

Aus der Klinik für Kardiologie
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Geschlechtsspezifischer Vergleich VEGF-induzierter
Signalwege und angiogeneserelevanter Proteinexpression in
weiblichen und männlichen HUVEC**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Althoff

Datum der Promotion: 04.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Abstract	1
1.1 Deutsche Version	1
1.2 Englische Version	3
2 Einleitung und Hintergrund	4
2.1 Das Geschlecht: Unterschiede zwischen „Sex“ und „Gender“	4
2.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen unter geschlechtsspezifischen Aspekten	4
2.2.1 Kardiovaskuläre Risikofaktoren	6
2.2.2 Atherosklerose im geschlechtsspezifischen Vergleich	7
2.2.3 Mikrovaskuläre Erkrankungen im geschlechtsspezifischen Vergleich	9
2.3 Endothel	10
2.3.1 HUVEC: Humane Umbilikale Venöse Endothelzellen	10
2.3.2 Endotheliale Funktion, Dysfunktion und Inflammation	11
2.3.3 Kardioprotektion durch endotheliale Östrogenwirkung	13
2.3.4 Neovaskulo- und Angiogenese	13
2.3.5 Ablauf der Angiogenese	15
2.3.6 Endotheliale Migration	17
2.3.7 Migration im geschlechtsspezifischen Vergleich	18
2.4 VEGF-Familie	20
2.4.1 VEGF-Signalwege	21
3 Fragestellung	24
4 Material und Methoden	25
4.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	25
4.2 Chemikalien und Lösungen	26
4.3 Antikörper	27
4.4 Humane Umbilikale Venöse Endothelzellen (HUVEC)	28
4.5 Nabelschnurpräparation	28
4.6 Zellkultur	29
4.6.1 Passagierung der Zellen	29
4.6.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen	30

4.6.3	Behandlung für die Zellversuche	30
4.6.4	Proteinextraktion	30
4.6.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
4.7	Western Blot	32
4.7.1	Gelherstellung und Elektrophoreseprozess.....	32
4.7.2	Blotting	35
4.8	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	36
4.8.1	Durchführung der quantitativen Bestimmung von Angiopoetin-2, TIMP-1 und VEGFR-1	37
4.8.2	Bestimmung von 55 angiogeneserelevanten Proteinen mit dem Angiogenese Array	38
4.9	Statistik	39
5	Ergebnisse	40
5.1	Phosphorylierung VEGFR-2-induzierter Signalwege im geschlechtsspezifischen Vergleich	40
5.1.1	VEGFR-2 Y1175.....	40
5.1.2	VEGFR-2 Y951	41
5.1.3	AKT	41
5.1.4	P38	42
5.1.5	PLC-Y	43
5.2	Vergleich der Proteinexpression nach 16 h VEGF-Behandlung.....	44
5.2.1	VEGFR-2	44
5.2.2	c-Src	45
5.2.3	AKT.....	45
5.2.4	PI3K.....	46
5.2.5	eNOS	46
5.3	Quantifizierung des sezernierten VEGFR-1 im geschlechtsspezifischen Vergleich.....	48
5.4	Angiopoetin-2 und TIMP-1 im geschlechtsspezifischen Vergleich	50
6	Diskussion.....	56
6.1	Geschlechtsspezifische kardiovaskuläre Unterschiede.....	56
6.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Migration	57
6.3	HUVEC als Zellkulturmodell für geschlechtsspezifische Unterschiede	58
6.4	VEGF und VEGFR.....	59
6.5	VEGF-induzierte Signalwege.....	61
6.6	Hemmende Faktoren der Angiogenese: TIMP-1 und Angiopoetin-2.....	62
6.7	Limitationen der Studie	63
7	Literaturverzeichnis.....	64

7.1	Printquellen	64
7.2	Internetquellen	74
8	Eidesstattliche Versicherung	76
9	Lebenslauf	77
10	Danksagung	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die häufigsten Todesursachen in Deutschland 2016 in Tsd.	5
Abbildung 2 Vergleich der geschlechtsspezifischen Erkrankungshäufigkeit in Prozent	6
Abbildung 3 Migrierende Zelle	18
Abbildung 4 Migrationsuntersuchung: konfluente HUVEC (linkes Bild) und zellfreier Streifen zu Beginn der Migrationsinduktion (rechtes Bild)	18
Abbildung 5 VEGFA-vermittelte Signalübertragung im Überblick.	23
Abbildung 6 Western Blot: Schematischer Aufbau	35
Abbildung 7 ELISA-Sandwich-Methode	36
Abbildung 8 Western Blot der VEGFR-2 Phosphorylierungsstelle Tyr1175 im geschlechtsspezifischen Vergleich	41
Abbildung 9 Western Blot der VEGFR-2 Phosphorylierungsstelle Tyr951 im geschlechtsspezifischen Vergleich	41
Abbildung 10 Western Blot der AKT-Phosphorylierung im geschlechtsspezifischen Vergleich	42
Abbildung 11 Western Blot der Thr180/Tyr182-Phosphorylierung der p38 im geschlechtsspezifischen Vergleich	42
Abbildung 12 Western Blot der Tyr783-Phosphorylierung der PLC-Y im geschlechtsspezifischen Vergleich	43

Abbildung 13 Western Blot der Expression von VEGFR-2 im geschlechtsspezifischen Vergleich	44
Abbildung 14 Western Blot der Expression von c-Src im geschlechtsspezifischen Vergleich	45
Abbildung 15 Western Blot der Expression von AKT im geschlechtsspezifischen Vergleich	45
Abbildung 16 Western Blot der Expression von PI3K im geschlechtsspezifischen Vergleich	46
Abbildung 17 Western Blot der Expression von eNOS im geschlechtsspezifischen Vergleich	47
Abbildung 18 ELISA zur Quantifizierung des löslichen VEGFR-1 im Zellkulturüberstand	49
Abbildung 19 Proteom Profiler Human Angiogenesis Array zur Messung von Angiopoetin-2	51
Abbildung 20 Proteom Profiler Human Angiogenesis Array zur Messung von TIMP-1	52
Abbildung 21 ELISA zur Quantifizierung des sezernierten Angiopoetin-2 im Zellkulturüberstand nach Serumreduktion für 5 h im Vergleich zur Basalkonzentration	54
Abbildung 22 ELISA zur Quantifizierung des sezernierten TIMP-1 im Zellkulturüberstand nach Serumreduktion für 5 h im Vergleich zur Basalkonzentration	55

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AG	Arbeitsgruppe
AKT	Proteinkinase B, PKB
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATP III	<i>Adult Treatment Panel III</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
c-Src	Zytoplasmatische Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase
COX	Cyclogenase
DEGS	Die Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland
DTT	Dithiothreitol
ECGS	<i>Endothelial Cell Growth Supplements</i>
EDHF	<i>Endothelial-derived Hyperpolarisations Factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis (aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPCs	<i>Circulating Endothelial Progenitor Cells</i>
ER β	Östrogenrezeptor β
ET-A	Endothelin-A Rezeptor
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GTP	Guanintriphosphat
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>

HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IG	Immunglobulin
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MIF	<i>Migration Inhibitory Factor</i>
MMP	Matrixmetalloproteasen
MR-MPI	<i>Magnetic Resonance Myocardial Perfusion Imaging</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	<i>Nuclear-Factor-κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	<i>Nitric Oxid Synthase</i>
NRP	Neuropilin
NSTEMI	Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF-BB	<i>Platelet Derived Growth Factor BB</i>
PDK	<i>Phosphoinositide-dependent Protein Kinase</i>
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie, Computertomographie
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PLC- γ	Phospholipase C
PIGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
Rho	<i>Ras homologue</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>

SDS	Natriumdocylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Polacrylamid Gelelektrophorese
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SHB	<i>Src Homology Protein-2</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>Tissue Growth Factor</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
TK	Tyrosinkinase
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSAd	<i>T-cell Specific Adapter</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i>
WISE	<i>Women's Ischemia Syndrome Evaluation-Study</i>

1 Abstract

1.1 Deutsche Version

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die Koronare Herzkrankheit, stehen statistisch bei der Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung der westlichen Länder an oberster Stelle. Die klinische Manifestation und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen weist bei Männern und Frauen geschlechtsspezifische Unterschiede auf. Während hormonelle geschlechtsspezifische Unterschiede in atherosklerotischen Prozessen und die kardioprotektive Eigenschaft von Östrogen bereits Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen sind, konnten in aktuellen Studien auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der endothelialen Zellfunktion nachgewiesen werden.

In Vorarbeiten der AG Lorenz/Stangl mit der AG Knaus (FU Berlin) wurden Unterschiede im Migrationsverhalten zwischen weiblichen und männlichen HUVEC gefunden. Weibliche HUVEC zeigten eine stärkere Migration als männliche. Die Zellmigration ist ein wichtiges Element der Angiogenese und der Wundheilung. Um die geschlechtsspezifischen Migrationsunterschiede zu erklären, wurden in dieser Arbeit VEGF-induzierte Signalwege sowie die Expressionsrate angiogeneserelevanter Proteine zwischen weiblichen und männlichen HUVEC mittels Western Blot und ELISA nach VEGF-Stimulation und Serumentzug untersucht. Nach derzeitigem Kenntnisstand gibt es keine weiteren Studien, die VEGF-aktivierte Signalwege bei HUVEC geschlechtsspezifisch verglichen haben. Der VEGF-Signalweg ist entscheidend an der Regulation der Angiogenese, der Steuerung des Zellüberlebens und an inflammatorischen Prozessen von Endothelzellen beteiligt.

Der geschlechtsspezifische Vergleich der Phosphorylierung von VEGFR-2 Y1175 ergab keine signifikanten Unterschiede. Trends stärkerer Phosphorylierungen von VEGF Y1175 bei weiblichen HUVEC waren durch interindividuelle Unterschiede nicht als signifikant zu bewerten. Die Phosphorylierung der Signalproteine AKT, p38 und PLC- γ , als auch die Expression des VEGFR-2, der angiogeneserelevanten Signalproteine Src, AKT, eNOS und der PI3K erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen HUVEC. Die quantitative Bestimmung des löslichen VEGFR-1 zeigte leicht höhere Konzentrationslevel bei den männlichen Zellen, die allerdings nicht statistisch signifikant waren. Die angiogeneseinhibierenden

Proteine Angiopoetin-2 und TIMP-1 wurden mittels ELISA untersucht. Es konnten jedoch keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei VEGF-induzierten Signalwegen detektiert werden. Trends geschlechtsspezifischer Unterschiede waren durch interindividuelle Unterschiede nicht als eindeutig zu bewerten. In zukünftigen Studien sollte neben der Erhöhung der zu untersuchenden Anzahl von HUVEC auch eine Erweiterung des Untersuchungsspektrums (weitere Zellfunktionen und angiogeneserelevante Proteine) vorgenommen werden, um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede deutlicher zu identifizieren.

1.2 Englische Version

Cardiovascular diseases, especially coronary heart disease, are statistically the most common cause of morbidity and mortality in the western world. The clinical manifestation and pathophysiology of cardiovascular diseases exhibits sex-specific differences. Hormonal sex-specific differences in atherosclerotic processes and the cardioprotective properties of oestrogen are well known and part of many experimental studies. However, current studies have also shown sex-specific differences in endothelial cell function.

In collaboration between the Lorenz/Stangl and Knaus (FU Berlin) research groups, differences in the migration of female and male HUVEC were identified. Female HUVEC exhibited a stronger migratory ability compared to males. Cell migration is an important element in angiogenesis and wound healing. In order to explain migratory sex differences, this study investigated VEGF-induced signalling pathways together with the levels rates of angiogenesis-relevant proteins in male and female HUVEC using Western Blot and ELISA following VEGF-stimulation. To the authors' knowledge, no other studies have compared VEGF-activated signalling pathways in HUVEC according to sex. The VEGF signalling pathway is crucial for regulating angiogenesis and cell survival, and it is a factor in inflammatory processes in endothelial cells.

The sex-specific comparison of the phosphorylation of VEGFR-2 Y1175 revealed no differences between male and female HUVEC. Trends towards stronger phosphorylation in female HUVEC were not considered significant due to high inter-individual differences. The phosphorylation of the signal proteins AKT, p38 and PLC- γ , the expression of the VEGFR-2 and the angiogenesis-relevant signal proteins Src, AKT, eNOS and PI3K showed no significant differences between male and female HUVEC. Quantitative determination of soluble VEGFR-1 revealed a slight increase of the levels in male cells, although these were not statistically significant. This study used ELISA to measure levels of the angiogenesis-inhibiting proteins Angiopoetin-2 and TIMP-1. However, it was not possible to detect any significant sex-specific differences.

This study was unable to detect gender-specific differences in VEGF-induced signalling pathways. Trends in gender-specific differences were deemed inconclusive due to high inter-individual differences.

Future studies should take a wider research spectrum into consideration as well as a higher number of HUVEC (to include additional cell functions and angiogenesis-relevant proteins) to more clearly identify sex differences.

2 Einleitung und Hintergrund

2.1 Das Geschlecht: Unterschiede zwischen „Sex“ und „Gender“

Bei der Geschlechtsbezeichnung wird zwischen dem biologischen Geschlecht „Sex“ und der Geschlechtsidentität „Gender“ unterschieden. Das biologische Geschlecht, wie das äussere und innere Genital, wird durch die genetischen Anlagen auf den Gonosomen bestimmt. Geschlechtsspezifische biologische Merkmale können auch auf das Tierreich übertragen werden. Die Geschlechtsidentität dagegen ist auf den Mensch bezogen und nicht im Tiermodellversuch reproduzierbar. Sie ist abhängig von dem Lebensstil, den sozioökonomischen Aspekten und der psychischen Identität des einzelnen Menschen (Regitz-Zagrosek et al., 2016).

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in der vorliegenden Studie auf die Unterscheidung zwischen „Gender“ und „Sex“ verzichtet und das „Geschlecht“ synonym sowohl für die Geschlechtsidentität als auch für das biologische Geschlecht verwendet.

2.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen unter geschlechtsspezifischen Aspekten

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die Koronare Herzkrankheit (KHK) und der akute Myokardinfarkt, stehen statistisch bei der Morbidität und Mortalität in der Bevölkerung der westlichen Länder an oberster Stelle (Abb. 1) (Benjamin et al., 2019).

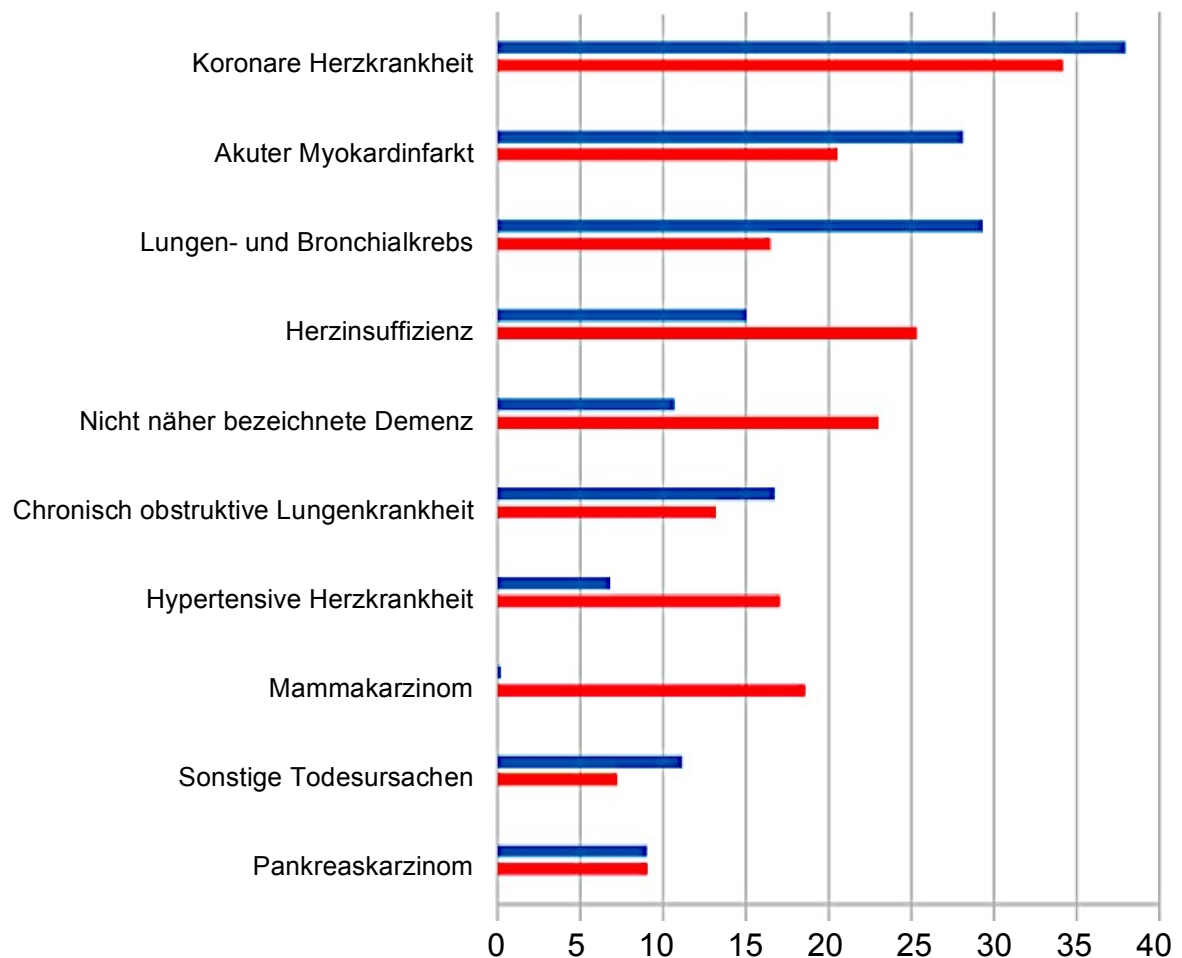


Abbildung 1 Die häufigsten Todesursachen in Deutschland 2016 in Tsd. (rot = Frauen; blau = Männer). Quelle: Statistisches Bundesamt (Destatis), 2019.

Die Lebenszeitprävalenz im Alter von 40-79 Jahre in Deutschland an einer KHK zu erkranken beträgt für Männer ca. 12 % und für Frauen ca. 6 %. Das Verhältnis m:w ist 2:1 (Gößwald et al., 2013). Frauen entwickeln im Durchschnitt 7 Jahre später eine KHK als Männer, jedoch ist die Prävalenz jüngerer Frauen im Laufe der letzten Jahre gestiegen (Ford and Capewell, 2007, Benjamin et al., 2019).

Weibliche Hormone, insbesondere Östrogen, wirken bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen protektiv (Hsu and Lee, 2020), daher ist die Prävalenz der prämenopausalen Frau für kardiovaskuläre Ereignisse gegenüber der gleichaltriger Männer reduziert (Benjamin et al., 2019). Postmenopausal zeigt sich dagegen eine erhöhte Inzidenzrate kardiovaskulärer Erkrankungen der Frauen (Swahn, 1998, Shaw et al., 2006). Auch die Studie des DEGS 1 zeigt ähnliche Ergebnisse (Abb. 2) (Scheidt-Nave et al., 2012, Gosswald et al., 2012).

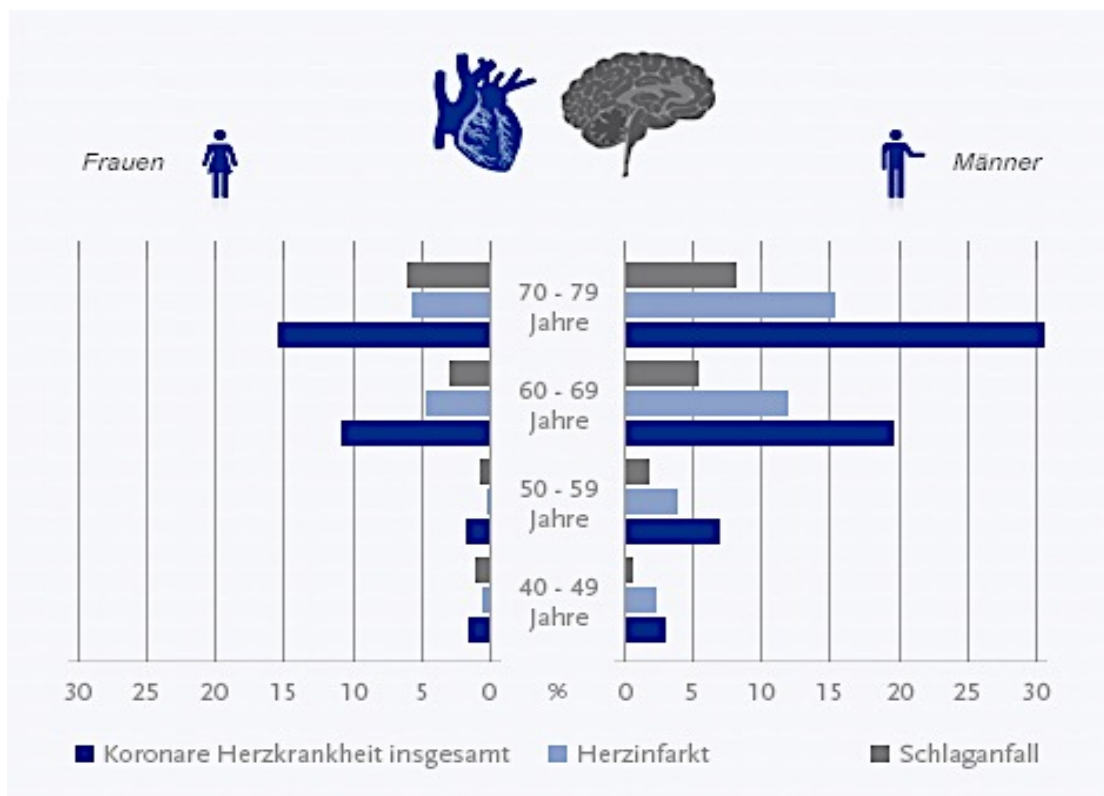


Abbildung 2 Vergleich der geschlechtsspezifischen Erkrankungshäufigkeit in Prozent.

Deutlich wird hier der Anstieg der Erkrankungshäufigkeit der Frauen in der 6. Lebensdekade, also postmenopausal. Der Schlaganfall tritt jedoch bei Frauen in früheren Lebensjahren als bei Männern auf. Quelle: Robert Koch-Institut, 2013, Studie DEGS1, Erhebung 2008-2011.

2.2.1 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung ist abhängig von Geschlecht, Alter, Lebensstil und der genetischen Veranlagung (Govindaraju et al., 2008). Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Adipositas und Rauchen sind jedoch geschlechtsspezifisch unterschiedlich zu gewichten. Nikotinkonsum und Diabetes beeinflussen das Gesamtrisiko der Frauen stärker als das der Männer (Löwel H, 1995). Außerdem werden Risikoerkrankungen bei Frauen gegenüber Männern später diagnostiziert (Okunrintemi et al., 2020).

Positiv beeinflusst wird das Risikoprofil der Frauen durch die prämenopausal protektive Eigenschaft von Östrogen, wodurch Hypertonie und Hyperlipidämien bei Frauen später entstehen als bei Männern (Swahn, 1998, Shaw et al., 2006). Frauen haben bis zur Menopause niedrigere *Low Density Lipoprotein* (LDL)- und erhöhte *High Density Lipoprotein* (HDL)-Konzentrationen

im Blut als Männer. Die Subfraktionsverteilung des LDLs zeigt geschlechtsspezifische Unterschiede auf. In der Menopause kommt es bei Frauen zu einer vermehrten Produktion von LDL-Fraktionen, so dass die Gesamt-LDL-Blutkonzentration die der Männer übersteigt. Diese Erhöhung korreliert direkt mit der erhöhten Inzidenzrate kardiovaskulärer Ereignisse bei postmenopausalen Frauen (McNamara et al., 1987, Campos et al., 1992, Castelli et al., 1986).

Das Viszeralfett, das durch den Taillenumfang quantifiziert wird, ist ein besonders relevanter Risikofaktor und wird daher zur Risikoeinschätzung für kardiovaskuläre Ereignisse genutzt. Männer neigen zu abdomineller, also stammbetonter Adipositas und bringen daher eine größere Prädisposition mit als Frauen (Lean et al., 1995).

2.2.2 Atherosklerose im geschlechtsspezifischen Vergleich

Die pathophysiologische Grundlage der KHK ist die Atherosklerose der Koronargefäße. Die häufigste Unterform der Arteriosklerose entsteht multifaktoriell, altersabhängig und bleibt zunächst asymptomatisch. Chronische Entzündungsreaktionen der Tunica intima führen zu Lipidablagerungen, Kalzifizierung und damit zu einer Verdickung der Gefäßschicht. Im Blut befindliches LDL wird über endotheliale Vesikel in den subendothelialen Raum transportiert. Hier modifiziert LDL zu oxidiertem LDL. Makrophagen nehmen über Phagozytose dieses oxidierte LDL auf, wodurch bei zunehmender LDL-Akkumulation sogenannte Schaumzellen mit Lipidablagerungen entstehen. Diese Lipidablagerungen führen zur Bildung von Atheromen und mit anwachsender Konfluenz zu exzentrischen atherosklerotischen Plaques innerhalb des Gefäßlumens (Stary et al., 1995, Ross, 1985).

Bei progredienter Einengung der Koronararterien kommt es zu Myokardischämien und einer klinischen Symptomatik, wie Brustschmerz, Kurzatmigkeit und Leistungsminderung, der Angina pectoris. Häufig ist bei Männern als pathophysiologisches Korrelat eine signifikante Stenose zu finden, also eine epikardiale und luminale Einengung einer oder mehrerer Koronargefäße von mindestens 50 %. In der Gruppe der Patienten mit einem intermediären Risiko ist dies bei Männern unter 60 Jahren nur bei 42,3 % der koronaren Untersuchungen nicht der Fall. Bei Frauen in der gleichen Altersgruppe findet sich demgegenüber, trotz Angina pectoris bei 78,8 % der koronarangiographischen Untersuchungen, kein Korrelat (Johnston et al., 2011). Aufgrund der koronarangiographischen Untersuchungsrisiken und der hohen Prozentzahl an Untersuchungen, die keinen diagnostischen und/oder

therapeutischen Nutzen haben, hat die *American Heart Association* 2014 die Empfehlung ausgesprochen, mehr noninvasive Methoden für Patientinnen mit niedrigem oder mittlerem Risiko zu nutzen, wie z. B. die PET-CT (Mieres et al., 2014). Auch der diagnostische und prädiktorische Nutzen inflammatorischer Biomarker bei koronarangiographisch unauffälliger Angina-Pectoris-Symptomatik ist gerade bei Patientinnen sinnvoll und kann das Outcome verbessern (Melander et al., 2012).

Trotz eines koronarangiographisch unauffälligen Status wurde im Rahmen der *Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE)*-Studie bei Patientinnen mit pectanginösen Beschwerden ein Risiko von 9,4 % festgestellt, innerhalb von vier Jahren einen Myokardinfarkt zu erleiden oder daran zu versterben (Merz et al., 1999, Park and Merz, 2016).

Erste Anzeichen einer kardiovaskulären Erkrankung werden bei Frauen häufig verkannt und nicht als Vorboten eines Myokardinfarktes gedeutet. Einer Studie des Jahres 2000 zufolge gingen Frauen noch durchschnittlich dreimal öfter mit kardialen Beschwerden zum Arzt als Männer, bis sie koronarangiographisch untersucht wurden. Von den ersten thorakalen Beschwerden bis zur invasiven Untersuchung dauerte es im Durchschnitt drei Jahre, bei Männern dagegen nur ein knappes Jahr (Schannwell et al., 2000).

Der Myokardinfarkt ist ein totaler oder subtotaler Verschluss einer oder mehrerer Koronararterien mit Myokardnekrose. Meist durch die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque kommt es durch die nachfolgende Thrombose und/oder Thromboembolie zu einem koronaren Gefäßverschluss (Herold, 2013, Libby et al., 2002). Bei einem Mann äußern sich die pectanginösen Beschwerden eines Myokardinfarktes häufig klassisch durch retrosternalen Brustschmerz und ST-Strecken-Hebung im Elektrokardiogramm. Bei prämenopausalen Frauen sind hingegen eher unspezifische Symptome wie Oberbauchbeschwerden, Übelkeit und allgemeines Unwohlsein zu beobachten. Retrosternale Schmerzen bei einem Myokardinfarkt treten bei Frauen nur bei ca. 50 % der Fälle auf (McSweeney et al., 2003). Psychischer Stress als akuter Einflussfaktor, als auch das Auftreten nächtlicher Manifestationen und Ruhebeschwerden sind auch eher bei Frauen zu erwarten (Wenger et al., 2010). Die Diagnosestellung erfolgt daher später als bei Männern, weil die Symptome oft verkannt werden (Chua et al., 2010). Zudem ist der Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI) bei prämenopausalen Frauen gegenüber Männern erhöht, so dass das Elektrokardiogramm nicht für die Diagnosestellung geeignet ist (Shaw et al., 2006).

Neben der genannten Symptomatik weist auch das Outcome geschlechtsspezifische Differenzen auf. Die durch das *National Health Institut* gepoolten Daten großer Studien (*Framingham Heart Study*, *Atherosclerosis Risk in Communities Study*, *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*, *Coronary Artery Risk Development in Young Adults*, *Jackson Heart Study* und *Cardiovasculär Health Study*) haben folgende prozentuale Ergebnisse ergeben. Die Mortalitätsrate nach dem ersten Myokardinfarkt im ersten Jahr bei weißen Männern und Frauen beträgt: > 44 Jahre: 18 % Männer, 23 % Frauen; > 64 Jahre: 14 % Männer, 18 % Frauen; > 75 Jahre 27 % Männer, 29 % Frauen (Benjamin et al., 2019). Die Mortalitätsrate ist also bei Frauen höher als bei Männern. Verantwortlich dafür sind Faktoren wie die spätere Diagnosestellung, die Verkennung der Symptome und die Schwere der Myokardischämie. Diese Faktoren würden jedoch nur zu einem Drittel die erhöhte Mortalitätsrate erklären (Vaccarino et al., 1999).

2.2.3 Mikrovaskuläre Erkrankungen im geschlechtsspezifischen Vergleich

Frauen haben mikrovaskuläre und myokardiale Veränderungen, die bei Männern weniger häufig auftreten (Campbell et al., 2011, Papakonstantinou et al., 2013). Bei einer koronaren mikrovaskulären Dysfunktion führen vasokonstriktorische Prozesse zu myokardialen Ischämien. Da jedoch bei einem Koronarangiogramm vor allem obstruktive Stenosen gut zu erkennen sind, bleibt die Koronarangiographie auch bei pectanginösen Beschwerden häufig ohne pathologische Befunde (Crea et al., 2014, Camici et al., 2015). Um das zu erklären, wurden Perfusionsstudien durchgeführt, die zu dem Begriff der mikrovaskulären Angina geführt haben. Die Risikofaktoren entsprechen denen der obstruktiven ischämischen Herzkrankheit (Cannon and Epstein, 1988). Die mikrovaskuläre Angina ist bei Frauen häufiger zu finden als bei Männern. Durch Messung der koronaren Flussreserve (CFR) wurde festgestellt, dass gerade bei Frauen mit unauffälliger koronarangiographischer Untersuchung häufig eine verminderte CFR vorliegt (Gehrie et al., 2009).

Die myokardiale Flussreserve wurde in der WISE-Studie durch Adenosinabgabe untersucht. Hier konnte die mikrovaskuläre Dysfunktion in eine direkte Verbindung mit dem Outcome der getesteten Frauen gebracht werden, die trotz Angina-Symptomatik keine Stenosen im Koronarangiogramm zeigten. Die mikrovaskuläre Dysfunktion wird seither als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse angesehen und als Ziel für therapeutische Maßnahmen betrachtet (Pepine et al., 2010).

Besonders bei Frauen ist daher eine geschlechtsangepasste Diagnostik wichtig. Hierfür benötigt es nicht-invasive diagnostische Verfahren, die möglichst sensitiv den mikrovaskulären koronaren Blutfluss messen. Der Goldstandard zur Messung der mikrovaskulären Funktion ist die CFR, aber auch Methoden wie die Doppler-Echokardiographie, die Magnetresonanztomographie (MRT) und die Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie (PET/CT) sind zur Untersuchung der kardialen mikrovaskulären Blutflüsse geeignet. Zudem wurde im Rahmen der WISE-Studie das *Magnetic Resonance Myocardial Perfusion Imaging* (MR-MPI) als ein verlässliches Verfahren zur Detektion von mikrovaskulärer Dysfunktion etabliert (Doyle et al., 2010).

Eine spezielle Mikrovaskulationsstörung, die fast nur bei Frauen auftritt, ist die Takotsubo Kardiomyopathie, die auch als Stress-Kardiomyopathie bezeichnet wird. Sie tritt besonders häufig bei postmenopausalen Frauen in psychischen Ausnahmesituationen auf und ist mit einer linksventrikulären Dysfunktion verbunden. Klinisch präsentiert sie sich häufig wie ein akutes Koronarsyndrom. Diagnostisch sind erhöhte kardiale Biomarker und elektrokardiographische Veränderungen zu sehen. Epikardiale arterielle Korrelate zu den linksventrikulären Wandveränderungen sind koronarangiographisch häufig nicht zu erkennen (Mejia-Renteria and Nunez-Gil, 2016).

2.3 Endothel

2.3.1 HUVEC: Humane Umbilikale Venöse Endothelzellen

Humane Umbilikale Venöse Endothelzell (HUVEC)-Kulturen, zuerst beschrieben 1922 durch Lewis et al., isoliert durch Jaffe 1972, werden seit 1987 zur Untersuchung kardiovaskulärer Physiologie und Pathophysiologie genutzt (Jaffe, 1987, Medina-Leyte et al., 2020, Lewis, 1922). Heute ist das HUVEC-Modell wissenschaftlich etabliert und wird auch der Arbeitsgruppe Mario Lorenz/Verena Stangl der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, in der diese Promotionsarbeit durchgeführt wurde, häufig verwendet (Lorenz et al., 2015, Lorenz et al., 2019, Lorenz et al., 2004, Witt et al., 2019).

Obwohl in und mit der Tiermodellentwicklung große Fortschritte gemacht wurden, lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse häufig nicht auf den menschlichen Organismus übertragen (Doke and Dhawale, 2015). *In-vitro*-Modelle stellen, aufgrund der guten Kontrollierbarkeit physiologischer pathophysiologischer Konditionen, eine gute Alternative dar. Das HUVEC-Modell kann zwar nicht zur Untersuchung aller Endothelschichten genutzt

werden, eignet sich jedoch sehr gut für die Untersuchung der Funktionen des kardiovaskulären Endothels (Baudin et al., 2007, Medina-Leyte et al., 2020).

Die Nabelschnur besteht aus Wharton-Sulze, in die zwei Umbilikalarterien und eine Umbilikalvene eingebettet sind. Sie entwickeln sich in der 5. Embryonalwoche aus extraembryonalem Mesoderm (Carlson, 2018). In der Umbilikalvene fließt oxigeniertes Blut von der Plazenta zum Embryo und in den Umbilikalarterien desoxygeniertes Blut vom Embryo zur Plazenta zurück. Aufgrund der vasalen Druckunterschiede des oxigenierten gegenüber dem desoxygenierten Gefäßsystem wurden in unserer Arbeitsgruppe die HUVEC als ein Modell zur Untersuchung kardiovaskulärer Fragestellungen genutzt. Eine aktuelle Studie von Lau et al. hat jedoch keine wichtigen Unterschiede zwischen HUVEC und HUAEC gefunden. Daher sind HUAEC als auch HUVEC gleichermaßen für die *in-vitro* Untersuchung von Proliferation, vasoaktiven Substanzen und extrazellulären Matrixproteinen geeignet (Lau et al., 2021).

Das HUVEC-Modell hat maßgeblich zum Verständnis angiogeneserelevanter Prozesse und zur Entwicklung angiogenesebezogener Medikamente beigetragen (Bartoszewski et al., 2017, Wang et al., 2016, Li et al., 2019, Medina-Leyte et al., 2020).

2.3.2 Endotheliale Funktion, Dysfunktion und Inflammation

Das hochaktive, einzellige Endothel hat als Verbindung zwischen dem Blut und den subendothelial gelegenen glatten Muskelzellen wichtige Funktionen, die sich auf den Blutfluss und dadurch auch auf die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen auswirken können. Die endotheliale Dysfunktion wird als frühe Manifestationsform der Atherosklerose betrachtet (Celermajer et al., 1992, Celermajer, 1997, Schächinger and Zeiher, 2000).

Endotheliale Funktionen sind die Regulation des Vaskulotonus, der Thrombozyten- und Leukozyteninteraktionen, der Koagulation und Fibrinolyse und der Steuerung proliferativer Prozesse. Physikalische und chemische Reize führen zur Freisetzung und/oder Synthese von Regulatorsubstanzen und Wachstumshormonen, wie NO, Prostacyclin, Endothelin, Interleukinen, dem *Endothelial Growth Factor*, Adhäsionsmolekülen und dem von Willebrand-Faktor (Jaffe, 1987, Sader and Celermajer, 2002).

Dysfunktionell kann es daher zu Störungen der Synthese-, Barriere-, Proliferations-, Migrations- und auch der immunreaktiven Funktion der Endothelzellen kommen. Die Synthesestörung führt zu einem NO-Mangel, der sich klinisch pro-thrombotisch, pro-inflammatorisch und pro-konstriktorisch manifestiert (Charo et al., 1998). Die Schwere der endothelialen Dysfunktion

kann als prognostischer Parameter für die Einschätzung des kardiovaskulären Risikos herangezogen werden (Vita and Keane, 2002). Die Dysfunktion des peripheren Endothels kovariiert mit der der Koronararterien (Anderson et al., 1995). Messbar ist die Funktion der Endothelzellen durch invasive und non-invasive Methoden, z. B. wird die Vasodilatationsfähigkeit durch Verabreichung vasodilatativer Substanzen (NO) oder durch Tonometrie der Gefäßelastizität gemessen (McMackin and Vita, 2005, Hamburg and Benjamin, 2009).

Kardiovaskuläre Risikoerkrankungen, wie z. B. Hypertension oder Diabetes, führen über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu oxidativem Stress. Der Zusammenhang zwischen Hypertension und endothelialer Dysfunktion zeigt sich bei Reduktion des hypertensiven oxidativen Stresses durch eine Besserung der endothelialen Parameter (Widlansky et al., 2003). Bei prämenopausalen Frauen sind im Vergleich mit gesunden, gleichaltrigen Männern die *in-vivo* Biomarker für oxidativen Stress niedriger (Ide et al., 2002). Die antioxidative Wirkung von Östrogen wird wahrscheinlich über eine Regulation der Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase und auch über die Induktion anti-oxidativer Enzyme moduliert (Miller et al., 2007).

Oxidativer Stress führt zur Induktion komplexer inflammatorischer Signalkaskaden im Endothel, wodurch die p38 *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK), als auch der *Nuclear-factor- κ B* (NF κ B) aktiviert werden (Mihm et al., 1995, Huot et al., 1997). Der NF κ B führt über die Synthese von Interleukinen und des Tumornekrosefaktors (TNF) zu einer Induktion inflammatorischer Prozesse. Die p38 MAPK aktiviert den TNF und reguliert so Cytokinaktivierung, Leukozytenadhäsion und Apoptosemechanismen (Kher et al., 2005). Dabei werden vor allem die Konzentrationen der Interleukine IL1, IL4, IL6 und IL8 durch die p38 MAPK beeinflusst (Lee et al., 1994).

Die Regulation der Aktivierung und Synthese der p38 MAPK durch Östrogen führt zu einer verminderten Cytokinproduktion (Kher et al., 2005). Außerdem wird durch Östrogen die Bindungsfähigkeit von NF κ B herabgesetzt, wodurch wiederum die Interleukinproduktion gehemmt wird. IL 6-, IL 10- und TNF-Konzentrationen sind daher bei Frauen bei einer Sepsis oder einem Trauma niedriger als bei Männern (Kher et al., 2005). Östrogen reduziert zudem signifikant die Expression inflammatorischer Mediatoren der glatten Muskelzellen in der Karotisarterie junger weiblicher Mäuse (Hsu and Lee, 2020).

2.3.3 Kardioprotektion durch endotheliale Östrogenwirkung

Die wichtigste kardioprotektive Eigenschaft von Östrogen ist die Erhöhung der vasodilatativen Kapazität des Endothels durch verschiedene Mechanismen. Neben der *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS)-Aktivität und der NO-Sekretion sind die Wirkdauer und die Wirkintensität von NO in weiblichen gegenüber männlichen Endothelzellen durch Östrogen erhöht (Miller et al., 2007, Case and Davison, 1999). Außerdem ist die endothelial induzierte Vasodilatation bei weiblichen Zellen von größerer Bedeutung als bei männlichen Zellen (in murinen Femoralarterien ID < 200 µm) (Luksha et al., 2006).

Bei NO-Mangel mediert der Hyperpolarisierungsfaktor (EDHF) über Membranveränderungen, Ionenkanalveränderungen und Signaltransduktionen eine vasorelaxierende Wirkung, die durch Östrogen gefördert wird. EDHF wirkt bei weiblichen, jedoch nicht bei männlichen eNOS/COX-1 Knockout-Mäusen vasorelaxierend. Männliche eNOS/COX-1 Knockout-Mäuse werden hypertensiv, weibliche dagegen nicht (Scotland et al., 2005).

Endothelin (ET)-1, das von den Endothelzellen synthetisiert wird, vermittelt über den Rezeptor ET-A eine Vasokonstriktion und damit einen Anstieg des Blutdrucks (Lamping and Nuno, 1996). Östrogen reduziert die Expressionsrate von ET-1 (Bilsel et al., 2000), daher kommt es bei ovariectomierten Schweinen zu einer Hochregulation des prepro-Endothelin-1 (Wang et al., 1997).

Östrogen bewirkt durch eine Erhöhung der eNOS-Aktivität und der NO-Sekretion eine Vasodilatation, inhibiert die Kollagensynthese, führt als Calciumantagonist zu einer verringerten Kalzifikation, reduziert die Sekretion von inflammatorischen Cytokinen, verringert die LDL-Oxidation und damit auch die Akkumulation von LDL in den Koronararterien oder der Aorta und wirkt daher über eine Inhibition atherosklerotischer Mechanismen kardioprotektiv (Hsu and Lee, 2020).

2.3.4 Neovaskulo- und Angiogenese

Für die Neovaskulogenese ist ein komplexes Zusammenspiel der extrazellulären Matrix, der Endothelzellen und der periendothelialen Zellen notwendig. Unterschieden werden zwei wichtige Mechanismen, die Vaskulo- und die Angiogenese. Als essentieller Prozess des Körpers und im Fokus pathologischer Mechanismen ist das Verständnis angiogenetischer Grundlagen auf Zellebene von essentieller Bedeutung für diagnostische und therapeutische Ansätze in der Medizin. Seit 1992 ist bekannt, dass Östrogen die endotheliale

Funktion und die Neovaskulogenese bei Frauen steigert (Morales et al., 1995). Im Kaninchenmodell wurde der Einfluss der Geschlechter auf die Neovaskulogenese weiter untersucht. Östrogenmangel, induziert durch eine Oophrektomie, führte zwar zu einer verminderten Neovaskulogenese, dagegen konnten keine Geschlechtsunterschiede in der Neovaskulogenese der nicht-oophrektomierten und der männlichen Kaninchen gefunden werden (Kyriakides et al., 2003).

Schon vor über 100 Jahren hat man aus embryonalen Endothelzellen eine *in-vitro*-Gefäßsprossung bewirken können, die jedoch noch nicht ganz erklärt werden konnte. Die Ursprungszellen dieser Gefäßentwicklung sind Angioblasten oder Hämangioblasten (Choi, 1998). Hämangioblasten sind Vorläuferzellen der hämatopoetischen Zellreihe und der Endothelzellen. Je nach Lage des im Dottersack gebildeten Zellaggregats differenzieren die äußeren Zellen zu Endothelzellen und die inneren zu Blutzellen (Carmeliet, 2000). Aus dieser Formation entsteht durch den Einfluss regulatorischer Mediatoren das erste embryonale Organ, ein primitives Gefäßsystem. Diese *de-novo* Gefäßformation aus Mesoderm ist in der Lage, die in der embryonalen Ausreifung stehenden Organe mit Sauerstoff zu versorgen (Bussolino et al., 1997). Der beschriebene Prozess, auch Vaskulogenese genannt, ist bei der Embryogenese, der Entstehung von Gefäßen aus Stammzellen in der Adoleszenz (Rafii et al., 2003) und bei der Wundheilung von Bedeutung. Postnatal erfolgt die Einleitung der Angioblasten-Differenzierung maßgeblich durch den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), den VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) und den *Basic Fibroblast Growth Factor* (BFGF) (Ferrara, 1999), während der VEGFR-1 inhibierend wirkt (Dickson et al., 1995).

Angiogenese wird durch unterschiedlichste Mechanismen gesteuert. Bei unbalancierter Angiogenese, also fehlerhafter Feinabstimmung der Regulation, kann der sogenannte „*angiogenic switch*“ zur Tumorentstehung führen (Asahara et al., 1998, Asahara et al., 1999). Weitere Krankheiten, die aus übermäßiger pro-angiogenetischer Wirkung entstehen, sind Atherosklerose, Retinopathien, Asthma, Adipositas, Arthritis und Psoriasis. Die fehlende oder insuffiziente Gefäßentwicklung führt wiederum zu Ischämien in Gehirn und Herz, zu Neurodegeneration, Hypertension, Osteoporose, respiratorischen Erkrankungen, Praeklampsie, Kardiomyopathien und zum ovariellen Überstimulationssyndrom (Carmeliet, 2003).

An der Angiogenese im adulten Organismus sind zudem *Circulating Endothelial Progenitor Cells* (EPCs) aus dem Knochenmark beteiligt. Die Art und Weise wird kontrovers diskutiert. Es wird angenommen, dass sie dem

chemotaktischen angiogenen Reiz folgen und sich dem während der Migration und Proliferation entstandenen Zellspross anschließen (Patenaude et al., 2010). Zwar findet keine vollständige Integration der Zellen in die Gefäßwand statt, aber sie fungieren während der Angiogenese als akzessorische Zellen an dem Endothel (Grunewald et al., 2006, Purhonen et al., 2008). Auf ihrer Oberfläche befinden sich auch VEGF-Rezeptoren. Die Studie von Vasa et al. 2001 ergab, dass die Anzahl der EPCs mit der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren invers korreliert sind. Der Grund dafür könnte die erhöhte Vaskularisation bei der KHK sein (Vasa et al., 2001, Schmidt-Lucke et al., 2005). Hoetzer et al. haben die Koloniebildungs-Kapazität als auch die Migrationsrate von EPCs vor dem Hintergrund kardiovaskulärer Unterschiede bei Mann und Frau untersucht. Die Koloniebildungs- und die Migrationsrate der weiblichen EPCs war höher als die der männlichen. Die physiologische Grundlage der geschlechtsspezifischen Unterschiede bleibt unklar. Die Probanden waren postmenopausale Frauen ohne Östrogensubstitution und Männer mit ähnlichem Risikoprofil. Es konnte kein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, inflammatorischer Aktivität und reduzierter Zellmobilität bezogen auf die geschlechtsspezifischen Unterschiede der EPCs hergestellt werden (Hoetzer et al., 2007).

2.3.5 Ablauf der Angiogenese

Die Stimulation der Angiogenese erfolgt unter anderem durch hypoxische oder inflammatorische Prozesse. Hypoxie induzierende Transkriptionsfaktoren (HIF) regen die Produktion von Wachstumshormonen an, wobei der wichtigste Vertreter dieser Gruppe der VEGF ist (Ferrara et al., 2003). Der Ablauf lässt sich in die folgenden Schritte einteilen:

1. Auflockerung der Endothelzellen und Lösung des Gefäßverbundes: Die Aktivierung der Endothelzellen erfolgt auf angiogene Stimulation durch NO-induzierte Vasodilatation. Die Endothelzellen erhalten damit genug Raum für die bevorstehende Sprossung. NO, durch eNOS generiert, induziert die Expression von VEGF und sorgt damit für eine erhöhte Gefäßpermeabilität (Kimura et al., 2000). Die Sprossung des Endothels wird auch durch die Angiopoetinfamilie gefördert. Angiopoetin-2 antagonisiert die Bindung am Tie-2 Rezeptor und bewirkt damit die Lockerung glatter Muskelzellen vom Endothel. Angiopoetin-1, auch ein Ligand des Tie-2 Rezeptors und wichtiger Antagonist von Angiopoetin-2, ist für die Stabilisierung der Gefäße notwendig und ein physiologischer Antipermeabilitätsfaktor (Maisonpierre et al., 1997). In dem gelockerten Gefäßverbund lösen Proteasen die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran auf. Wichtigste Vertreter der Proteasen sind die Matrixmetalloproteasen (MMP), sie haben als Gegenspieler gewebeständige

Inhibitoren (TIMP) (Brew et al., 2000). Hier bewirkt Angiopoetin-1 die Initiation der Sprossung über eine Hemmung von TIMP-2, dadurch kommt es zur Freisetzung von MMP (Kim et al., 2000). Mit dem Auflösen der extrazellulären Matrix werden Wachstumsfaktoren wie VEGF, BFGF und *Insulin-like Growth Factors* (IGF) freigesetzt, die die Proliferations- und Migrationsphase einleiten.

2. Proliferations- und Migrationsphase: Folgend der angiogenen Stimulation migrieren die gelösten Endothelzellen in den interstitiellen Raum. Die migrierenden Zellen bilden die erste Zellreihe, während die nachfolgenden Zellen mit der Proliferation beginnen, so dass ein Zellspross entsteht (Furcht, 1986, Mayor and Etienne-Manneville, 2016). Die interzelluläre biochemische Kommunikation erfolgt über Integrine, die als oberflächenständige Rezeptoren Zellprozesse regulieren und aufeinander abstimmen (Hynes, 1992, Brooks et al., 1994). Die Zellsprossenden bilden sogenannte „*Loops*“ bzw. Schlingen aus und formieren ein Endothelzellnetzwerk (Folkman, 1984).

3. Lumenbildung: Die Lumenbildung des Endothelzellnetzwerkes ist durch verschiedene Autoren beschrieben. Erste Untersuchungen mit dem Phasenmikroskop durch Folkman und Haudenschild ergaben die Hypothese, dass Vakuolen nebeneinander liegender Endothelzellen miteinander verschmelzen und so die Gefäßlumina bilden (Folkman and Haudenschild, 1980). Paku beschreibt 1998 die Krümmung der Endothelzellen und die anschließende Fusion der Enden zu einem Endothelzellring. Die Verschmelzung mit weiteren Endothelzellringen führt zur Bildung eines Lumens, so dass ein kapillarähnliches Gefäß entsteht (Paku, 1998). Später wurde die angiogene Lumenbildung als weiterer Prozess bei kultivierten HUVEC beobachtet. Dabei verschmelzen zunächst kleine Vakuolen zu einem größer werdenden Hohlraum und verbinden sich schließlich mit der Basalmembran. Der gebildete Hohlraum wird durch apoptotische und migrierende Prozesse moduliert, so dass ein Gefäßlumen entsteht. Apoptose ist der programmierte Zelltod (Meyer et al., 1997). Die Beobachtung apoptotischer Zellen innerhalb des Endothelsprosses machten auch Peters et al.. Sie nahmen an, dass die durch Proteasen induzierte Auflösung der extrazellulären Matrix zur Apoptose der mittelständigen Endothelzellen führt, so dass ein Lumen entsteht (Peters et al., 2002).

4. Stabilisierungsphase: Die Hemmung der Enzymproduktion, Migration und Proliferation durch Inaktivierung der Endothelzellen führt zur Beendigung des Angiogeneseprozesses. Komponenten der Basalmembran und der extrazellulären Matrix werden zur Stabilisierung des entstandenen Kapillarnetzes gebildet (Ausprunk and Folkman, 1977). Induziert durch VEGF

und den *Platelet Derived Growth Factor* BB (pDGF-BB) lagern sich periendotheliale Zellen wie Perizyten und glatte Muskelzellen an das Endothel an und bewirken die äußere Stabilisierung der Gefäße (Benjamin et al., 1998). Die Adaption an die lokalen Anforderungen des Entstehungsortes erfolgt durch Modulation der Gefäßgröße und Gefäßdicke, sowie der Zelldifferenzierung und -proliferation. Dieser Prozess wird auch vaskuläres Remodeling genannt (Risau, 1997).

2.3.6 Endotheliale Migration

Die Migration endothelialer Zellen spielt eine grundlegende Rolle bei der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus. Besonders wichtig ist sie bei der Angiogenese (2.3.5.), bei inflammatorischen Prozessen und für die Wundheilung (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Zellen wandern mithilfe von Polarität und Adhäsion. Die gerichtete Wanderung der Endothelzellen ist durch genaue koordinative Abstimmung von Extrazellulärmatrixproteinen, Aktinfilamenten und Integrinen möglich (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Für den Migrationsvorgang bildet die Endothelzelle zunächst in Richtung des chemotaktischen Reizes eine Vorder- und Rückseite aus. Nun werden innerhalb der Zelle zwei Pole gebildet, das Aktin konzentriert sich dafür an der Vorderseite, wohingegen sich die Zellorganellen vorwiegend an der Hinterseite organisieren. Diese sogenannte Polarisation ist wichtig für die folgende Membranausstülpung (Hood and Cheresch, 2002).

Integrine und ATP-abhängige Aktinpolymerisation ermöglichen die vorderseitige Membranausstülpung (Abb. 3). Je nach Morphologie werden die Ausstülpungen Filo- (schmal) oder Lamellopodien (breit) genannt (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Anhaltende Aktinpolymerisation bewirkt, dass die Membranausstülpungen während der Migration von der Vorder- zur Hinterseite geschoben werden. Die Interaktion von Aktinfilamenten mit Myosin bewirkt eine Zellkontraktion und sorgt damit für die Protrusorkraft der Zelle. Integrine schaffen die Verbindung zwischen Endothelzelle und der extrazellulären Matrix, sie befinden sich vorwiegend an der Vorderseite der Zelle. Mit jedem Fortwandern haften sie neu an der extrazellulären Matrix, bis sich die Zelle zu ihrem Ende vorgeschoben hat. Am Ende der Zelle lösen sich die Integrine und werden über Endozytose erneut in die Zelle aufgenommen (Lauffenburger and Horwitz, 1996).

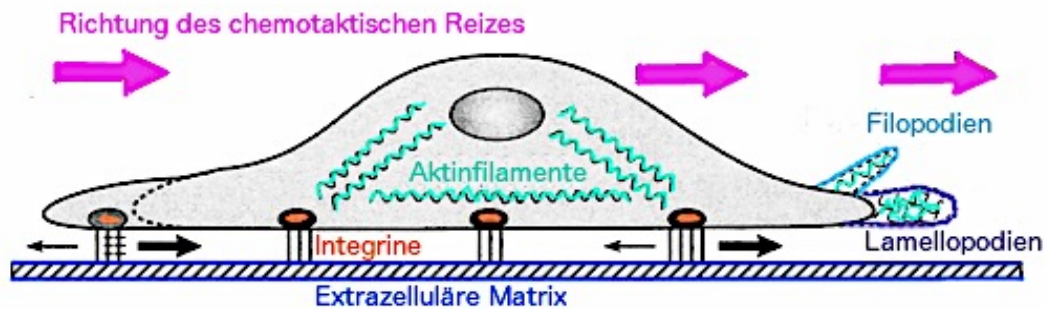


Abbildung 3 Migrierende Zelle. Quelle: Abbildung modifiziert nach Lauffenburger und Horwitz, 1996, S. 363. Mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlages.

2.3.7 Migration im geschlechtsspezifischen Vergleich

Migration, Angiogenese und Proliferation der Endothelzellen sind wesentlich am vaskulären Remodeling nach ischämischen Ereignissen wie einem Myokardinfarkt beteiligt. Unsere AG Lorenz/Stangl hat in Vorarbeiten mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Petra Knaus am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin Migrationsversuche durchgeführt (Lorenz et al., 2019). Dafür wurden konfluente HUVEC in M199 Medium mit 20 % FCS für 5 Stunden mit 0,5 % FCS in Migrationsansätzen (IBIDI) kultiviert. Zu Beginn der Migrationsinduktion wurden dabei definierte zellfreie Streifen erzeugt (Abb. 4).

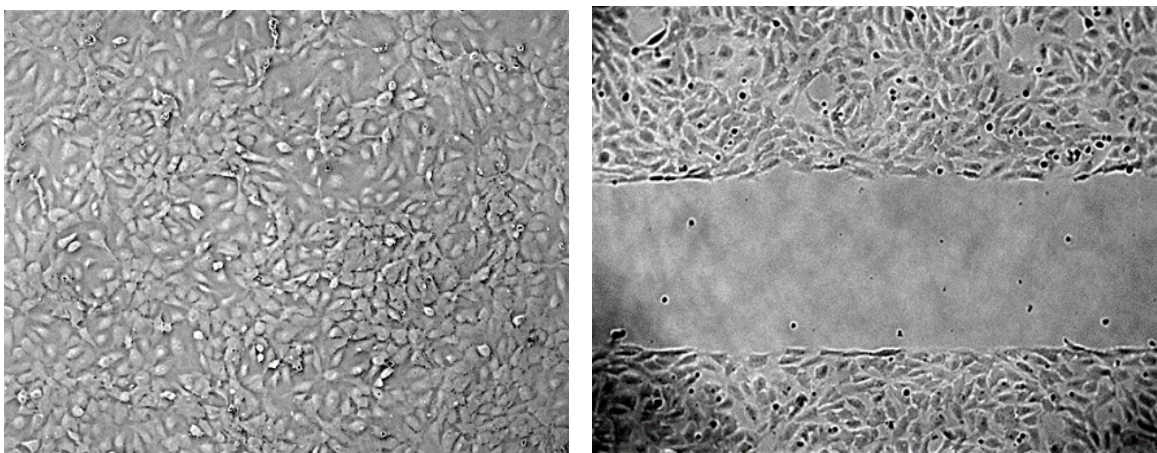


Abbildung 4 Migrationsuntersuchung: konfluente HUVEC (linkes Bild), zellfreier Streifen zu Beginn der Migrationsinduktion (rechtes Bild).

Anschließend wurde für eine Stunde der Proliferationshemmer Mitomycin hinzugegeben. Durch eine Zugabe von 2 nM VEGF erfolgte die Stimulation der Migration. Der prozentuale Migrationsfortschritt wurde mittels Analyse der Fotodokumentation, zu Beginn der Migration und nach 16 h, mit der ImageJ-Software bestimmt. Dabei zeigten die weiblichen HUVEC eine signifikant stärkere Migration als die männlichen, mit und ohne Zugabe von Phenolrot. Phenolrot besitzt eine agonistische Wirkung gegenüber dem Östrogenrezeptor und wurde eingesetzt, um die Wirkung von Östrogen auf die weiblichen und männlichen HUVEC zu imitieren und mögliche hormonelle Unterschiede zu demaskieren (Lorenz et al., 2019).

Addis et al. beobachteten auch einen etwas schnelleren Spaltschluss weiblicher Zellen im *in-vitro* Migrationsversuch ohne VEGF-Stimulation (Addis et al., 2014). In einer Folgestudie konnten höhere relative Expressionsraten von Gesamt-eNOS bei weiblichen gegenüber männlichen HUVEC und eine eNOS-abhängige Migration weiblicher HUVEC nachgewiesen werden. Cattaneo et al. führten dies vor allem auf eine erhöhte lamellipodale eNOS-Aktivität zurück (Cattaneo et al., 2017).

In unserer AG Stangl/Lorenz wurden die Migrationsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen HUVEC auch in einen Zusammenhang mit geschlechtsspezifischem Stressverhalten gebracht. Studien weisen darauf hin, dass weibliche und männliche HUVEC unterschiedlich auf „Stress“ reagieren. Zhang et al. beobachteten unter hypoxischen Bedingungen eine stärkere Tube-Formation bei weiblichen HUVEC gegenüber den männlichen (Zhang and Lingappan, 2017). Auch ein schnellerer aortaler und endothelialer Wundschluss bei weiblichen Ratten gegenüber männlichen konnte nachgewiesen werden (Huxley et al., 2018). Unter Scherspannung zeigten weibliche HUVEC eine ausgeprägtere transkriptionelle Antwort als die männlichen. Bei 20 von 77 immunbezogenen Genen konnte nach Scherspannung eine stärkere Erhöhung der Transkriptionslevel bei weiblichen gegenüber männlichen HUVEC nachgewiesen werden (Lorenz et al., 2015).

Um das geschlechtsspezifische Stressverhalten der HUVEC zu untersuchen, wurden die zellulären Energieniveaus mit Stressinduktion gemessen. Durch Nährstoffreduktion (von 20 % auf 0,5 % FCS) in der Zellkultur „hungerten“ die Zellen. Die unbehandelten HUVEC zeigten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Energieproduktion und Glykolyse. Nach Serumentzug und VEGF-Behandlung waren jedoch höhere Metabolite bei den weiblichen HUVEC messbar, was auf eine erhöhte Anpassungsfähigkeit der weiblichen Zellen auf Stress schließen lässt und wahrscheinlich auf eine Verschiebung des

Verhältnisses von Glycolyse zu mitochondrialer Respiration zurückzuführen ist (Lorenz et al., 2019). Auch die Adenosintriphosphat (ATP)-Konzentrationen zeigten geschlechtsspezifische Unterschiede. Während die basalen ATP-Konzentrationen bei den unbehandelten männlichen HUVEC höher waren als bei den weiblichen, konnte nach Serumentzug und VEGF-Behandlung eine signifikante Erniedrigung der ATP-Konzentrationen in männlichen gegenüber den weiblichen HUVEC nachgewiesen werden (Lorenz et al., 2019).

2.4 VEGF-Familie

Der Prototyp des VEGF wurde zunächst als *Vascular Permeability Factor* (VPF) bezeichnet. Heute sind neben dem Prototyp, genannt VEGFA (165), noch vier weitere bekannt: VEGFB, VEGFC und VEGFD (Senger et al., 1983, Ferrara et al., 2003). VEGFA reguliert als endothelspezifischer Wachstumsfaktor wichtige Prozesse in der Gefäßentwicklung wie z. B. Migration und Proliferation (Kroll and Waltenberger, 2000). Bereits das Fehlen eines Allels auf dem VEGF-Gen führt bei Knockout-Mäusen durch Hemmung der Migration und Angiogenese zum Absterben der Embryonen (Carmeliet et al., 1996).

Auch der *Placenta Growth Factor* (PlGF) wird zur VEGF-Familie gezählt. Die VEGF-Familie besteht vorwiegend aus homodimeren Polypeptiden. Ausnahmen sind VEGFA und PlGF, bei denen es sich um heterodimere Polypeptide handelt (DiSalvo et al., 1995, Koch and Claesson-Welsh, 2012). Durch alternatives Splicing der fünf Liganden werden sie spezifischer und erreichen damit eine gezieltere Signaltransduktion (Ferrara, 2010).

VEGFA hat eine hohe Affinität für die zwei Tyrosinkinase (TK)-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Korezeptoren sind Neuropilin (NRP) und Integrine. Die Bindung an den Rezeptoren wird durch Heparansulfat und NRP ermöglicht. Neben der Expression der VEGF-Familie durch Endothelzellen werden sie auch von anderen Zelltypen synthetisiert, wie z. B. durch Tumorzellen. Die Überexpression von VEGF und VEGF-Rezeptoren wurde unter anderem mit der Entstehung des Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht (Itakura et al., 2000).

Im kardiovaskulären System spielt die VEGF-Familie neben ihrer Relevanz für die Gefäßentwicklung auch bei der Regeneration nach einem Myokardinfarkt und bei der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque eine entscheidende Rolle. Myofibroblasten sind wichtig für den myokardialen Heilprozess, weil sie nach einem Myokardinfarkt VEGF und VEGFR synthetisieren. VEGFR-1 und VEGFR-2 wurden auch in einem Infarktareal gefunden, sodass man annehmen kann, dass VEGF die Heilung positiv beeinflusst (Chintalgattu et al., 2003).

2.4.1 VEGF-Signalwege

Die wichtigste Funktion des löslichen VEGFR-1 ist die Hemmung des pro-angiogenen VEGFR-2 durch Bindung von VEGF. Während inflammatorischer Prozesse steuert seine Modulation die Monozytenmigration (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Die VEGFR-1 Aktivierung ist zudem für den Fettsäuretransport und pathologische Angiogenesevorgänge verantwortlich. Auch die pathologische Aufnahme von Fettsäuren in Endothelzellen während atherosklerotischer Prozesse ist durch VEGFR-1 reguliert (Hagberg et al., 2010). Der VEGFR-1 Ligand VEGFB wird von herznahen Gefäßen synthetisiert und ist für die Neovaskularisation bei ischämischen Herzkrankheiten zuständig (Li et al., 2008).

Ein wesentlicher Rezeptor in Endothelzellen ist der VEGFR-2, auch *Kinase Insert Domain Receptor* (KDR) genannt. Zellüberleben, Zellproliferation und Zellmigration stehen in direktem Zusammenhang mit seiner Regulation. Der wichtigste Ligand dieses Rezeptors ist VEGFA. Weitere Modulatoren sind VEGFC und VEGFD (McColl et al., 2003).

Die VEGFA-vermittelte Proliferation wird über den VEGFR-2-aktivierten RAS/RAF/ERK/MAPK Signalweg induziert (Abb. 5) (Meadows et al., 2001).

Bei der VEGF-vermittelten Migration endothelialer Zellen gibt VEGFA durch chemotaktische Stimulation die Migrationsrichtung an. Die Bindung von VEGFA an VEGFR-2 bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors, so dass die Rezeptorstellen des VEGFR-2 Y996, Y951, Y1059, Y1175 und Y1214 die Autophosphorylierung initiieren und damit den Rezeptor aktivieren. Diese Rezeptoraktivierung initiiert die verschiedenen Signalwege (Koch and Claesson-Welsh, 2012). An die Rezeptorstelle VEGFR-2 Y951 bindet der *T-cell Specific Adapter* (TSA_d), so dass der TSA_d einen Komplex mit c-Src bilden kann (Sun et al., 2012). Die Rezeptorstelle VEGFR-2 Y1175 bindet das *Src Homology Protein-2* (SHB), welches wiederum an der *Focal Adhesion Kinase* (FAK) bindet und so eine Adhäsionsänderung der Zelle bewirkt. Dies ist wichtig bei der Zellmigration. Zudem wird die Phospholipase C (PLC- γ) aktiviert und dadurch die Aktinpolymerisation gefördert. Über die Rezeptorstelle VEGFR-2 Y1214 wird über mehrere Signalproteine die p38 MAPK aktiviert (Lamallice et al., 2006). Der p38/MAPK Signalweg ist neben der Aktinpolymerisation auch bei inflammatorischen und autoimmunen Prozessen sowie bei der Zelldifferenzierung beteiligt (2.3.2.) (Zarubin and Han, 2005).

Bei der Migration und Proliferation spielt die der *Ras homologue* (Rho)-Familie zugehörige Guanintri-phosphat (GTP)ase Cdc42 als Regulationsenzym eine

große Rolle. Sie steuert in der aktivierten Form, an GTP gebunden, die zytoskeletale Zellorganisation und die Membrankommunikation der Zelle (Sinha and Yang, 2008).

Die apoptotische Aktivität der Zelle und damit das Zellüberleben wird über die VEGFA-abhängige Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP3)-induzierte Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) (Abb. 5), sowie über die *Phosphoinositide-dependent Protein Kinase* (PDK) 1 und 2 reguliert. Durch die Aktivierung werden apoptotische Proteine gehemmt und die Produktion antiapoptotischer Stoffe stimuliert (Gerber et al., 1998).

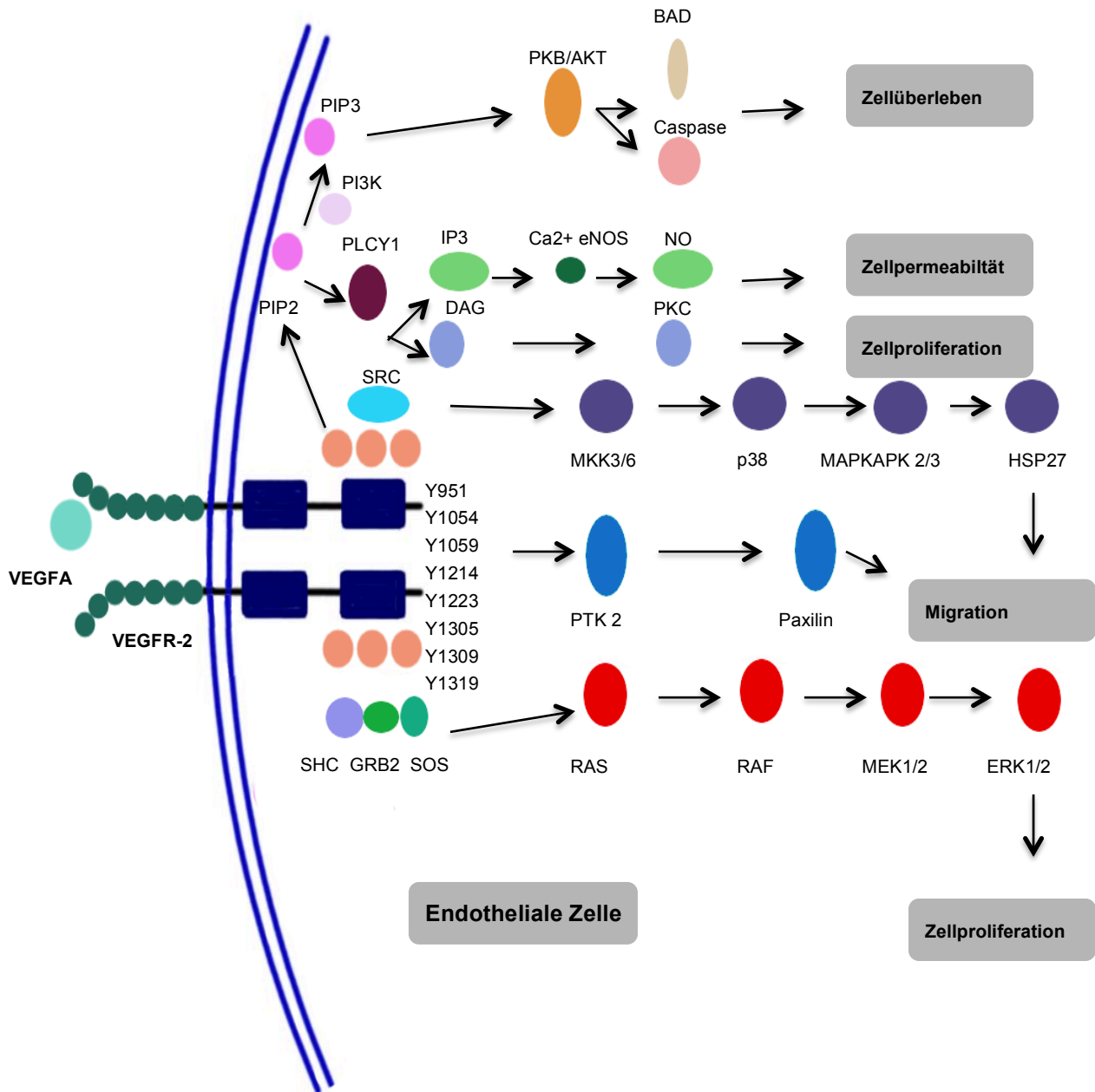


Abbildung 5 VEGFA-vermittelte Signalübertragung im Überblick. Quelle: Mit freundlicher Genehmigung erstellt nach antibodies-online, 2021.

3 Fragestellung

Kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere die Koronare Herzerkrankung stehen statistisch bei der Morbidität und Mortalität westlicher Länder an oberster Stelle. Die klinische Manifestation und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen weist bei Männern und Frauen geschlechtsspezifische Unterschiede auf. Hormonelle Unterschiede wirken sich auf die atherosklerotischen Prozesse aus und die kardioprotektive Eigenschaft von Östrogen ist gut belegt. Abgesehen von hormonellen Einflüssen, gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede, die in der endothelialen Zellfunktion zu finden sind.

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigt sich seit Jahren mit den geschlechtsspezifischen Unterschieden der Zellfunktion vor dem Hintergrund kardiovaskulärer Erkrankungen. Neben Unterschieden des Energiestoffwechsels, des Proteoms und der Transkription endothelialer Zellen, wurden hormonunabhängige Unterschiede in der VEGF-induzierten Migration zwischen weiblichen und männlichen HUVEC gefunden.

Die Migration von Endothelzellen, als wichtiger Prozess in der Embryogenese, Neovaskulogenese, bei Inflammation und Wundheilung ist entscheidend an der kardiovaskulären Gesundheit beteiligt. Um die Mechanismen geschlechtsspezifischer Migrationsunterschiede aufzuklären, wurden in dieser Arbeit angiogeneserelevante Signalwege sowie die Proteinexpression von Signalproteinen in HUVEC untersucht. Die folgenden Fragen sollten beantwortet werden:

1. Gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede in VEGF-induzierten zellulären Signalwegen?
2. Werden angiogeneserelevante Proteine geschlechtsspezifisch exprimiert?

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
Biosafe/Chronos 80	Cryotherm
Brutschrank	Heraeus Instruments
Chromatographiepapier 3 mm	Whatman
Cryosped Med	Linde
<i>Electrophoresis Power Supply E 802</i>	Roth
Elektrophoresekammer	Roth
<i>ELISA Reader</i>	Molecular Devices
Eppendorfcentrifuge 5415 R	Eppendorf
Fusion Solo S	Vilber
<i>Nalgene Mr. Frosty freezing Container</i>	Thermo Scientific
<i>OWL Scientific semi-dry Electroblotter</i>	Roth
Phasenkontrastmikroskop DMIL	Leica
Pipetboy	Integra-Biosciences
Pipetten	Eppendorf
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Sterile Werkbank	Heraeus Instruments
Thermomixer compact	Eppendorf
Vortexer	Roth
Wippe Duomax	Heidolph
Zellkulturflasche	Falco
Zentrifuge 400 R	Heraeus Instruments

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zentrifugenröhrchen	Falcon

4.2 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid (AA) Rotiphorese Gel 29:1 (40 %)	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ascorbinsäure	Sigma
Bromphenolblau	Merck
<i>Complete Protease Inhibitor Tablets</i>	Hoffmann-La Roche
Cryo-SFM-Einfriermedium	PromoCell
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
<i>Endothelial Cell Growth Supplements (ECGS)</i>	PromoCell
<i>Enhanced Chemilumescence Kit Pierce ECL 2 #80196</i>	Thermo Scientific
<i>Fetal Calf Serum (FCS)</i>	Biochrom
Gluthation	Sigma
Glycin	Merck
<i>Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)</i>	Gibco
Heparin	Biochrom
<i>Human ELISA Kit #119576</i>	ABcam
Kollagenase	Biochrom
L-Glutamin	Gibco
Medium 199 HEPES	Gibco
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriummolybdat	Sigma
Natriumvanadat	Sigma

Chemikalien	Hersteller
<i>Okadaic acid</i>	Sigma
Penicillin	Biochrom
<i>Phosphat Buffered Saline (PBS) w/o Ca²⁺, Mg²⁺</i>	Biochrom
<i>PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Hoffmann-La Roche
<i>Pierce BCA Protein Assay Kit #23225</i>	Thermo Scientific
<i>Quantikine Immunoassay Kit DANG20</i>	R&D Systems
<i>Quantikine Immunoassay Kit DTM100</i>	R&D Systems
β -Mercaptoethanol	Sigma
Streptomycin	Biochrom
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco
Tween 20 %	Roth
<i>Proteom Profiler Human Angiogenesis Array #007Ary</i>	R&D Systems

4.3 Antikörper

Antikörper/ Größe	Hersteller
P-p38 (Thr180/Tyr182) 38-45 kDa	Cell signaling
AKT 60 kDa	Santa Cruz
P-AKT (S473) 60 kDa	Santa Cruz
Src 60 kDa	Upstate
PI3K p110 β 110 kDa	Invitrogen

Antikörper/ Größe	Hersteller
eNOS 140 kDa	Becton, Dickinson (BD)
P-PLCY (Tyr783) 155 kDa	New England
VEGFR-2 210-230 kDa	Cell signaling
P-VEGFR-2 (Tyr951) 210-250 kDa	Enogen
P-VEGFR-2 (Tyr1175) 210-250 kDa	Enogen

4.4 Humane Umbilikale Venöse Endothelzellen (HUVEC)

HUVEC eignen sich gut zur Untersuchung kardiovaskulärer und geschlechtsspezifischer Unterschiede auf Zellebene (Onat et al., 2011, Baudin et al., 2007, Medina-Leyte et al., 2020). Sie sind leicht verfügbar und der hormonelle Einfluss im Nabelschnurblut weist nur geringe Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Zellen auf (Barry et al., 2011).

Die Nabelschnüre wurden dem Kardiologischen Labor der Charité am Campus Mitte freundlicherweise durch die Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Charité zur Verfügung gestellt. Die Nabelschnüre wurden nach der Abnabelung entnommen und von der Plazenta abgetrennt. Die Spenderdaten blieben anonym, wodurch maternale Daten wie kardiovaskuläre Vorerkrankungen, Komplikationen während der Schwangerschaft und der Reifezeitpunkt des Kindes bei Geburt nicht mit in die Studie einbezogen werden konnten.

4.5 Nabelschnurpräparation

Die Nabelschnurpräparation zur Gewinnung der HUVEC wurde unter den keimarmen Bedingungen einer sterilen Werkbank durchgeführt. Um Gewebereste und Blut zu entfernen, wurde die Vena umbilicalis punktiert und durch einseitiges Abklemmen mit 40 ml HBSS gespült. Nach dem Anbringen einer zweiten Klemme am kontralateralen Ende der Nabelschnur wurde 10 ml Kollagenase in die Vena umbilicalis injiziert. Die Kanüle wurde belassen, um ein Herauslaufen der Flüssigkeit zu vermeiden. Die Kollagenaseaktivität hängt von der Temperatur ab und erreicht ihr Optimum zur Lösung der extrazellulären Matrix bei 37 °C, weshalb die Nabelschnur 15 min im Brutschrank inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die erneute Nabelschnurspülung mit 20 ml HBSS. Die Spülflüssigkeit mit den Endothelzellen wurde in einer Schale aufgefangen

und in einen Falcon überführt. Durch Zentrifugation (Zentrifuge 400 R) bei 5 min 1200 rpm wurden die Zellen aus der Suspension pelletiert. Der Überstand wurde anschließend abpipettiert und das Zellpellet (HUVEC) wurde in eine T75 Zellkulturflasche mit 15-20 ml Nährmedium (M199) übertragen. Zu dem Nährmedium wurden Streptomycin und Penicillin gegen bakterielle Kontamination der HUVEC gegeben.

Nährmedium	Endkonzentration
FCS	20 %
L-Glutamin	2 mM
Ascorbinsäure	5 mg/l
ECGS	0,4 %
Gluthation	5 mg/l
Streptomycin/Penicillin	1 %

4.6 Zellkultur

Die Kultivierung der HUVEC erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97 % in einem Brutschrank, um optimale Bedingungen für das Wachstum der HUVEC zu schaffen. Durch phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen wurden Wachstum und Morphologie der Zellen täglich überprüft. Die Zellzählung wurde mithilfe einer Neubauer-Kammer durchgeführt. Das Nährmedium in den 75 cm² Zellkulturflaschen musste alle 2-3 Tage gewechselt werden. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie im Verhältnis 1:4 aufgeteilt.

4.6.1 Passagierung der Zellen

Zur Zellteilung wurde das Nährmedium abgesaugt und PBS als Spüllösung hinzugegeben. Anschließend wurden die adhärennten Zellen durch 0,5 ml Trypsin-EDTA gelöst. Die Lösung erfolgte sehr schnell, nach ca. 30 sec Inkubation bei 37 °C. Um den enzymatischen Prozess zu stoppen, wurden die Zellen mit dem Nährmedium benetzt. Die Kontrolle unter dem Phasenmikroskop zeigte anschließend gelöste kugelförmige HUVEC. Schließlich erfolgte die Aufteilung in Kulturflaschen mit Nährmedium.

4.6.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Lösung der HUVEC vom Kulturflaschenboden wurde, wie bereits bei der Zellaufteilung beschrieben, durchgeführt. Die gelösten Zellen wurden bei 1000 rpm 5-10 min zentrifugiert und anschließend konnte der Überstand abgesaugt werden. Zum Zellpellet wurden 3 ml Einfriermedium (Cryo-SFM) gegeben. Danach wurden die Kryoröhrchen jeweils mit 1 ml Zellsuspension gefüllt und in einem Einfrierbehälter langsam auf -80 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Überführung und Lagerung der Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff im Stickstofftank (Biosafe). Das Auftauen der HUVEC erfolgte in einem Wasserbad 30-60 sec bei 37 °C. Anschließend wurde Medium hinzugegeben und eine Zentrifugation von 2 min bei 1000 rpm durchgeführt. Nun konnten die Zellen erneut in Zellkulturflaschen mit Nährmedium umgefüllt und zur Inkubation in den Brutschrank gestellt werden.

4.6.3 Behandlung für die Zellversuche

Für die Versuche wurden HUVEC mit Passagen 2-5 verwendet und in 6 cm²-Kulturflaschen ausgesät. Bei der Aussaat von 1×10^5 Zellen waren die HUVEC ungefähr nach zwei Tagen konfluent. Nach dem Waschen mit PBS wurden sie 5 h auf serumreduziertes Nährmedium gesetzt (von 20 % FCS auf 0,5 % FCS). Anschließend erfolgte die 15-minütige oder 16-stündige Behandlung mit VEGF, um die Signalkaskaden bzw. die Genexpression zu aktivieren. Danach erfolgte die Lyse zur Proteinextraktion.

4.6.4 Proteinextraktion

Zur Proteolyse wurden die Zellen mit 1,5 ml kaltem PBS und anschließend mit 1 ml kaltem hypotonischen Puffer gewaschen. Dann wurde die Flüssigkeit quantitativ abgesaugt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 80 µl Lysepuffer bei 4 °C. Danach wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgetragen. Die löslichen Proteine wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und konnte für die folgenden Versuche verwendet werden.

Lysepuffer	Endkonzentration
NaCl	100 mM
Hepes	pH 7,9; 20 mM
<i>Okadaic acid</i>	100 μ M
EDTA	10 mM
Triton X-100	1 %
Na-Pyrophosphat	4 mM

Hypotonischer Puffer	Endkonzentration
Tris	10 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	2 mM
EGTA	1 mM
EDTA	1 mM
Frisch hinzufügen:	
DTT	1 M
Natriumorthovanadat	0,3 mM

4.6.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinmengenbestimmung des Zelllysats erfolgte mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* (#23225) von Thermo Scientific. Die Methode basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in einer alkalinen Lösung. Die Proteindetektion erfolgt durch die Zugabe von Bicinchoninsäure (BCA), die mit Cu^{1+} reagiert und so einen Farbumschlag hervorruft. Dieser kann dann mit dem *ELISA-Reader* quantitativ gemessen werden.

Inhalt des *Pierce BCA Protein Assay Kit*: Reagenz A 1000 ml (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure, Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid), Reagenz B 25 ml (4 % Kupfersulfat, 10x 1 ml Albumin Standard Ampullen mit bovinem Serumalbumin). Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanleitung. Zunächst wurden die Reagenzien im Verhältnis A 1000 μ l zu B 20 μ l angesetzt.

Anschließend wurde mit der Standardprobe eine Verdünnungsreihe hergestellt. Standardreihe: 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml. Danach wurden die Proteinproben 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und jeweils mit den Standardproben in Doppelansätzen in die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurde eine Leerprobe in die Wells pipettiert, die 10 µl H₂O enthielt. In jede der befüllten Vertiefungen wurde danach 200 µl Reagenz pipettiert. Nach der Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde mit dem Photometer (Messfilter 570 nm) am ELISA-Reader die Farbintensität gemessen. Mittels der Standardkurve durch die Standardreihe erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung.

4.7 Western Blot

Die Untersuchung der Phosphorylierung der Rezeptorstellen VEGFR-2 Y1175, VEGFR-2 Y951 und der Signalproteine PLC- γ , p38, AKT, eNOS, c-Src, PI3K erfolgte mit einem Western Blot. Es wurde eine denaturierende Gelelektrophorese, die *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese* (SDS-Page) genutzt. Zunächst wurden die Proteine durch das anionische Tensid SDS negativ geladen und zur Denaturierung aufgeköcht. Durch den SDS-Protein-Komplex können die Proteine bei der Elektrophorese ihrer Polypeptidkettenlänge nach getrennt werden. Große Proteine laufen langsam und kleinere schnell durch das Polyacrylamidgel, die Laufgeschwindigkeit ist also proportional zu ihrer Größe.

Anstatt die Proteine direkt auf das Trenngel aufzutragen, wurde nach Laemmli ein diskontinuierliches Gel genommen (Laemmli, 1970). Das Sammelgel hat einen pH-Wert von 6,8 und das Trenngel 8,8, so dass ein pH-Shift entsteht. Durch den pH-Wert im Sammelgel liegt Glycin als Zwitterion vor, ist elektrisch schlecht leitfähig und wird als Folgeion bezeichnet. Chlorionen als gute elektrische Leiter mit hoher Mobilität sind die Leitungen. Zwischen Leit- und Folgeionen konzentrieren sich die Proteine und bilden eine Bande. Ab dem Trenngel liegt das Glycin negativer vor und ist dadurch elektrisch mobiler, die elektrische Feldstärke nimmt ab und die Proteine können nun ihrer Größe nach wandern.

4.7.1 Gelherstellung und Elektrophoreseprozess

Die Polyacrylamid (PAA)-Quervernetzung (Acrylamid und Bisacrylamid 29:1) zu einem Gel wurde durch APS und TEMED initialisiert. Die Porengröße ist von der Acrylamidkonzentration abhängig und bestimmt die Laufgeschwindigkeit. Zur Gelherstellung wurden die Platten gereinigt, mittels Ethanol entfettet und in

die Gelelektrophoresekammer eingespannt. Der Zwischenraum von 0,1 cm wurde durch zwei Spacer gewährleistet. Anschließend wurde mit einer Pipette das Trenngel zwischen die Platten gefüllt, so dass noch $\frac{1}{3}$ Platz blieb. Gegen Blasenbildung und für eine glatte Trennlinie wurde das Gel mit einer dünnen Propanolschicht versehen. Nach Auspolymerisation (nach 30-60 min) konnte das Isopropanol abgeschüttet und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen werden. Als Platzhalter für die Proteinapplikation wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt. Weitere 30-60 min später wurde das Gel in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und der 1x SDS-Laufpuffer hinzugegeben. Die Proteinproben wurden im Thermoblock auf 85 °C erhitzt und mit 5x SDS-Probenpuffer und 10 mg Bromphenolblau (einem Farbmarker) gemischt. Anschließend wurde der Kamm entfernt, um die Proteinproben in die Taschen des Gels zu applizieren. Für den Probenlauf wurde das *Electrophoresis Power Supply* auf 25 mA pro Gel eingestellt, so dass das Gel nach 1-2 h entnommen werden konnte. Das Sammelgel wurde abgeschnitten und das fertige Gel wurde kurz in Blotpuffer geschwenkt.

Gele	Sammelgel pH 6,8	Trenngel pH 8,8
Tris pH 6,8; 1,5 M	645 µl	
Tris pH 8,8; 1,5 M		1,56 ml
AA 40 %	625 µl	1,38 ml
SDS 10 %	50 µl	62,5 µl
APS 10 %	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
ddH ₂ O	3,65 ml	3,65 ml

SDS-Probenpuffer	Endkonzentration
Tris	pH 6,8; 60 mM
Glycerol	25 %
β-Mercaptoethanol	5 %
SDS	2 %
Bromphenolblau	0,1 %
Temed	

SDS-Laufpuffer	Endkonzentration
Tris	pH 6,8; 2,5 mM
Glycin	19,2 mM
SDS	0,1 %
Temed	

Blotpuffer	Endkonzentration
SDS-Laufpuffer	10x
Methanol	20 %

<i>Tris Buffered Saline (TBS)</i>	Endkonzentration
Tris	50 mM
NaCl	150 mM

Westernwaschpuffer	Endkonzentration
TBS	20x
Tween 20	0,02 %

4.7.2 Blotting

Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf eine PVDF-Membran. Zunächst wurden die Chromatographiepapiere in Blotpuffer eingelegt. Die Aktivierung der PVDF-Membran wurde mit Methanol durchgeführt und anschließend wurde die Membran in Blotpuffer getränkt. Danach wurden die Chromatographiepapiere mit dem Gel und der PVDF-Membran im Blottinggerät luftblasenfrei gestapelt. Die Reihenfolge des Blottingpakets ist in Abbildung 6 zu erkennen.

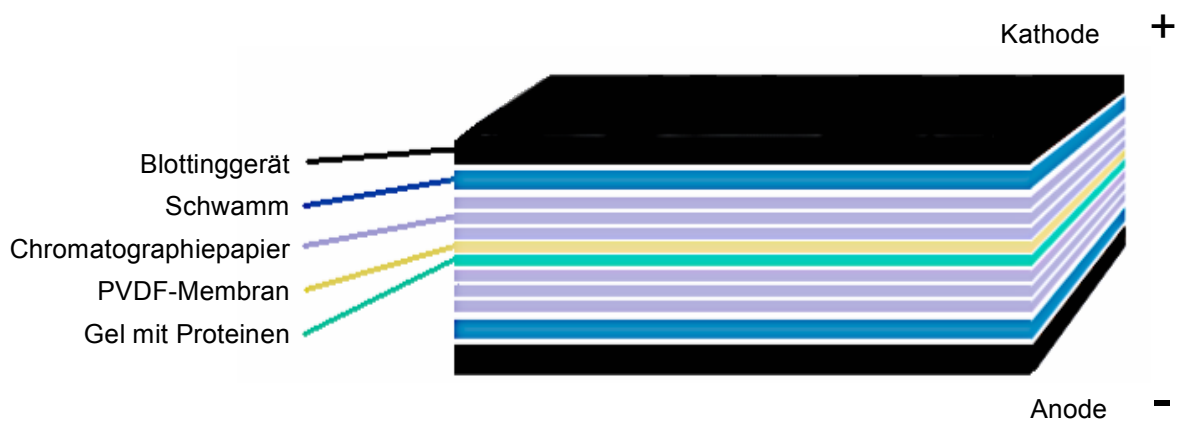


Abbildung 6 Western Blot: schematischer Aufbau. Quelle: Erstellt nach Merck KGaA, 2021.

Das Blottinggerät wurde an den *Electrophoresis Power Supply* angeschlossen (limitierender Faktor: 4 W). Es wurde 1-2 h geblottet. Nach 1 h wurde die PVDF-Membran entnommen und 2 h in 10 ml Rotiblock auf der Wippe geschwenkt, um unerwünschte Antigen-Antikörperkomplexbildungen zu verhindern und unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde der erste Antikörper in Rotiblock hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Anschließend wurde die Membran für 3x 5 min, danach 3x 10 min mit dem Westernwaschpuffer gespült und mit dem zweiten Antikörper in Rotiblock 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem mehrfachen Waschen mit dem Westernwaschpuffer wurde die Membran in das Pierce ECL-Western-Substrat gelegt und inkubiert. Die chemische Reaktion wurde durch die Meerrettichperoxidase (HRP), gebunden an den zweiten Antikörper, katalysiert. Die Chemolumineszenz des Luminol wurde durch die Fusion Solo S detektiert und sichtbar gemacht.

4.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die quantitative Bestimmung von Angiopoetin-2 wurde das *Quantikine Immunoassay Kit* DANG20 (R&D Systems), für TIMP-1 das *Quantikine Immunoassay Kit* DTM100 (R&D Systems) und für die VEGFR-1 Bestimmung das *Human ELISA Kit* von Abcam (#119576) verwendet. Mit dem *Proteom Profiler Human Angiogenesis Array* (#007Ary) (R&D Systems) wurden die relativen Konzentrationen von 55 angiogeneserelevanten Proteinen in den HUVEC-Zellysaten und Zellkultur-Überständen bestimmt. Von den 55 Proteinen wurden Angiopoetin-2 und TIMP-1 ausgewählt und untersucht.

Das *Human ELISA Kit* (Abcam), die *Immunoassay Kits* (R&D Systems) und das *Angiogenese Array* (R&D Systems) folgen einem ähnlichen Methodenprinzip. Mit der ELISA-Sandwich-Methode wurden die zu bestimmenden Proteine, hier VEGFR-1, Angiopoetin-2 und TIMP-1 durch Antikörperbindung detektiert und quantifiziert (Abb. 7).

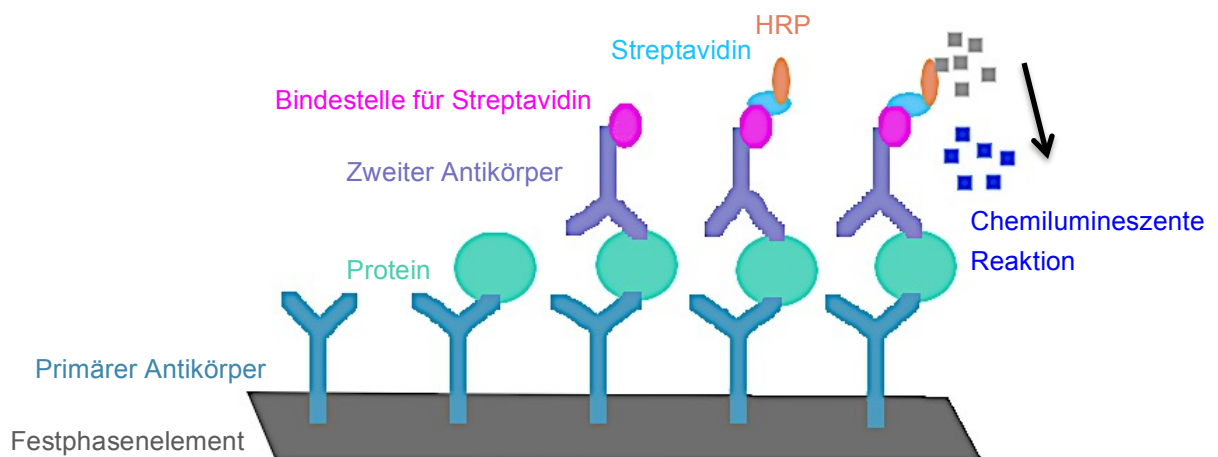


Abbildung 7 ELISA-Sandwich-Methode. Zwei Antikörper binden an verschiedene Epitope des Antigens, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Sandwich) entsteht. Durch die Bindung von proteingebundener HRP an Streptavidin und der Zugabe von chemilumineszenter Lösung wird enzymatisch eine Farbreaktion katalysiert. Quelle: Abbildung erstellt nach Theuscher N., 2014.

4.8.1 Durchführung der quantitativen Bestimmung von Angiopoetin-2, TIMP-1 und VEGFR-1

Bei der Versuchsdurchführung wurden die Gebrauchsanweisungen der *Immunassay Kits* befolgt. Unter den Buchstaben A = Angiopoetin-2, B = TIMP-1, C = VEGFR-1 finden sich jeweils die antigenspezifischen Angaben. Zunächst wurden die Reagenzien auf Zimmertemperatur erwärmt. Danach wurde mit einer Standardprobe eine Standardverdünnungsreihe hergestellt, bei der die zu detektierenden Proteine in einer bekannten Konzentration vorhanden waren (A *Calibrator Diluent* RD5-5 Reihe: 3000 pg/ml bis 46,9 pg/ml, B *Calibrator Diluent* RD5P Reihe: 5 ng/ml bis 0,156 ng/ml).

In die beschichteten 96-Well-Mikrotitrierplatten wurde zur Optimierung der Antigen-Antikörper-Reaktion *Assay Diluent* pipettiert (A *Assay Diluent* RD1-76 100 µl, B *Assay Diluent* RD1X 100 µl, C *Assay Buffer* 50 µl). Anschließend wurden die Proteinproben (HUVEC Zelllysat) (50 µl pro Well) und die Standardproben (50 µl pro Well) in die Vertiefungen pipettiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten drei Waschdurchgänge mit Waschpuffer, um das nicht gebundene Konjugat zu entfernen. Nach dem letzten Waschen wurde die Restflüssigkeit abpipettiert und auf Papier vorsichtig abgeklopft. Bei dem VEGFR-1 *Assay* wurde im folgenden Schritt 100 µl des *Streptavidin-HRP-Substrate* hinzugegeben, anschließend erfolgten weitere Waschdurchgänge.

Danach wurde das antigenspezifische Konjugat, ein enzymgebundener Antikörper, in die Wells appliziert, und es folgte eine erneute Inkubation auf der Wippe bei Raumtemperatur (A *Human Angiotensin-2 Conjugat* 200 µl, B *Human TIMP-1 Conjugat* 200 µl, C *Biotin-Conjugat* 50 µl). Anschließend folgten erneut drei Waschdurchgänge.

Danach wurde die zu dem Enzym passende *Substrat Solution* hinzugegeben. Geschützt vor Licht, auf der Wippe und bei Raumtemperatur wurde erneut inkubiert (A *Substrat Solution* 200 µl, B *Substrat Solution* 200 µl, C *TMB Substrat Solution* 100 µl). Die enzymatische Reaktion wurde mit Zugabe des *Solution Stops* beendet und der induzierte Farbumschlag erfolgte. Nun wurde die optische Dichte jedes Wells mittels des ELISA-Readers bei 450 nm gemessen (A *Solution Stop* 50 µl, B *Solution Stop* 50 µl, C *Solution Stop* 100 µl).

4.8.2 Bestimmung von 55 angiogeneserelevanten Proteinen mit dem Angiogenese Array

Die Durchführung des *Angiogenese Arrays* erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurden die Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurde 2 ml *Array Buffer 7* (Blockinglösung) in die 4-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend konnten die Schutzfolien der Membranen entfernt und entsprechend ihrer Nummer in die Wells eingelegt werden. Die Membranen bestehen aus Nitrozellulosepapier und haben den primären Antikörper gebunden. Danach erfolgte 1 h Inkubation auf der Wippe. Währenddessen wurden die Proben vorbereitet: 1 ml Probe wurde mit 0,5 ml *Array Buffer 5* vermischt. Anschließend wurden 15 µl *Detection Antibody Cocktail* zu den vorbereiteten Proben gegeben und es erfolgte 1 h Stunde Inkubation bei Raumtemperatur. Nun wurde der *Array Buffer 7* von der 4-Well-Platte abpipettiert und in die bereits mit Antikörpern versehene Probenlösung hinzugegeben. Die Platte wurde abgedeckt und es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 2-8 °C auf einer Wippe.

Am nächsten Tag wurden die Membranen vorsichtig mit einer Pinzette herausgenommen und einzeln für 10 min in 1x *Wash Buffer* gelegt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Es wurde drei Mal gewaschen. Danach wurde das Streptavidin-HRP mit *Array Buffer 5* verdünnt und 2 ml in die 4-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. In diese 4-Well-Platten wurden nun die gewaschenen Membranen vorsichtig zurückgelegt. Die mit einem Deckel versehenen Platten wurden erneut inkubiert und auf eine Wippe gestellt. Anschließend erfolgte wieder ein Waschvorgang. Nachdem die Membranen auf einem Papier getrocknet waren, wurden sie auf die obere Seite der Schutzfolie gelegt. Auf jede Membran wurde nun 1 ml vom *Chemi Reagent Mix* gegeben. Vorsichtig wurde eine weitere Folie auf die Membranen gelegt, so dass sie von Folie und Flüssigkeit umschlossen waren, dann erfolgte 1 min Inkubation.

Nach der Inkubationszeit wurde die obere Folie entfernt und die Restflüssigkeit behutsam durch ein Papiertuch abgetupft. Unter Vermeidung von Luftblasen wurde nun erneut eine Folie auf die Membranen gelegt. Die Detektion der Chemilumineszenz und die Intensitätsmessung der einzelnen Pixel erfolgte mit dem *Fusion Solo S* und der dazugehörigen Software.

Proteine des Angiogenese Arrays von R&D Systems

Activin A	FGF-7/KGF	PD-ECGF
ADAMTS-1	GDNF	PDGF-AA
Angiogenin	GM-CSF	PDGF-AB/PDGF-BB
Angiopoietin-1	HB-EGF	Persephin
Angiopoietin-2	HGF	CXCL4/PF4
Angiostatin/Plasminogen	IGFBP-1	PIGF
Amphiregulin	IGFBP-2	Prolactin
Artemin	IGFBP-3	Serpin B5/Maspin
Tissue Factor/Factor III	IL-1 beta	Serpin E1/PAI-1
CXCL16	CXCL8/IL-8	Serpin F1/PEDF
DPPIV/CD26	LAP (TGF-beta 1)	TIMP-1
EGF	Leptin	TIMP-4
EG-VEGF	CCL2/MCP-1	Thrombospondin-1
Endoglin/CD105	CCL3/MIP-1 alpha	Thrombospondin-2
Endostatin/Collagen XVIII	MMP-8	uPA
Endothelin-1	MMP-9	Vasohibin
FGF acidic	NRG1-beta 1	VEGF
FGF basic	Pentraxin 3	VEGF-C
FGF-4		

In dieser Arbeit wurden die fett gedruckten Proteine ausgewertet.

4.9 Statistik

Die graphische und numerische Auswertung der ELISA und des Angiogenese Arrays wurde mit dem Auswertungsprogramm des *ELISA-Readers* und von Microsoft Excel durchgeführt. Dabei wurden Mittelwerte und der *Standard Error of the Mean* (SEM) ermittelt. Außerdem wurde zur genaueren statistischen Analyse bei den ELISA-Versuchen der *Student T-Test* (GraphPad Software) genutzt. Dabei galt $p < 0,05$ als statistisch signifikant.

5 Ergebnisse

5.1 Phosphorylierung VEGFR-2-induzierter Signalwege im geschlechtsspezifischen Vergleich

Durch Phosphorylierung an verschiedenen Phosphorylierungsstellen des VEGFR-2 werden intrazelluläre Signalkaskaden der Angiogenese ausgelöst, die eine Zellmigration bewirken. Der wichtigste Ligand dieses Rezeptors ist VEGFA (McColl et al., 2003). Um die Aktivierung des Rezeptors nachzuweisen, wurden in einem Western Blot die rezeptorständigen Phosphorylierungsstellen VEGFR-2 Y1175 und VEGFR-2 Y951 untersucht.

Die VEGFR-2-Phosphorylierung bewirkt die Aktivierung weiterer intrazellulärer Signalproteine unter anderem von PLC- γ , p38 und AKT (Koch and Claesson-Welsh, 2012), so dass die Signalkaskaden für die benötigte Zellfunktion, z. B. die Migration, aktiviert werden.

Die weiblichen und männlichen HUVEC wurden für 5 h von 20 % auf 0,5 % FCS gesetzt. Durch den Nährstoffentzug „hungerten“ die Zellen. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit 2 nM VEGF für 15 Minuten. Danach wurden die Phosphorylierung des VEGFR-2 Tyr1175 und Tyr951, die Ser473-Phosphorylierung bei AKT, die Thr180/Tyr182-Phosphorylierung bei p38 und die Tyr783-Phosphorylierung bei PLC- γ mittels Antikörper detektiert und durch chemilumineszente Detektion im Fusion Solo S auf der Western-Blot-Membran sichtbar gemacht.

5.1.1 VEGFR-2 Y1175

In der Abbildung 8 ist ein Western Blot zur Detektion der VEGFR-2 Y1175 im geschlechtsspezifischen Vergleich dargestellt. Durch Phosphorylierung an verschiedenen Phosphorylierungsstellen des VEGFR-2 werden intrazellulär Signalkaskaden der Angiogenese ausgelöst (McColl et al., 2003).

Die Stimulation der Rezeptorstelle durch die Behandlung mit VEGF induzierte besonders bei den weiblichen HUVEC W3, W5 und W6 eine deutliche Phosphorylierung. Der geschlechtsspezifische Vergleich zeigte einen leichten Trend der stärkeren Phosphorylierung bei den weiblichen Zellen, insbesondere durch die Individuen W3 und W5. Es war jedoch eine große interindividuelle Variabilität zu beobachten.

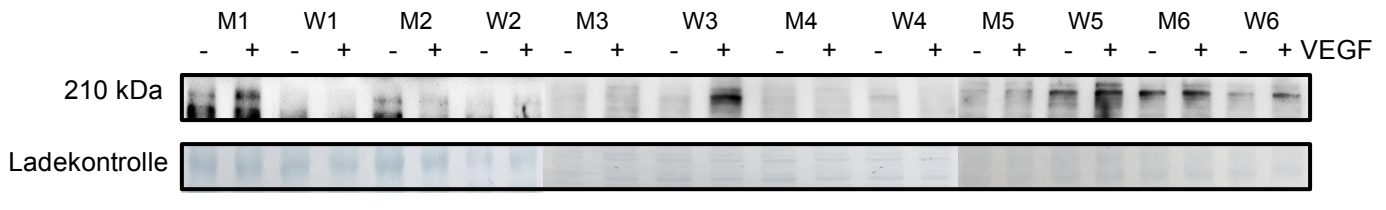


Abbildung 8 Western Blot der VEGFR-2 Phosphorylierungsstelle Tyr1175 im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 6 männliche (M) und 6 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 15 Minuten.

5.1.2 VEGFR-2 Y951

Abbildung 9 zeigt einen Western Blot der VEGFR-2 Phosphorylierungsstelle Tyr951. Die VEGF-Stimulation bewirkte überwiegend eine Phosphorylierung des Tyrosinrezeptors gegenüber der Kontrolle (unstimulierte HUVEC). Die HUVEC W2, M3 und W3 zeigten dabei eine besonders deutliche Induktion.

Die Rezeptorstelle VEGFR-2 Tyr951 ergab im Vergleich eine leicht stärkere Phosphorylierung der weiblichen HUVEC W3 und W4 gegenüber den männlichen. Daneben ist jedoch bei M5 die Phosphorylierung stärker ausgeprägt als bei W5. Wiederum wurden starke interindividuelle Unterschiede beobachtet. Es konnten keine eindeutigen Geschlechtsunterschiede festgestellt werden.

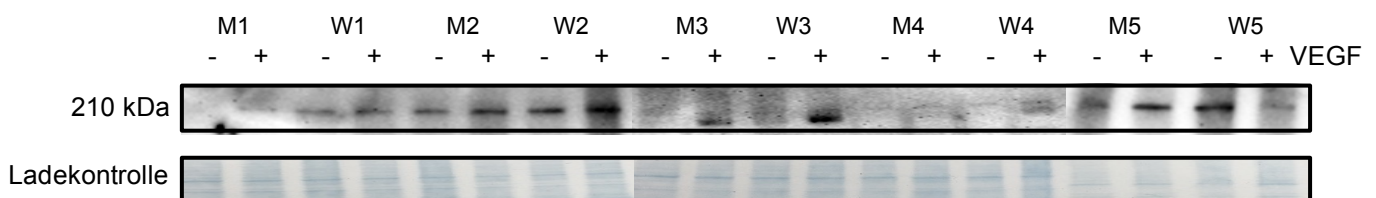


Abbildung 9 Western Blot der VEGFR-2 Phosphorylierungsstelle Tyr951 im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 5 männliche (M) und 5 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 15 Minuten.

5.1.3 AKT

Ein Beispiel für die AKT-Phosphorylierung ist in Abbildung 10 dargestellt. AKT ist Teil des MAPK Signalweges und wird durch Bindung von VEGF an den VEGFR-2 aktiviert (Gerber et al., 1998).

Die 15-minütige Behandlung mit VEGF induzierte teilweise eine AKT-Phosphorylierung, die jedoch nicht immer zu beobachten war.

Insbesondere bei M1, W1, W2, M4, W4 und M6 zeigte sich jedoch eine deutliche Aktivierung.

Der Vergleich der Phosphorylierung zwischen den Geschlechtern wies bei den weiblichen HUVEC W2 und W5 eine stärkere Induzierung der Phosphorylierung gegenüber den männlichen auf. Dagegen zeigten M1 und M6 eine stärkere Phosphorylierung gegenüber den weiblichen HUVEC. Insgesamt waren jedoch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zu beobachten.

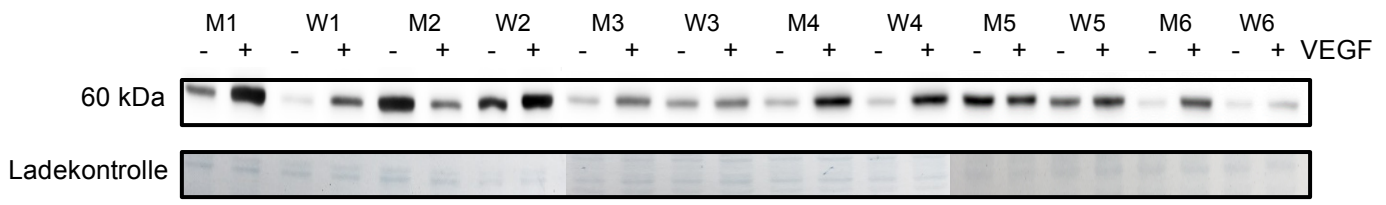


Abbildung 10 Western Blot der Ser473-Phosphorylierung bei AKT im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 6 männliche (M) und 6 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 15 Minuten.

5.1.4 P38

Die Detektion der Thr180/Tyr182-Phosphorylierung von der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) p38 ist in Abbildung 11 dargestellt. p38 ist beteiligt an Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose. Faktoren wie Zellstress fördern die Aktivierung (Meadows et al., 2001).

Die Behandlung mit VEGF induzierte eine Phosphorylierung, jedoch nicht bei allen HUVEC. Bei M2 und M3 ist keine deutliche Aktivierung zu sehen. Die VEGF-Stimulation bewirkte insbesondere bei M1, W1, W3 und M4 eine starke Phosphorylierung. Geschlechtsspezifische Unterschiede sind jedoch schwer zu erkennen.

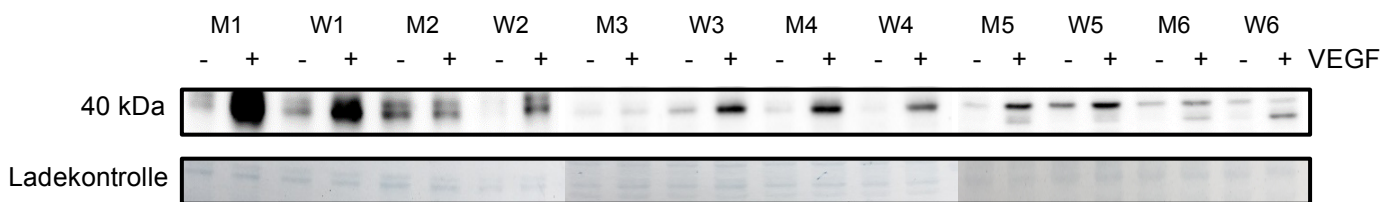


Abbildung 11 Western Blot der Thr180/Tyr182-Phosphorylierung der p38 im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 6 männliche (M) und 6 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 15 Minuten.

5.1.5 PLC-Y

In der Abbildung 12 ist ein Western Blot zur Detektion der Tyr783-Phosphorylierung der PLC-Y im geschlechtsspezifischen Vergleich dargestellt. PLC-Y wird durch VEGFR-2-Bindung aktiviert und bindet an der Rezeptorstelle Y1175. Durch PLC-Y wird die Aktinpolymerisation gefördert. Aktinpolymerisation ist wichtig für die Protrusion bei der Zellmigration (Koch and Claesson-Welsh, 2012).

Die Kurzzeitbehandlung mit VEGF bewirkte überwiegend eine Tyr783-Phosphorylierung der PLC-Y. Bei M2 und W6 war kaum eine Aktivierung zu sehen. Bei allen anderen HUVEC war die Stimulation stärker ausgeprägt.

Der geschlechtsspezifische Vergleich zeigte jedoch aufgrund der interindividuellen Variabilitäten keine Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen HUVEC.

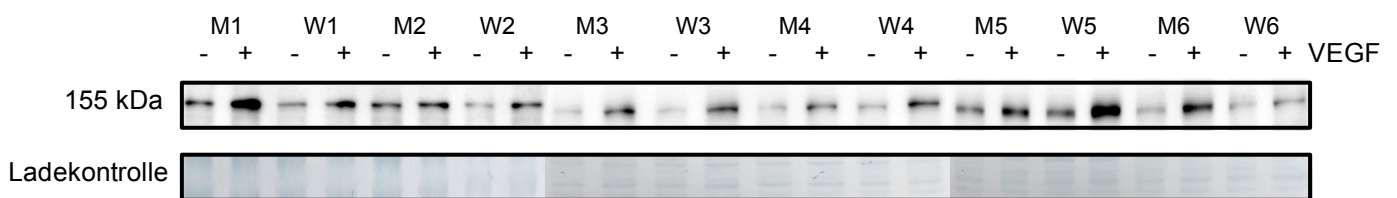


Abbildung 12 Western Blot der Tyr783-Phosphorylierung der PLC-Y im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 6 männliche (M) und 6 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 15 Minuten.

Bei der Phosphorylierungsstelle Tyr1175 des VEGFR-2 konnten keine eindeutigen geschlechtsspezifischen Unterschiede gezeigt werden, denn die Trends der stärkeren Phosphorylierung bei weiblichen HUVEC waren durch die großen interindividuellen Unterschiede nicht signifikant (Abb. 8).

Alle anderen Signalwegs-Phosphorylierungen wiesen auch keine Geschlechtsunterschiede auf. Allerdings waren auch hier interindividuelle Unterschiede zu beobachten, die eventuell vorhandene Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen HUVEC überdecken könnten.

5.2 Vergleich der Proteinexpression nach 16 h VEGF-Behandlung

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Basal- und VEGF-stimulierte Expression migrations- und angiogeneserelevanter Proteine zwischen weiblichen und männlichen HUVEC zu vergleichen. Hierzu erfolgte eine Langzeit-VEGF-Behandlung für 16 h. Neben dem bereits für die Phosphorylierung genutztem VEGFR-2 und dem Signalprotein AKT wurden zudem eNOS, c-Src und die Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K) für die Untersuchungen ausgewählt.

5 weibliche und 5 männliche HUVEC wurden für 5 h von 20 % auf 0,5 % FCS gesetzt. Durch den Nährstoffentzug „hungerten“ die Zellen. Anschließend erfolgte eine Langzeitbehandlung mit 2 nM VEGF für 16 h. Die Expression der Signalproteine wurde mithilfe spezifischer Antikörper und durch chemilumineszente Detektion der *Fusion Solo S* im Western Blot bestimmt.

5.2.1 VEGFR-2

Ein Western Blot zur Bestimmung der Expression des VEGFR-2 ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Stimulation der Expression erfolgte durch VEGF-Langzeitbehandlung über 16 h. Die Expression des VEGFR-2 war bei M2, W3, M4, M5 gegenüber den nicht-stimulierten Kontrollen stärker ausgeprägt. Insgesamt wies jedoch weder die basale noch die VEGF-stimulierte VEGFR-2-Expression eindeutige geschlechtsspezifische Unterschiede auf.

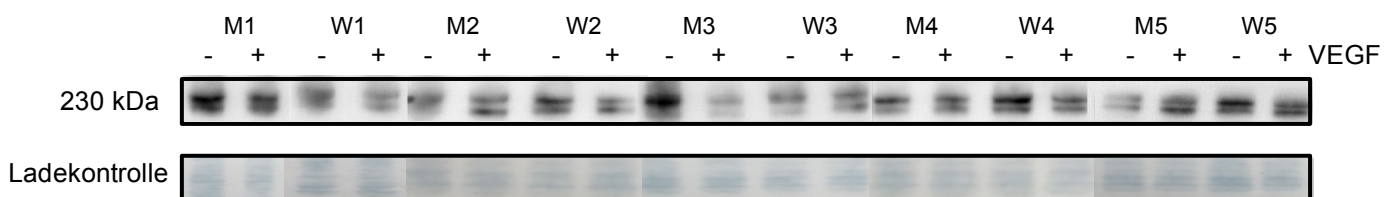


Abbildung 13 Western Blot der Expression von VEGFR-2 im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 5 männliche (M) und 5 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 16 h.

5.2.2 c-Src

Die Abbildung 14 zeigt einen Western Blot zur Detektion der Expression der zytoplasmatischen Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase (c-Src). C-Src, kodiert durch das Protoonkogen Src, wird durch Transmembranproteine unter anderem über den VEGFR aktiviert. Die aktivierte c-Src bewirkt Adhäsionsänderungen sowie Proliferationsprozesse und ist wichtig für das Zellüberleben (Sun et al., 2012, Koch and Claesson-Welsh, 2012).

Die Langzeitbehandlung mit VEGF für 16 h bewirkte insgesamt keine Veränderung der Expression im Vergleich zur Kontrolle (unstimuliert). Die männlichen und weiblichen HUVEC zeigten auch keine Unterschiede in der basalen und VEGF-stimulierten Expression.

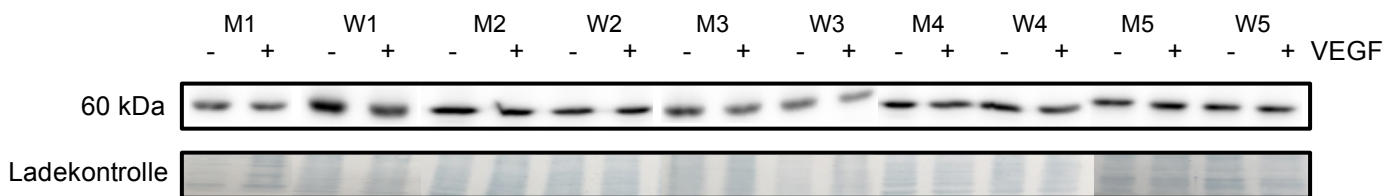


Abbildung 14 Western Blot der Expression von c-Src im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 5 männliche (M) und 5 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 16 h.

5.2.3 AKT

Ein Western Blot zur Bestimmung der Expression von AKT ist in Abbildung 15 dargestellt. Die VEGF-Stimulation für 16 h führte zu keiner stärkeren Expression der AKT in sowohl männlichen wie auch weiblichen HUVEC. Es waren zudem keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zu beobachten.

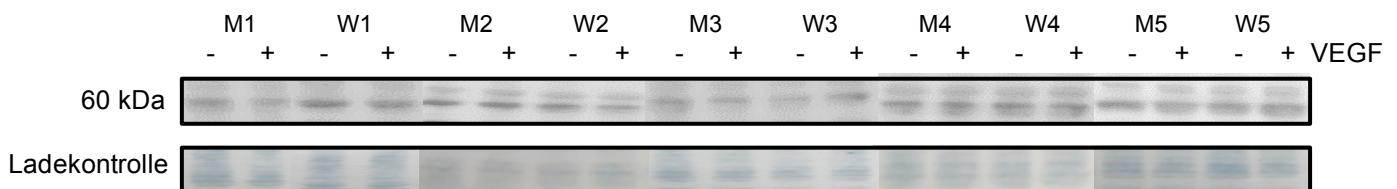


Abbildung 15 Western Blot der Expression von AKT im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 5 männliche (M) und 5 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 16 h.

5.2.4 PI3K

Die PI3K ist ein Membranprotein und an wichtigen Prozessen der Zelle beteiligt. Sie phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) (Abb. 5) und ermöglicht so die Initiierung des MAPK/AKT Signalweges (Koch and Claesson-Welsh, 2012). PI3K ist demnach wichtig für Zellwachstum und Zellstoffwechsel.

Abbildung 16 zeigt die Untersuchung der Expression der PI3K nach VEGF-Langzeitbehandlung für 16 h. Die VEGF-Stimulation führte zu keiner erhöhten Expression der PI3K in männlichen und weiblichen HUVEC. Es konnten zudem keine eindeutigen geschlechtsspezifischen Unterschiede in der basalen und VEGF-induzierten PI3K-Expression zwischen weiblichen und männlichen HUVEC beobachtet werden.

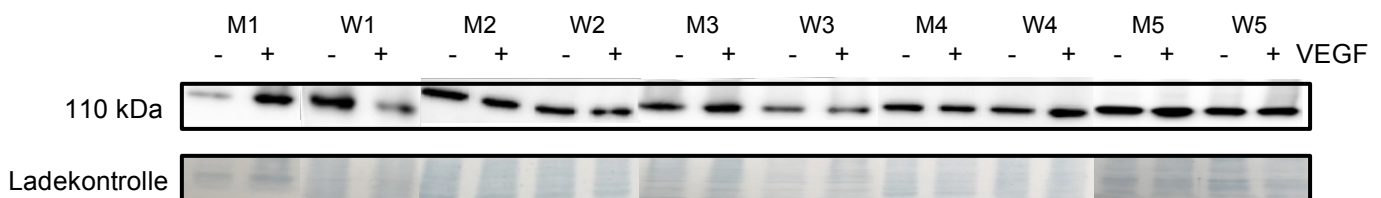


Abbildung 16 Western Blot der Expression von PI3K im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 5 männliche (M) und 5 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 16 h.

5.2.5 eNOS

Abbildung 17 zeigt einen Western-Blot zur Detektion der Expression der eNOS nach 16 h VEGF-Behandlung.

Weder bei weiblichen noch bei männlichen Zellen konnten Unterschiede in der eNOS-Expression zwischen den unstimulierten und den VEGF-behandelten Zellen detektiert werden. Der Vergleich der Expression von eNOS zwischen männlichen und weiblichen HUVEC ergab keine eindeutigen geschlechtsspezifischen Unterschiede.

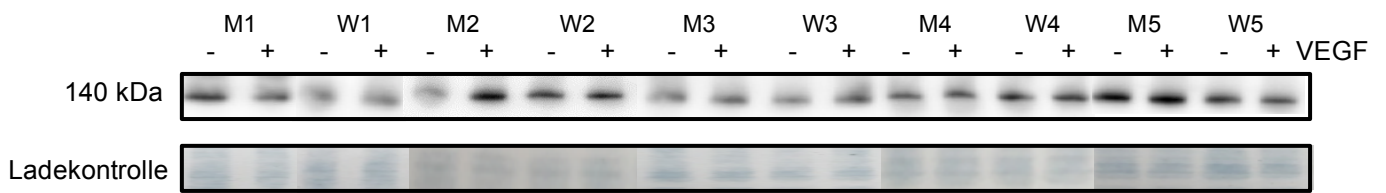


Abbildung 17 Western Blot der Expression von eNOS im geschlechtsspezifischen Vergleich. Dargestellt sind 5 männliche (M) und 5 weibliche (W) HUVEC nach VEGF-Behandlung für 16 h.

Insgesamt zeigten die basalen und VEGF-induzierten Expressionen des VEGFR-2, sowie der Signalproteine c-Src, AKT, eNOS und PI3K keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Die Stimulation mit VEGF führte für alle genannten Proteine zu keiner erhöhten Expression in den weiblichen und männlichen Zellen.

5.3 Quantifizierung des sezernierten VEGFR-1 im geschlechtsspezifischen Vergleich

Die wichtigste Funktion von VEGFR-1 ist die Hemmung von VEGFR-2 durch kompetitive Bindung von VEGF (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Abbildung 18 zeigt die quantitative Bestimmung vom gelösten VEGFR-1 im Zellkulturüberstand.

Die Zellen wurden dazu auf ein nährstoffarmes Medium mit 0,5 % FCS gesetzt (für 5 h und 16 h). Zudem erfolgte bei einem Teil der Zellen eine VEGF-Behandlung für 16 h.

Die Basalwerte des sezernierten VEGFR-1 waren bei den männlichen HUVEC minimal höher gegenüber den weiblichen. Der Nährstoffentzug für 5 h bewirkte eine Verminderung der Konzentrationen (1,8 ng/dl weiblich und 1,9 ng/dl männlich) auf 0,7 ng/dl (weiblich) und 0,8 ng/dl (männlich). Nach 16 h Nährstoffentzug war ein geringer Anstieg der Konzentrationen bei den weiblichen und männlichen Zellen auf 2,2 ng/dl und auf 2,1 ng/dl zu beobachten.

Die VEGF-Behandlung stimulierte die VEGFR-1 Sezernierung und führte zu einem Anstieg der Konzentrationen des gelösten VEGFR-1 auf 4,3 ng/dl (weiblich) und 4,8 ng/dl (männlich). Jedoch zeigten die jeweiligen Werte bei 20 % FCS (1,8 w, 1,9 m; $p = 0,6$), nach 5 h Serumentzug (0,7 w, 0,8 m; $p = 0,3$) und nach 16 h Serumentzug (2,2 w, 2,1 m; $p = 0,7$) keine signifikanten Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen HUVEC. Auch nach VEGF-Behandlung (4,3 w, 4,8 m; $p = 0,6$) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

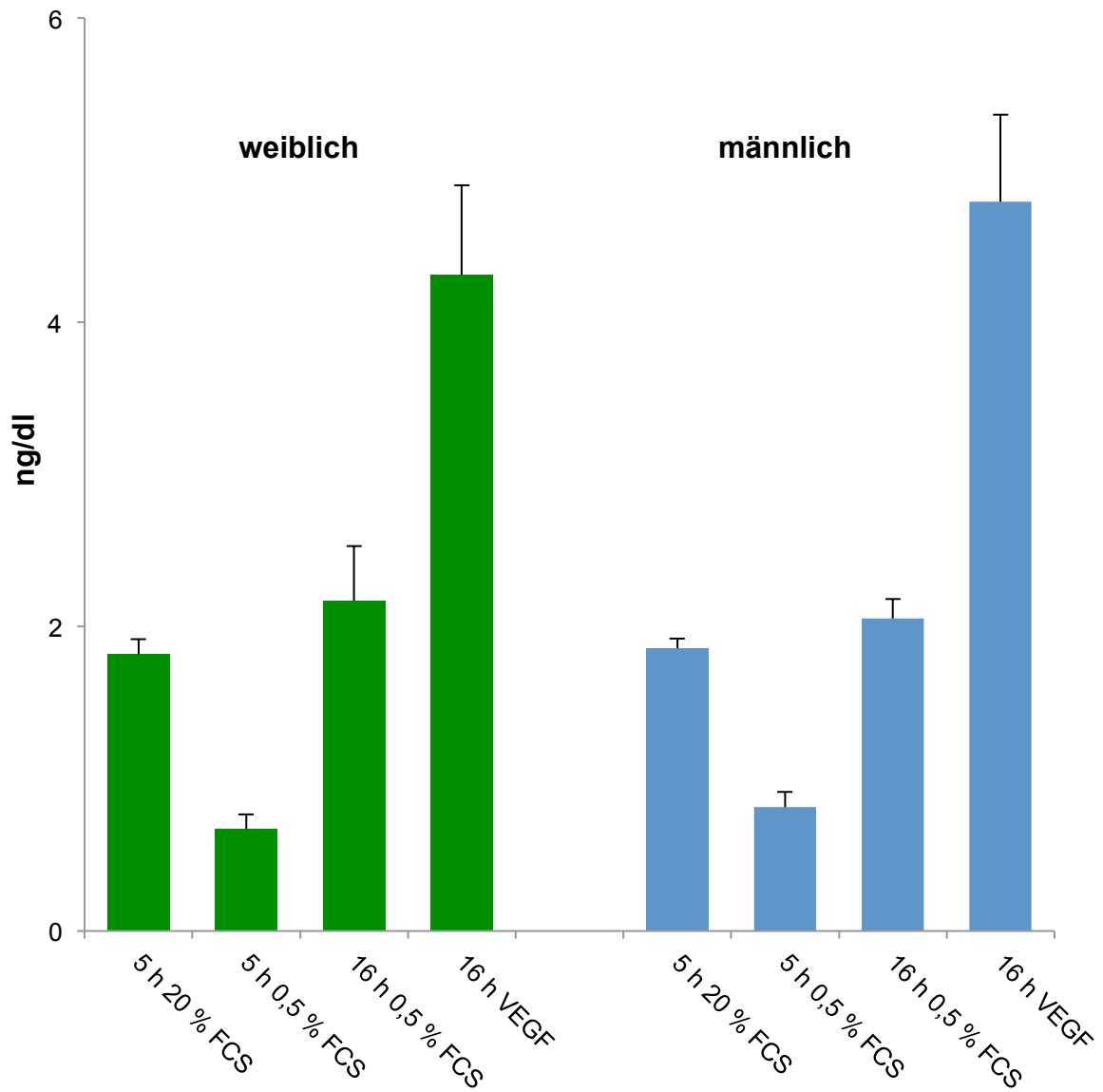
VEGFR-1

Abbildung 18 ELISA zur Quantifizierung des löslichen VEGFR-1 im Zellkulturüberstand. Alle Behandlungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM mit $n = 6$ HUVEC per Geschlecht.

5.4 Angiopoetin-2 und TIMP-1 im geschlechtsspezifischen Vergleich

Mit dem *Proteom Profiler Human Angiogenesis Array* (R&D Systems) wurden die Expressionen der angiogenesehemmenden Proteine Angiopoetin-2 und von TIMP-1 im Zelllysat und in den Zellkulturüberständen gemessen.

Angiopoetin-2 ist ein wichtiger Inhibitor angiogenetischer Abläufe und ist zur Gefäßdestabilisierung vor dem Aussprossen und als Antagonist von Angiopoetin-1 für angiogeneserelevante Abläufe essentiell. Angiopoetin-2 bewirkt ohne angiogenen Stimulus die Rückentwicklung von Gefäßen (Maisonpierre et al., 1997). Ein weiterer Inhibitor der Angiogenese ist der gewebeständige Inhibitor von Matrixmetalloproteasen-1 (TIMP-1). Matrixmetalloproteasen (MMP) lockern zur Initiation der Angiogenese den Gefäßverbund auf (Brew et al., 2000).

Zur Quantifizierung von Angiopoetin-2 und TIMP-1 aus dem Zellkulturüberstand wurde das *Quantikine Immunoassay Kit DANG20* (R&D Systems) und das *Quantikine Immunoassay Kit DTM100* (R&D Systems) verwendet.

Der Vergleich der Basalkonzentrationen von Angiopoetin-2 im Medium mit 20 % FCS zeigte leicht höhere Konzentrationen im Zelllysat männlicher Zellen gegenüber den weiblichen (Abb. 19). In den Zellkulturüberständen waren diese Konzentrationsunterschiede nicht nachzuweisen.

Die weiblichen und die männlichen Zellen wurden für die Versuche 5 h von Medium mit 20 % FCS auf Medium mit 0,5 % FCS gesetzt. Das Umsetzen der Zellen auf ein nährstoffarmes Medium bewirkte im Zelllysat einen geringen Anstieg der intrazellulären Konzentrationen von Angiopoetin-2 bei beiden Geschlechtern. Dieser war jedoch bei den männlichen Zellen stärker zu beobachten als bei den weiblichen.

In den Zellkulturüberständen zeigte sich eine Verringerung der Angiopoetin-2-Konzentrationen nach Nährstoffentzug. Diese war bei den weiblichen Zellen ausgeprägter als bei den männlichen (Abb. 19).

Angiopoetin-2

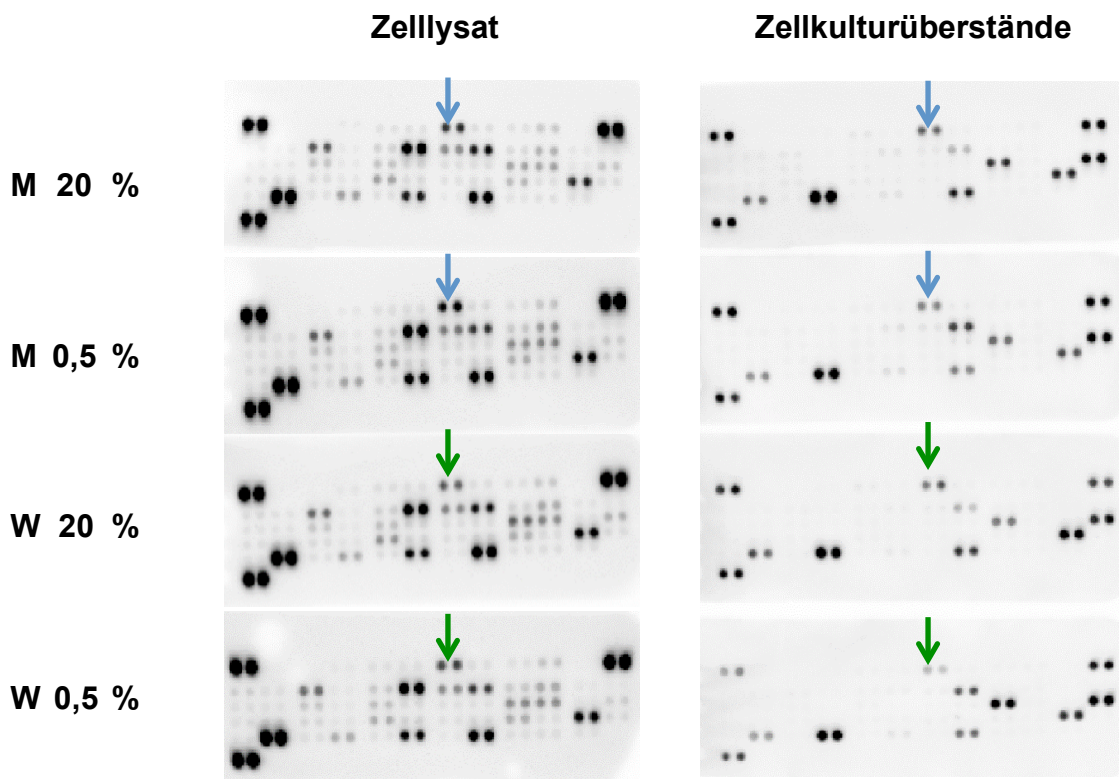


Abbildung 19 Proteom Profiler Human Angiogenesis Array zur Messung von **Angiopoetin-2**. Die Pfeile markieren Angiopoetin-2 bei unterschiedlichen FCS-Konzentrationen des Nährmediums (20 % FCS und 0,5 % FCS) im Zelllysate und in den Zellkulturüberständen. Es wurde ein Pool von 6 weiblichen (W) und 6 männlichen (M) HUVEC verwendet.

Die Basalkonzentrationen von TIMP-1 im Medium mit 20 % FCS (im Zelllysate und in den Zellkulturüberständen) wiesen keine Unterschiede zwischen den weiblichen und männlichen Zellen auf. In den Zellkulturüberständen war jedoch im Vergleich mit dem Zelllysate viel höhere Konzentrationen des TIMP-1 zu beobachten (Abb. 20).

Der Nährstoffentzug bewirkte keine Veränderungen der Konzentrationen von TIMP-1 im Zelllysate bei beiden Geschlechtern. Jedoch war in den Zellkulturüberständen bei den weiblichen und männlichen Zellen eine leichte Verringerung der Konzentrationen nach Serumentzug nachweisbar. Diese war bei den weiblichen Zellen weniger deutlich ausgeprägt.

Insgesamt zeigten sich im geschlechtsspezifischen Vergleich weder im Zelllysat noch in den Zellkulturüberständen eindeutige Unterschiede in der Konzentration von TIMP-1 zwischen weiblichen und männlichen HUVEC.

TIMP-1

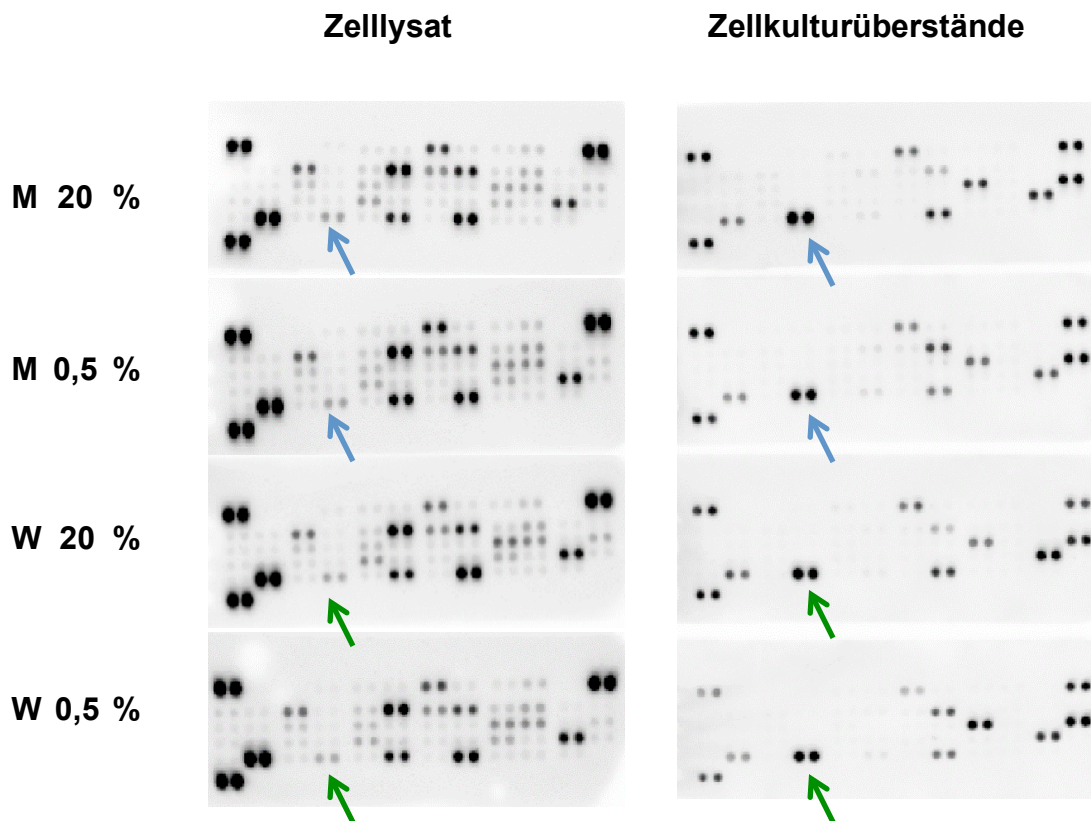


Abbildung 20 Proteom Profiler Human Angiogenesis Array zur Messung von TIMP-1.

Die Pfeile markieren TIMP-1 bei unterschiedlichen FCS-Konzentrationen des Nährmediums (20 % FCS und 0,5 % FCS) im Zelllysat und in den Zellkulturüberständen. Es wurde ein Pool von 6 weiblichen (W) und 6 männlichen (M) HUVEC untersucht.

Da im Human Angiogenesis Array geschlechtsspezifische Unterschiede in den Konzentrationen von Angiopoetin-2 nach Serumreduktion gefunden wurden, erfolgte ein ELISA zur Quantifizierung von Angiopoetin-2 im Zellkulturüberstand (Abb. 21).

Die Basalkonzentration in 20 % FCS war bei den männlichen HUVEC gegenüber den weiblichen leicht erhöht. Jedoch waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant (5458 w, 5610 m; $p = 0,3$).

Der Nährstoffentzug für 5 h bewirkte auch im ELISA eine Verminderung der Konzentration. Die Mittelwerte sind von 5458 ng/dl (weiblich) und von 5610 ng/dl (männlich) basal auf 3010 ng/dl (weiblich) und 3255 ng/dl (männlich) nach Serumreduktion gesunken.

Im direkten Vergleich waren nach 5 h Serumreduktion keine signifikanten Geschlechterunterschiede in der Konzentrationen von Angiopoetin-2 nachweisbar (3010 w, 3255 m; $p = 0,6$). Jedoch war wie im Array nach Serumreduktion eine höhere Angiopoetin-2-Konzentration in den Zellkulturüberständen bei den männlichen HUVEC gegenüber den weiblichen zu beobachten.

Angiopoetin-2

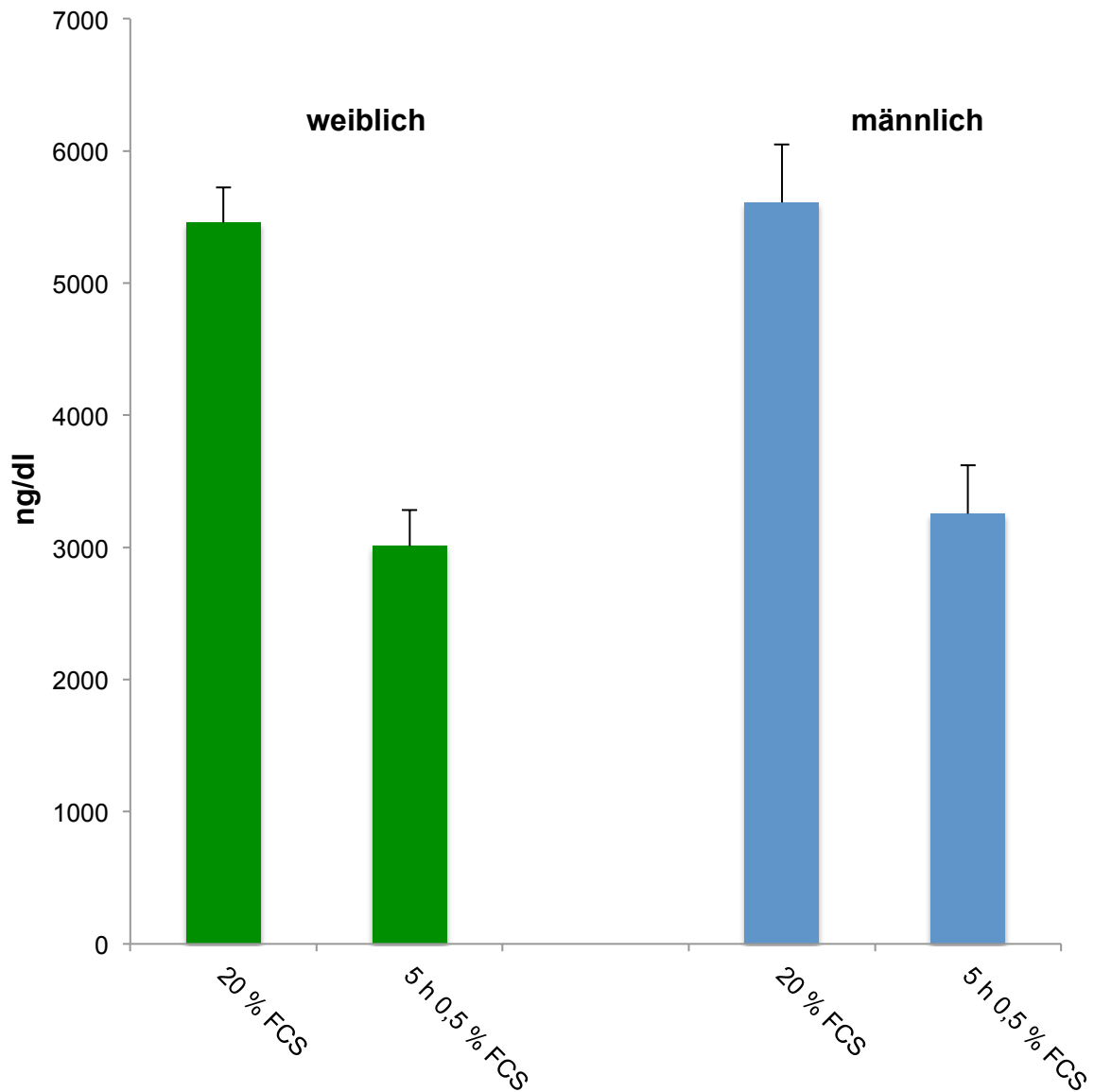


Abbildung 21 ELISA zur Quantifizierung des sezernierten Angiopoetin-2 im Zellkulturüberstand nach Serumreduktion für 5 h im Vergleich zur Basalkonzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM mit $n = 7$ HUVEC per Geschlecht.

Der ELISA zur Quantifizierung des sezernierten TIMP-1 im Zellkulturüberstand (Abb. 22) zeigte höhere Basalkonzentrationen bei den männlichen Zellen gegenüber den weiblichen. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (13,25 w, 14,65 m; $p = 0,28$).

Die Serumreduktion bewirkte eine starke Verminderung der Konzentrationen bei weiblichen und männlichen HUVEC. Die Werte sind von 13,25 ng/dl basal

auf 5,32 ng/dl (weiblich) und von 14,65 ng/dl basal auf 6,33 ng/dl (männlich) gesunken.

Auch nach Serumreduktion waren die Konzentrationen in den männlichen HUVEC gegenüber den weiblichen höher, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant (5,32 w, 6,33 m; $p = 0,16$) (Abb. 22).

TIMP-1

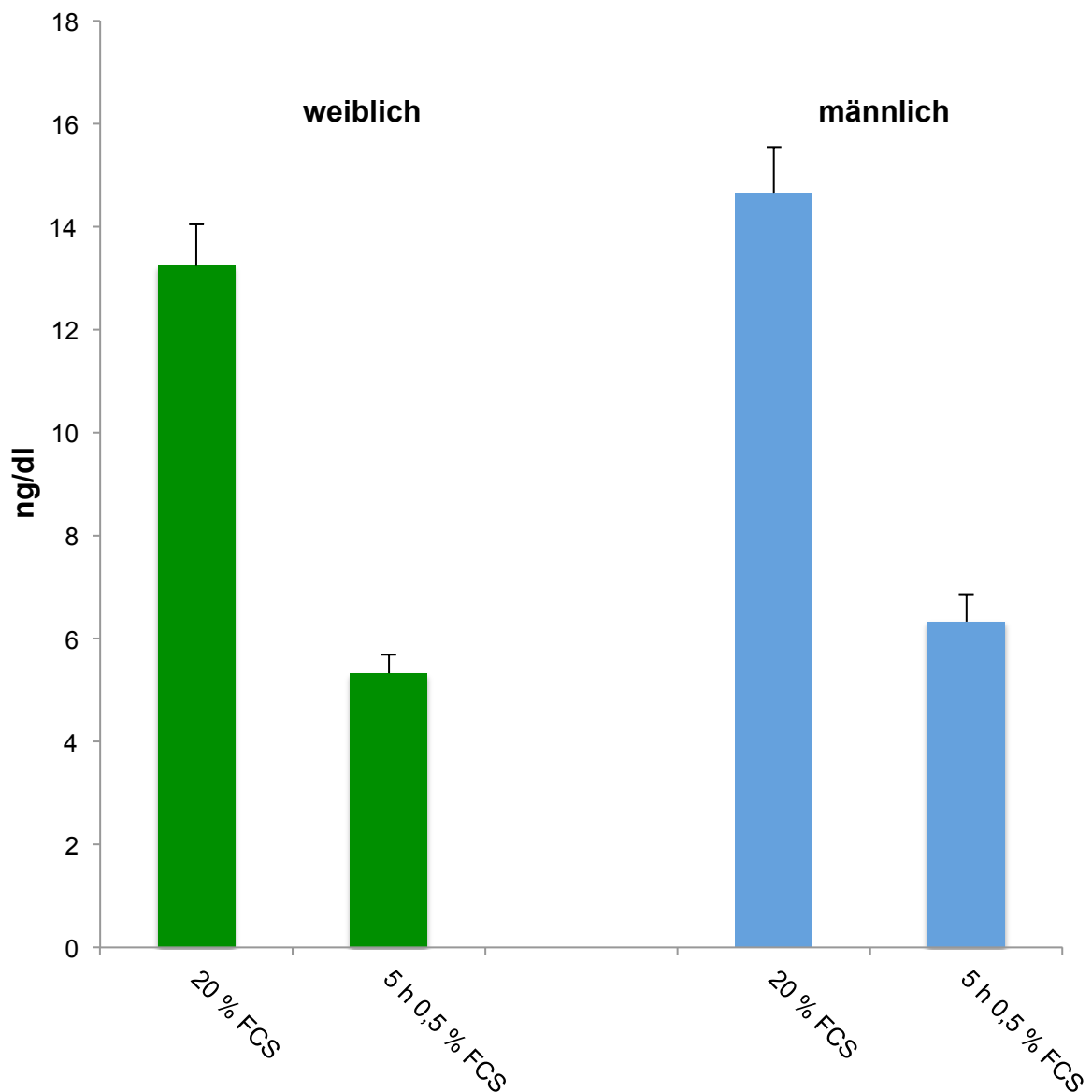


Abbildung 22 ELISA zur Quantifizierung des sezernierten TIMP-1 im Zellkulturüberstand nach Serumreduktion für 5 h im Vergleich zur Basalkonzentration. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM mit $n = 8$ HUVEC per Geschlecht.

6 Diskussion

6.1 Geschlechtsspezifische kardiovaskuläre Unterschiede

Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen statistisch bei der Morbidität und Mortalität westlicher Länder an oberster Stelle (Benjamin et al., 2019). Es gibt geschlechtsspezifische Unterschiede bei der klinischen Manifestation (McSweeney et al., 2003) und bei den pathophysiologischen Mechanismen kardiovaskulärer Krankheiten. Neben geschlechtsspezifischen Unterschieden bei Risikoerkrankungen, wie der Hyperlipidämie (McNamara et al., 1987, Campos et al., 1992, Castelli et al., 1986) und der Adipositas (Lean et al., 1995), wurden auch Unterschiede bei der endothelialen Funktion und Dysfunktion gefunden. Die endotheliale Dysfunktion wird dabei als Erstmanifestation der Atherosklerose verstanden (Celermajer et al., 1992, Celermajer, 1997, Schächinger and Zeiher, 2000).

Viele der geschlechtsspezifischen Unterschiede lassen sich auf die kardioprotektive Wirkung von Östrogen auf das Endothel zurückführen. Die wichtigste Wirkung von Östrogen ist die Erhöhung der vasodilatativen Kapazität durch Induktion der NO-Synthese (Miller et al., 2007, Case and Davison, 1999). Außerdem reduziert Östrogen oxidativen Stress (Ide et al., 2002, Miller et al., 2007) und dadurch auch die LDL-Oxidation in den Koronararterien. Durch eine Hemmung inflammatorischer Prozesse wird darüber hinaus die Sekretion von inflammatorischen Cytokinen verringert (Hsu and Lee, 2020). Ein Östrogenmangel kann daher zu einer postmenopausalen endothelialen Dysfunktion führen (Rohr et al., 2014).

Östrogen als kardioprotektives Hormon führt also zu Unterschieden bei den pathophysiologischen Prozessen, die mit der Entwicklung von Atherosklerose verbunden sind. Es gibt jedoch auch geschlechtsspezifische endotheliale Funktionsunterschiede. Unsere AG Lorenz/Stangl beschäftigt sich seit Jahren mit der Untersuchung endothelialer Unterschiede im Blick auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Dabei konnten geschlechtsspezifische transkriptionelle, proteomale und metabolische Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen HUVEC nachgewiesen werden (Lorenz et al., 2015, Witt et al., 2019, Lorenz et al., 2019).

6.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Migration

Hoetzer et al. haben die Migration von *Endothelial Progenitor Cells* (EPCs) aus dem Blut von 25 postmenopausalen Frauen und Männern bestimmt und geschlechtsspezifische Unterschiede in der Koloniebildungskapazität als auch in der migratorischen Aktivität der Zellen gefunden (Vasa et al., 2001, Hoetzer et al., 2007). Die Koloniebildungskapazität der weiblichen EPCs gegenüber den männlichen betrug 120 %. Auch die Migrationsrate der weiblichen Zellen war mit 40 % signifikant höher als die der männlichen EPCs (Hoetzer et al., 2007).

Addis et al. haben Untersuchungen mit HUVEC von gesunden Müttern ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren durchgeführt. Dabei war die Migrationsaktivität von unbehandelten weiblichen HUVEC nach 24 h signifikant größer als die der männlichen (Addis et al., 2014). Sie konnten außerdem eine höhere Expression von Beclin 1 und ein höheres Verhältnis LC3-II/LC3-I in den männlichen Zellen nachweisen. Die Konjugation von LC3-I zu LC3-II gilt als ein Indikator der Autophagieaktivität (Tanida et al., 2008), weshalb als eine mögliche Ursache für die geringe Migration eine erhöhte Autophagieaktivität der männlichen Zellen vermutet wurde. Darüber hinaus wurden eine erhöhte NOS3-RNA und eine höhere Proteinexpression bei weiblichen HUVEC als ein möglicher Erklärungsansatz für ihre höhere Migrationsaktivität angenommen (Addis et al., 2014). Cattaneo et al. 2017 führten die erhöhte Migrationsaktivität der weiblichen gegenüber den männlichen HUVEC auf eine höhere Expressionsrate von Gesamt-eNOS, auf eine eNOS-abhängige Migration und auf eine erhöhte lamellipodale eNOS-Aktivität zurück (Cattaneo et al., 2017).

Aktuelle Studien konnten geschlechtsspezifisches Stressverhalten von Endothelzellen nachweisen. In *in-vitro*-Versuchen konnte durch Stressinduktion mit Scherspannung, Hypoxie und Nährstoffreduktion eine stärkere Transkription, Tube-Formation, Migration und Energiemetabolisation von weiblichen gegenüber männlichen HUVEC festgestellt werden. (Lorenz et al., 2015, Lorenz et al., 2019, Zhang and Lingappan, 2017). Auch ein beschleunigter aortaler endothelialer Wundschluss bei weiblichen Ratten gegenüber männlichen wurde beobachtet (Huxley et al., 2018).

Die AG Lorenz/Stangl konnte in einer Zusammenarbeit mit der AG Knaus (FU Berlin) zeigen, dass weibliche HUVEC nach Serumreduktion auf 0,5 % FCS und VEGF-Behandlung gegenüber den männlichen eine bessere Migration aufweisen. Im Unterschied zu Addis et al. wurden die HUVEC für die Migrationsversuche von 20 % FCS auf 0,5 % FCS umgesetzt und entweder mit VEGF oder 5 % FCS behandelt. Durch die Nährstoffreduktion auf 0,5 % FCS „hungerten“ die Zellen, wodurch Zellstress induziert wurde. Unterschiede

zwischen weiblichen und männlichen HUVEC unter basalen Bedingungen (auf 5 % FCS) ohne eine VEGF-Zugabe konnten nicht nachgewiesen werden (Lorenz et al., 2019). Außerdem wurden die HUVEC mit dem „Östrogenagonisten“ Phenolrot behandelt, das als Östrogenrezeptor-Agonist östrogeninduzierte geschlechtsspezifische Unterschiede demaskiert hätte. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede stehen daher sehr wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der Wirkung von Östrogen (Lorenz et al., 2019).

Um die möglichen Ursachen für die geschlechtsspezifischen Migrationsunterschiede aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit VEGF-induzierte Signalwege und die Expressionsraten einiger angiogeneserelevanter Proteine bei weiblichen und männlichen HUVEC untersucht. Die HUVEC wurden dafür auf ein nährstoffarmes Medium mit 0,5 % FCS umgesetzt. Durch die Serumreduktion „hungerten“ die Zellen. Bislang gibt es keine Studie, die VEGF-Signalwege bei HUVEC nach Serumreduktion und VEGF-Behandlung geschlechtsspezifisch verglichen hat.

In der vorliegenden Studie konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in VEGF-induzierten Signalwegen nachgewiesen werden. Die Trends geschlechtsspezifischer Unterschiede waren durch interindividuelle Unterschiede bestimmt und konnten daher im Zellkulturmodell nicht als signifikant bewertet werden.

6.3 HUVEC als Zellkulturmodell für geschlechtsspezifische Unterschiede

Für die Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede der Gefäßfunktion auf Zellebene haben wir HUVEC als gut etabliertes Zellkulturmodell verwendet. HUVEC sind aufgrund ähnlicher physiologischer Eigenschaften wie adulte Endothelzellen in den Koronargefäßen sehr gut für die Erforschung kardiovaskulärer Fragestellungen hinsichtlich der Zellfunktion geeignet (Onat et al., 2011, Cines et al., 1998, Baudin et al., 2007, Medina-Leyte et al., 2020).

HUVEC können darüber hinaus auch gut bei der Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede auf Zellebene eingesetzt werden, denn der hormonelle Einfluss im Nabelschnurblut weist nur geringe Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Zellen auf. Die Hormonproduktion der männlichen und weiblichen Feten beginnt zwar mit der Ausreifung der Gonaden in der 8. Schwangerschaftswoche, aber wegen des zeitlich kurzen Einflusses im Nabelschnurblut sind die Effekte im Unterschied zum Erwachsenenalter als eher gering einzuschätzen (van de Beek et al., 2004). Auch wenn in einer

Metaanalyse erhöhte Testosteronspiegel in männlichem venösen Nabelschnurblut nachgewiesen werden konnten (Barry et al., 2011), so wurden in weiteren Studien vergleichbare Hormonkonzentrationen zwischen männlichem und weiblichem venösen Nabelschnurblut gemessen (Hickey et al., 2014, Armanian et al., 2013).

Außerdem werden externe Einflüsse auf das Endothel, wie Umwelt und Lebensweise, nur durch die maternalen Parameter bestimmt. Allerdings konnten wegen der Wahrung der Anonymität der Mütter entsprechende Faktoren wie die allgemeine Gesundheit der Mutter und relevante schwangerschaftsbezogene kardiovaskuläre Erkrankungen wie Präeklampsie, Hypertonie oder hypoxische Verhältnisse unter der Geburt, nicht in die Ergebnisauswertung einbezogen werden.

Für weitere Studien sollte homogeneres Untersuchungsmaterial verwendet werden, so dass die Daten besser vergleichbar sind. Ein geeigneteres Modell für weitere Studien wäre ein geschlechtsspezifischer Vergleich von HUVEC aus getrennt-geschlechtlichen Zwillingsgeburten. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, bei einer Untersuchung des Nabelschnurbluts auch laborchemische Parameter zu bestimmen, wie z. B. den pH-Wert und den Hormonstatus, um diese in die Ergebnisauswertung einbeziehen zu können.

6.4 VEGF und VEGFR

Die VEGF-Familie ist entscheidend an der Regulation der Angiogenese, der Steuerung des Zellüberlebens und an inflammatorischen Prozessen der Endothelzelle beteiligt (Carmeliet et al., 1996).

Während die physiologische Angiogenese lebenswichtig für den menschlichen Organismus ist, führt die pathologisch überschießende Neovaskulogenese in Karzinomen, z. B. beim colorektalen Karzinom und dem Pankreaskarzinom, zu einem schlechteren klinischen Outcome. Deshalb ist die VEGF-Familie Gegenstand vieler Studien, vor allem im Blick auf neue Therapiemöglichkeiten für die Onkologie. Als Ergänzung der chemotherapeutischen Behandlung hat sich der VEGFA-Antikörper Bevacizumab bereits etabliert. Die Inhibition der Gefäßversorgung erfolgt durch eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung an VEGFA (Hurwitz et al., 2004).

VEGFA ist eines der wichtigsten endothelialen Proteine, das nach kardiovaskulären Ereignissen wie einem Myokardinfarkt an der Regeneration des geschädigten Endothels beteiligt ist. Die Synthese erfolgt dabei neben der endothelialen Expression auch durch Myofibroblasten und fördert so den Regenerationsprozess (Chintalgattu et al., 2003). Als Permeabilitätsfaktor

induziert VEGFA eine erhöhte LDL-Durchlässigkeit der Gefäßwand, wodurch die Entstehung von Atherosklerose gemindert wird. Deshalb wirkt VEGFA auch protektiv auf das Gefäßsystem (Trotter et al., 2009).

Der VEGFR-2 wird in allen menschlichen Endothelzellen exprimiert und findet sich daher auch in den Endothelzellen der Nabelschnüre. Er gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren (Shibuya, 2013). Durch Bindung von VEGFA, VEGFC und VEGFD an der extrazellulären Domäne wird VEGFR-2 moduliert. Der wichtigste Ligand dieses Rezeptors ist jedoch VEGFA (McColl et al., 2003). Die Modulation von VEGFA führt am VEGFR-2 zu einer Konformationsänderung (Dimerisierung). Diese Änderung löst an der Tyrosinkinase-Domäne durch eine Aktivierung der Kinase die Autophosphorylierung der Tyrosin-Phosphorylierungsstellen aus (Matsumoto and Mugishima, 2006). Eine höhere Phosphorylierungsrate an den Phosphorylierungsstellen könnte die Migrationsunterschiede zwischen den weiblichen und männlichen HUVEC erklären.

Die Rezeptorstelle VEGFR-2 Y1175 bindet das SHB, das wiederum an der FAK bindet und so zu einer Adhäsionsänderung der Zelle führt, was eine große Rolle bei der Zellmigration spielt. Außerdem wird durch VEGFR-2 Y1175 die PLC- γ aktiviert, wodurch dann die Aktinpolymerisation gefördert wird (Koch and Claesson-Welsh, 2012). An die Rezeptorstelle VEGFR-2 Y951 bindet der TSAd, so dass TSAd einen Komplex mit c-Src bilden kann (Sun et al., 2012). Diese Signalwege sind entscheidend für die Angiogenese. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit das Ausmaß der Phosphorylierung der Tyrosin-Phosphorylierungsstellen VEGFR-2 Tyr1175 und Tyr951, sowie die Expression von VEGFR-2 nach 16 h Langzeitbehandlung mit VEGF durch Western Blot untersucht.

Die VEGF-Stimulation bewirkte bei den meisten HUVEC eine stärkere Phosphorylierung des Rezeptors gegenüber der Kontrolle (unstimulierte HUVEC). Der Vergleich der männlichen und weiblichen HUVEC ergab insbesondere bei VEGFR-2 Tyr1175 eine leicht stärkere Phosphorylierung der weiblichen HUVEC gegenüber den männlichen. Diese Trends waren jedoch gering und wiesen eine hohe interindividuelle Variabilität auf. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, müsste eine höhere Anzahl von HUVEC untersucht werden, um die interindividuellen Unterschiede auszugleichen. Ein Pool von mehreren weiblichen und männlichen HUVEC wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet, um geringfügige Unterschiede und Tendenzen nicht zu maskieren.

Der lösliche VEGFR-1 bewirkt durch eine kompetitive Bindung von VEGFA eine Hemmung der durch VEGFR-2-induzierten Signalwege (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Menge an VEGFR-1 im Zellkulturüberstand mittels ELISA untersucht. Eine erhöhte Expression des VEGFR-1 bei männlichen Zellen könnte eine bessere Migration der weiblichen Zellen erklären.

Die HUVEC wurden dazu von 20 % FCS auf ein nährstoffarmes Medium mit 0,5 % FCS gesetzt (für 5 h und 16 h). Außerdem erfolgte bei der Serumreduktion auch eine Behandlung mit VEGF. Sowohl der Nährstoffentzug über 16 h als auch die Behandlung mit VEGF stimulierte die Sezernierung von VEGFR-1 und führte zu einem Anstieg der Konzentration des löslichen VEGFR-1 im Zellkulturüberstand. Dabei zeigten sich leicht höhere Werte bei den männlichen HUVEC, die allerdings in allen Behandlungen nicht statistisch signifikant waren.

Anhand dieser Ergebnisse sind Migrationsunterschiede zwischen weiblichen und männlichen HUVEC mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf eine geschlechtsspezifische Sezernierung des VEGFR-1 zurückzuführen.

6.5 VEGF-induzierte Signalwege

Die Modulation des VEGFR-2 nach der Bindung von VEGFA führt durch multiple Phosphorylierungen des VEGFR-2 zu einer Aktivierung weiterer Signalproteine wie c-Src, p38, PLC-Y und AKT (Koch and Claesson-Welsh, 2012).

PLC-Y, das über VEGFR-2 Y1175 aktiviert wird, fördert die Aktinpolymerisation und damit auch Protrusion bei der Zellmigration (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose werden durch die MAPK p38 reguliert. Die Aktivierung von p38 wird durch Zellstress stimuliert. Die Kinase AKT fördert durch eine Hemmung der Apoptose das Zellüberleben (Gerber et al., 1998).

Als wichtige Proteine, die entscheidend an der Angiogenese beteiligt sind, wurde die Phosphorylierung von PLC-Y, AKT und p38 nach Serumreduktion und Kurzzeitbehandlung mit VEGF untersucht. Dabei konnten bei PLC-Y, AKT und p38 keine Tendenzen einer geschlechtsspezifischen Phosphorylierung detektiert werden. Jedoch waren auch hier große interindividuelle Unterschiede in HUVEC zu beobachten.

Das Signalprotein c-Src initiiert nach der Bindung von VEGFA Adhäsionsänderungen, Proliferationsprozesse und reguliert das Zellüberleben

(Matsumoto et al., 2005). Der MAPK/AKT Signalweg, stimuliert durch VEGF und andere Wachstumsfaktoren, hat eine besondere Bedeutung im Zellstoffwechsel und Zellwachstum. Die Aktivierung erfolgt über die PI3K (Koch and Claesson-Welsh, 2012). NO spielt eine wesentliche Rolle bei der Angiogenese, da es die angiogene Sprossung initiiert. Es wird durch eNOS generiert (Kimura et al., 2000).

Aufgrund ihrer Bedeutung für die Gefäßbildung wurden die Expressionen der Proteine c-Src, AKT, PI3K und eNOS nach Serumreduktion und 16 h Langzeitbehandlung mit VEGF untersucht. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den weiblichen und männlichen HUVEC detektiert werden und zwar sowohl vor als auch nach der VEGF-Stimulation.

Addis et al. haben bei der Messung von Gesamt-AKT ohne VEGF-Stimulation in HUVEC ebenfalls keine Geschlechtsunterschiede in der Expression festgestellt (Addis et al., 2014). Cattaneo et al. dagegen konnten 2017 höhere relative Expressionsraten von Gesamt-eNOS in weiblichen gegenüber männlichen HUVEC dizygoter Zwillinge nachweisen (Cattaneo et al., 2017). Im Gegensatz zu Cattaneo et al. wurden in der vorliegenden Arbeit die HUVEC für die Expressionsversuche von 20 % FCS auf 0,5 % FCS umgesetzt und mit VEGF behandelt. Darüber hinaus wurde nicht Gesamt-eNOS untersucht. Diese Faktoren könnten zu den unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben.

6.6 Hemmende Faktoren der Angiogenese: TIMP-1 und Angiopoetin-2

Entscheidend für den Ablauf der Angiogenese ist eine Balance zwischen angiogenesefördernden und angiogenesehemmenden Stoffen. Ein wichtiger Inhibitor der Angiogenese ist Angiopoetin-2, das ohne einen angiogenen Stimulus zu einer Rückentwicklung von Gefäßen führt (Maisonpierre et al., 1997). TIMP-1 ist ein weiterer Inhibitor der Angiogenese. Bei der angiogenetischen Sprossung bewirkt MMP die Lockerung des Gefäßverbundes und ermöglicht so den Beginn der Sprossung. Als Gegenspieler fungiert TIMP-1, das MMP und damit die angiogenetische Sprossung hemmt (Brew et al., 2000).

Diese Proteine wurden mit dem Human Angiogenese Array im Zelllysate und in den Zellkulturüberständen von HUVEC gemessen. Im Zelllysate konnten für TIMP-1 nach dem Serumentzug auf 0,5 % FCS keine Konzentrationsänderungen bei beiden Geschlechtern nachgewiesen werden. Bei Angiopoetin-2 war ein leichter Anstieg der Konzentrationen zu beobachten, allerdings ohne geschlechtsspezifische Unterschiede. In den

Zellkulturüberständen wurde nach der Serumreduktion ein geringer Abfall der Konzentrationen bei beiden Proteinen gemessen. Bei Angiopoetin-2 waren diese Konzentrationsveränderungen bei den weiblichen Zellen im Vergleich zu den männlichen stärker ausgeprägt.

Eine deutliche Abnahme der Konzentrationen von TIMP-1 und Angiopoetin-2 nach Serumreduktion war im ELISA zu beobachten. Jedoch waren auch hier keine Geschlechterunterschiede festzustellen. Die Basalkonzentrationen für beide Proteine waren in den männlichen HUVEC jeweils höher, jedoch nicht statistisch signifikant. Höhere Konzentrationen der inhibitorischen Proteine bei den männlichen HUVEC hätten zu einer möglichen Erklärung der geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Migration beigetragen.

6.7 Limitationen der Studie

In der vorliegenden Arbeit wurden VEGF-induzierte Signalwege sowie Expression und Konzentrationen von angiogeneserelevanten Proteinen bei weiblichen und männlichen HUVEC geschlechtsspezifisch verglichen.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden, was man auf verschiedene Ursachen zurückführen kann. So könnte etwa die verwendete Anzahl von weiblichen und männlichen HUVEC zu gering gewesen sein. In Folgestudien sollte daher eine Erweiterung und Erhöhung der Anzahl der zu untersuchenden HUVEC in Betracht gezogen werden. Außerdem sollten weitere Proteine und Zellfunktionen untersucht werden, wie z. B. die inflammatorischen Signalwege.

Wegen der Wahrung der Anonymität der Mütter für die verwendeten HUVEC konnten spenderabhängige Faktoren wie kardiovaskuläre Risikofaktoren nicht berücksichtigt werden. Für Folgestudien wäre es allerdings sinnvoll, anamnestisch den klinischen Hintergrund der Spenderinnen zu erfragen und in die Auswertung einzubeziehen. Außerdem sollten Untersuchungen mit getrenntgeschlechtlichen Zwillingsnabelschnüren durchgeführt werden, da die männlichen und weiblichen HUVEC dann einen vergleichbaren maternalen Hintergrund hätten.

Die genannten Faktoren und dabei insbesondere die Erhöhung der HUVEC-Anzahl, könnten zu signifikanten Ergebnissen in Folgestudien führen.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Printquellen

- ADDIS, R., CAMPESI, I., FOIS, M., CAPOBIANCO, G., DESSOLE, S., FENU, G., MONTELLA, A., CATTANEO, M. G., VICENTINI, L. M. & FRANCONI, F. 2014. Human umbilical endothelial cells (HUVECs) have a sex: characterisation of the phenotype of male and female cells. *Biol Sex Differ*, 5, 18.
- ANDERSON, T. J., UEHATA, A., GERHARD, M. D., MEREDITH, I. T., KNAB, S., DELAGRANGE, D., LIEBERMAN, E. H., GANZ, P., CREAGER, M. A. & YEUNG, A. C. 1995. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*, 26, 1235-41.
- ARMANIAN, A. M., HASHEMIPOUR, M., ESNAASHARI, A., KELISHADI, R. & FARAJZADEGAN, Z. 2013. Influence of perinatal factors on thyroid stimulating hormone level in cord blood. *Adv Biomed Res*, 2, 48.
- ASAHARA, T., CHEN, D., TAKAHASHI, T., FUJIKAWA, K., KEARNEY, M., MAGNER, M., YANCOPOULOS, G. D. & ISNER, J. M. 1998. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res*, 83, 233-40.
- ASAHARA, T., TAKAHASHI, T., MASUDA, H., KALKA, C., CHEN, D., IWAGURO, H., INAI, Y., SILVER, M. & ISNER, J. M. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18, 3964-72.
- AUSPRUNK, D. H. & FOLKMAN, J. 1977. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res*, 14, 53-65.
- BARRY, J. A., HARDIMAN, P. J., SIDDIQUI, M. R. & THOMAS, M. 2011. Meta-analysis of sex difference in testosterone levels in umbilical cord blood. *J Obstet Gynaecol*, 31, 697-702.
- BARTOSZEWSKI, R., SEROCKI, M., JANASZAK-JASIECKA, A., BARTOSZEWSKA, S., KOCHAN-JAMROZY, K., PIOTROWSKI, A., KRÓLICZEWSKI, J. & COLLAWN, J. F. 2017. miR-200b downregulates Kruppel Like Factor 2 (KLF2) during acute hypoxia in human endothelial cells. *Eur J Cell Biol*, 96, 758-766.
- BAUDIN, B., BRUNEEL, A., BOSSELUT, N. & VAUBOURDOLLE, M. 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*, 2, 481-5.
- BENJAMIN, E. J., MUNTNER, P., ALONSO, A., BITTENCOURT, M. S., CALLAWAY, C. W., CARSON, A. P., CHAMBERLAIN, A. M., CHANG, A. R., CHENG, S., DAS, S. R., DELLING, F. N., DJOUSSE, L., ELKIND, M. S. V., FERGUSON, J. F., FORNAGE, M., JORDAN, L. C., KHAN, S. S., KISSELA, B. M., KNUTSON, K. L., KWAN, T. W., LACKLAND, D. T., LEWIS, T. T., LICHTMAN, J. H., LONGENECKER, C. T., LOOP, M. S., LUTSEY, P. L., MARTIN, S. S., MATSUSHITA, K., MORAN, A. E., MUSSOLINO, M. E., O'FLAHERTY, M., PANDEY, A., PERAK, A. M., ROSAMOND, W. D., ROTH, G. A., SAMPSON, U. K. A., SATOU, G. M., SCHROEDER, E. B., SHAH, S. H., SPARTANO, N. L., STOKES, A., TIRSCHWELL, D. L., TSAO, C. W., TURAKHIA, M. P., VANWAGNER, L. B., WILKINS, J. T., WONG, S. S., VIRANI, S. S., AMERICAN HEART ASSOCIATION COUNCIL ON, E., PREVENTION STATISTICS, C. &

- STROKE STATISTICS, S. 2019. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, CIR00000000000000659.
- BENJAMIN, L. E., HEMO, I. & KESHET, E. 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*, 125, 1591-8.
- BILSEL, A. S., MOINI, H., TETIK, E., AKSUNGAR, F., KAYNAK, B. & OZER, A. 2000. 17Beta-estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 46, 579-84.
- BREW, K., DINAKARPANDIAN, D. & NAGASE, H. 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1477, 267-83.
- BROOKS, P. C., CLARK, R. A. & CHERESH, D. A. 1994. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 264, 569-71.
- BUSSOLINO, F., MANTOVANI, A. & PERSICO, G. 1997. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci*, 22, 251-6.
- CAMICI, P. G., D'AMATI, G. & RIMOLDI, O. 2015. Coronary microvascular dysfunction: mechanisms and functional assessment. *Nat Rev Cardiol*, 12, 48-62.
- CAMPBELL, D. J., SOMARATNE, J. B., JENKINS, A. J., PRIOR, D. L., YII, M., KENNY, J. F., NEWCOMB, A. E., KELLY, D. J. & BLACK, M. J. 2011. Differences in myocardial structure and coronary microvasculature between men and women with coronary artery disease. *Hypertension*, 57, 186-92.
- CAMPOS, H., BLIJLEVENS, E., MCNAMARA, J. R., ORDOVAS, J. M., POSNER, B. M., WILSON, P. W., CASTELLI, W. P. & SCHAEFER, E. J. 1992. LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb*, 12, 1410-9.
- CANNON, R. O., 3RD & EPSTEIN, S. E. 1988. "Microvascular angina" as a cause of chest pain with angiographically normal coronary arteries. *Am J Cardiol*, 61, 1338-43.
- CARLSON, B. M. 2018. Human Embryology and Developmental Biology (Sixth Edition). *Elsevier*. 372
- CARMELIET, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6, 389-95.
- CARMELIET, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9, 653-60.
- CARMELIET, P., FERREIRA, V., BREIER, G., POLLEFEY, S., KIECKENS, L., GERTSENSTEIN, M., FAHRIG, M., VANDENHOECK, A., HARPAL, K., EBERHARDT, C., DECLERCQ, C., PAWLING, J., MOONS, L., COLLEN, D., RISAU, W. & NAGY, A. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380, 435-9.
- CASE, J. & DAVISON, C. A. 1999. Estrogen alters relative contributions of nitric oxide and cyclooxygenase products to endothelium-dependent vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther*, 291, 524-30.
- CASTELLI, W. P., GARRISON, R. J., WILSON, P. W., ABBOTT, R. D., KALOUSDIAN, S. & KANNEL, W. B. 1986. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*, 256, 2835-8.

- CATTANEO, M. G., VANETTI, C., DECIMO, I., DI CHIO, M., MARTANO, G., GARRONE, G., BIFARI, F. & VICENTINI, L. M. 2017. Sex-specific eNOS activity and function in human endothelial cells. *Sci Rep*, 7, 9612.
- CELERMAJER, D. S. 1997. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol*, 30, 325-33.
- CELERMAJER, D. S., SORENSEN, K. E., GOOCH, V. M., SPIEGELHALTER, D. J., MILLER, O. I., SULLIVAN, I. D., LLOYD, J. K. & DEANFIELD, J. E. 1992. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*, 340, 1111-5.
- CHARO, S., GOKCE, N. & VITA, J. A. 1998. Endothelial dysfunction and coronary risk reduction. *J Cardiopulm Rehabil*, 18, 60-7.
- CHINTALGATTU, V., NAIR, D. M. & KATWA, L. C. 2003. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol*, 35, 277-86.
- CHOI, K. 1998. Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol*, 76, 947-56.
- CHUA, S. K., HUNG, H. F., SHYU, K. G., CHENG, J. J., CHIU, C. Z., CHANG, C. M., LIN, S. C., LIOU, J. Y., LO, H. M., KUAN, P. & LEE, S. H. 2010. Acute ST-elevation myocardial infarction in young patients: 15 years of experience in a single center. *Clin Cardiol*, 33, 140-8.
- CINES, D. B., POLLAK, E. S., BUCK, C. A., LOSCALZO, J., ZIMMERMAN, G. A., MCEVER, R. P., POBER, J. S., WICK, T. M., KONKLE, B. A., SCHWARTZ, B. S., BARNATHAN, E. S., MCCRAE, K. R., HUG, B. A., SCHMIDT, A. M. & STERN, D. M. 1998. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, 91, 3527-61.
- CREA, F., CAMICI, P. G. & BAIREY MERZ, C. N. 2014. Coronary microvascular dysfunction: an update. *Eur Heart J*, 35, 1101-11.
- DICKSON, M. C., MARTIN, J. S., COUSINS, F. M., KULKARNI, A. B., KARLSSON, S. & AKHURST, R. J. 1995. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*, 121, 1845-54.
- DISALVO, J., BAYNE, M. L., CONN, G., KWOK, P. W., TRIVEDI, P. G., SODERMAN, D. D., PALISI, T. M., SULLIVAN, K. A. & THOMAS, K. A. 1995. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor.placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem*, 270, 7717-23.
- DOKE, S. K. & DHAWALE, S. C. 2015. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J*, 23, 223-9.
- DOYLE, M., WEINBERG, N., POHOST, G. M., BAIREY MERZ, C. N., SHAW, L. J., SOPKO, G., FUISZ, A., ROGERS, W. J., WALSH, E. G., JOHNSON, B. D., SHARAF, B. L., PEPINE, C. J., MANKAD, S., REIS, S. E., VIDO, D. A., RAYARAO, G., BITTNER, V., TAUXE, L., OLSON, M. B., KELSEY, S. F. & BIEDERMAN, R. W. 2010. Prognostic value of global MR myocardial perfusion imaging in women with suspected myocardial ischemia and no obstructive coronary disease: results from the NHLBI-sponsored WISE (Women's Ischemia Syndrome Evaluation) study. *JACC Cardiovasc Imaging*, 3, 1030-6.
- FERRARA, N. 1999. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. *Kidney Int*, 56, 794-814.
- FERRARA, N. 2010. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21, 21-6.

- FERRARA, N., GERBER, H. P. & LECOUTER, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9, 669-76.
- FOLKMAN, J. 1984. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest*, 51, 601-4.
- FOLKMAN, J. & HAUDENSCHILD, C. 1980. Angiogenesis by capillary endothelial cells in culture. *Trans Ophthalmol Soc U K*, 100, 346-53.
- FORD, E. S. & CAPEWELL, S. 2007. Coronary heart disease mortality among young adults in the U.S. from 1980 through 2002: concealed leveling of mortality rates. *J Am Coll Cardiol*, 50, 2128-32.
- FURCHT, L. T. 1986. Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors. *Lab Invest*, 55, 505-9.
- GEHRIE, E. R., REYNOLDS, H. R., CHEN, A. Y., NEELON, B. H., ROE, M. T., GIBLER, W. B., OHMAN, E. M., NEWBY, L. K., PETERSON, E. D. & HOCHMAN, J. S. 2009. Characterization and outcomes of women and men with non-ST-segment elevation myocardial infarction and nonobstructive coronary artery disease: results from the Can Rapid Risk Stratification of Unstable Angina Patients Suppress Adverse Outcomes with Early Implementation of the ACC/AHA Guidelines (CRUSADE) quality improvement initiative. *Am Heart J*, 158, 688-94.
- GERBER, H. P., DIXIT, V. & FERRARA, N. 1998. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 273, 13313-6.
- GOSSWALD, A., LANGE, M., KAMTSIURIS, P. & KURTH, B. M. 2012. [DEGS: German Health Interview and Examination Survey for Adults. A nationwide cross-sectional and longitudinal study within the framework of health monitoring conducted by the Robert Koch Institute]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 55, 775-80.
- GÖSSWALD, A., SCHIENKIEWITZ, A., NOWOSSADECK, E. & BUSCH, M. A. 2013. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 56, 650-655.
- GOVINDARAJU, D. R., CUPPLES, L. A., KANNEL, W. B., O'DONNELL, C. J., ATWOOD, L. D., D'AGOSTINO, R. B., FOX, C. S., LARSON, M., LEVY, D., MURABITO, J., VASAN, R. S., SPLANSKY, G. L., WOLF, P. A. & BENJAMIN, E. J. 2008. Genetics of the Framingham Heart Study population. *Adv Genet*, 62, 33-65.
- GRUNEWALD, M., AVRAHAM, I., DOR, Y., BACHAR-LUSTIG, E., ITIN, A., JUNG, S., CHIMENTI, S., LANDSMAN, L., ABRAMOVITCH, R. & KESHET, E. 2006. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, 124, 175-89.
- HAGBERG, C. E., FALKEVALL, A., WANG, X., LARSSON, E., HUUSKO, J., NILSSON, I., VAN MEETEREN, L. A., SAMEN, E., LU, L., VANWILDEMEERSCH, M., KLAR, J., GENOVE, G., PIETRAS, K., STONE-ELANDER, S., CLAESSEON-WELSH, L., YLA-HERTTUALA, S., LINDAHL, P. & ERIKSSON, U. 2010. Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature*, 464, 917-21.
- HAMBURG, N. M. & BENJAMIN, E. J. 2009. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends Cardiovasc Med*, 19, 6-11.
- HEROLD, G. 2013. *Innere Medizin*. 239-253.

- HICKEY, M., HART, R. & KEELAN, J. A. 2014. The Relationship between Umbilical Cord Estrogens and Perinatal Characteristics. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 23, 946-952.
- HOETZER, G. L., MACENEANEY, O. J., IRMIGER, H. M., KEITH, R., VAN GUILDER, G. P., STAUFFER, B. L. & DESOUZA, C. A. 2007. Gender differences in circulating endothelial progenitor cell colony-forming capacity and migratory activity in middle-aged adults. *Am J Cardiol*, 99, 46-8.
- HOOD, J. D. & CHERESH, D. A. 2002. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2, 91-100.
- HSU, S. P. & LEE, W. S. 2020. Effects of female sex hormones on the development of atherosclerosis. *Chin J Physiol*, 63, 256-262.
- HUOT, J., HOULE, F., MARCEAU, F. & LANDRY, J. 1997. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res*, 80, 383-92.
- HURWITZ, H., FEHRENBACHER, L., NOVOTNY, W., CARTWRIGHT, T., HAINSWORTH, J., HEIM, W., BERLIN, J., BARON, A., GRIFFING, S., HOLMGREN, E., FERRARA, N., FYFE, G., ROGERS, B., ROSS, R. & KABBINAVAR, F. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 350, 2335-42.
- HUXLEY, V. H., KEMP, S. S., SCHRAMM, C., SIEVEKING, S., BINGAMAN, S., YU, Y., ZANILETTI, I., STOCKARD, K. & WANG, J. 2018. Sex differences influencing micro- and macrovascular endothelial phenotype in vitro. *J Physiol*, 596, 3929-3949.
- HYNES, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- IDE, T., TSUTSUI, H., OHASHI, N., HAYASHIDANI, S., SUEMATSU, N., TSUCHIHASHI, M., TAMAI, H. & TAKESHITA, A. 2002. Greater oxidative stress in healthy young men compared with premenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22, 438-42.
- ITAKURA, J., ISHIWATA, T., SHEN, B., KORNMANN, M. & KORC, M. 2000. Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 85, 27-34.
- JAFFE, E. A. 1987. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol*, 18, 234-9.
- JOHNSTON, N., SCHENCK-GUSTAFSSON, K. & LAGERQVIST, B. 2011. Are we using cardiovascular medications and coronary angiography appropriately in men and women with chest pain? *Eur Heart J*, 32, 1331-6.
- KHER, A., WANG, M., TSAI, B. M., PITCHER, J. M., GREENBAUM, E. S., NAGY, R. D., PATEL, K. M., WAIRIUKO, G. M., MARKEL, T. A. & MELDRUM, D. R. 2005. Sex differences in the myocardial inflammatory response to acute injury. *Shock*, 23, 1-10.
- KIM, I., KIM, H. G., MOON, S. O., CHAE, S. W., SO, J. N., KOH, K. N., AHN, B. C. & KOH, G. Y. 2000. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res*, 86, 952-9.
- KIMURA, H., WEISZ, A., KURASHIMA, Y., HASHIMOTO, K., OGURA, T., D'ACQUISTO, F., ADDEO, R., MAKUUCHI, M. & ESUMI, H. 2000. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*, 95, 189-97.

- KOCH, S. & CLAEISSON-WELSH, L. 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a006502.
- KROLL, J. & WALTENBERGER, J. 2000. [Regulation of the endothelial function and angiogenesis by vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A)]. *Z Kardiol*, 89, 206-18.
- KYRIAKIDES, Z. S., PETINAKIS, P., KAKLAMANIS, L., LYRAS, T., SBAROUNI, E., KARAYANNAKOS, P., ILIOPOULOS, D. & KREMASTINOS, D. T. 2003. Gender does not influence angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia. *Int J Cardiol*, 92, 83-91.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAMALICE, L., HOULE, F. & HUOT, J. 2006. Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *J Biol Chem*, 281, 34009-20.
- LAMPING, K. G. & NUNO, D. W. 1996. Effects of 17 beta-estradiol on coronary microvascular responses to endothelin-1. *Am J Physiol*, 271, H1117-24.
- LAU, S., GOSSSEN, M., LENDLEIN, A. & JUNG, F. 2021. Venous and Arterial Endothelial Cells from Human Umbilical Cords: Potential Cell Sources for Cardiovascular Research. *Int J Mol Sci*, 22.
- LAUFFENBURGER, D. A. & HORWITZ, A. F. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-69.
- LEAN, M. E., HAN, T. S. & MORRISON, C. E. 1995. Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. *BMJ*, 311, 158-61.
- LEE, J. C., LAYDON, J. T., MCDONNELL, P. C., GALLAGHER, T. F., KUMAR, S., GREEN, D., MCNULTY, D., BLUMENTHAL, M. J., HEYS, J. R., LANDVATTER, S. W. & ET AL. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372, 739-46.
- LEWIS, W. H. 1922. Endothelium in tissue cultures. *American Journal of Anatomy*, 30, 39-59.
- LI, J., XIANG, X., XU, H. & SHI, Y. 2019. Cilostazol Promotes Angiogenesis and Increases Cell Proliferation After Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Through a cAMP-Dependent Mechanism. *Cardiovasc Eng Technol*, 10, 638-647.
- LI, X., TJWA, M., VAN HOVE, I., ENHOLM, B., NEVEN, E., PAAVONEN, K., JELTSCH, M., JUAN, T. D., SIEVERS, R. E., CHORIANOPOULOS, E., WADA, H., VANWILDEMEERSCH, M., NOEL, A., FOIDART, J. M., SPRINGER, M. L., VON DEGENFELD, G., DEWERCHIN, M., BLAU, H. M., ALITALO, K., ERIKSSON, U., CARMELIET, P. & MOONS, L. 2008. Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 1614-20.
- LIBBY, P., RIDKER, P. M. & MASERI, A. 2002. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*, 105, 1135-1143.
- LORENZ, M., BLASCHKE, B., BENN, A., HAMMER, E., WITT, E., KIRWAN, J., FRITSCH-GUENTHER, R., GLOAGUEN, Y., BARTSCH, C., VIETZKE, A., KRAMER, F., KAPPERT, K., BRUNNER, P., NGUYEN, H. G., DREGER, H., STANGL, K., KNAUS, P. & STANGL, V. 2019. Sex-specific metabolic and functional differences in human umbilical vein endothelial cells from twin pairs. *Atherosclerosis*, 291, 99-106.

- LORENZ, M., KOSCHATE, J., KAUFMANN, K., KREYE, C., MERTENS, M., KUEBLER, W. M., BAUMANN, G., GOSSING, G., MARKI, A., ZAKRZEWICZ, A., MIÉVILLE, C., BENN, A., HORBELT, D., WRATIL, P. R., STANGL, K. & STANGL, V. 2015. Does cellular sex matter? Dimorphic transcriptional differences between female and male endothelial cells. *Atherosclerosis*, 240, 61-72.
- LORENZ, M., WESSLER, S., FOLLMANN, E., MICHAELIS, W., DÜSTERHÖFT, T., BAUMANN, G., STANGL, K. & STANGL, V. 2004. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem*, 279, 6190-5.
- LÖWEL H. L. M., KEIL U, HÖRMANN A, BOLTE HD, WILLICH S, GOSTOMZYK J. 1995. Temporal trends in myocardial infarct morbidity, mortality and 28-day fatalities and medical management. Results of the Augsburg Myocardial Infarct Register 1985 to 1992. *Kardiologie*, 84(8), 596-605.
- LUKSHA, L., POSTON, L., GUSTAFSSON, J. A., HULTENBY, K. & KUBLICKIENE, K. 2006. The oestrogen receptor beta contributes to sex related differences in endothelial function of murine small arteries via EDHF. *J Physiol*, 577, 945-55.
- MAISONPIERRE, P. C., SURI, C., JONES, P. F., BARTUNKOVA, S., WIEGAND, S. J., RADZIEJEWSKI, C., COMPTON, D., MCCLAIN, J., ALDRICH, T. H., PAPADOPOULOS, N., DALY, T. J., DAVIS, S., SATO, T. N. & YANCOPOULOS, G. D. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277, 55-60.
- MATSUMOTO, T., BOHMAN, S., DIXELIUS, J., BERGE, T., DIMBERG, A., MAGNUSSON, P., WANG, L., WIKNER, C., QI, J. H., WERNSTEDT, C., WU, J., BRUHEIM, S., MUGISHIMA, H., MUKHOPADHYAY, D., SPURKLAND, A. & CLAESSION-WELSH, L. 2005. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *EMBO J*, 24, 2342-53.
- MATSUMOTO, T. & MUGISHIMA, H. 2006. Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb*, 13, 130-5.
- MAYOR, R. & ETIENNE-MANNEVILLE, S. 2016. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17, 97-109.
- MCCOLL, B. K., BALDWIN, M. E., ROUFAL, S., FREEMAN, C., MORITZ, R. L., SIMPSON, R. J., ALITALO, K., STACKER, S. A. & ACHEN, M. G. 2003. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med*, 198, 863-8.
- MCMACKIN, C. J. & VITA, J. A. 2005. Update on nitric oxide-dependent vasodilation in human subjects. *Methods Enzymol*, 396, 541-53.
- MCMANARA, J. R., CAMPOS, H., ORDOVAS, J. M., PETERSON, J., WILSON, P. W. & SCHAEFER, E. J. 1987. Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis*, 7, 483-90.
- MCSWEENEY, J. C., CODY, M., O'SULLIVAN, P., ELBERSON, K., MOSER, D. K. & GARVIN, B. J. 2003. Women's early warning symptoms of acute myocardial infarction. *Circulation*, 108, 2619-23.
- MEADOWS, K. N., BRYANT, P. & PUMIGLIA, K. 2001. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem*, 276, 49289-98.

- MEDINA-LEYTE, D. J., DOMÍNGUEZ-PÉREZ, M., MERCADO, I., VILLARREAL-MOLINA, M. T. & JACOBO-ALBAVERA, L. 2020. Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. *Applied Sciences*, 10, 938.
- MEJIA-RENTERIA, H. D. & NUNEZ-GIL, I. J. 2016. Takotsubo syndrome: Advances in the understanding and management of an enigmatic stress cardiomyopathy. *World J Cardiol*, 8, 413-24.
- MELANDER, O., MAISEL, A. S., ALMGREN, P., MANJER, J., BELTING, M., HEDBLAD, B., ENGSTROM, G., KILGER, U., NILSSON, P., BERGMANN, A. & ORHO-MELANDER, M. 2012. Plasma proneurotensin and incidence of diabetes, cardiovascular disease, breast cancer, and mortality. *JAMA*, 308, 1469-75.
- MERZ, C. N., KELSEY, S. F., PEPINE, C. J., REICHEK, N., REIS, S. E., ROGERS, W. J., SHARAF, B. L. & SOPKO, G. 1999. The Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study: protocol design, methodology and feasibility report. *J Am Coll Cardiol*, 33, 1453-61.
- MEYER, G. T., MATTHIAS, L. J., NOACK, L., VADAS, M. A. & GAMBLE, J. R. 1997. 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. *Anat Rec*, 249, 327-40.
- MIERES, J. H., SHAW, L. J. & WENGER, N. K. 2014. Noninvasive testing in women with suspected ischemic heart disease: ten highlights to guide quality clinical care. *Clin Cardiol*, 37, 515-6.
- MIHM, S., GALTER, D. & DROGE, W. 1995. Modulation of transcription factor NF kappa B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply. *FASEB J*, 9, 246-52.
- MILLER, A. A., DE SILVA, T. M., JACKMAN, K. A. & SOBEY, C. G. 2007. Effect of gender and sex hormones on vascular oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34, 1037-43.
- MORALES, D. E., MCGOWAN, K. A., GRANT, D. S., MAHESHWARI, S., BHARTIYA, D., CID, M. C., KLEINMAN, H. K. & SCHNAPER, H. W. 1995. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation*, 91, 755-63.
- OKUNRINTEMI, V., TIBUAKUU, M., VIRANI, S. S., SPERLING, L. S., SANTOS VOLGMAN, A., GULATI, M., CHO, L., LEUCKER, T. M., BLUMENTHAL, R. S. & MICHOS, E. D. 2020. Sex Differences in the Age of Diagnosis for Cardiovascular Disease and its Risk Factors among US Adults; Trends from 2008-2017, the Medical Expenditure Panel Survey. *J Am Heart Assoc*, e018764.
- ONAT, D., BRILLON, D., COLOMBO, P. C. & SCHMIDT, A. M. 2011. Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Curr Diab Rep*, 11, 193-202.
- PAKU, S. 1998. Current concepts of tumor-induced angiogenesis. *Pathol Oncol Res*, 4, 62-75.
- PAPAKONSTANTINOOU, N. A., STAMOU, M. I., BAIKOUSSIS, N. G., GOUDEVENOS, J. & APOSTOLAKIS, E. 2013. Sex differentiation with regard to coronary artery disease. *J Cardiol*, 62, 4-11.
- PARK, S. M. & MERZ, C. N. 2016. Women and Ischemic Heart Disease: Recognition, Diagnosis and Management. *Korean Circ J*, 46, 433-42.

- PATENAUDE, A., PARKER, J. & KARSAN, A. 2010. Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization. *Microvasc Res*, 79, 217-23.
- PEPINE, C. J., ANDERSON, R. D., SHARAF, B. L., REIS, S. E., SMITH, K. M., HANDBERG, E. M., JOHNSON, B. D., SOPKO, G. & BAIREY MERZ, C. N. 2010. Coronary microvascular reactivity to adenosine predicts adverse outcome in women evaluated for suspected ischemia results from the National Heart, Lung and Blood Institute WISE (Women's Ischemia Syndrome Evaluation) study. *J Am Coll Cardiol*, 55, 2825-32.
- PETERS, K., TROYER, D., KUMMER, S., KIRKPATRICK, C. J. & RAUTERBERG, J. 2002. Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro. *Microvasc Res*, 64, 334-8.
- PURHONEN, S., PALM, J., ROSSI, D., KASKENPAA, N., RAJANTIE, I., YLAHERTTUALA, S., ALITALO, K., WEISSMAN, I. L. & SALVEN, P. 2008. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 6620-5.
- RAFII, S., AVECILLA, S., SHMELKOV, S., SHIDO, K., TEJADA, R., MOORE, M. A., HEISSIG, B. & HATTORI, K. 2003. Angiogenic factors reconstitute hematopoiesis by recruiting stem cells from bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci*, 996, 49-60.
- REGITZ-ZAGROSEK, V., OERTELT-PRIGIONE, S., PRESCOTT, E., FRANCONI, F., GERDTS, E., FORYST-LUDWIG, A., MAAS, A. H., KAUTZKY-WILLER, A., KNAPPE-WEGNER, D., KINTSCHER, U., LADWIG, K. H., SCHENCK-GUSTAFSSON, K., STANGL, V. & GROUP, E. U. C. C. S. 2016. Gender in cardiovascular diseases: impact on clinical manifestations, management, and outcomes. *Eur Heart J*, 37, 24-34.
- RISAU, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386, 671-4.
- ROHR, U. D., VOLKO, C. D. & SCHINDLER, A. E. 2014. Comparison of steady state development and reduction of menopausal symptoms after oral or transdermal delivery of 17-beta-estradiol in young healthy symptomatic menopausal women. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 18, 123-36.
- ROSS, R. N. 1985. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 314, 488-500.
- SADER, M. A. & CELERMAJER, D. S. 2002. Endothelial function, vascular reactivity and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 53, 597-604.
- SCHÄCHINGER, V. & ZEIHNER, A. M. 2000. Atherosclerosis-associated endothelial dysfunction. *Z Kardiol*, 89 Suppl 9, IX/70-4.
- SCHANNWELL, C. M., SCHOEBEL, F. C., LAZICA, D., MARX, R., PLEHN, G., LESCHKE, M. & STRAUER, B. E. 2000. [Differences in the clinical performance and initial diagnosis in women with suspected coronary artery disease]. *Dtsch Med Wochenschr*, 125, 1417-23.
- SCHEIDT-NAVE, C., KAMTSIURIS, P., GOSSWALD, A., HOLLING, H., LANGE, M., BUSCH, M. A., DAHM, S., DOLLE, R., ELLERT, U., FUCHS, J., HAPKE, U., HEIDEMANN, C., KNOPF, H., LAUSSMANN, D., MENSINK, G. B., NEUHAUSER, H., RICHTER, A., SASS, A. C., ROSARIO, A. S., STOLZENBERG, H., THAMM, M. & KURTH, B. M. 2012. German health interview and examination survey for adults (DEGS) - design, objectives and implementation of the first data collection wave. *BMC Public Health*, 12, 730.

- SCHMIDT-LUCKE, C., ROSSIG, L., FICHTLSCHERER, S., VASA, M., BRITTEN, M., KAMPER, U., DIMMELER, S. & ZEIHNER, A. M. 2005. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*, 111, 2981-7.
- SCOTLAND, R. S., MADHANI, M., CHAUHAN, S., MONCADA, S., ANDRESEN, J., NILSSON, H., HOBBS, A. J. & AHLUWALIA, A. 2005. Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo. *Circulation*, 111, 796-803.
- SENGER, D. R., GALLI, S. J., DVORAK, A. M., PERRUZZI, C. A., HARVEY, V. S. & DVORAK, H. F. 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219, 983-5.
- SHAW, L. J., BAIREY MERZ, C. N., PEPINE, C. J., REIS, S. E., BITTNER, V., KELSEY, S. F., OLSON, M., JOHNSON, B. D., MANKAD, S., SHARAF, B. L., ROGERS, W. J., WESSEL, T. R., ARANT, C. B., POHOST, G. M., LERMAN, A., QUYYUMI, A. A., SOPKO, G. & INVESTIGATORS, W. 2006. Insights from the NHLBI-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) Study: Part I: gender differences in traditional and novel risk factors, symptom evaluation, and gender-optimized diagnostic strategies. *J Am Coll Cardiol*, 47, S4-S20.
- SHIBUYA, M. 2013. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*, 153, 13-9.
- SINHA, S. & YANG, W. 2008. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cell Signal*, 20, 1927-34.
- STARY, H. C., CHANDLER, A. B., DINSMORE, R. E., FUSTER, V., GLAGOV, S., INSULL, W., ROSENFELD, M. E., SCHWARTZ, C. J., WAGNER, W. D. & WISSELER, R. W. 1995. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis: A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15, 1512-1531.
- SUN, Z., LI, X., MASSENA, S., KUTSCHERA, S., PADHAN, N., GUALANDI, L., SUNDVOLD-GJERSTAD, V., GUSTAFSSON, K., CHOY, W. W., ZANG, G., QUACH, M., JANSSON, L., PHILLIPSON, M., ABID, M. R., SPURKLAND, A. & CLAEISSON-WELSH, L. 2012. VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TAd. *J Exp Med*, 209, 1363-77.
- SWAHN, E. 1998. The care of patients with ischaemic heart disease from a gender perspective. *Eur Heart J*, 19, 1758-65.
- TANIDA, I., UENO, T. & KOMINAMI, E. 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*, 445, 77-88.
- TROTTER, A., HILGENDORFF, A., KIPP, M., BEYER, C., KUEPPERS, E., KIOSSIS, E., STUPLICH, J., POHLANDT, F. & THOME, U. 2009. Gender-related effects of prenatal administration of estrogen and progesterone receptor antagonists on VEGF and surfactant-proteins and on alveolarisation in the developing piglet lung. *Early Hum Dev*, 85, 353-9.
- VACCARINO, V., PARSONS, L., EVERY, N. R., BARRON, H. V. & KRUMHOLZ, H. M. 1999. Sex-Based Differences in Early Mortality after Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, 341, 217-225.

- VAN DE BEEK, C., THIJSSSEN, J. H., COHEN-KETTENIS, P. T., VAN GOOZEN, S. H. & BUITELAAR, J. K. 2004. Relationships between sex hormones assessed in amniotic fluid, and maternal and umbilical cord serum: what is the best source of information to investigate the effects of fetal hormonal exposure? *Horm Behav*, 46, 663-9.
- VASA, M., FICHTLSCHERER, S., AICHER, A., ADLER, K., URBICH, C., MARTIN, H., ZEIHNER, A. M. & DIMMELER, S. 2001. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89, E1-7.
- VITA, J. A. & KEANEY, J. F., JR. 2002. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation*, 106, 640-2.
- WANG, S., CAO, W., XING, H., CHEN, Y. L., LI, Q., SHEN, T., JIANG, C. & ZHU, D. 2016. Activation of ERK pathway is required for 15-HETE-induced angiogenesis in human umbilical vascular endothelial cells. *J Recept Signal Transduct Res*, 36, 225-32.
- WANG, X., BARBER, D. A., LEWIS, D. A., MCGREGOR, C. G., SIECK, G. C., FITZPATRICK, L. A. & MILLER, V. M. 1997. Gender and transcriptional regulation of NO synthase and ET-1 in porcine aortic endothelial cells. *Am J Physiol*, 273, H1962-7.
- WENGER, N., SHAW, L. & VACCARINO, V. 2010. Coronary Heart Disease in Women. In: ABRAHAM, D., CLIVE, H., DASHWOOD, M. & COGHLAN, G. (eds.) *Advances in Vascular Medicine*. Springer London.
- WIDLANSKY, M. E., GOKCE, N., KEANEY, J. F., JR. & VITA, J. A. 2003. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 42, 1149-60.
- WITT, E., LORENZ, M., VÖLKER, U., STANGL, K., HAMMER, E. & STANGL, V. 2019. Sex-specific differences in the intracellular proteome of human endothelial cells from dizygotic twins. *J Proteomics*, 201, 48-56.
- ZARUBIN, T. & HAN, J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, 15, 11-8.
- ZHANG, Y. & LINGAPPAN, K. 2017. Differential sex-specific effects of oxygen toxicity in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 486, 431-437.

7.2 Internetquellen

- ANTIBODYSONLINE.COM 2021. VEGF signaling
<https://www.antikoerper-online.de/vegf-signaling-pathway-124/>,
 Stand 07.04.2021.
- MERCK KGaA 2021. Western blot transfer assembly.
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/western-blotting.html>, Stand 07.04.2021.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2013. Studie DEGS1, Erhebung 2008–2011, Vergleich der geschlechtsspezifischen Erkrankungshäufigkeit in Prozent.
https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Chronische_Erkrankungen/HKK/HKK_node.html, Stand 13.02.2019.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (Destatis) 2018. Häufigste Todesursachen 2016.
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>, Stand 14.02.2019.

THEUSCHER, N. 2014. ELISA-Sandwich-Methode.
<https://www.certara.com/2014/07/22/ligand-binding-assays>, Stand 08.02.2019

8 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anne Althoff, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Geschlechtsspezifischer Vergleich VEGF-induzierter Signalwege und angiogeneserelevanter Proteinexpression in weiblichen und männlichen HUVEC“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

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

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

Datum

Unterschrift

9 Lebenslauf

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

10 Danksagung

Zunächst gebührt ein herzlicher Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Stangl für die Vergabe dieses Themas, die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Betreuung dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an PD Dr. Dreger für die fachliche Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung.

Ein großes Dankeschön gilt PD Dr. Lorenz für die laborwissenschaftliche Betreuung und konstruktive Kritik bei der Erstellung der Arbeit.

Für die labortechnische Beratung und liebevolle Zusammenarbeit danke ich herzlich Frau Bartsch und Frau Vietzke.

Von Herzen danke ich meiner Mutter, die mir durch ihre uneingeschränkte Liebe und Unterstützung diesen Lebensweg und damit die Erstellung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Ein besonderer Dank gilt einem Freund und Mentor Dr. Wübbena, der die Fertigstellung dieser Arbeit leider nicht mehr miterleben durfte. Danke für die Motivation und die liebevollen Ratschläge.

Herzlichen Dank,

Anne Althoff