

Aus der Klinik für Neonatologie – Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Vergleichende Untersuchung von VEGF und seinen
Rezeptoren an embryonalen
Gefäßendothelzellkulturen der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Folake Sandra Akanbi

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. M. Obladen

2. Prof. Dr. med. T. Höhn

3. Priv.-Doz. Dr. med. L. Schmitz

Datum der Promotion: 19.03.2010

Für die beste Mutter der Welt

Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch)

Abb.	Abbildung
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleid acid</i> = komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COX	Cyclooxygenase
DA	Ductus arteriosus
EC	Endothelzellen
EP 2, 3, 4	Prostaglandinrezeptoren
FACS	Durchflusszytometrie
FKS	Fötale Kälberserum
HIF-1α	Hypoxie induzierbarer Faktor 1 alpha
mRNA	<i>Messenger ribonucleid acid</i> = Boten-Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDA	Persistierender Ductus arteriosus
SSW	Schwangerschaftswoche
VEGF-R1 bzw.-R2	<i>Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Receptor 1/2</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzellen

1 EINLEITUNG

1.1 Pathophysiologie des persistierenden Ductus arteriosus

1.1.1 Anatomie, Funktion und Verschluss im Rahmen der postnatalen Adaptation	1
1.1.2 Bedeutung des PDA beim Frühgeborenen	6
1.1.3 Medikamentöser Verschluss- Indometacin.....	7
1.1.4 Medikamentöser Verschluss- Ibuprofen.....	7

1.2 Funktion von VEGF und seinen Rezeptoren

1.2.1 Aufbau, Lokalisation und Regulation von VEGF	8
1.2.2 Aufbau, Lokalisation und Regulation der VEGF Rezeptoren	10
1.2.3 Bedeutung von VEGF und seinen Rezeptoren für den Verschluss des DA.....	11

1.3 Fragestellung.....	12
-------------------------------	-----------

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Chemikalien.....	13
2.1.2 Material.....	16
2.1.3 Geräte.....	17

2.2 Tiertötung und Gewebeentnahme.....	18
---	-----------

2.3 Endothelzellen-Isolierung	20
--	-----------

2.4 Zellseparation und Zellkultur	20
--	-----------

2.4.1 Endothelzellen-Aufreinigung	21
---	----

2.4.2 Endothelzellkulturen.....	22
---------------------------------	----

2.5 Analyse der Reinheit der Zellkulturen (Durchflusszytometrie)	22
---	-----------

2.6 Zellvitalitäts und –zytotoxizitätsmessung

2.6.1 Vitalitätsassay	25
-----------------------------	----

2.6.2 Zytotoxizitätsuntersuchung (Lactatdehydrogenase-Messung) ...	25
--	----

2.7 Zellernte und RNA-Gewinnung.....	26
---	-----------

2.8 Reverse Transkription (cDNA Synthese)	27
--	-----------

2.9 Real-Time-PCR	27
--------------------------------	-----------

2.10 Versuchskonditionen.....	29
--------------------------------------	-----------

2.11 VEGF ELISA	30
2.13 Immunhistochemie (Gefrierschnitte).....	31
2.14 Statistik.....	32
3 ERGEBNISSE	
3.1 Reinheitsnachweis	
3.1.1 FACS– Messung.....	33
3.2 Zellvitalität und –zytotoxizität	
3.2.1 Vitalitätsassay	34
3.2.2 Zytotoxizitätsmessung	37
3.3 Immunhistochemischer Nachweis von VEGF und seinen Rezeptoren	38
3.4 <i>Real-Time-PCR</i>	
3.4.1 β -Actin	39
3.4.2 PCR Sonden.....	39
3.4.3 Expression von VEGF und seinen Rezeptoren	
3.4.3.1 Einfluss von Ibuprofen.....	41
3.4.3.2 Einfluss von Indometacin	41
3.4.3.3 Einfluss von PMA.....	42
3.4.3.4 Einfluss von Normoxie und Hypoxie.....	44
3.4.3.5 Vergleich zwischen DA und Aorta	44
3.4.3.6 Zeitkinetik	47
3.5 VEGF ELISA	47
4 DISKUSSION	
4.1 Ergebnisdiskussion.....	50
4.2 Diskussion der Methodik	59
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	63
6 LITERATURVERZEICHNIS	
7 ABBILDUNGS-UND TABELLENVERZEICHNIS	
8 ANHANG	
Danksagung, Lebenslauf, Eidesstattliche Erklärung	

1. Einleitung

1.1 Pathophysiologie des persistierenden Ductus arteriosus

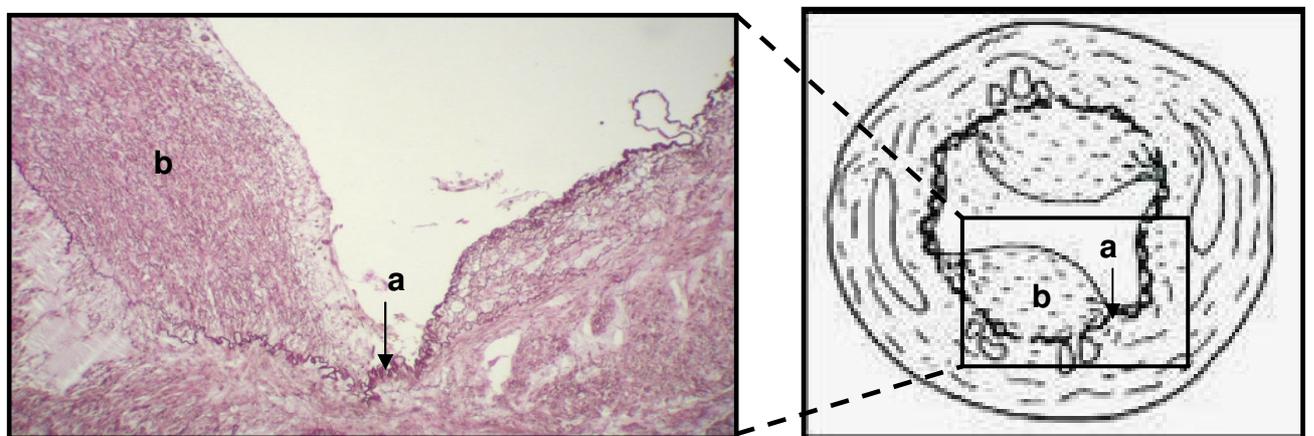
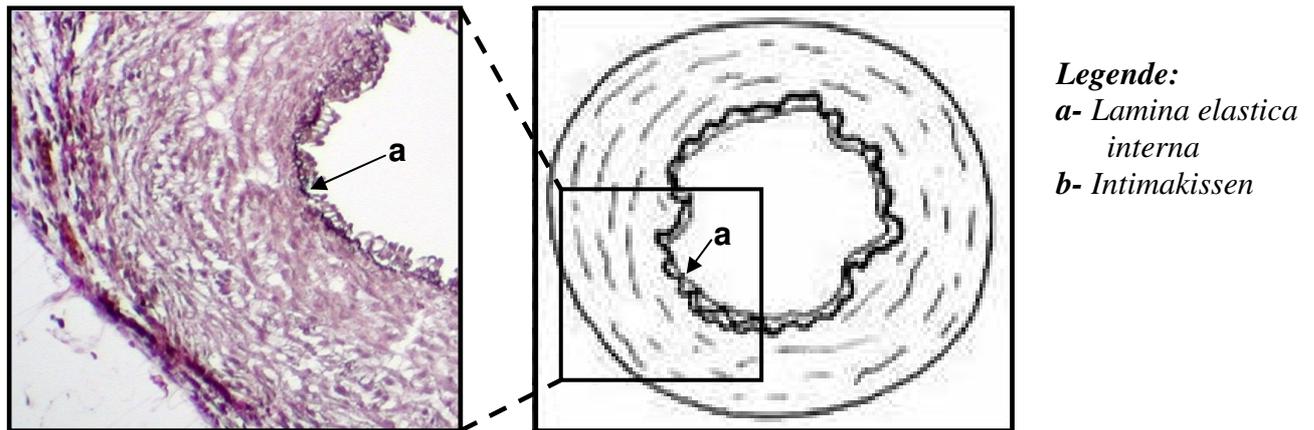
1.1.1 Anatomie, Funktion und Verschluss im Rahmen der postnatalen Adaptation

Anatomie und Funktion - Der Ductus arteriosus (DA) ist eine fetale Gefäßverbindung zwischen dem Pulmonalarterienstamm und dem absteigenden Teil des Aortenbogens. Der DA geht aus dem linken sechsten Ast des Aortenbogens hervor und unterscheidet sich in seiner embryonalen Entwicklung von den anderen Aortenbögenästen. Bereits seine frühe Entwicklung ist genetisch anders programmiert als die der ihn umgebenden elastischen großen Arterien, auch wenn dies histologisch noch nicht zu erkennen ist (Colbert et al., 1996). So orientiert sich der Aufbau des DA überwiegend am Typ einer muskulären Arterie, besitzt aber auch Eigenschaften von elastischen Arterien. Wie diese weist er am Ende des zweiten Trimenons der Schwangerschaft eine prominente stellenweise zweischichtige elastische Lamina interna auf, die von einer dünnen Intima ausgekleidet wird. Daran schließt sich die gut ausgebildete, aus gegenläufig und spiralförmig angeordneten Glattmuskelfasern bestehende, Media an. Benachbarte große Thoraxgefäße wie z.B. die Aorta besitzen eine dicke Intima und eine unscharf abgegrenzte, mit elastischen Membranen durchzogene, Media. Die Besonderheit des DA ist der vorprogrammierte Umbau des Gefäßes, der bereits im Verlauf der Schwangerschaft in Vorbereitung auf seinen Verschluss nach der Geburt, einsetzt. Postnatal ist der Verschluss des DA für das nun selbstständig atmende Neugeborene ebenso wichtig wie sein Offenbleiben in utero. Der DA leitet im fetalen Blutkreislauf unter Umgehung der Lunge das in der Plazenta mit Sauerstoff angereicherte Blut direkt vom rechten Herzen in den großen Kreislauf. Im Kreislauf des Fetus fließt ein Drittel des Herzzeitvolumens über das Foramen ovale vom rechten in den linken Vorhof, um anschließend über die Aorta ascendens einen großen Teil der zerebralen Versorgung zu übernehmen. Von den zwei Dritteln des Herzzeitvolumens, die in den Truncus pulmonalis ausgeworfen werden, gelangen lediglich 8% in die Lunge. Der überwiegende Teil des Blutvolumens wird über den DA in die Aorta geleitet, die zu diesem Zeitpunkt den gleichen Gefäßdruck wie der Pulmonalarterienstamm aufweist. Im Gegensatz dazu zeichnet sich der restliche Pulmonalkreislauf durch einen hohen Gefäßwiderstand aus. Im absteigenden Teil des Aortenbogens mischt sich das sauerstoffarme mit dem sauerstoffreichen Blut und versorgt über den großen Kreislauf den Rest des fetalen Körpers.

Verschluss- Der Verschluss des DA verläuft nach der Geburt in zwei Phasen. Auf die initiale Phase des so genannten funktionellen Verschlusses folgt der dauerhafte anatomische Umbau, der zur Ligamentation des DA führt. Die postnatale Adaptation beginnt mit dem plötzlichen Wegfall der Plazentazirkulation. Dies bewirkt einen Anstieg des systemischen Gefäßwiderstands, einen Wegfall der placentaren Prostaglandinproduktion und einen Anstieg des CO₂-Partialdruckes im Blut des Neugeborenen. Letzterer stellt einen Reiz für das kindliche Atemzentrum dar, so dass es zur Lungenentfaltung, Einsatz der Atembewegungen und somit zur Oxygenierung des Blutes kommt. Der in Folge dessen steigende Sauerstoffpartialdruck löst eine Erweiterung beider Pulmonalarterien aus und führt zu einem Abfall des Widerstands im Lungengefäßbett. Erstmals ist nun der systemische Gefäßwiderstand höher als der des Pulmonalkreislaufs, so dass der Rechts-Links-Shunt am Herzen über das Foramen ovale beendet wird.

In Vorbereitung auf den Verschluss nach der Geburt zeigen sich bereits ab dem zweiten Trimenon der Schwangerschaft morphologische Veränderungen der Ductusarchitektur. Im Rahmen seines Reifungsprozesses (Abbildung 1) kommt es zu einer Fragmentierung der Lamina elastica interna und Herauslösung der Endothelien aus ihrem Verband. Gleichzeitig bilden sich neointimale Kissen aus, die eine zunehmende Verdickung der innersten Gefäßschicht bewirken (Hornblad 1969, Gittenberger-de Groot et al., 1985). Diese Kissen entstehen durch Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima und durch Proliferation von luminalen Endothelien.

Makroskopisches Bild eines unreifen DA ohne Intimakissen



DA im fortgeschrittenen Reifestadium mit deutlich ausgebildeten Intimakissen

Abb. 1: Darstellung des morphologischen Umbauprozesses des DA mit Bildung neointimaler Kissen

Der endgültige Duktusverschluss ist nun vor allem eine Interaktion zwischen lokal gebildeten und zirkulierenden Faktoren (Abbildung 2) sowie der einzigartigen Duktusstruktur (Van Overmeire und Chemtob 2005). Die wichtigsten Faktoren in der Phase des funktionellen Duktusverschlusses sind der steigende Sauerstoffpartialdruck und die sinkende Prostaglandinkonzentration. Entscheidend für das Absinken zirkulierender Prostaglandinspiegel ist neben dem Wegfall der plazentaren Durchblutung (Thorburn 1992) auch die erhöhte Clearance in der nun durchbluteten neonatalen Lunge (Clyman 2006). Unter den verschiedenen bekannten Prostaglandinen ist PGE_2 als der wichtigste Mediator für die DA Relaxation identifiziert worden (Clyman et al., 1978). Der foetale DA exprimiert die Prostaglandin E_2 -Rezeptoren EP2, EP3 und EP4. Von den Prostaglandinrezeptoren wird der EP4 Rezeptor im dritten Trimenon der Schwangerschaft am stärksten im DA exprimiert (Rheinlaender et al.,

2006). Weitere wichtige Einflussfaktoren, die eine Ductusdilataion bewirken, sind Stickstoffmonoxid und der im Blutgefäß herrschende Druck. Im Gegensatz dazu sorgen Endothelin-1 (ET-1), Kalzium (Ca) und ein steigender Sauerstoffpartialdruck für eine Gefäßkontraktion (Kajino et al. 2001, Coceani et al. 1999).

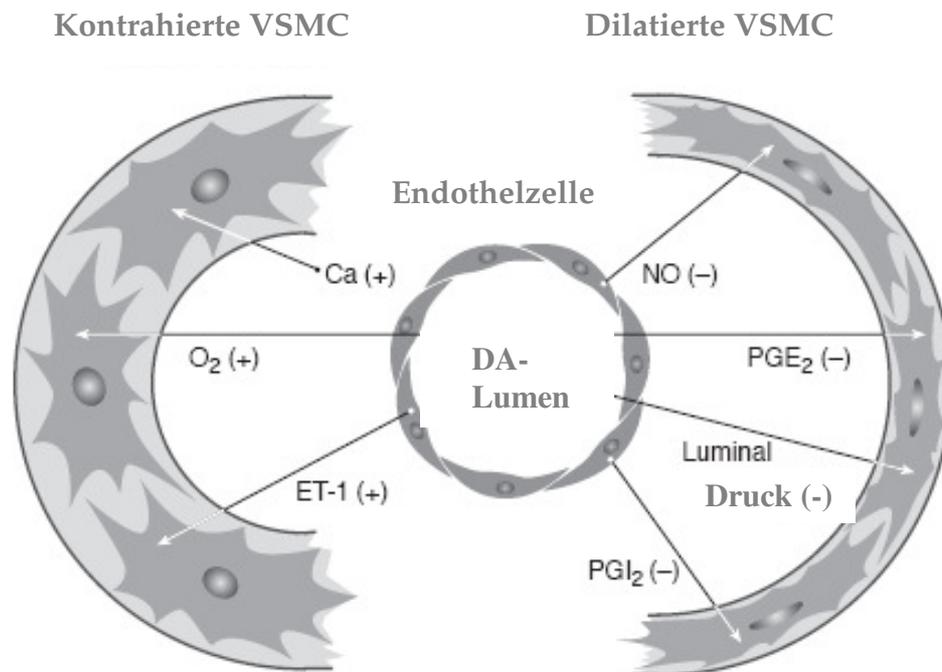


Abb. 2: Faktoren, die den funktionellen Ductusverschluss beeinflussen

Synergistisch bewirken der Wegfall des Prostaglandins und die steigende Sauerstoffkonzentration eine Kontraktion der medialen glatten Muskelzellen und somit den funktionellen Ductusverschluss innerhalb von 10-15h nach der Geburt. Durch den erhöhten Sauerstoffpartialdruck resultiert eine Membrandepolarisation in vaskulären glatten Muskelzellen, die intrazelluläres Kalzium frei setzen. Zeitgleich werden Kaliumkanäle gehemmt und Endothelin-1 freigesetzt (Nakanishi et al.1993). Durch die Kontraktion glatter Muskelzellen resultiert eine ischämische Hypoxie in den Zellen der Ductuswand, die nun nicht mehr ausreichend durch die ebenfalls kontrahierten Vasa vasorum mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Infolge dessen breitet sich die innere avaskuläre Zone des DA (ca. 400-500µm) auf nahezu die gesamte Gefäßwand (ca. >500µm) aus und kann nicht mehr durch Diffusion aus dem Lumen überbrückt werden. Die resultierende anhaltende Hypoxie ist der entscheidende Auslöser für die zweite Phase des anatomischen Gefäßumbaus (Clyman et al. 1999). In dieser Phase kommt es einerseits zur verstärkten Sekretion von VEGF, *Transforming Growth Factor*

(TGF) und anderen pro-angiogenen Mediatoren, die einen Umbau des Gefäßes unterstützen und andererseits zur Hemmung der lokalen Produktion von PGE₂ und NO (Momma, Toyono, 1999). Die unterversorgten Glattmuskelzellen (VSMC) werden apoptotisch und nekrotisch, die ausgeschütteten Wachstumsfaktoren induzieren eine Dedifferenzierung und Proliferation der VSMC. Die okklusive Phase mündet 2-3 Wochen postnatal in der kompletten Ligamentation des DA, dem Ligamentum arteriosum.

Zwischen Reif- und Frühgeborenen existieren im Verlauf dieses Umbauprozesses mehrere Unterschiede. Frühgeborene weisen sowohl in der funktionellen als auch in der okklusiven Phase des Ductusverschlusses Defizite auf, die bei 60% der Frühgeborenen zu einem verzögerten oder unvollständigen Verschluss des DA führen (Gersony 1983). So breitet sich bei Reifgeborenen die avaskuläre Zone bereits zu einem Zeitpunkt über die gesamte Gefäßwand aus, zu dem das Lumen noch nicht vollständig geschlossen ist (Levin et al., 2005). Dagegen ist die Wand des DA Frühgeborener von Anfang an dünner; ca. 200µm in der 24. Gestationswoche (Hermes-DeSantis et al., 2006) und wird direkt durch Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff aus dem Lumen versorgt. Der unreife DA erreicht daher bei Kontraktion der glatten Muskelzellen nicht den gleichen Hypoxiegrad wie der reife DA, sondern erst wenn das gesamte Lumen geschlossen ist. Es zeigt sich außerdem, dass die Ductuskonstriktion bei Frühgeborenen meist ineffektiv bleibt, weil das Gefäß einen schwächeren intrinsischen Tonus aufweist und auch nach der Geburt noch sensitiver auf PGE₂ reagiert (Seidner 2001). Zusätzlich reagiert der DA Frühgeborener bei nicht ausreichender Konstriktion mit einer Hochregulierung der Expression der NO-Synthetase wodurch es zu einer gesteigerten Produktion von Stickstoffmonoxid kommt, welches wiederum einer Gefäßkontraktion entgegen wirkt (Momma, Toyono, 1999). Weitere Unterschiede zum reifen Neugeborenen sind eine höhere Glukosekonzentration im Gewebe unter Hypoxie und die schwächer auf den Sauerstoffanstieg nach Geburt reagierenden glatten Muskelzellen (Levin et al., 2006). Außerdem verliert der DA von Frühgeborenen nach Stimulation durch Sauerstoff schneller die Fähigkeit zur anhaltenden Kontraktion (Clyman et al., 1978). Insgesamt erklären die hier beschriebenen Unterschiede während des Ductusverschlusses; geringere Kontraktilität, geringerer Grad an Hypoxie und eine höhere Hypoxietoleranz, die klinisch bei Frühgeborenen im Gegensatz zu Reifgeborenen beobachtete höhere Inzidenz eines PDA.

1.1.2 Bedeutung des PDA beim Frühgeborenen

Der PDA ist der dritthäufigste angeborene Herzfehler (Hoffmann et al., 2002). Er ist auf eine primäre kongenitale Malformation der Ductuswand zurück zu führen und wird als eine drei Monate nach der Geburt noch bestehende Gefäßverbindung definiert. Davon abzugrenzen ist der offene DA, der bei Frühgeborenen in Folge einer Unreife der funktionellen oder anatomischen Verschlussmechanismen auftritt. Im klinischen Gebrauch spricht man von einem PDA, wenn der DA 72 Stunden nach der Geburt noch nachweisbar ist. Die Diagnose sollte bei entsprechender Symptomatik anhand einer Doppler- bzw. Echokardiographie verifiziert werden. Die Inzidenz des PDA beträgt bei sehr unreifen Frühgeborenen (<28 Wochen Gestationsalter, GA) etwa 60%. Aufgrund eines Surfactantmangels entwickeln Frühgeborene häufig ein Atemnotsyndrom (RDS), das in seiner akuten Phase einen hohen pulmonalen Gefäßwiderstand bewirkt. In dieser Situation entsteht über den DA ein bidirektionaler, selten auch ein Rechts-Links-Shunt zwischen pulmonaler und systemischer Zirkulation (Amorim et al., 1999). Mit Rückbildung des Atemnotsyndroms sinkt der pulmonale Gefäßwiderstand und es entwickelt sich aufgrund des höheren systemischen Drucks in der Aorta ein Links-Rechts-Shunt über den DA. Ab einem Shuntvolumens >50% des linksventrikulären Auswurfs sinkt der Systemdruck. Die Folge ist eine beeinträchtigte Durchblutung nach geschalteter Organe. Das so genannte „ductal steal“ Phänomen betrifft hauptsächlich das Absinken des diastolischen Druckes. Ist die Perfusion der mesenterialen Gefäße betroffen, erhöht sich aufgrund der intestinalen Ischämie die Gefahr einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) (van de Bor et al., 1988, Cassady et al., 1989). Auf ähnliche Weise führen schwankende mittlere zerebrale arterielle Blutdrücke zu intraventrikulären Haemorrhagien (IVH) (Kluckow 2000, Osborn 2003) und zu einer renalen Minderdurchblutung mit Oligo- bzw. Anurie (Hammerman 1995). Bei weit offenem PDA ist die Lunge dem systemischen Blutdruck sowie einem erhöhten Blutfluss ausgesetzt. Kompensatorisch nimmt der Lymphabfluss der Lunge zu. Nach einigen Tagen wird dieser Mechanismus überlastet und es kann ein Lungenödem resultieren (Clyman, 2006). Der bei Frühgeborenen herrschende niedrige onkotische Druck im Plasma und die erhöhte kapilläre Permeabilität begünstigen diese Entwicklung zusätzlich. Folgen sind eine akute kardiale Insuffizienz mit Beatmungsnotwendigkeit, Erhöhung der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration und resultierende chronische Lungenschädigung (Bronchopulmonale Dysplasie) (Alpan 1989, Kluckow 2000, Rojas, 1995). Frühgeborene sind nicht in der Lage Ödeme adäquat zu resorbieren, so dass das alveoläre Wachstum gestört wird, wodurch es zu einer Verringerung der Alveolaroberfläche kommen kann. Dies erklärt zum Teil auch die

Korrelation mit Pneumonien und anderen entzündlichen Prozessen. Das Ausbleiben des Ductusverschlusses ist mit einem sehr unreifen Lungenstatus, einem schweren Atemnotsyndrom (Thibeault et al., 1975) sowie einer aggressiveren Beatmung assoziiert (Van de Bor 1988, Clyman 1998). Der PDA führt zu einer längeren Beatmungsabhängigkeit, längeren Hospitalisationsdauer und höheren Kosten.

1.1.3 Medikamentöser Verschluss- Indometacin

Seit den 70er Jahren wird der COX-Hemmer Indometacin zur Behandlung des PDA eingesetzt (Friedman 1976, Heymann 1976) und war für diese Indikation bis Ende der 90er Jahre das Medikament der ersten Wahl (Gersony 1983). Der Einsatz dieses Medikamentes basiert auf der Annahme, dass die Prostaglandine hauptverantwortlich für die Persistenz des DA sind. Als ein nichtsteroidales Antiphlogistikum (NSAID) und nicht-selektiver Inhibitor der Cyclooxygenasen (COX) 1 und 2 hemmt es die Prostaglandinsynthese. Nebenwirkungen der Behandlung sind eine Verminderung des zerebralen, mesenterialen und renalen Blutflusses mit Reduktion der zerebralen intrazellulären Oxygenierung (Edwards et al., 1990, McCormick et al., 1993), gastrointestinale Blutungen (Rennie 1986) oder Beeinträchtigungen der Nierenfunktion (Betkerur et al., 1981, van Bel et al., 1991). In zahlreichen prospektiv randomisierten Studien und Metaanalysen wurde die Effektivität von Indometacin bei der Behandlung des PDA belegt (Friedman 1976, Heymann 1976, Gersony 1983, Fowlie 2002, Ohlsson 2003).

In 70-90% der Fälle sprechen Neugeborene auf eine Indometacinbehandlung an (Gersony 1983, Osborn 2003), wobei bei Frühgeborenen mit einem GA <26 SSW die Effizienz unter 60% sinkt und die Gefahr der Wiedereröffnung des DA auf >20% steigt (Van Overmeire et al., 2005).

1.1.4 Medikamentöser Verschluss- Ibuprofen

Schon seit den 70er Jahren wurden aufgrund des Nebenwirkungsprofils von Indometacin experimentelle Untersuchungen mit alternativen COX-Inhibitoren durchgeführt (Coceani 1979). Ibuprofen wird seit 1995 in klinischen Studien zum medikamentösen Ductusverschluss eingesetzt (Mosca 1997, Patel 1995, Van Overmeire 2003). Es übt seinen pharmakologischen Effekt ebenso wie Indometacin durch die nicht-selektive Hemmung der Cyclooxygenasen aus. Allerdings ist die unterschiedlich stark ausgeprägte COX-1 und COX-2 Wirkung die Hauptursache für die pharmakologischen Unterschiede zwischen beiden COX-Hemmern (Van Overmeire 1997). Zudem bestehen Unterschiede bezüglich der Ausprägung ihrer antiinflammatorischen und antiproliferativen Eigenschaften (Malcolm, 1993). Ibuprofen hat eine

vergleichbare Effektivität wie Indometacin, führt im Gegensatz dazu aber nicht zu relevanten Einschränkungen der zerebralen, renalen und mesenterialen Perfusion (Chemtob 1991, Mosca 1997, Pezzati, 1999, De Carolis 2000, Patel 2000).

1.2 Funktion von VEGF und seinen Rezeptoren

1.2.1 Aufbau, Lokalisation und Regulation von VEGF

VEGF wurde erstmals 1983 (Senger et al., 1983) als *vascular permeability factor* identifiziert. Hinter dieser Bezeichnung verbirgt sich ein Heparin- bindendes homodimeres Glycoprotein von 45 Kilo Dalton. Das kodierende Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 6p21.3 (Vincenti et al.1996) und besteht aus 8 Exons getrennt durch 7 Introns. Produziert wird VEGF von Makrophagen, aktivierten T-Zellen, Glattmuskelzellen, aber auch Endothelien, wobei die Genexpression hauptsächlich sauerstoffabhängig über den durch Hypoxie oder Ischämie induzierbaren Faktor 1 (HIF-1) reguliert wird. Unter Hypoxie ist die Untereinheit HIF-1 alpha vor der Degradation durch die sauerstoffabhängige HIF-1 alpha-Hydroxylase geschützt und dimerisiert mit der Untereinheit HIF-1 beta zum Protein HIF-1. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 bindet im Zellkern an das Hypoxie responsive Element (HRE) im VEGF-Promotor, woraus eine vermehrte Transkription von VEGF resultiert (Ikeda et al. 1995). Neben Hypoxie können auch andere Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Östrogen und NO die Genexpression beeinflussen (Shweiki 1992, Plate 1997).

Die Bezeichnung VEGF charakterisiert eine Gruppe von homologen Proteinen, die man inzwischen als VEGF-A, -B, -C, -D, -E, PlGF (*Placenta derived Growth Factor*, Persico et al. 1999) und svVEGF (*snake venom VEGF*) kennt. VEGF-B ist in vielen Geweben lokalisiert, vor allem in der Skelettmuskulatur und im Herzen, für dessen Entwicklung es große Bedeutung hat (Olofsson et al. 1996). Das VEGF-C ist als parakriner Faktor ähnlich wie das VEGF-D essentiell für die Lymphangiogenese (Kukk et al. 1996). VEGF-D wirkt zudem chemotaktisch und proliferativ auf verschiedene monozytäre Zellen wie Makrophagen oder Chondroklasten in der Wachstumsfuge. VEGF-E ist bisher nur soweit klassifiziert worden, dass es als Kollektiv von Proteinen, die homolog zu VEGF-A sind, ein hohes angiogenetisches Potential besitzt und durch einen Virus kodiert wird. PlGF schließlich ist überwiegend in der Plazenta aber auch im Herzen, der Lunge, der Schilddrüse oder der Skelettmuskulatur zu finden und weist mehrere Isotypen auf (Maglione et al. 1991). Besonders hervorzuheben ist das VEGF-A, von welchem bisher neun verschiedene Subtypen bekannt sind. Diese entstehen aufgrund unterschiedlichen Gensplittings, bei dem die An- bzw. Abwesenheit der Sequenzen durch Exon 6 und 7 kodiert werden (Tischer

et al. 1991). Benannt nach der Länge ihrer Aminosäureketten, sind heute VEGF 121, 145, 148, 162, 165, 183, 189 und 206 bekannt. VEGF 165 ist zusammen mit dem VEGF 121 und 189 das potenteste und am häufigsten exprimierte VEGF Protein (Robinson et al., 2001). Es besitzt einen zusätzlichen Subtyp, das VEGF 165b, das als endogene Form hemmend auf VEGF 165 wirkt (Bates et al., 2002). Im Gegensatz zu den humanen Splicevarianten des VEGF-A sind diese bei Mäusen und Ratten jeweils um eine Aminosäure kürzer (Breier et al., 1992). VEGF ist ein starkes Mitogen speziell für mikro- und makrovaskuläre Endothelzellen (EC) und fungiert daher als Überlebensfaktor für Endothelien (Ferrara et al., 2003). Es sorgt für die Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen und Proliferation sowie Migration im Rahmen der Angiogenese und Vaskulogenese (Carmeliet et al., 1999). Es ist essentiell für die gesamte Embryonalentwicklung, weshalb es auch bereits wenige Tage nach der Implantation in den Trophoblasten nachgewiesen werden kann (Muller et al., 2006). Außerdem vermittelt VEGF morphologische Veränderungen des Endothelzellverbandes wie Fenestrierung und Kanalbildung mit der Folge einer erhöhten Gefäßpermeabilität (Neufeld et al. 1999). Es regt die Produktion und Sekretion von gerinnungsfördernden Mediatoren (vWF, Gewebsthorboplastin) an, vermittelt dem Endothel vasokonstriktorisches, durch Produktion von Endothelin-1 und vasodilatatorische Einflüsse in Folge der Freisetzung von NO (Kroll et al. 1999). Darüber hinaus induziert VEGF Zelladhäsionsmoleküle, wirkt chemotaktisch auf Monozyten, beeinflusst die Expression von Plasminogen-Aktivatoren und stimuliert den Hexose-Transport (Ferrara et al., 2001). VEGF wird am stärksten im Rahmen der Embryonalentwicklung exprimiert, wo es über die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle die Zellmigration und -kommunikation ebenso fördert, wie die geregelte Bildung von Blutgefäßen, Endotheldifferenzierung und Organformation. Beim Erwachsenen tritt VEGF dagegen nur im Rahmen des regelmäßig wiederkehrenden weiblichen Zyklus auf und ist ansonsten bei pathologischen Prozessen erhöht. Diese Prozesse können Entzündungen oder auch Tumorerkrankungen sein, bei denen die Expression von VEGF teilweise mit der Malignität und dem Ausmaß der Gefäßneubildung korreliert. Diese vielfältigen Eigenschaften des VEGF werden über verschiedene Rezeptoren vermittelt (Abb.3).

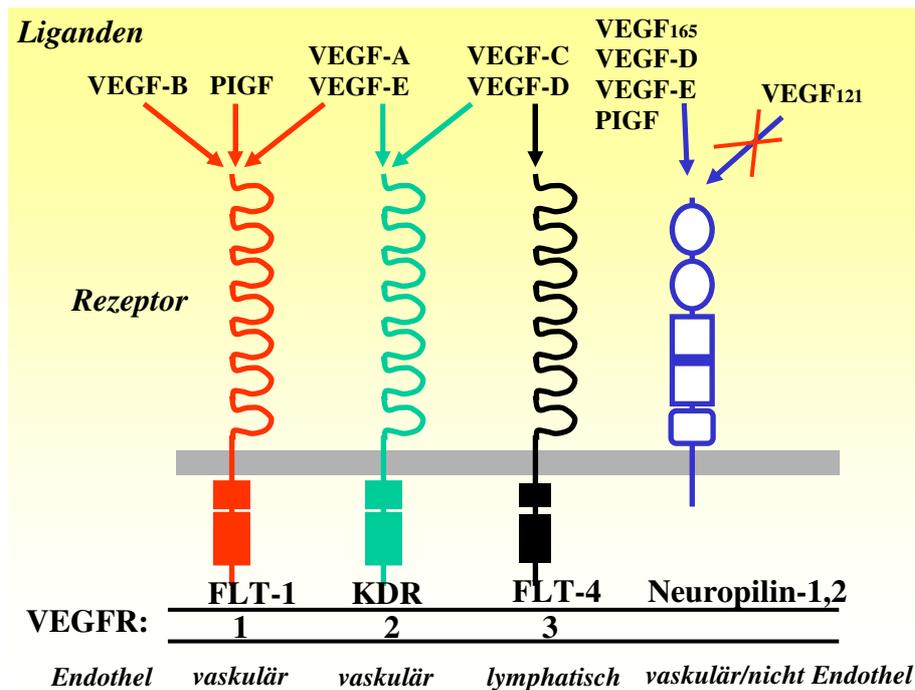


Abb. 3: Rezeptoren des VEGF, ihre Liganden und ihre Lokalisation im Gewebe

1.2.2 Aufbau, Lokalisation und Regulation der VEGF Rezeptoren

VEGF-R1(= Flt-1, *fms-like tyrosine kinase*), ein ca. 180 Kilo Dalton transmembranöses Glykoprotein, ist auf vaskulären Endothelien, Makrophagen, Monozyten (Barleon et al., 1996) und hämatopoetischen Stammzellen lokalisiert und bindet vor allem VEGF-A, -B und PlGF. In der frühen Entwicklung wirkt er limitierend auf das Gefäßwachstum, indem er die Wirkung seines Liganden hemmt (Takahashi et al., 2005). Diese Funktion wird durch schwache Autophosphorylierung des aktiv vorliegenden Teils von VEGF vermittelt, welcher damit keine Bindung mehr zum VEGF-R2 eingehen kann (sog. *Decoy* Rezeptor, Park et al. 1994). Er vermittelt eine Migration von Monozyten und Makrophagen durch Rekrutierung von hämatopoetischen Stammzellen.

Der VEGF-R2 (=KDR, *kinase insert domain containing receptor*) mit 200-230 Kilo Dalton, bindet alle Splicevarianten des VEGF-A. Er gehört zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren, besitzt sieben Immunoglobulin-ähnliche extrazelluläre Domänen, einen membrandurchspannenden hydrophoben Anteil und eine Tyrosinkinase-Sequenz, die eine Kinase-Bindungsstelle enthält (Houck et al., 1992). Der Rezeptor ist vor allem auf Endothelien, aber auch auf hämatopoetischen Stammzellen (Kato et al. 1995) nachweisbar. Er ist der wichtigste positive Regulator von Proliferation und Differenzierung der Endothelien, vermittelt

Mitogenese, Angiogenese und Permeabilitätserhöhung und seine Aktivierung ist bedeutend für den antiapoptotischen Effekt von VEGF auf das Endothel der Nabelschnur (Gerber et al. 1998, Tran et al. 1999). Bei seiner Aktivierung kommt es zur Phosphorylierung und Hochregulierung der NO-Synthetase, zur Produktion von zyklischem Guanidyl Monophosphat (cGMP) und zur Expression des VEGF-Rezeptor-Gens, so dass die zelluläre VEGF-R2 Konzentration gesteigert wird (Shen et al., 1999). Am Rezeptor 2 kommt es außerdem im Rahmen der Angiogenese zur Interaktion mit Korezeptoren, den so genannten Neuropilinen, die wichtig für die neuronale Aussprossung während der Neurogenese sind. Neuropilin-1 wird mit dem Rezeptor 2 koexprimiert und verstärkt die Bindung von VEGF 165 zum Rezeptor.

Die beiden VEGF Rezeptoren, R1 und R2, weisen strukturelle Homologien auf, 44% der Aminosäuresequenzen sind identisch. EC sind der einzige bekannte Zelltyp, der beide Rezeptoren exprimiert. Der Rezeptor 1 besitzt eine 10-fach höhere Affinität gegenüber VEGF als der Rezeptor 2, aber eine geringere Tyrosinkinase-Aktivität.

Der VEGF Rezeptor 3 (Flt-4, *fms-like tyrosine kinase*) bindet ausschließlich VEGF-C und -D. Seine Aufgabe besteht in der Vermittlung der Lymphangiogenese und dem Schutz lymphatischer Zellen vor Apoptose. Alle Rezeptoren werden durch VEGF selbst, durch verschiedene Zytokine und vor allem sauerstoffabhängig reguliert.

1.2.3 Bedeutung von VEGF und seinen Rezeptoren für den Verschluss des DA

VEGF ist ein entscheidender Mediator für den Gefäßumbau in der zweiten Phase des Duktusverschlusses. Infolge der durch Duktuskonstriktion entstandenen Hypoxie kommt es zur Ausschüttung von VEGF, Zytokinen und anderen Wachstumsfaktoren. VEGF bewirkt durch Proliferation und Permeabilitätsänderung der Endothelien die neointimale Hyperplasie und reguliert die Einsprossung der Vasa vasorum (Seidner et al., 2001). Wird die VEGF-Wirkung gehemmt, ist eine geringere Einsprossung der Vasa vasorum, ein Abfall der Endothelzellproliferation und -akkumulation in der Neointima zu verzeichnen (Clyman et al. 2002). Ohne die Wirkung des VEGFs auf den DA ist kein vollständiger Umbau zum Ligamentum arteriosum möglich. Eine weitere typische Erkrankung sehr unreifer Frühgeborener ist die Frühgeborenenretinopathie (ROP), bei deren Entstehung der Wachstumsfaktor VEGF ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt. In der ersten Phase nach der Geburt herrscht in der Retina ein relatives Sauerstoffüberangebot, das an der unreifen, unvollständig vaskularisierten Retina zur Vasoobliteration und Gefäßverlust führt. Die daraus resultierende Ischämie und Hypoxie führt im Verlauf u.a. zur Ausschüttung von VEGF, welches in der zweiten Phase der

Retinopathieentstehung eine pathologische Neovaskularisation bewirkt. Diese Mechanismen können bis hin zu einer Retinaablösung mit nachfolgender Erblindung des Auges führen. Die vulnerable Phase der Retinopathieentstehung und der Zeitpunkt einer medikamentösen Ductusintervention überschneiden sich häufig. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Studien an der Retina neugeborener Ratten zeigen, dass hohe Dosen von Ibuprofen (50mg/kg KG am Tag 1, gefolgt von 25mg/kg KG am Tag 2 und 3) die VEGF-Wirkung unterdrücken und dass dieser Effekt im Vergleich zu Indometacin wesentlich stärker ist (Beharry et al., 2006). In der gleichen Studie wurde eine Hemmung des VEGF-R2 durch Ibuprofen, jedoch nicht durch Indometacin gezeigt.

Die Vermutung liegt nahe, dass ähnlich wie bei der Retinopathieentstehung eine veränderte Regulation von VEGF und dessen Rezeptoren an der Pathogenese des PDA Frühgeborener beteiligt ist.

1.3 Fragestellung

Um den möglichen Einfluss der zum medikamentösen Ductusverschluss eingesetzten COX-Hemmer auf die zweite obliterative Phase des Ductusverschlusses zu untersuchen, sollte ein vergleichendes organotypisches embryonales Endothelzellkulturmodell etabliert werden. Hierzu sollten nach entsprechender Präparation des DA und der Aorta von embryonalen Ratten (E21= entsprechend einem ungefähren Reifealter Frühgeborener der 24. bis 26. SSW) die aus diesen Gefäßen isolierten und anschließend aufgereinigten Endothelzellkulturen dienen. Anhand dieses Modells sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Zeigt das Endothel des unreifen DA im Vergleich zum Aortenendothel eine unterschiedliche VEGF bzw. VEGF-R1 oder VEGF-R2 Expression?
2. In welcher Weise beeinflussen die COX-Inhibitoren Ibuprofen bzw. Indometacin die Expression von VEGF und/ oder seinen Rezeptoren am DA? Ist der Einfluss dosis- und/oder zeitabhängig?
3. Wie verändert sich die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren unter dem Einfluss einer Entzündung?
5. Verändert sich die VEGF-, VEGF-Rezeptoren Expression sauerstoffabhängig?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1 Verwendete Chemikalien

Zellkulturmedien

EC-Medium:	20%, 10% bzw. 5% FKS Medium 199 EARLE, 500 ml, 2,2g/l NaHCO ₃ , 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, #F0615, Biochrom AG, Berlin
VSMC-Medium:	DMEM, 500 ml, 3,7g/l NaHCO ₃ , 15% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, #F0405, Biochrom AG,
RPMI (<i>Rosewell-Park-Memorial-Institute</i>)-Medium	Medium 1640, 500 ml, 5,5g/l NaCl, 5mg/l Phenol Rot, 2,0g/l NaHCO ₃ , 25mM HEPES, 0,532g/l Glutamin, #0972 G, Biochrom AG
MACS [®] (<i>Magnetic Cell separation</i>)-Puffer:	Dulbecco's PBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,5% BSA, 2mM EDTA, PAA #H00 205-0245, Gibco/BRL, Berlin
PBS/BSA/Azid:	9,55 g PBS-Salze, 0,15% BSA (35%), 0,2% NaN ₃

Zellkulturzusätze

Fötales Kälberserum (FKS)	#S0115, 500ml, Biochrom AG
L-Glutamin	200mM, #K0283, Biochrom AG
Penicillin/ Streptomycin	#A2213, 10.000µg/ml, Biochrom AG
Fibroblastenwachstumsfaktor	FGF-1, <i>Fibroblast Growth Factor-acidic</i> rekombinant vom Menschen, #100-,17A, PEPROTECH Inc., London, England

Antikörper für die Säulentrennung

Anti-von Willebrand Faktor	IgG Kaninchen-anti-von Willebrand Faktor, polyklonal, ab6994, Abcam, Cambridge, England
----------------------------	---

MicroBeads Ziege-anti-Kaninchen IgG [H+L] MicroBeads, #486-02, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Antikörper für die FACS-Kontrolle

CD 90 Maus-anti-Ratte Isotyp IgG 2 α , monoklonal, #554893, BD Biosciences, Heidelberg

Aktin Maus-anti-Ratte, Glattmuskel Ab-1, Clone 1A4, Isotyp IgG 2 α , #06520, Dianova, Hamburg

Negativ Kontrolle für Kaninchen Isotyp IgG Ab-1, #13122, Dianova

Negativ Kontrolle für Maus Isotyp IgG 2 α Ab-1[Clone NCG2A.01], #05804, Dianova

IgG-FITC (Fluoreszenzmarker) Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L), #FI-1000, Vector, Stuttgart

PE (Fluoreszenzmarker) Ziege anti-Maus IgG #115-115-164, J Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA

Fixations & Permabilisierungslösung Fix & Perm, Bio Research, Kaumberg

PCR-Reagenzien

Random Primer #C118A, Promega, Madison, USA

dGTP #U121A, Promega

dCTP #U122A, Promega

dATP #U120A, Promega

dTTP #U123A, Promega

AMV Reverse Transkriptase inklusive 5x Reaktionspuffer, #M5101, Promega

Versuchsreagenzien

Ibuprofen Pedeia, 5mg/ml, Orphan Europe SARL, Paris

Indometacin Indocid PDA Injection (1mg/ml), Merck Sharp & Dohme, Haar

PMA Phorbol 12-Myristat 13-Acetat, 1mg, #P8139, Sigma Aldrich, Hamburg

RNAzol RNA-Bee™, # CS-501B, Tel-Test, Inc., Friendswood, USA

Enzyme

Kollagenase-Typ II	Typ: CLS II,226 U/mg, 1000mg, #CII-22, Biochrom AG
Elastase	Schweinepankreas, lyophilisiert, 50mg, #11027905001 (EC 3.421.36), Roche, Basel, Schweiz
Trypsin Hemmer	Typ I-S: aus Sojabohnen, 100mg, # T-9003 [9035-81-8], Sigma Aldrich, München
DNAse	DNAase II, 30 kU, #D8764, Sigma Aldrich

PCR-Reagenzien

PCR- Kit	qPCR Core Kit, RT-QP73-05, Eurogentec, Seraing,Belgien
Sonden und Primer	BioTez Berlin-Buch GmbH, Sequenz s. Tab. 2

ELISA

VEGF ELISA	Ratten VEGF Immunoassay, RV00, R&D Systems, Wiesbaden
------------	---

LDH-Bestimmung

LDH Zytotoxizität Test	#1644793, Roche, Mannheim
------------------------	---------------------------

MTT

MTT Reagenz	Thiazoyl Blau Tetrazolium Bromid, #M2128, Sigma Aldrich
Staurosporin	#S6942-200UL, Sigma Aldrich

Immunhistologie

Einbettungsmedium mit DAPI	VECTA Shield Mounting Medium, #H-1500, Vector Laboratories, Stuttgart
Fluoreszenzmarker	Ziege-anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488, #A11029, Invitrogen, Paisley, Großbritannien
Fluoreszenzmarker	Ziege-anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor 488, #A11034, Invitrogen
Triton X-100	#T8787, Sigma Aldrich

Einbettungsmedium für Gefrierschnitte	Kryostat embedding medium, #05-9801, WAK Chemie, Mailand, Italien
Ziegenserum	Normales Ziegenserum, #S1000, Vector Laboratories, Stuttgart
Azeton	#1.00013.2500, E. Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin	BSA, A-4628, Sigma Aldrich
Antikörperverdünnungslösung	ZUC025-100, Zytomed Systems, Berlin

2.1.2 Material

MACS [®] Trennsäule	LS <i>Seperation Columns</i> , # 130-042-401, Miltenyi Biotec
Mikropräparationsschere	Mikroschere Vannas, 80mm, gerade, #1500-08, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Mikropräparationsspinzette	Pinzette Dumont #5, 1100mm, gerade, #11254-20, Fine Science Tools GmbH
Superfrost-Plus-Objektträger	J1800AMNZ, Menzel, Braunschweig
Fettstift	MSI, München
Pipetten	Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, U.S.A
PCR Reaktionsgefäß	Streifen mit 8 Röhrchen, ultradünn 0,2ml, #710950, Biozym, Hessisch Oldendorf
Deckel für PCR Reaktionsgefäß	#710960, Biozym
Zellkulturflaschen	250ml (75cm ²), 750ml (175cm ²), Falcon, Becton Dickinson
Zellkulturschalen	100x 20mm, Falcon, Becton Dickinson
Zellschaber	38cm, #0054, TPP, Trasadingen, Schweiz
Filtereinsatz	40µm, #352340, Falcon, Becton Dickinson
Zellkulturröhrchen	50ml, #2070, Falcon, Becton Dickinson
Zellkulturplatten	96 well, #353055, Falcon, Becton Dickinson
FACS-Röhrchen	5ml Polystyren Rundbodenröhrchen, # 352054, Falcon, Becton Dickinson
Spritzen	Omnifix, 10ml, #4617100V, Braun, Melsungen
Kanüle	Sterican, 20 G x 2 ¾“, # 4665791, Braun

2.1.3 Geräte

Zellkulturbrutschrank	Water-Jacked-Incubator, Forma Scientific, Labotect, Göttingen
Hypoxieschrank	CB 150 #02-31954, Binder, Tuttlingen
Taqman-Zyklus	ABI Prism™,7700 Sequenzdetektor, Perkin Elmer, Wellesley, U.S.A
PCR-Zyklus	Petier Thermal Cyclers, PTC-200, MJ Research, Biozym
Kryotom	Leica, Kryostat, Wetzlar
Immunfluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axioplan2e, Carl Zeiss, Jena
<i>Microplate-reader</i>	Microplate Manager® 4.0, Modell 550, Bio-Rad Laboratories, Inc.
Minizentrifuge	Minifuge GL, Heraeus, Hanau
Megazentrifuge	Megafuge 1.0 R Heraeus
Stereomikroskop zur Mikropräparation	Leica M690, mit Linse Leica 10445170 (10 x 21B), Leica Mikrosysteme Vertriebs GmbH, Bensheim
Sterile Werkbank	LaminAir HBB 2448, Heraeus
Zellkulturmikroskop	Olympus CK 2, Hamburg
Digitalkamera	Olympus Camedia C-3030 Zoom, 3, 3 Megapixel

2.2 Tiertötung und Gewebeentnahme

Vor Versuchsbeginn wurde eine Tiertötungsanzeige an das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin unter der Projektnummernummer T 0259/04 gemeldet und am 22.11.2004 genehmigt.

Die Tiere wurden aus der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin Charité Campus Benjamin Franklin bezogen und in der Tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät der Charité in Berlin am Campus Virchow Klinikum unter Standardbedingungen (21°C Lufttemperatur, Licht von 8.00-16.00 Uhr, Futter und Wasser ad libitum) gehalten. Zur Durchführung der Experimente wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit weibliche trächtige terminiert verpaarte Ratten der Sorte Wistar am errechneten 21. Tag der Embryonalentwicklung (E21) getötet und präpariert.

Nach einer fünfminütigen CO₂-Narkose wurde der sichere Tod des Muttertieres durch zervikale Dislokation herbeigeführt. Anschließend wurde nach Desinfektion mit 70%igem Ethanol die Haut samt Fell mittels einer Schere vom darunter liegenden Peritoneum gelöst (*Abbildung 4*).



Abb. 4: Blick auf die abdominale Muskulatur einer trächtigen Wistar Ratte

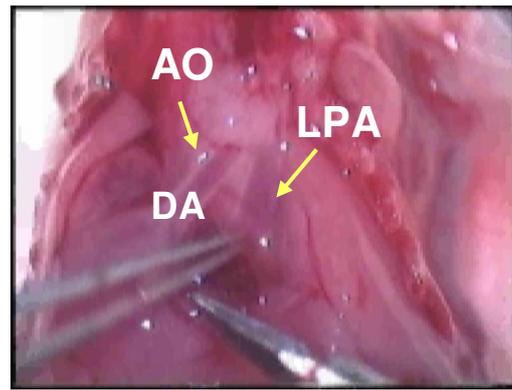


Eröffneter Situs mit Uterus

Anschließend wurde das freiliegende Bauchfell desinfiziert, V-förmig aufgeschnitten und der nun sichtbare Uterus eröffnet. Die im Dottersack eingeschlossenen Embryonen (ca. 10-20 pro Muttertier) wurden möglichst im Verbund entnommen und sofort in Reaktionsgefäße mit PBS (w/o Ca/Mg) auf Eis überführt. Nach Dekapitation der Rattenembryonen wurde der Thorax eröffnet. Diese und alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt (*Abbildung 5*).



Abb. 5: Rattenembryo von links lateral mit eröffnetem Thorax



Thoraxsitus mit Blick auf die Gefäße

In der sich anschließenden Mikropräparation unter dem Stereomikroskop wurde zuerst der DA isoliert, indem er am Übergang zur Aorta und am Truncus pulmonalis oberhalb der Pulmonalarterieneinmündung abgesetzt wurde. Anschließend wurde die Aorta nahe ihres Abganges am Herzen abgesetzt und im Verlauf unter Durchtrennung der Abgänge der Halsgefäße bis zur Einmündung des DA präpariert und entnommen (Abbildung 6). Die gewonnenen Präparate wurden sofort in separate, entsprechend beschriftete Zellkulturschalen in VSMC-Medium überführt. Während der Präparation aller Gefäße wurde das die Gefäße umgebende Bindegewebe kontinuierlicherhaltend vollständig entfernt.

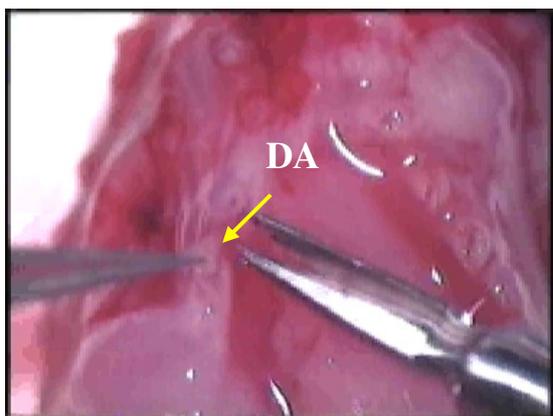
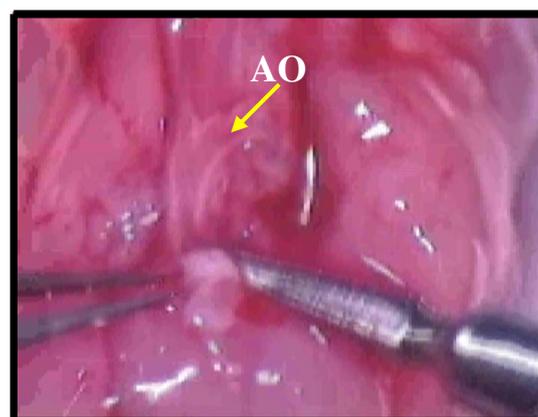


Abb. 6.: Mikropräparation des DA .
Dieser ist bereits an seiner aortalen Einmündung abgesetzt.



Mikropräparation der Aorta.
Sicht auf den Aortenbogen mit davor liegendem Stumpf des Truncus pulmonalis.

2.3 Endothelzellen-Isolierung

Die zur Gewinnung von EC vorgesehenen Gefäßpräparate wurden mit 1ml einer Kollagenase-Lösung (Kollagenase:Aqua dest. im Verhältnis 1:4) für ca. sieben Minuten in einem Reaktionsgefäß im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Die Lyse des Endothelzellverbundes wurde mit der doppelten Menge EC-Medium gestoppt, die Zellsuspension für 5 Minuten zentrifugiert (1000rpm, 4°C), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet nochmals in EC-Medium resuspendiert und filtriert (40µm Porengröße). Abschließend wurde die so gewonnene Endothelzellsuspension auf vorher gelatinierte 75cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Ein Wechsel des EC-Mediums erfolgte alle zwei Tage. Zur Unterstützung des Zellwachstums wurde dem EC-Medium 1% Fibroblastenwachstumsfaktor zugesetzt.

2.4 Zellseparation und Zellkultur

Nachdem die Zellen mikroskopisch konfluent gewachsen sind erfolgte eine immunomagnetische Zellseparation mittels MACS[®] Column-Technology (Abbildung 7). Hierbei werden die zu isolierenden Zellen durch spezifische Antikörperbindung mit so genannten *MicroBeads*, superparamagnetischen Mikropartikeln (ca. 50nm Durchmesser) markiert und auf eine spezielle Trennsäule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die markierten Zellen werden so in der extra für diesen Zweck konstruierten Matrix der Säulen zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen und das Magnetfeld nahezu ungehindert passieren. Die markierten, positiv selektionierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säulen außerhalb des Magnetfeldes gewinnen (Elution). Mit Hilfe dieses Verfahrens kann die Anreicherung (positive Selektion) und die Depletion (negative Selektion) verschiedener Zellarten aus der Primärkultur erfolgen.

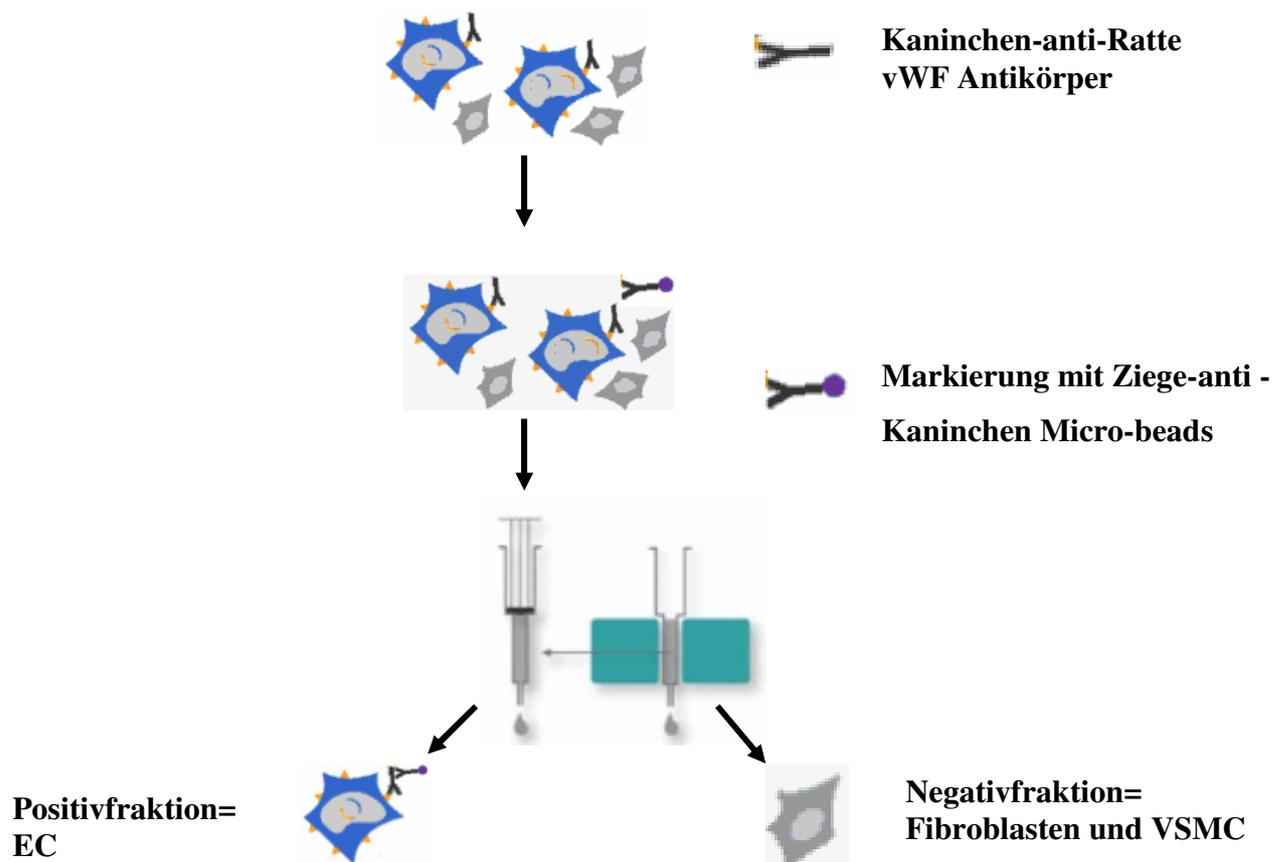


Abb. 7: Zellseparationsverfahren mittels MACS®-Technik

2.4.1 Endothelzellen-Aufreinigung

Die zur Isolierung von EC vorgesehenen konfluenten Primärkulturen wurden mit einem gegen den endothelzellspezifischen oberflächenständigen von Willebrand Faktor gerichteten Primärantikörper (Kaninchen-anti-von Willebrand Faktor IgG) versetzt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen nach einmaligem Waschen (PBS w/o Ca/Mg, 20°C) mit Akkutase (1ml, 5min bei 37°C) von der Zellkulturflasche gelöst. Die Lyse wurde mit 2ml VSMC-Medium gestoppt und der Zellrasen unter Zuhilfenahme eines sterilen Zellschabers mechanisch von der Zellkulturflasche gelöst. Anschließend wurden die Zellen in VSMC-Medium aufgenommen, mit einer Spritze vereinzelt und ihre Zellzahl pro μl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer mikroskopisch bestimmt. Hiernach wurden die Zellen noch einmal gewaschen und der Überstand nach erfolgter Zentrifugation (1000rpm, 20°C, 5min) verworfen. Das Pellet wurde in 1ml RPMI-Medium aufgenommen und über einen Filter mit 40 μm Porengröße gegeben. Diese Zellsuspension wurde mit dem Primärantikörper in berechneter Menge (5,0 μg /200.000 Zellen) unter intermittierendem Rütteln inkubiert (20°C, 30min). Nach Ablauf der Inkubationsdauer

wurde die Suspension gewaschen (PBS w/o Ca/Mg, 20°C) und zentrifugiert (1000rpm, 20°C, 5min). Das resuspendierte Zellpellet wurde anschließend mit 80µl MACS[®]-Puffer unter Zusatz von 20µl magnetisierten MicroBeads (Ziege-anti-Kaninchen IgG) für 15 Minuten bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf eine zuvor mit 3ml MACS[®]-Puffer äquilibrierte, im Magnetfeld hängende MACS[®]-Trennsäule (*LS MACS separation columns*, Miltenyi Biotec) aufgetragen. Die Positivfraktion wurde nach Entfernen der Säulen aus dem magnetischen Feld mit 1ml MACS[®]-Puffer unter Zuhilfenahme des Stempels herausgespült, in 5ml RPMI-Medium aufgenommen und über 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in EC-Medium aufgenommen und auf gelatinierte 75cm² Zellkulturflaschen ausgesät (Abbildung 8).

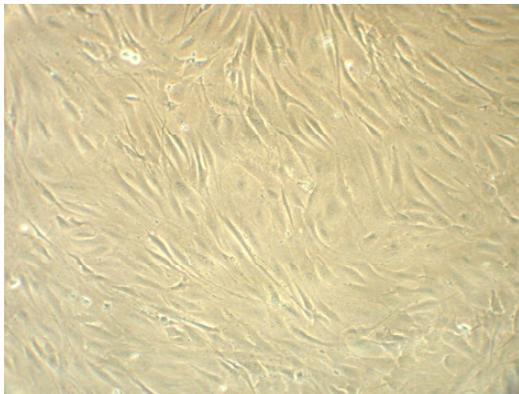


Abb. 8: Primäre Mischzellkultur vor der Säulenauftrennung in Phasenkontrastdarstellung (200fache Vergrößerung).



Mikroskopisch reine Endothelzellkultur der ersten Passage nach Säulentrennung mit charakteristischem Wachstum als Monolayer. (200fache Vergrößerung)

2.4.2 Endothelzellkulturen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an der sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (250ml, 75cm²) im Brutschrank (21% O₂, 5% CO₂, 37°C) bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Versuche mit Endothelzellkulturen der dritten Passage durchgeführt.

2.5 Analyse der Reinheit der Zellkulturen (Durchflusszytometrie)

Die Reinheit der aus der Säulentrennung gewonnenen Zellkulturen wurde durchflusszytometrisch vor Versuchsbeginn überprüft. Das Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence activated cell sorting) beruht auf der Messung optischer Signale der Zelle,

angeregt durch einen Laserstrahl. Durch die Verwendung entsprechender Primärantikörper ist es möglich unterschiedliche Antigene der Zellen zu markieren, des Weiteren können Aussagen über Zellgröße oder Granularität getroffen werden. Der in einem zweiten Schritt zugegebene Sekundärantikörper emittiert in Abhängigkeit von dem an ihn gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff nach Anregung durch einen monochromatischen Laserstrahl im Gerät Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses besteht aus Photonen, die bei der Rückkehr des angeregten Fluoreszenzfarbstoffes auf sein Ursprungsniveau von diesem abgegeben werden. Ein Photodetektor registriert die Photonenkonzentration, die hierbei der gebundenen Menge an Antikörper und damit indirekt der Antigenexpression entspricht. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Das Emissionsmaximum des FITC (Fluoreszeinisothiozyanat)-markierten Sekundärantikörpers liegt bei einer Wellenlänge von 530nm und das des PE (Phycoerithrin)-konjugierten Antikörpers bei einer Wellenlänge von 580nm. In der vorliegenden Arbeit wurde die Reinheit jeder Zellkultur anhand von fünf verschiedenen Primärantikörpern getestet, von denen zwei einer Negativ- bzw. Isotypkontrolle entsprachen. Die Primärantikörper binden an verschiedene Antigene, die jeweils spezifisch für eine der drei im Gefäß vorliegenden Zellarten sind (Abbildung 9, Tabelle 1).

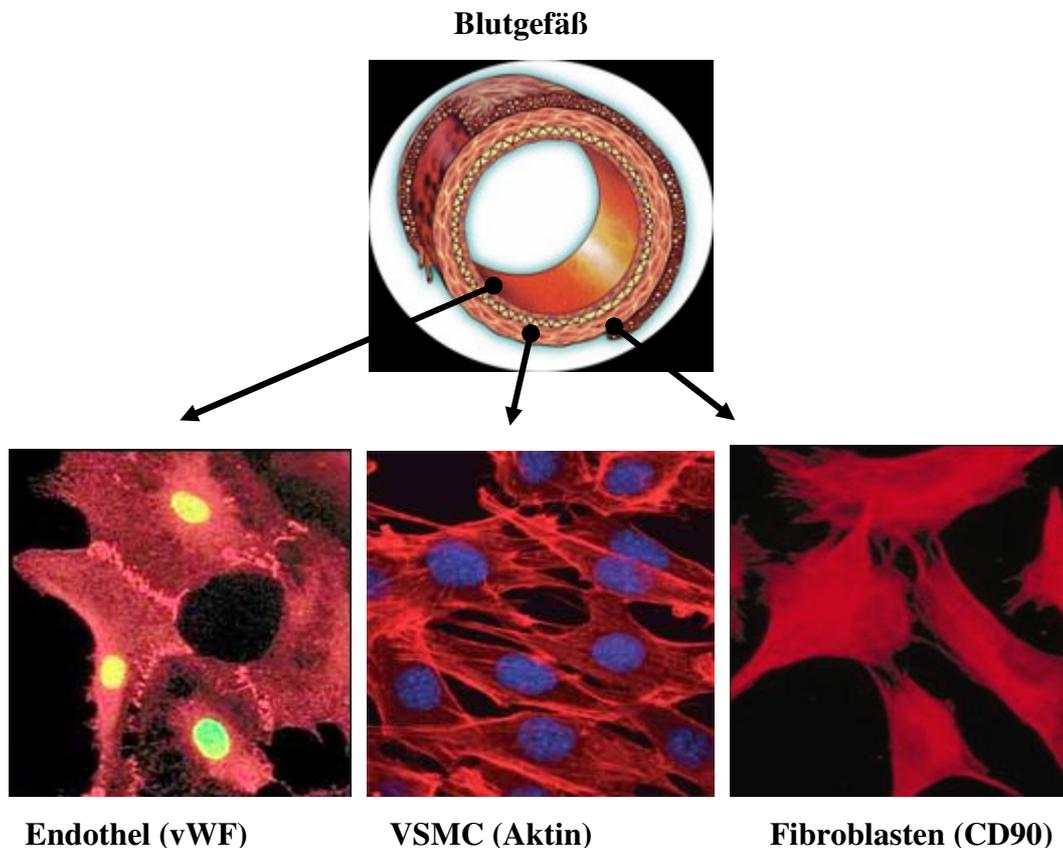


Abb. 9: Die am Aufbau eines Blutgefäßes beteiligten Zellen

Primär-Antikörper/ Isotyp (Kontrolle)	Antikörperkonzentration [µg/50.000 Zellen]
Endothel: vWF (IgG)	16,6
VSMC: Aktin (IgG2 α)	1
Fibroblasten: CD 90 (IgG2α)	2
Isotyp IgG	2,5
Isotyp IgG 2α	1

Tab. 1: Die für die Reinheitskontrolle verwendeten Antikörper und ihre Konzentrationen

Für die Reinheitskontrolle der Zellkulturen wurden die konfluent gewachsenen Zellen der ersten Passage, wie unter 2.3. beschrieben suspendiert und ausgezählt. Dann wurde pro Zellkultur ein Aliquot mit 250.000 Zellen zur FACS-Reinheitskontrolle entnommen und die restlichen Zellen auf eine gelatinierte große (750ml, 175cm) Zellkulturflasche ausgesät. Fünf FACS-Röhrchen wurden mit jeweils 50.000 Zellen aus dem Aliquot, entsprechend der zur Überprüfung eingesetzten drei Primärantikörper und zwei Isotypkontrollen, bestückt. Die Zellsuspensionen wurden einmalig in eisgekühltem PBS (0,15% BSA und 0,2% Natriumazid) gewaschen, zentrifugiert (2000rpm, 5min, 4°C) und der Überstand abgesaugt. Da Aktin intrazellulär lokalisiert ist, wurden die für den Aktinnachweis vorgesehenen Zellen mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Fix & Perm, Bio Research, Kaumberg) vor Inkubation mit dem Primärantikörper permeabilisiert. Hierzu wurden diese Zellen zunächst fixiert (100µl FIX Solution A, 30min., 20°C). Anschließend wurden sie einmal mit 4ml PBS (0,15% BSA und 0,2% Natriumazid) gewaschen und in 50µl PBS (0,15% BSA und 0,2% Natriumazid) resuspendiert. Parallel zu diesem Schritt wurden die für den Aktinnachweis vorgesehenen Chargen unter Zugabe von 100µl der PERM Solution B permeabilisiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden alle Proben erneut gewaschen (PBS/BSA/Azid 4ml, 20°C) bevor sie mit 5µl des FITC- bzw. PE-gekoppelten Sekundärantikörpers (30min, 4°C lichtgeschützt) inkubiert wurden. Der FITC-gekoppelte Sekundärantikörper diente dem Nachweis des vWF sowie der entsprechenden IgG Isotypkontrolle. Der Nachweis der übrigen zwei Primärantikörper und der dazugehörigen IgG2α Isotypkontrolle erfolgte anhand des PE-markierten Sekundärantikörpers. Nach einem letzten Waschschrift (PBS/BSA/Azid 4ml, 20°C) erfolgte die Fixierung der gefärbten Zellen mit 200µl einer 2%igen Paraformaldehydlösung. Hiernach konnte die Messung der Proben am Durchflusszytometer durchgeführt werden. Voraussetzung zur anschließenden Auswertung sind 5000 gemessene Ereignisse pro Probendurchlauf bei einem Fluss von 12µl/

Minute, einem langsamen Fluss entsprechend. Die Datenanalyse erfolgte mittels der Softwareprogramme Cell Quest 3.1 (Becton Dickinson, Heidelberg) und WinMDI 2.8 (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*).

2.6 Zellvitalitäts und –zytotoxizitätsmessung

2.6.1 Vitalitätsassay

Der MTT-Assay ist eine standardisierte kolorimetrische Messung, die von Mosmann 1983 zur Bestimmung der Zellvitalität und Zellproliferation eingeführt wurde. Dabei wird das gelbe MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide*) durch die aktivierte mitochondriale Reduktase in violette lipophiles, kristallines Formazan umgesetzt. Das Formazan kann nun mittels eines Spektrophotometers gemessen werden, wobei seine Farbintensität direkt proportional zur Anzahl aktivierter Mitochondrien und damit zur Zahl vitaler Zellen in der Probe ist. In dieser Arbeit wurde anhand des MTT-Assays einerseits die optimale Konzentration von FKS im Zellkulturmedium ermittelt, welche niedrig genug sein musste um die Versuchsergebnisse nicht zu beeinflussen und hoch genug, um die Vitalität der Zellen zu garantieren. Andererseits wurde der Einfluss niedrig und hoch dosierter Ibuprofen- und Indometacinkonzentrationen auf die verschiedenen Versuchsansätze untersucht. Dazu wurde eine konstante Anzahl von 1×10^6 Zellen auf eine 96-well Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert (37°C , 21% O_2 , 5% CO_2). Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Substanzen für 24 Stunden. Danach wurden 10 μl MTT-Reagenz pro well hinzugefügt und die Platte für weitere 2 Stunden inkubiert (37°C , 21% O_2 , 5% CO_2). Dann erfolgte der Zusatz von 100 μl Detergenz (Isopropanol mit 0,04 NHCL). Nach einer weiteren Inkubationsperiode von 2 Stunden (20°C , lichtgeschützt) erfolgte die spektrometrische Messung bei einer Wellenlänge von 570nm im Microplate Reader. Eine Referenzmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 630nm. Bei jeder Messung wurden Mediumleerwerte als Hintergrundkontrolle mitgeführt, die bei der anschließenden Auswertung vom jeweiligen Probenmesswert subtrahiert wurden.

2.6.2 Zytotoxizitätsuntersuchung (Lactatdehydrogenase-Messung)

Das Prinzip des MTT-Assay wurde auch zur Ermittlung einer möglichen zytotoxischen Wirkung der unterschiedlichen Versuchskonditionen angewandt. Als Indikator der Zellschädigung diente hierbei die Laktatdehydrogenase (LDH). Werden Zellen durch toxische Substanzen oder Versuchsbedingungen unspezifisch geschädigt, verlieren sie die Integrität ihrer Zellmembran

und setzen das zytosolische Enzym LDH frei, dessen Enzymaktivität im Zellkulturüberstand gemessen werden kann. Das Enzym LDH setzt in einer Oxidationsreaktion Laktat zu Pyruvat um, wobei gleichzeitig NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird (Ulmer et al., 1956). Der LDH-Zytotoxizitätstest nutzt das gebildete NADH, um mittels eines Katalysators das gelbliche Tetrazoliumsalz zum rötlichen Formazan zu reduzieren. Anschließend kann im ELISA-Reader die Intensität des Farbumschlages, der proportional zum Ausmaß der Zellschädigung ist, gemessen werden. Die ermittelten LDH-Werte der Proben wurden gegen interne Referenzwerte verglichen. Hierzu diente einerseits die minimale LDH-Freisetzung im Überstand unbehandelter Kontrollproben, sowie andererseits die durch Zusatz von Triton X-100 erreichte maximale Zellschädigung.

2.7 Zellernte und RNA-Gewinnung

Das Grundprinzip der RNA-Gewinnung besteht in einer Lyse der Zellen, Inaktivierung der RNAsen und Isolierung der RNA. Hierzu wurde zuerst nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsdauer das Versuchsmedium abpipettiert und der Zellmonolayer einmal mit PBS (w/o Ca/Mg, 4°C) gespült. Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber mechanisch von der Zellkulturschale gelöst und in PBS (w/o Ca/Mg, 4°C) aufgenommen. Die Suspension wurde zentrifugiert (2000rpm, 5min, 4°C), der komplette Überstand vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet in 600µl RNazol (Guanidinisothiocyantlösung mit Phenol) homogenisiert. Durch Zugabe von 60µl Chloroform wurde das Homogenisat in eine hydrophile und hydrophobe Phase getrennt (10min, 4°C). Nach erneuter Zentrifugation (2000rpm, 15min, 4°C) befinden sich in der oberen wässrigen Phase RNA, in der unteren sauren Phase Proteine und DNA-Fragmente. Durch Zugabe von Isopropanol 1:1 wurde die mit der wässrigen Phase entnommene RNA ausgefällt. Nach Präzipitation (20min, 4°C), Zugabe von 45µl Ethanol und einem weiteren Waschschrift, konnte die nun vorliegende nicht degradierte reine Gesamt-RNA in DNA umgeschrieben werden. Vor Umschreibung einer definierten Menge RNA muss deren Konzentration photometrisch ermittelt werden. Die optische Dichte der Proben wurde in einer Mikroküvette bei 260nm und 280nm gemessen, wobei die Ratio (260/280) >1,8 betragen sollte, um qualitativ aussagekräftig zu sein. Mittels eines vorher am Gerät eingestellten RNA-Programms konnte nun die Probendichte direkt in eine Konzentration umgerechnet werden.

2.8 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Bei der reversen Transkription erfolgt mittels eines Enzyms, der Reversen Transkriptase, die Umschreibung der vorliegenden messenger RNA in eine komplementäre DNA-Sequenz. Wie bei der *in vivo* Reaktion müssen dem Enzym Nukleotide, ein Primer und zur Optimierung der Reaktionsbedingungen ein Puffer zur Verfügung stehen. Zur Umschreibung in cDNA wurden der RNA-Probe 5µg RNA entnommen und auf Eis 2µl 10mM dNTP Mix, 4µl 5-fach Reaktionspuffer und 2µl Random Primer zugegeben. Das Probevolumen wurde dann mit destilliertem Wasser auf 10µl eingestellt, bevor zuletzt 1µl AMV Transkriptase, eine DNA-Polymerase mit zusätzlicher RNase-Aktivität, zugesetzt wurde. Ein unerwünschter vorzeitiger Start der Reaktion wurde durch das ständige Kühlen des Reaktionsgemisches auf Eis und die Zugabe des Enzyms im letzten Schritt vermieden. Im Thermocycler erfolgte nun die Reverse Transkription in den folgenden drei Schritten: 42°C für 30 Sekunden, 95°C für 5 Minuten und Abkühlung auf 4°C. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgt bei -20°C.

2.9 Real-time-PCR

In diesem Versuchsaufbau wurde die 1992 von Higuchi et al. eingeführte *Real-time-PCR* verwendet. Diese auch quantitative Echtzeit-PCR genannte Methode ermöglicht es spezifische DNA-Abschnitte schnell und sensitiv zu amplifizieren. Durch Messung in der exponentiellen Phase einer Reaktion erfolgt die Quantifizierung der eingesetzten Probenmenge. Im Folgenden sind die in dieser Arbeit eingesetzten Sonden und Primerpaare aufgeführt, welche alle von der Firma BioTez in Berlin synthetisiert wurden.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Actin Sonde	6-FAM-GTC GTA CCA CTG GCA TTG TG-TAMRA
Actin Vorwärts-Primer	CCC TAA GGC CAA CCG TGA AAA GATG
Actin Rückwärts-Primer	GAA CCG CTC ATT GCC GAT GTG ATG
VEGF Sonde	6-FAM-GCC CAT GAA GTG GTG AAG TT-TAMRA
VEGF Vorwärts-Primer	GTA CCT CCA CCA TGC CAA GT
VEGF Rückwärts-Primer	AGA TGT CCA CCA GGG TCT CA
VEGF-R1 Sonde	6-FAM-AGT GGC TCC ACG ACC TTA GA-TAMRA
VEGF-R1 Vorwärts-Primer	CTC GTT AGA GAT TTG GAA GCG C
VEGF-R1 Rückwärts-Primer	GCA GGG ACA CTT CTA GCT TGA C
VEGF-R2 Sonde	6-FAM-ACA GCA TCA CCA GCA GTC AG-TAMRA
VEGF-R2 Vorwärts-Primer	TTT CGC TCT GGG AAA GAC TA
VEGF-R2 Rückwärts-Primer	CTC CTC CAC AAA ACC TGA GC

Tab. 2: Bezeichnung und Basenpaarfolge der PCR Sonden

Die PCR erfolgte in 25 μ l-Ansätzen mit Dreifachbestimmungen der einzelnen Proben unter Zuhilfenahme eines kommerziell erhältlichen Kits (qPCR Core Kit) der Firma Eurogentec. Pro Versuchsansatz wurde 1 μ l der jeweiligen cDNA Probe vorgelegt und folgendes Reaktionsgemisch hinzu gegeben:

- 17,125 μ l Aqua dest.
- 2,5 μ l 10-fach Puffer
- 2,5 μ l Magnesiumchlorid
- 1 μ l dNTP-Mix
- 0,125 μ l Hotstart Polymerase
- jeweils 0,25 μ l der beiden Primer
- 0,25 μ l Sonde.

Die Amplifikation erfolgte dann am ABI *Prism™ 7700 Sequence Detector* mit einem zwei Stufen Zyklus über 40 Wiederholungen. Der erste Zyklus beinhaltete folgende Schritte: Erwärmung der Proben auf 50°C für 2 Minuten zur Hitzeaktivierung des Enzyms, weitere Erhitzung auf 95°C für 10 Minuten und anschließende Abkühlung auf 60°. Nun schlossen sich die regulären Wiederholungen an, bei denen erst die Denaturierung für 15 Sekunden bei einer Temperatur von 95°C erfolgte und anschließend für 2 Minuten das Annealing und die Extension bei 60°C. Bei jedem Durchgang können Störfaktoren wie z.B. Unterschiede in der Ausgangsmenge der RNA die PCR Effizienz wesentlich beeinflussen. Um diese Fehler aus zu schließen wird eine endogene Referenz in den zu bestimmenden Proben gemessen, das sog. Housekeeping Gen, welches ubiquitär vorkommt, möglichst nicht aktiv reguliert wird und dessen Expressionsniveau konstant ist. In der vorliegenden Arbeit wurde β -Aktin als Housekeeping Gen verwendet. Außerdem wird auf jeder Platte die „Ohne Template Kontrolle“ (NTC) mitbestimmt, bei der anstelle der DNA im Reaktionsgemisch Aqua dest. eingesetzt wird, um eine eventuelle Verunreinigung des Ansatzes auf zu zeigen. Eine Kontrollprobe bestehend aus nicht umgeschriebener mRNA dient dem Ausschluss von Verunreinigung durch genomische DNA.

Auswertung- Zur Quantifizierung der Startmenge wird in der Regel der so genannte Threshold Cycle oder C_T -Wert herangezogen, der dem Schwellenwert entspricht, bei dem die beobachtete Fluoreszenz das Hintergrundrauschen übersteigt. Er wird als konstantes Fluoreszenzniveau definiert zu dessen Zeitpunkt in allen Proben die gleiche Menge neu synthetisierter DNA zu detektieren ist. Im Falle einer 100% Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer C_T -Wert entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA, respektive mRNA Startmenge. Bei

der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene auf die eines nicht regulierten Housekeeping Gens bezogen. Die Vorteile dieser „Normierung“ liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping Gen betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgt über die sog. ΔC_T -Methode (Livak und Schmittgen 2001), die sich arithmetischer Formeln, abgeleitet aus der Kinetik der PCR, bedient. Zur Anwendung dieser Methode müssen folgende Validitätskriterien erfüllt sein. Erstens muss die Effizienz der Amplifikation hoch ($E \approx 1$), zweitens die von Ziel- und Referenzmolekülen vergleichbar und drittens insgesamt unabhängig vom Templategehalt zu Beginn der Reaktion (zu mindest in dem für die Messung relevanten Bereich) sein. Traf dieses zu wurde wie folgt verfahren. Im ersten Schritt wurde für jede untersuchte Probe der C_T -Wert des Referenzgens, hier β -Aktin, vom C_T -Wert der unbekannt Probe (Zielgen) subtrahiert.

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

Nach dieser Normierung wurde vom ΔC_T -Wert der experimentell behandelten Proben der ΔC_T -Wert einer Kontrolle abgezogen, was in der vorliegenden Arbeit der Normoxiekontrolle entsprach.

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ Behandlung} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

Abschließend erfolgte unter Berücksichtigung des exponentiellen Verlaufes der Amplifikation die Darstellung des Wertes als eine n-fache Vervielfältigung im Vergleich zur Kontrolle, die auf den Wert 1 gesetzt wurde.

$$2^{\Delta \Delta C_T}$$

2.10 Versuchskonditionen

Die durchflusszytometrisch kontrollierte Reinheit aller für die Versuche eingesetzten organotypischen Endothelzellkulturen aus DA und Aorta lag bei 87-95%. Für die Versuche wurden konfluente Endothelzellkulturen der dritten Passage eingesetzt. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die Zellen in EC-Medium mit einem Anteil von 10% FKS überführt, der zum Versuchsbeginn auf 5% reduziert wurde, um den positiven Einfluss von FKS auf die Zellproliferation zu minimieren. Der analog für die Aorten- und Ductusendothelien durchgeführte Versuchsansatz ist Abbildung 10 zu entnehmen. Alle Versuche wurden jeweils mit drei unterschiedlichen Inkubationszeiten unter Normoxie- (21%O₂) sowie unter

Hypoxiebedingungen (1%O₂) durchgeführt. Dabei wurde Ibuprofen mit einer Konzentration von 250µg/ml und 50µg/ml, Indometacin mit 10µg/ml, sowie PMA (50ng/ml) als Inflammationsmediator eingesetzt.

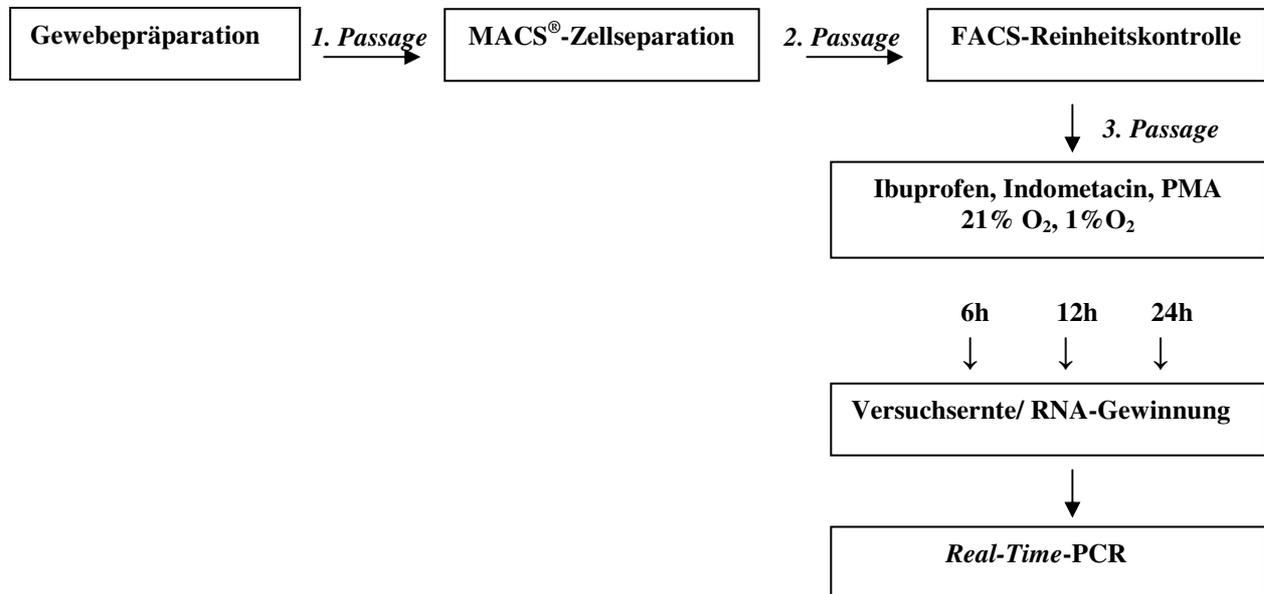


Abb. 10: Versuchsaufbau

2.11 VEGF ELISA

Der hier verwendete kommerzielle Assay der Firma R&D Systems ist für die VEGF-Proteinbestimmung in Plasma, Serum oder Zellkulturüberständen geeignet. Der ELISA bindet neben den VEGF-Isoformen 121 und 165 vermutlich auch VEGF 145. Jedoch gibt es bisher keine Versuche, die mit rekombinantem VEGF 145 im ELISA durchgeführt wurden um dies zu belegen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die VEGF-Bestimmung in den Probenüberständen, die nach Abschluss der Inkubation und Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -20°C konserviert wurden.

Der VEGF ELISA ist nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut. Die Mikrotiterplatte ist mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen Ratten-VEGF beschichtet, an den das freie Antigen aus der aufgetragenen Probe bindet. Nach einer zweistündigen Inkubationszeit (37°C) werden die nicht gebundenen Anteile von der Platte gewaschen und ein weiterer, gegen das Ratten-VEGF gerichteter, Antikörper zu dem vorliegenden Antigen-Antikörpermischung gegeben. Dieser bindet ebenfalls hoch spezifisch an einer anderen Stelle des Antigens. Nach einstündiger Inkubation (37°C) werden die nicht gebundenen Anteile abermals durch Waschen entfernt und ein

Farbsubstrat, bestehend aus Hydrogenperoxid und Chromogen, hinzu pipettiert. Durch Reaktion mit der an den zweiten Antikörper gebundenen Meerrettichperoxidase resultiert eine Blaufärbung. Nach 30 Minuten wird diese Reaktion durch Zugabe von Salzsäure gestoppt. Die Intensität der nun vorliegenden Farblösung wird im Photometer bei 490nm gemessen und ist proportional zur VEGF Konzentration in der Probe. Zur Quantifizierung werden die Messwerte mit einer Standardkurve aus Proben bekannter VEGF Konzentration verglichen.

2.13 Immunhistochemie (Gefrierschnitte)

Die Immunhistochemie dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen, die in einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion vom jeweiligen Antikörper gebunden werden. Zum Nachweis der VEGF-, VEGF-R1- und VEGF-R2-Proteinexpression am Rattenduktus und der Rattenaorta erfolgte die immunhistochemische Färbung an Gefrierschnitten.

Histologische Präparation- Die Gewebe wurden wie unter 2.2 beschrieben frisch präpariert und für 2 Stunden mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die Dehydratation über Nacht in 30%iger Saccharoselösung. Jeweils fünf bis sieben Präparate wurden unter dem Stereomikroskop in einem Einbettungsmedium für Gefrierschnitte positioniert und bei -20°C eingefroren. Die Lagerung der Präparate bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C . Aus den Gefrierblöcken wurden am Kryotom Schnitte mit einer Dicke von $10\mu\text{M}$ hergestellt und auf einen Superfrost-Plus-Objektträger aufgebracht. Zur Fixierung wurden sie für 30 Sekunden in Aceton (4°C) getaucht.

Immunhistochemie- Die einzelnen Schnitte wurden nun mit einem Fettstift umrandet, um ein Verlaufen der zur Färbung notwendigen Reagenzien zu vermeiden und in PBS (w/o Ca/Mg) rehydriert. Zur Blockung überflüssiger Antikörperbindungsstellen und zur Permeabilisierung wurde folgende Lösung (2% Ziegen Serum/ 1% BSA/ 0,1% TritonX-100) hinzu gesetzt. Nach Inkubation über 30 Minuten wurden die Objektträger einmalig in PBS (w/o Ca/Mg) gewaschen und mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Tabelle 2 gibt eine Übersicht der jeweils eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper, deren Solvenz und der verwendeten Konzentration.

Primärantikörper	Sekundärantikörper
VEGF Sc-7269 1:500 in Antikörperverdünnungs-Lsg	Ziege-anti Maus IgG, Alexa Fluor488, # A11029, 1:500 in Antikörperverdünnungs-Lsg
VEGF-R1(FLT-1) Dianova #124442 1:500 in Antikörperverdünnungs-Lsg	Ziege-anti Kaninchen IgG, Alexa Fluor488, # A11034, 1:500 in Antikörperverdünnungs-Lsg
VEGF-R2 (FLK-1) Dianova #12463 1:100 in Antikörperverdünnungs-Lsg	Ziege-anti Kaninchen IgG, Alexa Fluor488, # A11034, 1:500 in Antikörperverdünnungs-Lsg

Tab. 3: Übersicht der für die Immunhistochemie eingesetzten Antikörper

Nach dreimaligem Waschen in PBS (w/o Ca/Mg) erfolgte nun die Inkubation mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Dem schloss sich ein erneuter dreimaliger Waschvorgang zur Entfernung des Antikörperüberschusses an. Zuletzt wurden die Objektträger zur Kernfärbung mit DAPI-haltigem Medium eingedeckelt. Die mikroskopische Auswertung wurde an einem Immunfluoreszenzmikroskop mit automatischer Belichtungsmessung durchgeführt und die Ergebnisse in verschiedenen Vergrößerungen fotografisch digital dokumentiert wurden.

2.14 Statistik

Zur Auswertung der PCR Ergebnisse wurde die deskriptive Statistik angewandt. Von insgesamt fünf analog durchgeführten Versuchen wurden jeweils die Proben aus drei Wiederholungsversuchen in die PCR Messung einbezogen. Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung mit jeder Sonde, so dass am Ende der PCR Messungen für die jeweilige Versuchskondition und Zellart neun C_T -Werte vorlagen. Mit Hilfe der ΔC_T -Methode wurde aus den Dreifachbestimmungen einer Probe aus einem Versuch nach Mittelwertbildung ein Messwert ermittelt. Abschließend wurde aus drei zu einer Sonde, Inkubationsdauer und Zellart (DA oder Aorta) gehörigen Messwerten der Mittelwert (mean), sowie der Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) berechnet. Falls nicht anders angegeben, sind diese beiden Werte die Grundlage für die graphische Darstellung. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde die einfaktorielle Varianzanalyse von Messwiederholungen (ANOVA) verwendet. Dabei wurde von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen und die Proben als gepaart angesehen. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $<0,05$ angenommen. Die rechnerische Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Excel (Microsoft, USA) und GraphPad Prism4 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Reinheitsnachweis

3.1.1 FACS-Messung

Die in dieser Arbeit für die Versuche eingesetzten EC wurden aus Primärzellkulturen aufgereinigt, die aus einem Gemisch der am Gefäßaufbau beteiligten Fibroblasten, Endothel- und Glattmuskelzellen bestanden (Abbildung 11).

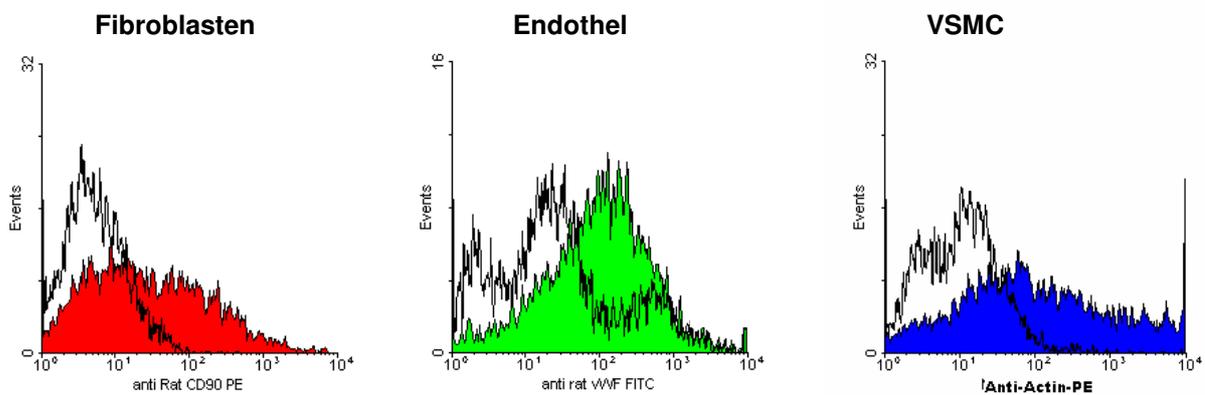


Abb. 11: Exemplarische Histogramme einer Mischkultur vor der Säulenaufreinigung;

Nach der unter 2.4 beschriebenen Zellseparation wurde die Reinheit der nun vorliegenden Zellkulturen durchflusszytometrisch überprüft. In den darauf folgenden Versuchen wurden ausschließlich Kulturen mit einem Nachweis von 87% bis 95% reinen EC (Abbildung 12 und 13) verwendet.

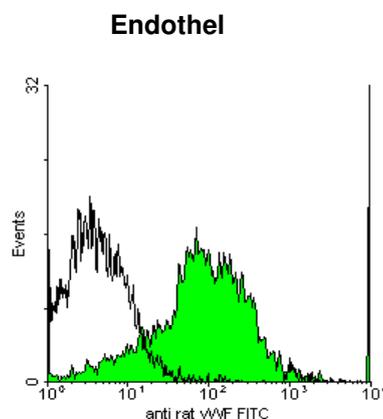


Abb. 12: Exemplarisches Histogramm einer reinen Endothelzellkultur nach der Säulenaufreinigung

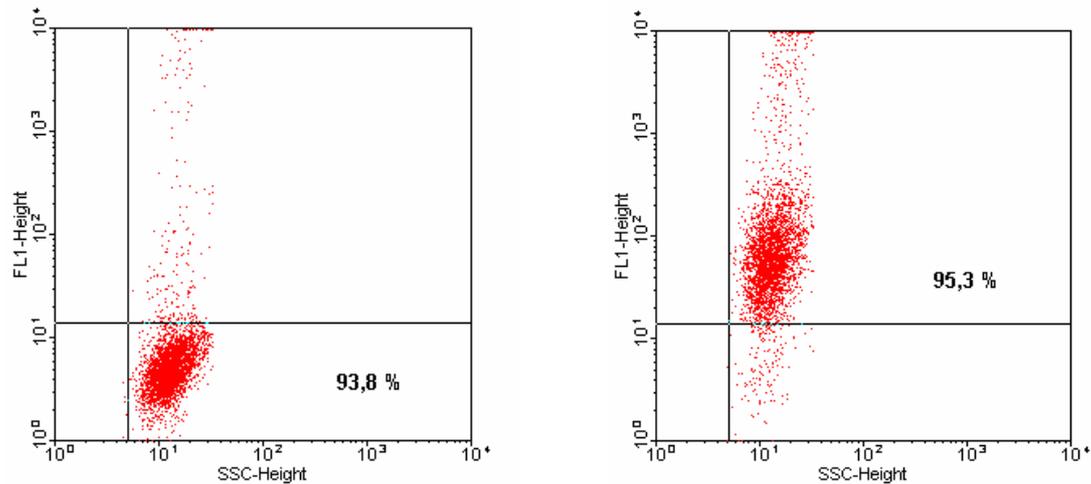


Abb. 13: Repräsentative Dot Blots zum Vergleich der Isotypkontrolle (links) und der aufgereinigten Endothelzellkultur (rechts)

3.2 Zellvitalität und –zytotoxozität

3.2.1 Vitalitätsassay

Versuchsmedium- Anhand des unter 2.6.1 beschriebenen MTT-Assays wurde zuerst die optimale im Versuchsmedium einzusetzende Konzentration des Fötalen Kälberserums ermittelt. Bei Aussaat von 100.000 Zellen pro Well, einem konfluenten Zellrasen entsprechend, ergab sich kein nennenswerter Unterschied bezüglich der Zellvitalität und -proliferation zwischen den EC-Medien mit unterschiedlicher FKS-Konzentration (Tabelle 3). Dagegen bewirkte bei Halbierung der ausgesäten Zellzahl auf 50.000 pro Well, einem subkonfluenten Zellrasen entsprechend, die Reduktion des FKS-Anteils im Medium auf 5% eine Abnahme der Zellvitalität um ein Viertel. Bei einem Zusatz von lediglich 1% FKS sank die Zellvitalität im Vergleich zum 20% FKS-haltigen Medium um die Hälfte. Bei Aussaat einer Zellzahl von 25.000 pro Well, einem nicht konfluenten Zellrasen entsprechend, erhöhte sich der Verlust der Zellvitalität unter 5%igem bzw.1%igem FKS im EC-Medium bis auf 60%.

Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde zusätzlich der Mitosehemmer Staurosporin (1µmolar) als Positivkontrolle eingesetzt (Tabelle 4). Darunter zeigte sich bei konfluentem Zellrasen in EC-Medium mit 20% bzw. 10% FKS eine Hemmung der Zellvitalität um 50% vom dazugehörigen Mediumleerwert. Im 5% FKS-haltigen Medium erfolgte eine Reduktion der ursprünglichen Vitalität der Zellen um 75% und im 1% FKS-haltigen Medium war nahezu keine Zellvitalität mehr nachzuweisen. Bei subkonfluentem Zellrasen war bei Zugabe von Staurosporin zum EC-Medium mit 5% FKS 10% Restvitalität zu verzeichnen. Darüber

hinaus zeigte eine Reduktion der Zellzahl auf 25.000 pro Well bereits im 10% FKS-haltigem nach parallelem Zusatz von Staurosporin Medium eine kaum noch messbare Zellvitalität.

Zellzahl pro Well	EC-Medium mit 20% FKS	EC-Medium mit 10% FKS	EC-Medium mit 5% FKS	EC-Medium mit 1% FKS
100.000	0,422 ± 0,014	0,502 ± 0,025	0,358 ± 0,02	0,342 ± 0,014
50.000	0,27 ± 0,022	0,265 ± 0,048	0,22 ± 0,03	0,139 ± 0,046
25.000	0,262 ± 0,007	0,17 ± 0,03	0,105 ± 0,007	0,116 ± 0,024

Zellzahl pro Well	EC-Medium mit 20% FKS und Staurosporin	EC-Medium mit 10% FKS und Staurosporin	EC-Medium mit 5% FKS und Staurosporin	EC-Medium mit 1% FKS und Staurosporin
100.000	0,187 ± 0,009***	0,335 ± 0,011	0,108 ± 0,018***	0,03 ± 0,006***
50.000	0,075 ± 0,005***	0,126 ± 0,006***	0,014 ± 0,004***	0 ± 0***
25.000	0,11 ± 0***	0,042 ± 0,017***	0,002 ± 0,001***	0 ± 0***

Tab. 4 und 5: Dargestellt sind die mittleren Adsorptionswerte für die Zellvitalität mit der jeweiligen Standardabweichung; 0 bedeutet, dass keine Zellvitalität messbar war; mean (\pm SEM) aus $n=5$ Versuchen, *** $p < 0,001$ vs. gleicher Zellzahl in EC-Medium mit dem entsprechenden FKS-Gehalt und ohne Staurosporin

In der konfluenten Zellkultur war die Zellvitalität bei Reduktion des FKS-Gehalts im EC-Medium, welcher sich in hoher Konzentration aufgrund der in ihm enthaltenen Wachstumsfaktoren störend auf die Versuchsbedingungen auswirken kann, am wenigsten beeinträchtigt. Für die nachfolgenden Versuche wurden daher ausschließlich konfluente Zellkulturen unter Verwendung von 5% FKS-haltigem EC-Medium eingesetzt. Insbesondere bei Zusatz von Staurosporin, welches den potentiell zytotoxischen Effekt, der im Versuch eingesetzten Substanzen simulierte, gewährleistete ein FKS-Gehalt von 5% im EC-Medium eine ausreichende Zellvitalität.

Medikamentenkonzentrationen- In den anschließenden Messungen sollte der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der Cyclooxygenasehemmer auf die Zellvitalität untersucht werden, um zytotoxische Effekte aus zu schließen. Hierzu wurde anhand einer Ductusendothelzellkultur der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Ibuprofen und Indometacin auf die Zellvitalität getestet. Die Messergebnisse zeigten nach 24 Stunden

Inkubation in Normoxie keinen Einfluss des Indometacins auf die Zellvitalität im Vergleich zur Kontrolle. Dies war unabhängig von der eingesetzten Konzentration, die hier von einer maximalen Dosis von 250µg/ml über acht Verdünnungen bis zu einer Minimalkonzentration von 0,5µg/ml reichte. Ähnliche Ergebnisse ohne Vitalitätshemmung zeigten sich bei Einsatz von Ibuprofen in Konzentrationen zwischen 500µg/ml und 12µg/ml in einer ebenfalls acht Schritte umfassenden Verdünnungsreihe.

Versuchsbedingungen- Im dritten Messzyklus wurden verschiedene der geplanten Versuchskonditionen simuliert. Neben der Wirkung von Ibuprofen in einer Konzentration von 250µg/ml bzw. 50µg/ml, Indometacin in einer Dosis von 10µg/ml und PMA mit 50ng/ml wurde auch die jeweilige Kombination aus PMA und Ibuprofen bzw. Indometacin getestet. Dieser Assay wurde mit Ductus- und Aortenendothelzellen unter Norm- und Hypoxiebedingungen durchgeführt.

Am Aortenendothel ergab sich nach 24stündiger Inkubation unter Normoxiebedingungen eine Vitalitätssteigerung bei Zusatz von Indometacin und PMA in Kombination um das Doppelte im Vergleich zur Kontrolle. Unter Hypoxie stieg die Zellvitalität auf das 2,2-fache. Dagegen fiel die Vitalitätssteigerung bei alleinigem Zusatz von PMA unabhängig von der Sauerstoffkonzentration geringer aus. An den Ductusendothelien zeigte Indometacin in Kombination mit PMA lediglich in Normoxie eine deutliche Wirkung auf die Zellvitalität (Verdoppelung der Wachstumsrat), wohingegen dieser stimulierende Einfluss unter Hypoxiebedingungen fehlte. Dagegen bewirkte Ibuprofen in Kombination mit PMA am Ductusendothel unter Hypoxie eine Vitalitätshemmung um 38% bzw. 46%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei konfluentem Zellrasen die Konzentration an FKS im Medium keinen Einfluss auf die Zellvitalität hat, wohingegen bei subkonfluentem Zellrasen eine reduzierte FKS-Konzentration im Medium eine Vitalitätshemmung bewirkte. Die COX-Inhibitoren Ibuprofen und Indometacin hatten alleine keinen Einfluss auf die Zellvitalität. In Kombination mit PMA als Entzündungsmediator bewirkte Indometacin am Aortenendothel eine Zellvitalitätssteigerung. Am Ductusendothel bewirkte die Kombination von PMA und Indometacin in Normoxie eine Vitalitätssteigerung, die Kombination aus PMA und Ibuprofen zeigte in Hypoxie eine Vitalitätshemmung.

3.2.2 Zytotoxizitätsmessung

Die in dieser Arbeit für die Versuche eingesetzten Substanzen hatten neben ihren potentiell stimulierenden möglicherweise auch zytotoxische Eigenschaften. Zur Einschätzung einer eventuellen Schädigung der Zellkulturen, insbesondere auch im Hinblick auf das im Versuchsmedium reduzierte FKS und die geänderten Sauerstoffbedingungen, wurde eine LDH-Bestimmung im Zellkulturüberstand als Maß für die Zellschädigung durchgeführt. Für alle Endothelzellkulturen ergab sich eine normale LDH-Aktivität, d.h. es trat keine relevante Zellschädigung durch die eingesetzten Substanzen ein. Hierbei wurden die gemessenen LDH-Konzentrationen der Proben gegen interne Referenzwerte verglichen. Üblicherweise wird dabei die minimale LDH-Freisetzung aus dem Überstand unbehandelter Kontrollproben und die maximale LDH-Freisetzung durch Zellschädigung mittels Zusatz von Triton X-100 ermittelt. Zur Sicherung der Ergebnisse wurde parallel in beliebig ausgewählten Stichproben im Zentrallabor der Charité am Campus Virchow Klinikum LDH-g nach der IFCC standardisierten Methode bestimmt (Bais, Philcox, 1994). Die Ergebnisse deckten sich vollends mit meinen Messungen. Tabelle 6 zeigt exemplarisch die LDH-Konzentrationen nach 24 Stunden Inkubationsdauer, wobei nach 6 und 12 Stunden Inkubationsdauer vergleichbare LDH-Konzentration nach zu weisen waren.

LDH-KONZENTRATION IN U/l	Ducuts		Aorta	
	Normoxie	Hypoxie	Normoxie	Hypoxie
Kontrolle	0,59 ±0,22	4,44 ±2,52	0,72 ±0,57	2,22 ±0,78
PMA 50ng/ml	0,98 ±0,06	2,54 ±0,76	0,15 ±0,0	2,08 ±1,16
Ibu 250µg/ml	1,67 ±0,17	3,55 ±1,42	2,73 ±1,91	1,76 ±0,45
Ibu 50µg/ml	0,88 ±0,68	0,67 ±0,52	0,92 ±0,38	2,63 ±1,15
Indo 10µg/ml	1,58 ±0,12	1,58 ±0,29	0,37 ±0,22	3,41 ±2,65
PMA+ Ibu 250µg/ml	1,42 ±0,64	0,76 ±0,31	0,60 ±0,45	2,47 ±0,32
PMA+ Ibu 50µg/ml	0,87 ±0,73	1,29 ±1,14	1,22 ±0,55	1,40 ±1,25
PMA+ Indo 10µg/ml	1,83 ±0,68	2,77 ±1,50	1,05 ±0,45	0,79 ±0,64

Tab. 6: Dargestellt sind die mittleren LDH-Konzentrationen (mean aus n=3 Versuchen) in U/l im Zellkulturüberstand mit SEM.

3.3 Immunhistochemischer Nachweis

Zum Nachweis von und seine Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 am DA und an der Aorta erfolgte die Fluoreszenz-Immunohistochemische Färbung (Abbildung 14). Ohne eine quantitative Aussage treffen zu können zeigt sich, dass VEGF und seine Rezeptoren in allen Abschnitten des DA und der Aorta nachweisbar sind.

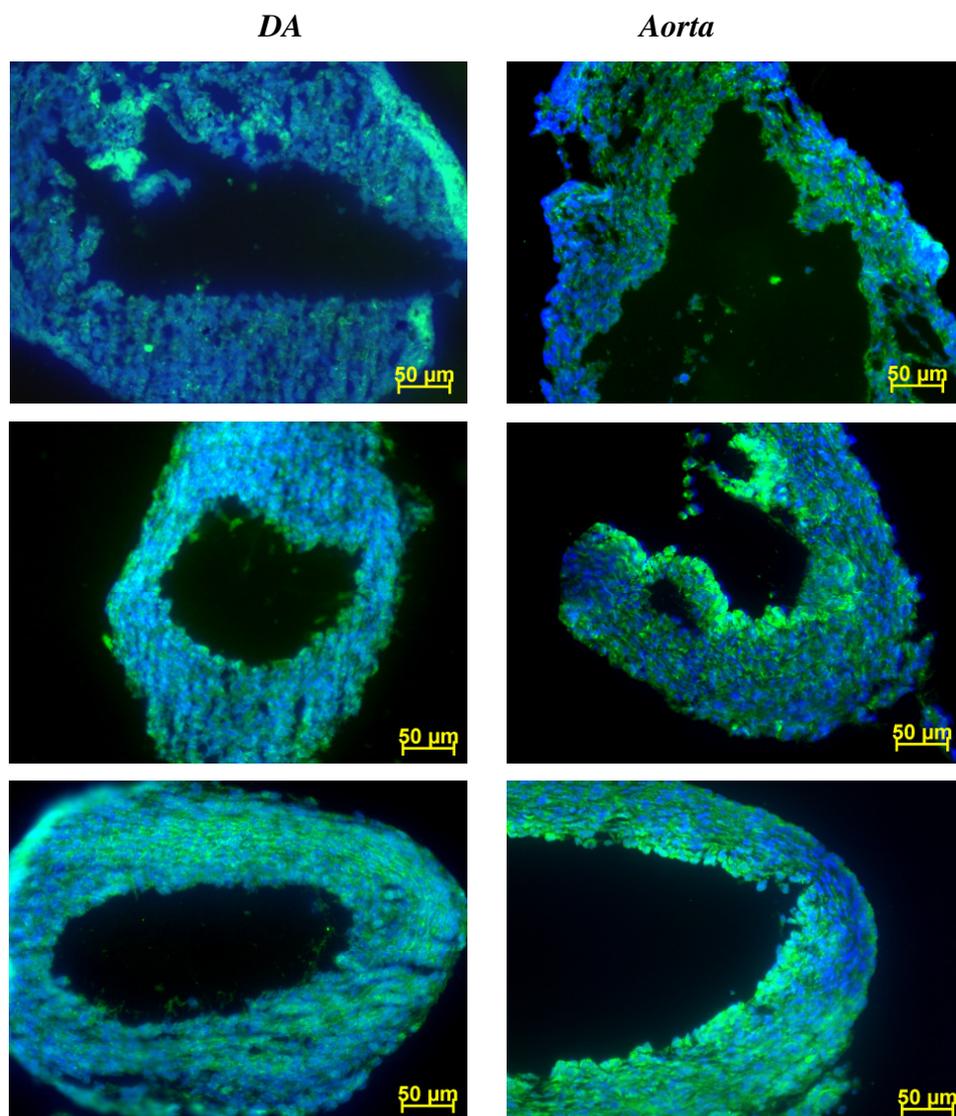


Abb. 14: Immunhistochemische Färbung am DA (linke Säule) und an der Aorta (rechte Säule) durch VEGF- (oben), VEGF-R1- (Mitte) und VEGF-R2 Antikörper (unten).

3.4 Real-Time-PCR

3.4.1 β -Aktin

In dieser Arbeit wurde das Housekeeping Gen β -Aktin zur Normierung in der ΔC_T -Methode verwendet. Die C_T -Werte des Aktin zeigten über den Verlauf der verschiedenen Messungen hinweg eine ausreichende Konstanz in den Proben beider Ursprungsgewebe (DA $21,64 \pm 0,305$ bis $23,2 \pm 0,2659$, Aorta $22,30 \pm 0,4311$ bis $23,48 \pm 0,3415$) (Abbildung 14). Dabei wurde die Normalverteilung der β -Aktinwerte durch den Kolmogorov-Smirnov-Test bestätigt. Die Ergebnisse waren unabhängig von der Inkubationsdauer, der Behandlungsart und der Sauerstoffkonzentration im Versuch. Damit scheint β -Aktin als Referenzgen in diesem Versuchsaufbau geeignet zu sein.

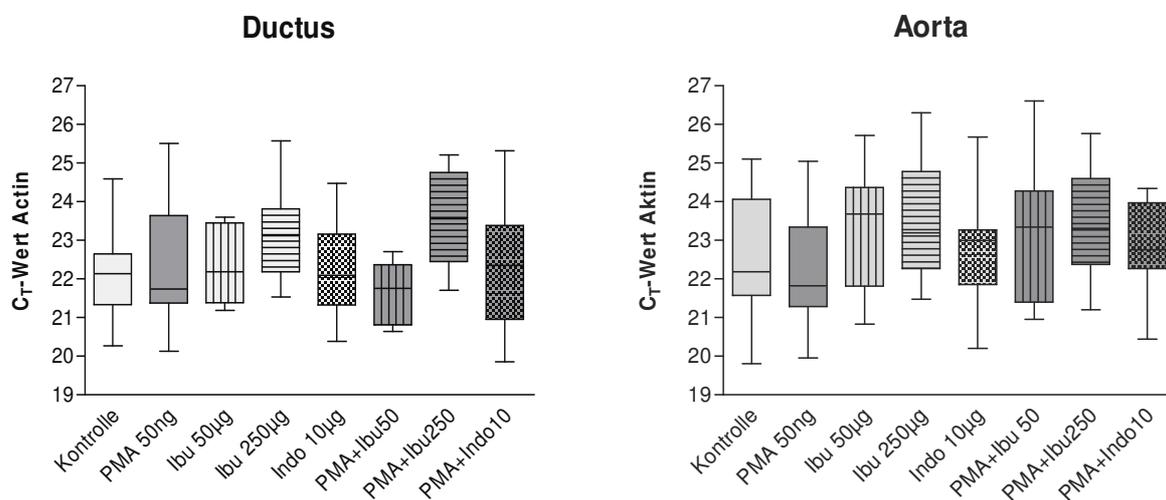


Abb.15: Vergleichende Darstellung aller β -Aktinwerte in Form von Boxplots mit Median und SEM.

3.4.2 PCR-Sonden

Der Nachweis von VEGF und VEGF-R1 erfolgte unter Verwendung der unter 2.9 aufgeführten Sonden und Primerpaare in der Real-Time-PCR konstant mit gut reproduzierbaren Ergebnissen. Darüber hinaus wurde das Produkt dieser drei Sonden und Primerpaare bereits im Rahmen einer anderen Arbeit sequenziert und zeigte ein spezifisches Ergebnis (Peiser, et al. 2005). Im Gegensatz dazu verlief der Nachweis des VEGF-R2 in der PCR anfänglich inkonstant. Da auch eine Veränderung der Reaktionsbedingungen keine adäquate Verbesserung brachte, wurden zwei weitere Sonden- und Primerpaare zum Vergleich eingesetzt. In der Sequenzierung zeigte sich nur für ein Sonden/Primerpaar ein

spezifisches Ergebnis (Abbildung 15). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde diese Sonden/Primerkombination für den Nachweis des VEGF-R2 in der real time PCR eingesetzt.

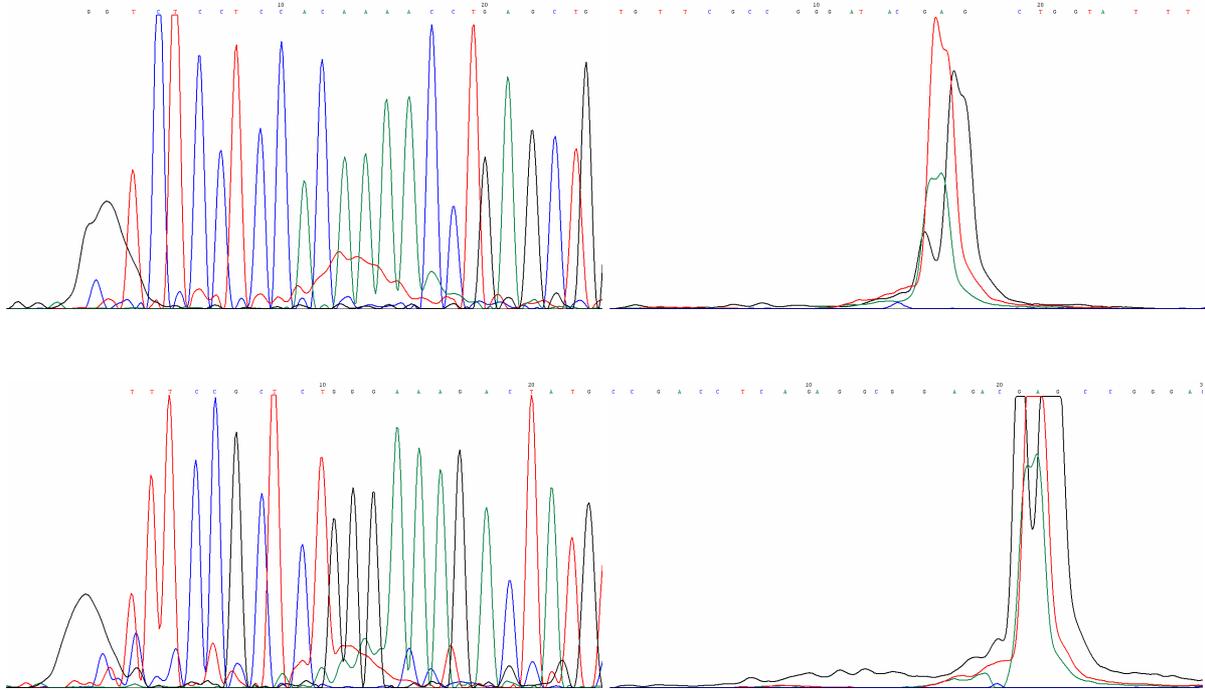


Abb. 16: Vergleich der Sequenzierungsergebnisse von zwei zufällig ausgewählten Ductusendothelzellproben für VEGF-R2 mRNA. Links das spezifische Produkt, der unter 2.10 beschriebenen Sonden/Primerkombination; rechts das unspezifische Produkt der im Vergleich eingesetzten Sonden/Primerkombination (Vorwärts Primer: ACA GTT CCC AGA CTG GTT GG; Rückwärts Primer: GTC ACT GAC AGA GGC GAT GA, Sonde 6-FAM-CTA TCG GGA CAC CGA TGT CT-TAMRA).

3.4.3 Expression von VEGF und seinen Rezeptoren

3.4.3.1 Einfluss von Ibuprofen

DA- Die VEGF, bzw. VEGF-R1 und -R2 mRNA Expression der DAEC variierte in Normoxie abhängig von der COX-Inhibitor Konzentration, der Zugabe von PMA und der Inkubationsdauer (Abbildung 16).

Unter Inkubation mit Ibuprofen 50µg/ml war keine signifikante Änderung der VEGF mRNA Expression zu verzeichnen. Unter Ibuprofen 250µg/ml zeigte sich für VEGF nach 12 Stunden Inkubation eine 70-fache, nach 24 Stunden eine 10-fache Steigerung der mRNA Expression gegenüber der Kontrolle.

Ibuprofen führte in keiner Konzentration zu einer signifikanten Änderung der VEGF-R1 mRNA Expression am Ductusendothel.

Die VEGF-R2 Expression zeigte unter Inkubation mit Ibuprofen eine Steigerung, die nach 12 Stunden Inkubation signifikant wurde.

Aorta- Unter Inkubation mit Ibuprofen 50µg/ml war keine signifikante Änderung der VEGF mRNA Expression zu verzeichnen. Unter Ibuprofen 250µg/ml zeigte sich für VEGF nach 12 Stunden Inkubation eine 10-fache Steigerung der mRNA Expression gegenüber der Kontrolle. Die VEGF-R1 mRNA Expression war in beiden Dosierungen des Ibuprofen nach 24stündiger Inkubationsdauer signifikant 13-/bzw. 11-fach erhöht.

Am VEGF-R2 führte Ibuprofen 50µg/ml nach 12 Stunden Inkubation zu einer 25-fachen Steigerung der mRNA Expression gegenüber der Kontrolle. Die Inkubation mit Ibuprofen 250µg/ml zeigte nach 12stündiger Inkubation eine signifikante Veränderung (5-fache Steigerung) der VEGF-R2 mRNA Expression.

3.4.3.2 Einfluss von Indometacin

DA- Unter Inkubation mit Indometacin 10µg/ml war keine signifikante Änderung der VEGF, VEGF-R1 und -R2 mRNA Expression zu verzeichnen.

Aorta- Nach 12stündiger Inkubationsdauer zeigte Indometacin eine 14-fache Steigerung der VEGF-R2 mRNA Expression. Am VEGF und VEGF-R1 führte Indometacin 10µg/ml zu keiner signifikanten Änderung der mRNA Expression.

3.4.3.3 Einfluss von PMA

Unter Inkubation mit PMA war keine signifikante Änderung der VEGF und VEGF-R2 mRNA Expression am Ductusendothel zu verzeichnen. Nach 6stündiger Inkubationsdauer trat am VEGF Rezeptor 1 unter Inkubation mit PMA eine signifikante Steigerung der mRNA Expression auf.

Am Aortenendothel führte PMA nach 12 Stunden Inkubation zu einer 43-fachen Steigerung der VEGF-R2 mRNA Expression gegenüber der Kontrolle. Auf die Expression von VEGF und VEGF-R1 hatte die Inkubation mit PMA am Aortenendothel keinen signifikanten Einfluss.

Ibuprofen- Am Ductusendothel wurde die VEGF mRNA Expression nach 12 bzw. 24 Stunden Inkubation unter der Kombination von PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung 34-, bzw. 12-fach gesteigert. Die Inkubation mit Ibuprofen 50µg/ml und PMA zeigte keine signifikante Steigerung von VEGF.

Unter Inkubation mit PMA und Ibuprofen 250µg/ml war zu allen Inkubationszeiten eine signifikante Steigerung des VEGF-R1 zu verzeichnen.

Am VEGF-R2 führte Ibuprofen 50µg/ml in Kombination mit PMA nach 12 Stunden Inkubation zu einer 9-fachen Steigerung der mRNA Expression gegenüber der Kontrolle.

Am Aortenendothel zeigte sich unter Ibuprofen 250µg/ml und PMA für VEGF nach 12 Stunden Inkubation eine 15-fache Steigerung der mRNA Expression.

Die VEGF-R1 mRNA Expression war nach 12stündiger Inkubationsdauer unter der Koinkubation von PMA und Ibuprofen 250 µg/ml 6-fach gesteigert.

Am VEGF-R2 führte die Inkubation mit PMA und Ibuprofen 250µg/ml nach 12stündiger Inkubationsdauer zu einer signifikanten 25-fachen Steigerung der VEGF-R2 mRNA Expression. Die Koinkubation mit PMA und niedrig dosiertem Ibuprofen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von VEGF und dessen Rezeptoren am Aortenendothel.

Indometacin- Unter Inkubation mit PMA in Kombination mit Indometacin 10µg/ml war keine signifikante Änderung der VEGF, -R1 und -R2 mRNA Expression am DA und am Aortenendothel zu verzeichnen.

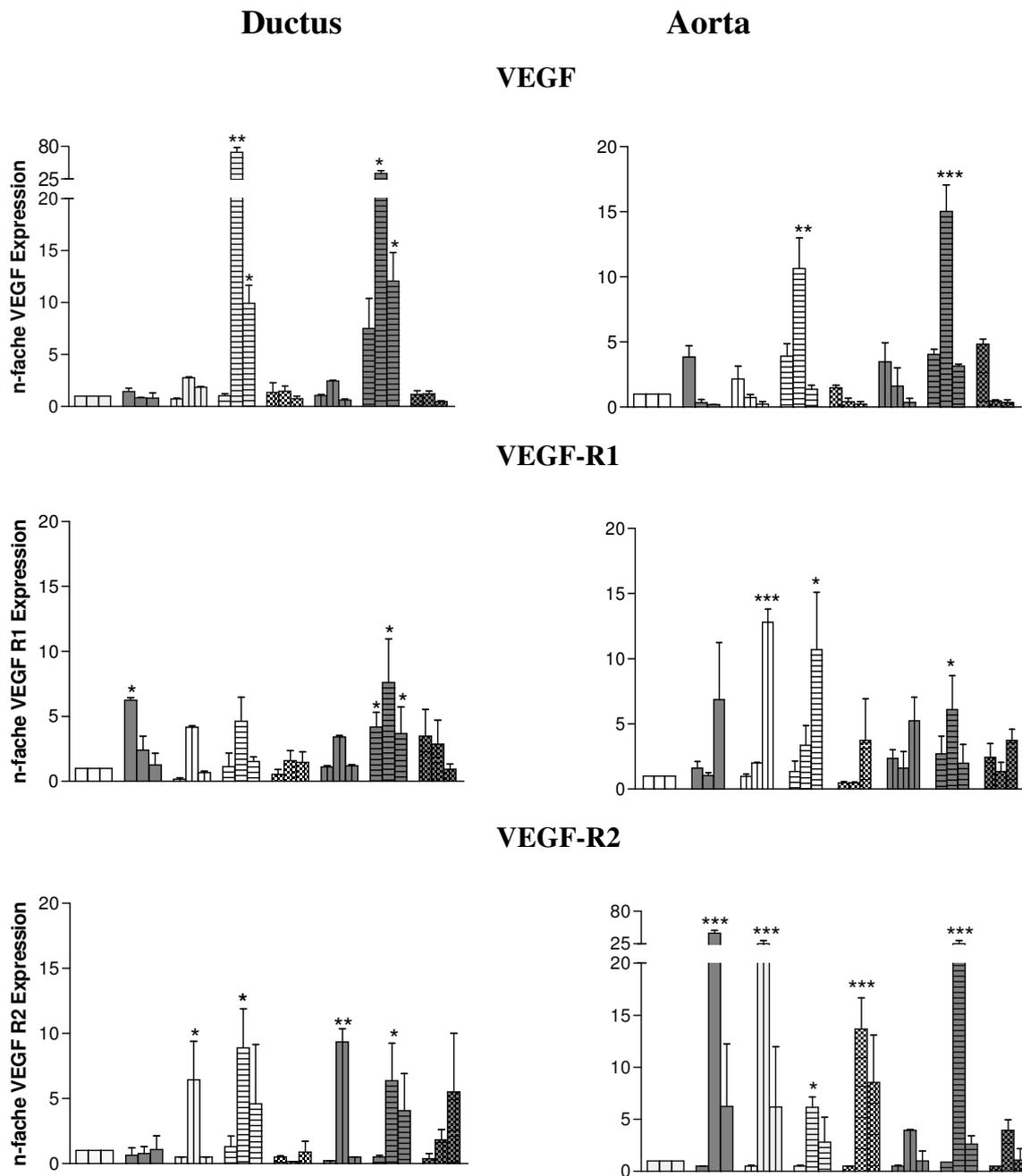
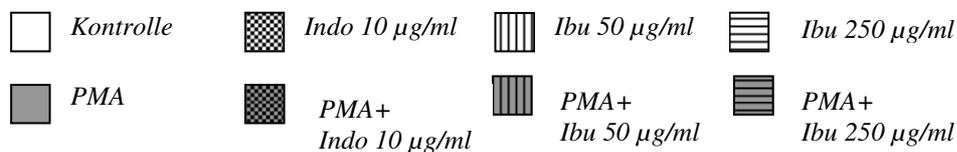


Abb. 17: VEGF, VEGF Rezeptor-mRNA Expression in Normoxie von DA- (linke Spalte) und Aortenendothelzellen (rechte Spalte); mean (+SEM), n=3, nach 6-, 12-, 24-stündiger Inkubation (linke, mittlere, rechte Säule einer Gruppe). * $p < 0,05$ vs., ** $p < 0,01$ vs. und *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle. Zu beachten sind die teilweise unterschiedlich skalierten y-Achsen.



3.4.3.4 Einfluss von Hypoxie

Am Endothelzellkulturmodell zeigte sich unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie keine signifikante Steigerung der VEGF, VEGF-R1 und VEGF-R2 Expression in den Kontrollproben sowohl am DA als auch an der Aorta. (Abbildung 18). In beiden Endothelzellkulturen war das durchschnittliche Expressionsniveau vom VEGF-R2 unter Hypoxie im Vergleich zur Normoxie geringer. Am Aortenendothel war bei keinem der verwendeten Stimulantien eine signifikante Änderung der VEGF, VEGF-R1 und -R2 mRNA Expression unter Hypoxie zu verzeichnen

VEGF- Am Ductusendothel war nach 12 Stunden Inkubationsdauer eine signifikante Steigerung der VEGF Expression unter Ibuprofen 250 mg/ml um das 37-fache und unter Koinkubation mit PMA um das 15-fache zu verzeichnen. Die Stimulation in Hypoxie fiel damit gegenüber der unter Normoxiebedingungen nur ungefähr halb so stark aus.

Am Aortenendothel zeigte die VEGF Expression unter Inkubation mit Ibuprofen 250µg/ml nach 12 bzw. 24 Stunden Inkubation und unter Inkubation mit PMA und Ibuprofen 250µg/ml nach 6 bzw. 24stündiger Inkubationsdauer eine nicht signifikante Steigerung.

VEGF-R1- Die Kombination von Ibuprofen in hoher Dosierung und PMA zeigte am Ductusendothel für den VEGF Rezeptor 1 nach 12 Stunden Inkubation eine 13,5-fache Steigerung der mRNA Expression gegenüber der Kontrolle. Indometacin zeigte keinen Einfluss auf die VEGF-R1 Expression.

VEGF-R2- Am Ductusendothel wurde der VEGF-R2 in Hypoxie unter der Inkubation von PMA und Ibuprofen 50 µg/ml nach 12stündiger Inkubationsdauer 7-fach exprimiert. Hoch dosiertes Ibuprofen und Indometacin in Kombination mit PMA zeigten nach 24 Stunden Inkubation eine tendenzielle Steigerung der VEGF-R2 mRNA Expression, die nicht signifikant war.

Am Aortenendothel zeigte der VEGF Rezeptor 2 keine signifikante Expressionssteigerung unter Hypoxie.

3.4.3.5 Vergleich zwischen DA und Aorta

VEGF- In beiden Endothelzellkulturen zeigte sich hoch dosiertes Ibuprofen allein oder in Kombination mit PMA unter Norm- und Hypoxiebedingungen als potentester Stimulus für die VEGF mRNA Expression. Das VEGF Expressionsniveau war am Ductusendothel unter Inkubation mit Ibuprofen alleine oder in Kombination mit PMA höher als an der Aorta unter den gleichen Bedingungen.

Am Ductusendothel war die VEGF Expression unter Inkubation mit Ibuprofen 250 µg/ml höher als unter der Koinkubation mit PMA. Im Gegensatz dazu zeigte sich an der Aorta eine höhere VEGF Expression unter Koinkubation von Ibuprofen 250 µg/ml und PMA. Dieses galt sowohl für Normoxie- als auch für Hypoxiebedingungen.

VEGF Rezeptor 1- In Normoxie war unter PMA nach 6 Stunden Inkubationsdauer am DA eine signifikante Steigerung der VEGF Rezeptor 1 Expression zu verzeichnen, während am Aortenendothel unter PMA nach 24stündiger Inkubation eine tendenzielle aber nicht signifikante Steigerung auftrat. Im Gegensatz zum DA war der VEGF-R1 am Aortenendothel unter Ibuprofen in beiden Konzentrationen nach 24 Stunden Inkubation signifikant gesteigert. Die Koinkubation von PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung führte in beiden Endothelzellkulturen zu einer Steigerung der VEGF-R1 Expression. Dieser Effekt zeigte sich für das Ductusendothel auch unter Hypoxiebedingungen.

Im Gegensatz zum DA zeigte das Aortenendothel unter Hypoxiebedingungen keine signifikante Steigerung der VEGF-R1 mRNA Expression.

VEGF Rezeptor 2- Das VEGF-R2 Expressionsniveau war am DA unter verschiedenen Bedingungen in Normoxie um ein Vielfaches geringer als am Aortenendothel. Lediglich unter Inkubation mit hoch dosiertem Ibuprofen und der Koinkubation von PMA und niedrig dosiertem Ibuprofen war die VEGF-R2 mRNA Expression am DA im Vergleich zur Aorta signifikant höher. Während am DA in Hypoxie nach 12stündiger Koinkubation mit PMA und Ibuprofen in niedriger Dosierung eine signifikante, in Kombination von PMA mit Indometacin oder Ibuprofen in hoher Dosierung nach 24 Stunden eine tendenzielle Steigerung der VEGF-R2 Expression zu verzeichnen war, wurde der VEGF-R2 an der Aorta kaum exprimiert.

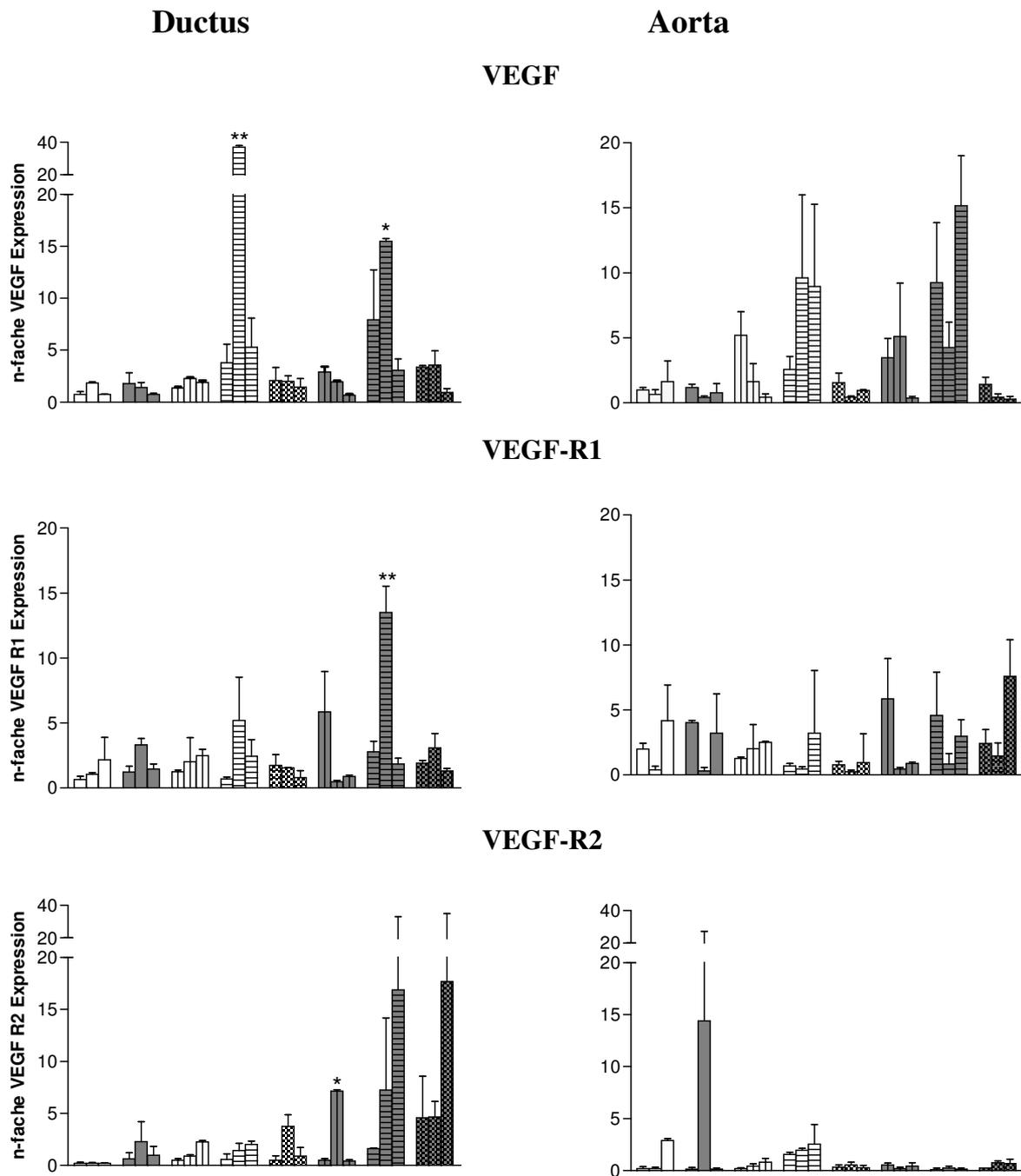
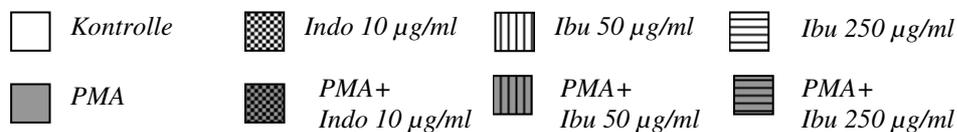


Abb. 18: VEGF, VEGF Rezeptor-mRNA Expression in Hypoxie von DA- (linke Spalte) und Aortenendothelzellen (rechte Spalte); mean (+SEM), n=3, nach 6-, 12-, 24-stündiger Inkubation (linke, mittlere, rechte Säule einer Gruppe). * p<0,05 vs. und ** p<0,01 vs. Kontrolle. Zu beachten sind die teilweise unterschiedlich skalierten y-Achsen.



3.4.3.6 Zeitkinetik

Neben der Frage, ob die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren am Ductus- und Aortenendothel eine Veränderung durch die zum Ductusverschluss eingesetzten Cyclooxygenaseinhibitoren Ibuprofen und Indometacin erfährt, sollte auch geklärt werden, in welchem zeitlichen Zusammenhang zur COX-Inhibitor-Gabe diese Beeinflussung statt findet. Dabei zeigte sich nach einer Inkubationsdauer von 12 Stunden die signifikanteste Steigerung der Expression von VEGF und dessen Rezeptoren unter Inkubation mit hoch dosiertem Ibuprofen allein sowie in Kombination mit PMA an beiden Endothelzellkulturen. Für einige Versuchskonditionen waren sowohl am DA als auch an der Aorta folgende Ausnahmen zu beobachten.

VEGF- Während am Ductusendothel nach 12stündiger Inkubation mit PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung unter Hypoxiebedingungen eine signifikante Steigerung der VEGF mRNA Expression zu zeigen war, trat diese am Aortenendothel erst nach 24stündiger Inkubation auf.

VEGF-R1- Unter Normoxie bewirkte PMA nach 6 Stunden Inkubation am Ductusendothel eine maximale Steigerung der VEGF-R1 Expression während es an der Aorta keinen Einfluss zeigte. Für beide Endothelzellkulturen zeigte die Koinkubation von PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung eine maximale Steigerung der mRNA Expression nach 12 Stunden. An der Aorta war die VEGF-R1 Expression in Normoxie zusätzlich nach 24 Stunden Inkubation mit Ibuprofen in hoher und niedriger Dosierung allein signifikant erhöht.

VEGF-R2- Unter Hypoxie zeigte sich am DA nach 24 Stunden Inkubation mit PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung sowie PMA und Indometacin eine Erhöhung der VEGF-R2 mRNA Expression. Dagegen war an der Aorta unter keiner Versuchsbedingung eine Veränderung der VEGF-R2 Expression gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen.

3.5 VEGF ELISA

Um fest zu stellen ob die unter 3.5 in der PCR für einige Stimuli beobachtete vermehrte Transkription auch zu einer gesteigerten Translation von VEGF führt, erfolgte eine Bestimmung des VEGF Proteins im Zellkulturüberstand mittels ELISA.

Sowohl am DA als auch an der Aorta war unter allen Versuchsbedingungen und zu allen Inkubationszeiten VEGF im Zellkulturüberstand nach zu weisen.

Ibuprofen und Indometacin- In Normoxie war im Vergleich zur Kontrolle weder unter Inkubation mit Ibuprofen in hoher und niedriger Dosierung noch mit Indometacin alleine eine signifikante Zunahme des VEGF Proteins in der Ductus- sowie in der Aortaendothelzellkultur zu verzeichnen.

PMA- Sowohl in der Ductus- als auch in der Aortenendothelzellkultur war unter alleiniger Inkubation mit PMA und unter der Koinkubation von PMA und Indometacin in Normoxie keine Erhöhung des VEGF Proteins im Zellkulturüberstand nachzuweisen. Am Ductusendothel zeigte sich nach 24stündiger Koinkubation von PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung eine maximale Erhöhung des VEGF Proteins. Am Aortenendothel war nach 6-, 12- und 24-stündiger Inkubation mit PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung eine signifikante Steigerung der VEGF Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand zu verzeichnen.

Hypoxie- Unter Hypoxiebedingungen kam es im Zellkulturüberstand der Ductusendothelien nach 6-, 12- und 24stündiger Inkubation zu einer nicht signifikanten Zunahme der VEGF Proteinkonzentration. Nach 6 Stunden Inkubation konnte in den Ductusendothelien unter der Koinkubation von PMA und Ibuprofen 250µg/ml eine signifikante Erhöhung des VEGF Proteins gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Nach 24stündiger Koinkubation von PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung zeigte sich gegenüber der Normoxie eine deutlich geringere VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand. Am Aortenendothel waren die unter Hypoxie gemessenen VEGF Konzentrationen nahezu identisch mit denen unter Normoxiebedingungen. Unter Hypoxie war an der Aorta nach Koinkubation von Ibuprofen 250µg/ml und PMA eine signifikante Erhöhung der VEGF Proteinkonzentration gegenüber der Kontrolle nach zu weisen, die nach 24 Stunden Inkubation ein Maximum erreichte .

DA vs. Aorta- In beiden Endothelzellkulturen war analog zu den PCR-Ergebnissen eine maximale Ausschüttung von VEGF in das Zellkulturmedium unter Koinkubation von PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung unter Norm- und Hypoxiebedingungen zu verzeichnen.

Nach 6stündiger Inkubation war die VEGF Konzentration am Ductusendothel höher als in den Proben der Aorta unter den gleichen Bedingungen. Nach 24 Stunden Inkubation war die VEGF Konzentration unter Hypoxie im Zellkulturüberstand der Aortenendothelien durchschnittlich höher als im Überstand der Ductusendothelzellen. Die VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand beider Endothelzellkulturen war nach 24stündiger Inkubation höher als ihr Ausgangswert nach sechs Stunden Inkubationsdauer (Abbildung 19). Erstmals lag nach 24 Stunden Inkubation die im Zellkulturüberstand der Aortenendothelien gemessene durchschnittliche VEGF Konzentration höher als im Überstand der DAEC. In beiden Endothelzellkulturen war das Verhalten gegenüber verschiedenen Stimuli nahezu identisch (Abbildung 19). Sowohl die Ductus- als auch die Aortenendothelien zeigten unter Normoxie- und Hypoxiebedingungen bei Zugabe von PMA und Ibuprofen 250µg/ml eine signifikante Steigerung des VEGF-Proteingehalts im Medium.

Zeitkinetik- Im Zellkulturüberstand beider Endothelzellkulturen war unter Normoxiebedingungen nach 6stündiger Inkubation mit PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung eine tendenzielle bzw. signifikante Erhöhung der VEGF Proteinkonzentration zu verzeichnen. Nach 12 Stunden Inkubation änderten sich die Ergebnisse nur geringfügig. Die maximale VEGF Proteinkonzentration im Überstand der Endothelzellkulturen wurde nach 24 Stunden Koinkubation unter PMA und Ibuprofen 250µg/ml erreicht.

Unter Hypoxiebedingungen war die VEGF Konzentration am DA nach 6 Stunden Inkubation mit PMA und Ibuprofen 250µg/ml am höchsten. Am Aortenendothel war die maximale VEGF Proteinkonzentration auch unter Hypoxiebedingungen nach 24stündiger Inkubation mit PMA und Ibuprofen in hoher Dosierung erreicht.

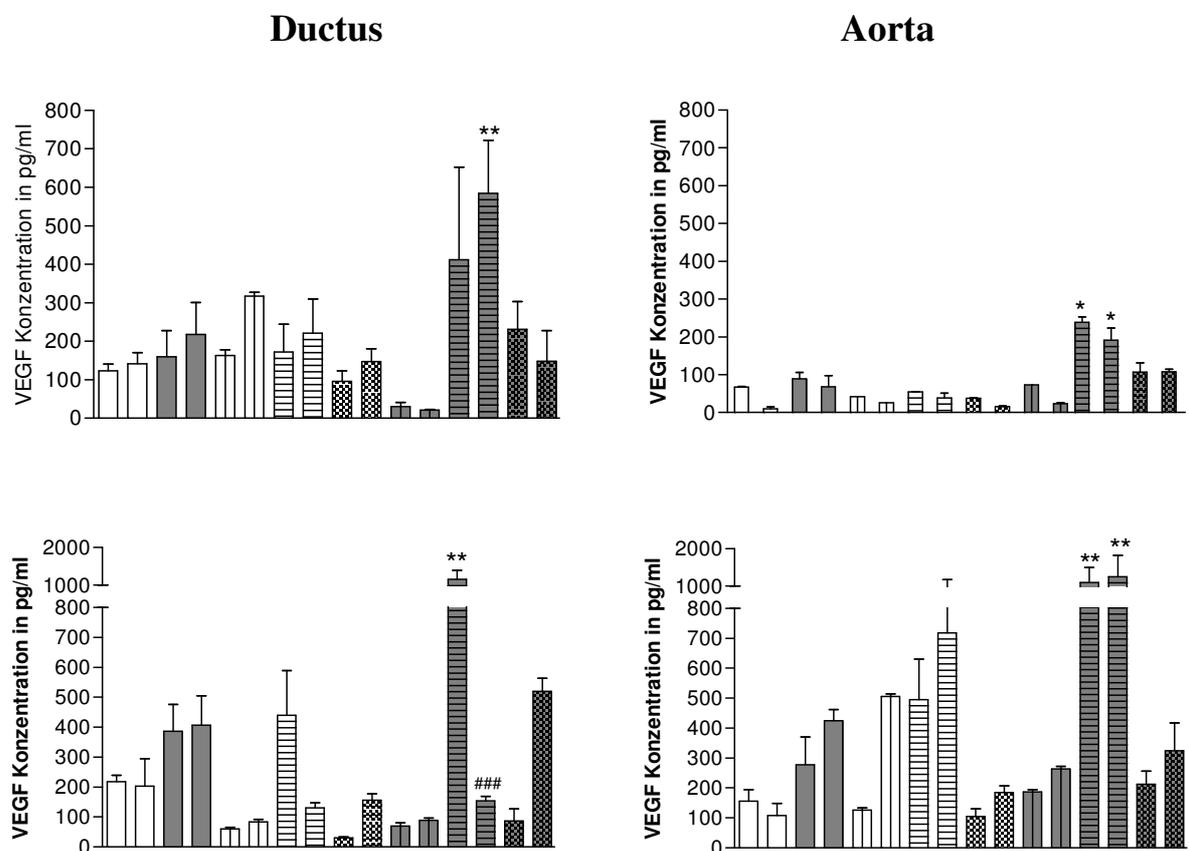
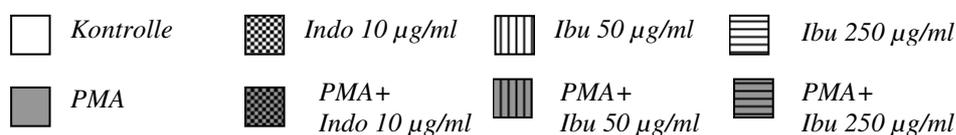


Abb. 19: VEGF Konzentration im Überstand von DA- (linke Spalte) und Aortenendothelzellen (rechte Spalte); nach 6 (obere Reihe) bzw. 24 Stunden Inkubation (untere Reihe) jeweils im Vergleich von Normoxie (linke Säule) und Hypoxie (rechte Säule); mean (+SEM) aus n=3 Versuchen, * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle. Zu beachten sind die teilweise unterschiedlich skalierten y-Achsen.



4. Diskussion

4.1 Ergebnisdiskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, VEGF und seine Rezeptoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen am embryonalen DA mit denen an der Aorta, ein Gefäß, welches postnatal keine morphologischen Veränderungen erfährt, zu vergleichen. Besonderes Interesse galt den am DA spezifischen Veränderungen, die Rückschlüsse auf die Rolle des VEGF/VEGF Rezeptorsystems während des Ductusverschlusses zulassen. Über dieses wichtige Regulatorsystem der Vaskulo- und Angiogenese liegen bis heute kaum Erkenntnisse im Hinblick auf seine Bedeutung beim Ductusverschluss vor. Zur Durchführung der Untersuchungen wurde ein Zellkulturmodell von embryonalen Ratten-DA- und Aortenendothelzellen neu etabliert.

In diesem Projekt wurden Veränderungen der Expression von VEGF und seinen Rezeptoren auf mRNA und Proteinebene unter Einsatz der COX-Inhibitoren Ibuprofen und Indometacin an Ductusendothelien nachgewiesen. Die primären Endothelzellkulturen aus DA und Aorta zeigten entsprechend ihrer unterschiedlichen postnatalen Bestimmung ein differentielles Verhalten gegenüber den Stimuli, wobei die beobachteten Veränderungen sowohl abhängig von der Wahl und Konzentration der COX-Inhibitoren, als auch von der vorherrschenden Sauerstoffspannung waren und eine jeweils spezifische Zeitkinetik aufzeigten.

VEGF

Zusammenfassung der Ergebnisse- Sowohl in der Ductus- als auch in der Aortenendothelzellkultur zeigten niedrig dosiertes Ibuprofen, Indometacin und PMA alleine und in Kombination miteinander keine signifikante Auswirkung auf die VEGF mRNA Expression. Hoch dosiertes Ibuprofen allein oder in Kombination mit PMA präsentierte sich dagegen in beiden Endothelzellkulturen sowohl unter Normoxie- als auch unter Hypoxiebedingungen als potentester Stimulus für die VEGF mRNA Expression. Das erreichte VEGF Expressionsniveau war dabei am DA höher als an der Aorta. Unter Normoxie- wie unter Hypoxiebedingungen zeigte sich am DA unter der Koinkubation von PMA und Ibuprofen 250µg/ml in der Zeitkinetik ein Expressionsmaximum nach jeweils 12stündiger Inkubationsdauer.

Analog zu den PCR Ergebnissen ließ sich in nahezu allen Proben der Ductus- als auch der Aortenendothelzellkultur VEGF Protein im Zellkulturüberstand mittels VEGF ELISA nachweisen. Die maximale Ausschüttung von VEGF in das Zellkulturmedium war dabei unter Koinkubation von PMA und Ibuprofen 250µg/ml in Norm- und Hypoxiebedingungen zu verzeichnen. Die durchschnittlich gemessene Konzentration war im Zellkulturüberstand der

Aortenendothelzellkultur höher als am Ductusendothel. Einzig nach 6stündiger Inkubation war die VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand des DA deutlich höher als an der Aorta.

Im MTT-Assay zeigte sich in Normoxie unter der Inkubation von Indometacin in Kombination mit PMA, eine erhöhte Zellvitalität sowohl für die Ductus- als auch für Aortenendothelzellen. Zusätzlich zeigte Indometacin in Kombination mit PMA in der Aortenzellkultur unter Hypoxiebedingungen eine deutliche Zellvitalitätssteigerung. Dagegen bewirkte Ibuprofen in Kombination mit PMA am Ductusendothel unter Hypoxie eine Vitalitätshemmung um 38% bzw. 46%.

Diskussion-

In der vorliegenden Arbeit wurde VEGF mRNA und VEGF Protein sowohl in der Ductus- als auch der Aortenendothelzellkultur nachgewiesen. Das Vorkommen von VEGF mRNA und Protein konnte bereits im DA-Gewebe verschiedener Spezies bewiesen werden (Clyman et al., 2002). Im humanen DA wurde VEGF immunhistochemisch im Endothel, der Intima und Media nachgewiesen (Weber et al., 2008). Die Arbeitsgruppe von Clyman et al. zeigte in ihrer Studie, dass VEGF eine essentielle Rolle während der Vasa vasorum Einsprossung und Migration der Glattmuskelzellen spielt (Clyman et al., 2001). Auch an anderen Stellen der Embryo- oder Angiogenese konnte in ähnlicher Weise über eine erhöhte Konzentration von VEGF dessen Bedeutung für den jeweiligen Entwicklungsmechanismus nachgewiesen werden. So wurde z.B. in einer Studie von Eichmann et al. gezeigt, dass ausschließlich in der Anwesenheit von VEGF-A aus Hämangioblasten Angioblasten und damit EC gebildet werden, während in Abwesenheit von VEGF aus Hämangioblasten hämatopoetische Stammzellen generiert werden (Eichmann et al., 1997).

Hierzu passt die in der vorliegenden Arbeit gezeigte gefäßspezifisch unterschiedliche VEGF mRNA- und Proteinexpression. Dabei waren die unter Inkubation mit den verschiedenen Stimulantien aufgetretenen Veränderungen in den Ductusendothelien im Vergleich zu den Aortenendothelien unter nahezu allen Bedingungen deutlicher nachweisbar. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass VEGF nicht nur im Rahmen der Angio- und Vaskulogenese eine entscheidende Rolle spielt, sondern ebenfalls eine besondere Bedeutung bei den morphologischen Veränderungen während des Ductusverschlusses zu besitzen scheint. Bekanntermaßen wird VEGF unter anderem hypoxieabhängig über den Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert. In der vorliegenden Arbeit kam es unter Hypoxie überraschenderweise in der Ductusendothelzellkultur im Vergleich zur Normoxiekontrolle jedoch nicht zu einer gesteigerten VEGF mRNA-, VEGF Proteinexpression oder einer veränderten Stoffwechselaktivität. Hierfür

gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Einige Gegebenheiten des vorliegenden Zellkulturmodells könnten zu einer relativen Unempfindlichkeit der EC gegenüber Hypoxie führen. So kommt es möglicherweise durch die Prozessierung des DA-Gewebes zu einer hypoxischen Präkonditionierung der EC. Des Weiteren handelt es sich hier um embryonales endotheliales Gewebe, welches häufig durch eine größere Robustheit gegen reinen Sauerstoffmangel gekennzeichnet ist. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde außerdem eine reine Hypoxie ohne Substratmangel ausgeführt, die anders als eine Ischämie bei ausreichenden Glukosevorkommen gut durch das embryonale Gewebe kompensiert werden kann. Bereits Clyman et al. hatten in einer Studie beschrieben, dass nur eine ausreichend ausgeprägte Hypoxie zum anatomischen Remodeling des DA und damit zu seinen morphologischen Veränderungen führen kann (Clyman et al. 1999).

Je nach zellulärer Ausstattung und Hypoxiegrad vermittelt HIF-1 entweder Anpassung und Proliferation oder Untergang und Zelltod durch Apoptose und Nekrose (Iida et al., 2002). In einer Arbeit von Marti wurde gezeigt, dass die Endothelien verschiedener adulter muriner Gewebe unter Normoxie eine differentielle VEGF-Expression aufweisen und diese unter Hypoxie unterschiedlich stark reguliert wird (Marti et al., 1998). So war VEGF in pathologischen Prozessen wie z.B. Tumorwachstum mit dem Ziel der Gefäßeinsprossung und der besseren Gewebeversorgung stark induzierbar, während VEGF in Geweben mit konstitutioneller VEGF Expression zur Aufrechterhaltung der Gefäßfunktionen und der physiologischen Prozesse nicht induzierbar war oder die Expression sogar unterdrückt wurde. Interessanterweise spielt auch der Ursprungsort der EC und die spätere Bestimmung des Gefäßes hierbei eine Rolle. Letztlich ist ein Effekt auf die VEGF Expression durch Hypoxie eher an den anderen Zelltypen des DA zu erwarten. Während des physiologischen Ductusverschlusses „triggern“ die EC Umbau- und Anpassungsprozesse am DA, während vor allem Glattmuskelzellen und Fibroblasten für die Umbauprozesse verantwortlich sind, die einem definitiven Verschluss vorausgehen. Die vorher zum vollständigen anatomischen Ductusverschluss postulierte erforderliche ausreichende Hypoxie ist demnach vor allem auf die Glattmuskelzellen zu beziehen. So haben andere Studien bereits gezeigt, dass unter Hypoxie überwiegend die Glattmuskelzellen des DA mit einem signifikanten Anstieg des VEGF reagierten, während am Endothel selbst kaum ein Einfluss nach zu weisen war (Clyman et al., 2001).

Die Zugabe des nicht selektiven COX-Inhibitors Ibuprofen führte nach 12 Stunden zu einer dosisabhängigen maximalen Steigerung der VEGF Expression. Der Effekt war in den EC des

DA viel ausgeprägter als in der Aorta. Im MTT-Assay zeigte sich unter Inkubation mit Ibuprofen keine Änderung der Stoffwechselaktivität und kein vermehrter Zelluntergang.

Nach meinem Wissen gibt es bisher keine Studien zum Einfluss von Ibuprofen auf die VEGF-Expression am DA. In Untersuchungen an der Rattenretina und ovariellen Tumorzellen führte Ibuprofen zu einer Hemmung der COX-assoziierten VEGF Expression (Beharry et al., 2006). Die Ergebnisse aus epithelialen Zelllinien bzw. Gefäßhomogenisaten sind entgegengesetzt zu denen in der vorliegenden Arbeit, was nicht unbedingt ein Widerspruch sein muss, da hier eine reine Endothelzellkultur verwendet wurde. Über die Funktion der VEGF Erhöhung unter Ibuprofengabe kann nur spekuliert werden, da es sich hierbei um ein völlig neues Ergebnis handelt. COX-1 und 2 wurden bereits im DA verschiedener Spezies nachgewiesen. Rheinländer et al. haben gezeigt, das COX-1 Protein im humanen DA mit steigendem Gestationsalter zunehmend exprimiert wird, während COX-2 Protein pränatal eher moderat und unabhängig vom Gestationsalter vorhanden ist (Rheinländer et al. 2006). Möglicherweise schafft die COX-Inhibition eine „pathologische“ Situation an den Ductusendothelzellen, die im Gegensatz zu den anderen Versuchsbedingungen durch verstärkte VEGF Transkription zur Angiogenese führt, welche natürlich in der Media, nicht im Endothel selbst stattfindet. Vielleicht handelt es sich hier um einen Teil des Mechanismus, über welchen der Einsatz von COX-Inhibitoren parakrin via vermehrte Proliferation der benachbarten Glattmuskelzellen zum Verschluss des DA führt. Eine autokrine VEGF Wirkung wird vermutlich über die Rezeptoren vermittelt, die ebenfalls unter hoch dosierter Ibuprofengabe hoch reguliert werden (s.u.). So könnte VEGF an den Ductusendothelzellen autokrin eine nicht-proliferative Wirkung für den Ductusverschluss entfalten, indem z.B. die Ausschüttung weiterer Wachstumsfaktoren, die Permeabilität der Endothelien und die NO-Produktion beeinflusst werden. Es ist bereits bekannt, dass im Rahmen der Angiogenese Wachstumsfaktoren parakrin die Ausschüttung von VEGF beeinflussen (Ferrara et al., 1997), so dass eine umgekehrte Beeinflussung am DA nahe liegt. Interessanterweise scheint dieser Effekt dosisabhängig zu sein, da v.a. unter hoch dosiertem Ibuprofen eine gesteigerte VEGF mRNA Expression nach zu weisen war. Mit den derzeit in der Klinik verwendeten Dosen unter der bisher üblichen Applikation von 10-5-5 mg Ibuprofen alle 24 Stunden werden Wirkspiegel erreicht, die der niedrigen Ibuprofen-Versuchskonzentration in der vorliegenden Arbeit entsprechen. Ibuprofenkonzentrationen von 250µg/ml sind eher denkbar nach Einführung der derzeit in Erprobung befindlichen Dosierung von 20-10-10 mg alle 24 Stunden. In wieweit jedoch die *in vitro* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf *in vivo* Verhältnisse übertragbar sind, bleibt abzuwarten.

Der Zusatz des ebenfalls nicht selektiven COX-Hemmers Indometacin führte in diesem Zellkulturmodell im Gegensatz zu Ibuprofen nicht zu einer Veränderung der VEGF Expression. An der Rattenretina sowie deren Gefäßen hemmt Indometacin die VEGF 165 mRNA Expression dosisunabhängig (Beharry et al. 2006). Die Ursache für die unterschiedliche Wirkung der beiden COX-Inhibitoren könnte in ihrer unterschiedlichen Selektivität für die COX-1 und -2 liegen. Zu dieser These finden sich unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur. COX-2 selektive Inhibitoren hemmen die VEGF Expression und Neovaskularisation an gelaserter Rattenretina (He et al. 2007). In einer Prostatakarzinomzelllinie kam es dagegen nicht zu einer Hemmung von VEGF durch einen COX-2-selektiven Inhibitor. Im klinischen Gebrauch wirkt sich die unterschiedliche COX-Selektivität von Ibuprofen und Indometacin eher im Nebenwirkungsprofil aus. Unter der Therapie mit Ibuprofen zeigte sich eine geringere Inzidenz von Oligurien (NNT 9; 95%CI 5-14). Dagegen trat eine chronische Lungenerkrankung (erhöhte Sauerstoffzufuhr am 28. Lebensstag) signifikant häufiger in der Ibuprofengruppe auf (RR 1,37; 95%CI 1,01-1,86) (Ohlsson et al., 2003). Weitere Studien bestätigten diese Ergebnisse und zeigten zusätzlich einen deutlich geringeren Anstieg des Serumkreatinins bei höherer Urinausscheidung und höherer Kreatinin-Clearance unter den mit Ibuprofen Behandelten, sowie einen geringeren Einfluss auf den cerebralen und mesenterialen Blutfluss (van Overmeire et al., 2003; Thomas et al., 2005). Das unterschiedliche Nebenwirkungsprofil der beiden COX-Inhibitoren zeigte in zahlreichen randomisierten Studien zum Vergleich der Wirksamkeit von Ibuprofen und Indometacin in den derzeit gebräuchlichen Dosierungen keine Auswirkung auf die Effektivität bezüglich des Verschlusses eines PDA (Patel et al., 1995; van Overmeire et al., 1997). In einer Metaanalyse von Ohlsson et al. wurde bei 509 Patienten eine vergleichbare PDA-Verschlussrate von 70% nach frühtherapeutischem Einsatz beider COX-Inhibitoren nachgewiesen (Ohlsson et al., 2008). Einen anderen klinisch relevanten Einfluss auf den Verschluss des DA stellen Entzündungen dar. Unter schweren septischen Krankheitsbildern kommt es häufig zur Wiedereröffnung eines bereits verschlossenen DA oder dieser wird durch eine Zunahme des Shuntvolumens hämodynamisch relevant und somit behandlungsbedürftig. In humanen Mamma- und Prostatazelllinien führte eine Zugabe von PMA als klassischer Auslöser einer Inflammationsreaktion vermutlich über eine Aktivierung der COX-2 zu einer hypoxieunabhängigen Erhöhung der VEGF Expression (Kolch et al., 1995). Diese Erhöhung ist wiederum durch Phosphokinaseinhibitoren hemmbar. Die Interaktion zwischen Inflammation und Angiogenese ist mehrfach beschrieben. So wirkt der Wachstumsfaktor VEGF im entzündeten Gewebe oftmals als Zytokin, indem er die Gefäßpermeabilität des Endothels erhöht.

Außerdem aktiviert VEGF das Immunsystem der Gefäßwand und stimuliert zusätzlich die Produktion von proangiogenetischen inflammatorischen Zytokinen (Aplin et al., 2006).

In dem vorliegenden Zellkulturmodell führt jedoch die Zugabe von PMA unabhängig von der anliegenden Sauerstoffspannung nicht zu einer erhöhten VEGF mRNA Expression. Die fehlende VEGF Aktivierung unter PMA und die teilweise Unterdrückung der VEGF mRNA Expression unter Koinkubation von PMA und hoch dosiertem Ibuprofen passen zu der von uns beobachteten Steigerung der VEGF-Expression durch COX-Inhibition. Dieses Ergebnissystem scheint in sich konsistent, einfach zu erklären ist diese Beobachtung jedoch nicht. Weitere Fragen werden durch meine Beobachtungen aufgeworfen:

1. Wie sind COX-1 und -2 in den Ductusendothelzellen exprimiert? Beide wurden im DA des Menschen und verschiedener Mammalia nachgewiesen (Rheinländer et al., 2006).
2. Welcher Signaltransduktionsweg ist für die partielle Hemmung der durch Ibuprofen induzierten VEGF Expression durch PMA denkbar?

Letztlich wird nur eine Untersuchung von COX-1 und -2 Expression sowie von HIF-1 alpha in dem hier entwickelten Zellkulturmodell zur Klärung der Signalvermittlung beitragen.

Ziel der hier durchgeführten ELISA-Untersuchung war es, die Ergebnisse der PCR auf Translationsebene nachzuvollziehen. Der höchste Proteinanstieg war unter Koinkubation von PMA und hoch dosiertem Ibuprofen zu verzeichnen. Auf Proteinebene kam es auch unter Zusatz von hoch dosiertem Ibuprofen zu einem VEGF Anstieg, aber weder der Effekt noch die Relationen der Ergebnisse waren so deutlich ausgeprägt wie auf mRNA-Ebene. Möglicherweise wurde in den Versuchen eine VEGF Isoform ausgeschüttet, z.B. das VEGF 189, welches nicht mit dem ELISA nachgewiesen wird. Außerdem könnte die Messung des Proteins zu spät erfolgt sein und das Maximum schon vor dem 24h-Zeitpunkt gelegen haben. Des Weiteren ist denkbar, dass es trotz erhöhter Transkription nicht zu einer gesteigerten Translation kommt, sondern eine Wirkung zunächst über die Aktivierung der Rezeptoren durch die erhöhte VEGF mRNA Expression in der Zelle vermittelt wird.

VEGF-Rezeptoren

Die VEGF-Wirkung wird über die VEGF-Rezeptoren R1, 2 und 3 vermittelt, klassische 7-Domänen-Transmembran-Tyrosinkinase mit einer intrazellulären Kinase-Einheit, die die intrazelluläre Signaltransduktion durch Phosphorylierung steuern. Ein „knock out“ geht bei allen drei Rezeptoren mit Letalität im Embryonalstadium einher. Wenig ist bisher bekannt über die Expression und vor allem Regulation der VEGF-Rezeptoren am Endothel des DA.

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA Expression des VEGF-R1 und -R2 am embryonalen DA und Aortenendothel untersucht.

VEGF Rezeptor 1

Zusammenfassung der Ergebnisse- In beiden Endothelzellkulturen konnte keine Beeinflussung der VEGF-R1 Genexpression durch Indometacin nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die Koinkubation von PMA und Ibuprofen 250µg/ml in Normoxie eine maximal signifikante Steigerung der mRNA Expression nach 12 Stunden. Dieser Effekt wiederholte sich im Ductusendothel auch unter Hypoxiebedingungen. Im Gegensatz dazu zeigte das Aortenendothel unter Hypoxiebedingungen keine signifikante Steigerung der VEGF-R1 mRNA Expression.

Zusätzlich war an der Aorta die VEGF-R1 Expression in Normoxie nach 24stündiger Inkubation mit Ibuprofen sowohl in niedriger als auch in hoher Dosierung signifikant erhöht. In Normoxie war unter PMA nach 6 Stunden Inkubationsdauer am DA eine signifikante Steigerung der VEGF-R1 Expression zu verzeichnen, während am Aortenendothel unter PMA nach 24stündiger Inkubation lediglich eine tendenzielle aber nicht signifikante Steigerung auftrat.

Diskussion- Der VEGF-R1 (=flt) ist in der Ductusendothelzellkultur exprimiert, hat aber im Vergleich zum VEGF-R2 ein eher moderates Expressionslevel. Die Aufgabe des VEGF-R1 besteht u.a. in der Vermittlung der Endotheldifferenzierung und der Mediation der Gefäßorganistaion. Dazu bewirkt er am Endothel eine Hemmung der VEGF Wirkung durch Phosphorylierung seines Liganden und unterstützt eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Takahashi et al., 2005). Knock-out-Phänotypen weisen einen Endothelzellüberschuss ohne Fähigkeit zur Organisation in Gefäßen auf. Während der Rattenentwicklung wurde bereits ein differentielles Expressionsmuster in verschiedenen Organen nachgewiesen (Veikkola et al., 2000). Weber et. al. haben sein Vorkommen im humanen embryonalen DA gezeigt, wobei spätere Reifestadien eine moderatere Expression aufwiesen (Weber et al., 2008).

Obwohl der VEGF-R1 ebenso wie VEGF über HIF hypoxiereguliert ist, wie bereits an HUVEC Zellen gezeigt (Gerber et al., 1997), kam es in der vorliegenden Arbeit nicht zu einer erhöhten mRNA Expression unter Hypoxie. Der Einfluss der Hypoxie in diesem Endothelzellkulturmodell wurde bereits im Zusammenhang mit der VEGF Expression diskutiert (siehe oben).

Die Zugabe von PMA führt nach 6 Stunden zu einer erhöhten VEGF-R1 mRNA Expression, der Effekt ist in Kombination mit hoch dosiertem Ibuprofen noch ausgeprägter und länger anhaltend. Unter Hypoxie zeigt sich nur in dieser Kombination eine Erhöhung. Im Aortenendothel kommt es nicht zu einer signifikanten Veränderung unter den genannten Bedingungen. Möglicherweise deutet sich hier ein weiterer Grund für den fehlenden Nachweis eines VEGF und VEGF-R1

Anstiegs in meinem Modell an, dieser könnte außerhalb des hier untersuchten Zeitfensters liegen und somit von uns nicht gezeigt werden. Am Aortenendothel zeigte sich jedoch eine tendenzielle Steigerung der VEGF-R1 mRNA Expression unter Inkubation mit PMA nach 24 Stunden. Möglicherweise gibt es ebenso wie bei der Hypoxie eine abgestufte Regulation abhängig vom Grad der Inflammation, bei der es zunächst zur vermehrten Expression des Rezeptors und zur Ausschüttung bereits vorhandener VEGF-Reserven kommt, ähnlich wie bei Thrombozyten nach PMA-Gabe beschrieben (Koehne et al., 2000). Die Transkription von VEGF könnte später oder erst durch einen stärkeren Reiz ausgelöst einsetzen. Es gibt bisher am DA keine Studie zur VEGF-R1 Expression nach PMA-Gabe, jedoch wird der Inflammationsinduktor in anderen Untersuchungen oft als Marker für PMA-induzierte primäre und Neovaskulogenese mitbestimmt (Fitzgerald et al., 2009). Interessanterweise spielt in dem vorliegenden Modell unter Einfluss von PMA am Ductusendothel eher der VEGF-R1 eine Rolle, während am Aortenendothel der VEGF-R2 hoch reguliert ist.

Unter alleinigem Zusatz von Ibuprofen kam es, ebenso wie bereits in der Rattenretina gezeigt (Beharry et al. 2006), zu einer nicht signifikanten Erhöhung der VEGF-R1 mRNA Expression. Unklar bleibt in diesem Zusammenhang der ausbleibende Anstieg des VEGF-R1 unter Ibuprofengabe, wenn man eine gleichsinnige Regulation von VEGF und -R1 über HIF annimmt. Unter Zugabe von Indometacin ist keine Veränderung der Expression nachweisbar, ebenso wie in der Rattenretina (Beharry et al. 2006). In der Choroidea und mikrovaskulären EC der Ratte führte Indometacin zu einer Hemmung oder besser Nichtaktivierung der VEGF und VEGF-R1 Expression und Neovaskularisation über eine vermehrte Expression des von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgens und der damit einhergehenden vermehrten Ubiquitinierung des HIF (Jones et al., 2002). Hier finden wir erneut einen unterschiedlichen Effekt der beiden COX-Inhibitoren, wie bereits oben für VEGF beschrieben.

VEGF Rezeptor 2

Zusammenfassung der Ergebnisse- Am Ductusendothel zeigte die mRNA Expression des VEGF Rezeptor 2 unter Indometacin, PMA und der Kombination von Indometacin und PMA keine Veränderung. Ebenso konnte unter Hypoxie am DA kein zusätzlich positiv stimulierender Effekt gegenüber der Normoxie nachgewiesen werden. Unter der Koinkubation von PMA und Ibuprofen 50µg/ml war in Hypoxie eine signifikante Expressionssteigerung am DA zu verzeichnen. In Normoxie war jeweils nach 12 Stunden Inkubation mit Ibuprofen 50µg/ml, Ibuprofen 250µg/ml und in jeweiliger Koinkubation mit PMA eine signifikante Steigerung des VEGF-R2 zu verzeichnen.

Die Aortaendothelien zeigten im Allgemeinen eine höhere VEGF-R2 Ausprägung in der vorliegenden Arbeit. Unter Inkubation mit Ibuprofen 50µg/ml war nach 12 Stunden Inkubation eine höhere Steigerung der VEGF-R2 mRNA zu erreichen als unter Inkubation mit Ibuprofen 250µg/ml. Die maximale Expressionssteigerung wurde nach 12 Stunden Inkubation mit PMA erreicht. Die Koinkubation von PMA mit Ibuprofen 250µg/ml zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der VEGF-R2 mRNA. Erstmals war auch unter der Inkubation mit Indometacin nach 12 Stunden eine Genexpressionssteigerung zu verzeichnen. Dahingegen zeigte sich am Aortenendothel keine zusätzliche positive Stimulation unter Hypoxie. Das Expressionslevel war hier deutlich geringer als in Normoxie.

Diskussion- Der VEGF-R2 (=KDR/flk1) ist in unserer Ductusendothelzellkultur exprimiert. Die Aktivierung des VEGF-R2 ist für die Vermittlung der VEGF Effekte an Endothelien essentiell (Bernatchez et al., 1999), wobei der VEGF-R2 als Mediator hauptverantwortlich für die Proliferation, Mitogenese, Angiogenese und Permeabilitätserhöhung am Endothel zu sein scheint. Ein Ausschalten des Gens führt zu einer fehlenden Differenzierung und Migration von hämatopoietischen oder endothelialen Zellen, die Gefäßbildung bleibt aus. Eine Überstimulation des VEGF-R2 wird durch den VEGF-R1 verhindert, der als VEGF-„Überlauf“ dient. Im humanen DA wurde der VEGF-R2 bereits nachgewiesen (Weber et al., 2008; Veikkola et al., 2000).

In Normoxie ist der VEGF-R2 im Aortenendothel deutlich stärker reguliert als in den Ductusendothelzellen. Der VEGF-R2 vermittelt das „endothelial commitment“ hämangioblastischer Vorläuferzellen und ist ein Marker für hämatopoietische Stammzellen. Aus Untersuchungen an der embryonalen Aorta verschiedener Spezies (Maus, Huhn und Zebrafisch) ist bekannt, dass das Aortenendothel in der Ontogenese ein Bildungsort VEGF-R2 positiver hämatopoietischer Stammzellen ist (Chen et al., 2009). Die vorliegenden Ergebnisse scheinen die Hauptfunktion des VEGF-R2 am Aortenendothel für die Angioblastogenese, Hämatopoiese und ständige Gefäßregeneration im Sinne eines späteren Gefäßerhalts widerzuspiegeln.

Der Zusatz von PMA führt zu einer unterschiedlichen VEGF-R2 mRNA Expression in beiden Endothelzelltypen. Während die Expression im DA unverändert bleibt, nimmt sie in der Aorta deutlich zu. Auch in retinalen EC ist eine deutliche Erhöhung der VEGF-R2 Expression über die Proteinkinase C-Kaskade nachzuweisen (Hata et al., 1999)

Die Zugabe von COX-Inhibitoren führt in den Ductusendothelzellen in Normoxie zu einer erhöhten VEGF-R2 mRNA Expression, PMA bewirkt keine Veränderung, unter hypoxischen Bedingungen steigt der VEGF-R2 erst unter Koinkubation von PMA und COX-Inhibitoren an. Bisher gibt es hierzu keine Erkenntnisse am DA, in der Rattenretina hemmt hoch dosiertes

Ibuprofen die VEGF-R2 Expression, Indometacin hat keinen Einfluss (Beharry et al., 2006). Man kann über eine erhöhte VEGF-R2 Expression durch die nachgewiesene vermehrte VEGF-Ausschüttung spekulieren. An anderer Stelle wurde bewiesen, dass neben der Aktivierung des VEGF-R2 durch VEGF selbst eine zusätzliche parakrine Beeinflussung durch Mediatoren, die aus ischämischem Gewebe frei gesetzt werden, existiert (Brogi et al., 1996). Ob und inwiefern solche Mediatoren unter Hypoxie im Gewebes des DA während des Verschluss eine Rolle spielen, ist derzeit noch unerforscht. Auch die in der vorliegenden Arbeit durch Ibuprofen deutlich gesteigerte VEGF Expression, könnte so über den VEGF-R2 zu einer vermehrten Endothelzellbildung und Angioblastenmigration führen, verstärkt durch Hypoxie und Entzündung. Welche Folgen diese Hochregulation *in vivo* für den Verschluss des DA hat, bleibt fraglich, denkbar wäre sowohl der Verschluss durch die Förderung der Reifung des DA (= COX-Inhibitor-Wirkung) als auch dessen Wiedereröffnung über eine durch VEGF induzierte VEGF-R2 vermittelte Relaxation des DA. Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des VEGF-R2 sind zwar wiederum konträr zur Rattenretina, aber konsistent mit den anderen Ergebnissen unserer Arbeit. Indometacin scheint im Vergleich zu Ibuprofen bei gleicher klinischer Effektivität einen geringeren Einfluss auf das VEGF-R1-R2-System zu haben.

Während sich die Expression im Ductusendothel in Hypoxie nur im Ibuprofenversuch verändert, bleibt die VEGF-R2 mRNA Expression im Aortenendothel unverändert. Dieser Effekt wurde bereits an adulten Rattenendothelzellen verschiedener Organe beobachtet (Marti et al., 1998).

Am VEGF-R2 wird die differentielle Regulation von DA und Aorta besonders deutlich. Die Endothelzelldifferenzierung und Gefäßbildung wird im potentiell langlebigeren Gefäß unter Hypoxie eingestellt, dabei reagiert das Aortenendothel eher wie reifes, adultes Gewebe, nicht so das Ductusendothel. Möglicherweise gehört hier Hypoxie zum physiologischen Programm. In diesem Ergebnis spiegelt sich die unterschiedliche postnatale Funktion und das unterschiedliche Schicksal beider Gefäße wider.

4.2 Diskussion der Methodik

Die Vorgänge die zur Reifung und letztendlich zum definitiven Verschluss des DA führen, sind überaus komplex. Mehrere bedeutende Signalsysteme steuern die Prozesse, die am embryonalen und neonatalen DA zu einer proliferativen Degeneration führen, während zeitgleich die anderen großen Arterien in streng geordneter Organarchitektur ihre lebenslange Versorgungs- und Flussregulationsfunktion übernehmen. Der Weg zum Verständnis des Zusammenspiels dieser Signalsysteme und verschiedener Einflüsse führt über ihr isoliertes Studium an den

verschiedenen Zelltypen des DA. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nach meinem Wissen erstmalig eine Methode zur Gewinnung einer embryonalen Endothelzellkultur des DA etabliert.

Einzelzellkulturmodell aus Endothelzellen des DA

Bisher gibt es kein Einzelzellkulturmodell aus EC des DA. Ein humanes *in vitro* Modell aus Primärzellen ist nicht realisierbar, DA-Gewebe ist nur aus Abortpräparaten oder OP-Präparaten erhältlich. Erstere sind aus ethischen und technischen Gründen nicht vital, sondern formalinfixiert. An diesem Gewebe sind nur begrenzte deskriptive Methoden wie *in-situ*-Hybridisierung oder Immunhistochemie durchführbar (Weber et al., 2008; Rheinlaender et al. 2006). Auch mRNA-Extraktionen am formalinfixierten Gewebe sind versucht worden, die Ergebnisse haben jedoch wegen der Degradation und Vernetzung durch Paraformaldehyd nur eingeschränkte Aussagekraft. Gewebepräparate aus dem DA sind selten (Leonhardt et al., 2003), da die gängige operative Methode zum Verschluss eines PDA in der Neonatalperiode nicht die Exzision sondern die Ligatur mittels Clip ist (Salomon et al., 1979). Die wenigen Exzisionspräparate sind inhomogen bezüglich ihres Alters, der durchlaufenen Pathologie und der erfolgten Therapie und somit nicht geeignet für systematische funktionelle Untersuchungen.

Tiermodelle stellen die realisierbare Alternative dar. In der DA-Forschung werden *in-vivo*-Modelle und organotypische Modelle verwendet. Häufig handelt es sich um funktionelle Analysen. Aussagen über die Funktion und Genexpression einzelner Zelltypen sind jedoch auch hier nur mittels *in-situ*-Hybridisierung oder Immunhistochemie möglich. Aufgaben und Beeinflussung der einzelnen Zelltypen sind letztlich nicht trennscharf zuzuordnen. Für Tiermodelle in der DA-Forschung werden die Spezies Schaf, Schwein, Meerkatze, Hase, Hamster, Ratte und Maus verwendet. Großtiermodelle sind zwar nahe am humanen Vorbild, haben aber wesentliche Nachteile wie die aufwendige Haltung, lange Tragzeiten und wenig Nachkommenschaft. Der DA ist an Kleintiermodellen auf vielen Ebenen gut untersucht und charakterisiert, außerdem sind gerade für Maus und Ratte auf molekularbiologischer Ebene eine Vielzahl von validierten Antikörpern und Sonden erhältlich. Der Mausitus erwies sich als zu klein für die Mikropräparation, so dass aus den oben genannten Erwägungen heraus für die vorliegende Arbeit die Ratte gewählt wurde.

Reinheit der Zellkultur

Die primäre Isolation der EC lieferte nur eine geringe Menge an Zellmaterial. Dieses Problem wurde durch eine *in vitro* Vermehrung über 3 Passagen gelöst. Damit wurde jedoch der Vorteil einer Primärzellkultur aufgegeben. Die EC haben z.B. durch die im Vergleich zu embryonalen

pO₂-Verhältnissen höhere atmosphärische Sauerstoffspannung und durch die Kultivierung eine Veränderung erfahren.

Ein weiteres Problem stellte die Verunreinigung der Endothelzellkultur durch proliferationsfreudigere Zelltypen wie z. B. Fibroblasten dar. Die erforderliche Reinheit wurde in diesem Modell in mehreren Stufen über einen gezielten Verdau, die Anzucht und Kultivierung in einem speziellen EC-Medium und die Separierung über die MACS[®]-Trennung mittels endothelzellspezifischer Oberflächenproteine erreicht und lag bei >90%. Der Erfolg dieser Maßnahmen wurde mittel FACS-Analyse nachgewiesen.

Versuchskonditionen

Die Viabilität der Endothelzellkulturen und Toxizität der Versuchsbedingungen wurden durch das MTT-Assay und die LDH-Messung überprüft.

Hypoxie und PMA. Beide in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsbedingungen sind gängige Methoden und nach Routinevorschriften durchgeführt worden.

Indometacin. Indocid inject ist eine in der Therapie Frühgeborener gebräuchliche Zubereitung des Indometacins. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte *in vitro* Konzentrationen liegt mit 10µg/ml über dem Bereich therapeutischer *in vivo* Spiegel von 0,4 bis 2µg/ml (Smyth et al., 2004; O'Donovan et al., 2004). Auf die Untersuchung einer niedrigen Indometacin-Konzentration wurde bei eingeschränkter Materialverfügbarkeit zu Gunsten der Ibuprofendosierungen verzichtet.

Ibuprofen. Mit Pede[®] haben wir uns für eine in der Therapie Frühgeborener gebräuchliche Zubereitung des Ibuprofen entschieden. Sie besteht aus einer razemischen Mischung von S(+)- und R(-) Enantiomeren, wobei ersteres für die klinische Wirkung verantwortlich ist. Weiterhin ist in Pede[®] Trometamol (THAM) als Trägersubstanz enthalten, welches im Gegensatz zu der zweiten möglichen Ibuprofen i.v.-Zubereitung mit Lysin ein erhöhtes Risiko für NEC und bei prophylaktischer Gabe Fälle von Hypoxie mit schwerer pulmonaler Hypertension in extrem kleinen Frühgeborenen unter 1000g Geburtsgewicht zeigte, die zum Abbruch einer Prophylaxestudie führten (Gournay, et al., 2004). Anhand der LDH-Messung im Überstand der EC und des MTT-Assays konnte in dieser Arbeit das Fehlen von zytotoxischen Effekten nachgewiesen werden.

Die *in vitro* Konzentrationen sind in der vorliegenden Arbeit mit 50 und 250µg/ml so gewählt, dass sie den Bereich therapeutischer *in vivo* Spiegel von 31-280µg/ml (Frühgeborene, früher therapeutische PDA Intervention, nach der ersten Gabe) (Overmeire et al., 2005) abdecken, wobei zu bemerken ist, dass therapeutische Spiegel um 250µg/ml selten vorkommen, und mit

dem derzeit gebräuchlichen Regime von 10-5-5 mg/kg Ibuprofen alle 24 Stunden eher Bereiche um 100 µg/ml erreicht werden. In vivo Spiegel stellen auch nur eine Orientierungshilfe für in vitro Spiegel dar, da sie sowohl bei Ibuprofen als auch bei Indometacin einer sehr variablen Resorption unterliegen und für beide COX-Hemmer die Existenz multipler genetischer Polymorphismen des abbauenden Cytochrom P450 Systems bekannt sind, die entweder einen beschleunigten oder verlangsamten Abbau beider Substanzen bewirken können (Zanger et al., 2008; Lopez-Rodriguez, 2008).

PCR. Für die Auswertung der Taqman PCR wurde die in mehreren Arbeiten bereits beschriebene Berechnung nach der ΔC_T -Methode angewandt. Dafür ist neben der eigentlichen Zielsequenz auch eine endogene Kontrolle notwendig, die im PCR-Lauf parallel mit dem Zielgen, amplifiziert wird. Das in unserem Versuchsaufbau verwendete β -Aktin ist ein hierfür häufig eingesetztes „house-keeping“ Gen, das einen Teil des Zellzytoskeletts kodiert und in einer konstanten Menge in den Zellen vorkommt. Die Expression sollte unter den verschiedenen Versuchsbedingungen konstant und seine Amplifikationseffizienz mit der des Zielgens vergleichbar sein. Jedoch haben Studien gezeigt, dass es zur unterschiedlichen Expression von „house-keeping“ Genen in Zellen kommen kann und diese in Gegenwart von Pseudogenen mit der Ergebnisinterpretation interferieren können (Bustin 2000). Die Validität der relativen Quantifizierung anhand des β -Aktin als „house-keeping“ Gen ist damit von der Invariabilität und Amplifikationseffizienz dieses Gens abhängig. Für die vorliegende Untersuchung konnten diese Bedingungen ausreichend erfüllt werden, was sich in der konstanten Expression des β -Aktins mit einem Meanwert von 22,44 +/- 1,15 Standardabweichung für die Ductusendothelzellen und von 22,97 +/- 1,38 Standardabweichung für die Aortaendothelzellen widerspiegelt, so dass damit die Aussagen der PCR-Ergebnisse dieser Studie nicht beeinflusst werden. Ebenfalls relevant war die Bestimmung der durch die VEGF Sonden gemessenen VEGF-Subtypen. Daher war die vorangegangene Primersuche vor allem auf den biologisch aktiven VEGF-Subtyp, VEGF 165, ausgerichtet. Somit kann davon ausgegangen werden, dass tatsächlich dieser mittels der *Real-Time*-PCR nachgewiesen wurde.

ELISA. Der ELISA ist eine einfache Methode zum Proteinnachweis, der vor allem in Routinetests gerne verwendet wird. Wie vom Hersteller angegeben werden durch ihn nur ein Teil der VEGF Subtypen nämlich vor allem die löslichen Isoformen gemessen. Das heißt neben VEGF 165, der biologisch aktivsten Form, werden VEGF 121 und aufgrund des ähnlichen Aufbaues, vom Hersteller vermutet aber nicht nachgewiesen, auch VEGF 145 gemessen. Nicht

nachgewiesen werden VEGF 189, die dritthäufigste Variante, sowie VEGF 183 und 206, welche sehr selten vorkommen und als nicht relevant gelten.

Da nicht auszuschließen ist, dass am Ductusverschluss auch die nicht mittels ELISA detektierten VEGF Splicevarianten beteiligt sind, wäre eine Untersuchung mittels Westerns Blots, einer Methode, die die genaue Detektion verschiedener ähnlich großer Proteine ermöglicht, wünschenswert.

Zusammenfassung

Zur medikamentösen Behandlung des persistierenden DA Frühgeborener stehen seit einigen Jahren Ibuprofen und Indometacin, zwei nicht-selektive Cyclooxygenasehemmer, zur Verfügung. Dabei unterschieden sich diese beiden bisher hauptsächlich aufgrund des beobachteten Nebenwirkungsspektrums. Außer den bekannten Prostaglandinen wird der Verschluss des DA nach der Geburt durch lokal produzierte und zirkulierende Mediatoren beeinflusst. Unter ihnen spielt der Wachstumsfaktor VEGF eine entscheidende Rolle, indem er einerseits durch Proliferation und Permeabilitätsänderung der Endothelien die neointimale Hyperplasie bewirkt und andererseits die Einsprossung der Vasa vasorum während der zweiten Phase des anatomischen Remodeling reguliert. Vorausgegangene Studien zeigten an der Retina von Ratten eine unterschiedliche Beeinflussung von VEGF und seinen Rezeptoren durch die COX-Inhibitoren. Der genaue Mechanismus ihrer Wirkung auf den DA und die Auswirkung der medikamentösen Therapie auf den Ablauf des Ductusverschlusses sind bis jetzt nicht abschließend geklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der mögliche Einfluss von Ibuprofen und Indometacin auf die zweite Phase des physiologischen Ductusverschlusses, in der das Auftreten von Wachstumsfaktoren, vor allem VEGF, essentiell zu sein scheint, untersucht werden.

Anhand eines neuen, aus der Präparation von embryonalen Ratten gewonnenen, vergleichenden Endothelzellkulturmodells wurde in Abhängigkeit von der Zeit der Einfluss verschiedener Versuchsbedingungen auf den Verschlussmechanismus erforscht. Dafür wurden die Zellkulturen 6, 12 und 24 Stunden mit niedrig und hoch dosierten COX-Inhibitoren, Inflammation und verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen inkubiert. Mittels der *Real-Time-PCR* und ELISA wurden die Veränderungen von VEGF, VEGF-R1 and -R2 mRNA und Proteinexpression in den Zellkulturen gemessen. Die Zellvitalität wurde anhand eines MTT-Assay determiniert, die Toxizität mit LDH-Messungen überwacht.

VEGF und seine Rezeptoren wurden im Ductusendothel embryonaler Ratten nachgewiesen. Bisher ist wenig über die Expression und Regulation des VEGF-Angiogenese-Systems und besonders der Rezeptoren am DA unter Hypoxie, Entzündung und Einfluss von COX-Inhibitoren bekannt. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass VEGF und seine Rezeptoren 1 und 2 in Ductusendothelzellen ganz eigenen, von EC permanenter Gefäße deutlich abweichenden Regulationsmechanismen unterliegen. Ibuprofen erhöht die mRNA-Expression von VEGF und seinen Rezeptoren, während Indometacin einen geringeren Einfluss auf deren Expression zu haben scheint. Die unterschiedliche Wirkung der beiden COX-Inhibitoren auf VEGF und seine Rezeptoren erhellen teilweise die Interaktion zwischen Prostaglandin- und VEGF-Angiogenese-System im Ductusendothel, jedoch werden mehr neue Fragen aufgeworfen als beantwortet.

Zur Einordnung der Bedeutung dieser neuen Ergebnisse sind Untersuchungen der COX- und HIF-Expression sowie des Effektes einer selektiven COX-1/2-Hemmung notwendig. Desweiteren kann überprüft werden, ob die nachgewiesenen Effekte an den EC auch auf die Fibroblasten und VSMC des DA übertragbar sind. Das in der vorliegenden Arbeit neu etablierte Zellkulturmodell stellt die einzigartige Möglichkeit dar, Einflussfaktoren systematisch getrennt an den verschiedenen Zelltypen des embryonalen DA zu studieren. Prozesse können zerlegt, verstanden und wieder zu einem in sich stimmigen System zusammengesetzt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Alpan G, Mauray F, Clyman RI. Effect of patent ductus arteriosus on water accumulation and protein permeability in the lungs of mechanically ventilated premature lambs. *Pediatr Res* 1989;26:570-5.
2. Amorim MM, Santos LC, Faundes A. Corticosteroid therapy for prevention of respiratory distress syndrome in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1283-8.
3. Aplin AC, Gelati M, Fogel E, Carnevale E, Nicosia RF. Angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor induce expression of inflammatory cytokines before angiogenesis. *Physiol Genomics* 2006;27:20-8.
4. Bais R, Philcox M. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC Method for Lactate Dehydrogenase (l-Lactate: NAD⁺Oxidoreductase, EC 1.1.1.27). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32:639-55.
5. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996;87:3336-43.
6. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4123-31.
7. Beharry KD, Modanlou HD, Hasan J, et al. Comparative effects of early postnatal ibuprofen and indomethacin on VEGF, IGF-I, and GH during rat ocular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3036-43.
8. Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 1999;274:31047-54.
9. Betkerur MV, Yeh TF, Miller K, Glasser RJ, Pildes RS. Indomethacin and its effect on renal function and urinary kallikrein excretion in premature infants with patent ductus arteriosus. *Pediatrics* 1981;68:99-102.
10. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992;114:521-32.
11. Brogi E, Schatteman G, Wu T, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* 1996;97:469-76.

12. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.
13. Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:133-58.
14. Cassady G, Crouse DT, Kirklin JW, et al. A randomized, controlled trial of very early prophylactic ligation of the ductus arteriosus in babies who weighed 1000 g or less at birth. *N Engl J Med* 1989;320:1511-6.
15. Chemtob S, Beharry K, Barna T, Varma DR, Aranda JV. Differences in the effects in the newborn piglet of various nonsteroidal antiinflammatory drugs on cerebral blood flow but not on cerebrovascular prostaglandins. *Pediatr Res* 1991;30:106-11.
16. Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature* 2009;457:887-91.
17. Clyman RI. Developmental responses to oxygen, arachidonic acid, and indomethacin in the fetal lamb ductus arteriosus in vitro. *Prostaglandins Med* 1978;1:167-74.
18. Clyman RI. Mechanisms regulating the ductus arteriosus. *Biol Neonate* 2006;89:330-5.
19. Clyman RI, Chan CY, Mauray F, et al. Permanent anatomic closure of the ductus arteriosus in newborn baboons: the roles of postnatal constriction, hypoxia, and gestation. *Pediatr Res* 1999;45:19-29.
20. Clyman RI, Chen YQ, Chemtob S, et al. In utero remodeling of the fetal lamb ductus arteriosus: the role of antenatal indomethacin and avascular zone thickness on vasa vasorum proliferation, neointima formation, and cell death. *Circulation* 2001;103:1806-12.
21. Clyman RI, Mauray F, Heymann MA, Rudolph AM. Ductus arteriosus: developmental response to oxygen and indomethacin. *Prostaglandins* 1978;15:993-8.
22. Clyman RI, Mauray F, Roman C, Rudolph AM. PGE₂ is a more potent vasodilator of the lamb ductus arteriosus than is either PGI₂ or 6 keto PGF₁α. *Prostaglandins* 1978;16:259-64.
23. Clyman RI, Mauray F, Wong L, Heymann MA, Rudolph AM. The developmental response of the ductus arteriosus to oxygen. *Biol Neonate* 1978;34:177-81.
24. Clyman RI, Seidner SR, Kajino H, et al. VEGF regulates remodeling during permanent anatomic closure of the ductus arteriosus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;282:R199-206.
25. Clyman RI, Waleh N, Black SM, Riemer RK, Mauray F, Chen YQ. Regulation of ductus arteriosus patency by nitric oxide in fetal lambs: the role of gestation, oxygen tension, and vasa vasorum. *Pediatr Res* 1998;43:633-44.

26. Coceani F, White E, Bodach E, Olley PM. Age-dependent changes in the response of the lamb ductus arteriosus to oxygen and ibuprofen. *Can J Physiol Pharmacol* 1979;57:825-31.
27. Colbert MC, Kirby ML, Robbins J. Endogenous retinoic acid signaling colocalizes with advanced expression of the adult smooth muscle myosin heavy chain isoform during development of the ductus arteriosus. *Circ Res* 1996;78:790-8.
28. Costa M, Barogi S, Socci ND, et al. Gene expression in ductus arteriosus and aorta: comparison of birth and oxygen effects. *Physiol Genomics* 2006;25:250-62.
29. De Carolis MP, Romagnoli C, Polimeni V, et al. Prophylactic ibuprofen therapy of patent ductus arteriosus in preterm infants. *Eur J Pediatr* 2000;159:364-8.
30. Edwards AD, Wyatt JS, Richardson C, et al. Effects of indomethacin on cerebral haemodynamics in very preterm infants. *Lancet* 1990;335:1491-5.
31. Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Breant C, Le Douarin NM. Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5141-6.
32. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
33. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001;106:148-56.
34. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
35. Fitzgerald M, Evill L, Banz K, Carroll S, Rodger J. Mineralocorticoids restore quiescent morphology and reduce VEGF receptor expression in inflamed choroidal endothelial cells in vitro. *Ophthalmic Res* 2009;41:44-52.
36. Fowlie PW, Davis PG. Prophylactic intravenous indomethacin for preventing mortality and morbidity in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2002:CD000174.
37. Friedman WF, Hirschklau MJ, Printz MP, Pitlick PT, Kirkpatrick SE. Pharmacologic closure of patent ductus arteriosus in the premature infant. *N Engl J Med* 1976;295:526-9.
38. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997;272:23659-67.
39. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313-6.

40. Gersony WM, Peckham GJ, Ellison RC, Miettinen OS, Nadas AS. Effects of indomethacin in premature infants with patent ductus arteriosus: results of a national collaborative study. *J Pediatr* 1983;102:895-906.
41. Gittenberger-de Groot AC, Strengers JL, Mentink M, Poelmann RE, Patterson DF. Histologic studies on normal and persistent ductus arteriosus in the dog. *J Am Coll Cardiol* 1985;6:394-404.
42. Gournay V, Roze JC, Kuster A, et al. Prophylactic ibuprofen versus placebo in very premature infants: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364:1939-44.
43. Hammerman C. Patent ductus arteriosus. Clinical relevance of prostaglandins and prostaglandin inhibitors in PDA pathophysiology and treatment. *Clin Perinatol* 1995;22:457-79.
44. Hata Y, Rook SL, Aiello LP. Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Diabetes* 1999;48:1145-55.
45. He T, Xing YQ, Zhao XH, Ai M. Interaction between iNOS and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice. *Arch Med Res* 2007;38:807-15.
46. Hermes-DeSantis ER, Clyman RI. Patent ductus arteriosus: pathophysiology and management. *J Perinatol* 2006;26 Suppl 1:S14-8; discussion S22-3.
47. Heymann MA, Rudolph AM, Silverman NH. Closure of the ductus arteriosus in premature infants by inhibition of prostaglandin synthesis. *N Engl J Med* 1976;295:530-3.
48. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10:413-7.
49. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1890-900.
50. Hornblad PY, Larsson KS, Marsk L. Studies on closure of the ductus arteriosus. VII. Closure rate and morphology of the ductus arteriosus in the lamb. *Cardiologia* 1969;54:336-42.
51. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:26031-7.
52. Iida T, Mine S, Fujimoto H, Suzuki K, Minami Y, Tanaka Y. Hypoxia-inducible factor-1alpha induces cell cycle arrest of endothelial cells. *Genes Cells* 2002;7:143-9.
53. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995;270:19761-6.

54. Jones MK, Szabo IL, Kawanaka H, Husain SS, Tarnawski AS. von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1alpha: new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis. *FASEB J* 2002;16:264-6.
55. Kajino H, Chen YQ, Seidner SR, et al. Factors that increase the contractile tone of the ductus arteriosus also regulate its anatomic remodeling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R291-301.
56. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995;55:5687-92.
57. Kluckow M, Evans N. Low superior vena cava flow and intraventricular haemorrhage in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:F188-94.
58. Kluckow M, Evans N. Ductal shunting, high pulmonary blood flow, and pulmonary hemorrhage. *J Pediatr* 2000;137:68-72.
59. Koehne P, Willam C, Strauss E, Schindler R, Eckardt KU, Buhner C. Lack of hypoxic stimulation of VEGF secretion from neutrophils and platelets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H817-24.
60. Kolch W, Martiny-Baron G, Kieser A, Marme D. Regulation of the expression of the VEGF/VPS and its receptors: role in tumor angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36:139-55.
61. Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:636-9.
62. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996;122:3829-37.
63. Leonhardt A, Glaser A, Wegmann M, Schranz D, Seyberth H, Nusing R. Expression of prostanoid receptors in human ductus arteriosus. *Br J Pharmacol* 2003;138:655-9.
64. Levin M, Goldberg S, Lindqvist A, et al. ATP depletion and cell death in the neonatal lamb ductus arteriosus. *Pediatr Res* 2005;57:801-5.
65. Levin M, McCurnin D, Seidner SR, et al. Postnatal constriction, ATP depletion, and cell death in the mature and immature ductus arteriosus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R359-64.

66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001;25:402-8.
67. Lopez-Rodriguez R, Novalbos J, Gallego-Sandin S, et al. Influence of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of racemic and enantiomeric forms of ibuprofen in healthy volunteers. *Pharmacol Res* 2008;58:77-84.
68. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:9267-71.
69. Malcolm DD, Segar JL, Robillard JE, Chemtob S. Indomethacin compromises hemodynamics during positive-pressure ventilation, independently of prostanoids. *J Appl Physiol* 1993;74:1672-8.
70. Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15809-14.
71. McCormick DC, Edwards AD, Brown GC, et al. Effect of indomethacin on cerebral oxidized cytochrome oxidase in preterm infants. *Pediatr Res* 1993;33:603-8.
72. Momma K, Toyono M. The role of nitric oxide in dilating the fetal ductus arteriosus in rats. *Pediatr Res* 1999;46:311-5.
73. Mosca F, Bray M, Lattanzio M, Fumagalli M, Tosetto C. Comparative evaluation of the effects of indomethacin and ibuprofen on cerebral perfusion and oxygenation in preterm infants with patent ductus arteriosus. *J Pediatr* 1997;131:549-54.
74. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
75. Muller PR, James AH, Murtha AP, Yonish B, Jamison MG, Dekker G. Circulating angiogenic factors and abnormal uterine artery Doppler velocimetry in the second trimester. *Hypertens Pregnancy* 2006;25:183-92.
76. Nakanishi T, Gu H, Hagiwara N, Momma K. Mechanisms of oxygen-induced contraction of ductus arteriosus isolated from the fetal rabbit. *Circ Res* 1993;72:1218-28.
77. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999;13:9-22.
78. O'Donovan DJ, Fernandes CJ, Nguyen NY, Adams K, Adams JM. Indomethacin therapy for patent ductus arteriosus in premature infants: efficacy of a dosing strategy based on a second-dose peak plasma indomethacin level and estimated plasma indomethacin levels. *Am J Perinatol* 2004;21:191-7.

79. Ohlsson A, Walia R, Shah S. Ibuprofen for the treatment of a patent ductus arteriosus in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;CD003481.
80. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2576-81.
81. Osborn DA, Evans N, Kluckow M. Effect of early targeted indomethacin on the ductus arteriosus and blood flow to the upper body and brain in the preterm infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2003;88:F477-82.
82. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994;269:25646-54.
83. Patel J, Marks KA, Roberts I, Azzopardi D, Edwards AD. Ibuprofen treatment of patent ductus arteriosus. *Lancet* 1995;346:255.
84. Patel J, Roberts I, Azzopardi D, Hamilton P, Edwards AD. Randomized double-blind controlled trial comparing the effects of ibuprofen with indomethacin on cerebral hemodynamics in preterm infants with patent ductus arteriosus. *Pediatr Res* 2000;47:36-42.
85. Peiser C, Felderhoff-Müser U., Koehne P., Obladen M. Hyperoxia decreases, injury caused by phorbol ester increases VEGF expression in the brain of newborn rats. *Pediatric Research* 2005;58:404.
86. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:31-40.
87. Pezzati M, Vangi V, Biagiotti R, Bertini G, Cianciulli D, Rubaltelli FF. Effects of indomethacin and ibuprofen on mesenteric and renal blood flow in preterm infants with patent ductus arteriosus. *J Pediatr* 1999;135:733-8.
88. Plate KH, Warnke PC. Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 1997;35:365-72.
89. Rennie JM, Doyle J, Cooke RW. Early administration of indomethacin to preterm infants. *Arch Dis Child* 1986;61:233-8.
90. Rheinlaender C, Weber SC, Sarioglu N, Strauss E, Obladen M, Koehne P. Changing expression of cyclooxygenases and prostaglandin receptor EP4 during development of the human ductus arteriosus. *Pediatr Res* 2006;60:270-5.
91. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114:853-65.
92. Rojas MA, Gonzalez A, Bancalari E, Claire N, Poole C, Silva-Neto G. Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. *J Pediatr* 1995;126:605-10.

93. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Wood K, Cool CD, Voelkel NF. Apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells stimulates vascular smooth muscle cell growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L362-8.
94. Salomon NW, Anderson RM, Copeland JG, Allen HD, Goldberg SJ, Sahn DJ. A rational approach to ligation of patent ductus arteriosus in the neonate. *Chest* 1979;75:671-4.
95. Seidner SR, Chen YQ, Oprysko PR, et al. Combined prostaglandin and nitric oxide inhibition produces anatomic remodeling and closure of the ductus arteriosus in the premature newborn baboon. *Pediatr Res* 2001;50:365-73.
96. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
97. Shen BQ, Lee DY, Zioncheck TF. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem* 1999;274:33057-63.
98. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5.
99. Smyth JM, Collier PS, Darwish M, et al. Intravenous indometacin in preterm infants with symptomatic patent ductus arteriosus. A population pharmacokinetic study. *Br J Clin Pharmacol* 2004;58:249-58.
100. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:227-41.
101. Thibeault DW, Emmanouilides GC, Nelson RJ, Lachman RS, Rosengart RM, Oh W. Patent ductus arteriosus complicating the respiratory distress syndrome in preterm infants. *J Pediatr* 1975;86:120-6.
102. Thomas RL, Parker GC, Van Overmeire B, Aranda JV. A meta-analysis of ibuprofen versus indomethacin for closure of patent ductus arteriosus. *Eur J Pediatr* 2005;164:135-40.
103. Thorburn GD. The placenta, PGE₂ and parturition. *Early Hum Dev* 1992;29:63-73.
104. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991;266:11947-54.
105. Tran J, Rak J, Sheehan C, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:781-8.

106. Ulmer DD, Vallee BL, Wacker WE. Metalloenzymes and myocardial infarction. II. Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum. *N Engl J Med* 1956;255:450-6.
107. van Bel F, Guit GL, Schipper J, van de Bor M, Baan J. Indomethacin-induced changes in renal blood flow velocity waveform in premature infants investigated with color Doppler imaging. *J Pediatr* 1991;118:621-6.
108. van de Bor M, Verloove-Vanhorick SP, Brand R, Ruys JH. Patent ductus arteriosus in a cohort of 1338 preterm infants: a collaborative study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1988;2:328-36.
109. Van Overmeire B. The use of ibuprofen in neonates in the treatment of patent ductus arteriosus. *Int J Clin Pract Suppl* 2003:23-7.
110. Van Overmeire B, Chemtob S. The pharmacologic closure of the patent ductus arteriosus. *Semin Fetal Neonatal Med* 2005;10:177-84.
111. Van Overmeire B, Follens I, Hartmann S, Creten WL, Van Acker KJ. Treatment of patent ductus arteriosus with ibuprofen. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;76:F179-84.
112. Van Overmeire B, Touw D, Schepens PJ, Kearns GL, van den Anker JN. Ibuprofen pharmacokinetics in preterm infants with patent ductus arteriosus. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:336-43.
113. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000;60:203-12.
114. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-5.
115. Weber SC, Rheinlaender C, Sarioglu N, et al. The expression of VEGF and its receptors in the human ductus arteriosus. *Pediatr Res* 2008;64:340-5.
116. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 2008;392:1093-108.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Darstellung des morphologischen Umbauprozesses des DA mit Bildung neointimaler Kissen
- Abb. 2: Faktoren, die den funktionellen Ductusverschluss beeinflussen
- Abb. 3: Rezeptoren des VEGF, ihre Liganden und ihre Lokalisation im Gewebe
- Abb. 4: Blick auf die abdominelle Muskulatur einer trächtigen Wistar Ratte; Eröffneter Situs mit Uterus
- Abb. 5: Rattenembryo von links lateral mit eröffnetem Thorax; Thoraxsitus mit Blick auf die Gefäße
- Abb. 6: Mikropräparation des DA . Dieser ist bereits an seiner aortalen Einmündung abgesetzt; Mikropräparation der Aorta. Sicht auf den Aortenbogen mit davor liegendem Stumpf des Truncus pulmonalis
- Abb. 7: Zellseparationsverfahren mittels MACS[®]-Technik
- Abb. 8: Primäre Mischzellkultur vor der Säulenauftrennung in Phasenkontrastdarstellung (200fache Vergrößerung); Mikroskopisch reine Endothelzellkultur der ersten Passage nach Säulentrennung mit charakteristischem Wachstum als Monolayer (200fache Vergrößerung)
- Abb. 9: Die am Aufbau eines Blutgefäßes beteiligten Zellen
- Abb. 10: Versuchsaufbau
- Abb. 11: Exemplarische Histogramme einer Mischkultur vor der Säulenaufreinigung
- Abb. 12: Exemplarisches Histogramm einer reinen Endothelzellkultur nach der Säulenaufreinigung
- Abb. 13: Repräsentative Dot Blots zum Vergleich der Isotypkontrolle (links) und der aufgereinigten Endothelzellkultur (rechts)
- Abb. 14: Immunhistochemische Färbung am DA (linke Säule) und an der Aorta (rechte Säule) durch VEGF- (oben), VEGF-R1- (Mitte) und VEGF-R2 Antikörper (unten).
- Abb. 15: Vergleichende Darstellung aller β -Aktinwerte in Form von Boxplots mit Median und SEM.
- Abb. 16: Vergleich der Sequenzierungsergebnisse von zwei zufällig ausgewählten Ductusendothelzellproben für VEGF-R2 mRNA. Links das spezifische Produkt, der unter 2.10 beschriebenen Sonden/Primerkombination; rechts das unspezifische Produkt der im Vergleich eingesetzten Sonden/Primerkombination (Vorwärts Primer: ACA GTT CCC AGA CTG GTT GG; Rückwärts Primer: GTC ACT GAC AGA GGC GAT GA, Sonde

6-FAM-CTA TCG GGA CAC CGA TGT CT-TAMRA).

Abb. 17: VEGF, VEGF Rezeptor-mRNA Expression in Normoxie von DA- (linke Spalte) und Aortenendothelzellen (rechte Spalte); mean (+SEM), n=3, nach 6-, 12-, 24-stündiger Inkubation (linke, mittlere, rechte Säule einer Gruppe). * p<0,05 vs., ** p<0,01 vs. und *** p<0,001 vs. Kontrolle. Zu beachten sind die teilweise unterschiedlich skalierten y-Achsen.

Abb. 18: VEGF, VEGF Rezeptor-mRNA Expression in Hypoxie von DA- (linke Spalte) und Aortenendothelzellen (rechte Spalte); mean (+SEM), n=3, nach 6-, 12-, 24-stündiger Inkubation (linke, mittlere, rechte Säule einer Gruppe). * p<0,05 vs. und ** p<0,01 vs. Kontrolle. Zu beachten sind die teilweise unterschiedlich skalierten y-Achsen.

Abb. 19: VEGF Konzentration im Überstand von DA- (linke Spalte) und Aortenendothelzellen (rechte Spalte); nach 6 (obere Reihe) bzw. 24 Stunden Inkubation (untere Reihe) jeweils im Vergleich von Normoxie (linke Säule) und Hypoxie (rechte Säule); mean (+SEM) aus n=3 Versuchen, * p<0,05 und ** p<0,01 vs. Kontrolle. Zu beachten sind die teilweise unterschiedlich skalierten y-Achsen.

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Die für die Reinheitskontrolle verwendeten Antikörper und ihren Konzentrationen

Tabelle 2: Bezeichnung und Basenpaarfolge der PCR Sonden

Tabelle 3: Übersicht der für die Immunhistochemie eingesetzten Antikörper

Tabelle 4 und 5: Dargestellt sind die mittleren Adsorptionswerte (OD) für die Zellvitalität und mit der jeweiligen Standardabweichung; 0 bedeutet, dass keine Zellvitalität messbar war; mean (\pm SEM) aus n=5 Versuchen *** p<0,001 vs. gleicher Zellzahl in EC-Medium mit dem entsprechendem FKS-Gehalt und ohne Staurosporin

Tabelle 6: Dargestellt sind die mittleren LDH-Konzentrationen (mean aus n=3 Versuchen) in U/l im Zellkulturüberstand mit SEM.

DANKSAGUNG

Frau Dr. Petra Koehne danke ich ganz herzlich für die Überlassung dieses Themas, für das sie mich von Anfang an begeisterte und während dessen Umsetzung sie mich jederzeit exzellent betreute, teils in Form von Ratschlägen, neuen Ideen oder auch mal in Form eines Frühstückes. In der vergangenen Zeit war sie nicht nur fachlich sondern auch menschlich eine wertvolle Unterstützung und dank ihrer unermüdlichen Motivation und geduldigen Bearbeitung erster Entwürfe konnte ich die nun vorliegende Arbeit überhaupt erst zu Ende führen.

Herrn Prof. Dr. Michael Obladen danke ich für die Möglichkeit die Doktorarbeit in seiner Abteilung durchzuführen und für seinen Glauben an das Gelingen dieses Projektes.

Für die angenehme und unterhaltsame Zusammenarbeit bei der Tierpräparation und die Herstellung der immunhistochemischen Bilder möchte ich mich herzlich bei Dr. Sven Weber danken.

Dr. Alexander Gratopp und Dr. Christian Peiser gilt mein Dank für die schnelle, aber gründliche Einarbeitung in Methoden dieser Arbeit und das jederzeit offene Ohr für Probleme und Fragen. Außerdem ist dank der Durchführung eines Teils der Messungen durch Dr. Alexander Gratopp die Dauer dieses Projektes wesentlich verkürzt worden.

Vielen Dank ebenfalls an Babara Mauder, die mir bereitwillig bei der Laborarbeit half und unter körperlichem Einsatz den Verlust vieler meiner Proben und damit der Arbeit eines ganzen halben Jahres verhinderte.

Besonderer Dank gilt auch der Seele des Labors, Evelyn Strauß, die immer wieder eine Lösung für auftretende Probleme bereit hielt und viele organisatorische Aufgaben übernahm. Nebenbei hat sie mit ihrem Humor die teilweise endlosen Stunden im Labor nie langweilig werden lassen.

Geduld, Durchhaltevermögen und dauerhaft gute Einfälle und Verbesserungsvorschläge. Dafür danke ich herzlich Dr. Cornelia Rheinländer. Dank dir hat es auch ein Ende gefunden.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich aufrichtig für die Unterstützung in allen Lebensbereichen, ohne die ich es niemals bis hierher gebracht hätte.

LEBENS LAUF

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

Erklärung

„Ich, Sandra Akanbi, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Vergleichende Untersuchung von VEGF und seinen Rezeptoren an embryonalen Gefäßendothelzellkulturen der Ratte selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

17.07.2009

Publikationsliste

1. Effect of COX-inhibitors on expression of VEGF and its receptors in rat endothelial cells from the ductus arteriosus, S Akanbi, A Gratopp, S Weber, C Peiser, M Obladen, P Koehne, 48th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Research, 2007
2. Einfluss von COX-Inhibitoren auf die Expression von VEGF und dessen Rezeptoren an embryonalen Zellkulturen des Ductus arteriosus der Ratte, S Akanbi, A Gratopp, SC Weber, C Peiser, M Obladen, P Koehne, 34. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2008
3. Isolierung und Kultur von organotypischen Endothel- und Glattmuskelzellen aus dem embryonalen Ductus arteriosus der Ratte, SC Weber, A Gratopp, C Rheinländer, S Akanbi,, P Barikbin, P Koehne, 34. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2008
4. Differentielle Genexpression in Ductus arteriosus und Pulmonalarterie, P Barikbin, SC Weber, S Akanbi, C Rheinländer, P Koehne, 34. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2008