste der getesteten Agenzien, indem es mehr als die doppelte Sp-Zahl als bFGF erzielte. Auffällig war die Sp-Morphologie bei ECGF/H-Stimulation, indem diese teilweise sehr viel breiter als die von bFGF- und VEGF-stimulierten BREC war. ECGF ist bereits im ersten publizierten SpA erfolgreich als aF eingesetzt worden (Folkman und Haudenschild, 1980). Trotz bereits oben genannter Vorbehalte ergibt sich aus den ECGF/H-Besonderheiten (Sp-Anwortstärke und -Morphologie) die Möglichkeit, beobachtete angiogene Effekte unter abweichenden Stimulationsbedingungen zu überprüfen.

Im eingesetzten Faktorengemisch (ECGF/H) ist Heparin in einer Endkonzentration von 11-225 $\mu$ g/ml vorhanden. Dabei ist eine maximale Wirkung von ECGF/H nach 24 Stunden bereits bei einer Konzentration von 55  $\mu$ g/ml Heparin (enthalten in der 7,5 $\mu$ g/ml ECGF-Dosis) und eine Wirkungssättigung nach 48 h bei 110  $\mu$ g/ml Heparin (enthalten in 15 $\mu$ g/ml ECGF) zu beobachten. Für Heparin sind sowohl anti- wie auch proangiogene Wirkungen beschrieben (Collen et al., 2001 und Rosengart et al., 1997). Heparin wurde getestet, ohne dass sich ein signifikanter Effekt zeigte (Ergebnisse nicht demonstriert). Antiangiogene Wirkung von Heparin wurden bei Aussaat humaner mikrovaskulärer EZ auf Fibrinmatrices bei Stimulation mit bFGF und TNF- $\alpha$  beschrieben (Collen et al., 2001). Auch in 3-D SpA ist der antiangiogene Einfluss auf humane Plazentavenen demonstriert (Jung et al., 2001).

In klinischen Untersuchungen wird ein angiogener (bzw. arteriogener) Heparin-Effekt bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit durch Förderung der Kollateralgefäßentstehung diskutiert (Bombardini & Picano, 1997). Die angiogene Wirkung von Heparin konnte im ‚Chorioallantoic Assay‘ am Hühnerei belegt werden, dabei war der Effekt an die Anwesenheit eines basischen Polypeptids gebunden (Pacini et al., 2002). In einer anderen, am gleichen Testsystem durchgeführten Untersuchung ließ sich die angiogene Heparin-Wirkung auf vermehrt exprimiertes Fibronectin zurückführen (Ribatti et al., 1997). Im hier beschriebenen SpA zeigte Heparin alleine kein signifikantes angiogenes Potenzial. Angesichts einer auf über 200% angestiegenen Angiogenese-Rate bei Verwendung des ECGF/H-Gemisches kann Heparin nicht alleinverantwortlicher angiogener Bestandteil sein. Ein synergistischer bzw. potenzierender Effekt des Heparin auf die ECGF-Wirkung kann nicht ausgeschlossen werden. Eine kooperative Wirkung und erst dadurch stark angiogene Wirkung von Heparin mit basischen Polypeptiden wurde nachgewiesen (Pacini et al., 2002).

#### **4.10. Angiostatin-Herstellung durch uPA und SHD**

Durch Plg-Proteolyse mit Elastase hergestelltes humanes AS (El.-AS) wandert laut Erstbeschreibung in der SDS-Elektrophorese in Form von drei separaten Banden bei 45, 42 und 40 kDa unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

Für jede der drei genannten Banden ist antiproliferative Wirkung auf EZ beschrieben (O'Reilly et al., 1994). Einige Jahre nach Entdeckung von AS wurden alternative Verfahren zur *in vitro*-Herstellung durch Verwendung von SHD und PA publiziert (Gately et al., 1997 und Stathakis et al., 1997). Teilweise wurde das exakte elektrophoretische Wanderungsverhalten des so generierten AS nicht dargestellt, da keine Angaben zur Bandenlokalisierung gemacht wurden (Gately et al., 1997). Bei der Erstbeschreibung eines durch uPA und SHD hergestellten AS (uPA/SHD-AS) wird im Gegensatz zum El.-AS ein nur aus zwei Banden bestehendes Plasminogenspaltprodukt präsentiert (Gately et al., 1997). Bei Verwendung von Thioredoxin und Protein-Disulfid-Isomerase nach erfolgter Aktivierung von Plg zu Plasmin (Plm) wurde AS als breite Bande mit Wanderung bei 43 kDa unter nicht-reduzierenden Bedingungen nachgewiesen (Stathakis et al., 1997).

Aufgrund der im Körper nahezu ubiquitären Verfügbarkeit von PA und SHD ist der Mechanismus der uPA/SHD-AS-Produktion physiologisch bedeutsam. In der vorliegenden Arbeit wurden die Herstellungsbedingungen von uPA/SHD-AS überprüft. Zwei verschiedene SHD, NAC und GSH, zeigten bei Inkubation mit uPA Plg-Konversions-Aktivität. Das entstandene AS trat als Doppelbande bei 45 und 52 kDa und als eine inkonstant nachweisbare Bande bei 36 kDa unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf. NAC war im Vergleich mit GSH effektiver hinsichtlich der AS-Produktion, daher wurde es im folgenden als SHD eingesetzt. Die Wirkung des NAC war dosisabhängig. Bei Verwendung von 100  $\mu$ M NAC war die effektivste AS-Produktion zu beobachten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit publizierten Daten (Gately et al., 1997). NAC schwächte in höheren Konzentrationen die AS-Banden. Parallel war bei Verwendung dieser hohen Konzentrationen eine Verminderung von Plg selbst zu beobachten. Aufgrund dieser Beobachtung erscheint eine Beteiligung von SHD sowohl an der Produktion als auch beim Abbau von AS möglich.

Die totale antioxidative Kapazität in humanem Plasma, die durch Schwefelgruppen-Donatoren wie GSH mitbestimmt wird, erreicht nach neueren Daten durchschnittliche Werte von etwa 1,5 mmol/l (Kampa et al., 2002). Die bei *in vitro*-Herstellung von AS verwendeten hohen Konzentrationen an SHD können unter Zellkulturbedingungen nicht erreicht werden (Stathakis et al., 1999). Tumorzellen sezernieren eine sog. ‚Plasmin-Reduktase‘, die für die Reduktion

von Disulfid-Brücken verantwortlich zu sein scheint. Nach dieser Vorstellung sind im zellhaltigen Milieu SHD Co-Faktoren von ‚Plasmin-Reduktasen‘ (Stathakis et al., 1999). Ausreichend hohe Konzentrationen an SHD sind *in vitro* eine entscheidende Komponente der AS-Produktion (bei gleichzeitiger Anwesenheit von PA). SHD sind gleichzeitig aber vermutlich nur eine von mehreren Determinanten der AS-Produktion unter physiologischen Bedingungen.

Die Dosis-Wirkungsexperimente mit uPA ließen über einen um Faktor 1000 unterschiedlichen Konzentrationsbereich eine nahezu unveränderte AS-Entstehung erkennen. Die von Gately et al. (1997) gewählte uPA-Dosis erwies sich auch in den hier vorgestellten Experimenten als wirksam. Die Anwesenheit von uPA (bzw. PA) ist unabdingbarer Faktor für die AS-Produktion im vorgestellten System, da Plg-Inkubation nur mit SHD keine AS-typischen Banden entstehen ließ. Der relativ geringe Einfluss einer veränderten uPA-Dosis spricht jedoch dafür, dass die Regulation der AS-Entstehung unter physiologischen Bedingungen nicht primär von der PA-Konzentration beeinflusst wird.

Plg-Proteolyse durch Pankreaselastase wurde als erstes *in vitro*-Verfahren zur AS-Herstellung beschrieben. Physiologisch scheinen jedoch andere Mechanismen der AS-Produktion vorzuherrschen. Konditioniertes Medium von humanen Pankreascarcinomzellen enthält AS-generierende Faktoren. Die Pankreastumorzellen sezernieren statt Elastasen Serin-Proteasen (vermutlich uPA), die als verantwortliche AS-produzierende Enzyme nachgewiesen wurden (O'Mahoney et al., 1998). Für Prostatacarcinomzellen sind verschiedene Enzyme mit Aktivität zur AS-Herstellung beschrieben worden. Prostata spezifisches Antigen, Cathepsin D und PA wurden als dort verantwortliche AS-Produzenten nachgewiesen (Gatley et al., 1997; Heidtmann et al., 1999 und Morikawa et al., 2000). Somit ist die AS-Entstehung in einem Tumor bzw. einem Gewebe durch verschiedene enzymabhängige Systeme reguliert.

Mehrere Metalloproteasen sind zur AS-Produktion befähigt. Für Matrix Metalloproteinase 3 (MMP 3), MMP 7, MMP 9 und MMP12 wurden entsprechendes Potenzial beschrieben (Dong et al., 1997; Lijnen et al., 1998; Patterson und Sang, 1997). In Prostata-Carcinom-Zellen lassen sich keine aktiven Formen von MMP-7 und MMP-9 nachweisen, so dass für die genannten Zellen ein von diesen Enzymen abhängiger AS-Entstehungs-Mechanismus zunächst

nicht wahrscheinlich ist (Patterson und Sang, 1997). Die Beteiligung einer MMP-abhängigen AS-Entstehung in verschiedenen Tumoren wird durch die Fähigkeit von Makrophagen zur Tumor-Invasion und zur Sekretion vom MMP jedoch möglich (Dong et al., 1997 und Cornelius et al., 1998). Auch in nicht-neoplastischem Gewebe konnte AS-Bildung nachgewiesen werden. Makrophagen sind im Rahmen von Entzündungsprozessen mitverantwortliche AS-Produzenten (Falcone et al., 1998). Vaskuläre glatte Muskelzellen sind AS-Bildner (Stathakis et al., 1999). Thrombozytenaggregation führt zur AS-Produktion (Jurasz et., 2003).

Die zur AS-Bildung befähigten Enzyme wurden nach einer Arbeit in zwei Kategorien eingeteilt: MMP (s.o.), Cathepsin D und Prostata spezifisches Antigen gehören zur Gruppe der Proteinasen, die direkt aus Plg AS bzw. AS-ähnliche Fragmente generieren können (Kwon et al, 2002). Die zweite Gruppe der Proteinasen stellt dieser Einteilung zufolge AS in mehreren Teilschritten indirekt her. Dazu wurde die hier vorgestellte uPA/SHD-Methode gerechnet (Kwon et al, 2002). Als Teilschritt erfolgt erstens die Konversion von Plg zu Plm durch einen PA. Zweitens reduziert eine Plasmin Reduktase die Cystein(Cys)<sup>426</sup>-Cys<sup>541</sup>- sowie die Cys<sup>512</sup>-Cys<sup>536</sup>-Disulfid-Brücken in Kringle 5. Drittens wird durch die reduzierten Disulfid-Brücken eine Spaltung der Arginin<sup>-530</sup>-Lysin<sup>531</sup>-Peptidbrücken und von zwei anderen, nicht näher definierten C-terminal von Cys<sup>462</sup> gelegenen Peptidbrücken getriggert. Die Spaltung kann dabei sowohl autoproteolytisch wie auch durch Serin-Proteasen erfolgen. Viertens können die so entstandenen Kringle 1-4,5-Fragmente durch MMP weiter zu Kringle 1-3 bzw. Kringle 1-4-Angiostatin-Formen prozessiert werden (Kwon et al., 2002 und Lay et al., 2000).

Nachdem von Stathakis et al. (1997) die Beteiligung einer Plm-Reduktase an der uPA/SHD-induzierten Bildung von AS postuliert wurde, konnten mittlerweile Annexin II und ein Enzym der Glykolyse, Phosphoglycerat-Kinase, als Plm-Reduktasen identifiziert werden (Kwon et al., 2002 und Lay et al., 2002). In Übereinstimmung mit der postulierten Existenz von drei alternativen Proteolyseorten nach erfolgter Disulfidbrückenreduktion bei der uPA/SHD-AS-Entstehung ließen sich bei den hier vorgestellten Experimenten bis zu drei unterschiedliche Banden (52, 42 und 36 KDA unter nicht-reduzierenden Bedingungen) beobachten. Als Ausdruck einer variierenden Plg-Degradation war

die 36 kDA-Bande nicht einheitlich nachzuweisen bzw. teilweise nur sehr schwach vorhanden.

Die Entstehung von AS-ähnlichen Fragmenten bei Inkubation von Plg mit uPA in Abwesenheit von SHD wurde beschrieben (Kassam et al., 2001). In diesem Kontext wurde diskutiert, dass ein alkalischer pH des Inkubationsmediums die uPA-initiierte Autoproteolyse von Plg steuert. Die Reduktion der Cys<sup>512</sup>-Cys<sup>536</sup>- und Cys<sup>462</sup>-Cys<sup>541</sup>-Peptidbrücken soll dieser These zufolge durch Wasserstoffionen erfolgen können, die die SHD-Wirkung ersetzen.

In dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau wurden Plg-Inkubationen zur Herstellung von AS bei einem pH von 9,0 durchgeführt, da in diesem Bereich das pH-Optimum von uPA liegt (Yabushita, 1988). Bei Inkubation von Plg mit verschiedenen uPA-Formen ohne SHD ließ sich elektrophoretische Wanderungsaktivität zwischen 52 und 120 kDA feststellen, ohne dass eindeutige Banden zu differenzieren waren. Mithin ist bei den hier vorgestellten Inkubationsbedingungen ein kombinierter pH/uPA-Effekt nach der These von Kassam et al. (2001) möglich. Allerdings sind die so produzierten AS-ähnlichen Banden vergleichsweise schwach und von anderen Plg-Degradationsfragmenten nicht eindeutig zu differenzieren. Entsprechend wurden für die uPA/SHD-AS-Produktion in größeren Mengen NAC und sc-uPA parallel verwendet.

#### **4.11. Vergleich der Angiostatin-Formen**

Zum Zeitpunkt der hier vorgestellten Experimente war in der Literatur nur über zwei unterschiedliche Entstehungs- und Produktionswege von AS berichtet worden (Reilly et al., 1994; Gately et al, 1997). Dabei existierten keine Daten hinsichtlich der Vergleichbarkeit der unterschiedlich hergestellten AS-Formen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Notwendigkeit einer solchen Analyse durch Vergleich der elektrophoretischen Wanderung und der Aminosäuresequenzen von El.-AS und von uPA/SHD-AS nachgekommen. Nach Produktion von El.-AS nach herkömmlicher Methode ließen sich elektrophoretisch unter nicht-reduzierenden Bedingungen Doppelbanden bei 35 und 32 kDA sowie bei 29 und 26 kDA nachweisen. Die erwartete Wanderung von El.-AS wäre laut AS-Erstbeschreibung bei 45, 42 und 40 kDA unter nicht-

reduzierenden Bedingungen gewesen (O'Reilly et al., 1994). Das parallel getestete uPA/SHD-AS zeigte im gleichen Elektrophorese-Experiment Banden zwischen 45 und 52 kDA. Bei der Erstbeschreibung von uPA/SHD-AS wurde eine Doppelbande detektiert, ohne dass deren exaktes Wanderungsverhalten beschrieben wurde, da keine Massenmarkerproteine angegeben wurden (Gately et al., 1997). Zur fast gleichen Zeit wurde die *in vitro*-Produktion von AS durch einen anderen SHD nach erfolgter Konversion von Plg zu Plm beschrieben: ‚Thioredoxin-AS‘. Die ‚Thioredoxin-AS‘-Wanderung lag bei 45, 41 und 38 kDA unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Stathakis et al., 1997).

Somit waren die bis dahin publizierten Elektrophorese-Daten von AS leicht (‚Thioredoxin-AS‘ versus El.-AS) bis deutlich diskrepant (uPA/SHD-AS versus El.-AS). Die in dieser vorliegenden Arbeit miteinander verglichenen AS-Formen zeigten eine Differenz von 15-20 kDA hinsichtlich ihres Wanderungsverhalten. Auch unter reduzierenden Konditionen waren diese Unterschiede vorhanden, dort waren El.-AS bei 42 und 38 kDA sowie uPA/SHD bei 65 kDA zu beobachten. Es ergaben sich somit Molekülmassendifferenzen von maximal etwa 20 kDA.

In den letzten Jahren wurden weitere, von der Produktionsart von AS abhängige Molekülmassendifferenzen beschrieben. Plg-Behandlung mit Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) resultierte in drei Banden bei 58, 42 und 38 kDA, Plg-Degradation mit MMP-7 hingegen in einer breiten Bande zwischen 38 und 45 kDA unter reduzierenden Bedingungen (Patterson und Sang, 1997). Cathepsin D spaltet Plg zu AS-Banden bei 55 und 52 kDA unter reduzierendem Probenpuffer (Morikawa et al., 2000). MMP-3 ergibt sowohl bei reduzierenden wie auch bei nicht-reduzierenden Konditionen Banden bei 55, 40 und 30 kDA (Lijnen et al., 1998). Aufgrund der genannten Differenzen wird zunehmend der Begriff AS-ähnliche Fragmente verwendet bzw. zwischen den einzelnen Herstellungsarten unterschieden (Kassam et al., 2001; Lijnen et al., 1998; Migita et al., 2001).

Initial wurden die Kringle 1-4 von Plg als AS angesehen (O'Reilly et al., 1994). Es existieren alternative Proteolyse-Orte bei der AS-Entstehung, so dass Kringle 1-4½, Kringle 1-4 und Kringle 1-3 als Plg-Abbauprodukte beobachtet werden können (Lay et al., 2000). Zunehmend werden die Entstehungswege und Molekülgrößen von AS-ähnlichen Plg-Fragmenten unterschieden. Kürzlich ist das Plg-Fragment A<sub>61</sub> beschrieben worden (Kassam et al., 2001). Als A<sub>61</sub> ist ein 61

kDa großes Plg-Fragment benannt worden, dass bei Inkubation von Plg mit uPA ohne Zugabe von SHD bei pH 9,0 hergestellt werden kann. A<sub>61</sub> zeigte dabei, vergleichbar mit in den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen uPA/SHD-AS, elektrophoretische Wanderung mit einer breiten diffusen Bande unter nicht-reduzierenden Bedingungen bei 50 kDa sowie unter reduzierenden bei 61 und 64 kDa als Doppelbande (Kassam et al., 2001).

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Teilsequenzierungen der AS-Formen sowie der verbliebenen Plg-Reste wurde die Aminosäurefolge der AS-Varianten bestimmt. Für El.-AS ließen sich die alternativen Sequenzen Tyrosin<sup>99</sup>-Valin<sup>462</sup>, Tyrosin<sup>99</sup>-Alanin<sup>463</sup> und Tyrosin<sup>99</sup>-Leucin<sup>469</sup> nachweisen. Laut einer bei Kassam et al. (2001) erstellten tabellarischen Übersicht entspricht El.-AS der Plg-Region Tyrosin<sup>99</sup>-Alanin<sup>459</sup>, wenn die Sequenz des humanen Plg inklusive des Signalpeptids zu Grunde gelegt wird (vgl. Abb. 44, S. 73). Somit ergibt die hier vorgestellte Plg-Elastase-Proteolyse geringfügige Abweichungen im erhalten El.-AS, welches Kringle 1-4 des Plg entspricht.

Das Kringle 1-3 umfassende El.-AS wurde als Plg-Sequenz Tyrosin<sup>99</sup>-Valin<sup>357</sup> bzw. Tyrosin<sup>99</sup>-Valin<sup>373</sup> beschrieben (Kassam et al., 2001). Das in der vorliegenden Arbeit bei Plg-Elastase-Proteolyse erhaltene 14 kDa-Fragment beginnt laut N-terminaler Sequenzierung bei Valin<sup>374</sup>. Kringle 3 endet bei Cystein<sup>352</sup>. Die einzelnen Kringle-Domänen umfassen jeweils ca. 80 Aminosäuren, Kringle 4 beginnt bei Cystein<sup>377</sup> (Cao et al., 1996). Somit handelt es sich beim nachgewiesenen 14 kDa-Fragment um Kringle 4. Daraus folgt, dass El.-AS in dieser Arbeit auch Kringle 1-3 enthaltende Fragmente aufweist, da der nachgewiesene Spaltungsort zwischen Kringle 3 und 4 lokalisiert ist. Die Sequenz von Kringle 1-3 erstreckt sich in Übereinstimmung mit anderen Daten von Tyrosin<sup>99</sup>-Valin<sup>373</sup> (Kassam et al., 2001).

uPA/SHD-AS wurde ebenfalls N-terminal teilsequenziert. Es waren zwei unterschiedliche N-Termini festzustellen: Lysin<sup>97</sup> und Valin<sup>98</sup>. Der Versuch, den Plg-Rest nach uPA/SHD-Proteolyse zu sequenzieren, um das C-terminale Ende des uPA/SHD-AS zu bestimmen, gelang nicht. Somit ließ sich die exakte Molekülgröße nicht erfassen. Unter Verwendung bereits publizierter Daten von durch PA und SHD hergestellten AS-Formen (Stathakis et al., 1999; Kassam et al., 2001) und aufgrund einer elektrophoretischen Wanderung bei 65 kDa des hier hergestellten uPA/SHD-AS sollte dessen Ausdehnung bis in die Kringle 5-

Domäne reichen. Es sind durch Plasmin-Reduktase hergestellte AS-Formen beschrieben, deren Aminosäuresequenz von Lysin<sup>97</sup> bis Arginin<sup>549</sup> reichte (Stathakis et al., 1999). Das A<sub>61</sub> benannte AS-ähnliche Protein reicht von Lysin<sup>97</sup> bis Lysin<sup>487</sup> (Kassam et al., 2001). Die genannten AS-Formen zeigen Banden zwischen 57 und 65 kDa unter reduzierenden Bedingungen, so dass bei vergleichbarer uPA/SHD-AS-Wanderung die vermutete Aminosäuresequenz wahrscheinlich ist. Diese Überlegungen erklären auch die festgestellten Unterschiede zwischen der Wanderung von El.-AS- und uPA/SHD-AS in der Elektrophorese. Ob die unterschiedlichen Entstehungswege von AS auch differierende biologische Wirkungen bedingen, ist weitgehend unklar und sollte Bestandteil weitergehender Untersuchungen sein (Soff, 2000).

#### **4.12. Der Integrin-Antagonist cRGD als potenter Angiogenese-Inhibitor**

Der Integrin-Antagonist cRGD hemmt im BREC-SpA die Sp-Entstehung zuverlässig. Puffereffekte konnten ausgeschlossen werden. Integrine sind transmembranöse, adhäsionsvermittelnde Moleküle. Jede Zellart verfügt über ihren eigenen Satz an Integrienen (Hynes, 1992). Prinzipiell sind EZ in der Lage, die Integrine alpha1-beta1 ( $\alpha1\beta1$ ), alpha2-beta1 ( $\alpha2\beta1$ ), alpha3-beta1 ( $\alpha3\beta1$ ), alpha5-beta1 ( $\alpha5\beta1$ ), alpha6-beta1 ( $\alpha6\beta1$ ), alphaV-beta1 ( $\alpha V\beta1$ ), alphaV-beta3 ( $\alpha V\beta3$ ) und alphaV-beta5 ( $\alpha V\beta5$ ) zu exprimieren (Bayless et al., 2000; Albelda et al., 1989). Ob und in welchem Ausmaß die EZ-Integrine phänotypisch in Erscheinung treten, hängt vom Zustand der Zellen ab.

1994 zeigten Brooks und Mitarbeiter, dass  $\alpha V\beta3$  als Marker für angiogen aktive EZ dienen kann, während ruhendes Endothel dieses Integrin nur in extrem geringer Anzahl exprimiert. Integrin-Anwesenheit variiert auch in Abhängigkeit von der gewählten Stimulation, da VEGF vor allem  $\alpha V\beta5$ -Expression und bFGF hauptsächlich  $\alpha V\beta3$ -Expression bewirken (Friedländer et al., 1995). Die Relevanz von Zell-Matrix-Interaktion zeigt sich auch auf Ebene der Integrine. Je nach Matrix werden verschiedene Integrin-Typen der EZ vermehrt exprimiert. So herrschen in Typ 1-Kollagen  $\alpha2\beta1$ , in Laminin-reicher Umgebung  $\alpha6\beta1$  und in Fibrin-Matrices  $\alpha V\beta3$  und  $\alpha5\beta1$  vor (Bayless et al., 2000). 1999 ist durch Feng und Mitarbeiter nachgewiesen worden, dass auf 2-D-Kollagenschicht wachsende EZ weit höhere  $\alpha V$  mRNA Werte zeigen als die gleichen EZ innerhalb einer 3-D-

Kollagenschicht. Dies unterstreicht erneut die Bedeutung der Assay-Dimensionalität (vgl. oben).

cRGD ist im BREC-SpA bei Stimulation mit bFGF und VEGF und ECGF/H wirksam. Die antiangiogenen Effekte zeigten Dosis-Abhängigkeit und wiesen damit die Spezifität der Wirkungen aus. Maximale Hemmwirkung zeigte sich ab 5µg/ml cRGD. Auch die lineare RGD-Form (lin RGD) wirkte antiangiogen, allerdings schwächer als cRGD. Lineares RGE-Peptid (lin RGE) hingegen war nicht wirksam. Die antiangiogene Wirksamkeit von RGD-Peptiden wurden in den letzten Jahren mehrfach demonstriert (Bayless et al., 2000; Hammes et al., 1996; Meerovitch et al., 2003; Pfaff et al., 1994). cRGD-Interaktionen sind mit den EZ-Integrinen  $\alpha V\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 5$  und  $\alpha 5\beta 1$  beschrieben (Übersicht bei Cardarelli et al., 1994). Nach VEGF-Stimulation vorzugsweise exprimiertes  $\alpha V\beta 5$  wird daher ebenso blockiert wie durch bFGF-behandelte EZ mit  $\alpha V\beta 3$ -Integrinen. Da im vorgestellten Assay auch ECGF/H-induzierte Angiogenese durch cRGD blockiert werden kann, ist auch hier die Expression von Integrinen notwendig, die mit RGD-Peptiden interagieren.  $\alpha V\beta 3$  und  $\alpha 5\beta 1$  sind hierbei die wahrscheinlichsten Kandidaten, da ihre Expression in Fibrinsystemen zu dominieren scheint (Bayless et al., 2000).

Fibg-Bindung findet aber auch über die RGD-Sequenz seiner A $\alpha$ -Kette an das  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin der EZ statt, diese Bindung wird durch RGD-Peptide verhindert (Suehiro et al., 2000). Zusätzlich können RGD-Peptide EZ-Apoptose durch direkte Aktivierung des proapoptotischen Proteins Caspase 3 induzieren (Buckley, 1999). Auch die inhibitorische Wirkung von RGD-Peptiden auf retinale Angiogenese wurde mehrfach beschrieben, so dass die hier vorgestellten Ergebnisse mit bisherigen Erkenntnissen konform gehen (Hammes et al., 1996; Riecke et al., 2001). Die klinische Relevanz solcher Daten zeigt sich durch Untersuchungen an menschlichen Augen.  $\alpha V\beta 3$  als auch  $\alpha V\beta 5$  werden bei der proliferativen diabetischen Retinopathie exprimiert (Friedländer et al., 1996).

Auch im Hinblick auf tumorassoziierte Angiogenese erweisen sich Integrin-Inhibitoren als vielversprechende Strategie (Buerkle et al., 2002; Kerr et al., 2002; Tucker, 2002). Dabei stellt die Selektivität des Therapiekonzeptes einen entscheidenden Vorteil dar. Zum einen haben EZ ihren spezifischen Satz an Integrinen, zum anderen sind angiogen aktive EZ durch bevorzugte Expression

einiger dieser Subtypen „markiert“. Integrin-Antagonismus wird in klinischen Studien getestet (Gutheil et al., 2000).

#### **4.13. TGF- $\beta$ als Prototyp Kontext-abhängiger Angiogenese-Effekte**

Im Vergleich mit cRGD ist die hier ermittelte AI-Wirkung von TGF- $\beta$ 1 etwas schwächer und uneinheitlicher. TGF- $\beta$ 1 und cRGD sind gut wirksame Kontrollinhibitoren des BREC-SpA, der dadurch auch für das Screening nach AI geeignet ist. Während bFGF- und VEGF-induzierte Sp-Bildung durch TGF- $\beta$ 1 inhibiert werden konnte, blieb der erwartete Effekt bei Stimulation mit ECGF/H aus. Die mangelnde Wirksamkeit von TGF- $\beta$ 1 ließe sich theoretisch auf die Stärke der angiogenen Antwort nach ECGF/H-Stimulation zurückführen, da beim Vergleich mit bFGF und VEGF ECGF/H der stärkste aF im BREC-SpA ist: Angiogenese wird nicht durch An- oder Abwesenheit einzelner Substanzen bewirkt, sondern ist der Netto-Effekt aller pro- und antiangiogenen Stimuli (Folkman, 1995). Entsprechend wurde in einem orientierenden Experiment geprüft, ob nach Dosis-Reduktion von ECGF/H die inhibitorische Potenz von TGF- $\beta$ 1 zu beobachten war. Dabei war ein Tendenz zur Angiogenese-Verstärkung bei geringen ECGF/H-Konzentrationen festzustellen, die allerdings nicht signifikant war. Das Nichterreichen des Signifikanzniveaus ist jedoch am ehestens der geringen Datenmenge ( $n = 2$ ) zuzuschreiben. Die Frage nach einer Angiogenese-Verstärkung durch TGF- $\beta$ 1 stand nicht im Zentrum der vorliegenden Arbeit, die Klärung eines angiogenen Effekts durch TGF- $\beta$ 1 im vorgestellten BREC-SpA bleibt somit Zusatzexperimenten vorbehalten.

Bei der Charakterisierung der BREC im Proliferationsversuch zeigte sich TGF- $\beta$ 1 als potenter Inhibitor der EZ-Proliferation. Die Mitosehemmung durch TGF- $\beta$ 1 scheint jedoch nicht der entscheidende Mechanismus der antiangiogenen Potenz von TGF- $\beta$ 1 in anderen 3-D-SpA zu sein (Pepper et al., 1990), da Inhibition der DNA-Synthese durch Mitomycin die Sp-Ausformung nicht verhindern konnte (Montesano und Orci, 1985).

In 3-D Assays wurde eine mangelnde antiproliferative Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf EZ wiederholt beobachtet (Madri et al., 1988). TGF- $\beta$ 1 fungiert als Ligand für TGF $\beta$  Rezeptor-Typ I und Typ II (Piek et al., 1999). Die für TGF- $\beta$ 1 beschriebenen Wirkungen auf die EZ wie Wachstumshemmung (Baird und

Durkin, 1986), Sekretion von Proteasen bzw. Protease-Inhibitoren (Pepper et al., 1990) und Matrixmodulation (Madri, 1988) werden über die genannten Rezeptoren vermittelt. Ausbleibende Proliferationshemmung von EZ durch TGF- $\beta$ 1 in 3-D Angiogenese Assays wird auf die verminderte Expression der TGF- $\beta$ 1-Rezeptoren Typ II zurückgeführt. Dieser Rezeptortyp soll die Inhibition des EZ-Wachstums in 2-D Assays vermitteln (Sankar et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte TGF- $\beta$ 1 zwar die Proliferation von ECGF/H-behandelten BREC im 2-D-Assay hemmen, blieb aber ohne inhibitorisches Potenzial bei der ECGF/H-bedingten Ausformung von Sp. Die genannte Divergenz der Effekte ließe sich durch unterschiedliche Rezeptorexpression mit relativem Mangel an TGF- $\beta$ 1-Rezeptor Typ II erklären. Entsprechend könnten die TGF- $\beta$ 1-Wirkungen bei Stimulation von bFGF und VEGF im Vergleich mit der Verwendung von ECGF/H auf veränderte Rezeptorexpression zurückzuführen zu sein.

Experimente mit TGF- $\beta$ 1 haben die Entstehung des Konzepts der Kontext-abhängigen Wirkung von Angiogenese-Regulatoren entscheidend mitgeprägt. Diese Vorstellung besagt, dass die Wirkung bzw. Wirksamkeit eines AI bzw. aF von der Anwesenheit und Konzentration anderer Mediatoren, Adhäsionsproteine sowie dem Zustand der EZ selbst (Wachstums- gegenüber Ruhephase) abhängig ist (Pepper et al., 1993; Sutton et al., 1991). Angiogenese stellt also das Ergebnis einer vielfach vernetzten Interaktion verschiedener Wachstumsfaktoren und-inhibitoren, Proteasen und Matrixproteine mit der EZ dar. Die im BREC-SpA vorhandene Inhibition bFGF- und VEGF-stimulierter Angiogenese durch TGF- $\beta$ 1 und dessen gleichzeitig möglich erscheinende Synergismus mit ECGF/H als Sp-induzierender Faktor unterstützt diese Vorstellungen des Angiogenese-Kontextes. Das komplexe Zusammenspiel verschiedener Co-Faktoren miteinander und der variable Phänotyp von EZ (Sankar et al., 1996) führt dazu, dass TGF- $\beta$ 1 sowohl inhibierend (Müller et al., 1987; Pepper et al., 1990) wie auch stimulierend auf in vitro-Angiogenese wirkt (Madri et al. 1988). ECGF/H induziert bei BREC Sp anderer Morphologie. Diese Beobachtung legt nahe, dass der EZ-Phänotyp auch auf der molekularbiologischen Ebene unterschiedlich ist und eine andere Ausstattung der EZ mit Rezeptoren, Proteasen und Integrinen zur Folge hat.

Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1-Applikation sowohl die Synthese von Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (PAI-1) mRNA wie auch gleichzeitig die

von uPA mRNA in EZ erhöhen kann (Pepper et al., 1990). Dabei war PAI-1-Induktion von einem raschen Anstieg und einem Maximum nach 12 h gekennzeichnet, während für uPA mRNA ein späterer, langsamerer Anstieg zu verzeichnen war. Daraus ergab sich für die EZ eine sog. „proteolytische Balance“, die initial eine Proteolyse-Hemmung und später eine Proteolyse-Verstärkung bewirkte. Bei gleichzeitiger bFGF-Behandlung der Zellen zeigte sich ein vergleichbarer Netto-Effekt (Pepper et al., 1990). Eine derartige zeitversetzte Expression maximaler Konzentrationen von Anti-Proteasen und Proteasen allein könnte die im BREC-SpA beobachteten Interaktionen zwischen ECGF/H und TGF- $\beta$ 1 erklären. ECGF/H ist stärkster Sp-fördernder Faktor des SpA. Die ECGF/H-induzierten Sp zeichnen sich teilweise durch eine besonders breite Morphologie aus. Aufgrund der Breite der ECGF/H-Sp ist eine erhöhte proteolytische Aktivität der BREC im Vergleich zu den VEGF/bFGF-Sp zu fordern, da das teilweise seenartige Zusammenfließen der Sp den Abbau der Fibrinmatrix voraussetzt.

#### **4.14. Endostatin und Angiostatin sind ohne Effekt**

Für AS und ES existiert eine Vielzahl experimenteller Daten, die deren antiangiogenes Potential untermauern. Dabei wurde die antiangiogene Wirksamkeit von AS und ES sowohl in vitro als auch in vivo demonstriert (Drixler et al., 2000; Morikawa et al., 2000; O'Reilly et al., 1994; O'Reilly et al., 1997; Sacco et al., 2000; Wajih & Sane, 2003). Im hier vorgestellten BREC-SpA wie auch bei Tests mit HUVEC lassen sich keine antiangiogenen Wirkungen von AS und ES feststellen. Im Hinblick auf das Konzept kontextabhängiger Substanzwirkungen müssen diese Ergebnisse differenziert betrachtet werden.

Für kapilläre EZ sind spezialisierte Isolationsmethoden beschrieben worden, die u.a. die EZ-Wachstumsstimulation mit tumorzell-konditioniertem Medium beinhalten (Folkman et al., 1979). Die Langzeitkultur der häufig in der Angiogenese-Forschung verwendeten kapillären bovinen Nebennierenrinden-EZ wird durch diese Methode möglich. Ein erheblicher Teil der publizierten in vitro Experimente mit AS und ES wurde mit auf solche Weise isolierten EZ durchgeführt (Cao et al., 1995; Cao et al., 1996; Claesson-Welsh et al., 1998; Dong et al., 1997; Falcone et al., 1998; Gately et al., 1997; Lannutti et al., 1997; Luo

et al, 1998; O'Reilly et al., 1994; O'Reilly et al., 1996; O'Reilly et al., 1997 und Sim et al., 1997). Die Verwendung von tumorzell-konditionierten EZ ist sinnvoll, da derartige EZ einen Hauptangriffspunkt therapeutischer Bemühungen darstellen. Dennoch ist die Frage nach der Gültigkeit der auf diese Weise erzielten Ergebnisse für nicht-tumorzell-konditionierte EZ berechtigt. Tumorzell-konditionierte EZ weisen eine andere proteolytische Potenz auf, sind mit anderen Oberflächen- und Adhäsionsmolekülen ausgestattet und reagieren im Vergleich mit physiologischen EZ auf aF bzw. AI unterschiedlich (Bajou et al., 2002; Kamada et al., 2000; Ran et al., 2002). Die antiangiogene Wirkung von AS und ES auf tumorzell-konditionierte EZ könnte daher stärker und einheitlicher auftreten als bei Experimenten mit physiologischen EZ.

Tatsächlich sind die Resultate in Testsystemen mit derartigen EZ uneinheitlich. So zeigte AS in einer Untersuchung einen inhibitorischen Effekt auf HUVEC-Proliferation (Gately et al, 1996). In einer anderen Publikation hingegen wird vom fehlenden Einfluss von AS auf das Wachstum von HUVEC berichtet (Stathakis et al., 1997). Kürzlich wurde berichtet, dass die antiproliferative Wirkung von AS von der Art der EZ-Stimulation abhängen kann. Dabei zeigte AS keinen Einfluss auf HUVEC-Proliferation nach Stimulation der Zellen durch VEGF und bFGF. Demgegenüber ließ sich seine angioinhibitorische Potenz nach Stimulation mit Hepatocyte Growth Factor (HGF) feststellen (Wajih & Sane, 2003). In der hier vorliegenden Arbeit wurden die AS-Wirkung nach Stimulation von bFGF, VEGF und ECGF/H getestet. In keiner der genannten Ansätze ergab sich ein AS-Effekt.

Die Proliferation humaner EZ der Haut wurde durch AS allenfalls minimal inhibiert (Redlitz et al., 1999). Das Wachstum von HUVEC wird entweder gar nicht (Stathakis et al., 1997) oder nur geringfügig um 25% bis 35 % gehemmt (Gately et al, 1996; Moser et al., 1999). Demgegenüber inhibierte AS bei Maus-EZ die Proliferation um 85% (Goretzki et al., 2000). Bei bovinen EZ konnte eine 100% Hemmung der Proliferation durch AS nachgewiesen werden (Lannutti et al., 97; Lucas et al., 1998). In einem 3-D in vitro Angiogenese Assay wurde keine antiangiogene Wirkung von AS auf humane Plazenta-Venen festgestellt (Pil Jung et al., 2003). In den hier präsentierten Experimenten wurde der AS-Effekt sowohl auf humane EZ wie auch auf bovine EZ getestet, ohne dass sich eine Speziesbedingte Änderung der Resultate beobachten ließ.

Es existieren Hinweise für Spezies-Abhängigkeit der ES-Wirkung. In einem 3-D in vitro Angiogenese Modell ließ sich durch humanes ES (hES) keine inhibierende Wirkung auf die Sp-Ausbildung im Rat Aorta Ring Assay erzielen, während Maus-ES (M-ES) wirksam war. Wurden im selben Testmodell humane EZ der Vena saphena zur Sp-Bildung stimuliert, zeigte demgegenüber das hES antiangiogene Potenz (Kruger et al., 2000). In ähnlicher Weise war durch hES keine antiproliferative wie auch keine proapoptische Wirkung bei verschiedenen bovinen EZ festzustellen, wohingegen M-ES effektiv war. Bei Kontrollexperimenten mit humanen EZ zeigte hES die erwartete proapoptische Kapazität (Dhanabel et al., 1999a). Es wurde über fehlende antiproliferative Wirkung von hES auf das Wachstum boviner EZ bei vorhandenem Effekt auf humane EZ berichtet (Dhanabel et al., 1999b). In der hier vorgestellten Arbeit wird die mangelnde Wirkung von hES auf die Proliferation von HUVEC demonstriert, nachdem hES in Experimenten mit BREC ineffektiv war. Somit deutet primär nichts auf mangelnde ES-Wirksamkeit aufgrund von Speziesunterschieden hin. Es wurden jedoch ausschließlich antiproliferative Effekte von hES auf HUVEC getestet.

In einigen Untersuchungen entfaltete ES nur antimigratorische, jedoch keine antiproliferativen Effekte (Yamaguchi et al., 1999). Bereits das erste isolierte hES zeigte sich in Proliferationsexperimenten mit bovinen und humanen EZ unwirksam (Ständker et al., 1997). Es wurde berichtet, dass eine längere hES-Variante antiangiogene Effekte aufweist, wofür die im Vergleich zum Erst-hES-Molekül längere Aminosäuresequenz verantwortlich gemacht wurde (Taddei et al., 1999). Daher wurden hier verschiedene ES-Varianten untersucht. Keine der hier verwendeten ES-Präparationen war effektiv. ES entfaltet seine antiangiogenen Wirkungen in Abhängigkeit vom Serumanteil der EZ-Kultur (Shichiri und Hirata, 2001). In einer weiteren Untersuchung konnte ES VEGF-stimulierte EZ im Gegensatz zu bFGF-behandelten Zellen nicht inhibieren (Sasaki et al., 2000). Unterschiedliche Serum-Anteile wie auch die Art der Zellstimulation änderten nichts an der mangelnden antiangiogenen Wirkung von ES im BREC-MS-SpA. Mangelnde hES-Wirkung wurde auf die makrovaskuläre Abstammung von EZ zurückgeführt (Taddei et al., 1999). Der fehlende Effekt von hES in dieser Arbeit betrifft sowohl mikrovaskuläre EZ (BREC) wie auch makrovaskuläre EZ (HUVEC). Für M-ES ist eine proangiogene Wirkung auf murine EZ beschrieben.

In der betreffenden Untersuchung erhöhte M-ES in Kombination mit bFGF die Überlebensrate von EZ und damit die Ausformung von Sp im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von bFGF (Dixelius et al., 2000).

Trotz der aufgeführten Beispiele mangelnder bzw. unterschiedlicher ES- und AS-Wirkungen bleibt deren antiangiogenes Potenzial in Anbetracht der Menge gegenteiliger Daten unbestritten. Bei Bewertung der antiangiogenen Effekte der Substanzen sollte jedoch der jeweilige Kontext mit einbezogen werden: Stimulationsbedingungen, die Art der EZ, die eingesetzten AS- bzw. ES-Formen, der prinzipielle Versuchsaufbau sind relevante Variablen.

Je genauer der Wirkmechanismus von AS definiert ist, desto besser sollte es gelingen, dass Ausbleiben bzw. Auftreten seines antiangiogenen Einflusses zu erklären. AS interagiert mit den Integrinen  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  boviner aortaler EZ, dabei fungiert vor allem  $\alpha V\beta 3$  als Bindungsstelle (Tarui et al., 2001). ATP Synthase weist Rezeptoreigenschaften für AS auf und kann durch AS inhibiert werden (Moser et al., 2001). Annexin II ist ebenfalls als AS-Rezeptor beschrieben (Tuszynski et al., 2002). AS hemmt Plasmin-induzierte EZ-Migration (Tarui et al., 2002). Intrazelluläre pH-Werterniedrigung durch AS wurde als antiangiogener Mechanismus beschrieben (Wahl et al., 2002). AS wirkt vasokonstriktorisch (Koshida et al., 2003). AS wirkt Apoptose-fördernd (Lucas et al., 1998). AS-behandelte EZ weisen signifikant erhöhtes E-Selectin-Vorkommen auf (Luo et al., 1998). AS verhindert die Signaltransduktion des ‚Hepatocyte Growth Factor‘ (HGF). AS zeigt partielle Sequenzhomologie zu HGF und bindet an den HGF-Rezeptor c-met (Wajih & Sane, 2003). Seit der AS-Entdeckung ist somit eine Vielzahl an Mechanismen und Interaktionen des Moleküls beschrieben. Die mangelnde Wirkung der hier bei BREC (und HUVEC) eingesetzten AS-Formen ist ungeklärt. AS wurde in anderen Modellen retinaler Angiogenese eingesetzt und zeigte antiangiogene Potenz (Igirashi et al., 2003; Meneses et al., 2001).

Ähnlich wie für AS wurden für das erst seit etwa sieben Jahren bekannte ES verschiedene potentielle Wirkmechanismen beschrieben. Interaktionen mit Glypikanen,  $\alpha 5$ - und  $\alpha V$ - Integrinen und mit der Matrix Metalloprotease 2 sind beschrieben (Karumanchi et al., 2001; Kim et al., 2000; Rehn et al., 2001). An das Zellmembranankerprotein Caveolin-1 scheint ES ebenfalls zu binden (Wickstrom et al., 2002). Sowohl für die Wirkung von AS wie auch für ES scheinen  $Ca^{2+}$ -Signale von Bedeutung zu sein (Lianwei et al., 2001). ES induziert Apoptose

(Dhanabel et al., 1999a). ES kann die VEGF-Wirkung inhibieren, indem ES die Phosphorylierung von KDR/Flk-1, einem der VEGF-Rezeptoren, sowie die Aktivierung verschiedener abhängiger Kinasen blockiert (Kim et al., 2002). Auch hier deutet die Vielzahl der diskutierten Mechanismen den weiterhin vorhandenen Klärungsbedarf an. Die definitive Klärung der ES-Wirkmechanismen könnte die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse im BREC-SpA erleichtern. Es bleibt festzuhalten, dass der angiainhibitorische Effekt von AS und ES nicht in jedem Kontext auftritt und somit EZ zu existieren scheinen, die unempfindlich gegenüber den Wirkungen der Substanzen sind.

## 5.1. Zusammenfassung

1. Der Verlauf vieler Erkrankungen (z.B. koronare Herzkrankheit, Diabetes mellitus, Tumoren, rheumatoide Arthritis) wird durch Angiogenese entscheidend beeinflusst. Valide Angiogenese-Modelle sind eine Voraussetzung zur Erforschung angiogener Mechanismen und zur Entwicklung angiogener und antiangiogener Substanzen.
2. In der vorliegenden Arbeit gelingt die Etablierung eines Mikroshären-gestützten „Sprouting“ Assays (SpA) durch Verwendung boviner retinaler Endothelzellen (BREC). Dieser SpA wird als gut definierter und in der Durchführung einfacher Angiogenese-Assay vorgestellt, der viele Teilschritte physiologischer Angiogenese erfasst.
3. Zunehmend wird die Bedeutung der Dimensionalität von Angiogenese-Assays erkannt. Als primär 3-D in vitro Modell kommt der BREC-SpA physiologisch 3-D ablaufender Angiogenese sehr nahe. Dabei kann der BREC-SpA insbesondere auch als Modell für retinale Neovaskularisationen dienen.
4. bFGF und VEGF sind verantwortlich für die Angiogenese-Induktion im BREC-SpA. TNF- $\alpha$  bleibt im gezeigten Angiogenese-Kontext ohne Wirkung.
5. Erhöhung der Fibrinogen-Konzentration innerhalb physiologischer Werte hat einen antiangiogenen Effekt im BREC-SpA.
6. Thrombin wirkt in höheren Konzentration angiogen bei Zugabe ins Medium. Der Effekt von „Medium-Thrombin“ ist wohl matrixunabhängig und vermutlich direkten Wirkungen auf die Endothelzelle zuzuschreiben.
7. Aprotinin ist im BREC-SpA ohne angioregulatorische Wirkung und daher redundant.
8. Der pH-Wert ist ein wichtiger Angiogenese-regulierender Faktor.
9. Die komplette Applikation von Testsubstanzen ins Versuchsmedium führt zur methodischen Vereinfachung des BREC-SpA und vermindert das Risiko unspezifischer Effekte durch (z.B.) pH-bedingte Veränderungen der Matrixstruktur.
10. ECGF/H ist ein potenter angiogener Faktor (aF) im BREC-SpA. ECGF/H bewirkt teilweise nicht quantifizierbare Sp und sollte daher nicht als Standardsubstanz im BREC-SpA verwendet werden.

11. Die Produktion von Angiostatin (AS) durch uPA-Proteolyse von Plasminogen (Plg) und Reduktion von Plasmin durch Sulfhydrylgruppen-Donatoren (SHD) ist reproduzierbar.
12. Im Vergleich mit Plg-Proteolyse durch Elastase ergibt uPA/SHD-AS-Herstellung eine AS-Variante, die sowohl elektrophoretisch wie auch durch N-terminale Sequenzierung unterschieden werden kann.
13. cRGD und TGF- $\beta$ 1 sind potente Angiogenese-Inhibitoren (AI) im BREC-SpA und können als Kontrollsubstanzen zum Screening nach neuen AI fungieren.
14. TGF- $\beta$ 1 zeigt seine AI-Potenz abhängig vom aF und dient als Beispiel für die Kontext-Abhängigkeit von Angiogenese.
15. AS und Endostatin sind im BREC-SpA und in Proliferationsassays mit BREC und humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) ohne antiangiogene Wirkung. Die Ursache der in diesem Kontext fehlenden Wirksamkeit ist unklar.
16. Das in dieser Arbeit vorgestellte Angiogenese-Modell und die dargestellten Substanzwirkungen leisten einen Beitrag zur Erforschung der angiogenen Mechanismen und Faktoren. Die komplexen Interaktionen im „Angiogenese-Kontext“ müssen weiter intensiv untersucht werden, dafür bietet der BREC-SpA ausgezeichnete Voraussetzungen.

## 5.2. Summary

1. The course of many diseases (for example ischaemic heart disease, diabetes mellitus, tumors and rheumatoid arthritis) are affected critically by Angiogenesis. Valid models of Angiogenesis are a prerequisite for research on angiogenic mechanisms and for the development of angiogenic and antiangiogenic substances.
2. This paper describes the establishment of a microcarrier-based sprouting assay (SpA) by using bovine retinal endothelial cells (BREC). This angiogenesis assay represents a well defined system, which is characterized by its technical simplicity and which includes many steps that take place in physiological Angiogenesis.
3. Researchers focus increasingly on the dimensionality of Angiogenesis assays. As a primarily three dimensional in vitro assay the BREC-SpA closely relates to three dimensionally occurring physiological Angiogenesis. The BREC-SpA can especially serve as a model for retinal neovascularization.

4. bFGF and VEGF promote Angiogenesis in the BREC-SpA. TNF- $\alpha$  does not effect Angiogenesis in this context.
5. An increase of Fibrinogen concentrations within physiological range results in an antiangiogenic response in the BREC-SpA.
6. Thrombin promotes Angiogenesis in higher concentrations when added to the cell medium. The angiogenic effect of Thrombin in the medium seems to be independent of the matrix and probably is due to direct effects on the endothelial cells.
7. Since Aprotinin does not have any effect on Angiogenesis it is redundant in the BREC-SpA.
8. The pH is important in regulation of Angiogenesis.
9. The complete application of test substances into the assay medium results in a methodic simplification. Also, it decreases the risk of unspecific effects caused by modifications of matrix structure, for example due to pH effects.
10. ECGF/H is a potent angiogenic factor in the BREC-SpA. Since ECGF/H partially leads to the development of sprouts that can not be quantified it should not be used as a routine substance in the BREC-SpA.
11. Production of Angiostatin by proteolysis of Plasminogen by uPa and reduction of Plasmin by Sulfhydrylgroup donators (SHD) is a reproducible method.
12. Compared to proteolysis of Plasminogen by Elastase the method using uPA and SHD generates an Angiostatin form that can be distinguished by electrophoresis as well as by N-terminal sequencing.
13. cRGD and TGF- $\beta$ 1 act as potent Angiogenesis inhibitors in the BREC-SpA. Therefore these substances can be used as a control when screening for new Angiogenesis inhibitors.
14. The antiangiogenic potential of TGF- $\beta$ 1 depends on the applied angiogenic factor and therefore serves as an example for contextual dependency of Angiogenesis.
15. Angiostatin and Endostatin do neither show any antiangiogenic effect in the BREC-SpA nor in proliferation assays with BREC and HUVEC. The cause of their lacking potential in this context is not known.
16. The Angiogenesis model presented in this work as well as the demonstrated effects of substances contribute to the research of angiogenic mechanism and

angiogenic factors. The BREC-SpA provides excellent conditions for further research on the complex interactions of the context of Angiogenesis, which need to be investigated more thoroughly.

## 6. Anhang

### 6.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb. (Abbildung)

aF (angiogene Faktoren)

aFGF (acidic Fibroblast Growth Factor)

AI (Angiogenese-Inhibitoren)

Ak (Antikörper)

Aminosäuren-Abkürzungen:

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	<u>R</u>
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	<u>D</u>
Cystein	Cys	<u>C</u>
Glutamin	Gln	<u>Q</u>
Glutaminsäure	Glu	<u>E</u>
Glycin	Gly	<u>G</u>
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Asparaginsäure oder Asparagin	Asx	B
Glutaminsäure oder Glutamin	Glx	Z
Unbekannte Aminosäure	Xaa	X

AI (Angiogenese-Inhibitoren)

AS (Angiostatin)

$\alpha 1\beta 1$  (Alpha1beta1-Integrin)

$\alpha 3\beta 1$  (Alpha3beta1-Integrin)

$\alpha 5\beta 1$  (Alpha5beta1-Integrin)  
 $\alpha 9\beta 1$  (Alpha9beta1-Integrin)  
 $\alpha 6\beta 1$  (Alpha6-beta1-Integrin)  
 $\alpha 4\beta 1$  (Alpha4beta1-Integrin)  
 $\alpha 2\beta 1$  (Alpha2beta1-Integrin)  
 $\alpha V\beta 1$  (alphaV-beta1-Integrin)  
 $\alpha V\beta 3$  (AlphaVbeta3-Integrin)  
 $\alpha V\beta 5$  (AlphaVbeta5-Integrin)  
 $\alpha 2\beta 1$  (Alpha2beta1-Integrin)  
 $\alpha 2\beta 5$  (Alpha2beta5-Integrin)  
ATP (Adenosintri-phosphat)  
bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor)  
BREC (Bovine Retinal Endothelial Cells)  
CAM (Chicken Chorioallantoic Assay)  
CD (Cluster of Differentiation)  
cRGD (Zyklisches RGD-Peptid)  
d1-uPA/d2-uPA (doppelkettiges uPA 1 und 2 )  
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)  
DR (Diabetische Retinopathie)  
3-D (Dreidimensional)  
EZ (Endothelzelle)  
ECGF/H (Endothelial Cell Growth Factor/Heparin)  
ECGM („Endothelial cell growth medium“; Endothelzellwachstumsmedium)  
E.coli (Escherichia Coli)  
EGF (Epidermal Growth Factor)  
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)  
El.-AS (Elastase-Angiostatin)  
ES (Endostatin)  
EZM (Extrazellulärmatrix)  
Fib (Fibrin)  
Fibg (Fibrinogen)  
FBS (fötales bovines Serum)  
FGF-5 (Fibroblast Growth Factor-5)  
FGFR-1 (Fibroblast Growth Factor Receptor-1)

flt 1 und 4 (FMS-ähnliche Tyrosin Kinase 1 und 4)  
flk-1 (Fetal liver kinase)  
GSH (Glutathion)  
hES (humanes Endostatin)  
HCl (Salzsäure)  
HGF (Hepatocyte Growth Factor)  
HLPC (High Pressure Liquid Chromatography)  
HUVEC („Human Umbilical Venous Endothelial Cells“)  
IGF-1 (Insulin like Growth Factor-1)  
kDA (kiloDalton)  
LLC (Lewis lung carcinoma)  
linRGD (lineares RGD-Peptid)  
linRGE (lineares RGE-Peptid)  
M-ES (Maus-Endostatin)  
MMP (Matrix Metalloproteasen)  
mRNA (messenger RNA)  
MS (Microsphären)  
MS-SpA (Microsphären-gestützter Sprouting Assay)  
N (Stickstoff)  
NAC (N-Acetyl-Cystein)  
NaCl Natriumchlorid)  
NaOH (Natriumhydroxid)  
NC1 (Non-collagenous 1)  
NPDR (Nicht-proliferative diabetische Retinopathie)  
PA (Plasminogen-Aktivatoren)  
PAI-1 (Plasminogen Aktivator-Inhibitor 1)  
PBS (Phosphat-Salz-Puffer)  
Plg (Plasminogen)  
Plm (Plasmin)  
PBS („Phosphate buffer sulfate“, Phosphatsalzpuffer)  
PDGF (Plateled Derived Growth Factor)  
PDR (Proliferative diabetische Retinopathie)  
Pro-Io (Propidium-Iodid)  
PSA (Prostata spezifisches Antigen)

RNase (Ribonucleinsäure-spaltendes Enzym)  
 RT (Raumtemperatur)  
 sc-uPA (single chain urokinase Plasminogen Aktivator)  
 SHD (Sulphydrylgruppen-Donator)  
 SDS (Sodiumdodecylsulfat)  
 Sp („Sprouts“, Gefäßsprossen)  
 SpA (Sprouting Assay)  
 SPARC (Secreted Protein Acidic Rich Cysteine)  
 TBS (Tris-Salz-Puffer)  
 TGF-  $\alpha$  (Transforming Growth Factor-alpha)  
 TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor-beta 1)  
 TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteases)  
 TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor-alpha)  
 uPA (Urokinase Plasminogen Aktivator)  
 uPA/SHD-AS (Urokinase Plasminogen Aktivator/Sulphydrylgruppen-Donator-  
 Angiostatin)  
 VEGF (Vascular endothelial growth factor)  
 vWF (von Willebrand Faktor)  
 Zn<sup>2+</sup> (Zink)  
 2-D (Zweidimensional)

## 6.2. Material

### Chemikalien, Proteine, Zellkulturmaterialien:

Aceton: Best.nr. 5025.2, Roth  
 Ammoniumsulfat: Best.nr.9218.2, Roth  
 Bovines Albumin: Best.nr. A 7030, Sigma  
 BCA Protein Assay Kit: Best.nr. 23225ZZ, Pierce  
 rh bFGF: Best.nr. 13258-029, Gibco  
 Aprotinin: Reg.nr. 48458, Bayer  
 Bisbenzimid: Best.nr. B 2261, Sigma  
 cRGD: Best.nr. H-2574, Bachem Biochemica  
 Dulbecco's Modified Eagle-Medium (DMEM): Best.nr. 42430-025, Gibco  
 Elastase: Best.nr. 1027891, Boehringer Mannheim

rh Endostatin (versch. Formen): Ludger Ständker, Niedersächsisches Institut  
für Peptidforschung, D-30625 Hannover

Endothel Cell Growth Supplement / Heparin: Best.nr. 30120, Promo Cell

Endothel Cell Growth Medium : Best.nr. C-22010, Promo Cell

Wachstumsfaktoren des ECGM ( 0,1 ng/ml rh Epidermal growth factor,  
1,0 ng/ml bFGF, 1,0 µg/ml Hydrocortisone, 50µg/ml Gentamicin, 50  
ng/ml Amphotericin B) : Best.nr. C-39210, Promo Cell

Eppendorf Reaktionsgefäße: Best.nr. 0030 121.023, Eppendorf GmbH

Epsilon-Aminocaprinsäure: Best.nr. A-2504, Sigma

Fötales bovines Serum: Best.nr. 7758075, Greiner

Fibronectin (bovin): Best.nr. F-0895, Sigma

Fibrinogen (bovin): Best.nr. F 4753, Sigma

Gelatine (Typ B): Best.nr. G 1393, Sigma

L-Glutamin: Best.nr. 25030-024, Gibco

Glutathion (L-reduzierte Form): Best.nr. G-4251, Sigma

Heparin (bovin): Best.nr. H-0777, Sigma

Hirudin: Best.nr. H-7380, Sigma

Kammer-Glasplatten: Best.nr. 177445, Nunc

Kristallviolett-Lösung: Best.nr. C 0775, Sigma

lineares RGD: Best.nr. H-1155, Bachem Biochemica

lineares RGE: Best.nr. H-7745, Bachem Biochemica

Lysin-Sepharose: Best.nr. L 5631, Sigma

Methanol: Best.nr. 4627.3, Roth

MCDB 131 Medium: Best.nr. FM-52-L, C.C. Pro

Microsphären (Cytodex 3 -): Best.nr. C 3275, Sigma

N-Acetyl-Cystein: Best.nr. A-8199, Sigma

Natrium-azid: Art.nr. 6688, Merck

Natronlauge (1 N): Art.nr. 9137100, Merck

Paraformaldehyd: Best.nr. 4005, Merck

PBS Dulbecco's: Best.nr. 14040-091, Gibco.

Penicillin/Streptomycin-Lösung: Best.nr. 15140-114, Gibco.

Petrischalen, 96 mm Durchmesser: Best.nr. 633171, Greiner

Phenylmethylsulfonylfluorid: Best.nr. P 7626, Sigma

Propidium-Iodid (95-98%): Best.nr. P 4170, Sigma

RNase : Best.nr. 109169, Boehringer Mannheim  
 Salzsäure (1 N): Art.nr. K 025.1, Roth  
 Skim milk powder: Best.nr. 70166, Fluka Chemie  
 TGF  $\beta$ 1: Best.nr. B 1010, R & D Systems  
 Thrombin(bovines): Best.nr. T-7513, Sigma  
 Thimerosal: Best.nr. T-5125, Sigma  
 Tris-Puffer: Best. Nr. T-1503, Sigma  
 Trypsin-EDTA: Best. nr. T 8253, Sigma  
 Tween 20: (= Polyoxyethlen-Sorbitan-Monolaurate): Best.nr. P 1379, Sigma  
 rh VEGF 165: Best.nr. 293-VE-010, R & D Systems  
 Vitronectin: eigene Präparation , Arbeitsgruppe Prof. Preissner, 1997  
 12-well-Zellkulturplatten: Best.nr. 3513, Corning Costar  
 24-well-Tellkulturplatten: Best.nr. 3524, Corning Costar  
 96-well-Zellkulturplatten: Best.nr. 167008, Nunc

Elektrophorese und Blot-Material:

Acrylamid (99,9%): Best.nr. 161-0100, Bio-Rad  
 Ammoniumpersulfat: Best.nr. 161-0700, Bio-Rad  
 ECL Reagenz: Best.nr. RPN 2106, Amersham Pharmacia  
 Glycin: Best.nr. 3908.3, Roth  
 Fotopapier Kodak X-omat, Best.nr. 7351 848-7, Sigma  
 Polyvinyliden-Fuorid Transfer Membran (Imobilon P): Best.nr. IPVH00010,  
 Millipore  
 Prestained Protein Marker "High": Best.nr. 161-0309, Bio-Rad  
 Prestained Protein Marker "Low": Best.nr. 161-0305, Bio-Rad  
 Sodium Dodecyl Sulfate: Best.nr. 28365, Pierce  
 Temed (=N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin): Best.nr. 161-0800, Bio-Rad  
 Tween 20 (= Polyoxyethlen-Sorbitan-Monolaurate): Best.nr. P 1379, Sigma

Zellen:

BREC: Sigrid Zink, Diabetes- Forschungsinstitut, Düsseldorf  
 HUVEC: Eigene Präparation, Arbeitsgruppe Prof. Preissner, 1997-1999

Antikörper:

Aktin-AK (Kaninchen Anti-synthetisches Actin-Fragment): Best.nr. A-2066,

Sigma

Glatter Muskel-Aktin-Ak (Kaninchen -Anti-synthetisches Glatter Muskel Aktin-

Fragment, polyklonal): Best.nr. 2066A, Sigma

Kaninchen Antikörper (Schwein Anti-Kaninchen, FITC-konjugiert):

Best.nr. F 205-02, Dako

Streptavidin-Ak (Peroxidase-konjugiert): Best.nr. P 0397, Dako

von Willebrand Faktor-Ak (Kaninchen Anti-Human, polyklonal): Best.nr. A 082,

Dako

Adressen der genannten Firmen:

Amersham Pharmacia: D-38110 Braunschweig

Bachem Biochemica: D-69126 Heidelberg

Bayer: D-51368 Leverkusen

Beckman: 80807 München

Bio-Rad: D-80939 München

Boehringer Mannheim: D-68305 Mannheim

C.C.Pro: D-67433 Neustadt/W.

Corning Costar: D-55294 Bodenheim

Dako: D-22047 Hamburg

Eppendorf GmbH: D-22331 Hamburg

Fluka Chemie: CH-9470 Buchs

Gibco: D-76131 Karlsruhe

Greiner: D-72636 Frickenhausen

Immunotech: F-13276 Marseille

Molecular Devices: Menlo Parc, CA, USA

Millipore: D-65731 Eschborn

Merck: D-64271 Darmstadt

Nunc: D-65203 Wiesbaden

Pierce: Vertrieb über Perbio Science, 53113 Bonn

Promo Cell : D-69120 Heidelberg

R&D Systems: D- 65205 Wiesbaden

Sigma: D-82039 Deisenhofen

Roth: D-76185 Karlsruhe

### 6.3. Referenzen

Abe T, Okamura K, Ono M, Kohno K, Mori T, Hori S & Kuwano M. Induction of vascular endothelial tubular morphogenesis by human glioma cells. *J. Clin. Invest.* 92: 54-61, 1993.

Adamis A P, Kwoki M, Tolentino M J, Kim J. Advanced glycation end products (AGE) increase retinal VEGF gene expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37: 975, 1996.

Adamis A, Miller J, Bernal M, D'Amico D, Folkman J, Yeo T & Yeo K. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 118: 445-450, 1996.

Aiello L P, Avery R L, Arrigg P G, Keyt B A, Jampel H D, Shah S T, Pasquale L R, Thieme H, Iwamoto M A & Park J E. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* 331: 1480-1487, 1994.

Albelda S M, Daise M, Levine E M & Buck C A: Identification and characterization of cell-substratum adhesion receptors on cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 83: 1991-2002, 1989.

Amin R H, Frank R N, Kennedy A, Elliot D, Pucklin J E & Abrams G W. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38 : 2729-2741, 1997.

Antonelli-Orlidge A, Saunders K, Smith S & D'Amore P. An activated form of transforming growth factor-beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4544-4548, 1989.

Armstrong D, Augustin A J, Spengler R, Al-Jada A, Nickola T, Grus F & Koch F. Detection of vascular endothelial growth factor and tumor necrosis factor alpha in

epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy and macular pucker. *Ophthalmologica* 212: 410-414, 1998.

Arnold F & West D C. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol. Ther.* 52: 407-422, 1991.

Asplin I R, Wu S M, Mathew S, Bhattacharjee G & Pizzo S V. Differential regulation of the fibroblast growth factor (FGF) family by  $\alpha_2$ -macroglobulin: evidence for selective modulation of FGF-2-induced angiogenesis. *Blood* 97: 3450-3457, 2001.

Baird A & Durkin T. Inhibition of endothelial cell proliferation by type-beta transforming growth factor: interactions with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138: 476-482, 1986.

Bajou K, Lewalle J M, Martinez C R, Soria C, Lu H, Noel A & Foidart J M. Human breast adenocarcinoma cell lines promote angiogenesis by providing cells with uPA-PAI-1 and by enhancing their expression. *Int. J. Cancer* 100: 501-506, 2002.

Bayless K J, Salazar R & Davis G E. RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three dimensional fibrin matrices involves the  $\alpha V\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins. *Am J Pathol* 156: 1673-1683, 2000.

Benelli R & Albini A. In vitro models of angiogenesis: the use of Matrigel. *Int. J. Biol. Markers* 14: 243-246, 1999.

Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu T H, Itoh H, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb C & Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biol.* 2: 737-744, 2000.

Bhujwala Z M, Artemov D, Ballesteros P, Cerdan S, Gillies R J & Solaiyappan M. Combined vascular and extracellular pH imaging of solid tumors. *NMR Biomed.* 15: 114-119, 2002.

Bini A, Wu D, Schnuer J & Kudryk B J. Characterization of stromelysin 1 (MMP-3), matrilysin (MMP-7), and membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) derived fibrin(ogen) fragments D-dimer and D-like monomer: NH<sub>2</sub>-terminal sequences of late-stage digest fragments. *Biochemistry* 38: 13928-13936, 1999.

Bogousslavsky J, Victor S J, Salinas EO, Pallay A, Donnan G A, Fieschi C, Kaste M, Orgogozo J M, Chamorro A & Desmet A. Fiblast (trafermin) in acute stroke: results of the European-Australian phase II/III safety and efficacy trial. *Cerebrovasc. Dis.* 14: 239-251, 2002.

Bombardini T, Picano E. The coronary angiogenic effect of heparin: experimental basis and clinical evidence. *Angiology* 48(11): 969-76, 1997.

Breier G, Blum S, Peli J, Groot M, Wild C, Risau W & Reichmann E. Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int. J. Cancer* 97: 142-148, 2002.

Brem St. Angiogenesis antagonists: Current clinical trials. *Angiogenesis* 2: 9-20, 1998.

Brown J B, Maynes S F, Bezos A, Maguire D J, Ford M D & Parish C R. A novel in vitro assay for human angiogenesis. *Lab. Inv.* 75: 539-555, 1996.

Brown L F, Asch B, Harvey V S, Buchinski B & Dvorak H F. Fibrinogen influx and accumulation of cross-linked fibrin in mouse carcinomas. *Cancer Res.* 48: 1920-1925, 1988.

Brooks P C, Clark R A F & Cheresh D A. Requirement of vascular integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 for angiogenesis. *Science* 264: 569-571, 1994.

Brooks S E, Gu X, Kaufmann P M, Marcus M D & Caldwell R B. Modulation of VEGF production by pH and glucose in retinal Muller cells. *Curr. Eye Res.* 17: 875-882, 1998.

Buckley C D, Pilling D, Henriquez N V, Parsonage G, Threlfall K, Scheel-Toellner D, Simmons D L, Akbar A N, Lord J M & Salmon M. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase3-activation. *Nature* 397: 534-539, 1999.

Buerkle M A, Pahernik S A, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K & Dellian M. Inhibition of alpha V – integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumors in vivo. *Br. J. Cancer* 86: 788-795, 2002.

Burbridge M F, West D C, Atassi G & Tucker G C. The effect of extracellular pH on angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 3: 281-288, 1999.

Burgos R, Simo R, Audil, Mateo C, Mesa J, Garcia-Ramirez M & Carrascosa A. Vitreous levels of vascular endothelial growth factor are not influenced by serum concentrations in diabetic retinopathy. *Diabetologica* 40: 1107-1109, 1997.

Camera M, Hajjar K A, Pan S, Szabo P, Vicart P, Paulin D & Weksler B B: Profibrinolytic properties characterize a stably transformed human endothelial cell line. *Blood Coagul. & Fibrinolysis* : 153-165, 1998.

Cao Y, Chen A, An S S A, Ji R W, Davidson D, Cao Y & Llinas M. Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J. Biol. Chem.* 272: 22924-22928, 1997.

Cao Y, Ji R W, Davidson D, Schaller J, Marti D, Söhndel S, McCance S G, O'Reilly M S, Llinas M & Folkman J. Kringle domains of human angiostatin. *J. Biol. Chem.* 271: 29461-29467, 1996.

Cao Y, O'Reilly M S, Marshall B, Flynn E, Ji R-W & Folkman J. Expression of Angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J.C.I.* 101: 1055-1063, 1995.

Cardarelli P M, Cobb R R, Nowlin D M, Scholz W, Gorcsan F, Moscinski M, Yasuhara M, Chiang S-L & Lobl T J. Cyclic RGD peptide inhibits  $\alpha 4\beta 1$  interaction with connecting segment 1 and vascular adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 269: 18668-18673, 1994.

Carmeliet P, Ferreira V, Brier G, Pollefeyt S, Kirchens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal, K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W & Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439, 1996.

Castellon R, Hamdi H K, Sacerio I, Aoki A M, Kenney M C & Ljubimov A V. Effects of angiogenic growth factor combinations on retinal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* 74: 523-535, 2002.

Chaudhury A & D'Amore P A. Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta. *J. Cell. Biochem.* 47: 224-229, 1991.

Chavakis T, Kanse S M, Yutzy B, Lijnen H R & Preissner K T. Vitronectin concentrates proteolytic activity on the cell surface by trapping soluble uokinase receptor-urokinase complexes. *Blood* 91: 2305-2312, 1998.

Chen C S, Toda K I, Maruguchi Y, Matsuyoshi N, Horiguchi Y & Imamura S. Establishment and characterization of a novel in vitro angiogenesis model using a microvascular endothelial cell line, F2-C, cultured in chemically defined medium. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 33: 796-802, 1997.

Chen Y H, Wu H L, Chen C K, Huang Y H, Yang B C & Wu L W. Angiostatin antagonizes the action of VEGF-A in human endothelial via two distinct pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (3): 804-810, 2003.

Cheresh D A. Death to a blood vessel, death to a tumor. *Nature Medicine* 4: 395-396, 1998.

Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M S & Folkman J. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95: 5579-5583, 1998.

Clapp C, Martial M A, Guzman R Z, Rentier-Delrue F & Weiner R I. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133: 1292-1299, 1993.

Clark R A F, Tonnesen M G, Gailit J & Cheresh D A. Transient functional expression of  $\alpha V\beta 3$  on vascular cells during wound repair. *Am. J. Pathol* 148: 1407-1421, 1996.

Collen A, Koolwijk P, Kroon M & van Hinsbergh V W: Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis* 2: 153-165, 1998.

Collen A, Smorenburg S M, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C, van Hinsbergh V W. Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro. *Cancer Res.* 60(21): 6196-6200, 2000.

Cornelius L A, Nehring L C, Harding E, Bolanowski M, Welgus H G, Kobayashi D K, Pierce R A & Shapiro S D. Matrix metalloproteinases generate Angiostatin: effects on neovascularization. *J. Immunology* 161: 6845-6852, 1998.

Cursiefen C & Schönher U. Angiogenese und Angiogenesehemmung am Auge. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 210: 341-351, 1997.

D'Amore P: Mechanism of retinal and choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35: 3974-3979, 1994.

Davis S, Aldrich T H, Jones P F, Acheson A, Compton TL & Jain V. Isolation of angiopoetin-1 , a ligand for the TIE-2 receptor by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87: 1161-1169, 1996.

Davis G E & Camarillo C W. Regulation of endothelial cell morphogenesis by integrins, mechanical forces, and matrix guidance pathways. *Exp. Cell Res.* 216: 113-123, 1995.

Dayer J M. The saga of the discovery of IL-1 and TNF and their specific inhibitors in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 69: 123-132, 2002.

Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman M J W, Lu H, Knebelmann B, Segal M & Sukhatme V P. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274 (17): 11721-11726, 1999a.

Dhanabel M, Volk R, Ramchandran R, Simons M & Sukhatme V P. Cloning, expression and in vitro activity of human endostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 345-352, 1999b.

Dejana E, Lampugnani E, Giorgi M, Marchisio P. Fibrinogen induces endothelial cell adhesion and spreading via the release of endogenous matrix proteins and the recruitment of more than one integrin receptor. *Blood* 75: 1509-1517, 1990.

De Oliveira F. Pericytes in diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmology* 50: 134-143, 1966.

Deutsch D G & Mertz E T. Plasminogen: Purification from human plasma by affinity chromatography. *Science* 170: 1095-1096, 1970.

De Vries C, Escobedo J A, Ueno H, Honck K, Ferrara N & Williams C . The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-991, 1992.

Dixelius J, Larsson L, Sasaki T, Holmqvist K, Lu L, Engström A, Timpl R, Welsh M & Claesson-Welsh L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 95 (11) : 3403-3411, 2000.

Dmitriev A V & Mangel S C. Circadian clock regulation of pH in the rabbit retina. *J. Neurosci.* 21: 2897-2902, 2001.

Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler I J. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of Angiostatin in Lewis Lung Carcinoma. *Cell* 88: 801-810, 1997.

Drixler T A, Borel Rinkes I H M, Ritchie E D, van Vroonhoven T J M V, Gebbink M F B G & Voest E E. Continuous administration of angiostatin inhibits accelerated growth of colorectal liver metastases after partial hepatectomy. *Cancer Res.* 60: 1761-1765, 2000.

Duffy M J, Maguire T M, McDermott E W & O'Higgins N. Urokinase plasminogen activator: a prognostic marker in multiple types of cancer. *J. Surg. Onc.* 71: 130-135, 1999.

Engelmann M G & Nikol S. Therapeutische Neoangiogenese. *Dtsch. Med. Wochenschr* 126: 1053-1057, 2001.

Eliceiri B P & Cheresh D A. Adhesion events in angiogenesis. *Curr. Opinion in Cell Biol.* 13: 563-568, 2001.

Eriksson K, Magnusson P, Dixelius J, Claesson-Welsh L & Cross M J. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to bFGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett* 536 (1-3): 19-24, 2003.

Falcone D J, Khan K M F, Layne T & Fernandes L. Macrophage formation of Angiostatin during inflammation. *J. Biol. Chem.* 273: 31480-31485, 1998.

Felbor U, Dreier L, Bryant R A R, Ploegh H L, Olsen B R & Mothes W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J.* 19: 1187-1194, 2000.

Feldmann M & Maini R N. Discovery of TNF-alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis: preclinical and clinical studies. *Joint Bone Spine* 69: 12-18, 2002.

Feng X, Clark R A F, Galanakis D & Tonnesen M G. Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: Stabilization of  $\alpha V\beta 3$  mRNA by fibrin. *J. Invest. Dermat.* 113: 913-919, 1999.

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.

Ferrara N, Carver-Morre K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea K S, Powell-Braxton L, Hillan K J & Moore M W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442, 1996.

Fischer S, Sharma H S, Karliczek G F & Schaper W. Expression of vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor in pig cerebral microvascular endothelial cells and its upregulation by adenosine. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 28: 141-148, 1995.

Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1182-1186, 1971.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1: 27-31, 1995.

Folkman J & Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551-556, 1980.

Folkman J, Browder T & Palmbld J. Angiogenesis research: Guidelines for translation to clinical application. *Thromb. Haemost.* 86: 23-33, 2001.

Folkman J, Cole P & Zimmermann S. Tumor behavior in isolated perfused organs: In vitro growth and metastasis of biopsy material in rabbit and canine intestinal segment. *Ann. Surg.* 164: 491-503, 1966.

Folkman J, Long D M & Becker F F. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 16: 453-467, 1963.

Folkman J & Shing Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267: 10931-10934, 1992.

Form D M, Pratt B M & Madri J A. Endothelial cell proliferation during angiogenesis: in vitro modulation by basement membrane components. *Lab. Invest.* 55: 521-530, 1986.

Frank R N, Amin R H, Elliot D, Puklin J E & Abrams G W. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor are present in epiretinal and choroidal neovascular membranes. *Am. J. Ophthalmol.* 122: 393-403, 1996.

Friedländer M, Brooks P, Shaffer R, Kincaid C, Varner J & Cheresh D. Definition of two angiogenic pathways by distinct LV integrins. *Science* 270: 1500-1502, 1995.

Friedländer M, Theesfeld C L, Sugita M, Fruttiger M, Thomas M A, Chang S & Cheresh D A. Involvement of integrins  $\alpha V\beta 3$  und  $\alpha V\beta 5$  in ocular neovascular disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 9764-9769, 1996.

Friling R, Yassar Y, Levy R, Kost J, Schwartz B, Mikhailowsky R & Lamprecht S A. A role of transforming growth factor-beta 1 in the control of corneal neovascularization. *In Vivo* 10: 59-64, 1996.

Galzie Z, Kinsella A R & Smith J A. Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem. Cell Biol.* 75: 669-685, 1997.

Gately S, Twadorski P, Stack M S, Cundiff D L, Grewa D, Castellino F J, Enghild J, Kwaan H C, Lee F, Kramer R A, Volpert O, Bouck N & Soff G A. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10868-10872, 1997.

Gately S, Twardoski P, Stack M S, Patrick M, Boggio L, Cundiff D L, Schnaper H W, Madison L, Volpert O, Bouck N, Enghild J, Kwaan H C & Soff G A. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Canc. Res.* 56: 4887-4890, 1996.

Gerweck L E. Tumor pH: implications for treatment and novel drug design. *Semin. Radiat. Oncol.* 8: 176-182, 1998.

Goerges A L & Nugent M A. Regulation of vascular endothelial growth factor binding and activity by extracellular pH. *J. Biol. Chem.* 278: 19518-19525, 2003.

Goretzki L, Lombardo C R & Stallcup B W. Binding of the NG2 Proteoglycan to Kringle Domains Modulates the Functional Properties of Angiostatin and Plasmin(ogen). *J. Biol. Chem.* 275: 28625-28633, 2000.

Gorman C. The hope and the hype. *Time*: 40-53, 18. Mai 1998.

Goto F, Goto K, Weindel K & Folkman J. Synergistic effects of Vascular Endothelial Growth Factor and basic Fibroblast Growth Factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab. Invest.* 69: 508-517, 1993.

Graf M, Halbach E und Kaufmann H. Ursachen von Blindheit in Hessen in 1996. *Klin. Monatsbl. Augheilkunde* 215: 50-55, 1999.

Greisler H P, Klosak J J, Dennis J W, Karesh S M, Ellinger J, Kim DU. Biomaterial pretreatment with ECGF to augment endothelial cell proliferation. *J. Vasc. Surg.* 5(2): 393-399, 1987.

Griffioen, A W & Molema G. Angiogenesis: Potentials for the pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation. *Pharm. Rev.* 52 (2): 237-268, 2000.

Guan K P, Ye HY, Yan Z, Wang Y & Hou S K. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 61: 719-723, 2003.

Guedez L, Rivera A M, Salloum R, Miller M L, Diegmüller J J, Bungay P M & Stetler-Stevenson W G. Quantitative assessment of angiogenic responses by the directed in vivo angiogenesis assay. *Am. J. Pathol* 162: 1431-1439, 2003.

Guo Y-L, Wang S & Colman R W. Kininostatin, an angiogenic inhibitor, inhibits endothelial cell proliferation and induces apoptosis of human endothelial cells. *Arterioscler. Thr. Vasc. Biol.* 21: 1427-1433, 2001.

Gutheil J C, Campbell T N, Pierce P R, Watkins J D, Huse W D, Bodkin D J & Cheresch D A. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using vitaxin: A humanized monoclonal antibody to the integrin  $\alpha V\beta 3$ . *Clin. Cancer Res.* 6: 3056-3063, 2000.

Hall H, Baechi T & Hubbell J A. Molecular properties of fibrin-based matrices for promotion of angiogenesis in vitro. *Microvasc. Res.* 62: 315-326, 2001.

Hanahan D. A flanking attack on cancer. *Nature Med.* 4: 13-14, 1998.

Hanahan D & Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.

Hammes H-P, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner K T. Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nature Med.* 2: 529-533, 1996.

Haralabopoulos G C, Grant D S, Kleinman H K & Maragoudakis M E. Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am. J. Physiol.* 273: 239-245, 1997.

Hata Y, Nakagawa K, Ishibashi T, Inomata H, Ueno H & Sueishi K. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal glial cells promotes in vitro angiogenesis. *Virchows Archiv* 426: 479-485, 1995.

Hata-Sugi N, Kawase-Kageyama R & Wakabayashi T. Characterization of rat aortic fragment within collagen gel as an angiogenesis model; capillary morphology may reflect the action mechanisms of angiogenesis inhibitors. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 446-451, 2002.

Heidtmann H-H, Nettelbeck D M, Mingles A, Jäger R, Weelker H G & Kontermann R E. Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by prostate-specific antigen. *Br. J. Cancer* 81: 1269-1273, 1999.

Hewett P W & Murray J C. Coexpression of flt-1, flt-4 and KDR in freshly isolated and cultured human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 221: 697-702, 1996.

Hill D J, Flyvbjerg A, Arany E, Lanszus F F & Klebe J G: Increased levels of serum fibroblast growth factor-2 in diabetic pregnant women with retinopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 1452-1457, 1997.

Huang X & Lee C. From TGF-beta to cancer therapy. *Curr. Drug Targets* 4: 243-250, 2003.

Hynes R O. Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25, 1992.

Ingber D E & Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation for fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* 109: 317-330, 1989.

Igirashi T, Miyake K, Kato K, Watanabe A, Ishizaki M, Ohara K & Shimada T. Lentivirus-mediated expression of angiostatin efficiently inhibits neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. *Gene Ther.* 10: 219-226, 2003.

Isner J M, Pieczik A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield U, Ravzi S, Walsh K & Symes J T. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of ph VEGF 165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 348: 370-374, 1996.

Jain R K, Schlenger K, Höckel M & Yuan F. Quantitative angiogenesis assays: Progress and problems. *Nat. Med.* 3: 1203-1208, 1997.

Jiang L, Jha V, Dhanabel M, Sukhatme V P & Alper S L. Intracellular  $Ca^{2+}$  signaling in endothelial cells by the angiogenesis inhibitors endostatin and angiostatin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: 1140-1150, 2001.

Jimenez B, Volpert O V, Crawford S E, Febbraio M, Siverstein R L & Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat. Med.* 6: 41-48, 2000.

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chivov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkinen N & Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15(2): 290-298, 1996.

Jung S P, Siegrist B, Wade M R, Anthony C T & Woltering E A. Inhibition of human angiogenesis with heparin and hydrocortisone. *Angiogenesis* 4(3): 175-186, 2001.

Jurasz P, Alonso D, Castro-Blanco S, Murad F & Radomski M W. Generation and role of Angiostatin in human platelets. *Blood* 102 (9): 3217-3223, 2003.

Kaji T, Yamada A, Miyajima S, Yamamoto C, Fujiwara Y, Wight T N & Kinsella

M G. Cell-density dependent regulation of proteoglycan synthesis by transforming growth factor-beta (1) in cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275: 1463-1470, 2000.

Kamada H, Tsutsumi Y, Kihira T, Tsunoda S, Yamamoto Y & Mayumi T. In vitro remodelling of tumor vascular endothelial cells using conditioned medium from various tumor cells and their sensitivity to TNF-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 809-813, 2000.

Kampa M, Nistikaki A, Tsaouis V, Maliaraki N, Notas G & Castanas E. A new automated method for the determination of the total antioxidant capacity of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clin. Pathol* 2(1): 3, 2002.

Kamphaus G D, Colorado P C, Panka D J & Hopfer H. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Biol. Chem.* 275: 1209-1215, 2000.

Karumanchi S A, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, Dhanabal M, Hanai J-I, Venkataraman G, Shriver Z, Keiser N, Kalluri R, Zeng H, Mukhopadhyay D, Chen R L, Lander A D, Hagihara K, Yamaguchi Y, Sasisekharan R, Cantley L & Sukhatme V P. Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors. *Molecular cell* 7: 811-822, 2001.

Kassam G, Kwon M, Yoon C-S, Graham K S, Young M K, Gluck S & Waisman D M. Purification and characterization of A<sub>61</sub>. *J Biol. Chem.* 276: 8924-8933, 2001.

Kawaguchi M, Hosotani R, Ohishi S, Fujii N, Tulachan S S, Koizumi M, Toyada E, Masui T, Nakajima S, Tsuji S, Ida J, Fujimoto K, Wada M, Doi R & Imamura M. A novel synthetic Arg-Gly-Asp-containing peptide cyclo(-RGD=V-) is the potent inhibitor of angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 288: 711-717, 2001.

Kerr J S, Slee A M & Mousa S A. The alpha V integrin antagonists as novel anticancer agents: an update. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 11: 1765-1774, 2002.

Keshet E & Ben-Sasson S A. Anticancer drug targets: approaching angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 104: 1497-1501, 1999.

Kim Y-M, Hwang S, Kim Y-M, Pyun B-J, Kim T-J, Lee S-T, Gho Y S & Kwon Y-G. Endostatin blocks Vascular Endothelial Growth Factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. *J. Biol. Chem.* 277: 27872-27879, 2002.

Kim Y-M, Jang J-W, Lee O-H, Yeon J, Choi E-Y, Kim K-W, Lee T-S & Kwon Y-G. Endostatin inhibits endothelial and tumor cell invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase 2. *Cancer Res.* 60: 5410-5413, 2000.

Klein R, Klein B E, Moss S E & Cruickhanks K J. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 105: 1801-1815, 1998.

Knott R M , Robertson M, Muckersie E, Folefac V A, Fairhurst F E, Wileman S M & Forrester J V. A model system for human retinal angiogenesis: activation of monocytes and endothelial cells and the association with the expression of the monocarboxylate transporter type 1 (MCT-1). *Diabetologia* 42: 870-877, 1999.

Koblizek T I, Weiss C, Yancopoulos G D, Deutsch U & Risau W. Angiopoetin induces sprouting angiogenesis in vitro. *Current Biology* 8: 529-532, 1998.

Koolwijk P, van Erck M G M, de Vree W J A, Vermeer M A, Weich H A, Hanemaaijer R & van Hinsbergh V W M. Cooperative effect of TNF- $\alpha$ , bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J. Cell. Biol.* 132: 1177-1188, 1996.

Korff T & Augustin H G. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J. Cell Sci.* 112: 3249-3258, 1999.

Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G & Augustin H G. Blood vessel maturation

in a 3-dimensional spheroid coculture model.: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB j.* 15: 447-457, 2001

Koshida R, Ou J, Matsunaga T, Chilian W M, Oldham K T, Ackerman A W & Pritchard K A. Angiostatin: a negative regulator of endothelial-dependent vasodilation. *Circulation* 107: 803-806, 2003.

Kozin S V, Shkarin P & Gerweck L E. The cell transmembrane pH gradient in tumors enhances cytotoxicity of specific weak acid chemotherapeutics. *Cancer Res.* 61: 4740- 4743, 2001.

Kruger E A, Duray P H, Tsokos M G, Venzon D L, Libutti S K, Dixon S C, Rudek M A , Puda J, Allegra C & Figg W D. Endostatin inhibits microvessel formation in the ex vivo rat aortic ring angiogenesis assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268: 183-191, 2000.

Kucharz E J, Kotulska A, Kopec M, Stawiarska-Pieta B, Pieczyrak R. Serum level of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with hyperthyroidism or hypothyroidism. *Wien. Klin. Wochenschr* 115: 179-181, 2003.

Kwon M, Caplan J F, Filipenko N R, Choi K-S, Fitzpatrick S L, Zhang L & Waisman D M. Identification of Annexin II heterotetramer as a Plasmin reductase. *J. Biol. Chem.* 277: 10903-10911, 2002.

Lannutti B J, Gately S T, Quevedo M E, Soff G A & Paller A S. Human angiostatin inhibits murine hemangioendothelioma tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 57: 5277-5280, 1997.

Lansink M, Koolwijk P, van Hinsbergh V & Kooistra T. Effect of steroid hormones and retinoids on the formation of capillary-like tubular structures of human microvascular endothelial cells in fibrin matrices is related to Urokinase expression. *Blood* 92: 927-938, 1998.

Lay A J, Jiang X-M, Daly E, Sun L & Hogg P J. Plasmin reduction by phosphoglycerate kinase is a thiol-independent process. *J. Biol. Chem.* 277: 9062-9068, 2002.

Lay A J, Jiang X-M, Kisker O, Flynn E, Underwood A, Condron R & Hogg P J. Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature* 408 : 869-73, 2000.

Lianwei J, Vivekanand J, Dhanabal M, Sukhatme V P & Alper S L. Intracellular  $Ca^{2+}$  signaling in endothelial cells by the angiogenesis inhibitors endostatin and angiostatin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: 1140-1150, 2001.

Lijnen H R, Uguw F, Bini A & Collen D. Generation of Angiostatin-like fragment from plasminogen by Stromelysin (MMP-3). *Biochem.* 37: 46099-4702, 1998.

Losordo D W, Vale P R & Isner J M. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Americ. Heart J.* 138: 132-141, 1999.

Lu M & Adamis A P. Vascular endothelial growth factor gene regulation and action in diabetic retinopathy. *Ophthalmol. Clin. North. Am.* 15: 69-79, 2002.

Lucas R L., Holmgren L, Garcia I, Jimenez B, Mandriota S J, Borlat F, Sim B K L, Wu Z, Grau G E, Shing Y, Soff G A, Bouck N & Pepper M S. Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood* 92: 4730-4741, 1998.

Luo J, Lin J, Paranya G & Bischoff G. Angiostatin upregulates E-Selectin in proliferating endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 245: 906-911, 1998.

Maciag T, Cerundolo J, Ilsley S, Kelley P R & Forand R. An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: Identification and partial characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5674-5678, 1979.

Maciag T, Hoover G A & Weinstein R. High and low molecular forms of Endothelial Cell Growth Factor. *J. Biol. Chem.* 257: 5333-5336, 1982.

Madri J A & Pratt B. Endothelial cell-Matrix interactions: In vitro models of angiogenesis. *J. Histochem. Cytochem.*: 34: 85-91, 1986.

Madri J A, Pratt B & Tucker A. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor- $\beta$  depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J. Cell. Biol.* 106: 1375-1384, 1988.

Maeshima Y, Sudhakar A, Lively J C, Ueki K, Kharbanda S, Kahn C R, Sonenberg N, Hynes R O & Kalluri R. Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science* 295: 140-143, 2002.

Majka S, McGuire P G & Das A. Regulation of matrix metalloproteinase by tumor necrosis factor in a murine model of retinal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43: 260-266, 2002.

Mandriota S J & Pepper M S. Vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous fibroblast growth factor. *J. Cell Science* 110: 2293-2302, 1997.

Mathews M K, Merges C, McLeod D S & Litty G A. Vascular endothelial growth factor and vascular permeability changes in human diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38: 2729-2741, 1997.

Mauceri H J, Hanna N N, Beckett M A, Gorski D H, Staba M-J, Stellato K A, Bigelow K, Heimann R, Gately S, Dhanabal M, Soff G A, Sukhatme V P, Kufe D W & Weichselbaum R R. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy. *Nature* 394: 287-291, 1998.

Meerovitch K, Bergeron F, Leblond L, Grouix B, Poirier C, Bubenik M, Chan L, Gourdeau H, Bowlin T & Attardo G. A novel RGD antagonist that targets both

$\alpha V\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  induces apoptosis of angiogenic endothelial cells on type I collagen. *Vascul. Pharmacol.* 40: 77-89, 2003.

Meneses P I, Hajjar K A, Berns K I & Duvoisin R M. Recombinant angiostatin prevents retinal neovascularization in a murine proliferative proliferative retinopathy model. *Gene Ther.* 8: 646-648, 2001.

Meyer G T, Mattias L J, Noack L, Vadas M A & Gamble J R. Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death and capillary tube remodelling by different populations of endothelial cells. *Anatomical record* 249: 327-340, 1997.

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhuess A, Waltenberger J, Augustin H G, Ziche M, Lanz, C, Büttner M, Rziha H-J & Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 18: 363-374, 1999.

Migita T, Oda Y, Naito S, Morikawa W, Kuwano M & Tsuneyoshi. The accumulation of Angiostatin-like fragments in human prostate carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7: 2750-2756, 2001.

Minchenko A, Bauer T, Salcedo S & Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor in vitro and in vivo. *Lab. Invest.* 71: 374-379, 1994.

Montesano R & Orci L. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. *Cell* 42: 469-477, 1985.

Montesano R, Pepper M S, Vassalli J-D & Orci L. Phorbol ester induces cultured endothelial cells to invade a fibrin matrix in the presence of fibinolytic inhibitors. *J. Cell. Physiol* 132: 509-516, 1987.

Montesano R, Vassalli J-D, Baird A, Guillemin R & Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 3: 7297-7301, 1986.

Morikawa W, Yamamoto K, Ishikawa S, Takemot S, Ono M, Fukushi J-I, Naito S, Nozaki C, Iwanaga S & Kuwano M. Angiostatin generation by Cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem* 275 (49): 38912-38920, 2000.

Moser T L, Kennan D J, Ashley T A, Roy J A, Goodman M D, Misra U K, Cheek D J & Pizzo S V. Endothelial cell surface F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6656-6661, 2001.

Moser T L, Stack M S, Asplin I, Enghild J J, Højrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper H W & Pizzo S V. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2811-2816, 1999.

Müller G, Behrens J, Nussbaumer U, Böhlen P & Birchmeier W. Inhibitory effect of transforming growth factor-beta on endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5600-5604, 1987.

Mutin M, Dignat-George F & Sampol J: Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules. *Tissue antigens* 50: 449-458, 1997.

Nehls V & Drenckhahn D. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc. Res.* 50: 311-322, 1995.

Nehls V & Herrmann R. The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvasc. Res.* 51: 347-364, 1996.

Nehls V, Herrmann R, Hühnken M & Palmetshofer A. Contact-dependent inhibition of angiogenesis by cardiac fibroblasts in three-dimensional fibrin gels in vitro: implications for microvascular network remodeling and coronary collateral formation. *Cell Tissue Res.* 293: 479-488, 1998.

Nehls V, Schuchardt E & Drenckhahn D. The effect of fibroblasts, vascular smooth muscle cells, and pericytes on sprout formation of endothelial cells in a fibrin gel angiogenesis system. *Microvasc, Res.* 48: 349-363, 1994.

Nicosia R F, T'chao R & Leighton J. Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and autoradiographic studies. *In Vitro* 18: 539-548, 1982.

Nicosia R F & Ottinetti A. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta: A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab. Invest.* 63: 115-122, 1990.

Nishimura T, Utsunomiya Y, Hoshikawa M, Ohuchi H & Itoh N. Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in the fetal brain. *Biochem. Biophys. Acta.* 1444: 148-151, 1999.

Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS* 105: 417-437, 1997.

Novogrodsky A, Vanichkin A, Patya A, Gazit A, Osherov N & Levitzki A. Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. *Science* 264: 1319-1322, 1994.

O'Mahoney C A, Seidel B S, Albo D, Chang H, Tuszynski G P & Berger D H. Angiostatin generation by human pancreatic cancer. *J.Surg. Res.* 77: 55-58, 1998.

O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal R A, Moses M, Lane W S, Cao Y, Sage E H & Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor

that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328, 1994.

O'Reilly M S, Holmgren L, Chen C & Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Med.* 2: 689-692, 1996.

O'Reilly M S, Boehm T & Shing Y. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88: 277-285, 1997.

O'Reilly M S, Pirie-Shepherd S, Lane W S & Folkman J. *Science* 285: 1926-1928, 1999.

Orlidge A & D'Amore P. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* 105: 1455-1462, 1987.

Pacini S, Gulisano M, Vannucchi S & Ruggiero M. Poly-L-lysine/heparin stimulates angiogenesis in chick embryo chorioallantoic membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 820-823, 2002.

Paleolog E. Target effector role of vascular endothelium in the inflammatory response: insights from the clinical trial of anti-TNF alpha antibody in rheumatoid arthritis. *Mol. Pathol.* 50: 225-233, 1997.

Parsons-Wingerter P, Elliott K E, Farr A G, Radhakrishnan K, Clark J I & Sage E H. Generational analysis reveals that TGF-beta1 inhibits the rate of angiogenesis in vivo by selective decrease in the number of new vessels. *Microvasc. Res.* 59: 221-232, 2000.

Patterson B C & Sang Q X A. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/Type IV Collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.* 272: 28823-28825, 1997.

Pe'er J, Shweiki D, Itin A, Hemo I, Gnessin H & Keshet E. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab. Invest.* 72: 638-645, 1995.

Pepper M S. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb. Haemost.* 86: 346-355, 2001.

Pepper M S. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 21-43, 1997.

Pepper M S, Belin D, Montesano R, Orci L & Vassalli J-D. Transforming growth factor-beta 1 modulates basic Fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J. Cell Biol.* 111: 743-755, 1990.

Pepper M S, Mandriota S J, Vassalli J-D, Orci L & Montesano R. Angiogenesis regulating cytokines: activities and interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 213: 31-67, 1996.

Pepper M S, Vassalli J-D, Orci L & Montesano R. Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 204: 356-363, 1993.

Pfaff M, Tangemann K, Müller B, Gurrath M, Müller G, Kessler H, Timpl R & Engel J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha II beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta1 integrins. *J. Biol. Chem.* 269: 20233-20238, 1994.

Piek E, Heldin C H & Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* 13: 2105-2124, 1999.

Pierce E A, Avery R L, Foley E D, Aiello L P & Smith L E H. Vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 905-909, 1995.

Pike S E, Yao I, Jones K D, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G & Tosato G. Vasostatin, a Calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J. Exp. Med.* 188 (12): 2349-2356, 1998.

Pil Jung S, Siegrist B, Wang Y Z, Wade M R, Anthony C T, Hornick C & Woltering E A. Effect of human angiostatin protein on human angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 6: 233-240, 2003.

Preissner K T, Kanse S M & Hammes H-P. Integrin chatter and vascular function in diabetic retinopathy. *Horm. Metab. Res.* 29: 643-645, 1997.

Quinn T P, Peters K G, De Vries C, Ferrara N & Williams L T. Fetal liver kinase is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7533-7537, 1993.

Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman M J, Segal M, Lu H, Knebelmann B & Sukhatme V P. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255: 735-739, 1999.

Ran S, Dolves A & Thorpe P E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer Res.* 62: 6132-6140, 2002.

Rastinejad F, Polverini P J & Bouck N P. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 56: 345-355, 1989.

Redlitz A, Daum G & Sage E H. Angiostatin diminishes activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and ERK-2 in human dermal microvascular endothelial cells. *J. Vasc. Res.* 36: 28-34, 1999.

Rehn M, Hintikka E & Pihlajaniemi T. Characterization of the mouse gene for the alpha 1 chain of Type XVIII collagen (col18a1) reveals that the three variant N-

terminal polypeptide forms are transcribed from two widely separated promoters. *Genomics* 32: 436-446, 1996.

Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakumara H, Ilmonen M, Lombardo C R, Pihlajaniemi T, Alitalo K & Vuori K. Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1024-1029, 2001.

Ribatti D, Vacca A, Costantino F, Minischetti M, Locci P, Becchetti E, Roncali L & Dammacco F. Exogenous heparin induces fibronectin overexpression parallel to angiogenesis in the extracellular matrix of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Tissue Cell* 29: 131-136, 1997.

Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997.

Rosengart T K, Budenbender K T, Duenas M, Mack C A, Zhang Q X & Isom O W. Therapeutic angiogenesis: a comparative study of the angiogenic potential of acidic fibroblast growth factor and heparin. *J. Vasc. Surg.* 26: 302-312, 1997.

Ruegg C, Dormond O & Foletti A. Suppression of tumor angiogenesis through the inhibition of integrin function and signaling in endothelial cells: which side to target? *Endothelium* 9: 151-160, 2002.

Ruoslahti E & Engvall E. Integrins and vascular extracellular matrix assembly. *J. Clin. Invest.* 99: 1149-1152, 1997.

Sacco M G, Caniatti M, Cato E M, Frattini A, Chiesa G, Ceruti R, Adorni F, Zecca L, Scanziani E & Vezzosi P. Liposome-delivered angiostatin strongly inhibits tumor growth and metastatization in a transgenic model of spontaneous breast cancer. *Cancer Res.* 60: 2660-2665, 2000.

Sahni A & Francis C W. Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood* 96: 3772-3778, 2000.

Sage H. Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. *Trends Cell Biol.* 7: 182-186, 1997.

Sankar S, Mahooti-Brooks N, Bensen L, McCarthy T L, Centrella M & Madri J A. Modulation of transforming growth factor-beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 97: 1436-1446, 1996.

Sasaki T, Fukai N, Mann K, Göhring W, Olsen B R & Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* 17: 4249-4256, 1998.

Sasaki T, Larsson H, Kreuger J, Salmivirta M, Claesson-Welsh L, Lindahl U, Hohenester E & Timpl R. Structural basis and potential role of the heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* 18: 6240-6248, 1999.

Sasaki T, Larsson H, Tisi D, Claesson-Welsh L, Hohenester E & Timpl R. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and antiangiogenic activity. *J. Mol. Biol.* 301: 1179-1190, 2000.

Scherberich A & Beretz A. Culture of vascular cells in tridimensional (3-D) collage: a methodological review. *Therapie* 55: 35-41, 2000.

Schor A M & Schor S L. The isolation and culture of endothelial cells and pericytes from the bovine retinal microvasculature. *Microvasc. Res.* 32: 21-38, 1986.

Schweigerer L, Neufeld G, Friedman J, Abraham J A, Fiddes J C & Gospodarowicz D. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325: 257-259, 1987.

Senger D R, Claffey K P, Benes J E, Perruzzi C A, Sergiou A P & Detmar M. Angiogenesis promoted by VEGF: Regulation through  $\alpha 1\beta 2$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13612-13617, 1997.

Sheibani N & Frazier W A. Down-regulation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 results in thrombospondin-1 expression and concerted regulation of endothelial cell phenotype. *Molecular Biol. Cell* 9: 701-713, 1998.

Shichiri M & Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *Faseb J.* 15: 1044-1053, 2001.

Sholley M M, Ferguson G P, Seibel, H R, Montour J L & Wilson J D. Mechanism of neovascularization: Vascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells. *Lab. Invest.* 51: 624-634, 1984.

Senger D R, Van de Water L, Brown L F, Nagy J A, Yeo K-T, Berse B, Jochman R W, Dvorak A M & Dvorak H T. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev.* 12 : 303-324, 1993.

Sim B K L. Angiostatin and Endostatin: endothelial cell-specific endogenous inhibitors of angiogenesis and tumor growth. *Angiogenesis* 2: 37-48, 1998.

Sim B K L, O'Reilly M S, Liang H, Fortier A H, He W, Madsen J W, Lapcevic R & Nacy C A. A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res.* 57: 1329-1334, 1997.

Simpson-Haidaris P J & Rybarczyk B. Tumors and fibrinogen. The role of fibrinogen as an extracellular matrix protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936: 406-425, 2001.

Soff G A. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev.* 19: 97-107, 2000.

Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Kondo S, Hanatani M, Suzuki H & Yamashita

K. Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221 : 193-198, 1996.

Spranger J, Meyer-Schwickerath R, Klein M, Schatz H & Pfeiffer A. Deficient activation of transforming growth factor-beta isoforms in active proliferative diabetic retinopathy and neovascular eye disease. *Exp. Clin. End. Diab.* 107: 21-28, 1999.

Ständker L, Schrader M, Kanse S M, Jürgens M, Forssman W-G & Preissner K T. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin. *FEBS Lett.* 420: 129-133, 1997.

Stathakis P, Fitzgerald M, Matthias L J, Chesterman C N & Hogg P J. Generation of Angiostatin by reduction and Proteolysis of Plasmin. *J. Biol. Chem.* 272: 20641-20645, 1997.

Stathakis P, Lay A J, Fitzgerald M, Schieker C, Matthias L J, & Hogg PJ. Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in Kringle 5 of Plasmin. *J. Biol. Chem.* 274: 8910-8916, 1999.

Stavri G T, Zachary I C, Baskerville P A, Martin J F & Erusalimsky J D. Basic fibroblast growth factor upregulates vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic action with hypoxia. *Circulation* 92: 11-14, 1995.

Stubbs M, McSheehy P M & Griffiths J R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. *Adv. Enzyme Regul.* 39: 13-39, 1999.

Suehiro K, Mizuguchi J, Nishiyama K, Iwagana S, Farrell D H & Ohtaki S. Fibrinogen binds to integrin  $\alpha 5\beta 1$  via the carboxyl-terminal RGD site of the  $A\alpha$ -Chain. *J. Biochem.* 128: 705-710, 2000.

Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M & Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities by  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100: 4766-4771, 2003.

Sugarbaker E V, Thornthwaite J & Ketcham A S. Inhibitory effect of a primary tumor on metastasis. In: *Progress in cancer research and therapy*. Day S B, Myers W P L, Stansley P, Garattini S & Lewis M G (Hrsg.). New York, Raven Press: 277-240, 1977.

Sutton A B, Canfield A E, Schor S L, Grant M E & Schor A M. The response of endothelial cells to TGF $\beta$ -1 is dependent upon cell shape, proliferative state and the nature of the substratum. *J. Cell Science* 99: 777-787, 1991.

Taddei L, Chiarugi P, Brogelli L, Cirri P, Magnelli L, Raugei G, Ziche M, Granger H J, Chiarugi V & Ramponi G. Inhibitory effect of full-length human endostatin on in vitro angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 340-345, 1999.

Takei A, Tashiro Y, Nakashimi Y & Sueshi K. Effects of fibrinogen on the angiogenesis of bovine endothelial cells in collagen gel. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 31: 467-472, 1995.

Tarui T, Miles L A & Takada Y. Specific interaction of Angiostatin with integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 in endothelial cells *J. Biol. Chem.* 276: 39562-39568, 2001.

Tarui T, Majumar M, Miles L A, Ruf W & Takada Y. Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the antiangiogenic action of angiostatin. *J. Biol. Chem.* 277: 33564-33570, 2002.

Thewes T, Ramesh V, Simplaceanu E L & Llinas M. Isolation, purification and 1H-NMR characterization of a kringle 5 domain fragment from human plasminogen. *Biochem. Biophys. Acta* 912: 254-269, 1987.

Tolentino M J, Miller J W & Eragondas ES. Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor produce retinal ischaemia and microangiopathy in adult primate. *Ophthalmology* 103 : 1820-1828, 1996.

Tsopanoglou N E, Pilipi-Synetos E & Maragoudakis M E. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am. J. Physiol.* 264: 1302-1307, 1993.

Tucker G C. Inhibitors of integrins. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2: 394-402, 2000.

Tuszynski G P, Sharma M R, Rothman V L & Sharma M C. Angiostatin binds to tyrosine kinase substrate annexin II through the lysine-binding domain in endothelial cells. *Microvasc. Res.* 64: 448-462, 2002.

Tuxhorn J A, McAlhany S J, Yang F, Dang TD & Rowley DR. Inhibition of transforming growth factor-beta activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res.* 62: 6021-6025, 2002.

Vailhe B, Lecomte M, Wiernsperger N & Tranqui L. The formation of tubular structures by endothelial cells is under control of fibrinolysis and mechanical factors. *Angiogenesis* 2: 331-344, 1998.

Vailhe B, Ronot X, Tracqui P, Usson Y & Tranqui L. In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels and is related to alpha (V) beta 3 integrin localization. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 33: 763-773, 1997.

Van Hinsbergh V W M, Sprengers E D & Kooistra T. Effect of thrombin on the production of plasminogen activators and PA inhibitor-1 by human foreskin microvascular endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 57: 148-153, 1987.

Van Hinsbergh V W M, Collen A & Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 936: 426-437, 2001.

Vernon R B, Lara S L, Drake C J, Iruela-Arispe M L, Angello J C, Little C D, Wight T N & Sage E H. Organized type I collagen influences endothelial patterns during “spontaneous angiogenesis in vitro”: planar cultures as models of vascular development. *In vitro cellular and developmental biology. Animal* 31: 120 –131, 1995.

Vernon R B & Sage E H. A novel, quantitative model for the study of endothelial cell migration and sprout formation within three dimensional collagen matrices. *Microvasc. Res.* 57: 118-133, 1999.

Vlodavsky I, Fuks Z, Ishai-Michaeli R, Baskin P, Levi E, Korner G, Bar-Shavit R & Klagsbrun M. Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: implication for the control of angiogenesis. *J. Cell. Biochem.* 45: 167-176, 1991.

Wahl M L & Grant D S. Effects of microenvironmental extracellular pH and extracellular matrix proteins on angiostatin’s activity and on intracellular pH. *Gen. Pharmacol.* 35: 277-285, 2000.

Wahl M L, Owen C S & Grant D S. Angiostatin induces intracellular acidosis and anoikis in endothelial cells at a tumor-like low pH. *Endothelium*: 205-216, 2002.

Wajih H & Sane D C. Angiostatin selectively inhibits signalling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. *Blood* 101: 1857-1863, 2003.

Warren B A, Chauvin W J & Philips J. Blood-borne tumor emboli and their adherence to vessel walls. In: *Progress in Cancer research and therapy*. Day S B, Myers W P L, Stansley P, Garattini S & Lewis M G (Hrsg.). New York, Raven Press: 277-240, 1977.

Weich H A, Iberg N, Klagsbrun M & Folkman J. Transcriptional regulation of basic fibroblast growth factor gene expression in capillary endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* 47: 158-164, 1991.

Wen W, Moses M A, Wiederschain D, Arbiser J L & Folkman J. The generation of Endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res.* 59: 6052-6056, 1999.

Wickstrom S A, Alitalo K & Keski-Oja J. Endostatin associates with integrin  $\alpha 5 \beta 1$  and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res.* 62: 5580-5589, 2002.

Wickström S A, Veikkola T, Rahn M, Pihlajeni T, Alitalo K & Keski-Oja J. Endostatin-induced modulation of plasminogen activation with concomitant loss of focal adhesions and actin stress fibers in cultured human endothelial cells. *Cancer Res.* 61: 6511-6516, 2001.

Williams S. Angiogenesis in three-dimensional cultures. *Lab. Invest.* 69: 491-493, 1993.

Wittmer A N, Vrensen G F, Van Noorden C J & Schlingemann R O. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 22: 1-29, 2003.

Xing R H & Rabbani S H. Regulation of urokinase production by androgens in human prostate cancer cells: effect on tumor growth and metastases in vivo. *Endocrinology* 140: 4056-4064, 1999.

Xu L, Fukumura D & Jain R K. Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK 1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J Biol. Chem.* 277: 11368-11374, 2002.

Yabushita Y. Studies on the properties of immobilized urokinase: effects of pH and temperature. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 10: 294-300, 1988.

Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M & Yamamoto H. Advanced-glycation end products-driven angiogenesis in vitro. *J. Biol. Chem.* 272: 8723-8730, 1997.

Yamaguchi N, Anand-Apte B, Lee M, Sasaki T, Fukai N, Shapira R, Que I, Lowik C, Timpl R & Olsen B R. Endostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell migration and tumor growth independently of zinc binding. *EMBO J.* 18: 4414-4423, 1999.

Yan Q & Sage E H. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces apoptotic cell death in cultured retinal endothelial cells but not pericytes: Association with decreased expression of p21 waf1/cip1. *J. Cell. Biochem.* 70: 70-83, 1998.

Yancopoulos G D, Davis S & Gale N W. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242-248, 2000.

Yang E Y & Moses H L. Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces changes in cell migration, proliferation and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J. Cell Biol.* 111: 731-741, 1990.

Zacharski L R, Schned A R & Sorensen G D. Occurrence of fibrin and tissue factor antigen in human small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.* 43: 3963-3968, 1983.

Zhang N, Samadani E & Frank R. Mitogenesis and retinal pigment epithelial cell antigen expression after laser photo coagulation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34: 2412-2424, 1993.

Zink S, Rösen P & Lemoine H. Micro- and Macrovascular endothelial cells in  $\beta$ -adrenergic regulation of transendothelial permeability. *Americ. J. Physiol.* 269: 1209-1218, 1995.

#### **6.4. Erklärung**

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.



## Lebenslauf

**Name** Klaus Dieter Wiechmann

**Geburtsdatum** 31.08.1967

**Geburtsort** Lübeck

**Eltern** Edith Wiechmann (Hausfrau)  
Bernhard Wiechman (Schlosser, 1986 verstorben)

## Schulbildung

1974 - 1978 Grundschulbesuch Lübeck  
 1978 - 1984 Burckhardt-Gymnasium Lübeck  
 1984 - 1985 Austauschjahr in Omaha, Nebraska, USA  
 1985 - 1988 Burckhardt-Gymnasium Lübeck, Abitur Mai 88

## Zivildienst

1988 - 1990 Rettungssanitäter beim Arbeiter-Samariter Bund Lübeck

## Studium

1991-2000 Studium der Humanmedizin,  
Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen

1994 Physikum  
 1996 1. Staatsexamen  
 1999 2. Staatsexamen  
 1999 - 2000 PJ in akademischen Lehrkliniken Wetzlar u. Lich  
 2000 3. Staatsexamen

## Berufstätigkeit

01.10.2000–31.03.2002 Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik  
des Kreiskrankenhaus Gifhorn

Seit 01.04.2002 Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik des  
Kreiskrankenhaus Gifhorn (Facharztausbildung  
zum Internisten)

## Wissenschaftliche Qualifikation

August 1997 bis August 2000 Experimentdurchführung zur vorliegenden Arbeit

Mai 1999 Vortrag auf der 34. Jahrestagung der Deutschen  
Diabetes-Gesellschaft: "Retinale Angiogenese:  
Der Sprouting Assay als in vitro Modell"

## Danksagung

an

Anke und Moritz für's Mich-Aushalten und Entbehrungen

Thomas und Silke für's Bewahren vor dem Hungertod in Labor-Zeiten ohne Einkünfte

Matze für seinen Computer in Zeiten der Not

Marco und Angela für einen Unterschlupf in Gießen bei Bedarf

Ursula für's Korrekturlesen

meine Mutter (einfach so)

Dr. Triantafyllos Chavakis für seine Freundschaft und Unterstützung im Labor

Dr. S. Kanse für seine gute Betreuung

Prof. Dr. K. Preissner für Ratschläge und gute Betreuung

Uwe Schubert für ständige Hilfsbereitschaft und Hilfe bei der Immunzytochemie

Dr. Karen Hersemeyer für Hilfe bei der Immunzytochemie

Dr. Linder für die Proteinsequenzierung

Thomas Schmidt für die Präparation von „El.- Angiostatin“

Dr. Ludger Ständker für die verschiedenen Endostatin-Formen

Arbeitsgruppe Dr. Sigrid Zink, Düsseldorf, für das Bereitstellen der BREC