

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-OHRENHEILKUNDE
PROF. DR. C. BOHR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss von zyklischer Dehnung auf die Vaskulogenese von Gefäßmalformationen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der

Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Johanna Louise Ganzenmüller

2022

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HALS-NASEN-UND-OHRENHEILKUNDE
PROF. DR. C. BOHR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss von zyklischer Dehnung auf die Vaskulogenese von Gefäßmalformationen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Johanna Louise Ganzenmüller

2022

Dekan: *Prof. Dr. Dirk Hellwig*

1. Berichterstatter: *PD Dr. Veronika Vielsmeier*

2. Berichterstatter: *PD Dr. Sebastian Geis*

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2022

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Klassifikation vaskulärer Anomalien.....	7
1.1.1 Vaskuläre Neoplasien	7
1.1.2 Vaskuläre Malformationen	7
1.1.2.1 Kapilläre Malformationen	8
1.1.2.2 Lymphatische Malformationen	8
1.1.2.3 Venöse Malformationen	8
1.1.2.4 Arteriovenöse Malformationen	9
1.1.2.5 Arteriovenöse Fisteln	10
1.1.2.6 Kombinierte Malformationen	10
1.1.2.7 Mit anderen Anomalien assoziierte Malformationen	11
1.2 Diagnostik.....	11
1.2.1 Sonographie.....	11
1.2.2 Magnetresonanztomographie.....	12
1.2.3 Computertomographie	12
1.2.4 Phlebographie und Angiographie	12
1.3 Therapie	12
1.3.1 Konservative Therapie	13
1.3.1.1 VEGF-Inhibitor Bevacizumab.....	13
1.3.1.2 MEK-Inhibitor Trametinib	14
1.3.2 Lasertherapie	15
1.3.3 Sklerotherapie	15
1.3.4 Embolisationstherapie	16
1.3.5 Endoluminale Verfahren.....	16
1.3.6 Chirurgische Therapie.....	17

1.4 Ätiologie und Genetische Grundlagen.....	17
1.4.1 Einflussfaktoren auf Vaskulogenese und Angiogenese	19
1.4.1.1 VEGF	20
1.4.1.2 TGF- β 1	22
1.4.1.3 IL-6.....	23
1.4.2 Wachstumsinduktion vaskulärer Malformationen im Krankheitsverlauf.....	23
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Zellkultur.....	25
2.1.1 Malformationszellen	25
2.1.2 CD31-Immunhistochemie.....	27
2.1.3 Kultivierung der Zellen	28
2.1.4 Splitten, Passagieren	29
2.1.5 Einfrieren.....	30
2.1.6 Auftauen.....	30
2.2. Experimente zur Zellproliferation.....	31
2.2.1 Proliferationsversuch.....	31
2.2.2 Resazurin-Assay.....	31
2.2.3 Dehnungsversuch	32
2.3. Expressionsanalyse	34
2.3.1 Proteinexpressionsanalyse	34
2.3.2 Genexpressionsanalyse	36
2.3.2.1 RNA-Isolation.....	36
2.3.2.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA	37
2.3.2.3 PCR	37
2.3.2.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	38

2.4. Statistische Auswertung	41
3 Ergebnisse.....	42
3.1 Experimente zur Zellproliferation.....	42
3.1.1 Resazurin Assay	42
3.1.2 Allgemeine Zellzählung ungedehnter Zellen in 6-Well-Platte	43
3.1.3 Zellzählung im Dehnungsversuch in 6-Well-Platte	44
3.1.3.1 Vergleich innerhalb der Entitäten zwischen Dehnungs- und Kontrollgruppe	44
3.1.3.2 Vergleich zwischen AVM, HDMEC und NHF	46
3.2 Proteinexpression.....	49
3.2.1. Interleukin 6 (IL-6)	49
3.2.2. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	51
3.2.3 Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)	53
3.3 Genexpression	55
3.3.1 PCR mit GAPDHrat, VEGF-A mit Primer VEGF1-hu und VEGF4-hu.....	55
3.3.2 Quantitative Real-Time PCR mit GAPDHrat und VEGF4-hu	57
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	59
3.4.1 Proliferationsversuche.....	59
3.4.2 Expression von Wachstumsfaktoren	60
4 Diskussion	61
4.1 Wachstumsverhalten der Zellen	61
4.1.1 Basales Wachstumsverhalten der AVM verglichen mit gesunden Zellen des vaskulären Systems	61
4.1.2 Wachstumsverhalten der gedehnten AVM, NHF und HDMEC	62
4.2 Expression von Wachstumsfaktoren mit und ohne mechanische Belastung...	64
4.2.1 Interleukin 6 (IL-6)	64
4.2.2 Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)	65

4.2.3 Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)	68
4.3 Klinische Anwendung der Forschungsergebnisse.....	70
4.3.1 VEGF-Inhibitor Bevacizumab	70
4.3.2 MEK-Inhibitor Trametinib	71
4.3.3 NRP1-Inhibitor EG00229	72
4.3.4 Ausblick.....	72
4.3.5 Limitationen der Arbeit	73
5 Zusammenfassung	74
6 Literaturverzeichnis	77
7 Anhang	I
7.1 Tabellenverzeichnis.....	I
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	II
7.3 Abkürzungsverzeichnis	V
7.4 Ergänzende Informationen	IX
7.4.1 Abbildungen	IX
7.4.2 Informationen zu verwendetem/r Labormaterial/-ausstattung	XI
7.5 Danksagung	XXI

1 Einleitung

1.1 Klassifikation vaskulärer Anomalien

Bei vaskulären Anomalien handelt es sich um eine heterogene Gruppe von seltenen Erkrankungen, die mit Störungen der Gefäßentwicklung einhergehen. Die pathologische Vaskulogenese bzw. Angiogenese führt zu erkennbaren vaskulären Läsionen und daraus hervorgehenden Deformitäten (1). Unter Vaskulogenese versteht man den Prozess der Entstehung eines primären vaskulären Plexus im Embryo. Die Entwicklung weiterer sich nach und nach verzweigender Blutgefäße auf Grundlage dessen nennt man Angiogenese (2). Basierend auf ihren biologisch-histologischen und klinischen Besonderheiten ist es möglich, vaskuläre Anomalien in Untergruppen aufzuteilen (3). Erst diese genaue Klassifikation ermöglicht eine korrekte Einteilung der verschiedenen Krankheitsbilder und ist für eine gezielte Therapie unabdingbar. Die sogenannte International Society for the Study of Vascular Anomalies, kurz ISSVA, macht es sich daher seit 1996 zur Aufgabe, in regelmäßigen Abständen eine auf neuester Forschung beruhende Klassifikation zu erarbeiten, auf die hier Bezug genommen werden soll.

Primär lassen sich zwei große Gruppen voneinander unterscheiden: Die vaskulären Neoplasien und die vaskulären Malformationen (4).

1.1.1 Vaskuläre Neoplasien

Vaskuläre Neoplasien sind im Unterschied zu den vaskulären Malformationen als echte Neoplasien mit pathologischer Zellproliferation anzusehen (5). Die häufigsten vaskulären Neoplasien stellen die Hämangiome dar, die zur Gruppe der benignen vaskulären Neoplasien gehören. Darüber hinaus gibt es maligne Neoplasien und die Gruppe der lokal aggressiven Neoplasien sowie Borderline-Tumore.

1.1.2 Vaskuläre Malformationen

Vaskuläre Malformationen zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit wenigen Ausnahmen bereits zum Zeitpunkt der Geburt bestehen. Im Unterschied zu vaskulären Neoplasien weisen sie keine Anzeichen eines pathologisch erhöhten Zellumsatzes in Form einer endothelialen Proliferation, sondern vor allem strukturelle Defizite auf. Ihr Endothelium ist charakteristischerweise sehr flach. Zudem ist ein mit dem Körperwachstum assoziiertes Größenwachstum der Läsion beobachtbar (5–7).

Ursächlich scheinen Fehler in der embryonalen Entwicklung zu sein, die in vielen Fällen auf Mutationen bestimmter in der Vaskulo- und Angiogenese entscheidender Gene zurückzuführen sind. Dabei wird der Prozess der Blutgefäßformation in Bezug auf die endothelialen Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs gestört. Vaskuläre Malformationen können sehr komplex und mit Anomalien des Parenchyms assoziiert sein (3,4).

Anhand des Flussverhaltens können mehrere Unterformen der vaskulären Malformationen unterschieden werden. Man unterteilt vaskuläre Malformationen in Slow-Flow- (kapilläre, lymphatische und venöse Malformationen) und Fast-Flow-Malformationen (arteriovenöse Malformationen und arteriovenöse Fisteln) (7,8).

1.1.2.1 Kapilläre Malformationen

Unter kapillären Malformationen (CM) versteht man Deformitäten des Kapillarnetzes. Sie zählen zu den Slow-Flow-Malformationen und finden sich meist in Kopf- und Nackenregion. Wie alle vaskulären Malformationen sind auch CMs bereits bei Geburt existent und wachsen in Proportion zum Körperwachstum des Kindes mit (9).

Ihr klinisches Bild umfasst flache, pink-rötliche Hautbläschen, die ein auffälliges Muster zeichnen können (3,10,11). Am häufigsten zeigen sie sich in Form der sogenannten „port-wine-stains“ mit einer Inzidenz von 0,3 % (8,12).

1.1.2.2 Lymphatische Malformationen

Lymphatische Malformationen unterteilen sich in mikrozystische LM mit multiplen, kleinen Zysten unter 2,5 cm, makrozystische LM mit großen Zysten über 2,5 cm und kombinierte LM. Prädilektionsstellen sind Axilla, Thorax, die zervikofaziale Region, sowie Mediastinum, Retroperitoneum, die Gesäßbacken und der Anogenitalbereich. Mitunter manifestieren sie sich in Form winzig kleiner Vesikel auf der Haut (3,12).

LM können sowohl das Subkutangewebe als auch Muskeln, Knochen und seltener die inneren Organe wie den Gastrointestinaltrakt oder die Lunge betreffen. Am meisten betroffen zeigen sich jedoch Haut und Parenchym (3).

1.1.2.3 Venöse Malformationen

Bei den venösen Malformationen (VM) handelt es sich um die häufigste Art der Malformationen (13). Klinisch präsentieren sie sich als bläuliche, weiche und kompressible Läsionen, die sowohl zentral an einer Stelle als auch multipel über den

Körper verteilt auftreten können (12). LM weisen ein lageabhängiges Wachstum auf und reagieren mit einer Ausdehnung der pathologischen venösen Gefäße auf das Valsalva-Manöver (14).

Prädilektionsstellen sind Gesicht, Gliedmaßen und Rumpf. Ebenso betroffen sein können Pharynxregion, Genitalien, Blase, Gehirn, Rückenmark, Leber, Milz, Lunge, Skelettmuskel und Knochen (12).

1.1.2.4 Arteriovenöse Malformationen

Arteriovenöse Malformationen (AVM) gehören zur Gruppe der Fast-Flow-Malformationen. Charakteristisch für AVM sind abnormale Verbindungen oder auch Shunts zwischen Venen und Arterien. Ein Kapillarbett als Zwischenstation fehlt. Diese beschriebenen Shunts bilden den sogenannten Nidus der AVM (3). Innerhalb der Gefäßwand von betroffenen Arterien und Venen der AVM fallen uneinheitliche, myxoid anmutende, entartete Gewebestrukturen auf (15).

In der Klinik lassen sich mehrere Stadien arteriovenöser Malformationen erkennen, die in der sogenannten Schobingerklassifikation unterschieden werden (siehe Tab.1).

▼Tab. 1: Schobinger Klassifikation. Quelle: nach Holcomb et al., 2010, S. 994

Stadium	Klinische Besonderheiten
I: Ruhendes Stadium	<ul style="list-style-type: none"> ○ pink-bläuliche Flecken ○ Erwärmte Haut über der Läsion ○ AV-Shunts in Doppler-Sonographie sichtbar
II: Expansionsstadium	<ul style="list-style-type: none"> ➤ wie Stadium I + ○ Größenzunahme ○ Pulsieren/Schwirren über Shunt ○ straff gespannte/gewundene Venen
III: Destruktionsstadium	<ul style="list-style-type: none"> ➤ wie Stadium II + ○ Ulzerationen, Blutungen, ○ persistierende Schmerzen, Gewebnekrosen
IV: Dekompensationsstadium	<ul style="list-style-type: none"> ➤ wie Stadium III + ○ Herzinsuffizienz

Als Einflussfaktoren werden sowohl hormonelle Schwankungen, wie sie in Pubertät oder Schwangerschaft auftreten, lokale Traumata als auch operative oder

endovaskuläre Eingriffe gesehen. Diese können für eine plötzliche Progredienz der Erkrankung sorgen. Ihre Unberechenbarkeit ist der Tatsache geschuldet, dass die genaue Pathophysiologie des Größenwachstums bis heute nicht vollständig zu erklären ist (3,12,16).

Arteriovenöse Malformationen sind meist lokal begrenzt zu finden, aber auch ausgedehnte Varianten sind bekannt (3). Die häufigste Lokalisation der AVM ist intrazerebral. Zudem findet man AVMs gehäuft in der Kopf-Hals-Region (siehe Abb. 1) ebenso an den Extremitäten, dem Rumpf und im viszeralen Bereich (3,12).



▲ Abb. 1: (1) AVM des Auges. (2) Palmare AVM des Fußes. Quelle: Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Regensburg.

1.1.2.5 Arteriovenöse Fisteln

Unter einer arteriovenösen Fistel (AVF) versteht man eine direkte Kurzschlussverbindung zwischen Arterie und Vene ohne zwischengeschaltetes Kapillarbett. Arteriovenöse Fisteln werden unterteilt in kongenitale und erworbene AVF. Letztere können dabei auf Traumata zurückgehen sowie iatrogenen Ursache z.B. in Verbindung mit einer Hämodialyse sein. In ihrer kongenitalen Ausprägung stellt die AVF die einfachste Form einer arteriovenösen Malformation dar und zählt folglich ebenfalls zu den Fast-Flow-Malformationen (17–20).

Sowohl arteriovenöse Fisteln als auch arteriovenöse Malformationen können infolge einer hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie (HHT) auftreten (4).

1.1.2.6 Kombinierte Malformationen

Kombinierte Malformationen sind definiert als „zwei oder mehr Malformationen, die in einer Läsion gefunden werden können“ (4). Das Krankheitsbild erweist sich

dementsprechend als Mischung der bereits besprochenen kapillären, lymphatischen, venösen und arteriovenösen Malformationen, je nach Anteil der jeweiligen Malformation.

1.1.2.7 Mit anderen Anomalien assoziierte Malformationen

Auch in Zusammenhang mit anderen Anomalien auftretende Malformationen lassen sich in Slow-Flow oder Fast-Flow unterteilen. Sie verbindet eine Assoziation mit Skelett- und Parenchym-Hypertrophie (3). Es sind viele Formen kombinierter Malformationen bekannt. Die fünf häufigsten und wichtigsten sind das Klippel-Trenaunay-Syndrom, das Parks-Weber-Syndrom, das Maffucci-Syndrom, das Sturge-Weber-Syndrom und das Proteus-Syndrom, auf die hier aber nicht weiter eingegangen werden soll.

1.2 Diagnostik

Zu den Standards einer gelungenen Diagnostik gehören eine genaue klinische Untersuchung und eine ausführliche Patientenanamnese. Um Gewissheit über Größe, Lokalisation und die Form der vaskulären Malformation zu erhalten, sind bildgebende Verfahren notwendig (21,22). Kann die Diagnosestellung auf diesem Weg nicht sicher erfolgen, muss erwogen werden, eine (Exzisions-) Biopsie des betroffenen Gewebes zu entnehmen (12).

Die Formen der bildgebenden Verfahren sollen nun in Bezug auf ihre Relevanz in der Diagnostik vaskulärer Malformationen näher beleuchtet werden.

1.2.1 Sonographie

Die Sonographie bietet sich als Methode der Erstuntersuchung oberflächlicher vaskulärer Malformationen an (21,23). Über den Farbdoppler lassen sich auf einfache Weise in Echtzeit Fluss und Flussgeschwindigkeit innerhalb der Gefäße messen und analysieren. So können Fast-Flow- und Slow-Flow-Läsionen voneinander unterschieden werden. Die Sonographie besticht mit ihrer Noninvasivität und ist als Monitoring-Mittel in der Nachbehandlung von Bedeutung. Diagnostisch weniger gut beurteilbar sind tiefer gelegene Läsionen oder Läsionen, die an Luft oder Knochen angrenzen (21,24).

1.2.2 Magnetresonanztomographie

Die MRT stellt den Goldstandard der Diagnostik vaskulärer Malformationen dar (12). Sie gibt Aufschluss über den vaskulären Blutfluss, das Ausmaß der Läsion und bestehende abnormale Gefäße. Außerdem stellt sie die Beziehung der Malformation zum umliegenden Gewebe mit seinen Nerven, Sehnen und Muskeln dar (24).

Die MRT ist die einzige diagnostische Methode, die vaskuläre Malformationen mit hoher Sensitivität und Spezifität in Slow-Flow- und High-Flow-Läsionen zu unterteilen vermag (21).

1.2.3 Computertomographie

Die CT mit der Möglichkeit zur intravenösen Kontrastmittelgabe bietet sich zur raschen Einschätzung einer Malformation und eventueller Folgen an. Die hohe räumliche Auflösung der CT ist der Grund, weshalb konkrete Aussagen über den Ort der Malformation und den genauen Aufbau der zu- und abführenden Gefäße getroffen werden können. Für Messungen des Blutflusses ist die CT nur bedingt geeignet (21,24).

1.2.4 Phlebographie und Angiographie

Unter Phlebo- und Angiographie versteht man die Injektion von Kontrastmittel in venöse bzw. arterielle Gefäße, die teilweise direkt in der Läsionsstelle liegen. Unter Röntgenkontrolle können dadurch hämodynamische Charakteristika der Läsion, also deren Volumen und Fluss, besser eingeschätzt werden als durch die vorbeschriebene Diagnostik. Dies ist vor allem in Bezug auf die nachfolgende Therapieplanung wichtig. Hier ist es von Nutzen, eine genaue Vorstellung über die Möglichkeit zur Sklerosierung oder Embolisierung und der Verweildauer der Sklerosanzien in der Läsion zu erhalten, die durch Blutvolumen und -fluss beeinflusst wird. Es ist anzumerken, dass es sich bei der Phlebo- und Angiographie um invasive und schmerzhaft Maßnahmen handelt, bei denen der Patient Strahlung ausgesetzt ist (24,25).

1.3 Therapie

Vaskuläre Malformationen können sowohl konservativ als auch interventionell behandelt werden (8,13). Mögliche interventionelle Therapieformen sind Lasertherapie, Sklerotherapie, Embolisierungstherapie, endoluminale Verfahren wie Radiofrequenzablation, Kryoablation oder eine endovaskuläre Lasertherapie sowie

eine chirurgische Therapie (13,26,27). Die Wahl des Therapieschemas hängt maßgeblich von den Fluss-Charakteristika der jeweiligen Malformation ab (28).

Der wichtigste Grundsatz in der Therapie vaskulärer Malformationen ist die multimodale Behandlung des Patienten durch ein interdisziplinäres Ärzteteam. So können individuelle Therapieschemata für den einzelnen Patienten entwickelt werden, die der individuellen Erkrankung des Patienten gerecht werden und eine optimale Akut- und Anschlussbetreuung ermöglichen (28).

1.3.1 Konservative Therapie

Die konservative Therapie zielt einerseits auf die Kompression der Malformationen z.B. durch speziell angepasste Strümpfe ab. Diese sorgen für den Schutz der Haut, reduzieren Schwellungen und wirken einer Blutstase sowie einer Koagulopathie entgegen (29).

Auch eine medikamentöse Therapie kann indiziert sein, so zum Beispiel bei Auftreten von Schmerzen. Zur Infektionsprophylaxe oder Behandlung greift man auf Antibiotika zurück (8). Die Aspirin-Gabe dient dem Zweck, die Plättchenaggregation zu inhibieren und somit das Thromboserisiko zu minimieren (30).

Mittlerweile stehen neben symptomorientierten Medikamenten auch Pharmaka zur Verfügung, die auf die Vaskulogenese und Angioproliferation von Malformationen einwirken. Hier soll auf die Behandlungsoptionen hinsichtlich AVM eingegangen werden.

1.3.1.1 VEGF-Inhibitor Bevacizumab

Vielversprechend in der Behandlung von AVM zeigt sich der seit mehreren Jahren erprobte VEGF-Inhibitor Bevacizumab. Bevacizumab ist ein humanisierter, monoklonaler Anti-VEGF-Antikörper, der eine Bindung mit VEGF-A-Isoformen eingeht und diese inhibiert (31,32). Aufgrund dieser Wirkweise erfolgte der primäre Einsatz von Bevacizumab in der Tumorthherapie. Hier profitierten vor allem PatientInnen mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen z.B. bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC), Glioblastom, metastasiertem Kolonkarzinom oder Hepatozellulärem Karzinom (33).

Abgeleitet von seinem Wirkmechanismus konnte in mehreren Studien auch ein therapeutischer Nutzen des VEGF-Inhibitors in Bezug auf arteriovenöse

Malformationen festgestellt werden. So wurde ein positiver Effekt von submukös injiziertem Bevacizumab (Avastin) auf die therapierefraktäre Epistaxis im Rahmen eines Morbus Oslers beobachtet (34). Auch in Kombination mit einer Nd:YAG-Laser-Therapie konnten verbesserte Ergebnisse in der Behandlung der HHT erzielt werden. Sowohl Dauer, Frequenz und Schwere der Epistaxis sowie der Bedarf an medikamentöser Therapie wurde durch den Zusatz intramukös verabreichten Bevacizumabs vermindert, sodass auch die Anzahl benötigter Bluttransfusionen zurückging. Daraus resultiert die Annahme einer Überlegenheit der Dualtherapie verglichen mit der alleinigen Nd:YAG-Laser-Therapie (35). Im Mausmodell zeigte sich eine durch topische Applikation von Bevacizumab induzierte Verminderung der Entwicklung und Progression von AVM sowie von Blutungskomplikationen im Verlauf der Erkrankung (36). Ähnliches konnte in Bezug auf die intraperitoneale Gabe von Bevacizumab bei AVM des Gehirns in Mäusen berichtet werden. Auch hier kam es zu einer Reduktion pathogener Blutgefäße (37).

Dosisabhängig treten mit einer Bevacizumab-Therapie assoziierte Nebenwirkungen auf. Hierbei kann es zu Herzinsuffizienz, Thromboembolien, Hämorrhagien, hypertensiven Krisen oder einem nephritischen Syndrom kommen (38).

In der Therapie arteriovenöser Malformationen erfolgt die Gabe von Bevacizumab noch im Rahmen des Off-Label Uses. Für eine breitere Anwendung bedarf es weiterer Studien mit größerem Patientenkollektiv, um den Nutzen der Therapie gegen möglicherweise auftretende Nebenwirkungen abwägen zu können und neue Erkenntnisse z.B. in Bezug auf eine sinnvolle Dosierung zu gewinnen.

1.3.1.2 MEK-Inhibitor Trametinib

Trametinib ist neben Cobimetinib und Binimetinib ein seit einiger Zeit in der Tumorthherapie eingesetzter MEK-Inhibitor, der den RAS/MAPK/ERK Signalweg deaktiviert. In der Therapie des BRAF-mutierten Melanoms konnten hiermit hoffnungsvolle Ergebnisse erzielt werden (39).

Daraufhin folgten auch Studien zum Einsatz Trametinibs in der Behandlung arteriovenöser Malformationen. Hierbei konnte eine durch Trametinib hervorgerufene Reduktion der ERK1/2-Aktivierung und der damit assoziierten Gefäßproliferation in MAPK2K1-mutierten AVM beobachtet werden (40). In einer Fallstudie zu im KRAS-

Gen mutierten AVM konnte durch Trametinib-Substitution eine signifikante Reduktion des arteriellen Flusses innerhalb der Läsion erzielt werden (41).

1.3.2 Lasertherapie

Es stehen unterschiedliche Laser zur Auswahl. Farbstofflaser, wie der Flashlamp-pumped dye laser, Argon-Laser und CO₂-Laser werden in der Behandlung oberflächlicher Läsionen verwendet. Den Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Laser (Nd:YAG-Laser) kann man sowohl zur Behandlung tiefliegender als auch oberflächlicher Läsionen und zur Behandlung ganzer Hohlorgane bzw. Körperhöhlen verwenden (27). Sein Vorteil besteht außerdem in einer bakteriziden Wirkung und einer nur geringfügigen Schädigung des umliegenden Gewebes. So kann die inflammatorische Reaktion deutlich eingeschränkt werden (42). Die Wahl des Lasers hängt somit von Lage, Größe und Art der Malformation ab. Bei kleineren und oberflächlicheren Läsionen reicht eine Behandlung mit kurzer Pulsdauer aus. Größere und tiefere Läsionen verlangen dagegen nach einer Behandlung mit längerer Pulsdauer (27).

1.3.3 Sklerotherapie

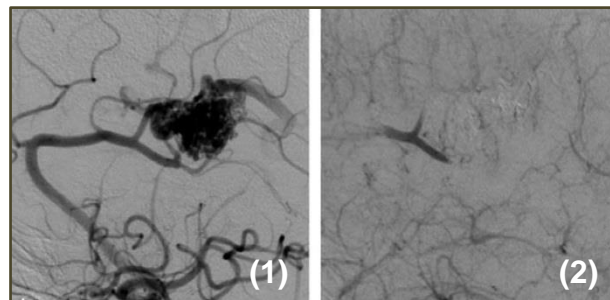
Bei der Sklerotherapie wird dem Patienten ein Sklerosanz injiziert. Das Sklerosanz führt zu einer Irritation der Gefäßendothelzellen, was wiederum die Entstehung eines Thrombus nach sich zieht. Somit bildet sich ein fibröses Geflecht aus dem ursprünglichen Gefäß, das letztendlich vollständig abgebaut wird (43). In der Regel wird der Eingriff in lokaler bzw. in Allgemeinanästhesie durchgeführt (24).

Für die Sklerotherapie stehen verschiedene Sklerosanzien zur Verfügung. Häufig Verwendung finden Natrium-Tetradecylsulfat (STS), Bleomycin, Doxycyclin, Ethanol, Picibanil und Polidocanol (44). Jedes davon weist sowohl Vor- als auch Nachteile auf, weshalb sie individuell auf die Therapie jedes einzelnen Patienten angepasst werden müssen (28).

In der Zeit nach einer Sklerotherapie ist ein sorgfältiges Monitoring empfehlenswert. Im Behandlungsbereich kann es zu Schwellungen und Hautläsionen kommen, die allerdings zum Großteil im Laufe der Zeit abnehmen. Zudem können Nervenläsionen im umliegenden Gewebe, Nekrosen der darüberliegenden Haut, Infektionen und dosisabhängig kardiotoxische Effekte auftreten (3,28). Die Nachsorge-Periode sollte sich über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren erstrecken (24).

1.3.4 Embolisierungstherapie

Für eine Embolisierungstherapie ist es entscheidend, die der Läsion zuführenden Gefäße gut darzustellen. Dies wird über die Gabe von Kontrastmittel im Rahmen einer Angiographie bewerkstelligt (siehe Abb. 2). Im Anschluss daran kann eine effiziente Embolisierung erfolgen. Dafür kommen entweder flüssige und semi-flüssige Lösungen wie Onyx, Ethanol, Äthoxysklerol, n-Butyl-cyanoacrylat und Aminosäuren oder partikelförmige Substanzen wie Siliziumkugeln oder Polyvinylalkohol zur Anwendung. Auch mechanische Vorrichtungen wie Stahlspulen, "Stahlspinnen" und abnehmbare Ballone wirken embolisierend. Die Katheterisierung und Freisetzung der Embolisierungsstoffe erfolgt unter fluoroskopischer Kontrolle und Allgemeinanästhesie. Eine Embolisierung erfolgt in der Regel über mehrere Sitzungen (44,45).



▲ **Abb. 2:** AVM des rechten Frontallappens; Arteriogramm (1) vor Embolisierungstherapie; A. carotis interna dextra mit Versorgung der AVM durch Aa. pericallosae dextrae und superfizieller venöser Drainage. (2) nach Embolisierungstherapie; Komplette Okklusion der AVM. Quelle: Panagiotopoulos V. et al., 2009, S. 105

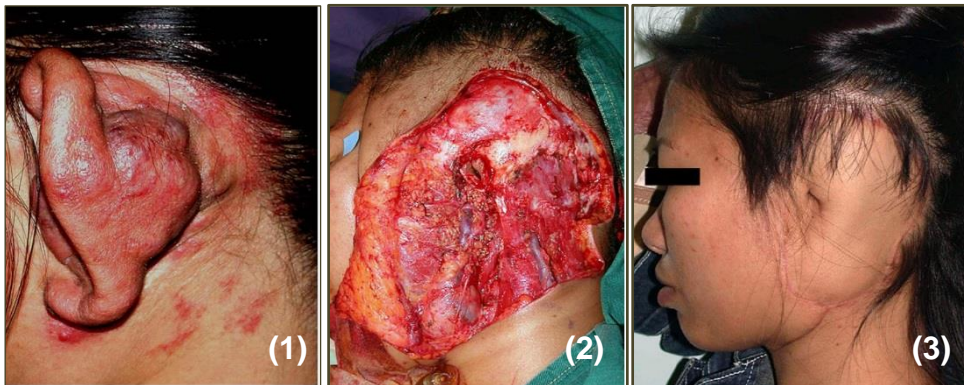
1.3.5 Endoluminale Verfahren

Endoluminale Verfahren wie die endovaskuläre Lasertherapie, die Radiofrequenz- und die Kryoablation verfolgen den Zweck, große dysplastische Venen im Rahmen einer komplexen venösen Malformation minimalinvasiv zu verschließen. Als Komplikationen können oberflächliche Verbrennungen oder eine Schädigung der nächstgelegenen Nerven auftreten. Prophylaktisch wird daher Kochsalzlösung in die Umgebung des Gefäßes gespritzt, das ihm als eine Art Wasserkissen zum Schutz dient. Als weitere Nebenwirkungen sind Thrombosen und Hautverfärbungen im Therapiebereich zu nennen (26).

1.3.6 Chirurgische Therapie

Mit der Einführung neuer interventioneller Therapieformen wie der Sklerotherapie hat sich die Stellung der chirurgischen Therapie im Management von vaskulären Malformationen verändert. Sie wird nun häufig als Kombinationstherapie mit anderen Therapieformen eingesetzt. Nach wie vor stellt sie einen wichtigen Teil in der Behandlung vaskulärer Malformationen dar (siehe Abb.3) (46,47). Kleinere und oberflächlich liegende Malformationen weisen nach erfolgten chirurgischen Eingriffen gute Ergebnisse und geringe Rezidivraten auf. Komplette Resektionen sind in diesen Fällen möglich (3).

Mögliche Komplikationen eines operativen Eingriffs sind sowohl Infektionen, Fistelbildung als auch die Beeinträchtigung vaskulärer Strukturen und Nerven und das Auftreten postoperativer Wundheilungsstörungen (47,48). Zudem muss bedacht werden, dass das Wachstum vaskulärer Malformationen durch unvollständige Resektion stimuliert werden und zu einem Progress der Erkrankung führen kann (24).

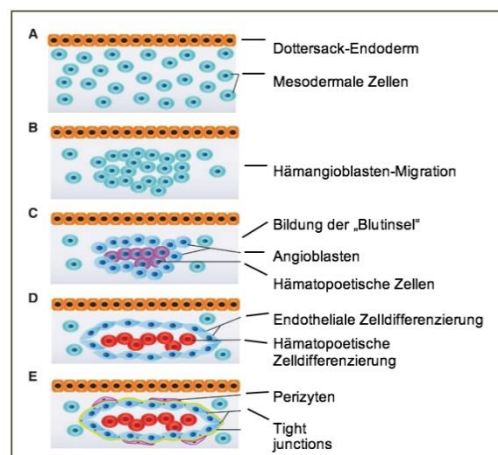


▲ **Abb. 3: AVM des linken Ohres im Stadium II mit Ulzerationen des umliegenden Gewebes. (1) Vor Totalamputation. (2) Während der Totalamputation des Ohrs. (3) Nach Amputation; Hautimplantat aus ulnarem Hautlappen.** Quelle: Visser A. et al., 2011, S. 288

1.4 Ätiologie und Genetische Grundlagen

Um die Ätiologie vaskulärer Malformationen zu verstehen, ist es notwendig, einen Blick auf die embryonale Blutgefäßentwicklung zu werfen. Blutgefäße entstehen infolge zweier aufeinander folgender Prozesse: der Vaskulogenese und der Angiogenese (49). Die Vaskulogenese umfasst die Entstehung eines primären vaskulären Plexus (siehe Abb.4). Hierbei wandeln sich die dem Dottersack anliegenden mesodermalen Zellen zu ersten Hämangioblasten und formen im Rahmen einer Migration eine

sogenannte „Blutinsel“, in deren Mitte sich die Vorläuferzellen zu hämatopoetischen Stammzellen und an deren Rand zu Angioblasten weiterdifferenzieren. In einem letzten Schritt lagern sich Perizyten an die äußeren Angioblasten, die sich letztlich zu Endothelzellen differenzieren, an und es werden Tight junctions gebildet, die das Gefäß nach außen hin abdichten (49–51).



▲ **Abb. 4: Schema der extraembryonalen Vaskulogenese.** Quelle: Patel-Hett S. et al., 2011, S.

354

In der Angiogenese kommt es zum Wachstum von Blutgefäßen auf Grundlage der während der Vaskulogenese entstandenen primären Kapillaren. Dies vollzieht sich auf unterschiedliche Art und Weise. Blutgefäße können hierbei entweder durch „Sprouting“ (Sprießen) (siehe Abb.5.1), „Pruning“ (Ausästen) oder „Splitting“ (Aufspaltung), das auch „Intussuszeption“ genannt wird (siehe Abb.5.2), entstehen. Um weitere Blutgefäße an die bereits bestehenden anzuknüpfen, ist die Induktion der Zellapoptose und das Ablösen der Perizyten an den Übergangsstellen erforderlich. Anschließend migrieren sogenannte „Tip-cells“ infolge eines Stimulus an eben jene Stellen und bewirken mit „Stalk-cells“ eine nachfolgende Endothelzell-Proliferation. Um das neu entstandene Gefäßrohr siedeln sich Perizyten und/oder glatte Muskelzellen an (49). Das Entstehen von Blutgefäßen geht dementsprechend auf ein Gleichgewicht zwischen pro-apoptischen und anti-apoptischen Signalen zurück (52,53).



1.4.1 Einflussfaktoren auf Vaskulogenese und Angiogenese

Im Verlauf dieser frühen Blutgefäßentwicklung nehmen verschiedene Faktoren Einfluss, um einen erfolgreichen Ablauf zu gewährleisten. Dazu zählen Growth factors wie der Vascular endothelial growth factor (VEGF) und der Transforming growth factor- β (TGF- β), Chemokine und Proteasen sowie Zytokine wie zum Beispiel Interleukine und viele mehr (54). Sie sind verantwortlich für den koordinierten Fortgang der einzelnen Schritte in Vaskulo- und Angiogenese (49,55).

Die Endothelzellen und die glatten Muskelzellen innerhalb der Blutgefäße sind zudem physiologischerweise durch den Blutfluss dem Einwirken mechanischer Stimuli wie Scherspannungen und zyklischer Dehnung ausgesetzt. Dies kann über die Aktivierung mechanosensitiver Rezeptoren, unter ihnen Alk1 (activin receptor- like kinase 1) und Notch1 oder Notch4, und der anschließenden Expression von VEGF strukturelle zelluläre Veränderungen in Form eines Remodellings zur Folge haben (56–61).

Je nach Stärke und zeitlicher Länge der einwirkenden zyklischen Dehnung oder Scherspannung ergeben sich unterschiedliche Effekte. In einer Studie konnte festgestellt werden, dass zyklische Dehnung (1 Hz, 20%) von Endothelzellen zu einer zeitweisen Erhöhung von VEGF auf RNA- und Proteinebene führt (62). Des Weiteren konnte bei Endothelzellen, die einer zyklischen Dehnung von 10 % bei 30 Zyklen pro Minute ausgesetzt waren, eine signifikante Steigerung der Zellproliferation festgestellt werden. Dies ging einher mit einer erhöhten Expression von VEGFR2. Interessanterweise zeigte zyklische Dehnung einen deutlicheren Einfluss als konstante, statische Dehnung (63). Im Falle einer dem gestörten Blutfluss nachempfundenen oszillatorischen Scherspannung konnte die Hochregulierung des Zellzyklus von Endothelzellen mittels Induktion von BMPR-spezifischem Smad 1/5 (Bone morphogenic protein receptor- spezifischem Smad 1/5) nachgewiesen werden. Bei laminarem Blutfluss blieb dieser Effekt hingegen aus. Die genaue Pathogenese dieses Prozesses ist noch ungewiss (58,64–66).

Die Genese vieler Tumorerkrankungen beinhaltet eine pathologische Vaskulo- und Angiogenese, ausgelöst durch Über- oder Unterexpression bestimmter Faktoren. Beim Mammakarzinom konnte eine vermehrte Ausschüttung von VEGF-A, VEGF-C und

VEGF-D mit der tumorassoziierten Angio- und Lymphangiogenese in Verbindung gebracht werden (67). Im Falle des hepatozellulären Karzinoms wurde ein die Angiogenese bestimmender Signalweg identifiziert, bei dem TGF- β 1 eine entscheidende Rolle spielt (68). In einer aktuellen Studie konnte auch ein Zusammenhang zwischen IL-6-Überexpression und tumorassoziiierter Angiogenese beim kolorektalen Karzinom hergestellt werden (69).

Bei vaskulären Malformationen wird eine ähnliche Pathogenese, meist ausgelöst durch somatische Mosaikmutationen und charakterisiert durch fehlerhafte Signalwege und damit verbundener Fehlregulation bestimmter Vaskulo- und Angiogenesefaktoren, vermutet, die zu einer erhöhten Proliferation der gefäßeigenen Endothelzellen führt (70–72). Im Falle arteriovenöser Malformationen bestehen Mutationen, die über den Rat sarcoma/Mitogen activated protein-Kinase/extracellular signal-regulated kinase-Signalweg (RAS/MAPK/ERK-Signalweg) zu Dysfunktionalität in der Angiogenese führen. Hierbei aktivieren AVM, die eine somatische Mutation des MAP2K1 aufweisen, den RAS/MAPK-Signalweg in Endothelzellen und produzieren signifikant mehr ERK1/2 (40,72). Auch Mutationen des KRAS (Kirsten RAAt Sarcoma virus) sind bekannt, die über denselben Signalweg zur pathologischen Aktivierung der Angiogenese und somit zur AVM-Progression führen (73).

In unserem Versuchsaufbau untersuchten wir die einem externen Stimulus in Form zyklischer Dehnung ausgesetzten Proben auf Protein- und RNA-Ebene infolge der vorangegangenen Betrachtungen auf die drei bekannten Angiogenesefaktoren VEGF, TGF- β 1 und IL-6.

1.4.1.1 VEGF

Der Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist ein in vitro vorkommendes endothelial und zell-spezifisches Mitogen und ein in vivo auftretender Angiogenese-Induktor, dem sowohl in Vaskulo- als auch Angiogenese eine große Bedeutung zugemessen wird (74,75). Hierbei stellen Endothelzellen die Zellen mit der größten Interaktion mit VEGF dar und exprimieren alle Isoformen des Wachstumsfaktors (76). Auch auf die Entwicklung von Fibroblasten wirkt VEGF ein. In einer Studie über die fibrogene Stimulation von Myofibroblasten konnte VEGF-D als entscheidender profibrogener Faktor ausgemacht werden, der Fibroblasten zur Proliferation anregt und zu einer Aktivierung zu Myofibroblasten sorgt (77).

Schon in den ersten Schritten der Blutgefäßentwicklung greift VEGF regulativ ein, indem er die vaskuläre Vorläuferzell-Differenzierung zu Angioblasten anregt (78). In der Angiogenese fungiert VEGF als vielseitiges Zytokin. Am besten erforscht ist in diesem Zusammenhang VEGF-A, der über den Rezeptor VEGFR-2 wirkt (siehe Abb. 36 im Anhang). Ihm wird eine Fähigkeit zur Stimulation von Zellüberleben, -invasion, -migration und -proliferation, Entzündungsreaktionen und der vaskulären Permeabilität zugeschrieben (49,55,75,79). Eine weitere wichtige Funktion von VEGF bzw. seines Rezeptors VEGFR2 besteht in der Aktivierung der TGF- β 1 vermittelten Apoptoseinduktion im Verlauf der Angiogenese (80).

In den meisten menschlichen Tumoren ist VEGF-mRNA nachzuweisen (81). In Bezug auf vaskuläre Malformationen konnte bei Erkrankten eine erhöhte Serumkonzentration von VEGF verglichen mit gesunden Kontrollgruppen beobachtet werden (82). Die Pathogenese einzelner Formen von Malformationen ist hierbei genauer untersucht worden. So wurde eine durch KRIT1 (Krev interaction trapped 1) Depletion verursachte VEGFR2-Aktivierung mit einer verstärkten Bildung von CCMs (Cerebral Cavernous Malformations) bei Mäusen in Verbindung gebracht (83). Bei KRIT1 handelt es sich um ein Gen, das für ein in die Bildung von Gefäßen integriertes Protein codiert. Zudem ist es Teil eines Komplexes, der die Suppression des Signalmoleküls RhoA-GTPase forciert. Rho GTPasen beeinflussen das Wachstum und die Widerstandskraft von Blutgefäßen. Ohne vorgeschaltete inhibierende Effekte bewirken diese GTPasen strukturelle Defekte der Gefäße infolge fehlerhafter Zellverbindungen, wie sie bei vaskulären Malformationen, insbesondere CCM, zu finden sind (84–86).

Des Weiteren zeigten die Endothelzellen zerebraler AVM laut einer Studie eine hohe VEGF-Expression und signifikant höhere Werte von VEGFR1 und 2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 und 2) (87). Untersuchungen an AVM unterschiedlicher Stadien ergaben zudem auffällige Werte von NRP1 und NRP2. Neuropilin-1 (NRP1) stellt einen Ko-Rezeptor von VEGFR-2 dar, der sich in Form eines Komplexes mit VEGFR-2 und VEGF aktivierend auf p38MAPK als Teil des Ras/MAPK/ERK-Signalwegs und somit auf die Angioproliferation auswirkt (88–90). Hierbei konnte eine höhere NRP1/NRP2-Expression der AVMs in Stadium III der Schobinger Klassifikation verglichen mit Stadium II detektiert werden, was für einen Zusammenhang dieser Faktoren mit der AVM-Progression spricht (91).

In der AVM-Bildung wurde eine erhöhte Sensitivität der Endothelzellen gegenüber VEGF und einer daraus begründeten Steigerung der Proliferation infolge eines defekten endothelialen ENG (Endoglin) beobachtet. ENG ist unter physiologischen Bedingungen für eine ausgeglichene Empfindlichkeit der Endothelzellen auf Aktivierungsreize von VEGF zuständig. Fällt dieser regulierende Faktor weg, setzt eine enthemmte VEGF-vermittelte Endothelzellproliferation ein (92).

1.4.1.2 TGF- β 1

Der Transforming growth factor- β (TGF- β) ist über verschiedene Signalwege an diversen Prozessen der Zellentwicklung beteiligt. Als Angiogenesefaktor weist TGF- β sowohl angiogene als auch angiostatische Qualitäten auf (74,96,97). Dabei wird laut Studien vor allem TGF- β 1 eine wichtige Rolle in der Angiogenese zugeschrieben (siehe Abb. 37 im Anhang) (50). In der Vaskulogenese wirkt TGF- β als regulatorischer Faktor auf die Differenzierung der embryonalen Stammzellen ein. Hierfür wird VEGF als Stimulanz benötigt (80,97). Während der Angiogenese kommt es zu einer TGF- β 1 induzierten Apoptose und einem Verlust der zelleigenen Tip-cell- und Stalk-cell-Identität. Dieser Vorgang wird wiederum durch VEGF stimuliert (80,96). Zudem sind durch TGF- β 1 initiierte Signalwege an der Rekrutierung und Differenzierung von glatten Muskelzellen beteiligt, die zur Stabilisierung der Gefäßwand benötigt werden (50,51,97).

Hinsichtlich vaskulärer Malformationen beruht seine Rolle vor allem in seinem Einfluss auf die Pathogenese von HHT. Zu dieser Form von arteriovenöser Malformation scheint es u.a. durch eine Mutation im TGF- β /BMP-Signalweg zu kommen, der unter physiologischen Bedingungen regulierend auf die Differenzierung embryonaler und somatischer Stammzellen einwirkt (98,99). Mehrheitlich ist bei HHT eine Mutation der Mechanorezeptoren Alk1 und ENG beobachtbar, die als Rezeptoren für BMP und TGF- β fungieren. Die durch TGF- β im Gleichgewicht gehaltene Mischung aus Aktivierung und Inhibition von Zellproliferation, -migration und -invasion erfolgt über seine Rezeptorbindung an Alk1 und Alk5. Alk1 vermittelt hierbei infolge niedriger TGF- β -Expression die Aktivierung dieser Prozesse, Alk5 infolge hoher TGF- β -Expression die Inhibition (siehe Abb. 3 im Anhang) (100–103). BMP wirkt antagonistisch zu TGF- β und induziert eine Inhibition der Zellproliferation und eine Rekrutierung muraler Zellen über Alk1-Bindung (104,105). Wirken Scherkräfte auf die Endothelzellen ein, kommt es über besagte Mechanorezeptoren durch eine Sensitivierung der

Endothelzellen auf BMP9 zu einer gesteigerten Inhibition der Endothelzell-Proliferation und einer Rekrutierung muraler Zellen. Ist die dadurch entstehende Stabilität der Gefäße durch eine Mutation von Alk1 oder ENG nicht mehr gegeben, kann es zum Auftreten vaskulärer Malformationen kommen (106–108).

In Bezug auf Fibroblasten konnte nach Einwirkung mechanischer Dehnung eine erhöhte Expression von TGF- β 1 nachgewiesen werden (109).

1.4.1.3 IL-6

Interleukin 6 (IL-6) wird in der Literatur als Faktor beschrieben, der die endotheliale Zellmigration im Verlauf der Angiogenese stimuliert. In der Neovaskularisierung wird IL-6 eine Rolle als Induktor zugeschrieben (110). Laut neuen Studien scheint IL-6 ein ähnlich potenter Induktor des Angiogenese-Sproutings zu sein wie VEGF. Im Vergleich zu VEGF mit dem Ergebnis defekter Gefäße (111).

1.4.2 Wachstumsinduktion vaskulärer Malformationen im Krankheitsverlauf

Vaskuläre Malformation sind seit Geburt angelegt und wachsen im Verlauf proportional mit dem allgemeinen Körperwachstum des betroffenen Kindes mit. In der Pubertät beziehungsweise im jungen Erwachsenenalter kommt es häufig zu einer Aggravation mit deutlichem Wachstum und ggf. Komplikationen. In der aktuellen Literatur werden hormonelle bzw. mechanische Einflüsse, die das Wachstum beeinflussen, diskutiert, da während der Pubertät oder einer Schwangerschaft sowie nach Traumata im Läsionsbereich oder nach operativen Eingriffen ein gesteigertes Wachstum der Malformation beobachtbar ist (3,12,16,112). Diese Annahme führt zur Zielsetzung dieser Arbeit.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie oben ausführlich beschrieben zeigt sich infolge äußerer Einflüsse häufig ein schubhaftes Wachstum der Malformation. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erforschung des Einflusses mechanischen Stresses bzw. zyklischer Dehnung auf das Wachstum von Gefäßmalformationen, insbesondere auf das arteriovenöse Malformationen. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob eine Korrelation zwischen äußeren Einflussfaktoren wie beispielsweise Körperwachstum, lokalen Traumata oder den Scherkräften innerhalb der Gefäße und dem Wachstum der Malformation besteht bzw. ob der auf die Malformation ausgeübte mechanische Stress als Wachstumsreiz

wirkt. Zu diesem Zweck wurden AVM-Zellen sowie Endothelzellen und Fibroblasten aus gesundem Gewebe innerhalb einer Dehnungskammer zyklischer Dehnung ausgesetzt und anschließend in Hinblick auf die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren verglichen.

2 Material und Methoden

Zur Durchführung der Experimente kamen verschiedene Materialien wie Zellkulturen, Zellkulturmedium und Medienzusätze, Chemikalien und Lösungen, Assays, Material für RNA-Isolation, cDNA-Transkription und PCR sowie Geräte und Verbrauchsmaterial zur Anwendung (siehe Tab.4-9). Diese werden im Anhang näher beschrieben.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Malformationszellen

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden mit Malformationszellen, gewonnen aus arteriovenösen Malformationen, durchgeführt. Da es sich bei den Malformationszellen um eine Mischkultur, bestehend aus Endothelzellen und Fibroblasten handelte, wurden ihnen Kontrollgruppen humaner Endothelzellen (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, HDMEC) und humaner Fibroblasten (Normal Human Fibroblasts, NHF) gegenübergestellt.

HDMEC zeichnen sich dadurch aus, dass sie ebenso wie AVM CD31 als Oberflächenmarker exprimieren (113). Zudem sind beide mikrovaskulären Ursprungs und durch eine „tube formation“ in ihrer Entwicklung charakterisiert (114).

NHF zeigten sich als besonders geeignet aufgrund bereits vorheriger Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau. Hierbei wurde der Einfluss mechanischer Krafteinwirkung in Form zyklischer Dehnung auf Keloidfibroblasten und gegenübergestellte NHF in einem unserer Dehnungskammer entsprechenden Gerät analysiert (115).

Die Malformationszellen wurden im Rahmen operativer Resektionen nach pathologischer Inspektion in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Regensburg in dem Zeitraum von 28.06.2018-06.03.2019 gewonnen. Diese Arbeit wurde unter der Ethikantragsnummer 17-854-101 und mit schriftlicher Einverständniserklärung der Patienten (n=3) (siehe Tab.2) gemäß der Deklaration von Helsinki zu ethischen Grundsätzen für medizinische Forschung am Menschen durchgeführt.

▼ Tab. 2: Angaben zu den PatientInnen, deren AVM-Zellen Verwendung in dieser Forschungsarbeit fanden.

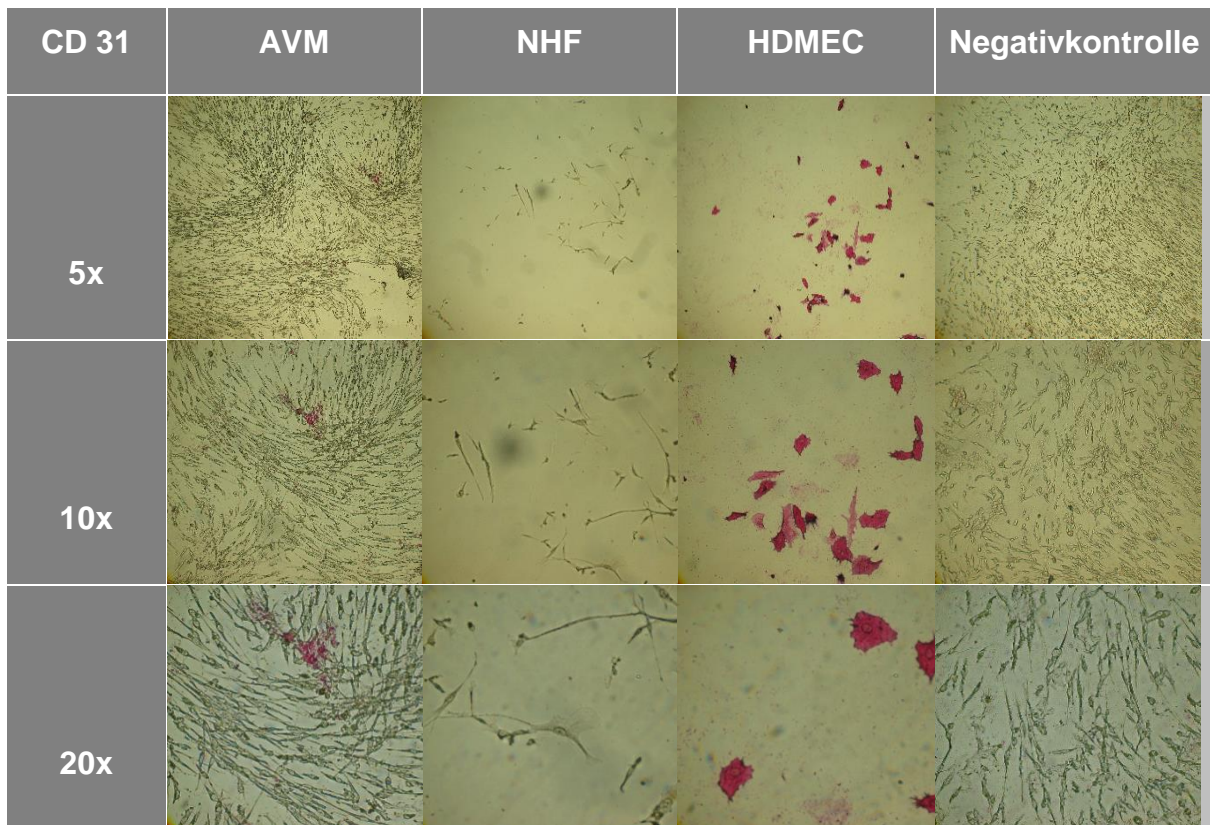
	PatientIn 1	PatientIn 2	PatientIn 3
Geschlecht	weiblich	weiblich	männlich
Alter	40 J.	26 J.	18 J.
Diagnose	Orbitale AV-Malformation rechts	AV-Malformation Nasenwurzel rechts	AV-Malformation submental links
Schobinger-Stadium	III	III	II
OP-Datum	Juni 2018	November 2018	März 2019

Zum Zweck der Isolation wurde die Probe in 20 ml phosphatgepufferter Salzsäure (PBS) und 4 ml Heparin gegeben und auf Eis gelagert transportiert. PBS und Heparin sollten die Blutgerinnung innerhalb des Gewebes verhindern und eine Beeinträchtigung desselben reduzieren (116). Der anschließende Prozess wurde unter ständiger Kühlung durch die Lagerung auf Eis und unter sterilen Verhältnissen in einer Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt. Zu Beginn erfolgte das Coating einer 12-Well-Platte. Hierfür wurde Extrazelluläre Matrix (ECM) über Nacht aufgetaut und die 12-Well-Platte samt der Spitzen im Kühl- oder Gefrierschrank gelagert. 1200 µl der ECM wurden in einem Verhältnis von 1:1 mit dem Low Glucose enthaltenden Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gemischt. Pro Well wurden 200 µl dieser Mischung pipettiert und diese 40 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert. Es folgte die Gefäßpräparation. Dazu wurde das Gefäß in eine Petrischale gelegt und dem Gefäß anhängende Strukturen entfernt. Es folgte die Spülung mit eiskalter PBS. Danach wurde das entnommene Gefäß in ca. 1x2 mm große Streifen geschnitten und jeweils 4 Gewebestückchen in ein mit ECM beschichtetes Well gelegt. Nach kurzer Anheftungszeit wurden 100 µl Endothelzellmedium hinzugegeben, ohne eine Ablösung der Streifen zu bewirken. Im Anschluss daran wurde die Platte für 4-6 Stunden bei 37° inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde erneut Endothelzellmedium dazugegeben, bis alle Gefäßstückchen bedeckt waren. Es bedurfte einer täglichen Kontrolle und einer ggf. wiederholten Gabe

von Endothelzellmedium. Die Gefäßstückchen wurden nach maximal 8 Tagen mit einer 1000 µl-Pipette entfernt. Anschließend erfolgte jeden 2.-3. Tag die Gabe von 1000 µl Medium. Nach maximal 9 Tagen wurden die Zellen sichtbar. Am Tag 15 erfolgte ein erneuter Mediumwechsel. Hier konnte auch bei einer ausreichenden Anzahl sichtbarer Zellen eine Cluster of differentiation 31-Färbung (CD31-Färbung), die im Folgenden beschrieben wird, durchgeführt werden. Am Tag 26. erfolgte die in 3.1.3 näher beschriebene Trypsinierung der Zellen und deren Transferierung in 25cm²-Zellkulturflaschen. Nach weiteren 4 Wochen konnten die Zellen eingefroren werden. Der Ablauf des Einfrierungsprozesses wird unter 3.1.4 beschrieben.

2.1.2 CD31-Immunhistochemie

Die CD31-Immunhistochemie verfolgte den Zweck, Endothelzellen in den Malformationszellen nachzuweisen. Hierzu wurde zuerst das Medium mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten lang mit PBS gewaschen. Die Prozedur wurde noch weitere zwei Mal wiederholt. Daraufhin wurde zur Fixierung Glycinalkohol hinzugegeben, der zuvor aus 112 mg Glycin und 70 ml 100%igem Ethanol hergestellt worden war. Im Anschluss daran erfolgten drei Waschgänge mit Blocking Buffer. Der Blocking Buffer war zu Beginn aus 2 g BSA und 200 ml PBS hergestellt und steril filtriert worden. Anschließend wurden 2000 µl des Primärantikörpers CD 31 in einer Verdünnung von 1:100 mit Blocking Buffer zu den Zellen gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen drei Mal in Folge für 10 Minuten mit Blocking Buffer gewaschen. Danach wurden 1000 µl des Sekundärantikörpers Goat Anti Mouse in einer Verdünnung von 1:400 mit Blocking Buffer hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten 3 Waschgänge von jeweils 10 Minuten mit Aqua destillata. Abschließend wurden 2 x 2 Tabletten des mit 20 ml Aqua destillata verdünnten Farbstoffs „Fast Red“ zu den Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die erfolgte Farbreaktion ließ auf vorhandene Endothelzellen schließen (siehe Abb.6).



▲ **Abb. 6: CD 31-Färbung bei AVM, NHF und HDMEC mit 5facher, 10facher und 20facher Vergrößerung.** Quelle: Dr. Caroline Seebauer, Universitätsklinikum Regensburg.

2.1.3 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Flow-Werkbank. Die Zellen wurden je nach Zellzahl in 25 cm²- und 75 cm²-Kulturflaschen kultiviert und in einem „Heracell 150“-Brutschrank unter 5,1 % CO₂ und einer Umgebungstemperatur von 37,0 °C verwahrt. Das verwendete Endothelzellnährmedium wurde entsprechend Herstellerangaben bedarfsgerecht frisch hergestellt (siehe Tab.3).

▼ Tab. 3: Herstellung des Endothelzellnährmediums

Herstellung des Endothelzellnährmediums
1. 50 ml Endothelial Cell Basal Medium
2. 50 µl Gentamicin solution
3. 100 µl Amphotericin B
4. 500 µl L-Glutamine solution
5. 1000 µl FCS-10
6. 200 µl ECGS/H
7. 50 µl hEGF-0.05
8. 50 µl hbFGF-0.5
9. 50µl Hydrocortison (HC-500)

Der Mediumwechsel erfolgte folgendermaßen: Das alte Medium wurde vorsichtig über eine Pasteurpipette, ohne dabei den Zellrasen zu berühren, abgesaugt. Im Anschluss daran erfolgte das Auffüllen der Flasche mit demselben Volumen an frischem Endothelzellnährmedium durch eine serologische Pipette. 75cm²-Kulturflaschen wurden mit einem Volumen von 12 ml, 25cm²-Kulturflaschen mit einem Volumen von 5 ml gefüllt.

2.1.4 Splitten, Passagieren

Bei einer Konfluenz von 70-100% ebenso wie vor Beginn des Dehnungsversuchs und des Resazurin-Assays erfolgte die Zelltrypsinierung. Hierfür wurde das Endothelzellnährmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Als Spülreagenz wurde mit einer serologischen Pipette phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) hinzugefügt und im Folgenden mit einer Pasteurpipette entfernt. Anschließend erfolgte die Gabe von Trypsin-Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat (Trypsin-EDTA). Bei 25cm²-Kulturflaschen benötigte man hiervon 500 µl-1 ml, bei 75cm²-Kulturflaschen 1-2 ml.

Daraufhin wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C etwa 2 Minuten inkubiert. Unter dem Mikroskop wurde die erfolgreiche Ablösung der Zellen vom Flaschenboden kontrolliert. Nach vollständiger Ablösung der Zellen wurde Trypsin-Inhibitor (3-4 ml bei 25cm²-Kulturflaschen, 6-8 ml bei 75cm²-Kulturflaschen) zum Einstellen der enzymatischen Reaktion hinzugegeben. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein steriles 15ml-Falcon-Tube übertragen und 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, ohne dabei Teile des Zellpellets zu tangieren. Zu dem verbliebenen Zellpellet wurden 1-4 ml Endothelzellmedium mit einer Pipette hinzugefügt, und durch Auf- und Abpipettieren wurde eine Zellsuspension hergestellt. Im Anschluss daran erfolgte die Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Installation der Zählkammer erforderte das sachgerechte Anbringen eines Deckglases. Zeichen des erfolgreichen Auflegens war das Auftreten der sogenannten nubischen Ringe. Nun konnten 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer gegeben werden und unter Zuhilfenahme des Zellzählers in vier Quadranten ausgezählt werden. Mit folgender Formel errechnete sich die Zellzahl pro ml:

$$\text{Anzahl der gezählten Zellen} / 4 \times 10.000 \times \text{Volumen}$$

2.1.5 Einfrieren

Für das Einfrieren der Zellen standen Cryogenic Vials bereit, in die jeweils 500 µl der mit Cryopreservation Freezing Medium (Cryo-SFM) suspendierten Zellen pipettiert wurden. Bei Malformationszellen und HDMEC betrug die Anzahl der Zellen pro 500 µl 1.000.000. Bei NHF waren die 500 µl Cryo-SFM mit 500.000 Zellen versetzt. Anschließend wurden die Cryogenic Vials in einen mit Alkohol präparierten Freezing Container überführt und in diesem für etwa fünf Tage bei -75°C eingefroren. Nach Ablauf der fünf Tage konnten die Cryogenic Vials aus dem Freezing Container entnommen und in einer Aufbewahrungsbox bei -80°C untergebracht werden.

2.1.6 Auftauen

Die Zellen wurden nach Entnahme aus dem -75°C-Gefrierschrank möglichst rasch im 37°C-Wasserbad aufgetaut, während zugleich Endothelzellnährmedium in geeigneten

Zellkulturflaschen vorgelegt wurde. Bei Malformationszellen und HDMEC kamen kleine Zellkulturflaschen mit 5 ml Medium, bei NHF große Zellkulturflaschen mit 12 ml Medium zur Verwendung. Die aufgetaute Zellsuspension wurde anschließend in die mit Medium gefüllten Flaschen pipettiert und bei 37°C inkubiert. Am Folgetag erfolgte der erste Mediumwechsel. Dieser war alle 3-4 Tage zu wiederholen.

2.2. Experimente zur Zellproliferation

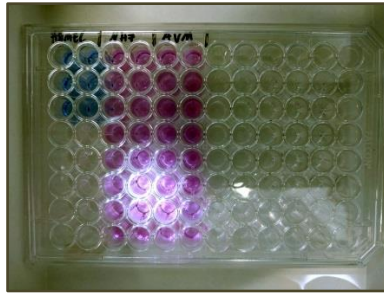
2.2.1 Proliferationsversuch

Für den Proliferationsversuch wurden AVM, HDMEC und NHF in einer 6-Well-Platte im Doppelansatz ausgesät. Daraufhin wurde die 6-Well-Platte für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der 48 Stunden wurden die Zellen wie in 3.1.4 beschrieben trypsinisiert und in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

2.2.2 Resazurin-Assay

Sowohl Malformationszellen als auch HDMEC und NHF wurden wie in 3.1.4 beschrieben trypsinisiert und ausgezählt. Daraufhin wurden die Zellen mit Endothelzellmedium suspendiert auf einer 96-well-Platte in jeweils 16 Wells ausgesät (siehe Abb. 7). Die Anzahl der ausgesäten Zellen betrug 5.000 pro Well, die in 100 µl Medium suspendiert waren. Anschließend wurden die Zellen 48 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der 48 Stunden wurde zuerst das Resazurin aufgetaut. Hierbei musste darauf geachtet werden, das Resazurin dunkel zu lagern, weshalb es mit Alufolie umwickelt und während des ganzen Versuchs in der Sterilbank ohne den Einsatz von Licht gearbeitet wurde. Nach Auftauen des Resazurins wurden 20 µl davon pro Well mit einer Multipipette verteilt. Im Anschluss daran erfolgte eine erneute Inkubation der Zellen. Das blaue und nichtfluoreszierende Resazurin wurde in Kontakt mit Zellen und Zellmedium zu pinkem und hoch fluoreszierendem Resorufin reduziert. (117) Nach 2 und 4 Stunden wurden die Absorptionsspektren mit dem Varioscan gemessen. Hiermit wurde die Zellproliferation der einzelnen Zellgruppen gemessen und ins Verhältnis zur Proliferation der anderen Zellgruppen gesetzt (117).

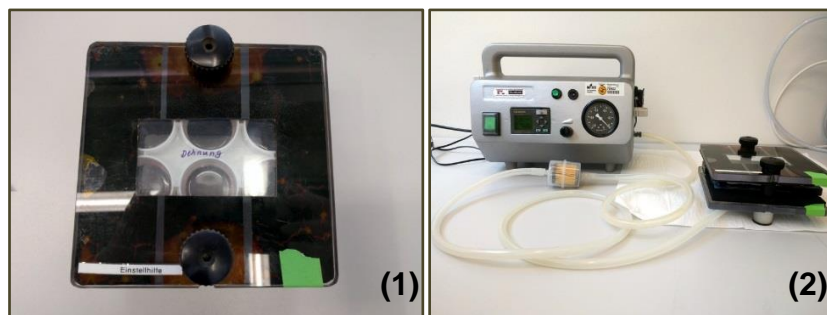


▲ **Abb. 7: Resazurin-Assay. Links HDMEC, mittig AVM, rechts NHF. Quelle: Eigene Darstellung**

Anschließend wurde das mit Resazurin versetzte Endothelzellmedium in den Wells mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt und durch 200 µl frisches Medium pro Well ersetzt. Die Platte wurde nun für weitere 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wiederholte sich die bereits beschriebene Prozedur. Zu den 200 µl Medium pro Well wurden 20 µl Resazurin pipettiert. Nach 2 und 4 Stunden wurden die Absorptionsspektren im Varioscan gemessen.

2.2.3 Dehnungsversuch

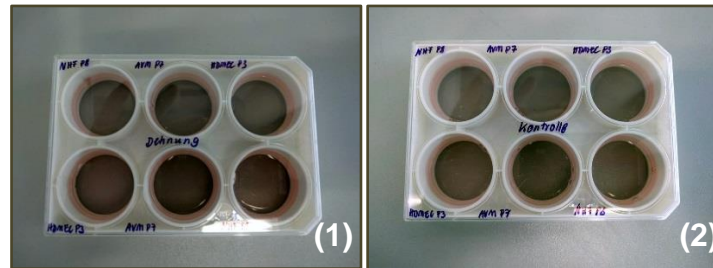
Der Dehnungsversuch stellte die Grundlage der Doktorarbeit dar. Hierbei sollte über eine am Universitätsklinikum Regensburg entwickelte Dehnungskammer auf die Zellen wirkende mechanische Belastung simuliert werden (siehe Abb. 8).



▲ **Abb. 8: (1) Dehnungskammer mit 6-Well-Platte. (2) Vakuumpumpe mit integrierter Zeitschaltuhr und daran angeschlossener Dehnungskammer. Quelle: Eigene Darstellung**

Für den Dehnungsversuch wurden Malformationszellen, HDMEC und NHF wie bereits in 3.1.3 beschrieben trypsinisiert und gezählt. Parallel dazu wurden zwei 6-Well-Zellkulturplatten mit silikonhaltigem, dehnbarem Untergrund vorbereitet (siehe Abb. 9). Jeweils zwei der 6 Wells wurden bei 24-stündiger Dehnung mit 200.000 Malformationszellen, 200.000 HDMEC und 100.000 NHF, bei 48-stündiger Dehnung

mit 150.000 Malformationszellen, 150.000 HDMEC und 75.000 NHF suspendiert in 4 ml Medium bestückt. Beide 6-Well-Platten wurden für 24 Stunden inkubiert.



▲ **Abb. 9: 6-Well-Platten. (1) 6-Well-Platte für die Dehnung. (2) 6-Well-Platte für die Kontrolle.**

Quelle: Eigene Darstellung

Nach Ablauf der 24 Stunden kam es zur mikroskopischen Kontrolle des Zellwachstums. Wurde dieses als erfolgreich und ausreichend beurteilt, wurde dem anfänglichen Volumen von 4 ml pro Well ein weiterer Milliliter Endothelzellnährmedium hinzugefügt, um einer Austrocknung durch Kondensation vorzubeugen. Daraufhin wurde eine der beiden 6-Well-Zellkulturplatten in die Dehnungskammer eingesetzt, in der die Wells einem Unterdruck von -0.3 bar ausgesetzt waren. Die im Minutentakt ablaufende zyklische Dehnung wurde mittels Vakuumpumpe und eingebauter Zeitschaltuhr gesteuert. Die zweite Platte diente als Kontrollplatte und wurde gemeinsam mit der in Dehnung befindlichen Platte für 24 bzw. 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Pro 24 Stunden erfolgten 24225 zyklische Dehnungen.

Nach Beendigung der Dehnung nach 24 bzw. 48 Stunden erfolgte die numerische Auswertung des Zellwachstums und die Gewinnung der Überstände und Pellets. Hierfür wurden pro Well 2 ml Überstand in Eppendorf-Tubes abpipettiert. Anschließend wurden die Tubes zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und in frische Eppendorf-Tubes übertragen, die daraufhin eingefroren wurden.

Die 6-Well-Platten wurden nun mit Hilfe einer Pasteurpipette vollständig abgesaugt und mit $500\mu\text{l}$ - $1000\mu\text{l}$ PBS gespült. Das PBS wurde anschließend abgesaugt. Daraufhin wurden 300 - $400\mu\text{l}$ Trypsin-EDTA pro Well aufpipettiert. Die 6-Well-Platten wurden daraufhin für ca. 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Silikonuntergrund wurde mikroskopisch kontrolliert. Zum Neutralisieren wurden dann 600 - $700\mu\text{l}$ Trypsin-Inhibitor pro Well hinzugegeben. Die nunmehr in den Wells enthaltene Flüssigkeit wurde mehrmals mit der Pipette auf- und abpipettiert. Im

Anschluss daran konnte die Flüssigkeit in 1,5 ml-Reagiergefäße abpipettiert werden. Aus jedem Reagiergefäß wurden 10 µl zur Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer entnommen. Die genauen Zellzahlen wurden über die oben erwähnte Formel berechnet und vermerkt. Schlussendlich wurden die Reagiergefäße zentrifugiert und der Überstand vorsichtig ohne Beeinträchtigung des Pellets abgesaugt. Das verbliebene Pellet wurde bei -20°C eingefroren.

2.3. Expressionsanalyse

2.3.1 Proteinexpressionsanalyse

Die Proteinexpressionsanalyse verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche Einfluss auf die Vaskularisation nehmen, wie Interleukin 6 (IL-6), Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Transforming growth factor 1 (TGFβ-1), erfolgte im Rahmen eines Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA). Das Verfahren der Wahl stellte hierbei ein sogenannter Sandwich-ELISA mit Capture- und Detection-Antibody dar.

Zu Beginn war eine genaue Vorbereitung der benötigten Reagenzien und Antikörper erforderlich. Der Waschpuffer wurde durch Hinzugabe von 250 µl Tween zu 500 ml PBS hergestellt. Das Reagent Diluent, das als späteres Verdünnungsmittel Verwendung fand, wurde aus 1 g BSA in 100 ml PBS hergestellt. Das BSA wurde hierfür auf einer Waage abgewogen und mit einem Magnetührstab auf dem Rührgerät mit PBS verrührt. Anschließend konnte das Gemisch über einen sterilen Filter steril filtriert werden. Zu diesem Zweck setzte man den Filter auf einen Falcon auf und drückte die Flüssigkeit mit Hilfe einer sterilen Spritze hindurch.

Der Capture-Antibody, Detection-Antibody und der Standard wurden zur geforderten Arbeitskonzentration entsprechend Herstellerangaben aliquotiert. Die Aliquots konnten bis zum Tag der Verwendung bei -20°C eingefroren werden.

Zu Beginn der Proteinexpressionsanalyse bestückte man eine 96-well-Platte mit 100 µl des aufgetauten Capture Antibody pro Well. Der Capture Antibody war zuvor mit PBS zur Arbeitskonzentration verdünnt worden. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurden zuerst die eingefrorenen Überstände der Dehnungsversuche aufgetaut. Für die Proteinexpressionsanalyse von IL-6 und VEGF

verwendete man die Überstände ohne Zusatz. Bei TGF β -1 war ein weiterer Schritt in der Vorbereitung vonnöten. Hier wurde aus 91,67 ml deionisiertem Wasser und 12 N Salzsäure (HCL) 1 N HCL hergestellt. Aus 75 ml Wasser, 12 ml 10 N Natriumhydroxid (NaOH), 1 g 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) und 13 ml deionisiertem Wasser bereitete man 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES vor. Zu 300 μ l Zellüberstand wurden dann 60 μ l 1 N HCL hinzugegeben, gut gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Infolgedessen wurden zur Neutralisation 60 μ l 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES hinzu pipettiert und gut gemischt.

Danach erfolgte der erste Waschgang der 96-well-Platte mit Waschpuffer. Hierzu wurde jedes Well mit 400 μ l Waschpuffer gefüllt und anschließend der Waschpuffer wieder abgesaugt. Dieser Prozess wiederholte sich zweimal. Im Anschluss wurden 300 μ l Reagent Diluent pro Well mit einer Multipipette hinzugegeben und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Standard mit Reagent Diluent in unterschiedlichen Verdünnungsstufen präpariert. Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit erfolgte ein erneuter Waschgang mit Waschpuffer wie bereits beschrieben. Dann wurden die 8 Standardverdünnungen sowie die aufgetauten Überstände der Dehnungsversuche im Doppelansatz mit 100 μ l pro Well in die 96-well-Platte pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschgang mit Waschpuffer. Anschließend wurden 100 μ l pro Well des mit Reagent Diluent zur Arbeitskonzentration verdünnten Detection Antibody in die Platte pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Wieder folgte ein Waschgang mit Waschpuffer. Daraufhin wurde in jedes Well Streptavidin-HRP in einer 1:40-Verdünnung mit Reagent Diluent hinzugegeben. Hierfür war im Vorfeld eine Mischung aus 10 ml Reagent Diluent und 250 μ l Streptavidin vorbereitet worden. Dieser Ansatz wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei darauf geachtet werden musste, die Platte keinem direkten Licht auszusetzen. Danach wurde die 96-well-Platte auf ein Neues mit Waschpuffer gespült. Anschließend wurden 100 μ l Substrate Solution pro Well hinzugegeben, und es erfolgte eine weitere Inkubation für 20 Minuten unter Vermeidung des Kontakts mit direktem Licht. Die Substrate Solution war zuvor als 1:1-Gemisch aus Part A und B angemischt worden. Nach Ablauf der 20 Minuten bedurfte es einer Zugabe von 50 μ l Stop Solution pro Well. Die Platte wurde von außen leicht beklopft, um eine bessere Vermischung zu erzielen. Abschließend wurde die optische Dichte der Wells bei 450 nm am Varioscan

gemessen. Im Falle der Proteinexpressionsanalyse von TGF β -1 musste die errechnete Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor 1,4 multipliziert werden.

2.3.2 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse erfolgte auf Basis der RNA über eine RNA-Isolation, deren reverse Transkription in cDNA und die anschließende quantitative real-time PCR.

2.3.2.1 RNA-Isolation

Für die Ribonukleinsäure-Isolation (RNA-Isolation) wurde das Quiagen RNeasy Mini-Kit verwendet. Vor Beginn der Isolation musste die Puffer work solution bestehend aus 10 μ l β -Mercaptoethanol in 1 ml RNeasy Lysis Buffer (RLT Puffer) und einer Mischung aus 4 Volumenanteilen 96-100%igem Ethanol zu einem Volumenanteil konzentriertem Waschpuffer (RPE-Puffer) hinzugegeben werden. Daraufhin folgte die Lysierung der Zellen. Zu diesem Zweck wurden 350 μ l des zuvor mit β -Mercaptoethanol gemischten RLT-Puffers zum Zellpellet gegeben und für maximal 10 Minuten gevortext. Je besser verkleinert und homogenisiert wurde, desto erfolgreicher war die RNA-Isolierung. Anschließend wurden 350 μ l 70 %iges Ethanol pro Cup hinzugegeben und mit der Pipette auf- und abpipettiert. Dabei konnte das Ausfallen der RNA beobachtet werden. Die in den Cups enthaltenen 700 μ l wurden auf die Säulen (Rneasy Mini Spin Columns) transferiert und für 15 Sekunden bei über 8000 g zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde verworfen. Daraufhin erfolgte die Gabe von jeweils 700 μ l RW1-Puffer auf die Säulen und das erneute Zentrifugieren für 15 Sekunden. Für den DNA-Verdau wurden 10 μ l DNase und 70 μ l DNA Digest-Puffer (RDD) auf jede Säule pipettiert und das Gemisch für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Säulen mit jeweils 350 μ l RW1 gewaschen und für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss konnte verworfen werden. Dann wurden 500 μ l des zuvor mit Ethanol angereicherten RPE-Puffers auf die Säulen gegeben und für 15 Sekunden zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Beim zweiten Mal erhöhte sich die Zeit der Zentrifugation auf 2 Minuten, wodurch die Silicagel-Membran getrocknet wurde. Anschließend wurden die Säulen in RNase freie Collection Tubes platziert und 30-50 μ l RNase freies Wasser hinzugegeben. Die Tubes wurden dann für eine Minute zentrifugiert, wobei die RNA aus der Säule gewaschen wurde. Die Säulen wurden verworfen und der Durchfluss mit der enthaltenen RNA für die Messung

zurückgehalten. Zur Bestimmung des RNA-Gehalts wurde 1 µl jeder Probe auf den IMPLEN Nanophotometer pipettiert. Abschließend wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2.2 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Zur Vorbereitung der Umschreibung von RNA in die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurden drei Ansätze hergestellt. In Ansatz 1 mischte man je nach Probenanzahl pro Probe 1 µl Random Primer mit 1 µl Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix). Ansatz 2 bestand aus 4 µl First Strand Buffer und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) pro Probe. Ansatz 3 wurde aus 1 µl Super Script II Reverse Transkriptase (Super Script II RT) und 1 µl destilliertem Wasser pro Probe hergestellt. Anschließend wurden die RNA-Proben aus dem -80°C-Gefrierschrank genommen und gemeinsam mit den anderen Reagenzien auf Eis gelagert. Pro 10 µl Probe wurden nun 2 µl des 1. Ansatzes hinzugegeben. Das Gemisch wurde daraufhin in den Thermocycler gestellt und zuerst für 5 Minuten bei 65°C gelagert, um schließlich eine Minute lang bei 4°C abgekühlt zu werden. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 6 µl des 2. Ansatzes pro Probe und die Lagerung im Thermocycler für 2 Minuten bei 25°C. Diesem Schritt folgend wurden pro Probe 2 µl des 3. Ansatzes hinzu pipettiert. Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei 25°C, für 50 Minuten bei 42°C und für 15 Minuten bei 70°C gelagert und schließlich auf 4°C heruntergekühlt. In einem letzten Schritt erfolgte die Zugabe von 80 µl RNase freiem Wasser. Somit ergab sich ein Endvolumen jeder Probe von 100 µl. Diese wurden anschließend bei -20°C gelagert.

2.3.2.3 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen mit GAPDH und VEGF-A durchgeführt. Hierzu wurden die GAPDHrat Primer forward und reverse sowie die unterschiedlichen VEGF-A-Primer VEGF4-hu und VEGF1-hu mit Primer sense und antisense verwendet. Da VEGF4-hu mit human VEGF 165, 189 und 120 mehr Isoformen abbildete als VEGF1-hu, fand dieser Primer hauptsächlich Verwendung. VEGF4-hu weist die Kennungsnummern NM_000493, NM_001844, und NM_000088 als Coding-Sequenzen auf (118).

Zu jeweils 2 µl der cDNA-Proben wurden 12,5 µl Taq PCR Mastermix, 1 µl Primer forward (10 pmol), 1 µl Primer reverse (10 pmol) und 8,5 µl RNase freies Wasser in

PCR Soft Tubes pipettiert. So ergab sich ein Endvolumen von 25 µl. Anschließend wurden die Ansätze in den PCR-Cycler überführt und mit diesem ein zwei bzw. dreistündiges Programm gefahren, in dessen Verlauf die Phasen der Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation nacheinander abliefen.

In der Zwischenzeit wurde das Agarosegel hergestellt. Hierzu wurden 2,5 g Agarose-Pulver in 100 ml TRIS-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) gegeben. Der TBE-Puffer war zuvor aus einer Mischung aus 43,2 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 22 g Borsäure und 16 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) hergestellt worden. Um das Agarose-Pulver vollständig in der Puffer-Flüssigkeit zu lösen, wurde es für einige Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden 5 µl Ethidiumbromid unter Verwendung einer Schutzbrille hinzugefügt und mit der Lösung vermischt. Anschließend wurde das mit Ethidiumbromid vervollständigte Gel unter fließendem Wasser abgekühlt, bevor es in die Gelkammer gegeben wurde, um dort für 20 Minuten auszuhärten.

10 µl der fertigen PCR-Produkte wurden für den Agarosegelansatz mit jeweils 2 µl Blue Loading Buffer und 5 µl Standard in Cups gemischt. Der Inhalt der Cups wurde anschließend in die Geltaschen pipettiert. Daraufhin erfolgte die Gelelektrophorese mit 100 V, in deren Verlauf Banden innerhalb des Gels sichtbar wurden. Nach 45 Minuten wurde das Gel in die Fotokammer gesetzt und fotografiert.

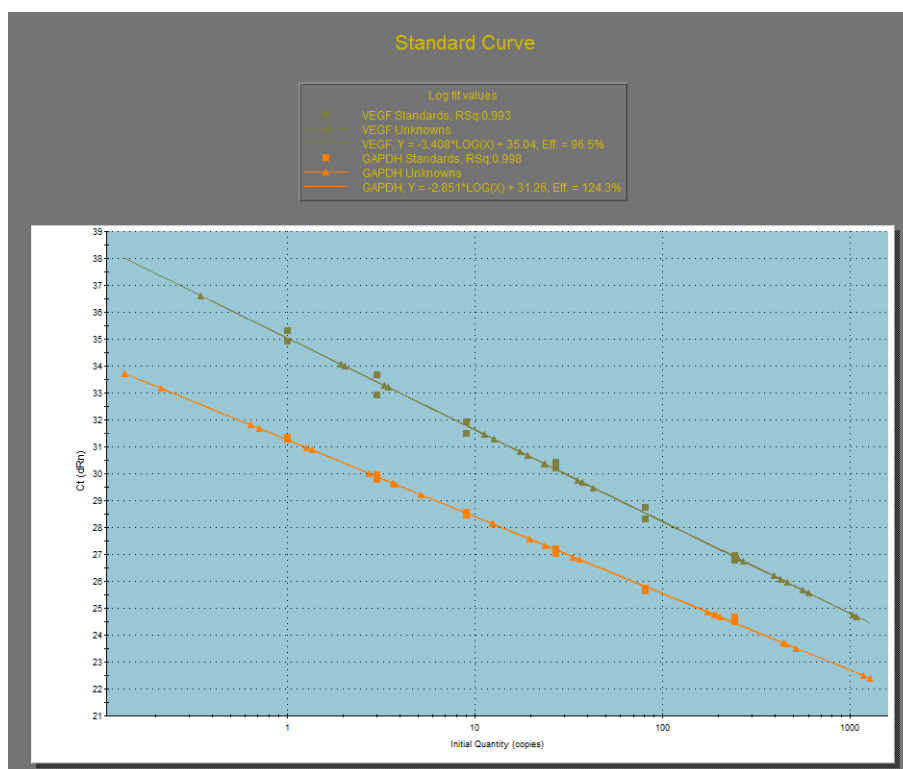
2.3.2.4 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Für die quantitative Real-time PCR wurde in einem ersten Schritt ein passendes Plattenlayout für die 96-Well-Platte erstellt.

Anschließend wurde ein Pool aller zu untersuchenden Proben erstellt. Mit diesem Pool wurde eine Verdünnungsreihe vorbereitet, die eine 1:3-, 1:9-, 1:27-, 1:81, eine 1:243-Verdünnung und einen Blanc enthielt. Die Proben und anderen Reagenzien wurden hierbei auf Eis gelagert. Im nächsten Schritt wurden die beiden Mastermix-Ansätze mit den GAPDH als Referenzgen und VEGF-hu-4 als Zielgen hergestellt. Hierfür wurden für beide Ansätze 440 µl Mastermix mit 22 µl des jeweiligen Primer forward, 22 µl des jeweiligen Primer reverse und 220 µl RNase freiem Wasser vermischt. Davon wurden 16 µl pro dafür vorgesehenem Well gemäß dem vorausgesetzten Layout in die 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 4 µl cDNA-Probe pro Well im Doppelansatz dazugegeben. Auch hier erfolgte die Orientierung wieder anhand des Layouts. Im Anschluss daran wurde die Platte für eine Minute mit 1500 rpm

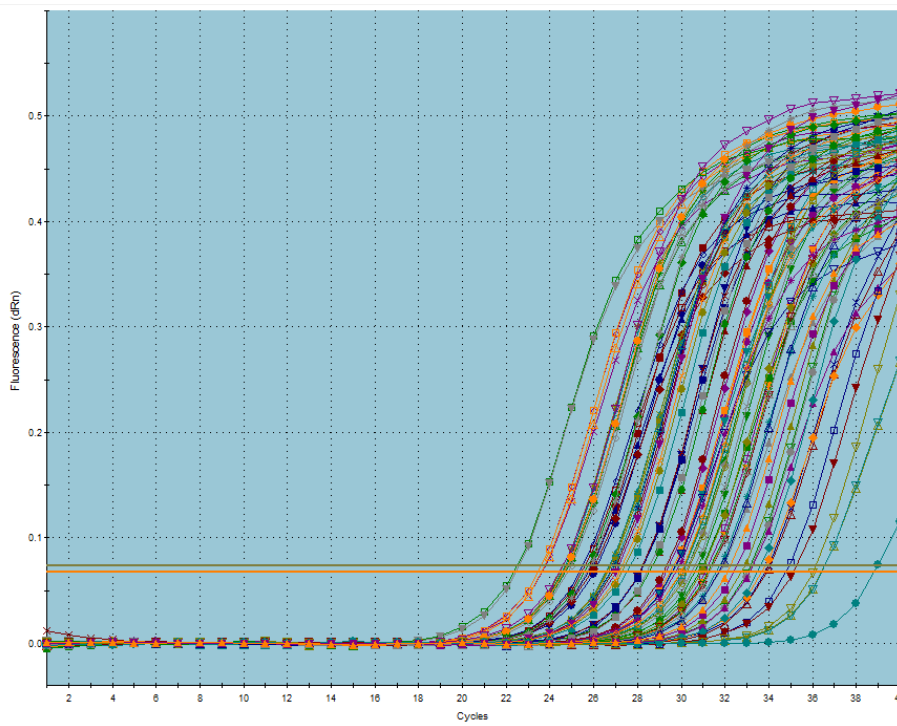
zentrifugiert und in den PCR-Cycler gestellt. Der PCR-Cycler fuhr ein Programm nach folgendem Schema: 1 Zyklus von 3 Minuten bei 95°C, 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95°C und 30 Sekunden bei 58°C und 1 Zyklus von 30 Sekunden bei 72°C und 30 Sekunden bei 95°C.

Zur Sicherstellung eines validen Ergebnisses der qPCR bzw. der gewünschten Leistung einer Real-Time-PCR-Reaktion mussten Faktoren überprüft werden, die den sogenannten C_t -Wert (Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus) beeinflussen. Unter dem C_t -Wert versteht man ein relatives Maß für die Konzentration des Ziels in der PCR-Reaktion (119). Ein erster Blick galt hierbei der Standardkurve, welche die Effizienz der Amplifikation (siehe Abb. 11) wiedergibt. Die beispielhaft dargestellte Standardkurve in *Abb. 10* lässt ein zufriedenstellendes Ergebnis mit einer Effizienz der VEGF-Amplifikation von 96,5 % und der GAPDH-Amplifikation von 124,3 % erkennen. Der R_{sq} -Wert (Respective correlation coefficient), der bei Werten von 1.0 auf eine perfekte, lineare Amplifikation schließen lässt, zeigt bei VEGF mit 0.993 und bei GAPDH mit 0.998 ebenfalls ein gutes Ergebnis an und bestätigt die Effizienz der qPCR-Reaktion.



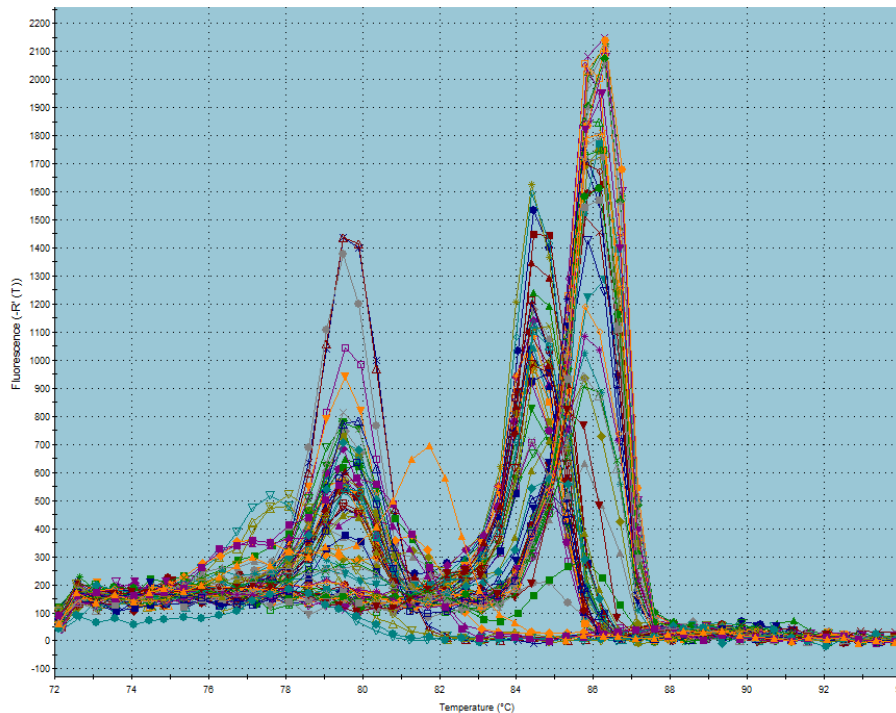
▲ *Abb. 10: qPCR mit Proben VD4-5; Standardkurve. Quelle: Eigene Darstellung*

In der Amplifikationskurve ließen sich die nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen exponentiell ansteigenden Fluoreszenzsignale jeder Probe anschaulich darstellen.



▲ **Abb. 11: qPCR mit Proben VD4-5; Amplification Plots.** Quelle: Eigene Darstellung

Als weiteres Mittel der Qualitätskontrolle stand die Schmelzkurve zur Verfügung, in der eine Messung der Fluoreszenz bei kontinuierlich ansteigender Temperatur erfolgte. Je länger das zu detektierende Amplikon, desto höher war die Schmelztemperatur. Bei mehreren detektierten Amplikons zeigten sich, wie in Beispiel *Abb. 12*, mehrere Peaks.



▲ **Abb. 12: qPCR mit Proben VD4-5; Schmelzkurve.** Quelle: Eigene Darstellung

2.4. Statistische Auswertung

Vor der statistischen Auswertung wurde die Normalverteilung der Werte mittels Kolmogorov-Smirnow-Test ermittelt. Normalverteilte Daten wurden anhand des Student's t-Test, nicht normalverteilte Daten durch den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, ausgewertet. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und mit einem Asteriskus (*) gekennzeichnet. Werte mit $P \leq 0,01$ wurden mit (**), $P \leq 0,001$ mit (***) und $P \leq 0,0001$ mit (****) vermerkt. Nicht signifikante Werte, $P > 0,05$, wurden mit (ns) gekennzeichnet. Der Mittelwert und die Standardfehler sind in den Graphiken dargestellt. Die Statistik wurde mittels SPSS Statistics Software (SPSS GmbH Software, München, Deutschland) ausgewertet. Graph Pad Prism wurde zur Berechnung des Standardfehlers (SEM), des Mittelwerts und des 95%-Konfidenzintervalls (CI) aller Daten verwendet.

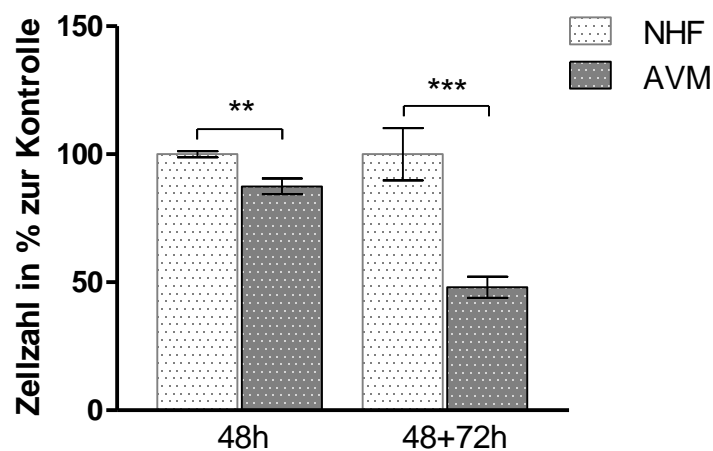
3 Ergebnisse

3.1 Experimente zur Zellproliferation

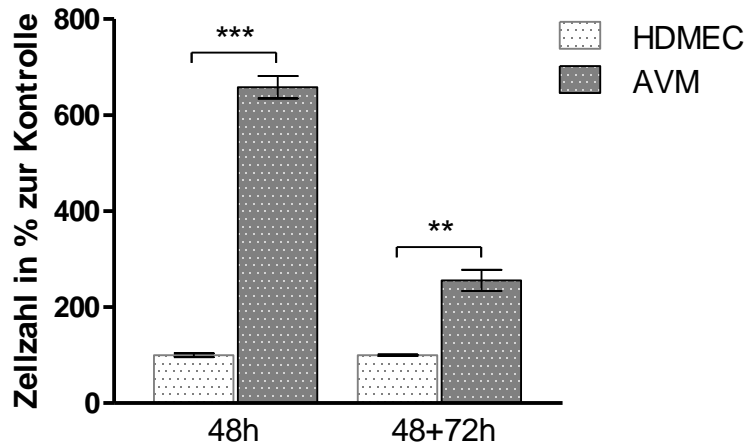
3.1.1 Resazurin Assay

Die Bestimmung der Zellviabilität von AVM, HDMEC und NHF im Resazurin-Assay erlaubt eine Ableitung auf das allgemeine Proliferationsverhalten der Zellen. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Zellvermehrung der NHF im Vergleich zu den AVM nach 48h ($p < 0,0019$), und mit noch deutlich höherer Signifikanz nach 48+72h ($p < 0,0003$). Das 95%-Konfidenzintervall lag hierbei nach 48h zwischen 5,489 und 19,66 % und nach 48+72h zwischen 33,81 und 70,02 % (siehe Abb. 13).

Dagegen wiesen die HDMEC-Zellen verglichen mit den AVM-Zellen sowohl nach 48h ($p < 0,0001$) als auch nach 48+72h ($p < 0,0025$) eine stark signifikante niedrigere Zellvermehrung mit einem 95%-Konfidenzintervall von -646,7 bis -469,4 % nach 48h bzw. von -240,3 bis -70,87 % nach 48+72h auf (siehe Abb. 14).



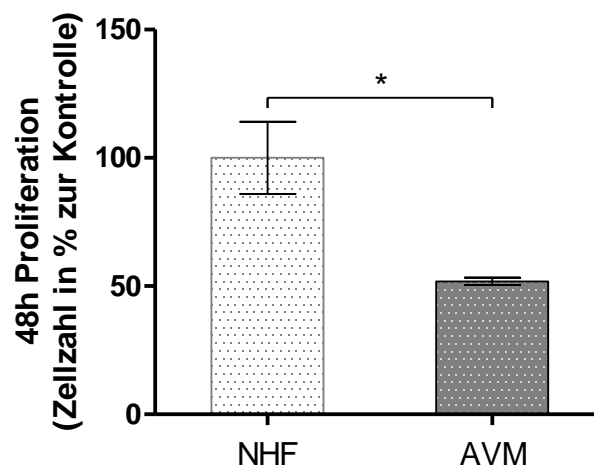
▲ Abb. 13: Zellviabilität der AVM in Prozent zur Zellviabilität der NHF nach 48h und 48+72h. ** = $p \leq 0.01$. *** = $p \leq 0.001$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.



▲ **Abb. 14: Zellviabilität der AVM in Prozent zur Zellviabilität der HDMEC nach 48h und 48+72h.**
 ** = $p \leq 0.01$. *** = $p \leq 0.001$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.

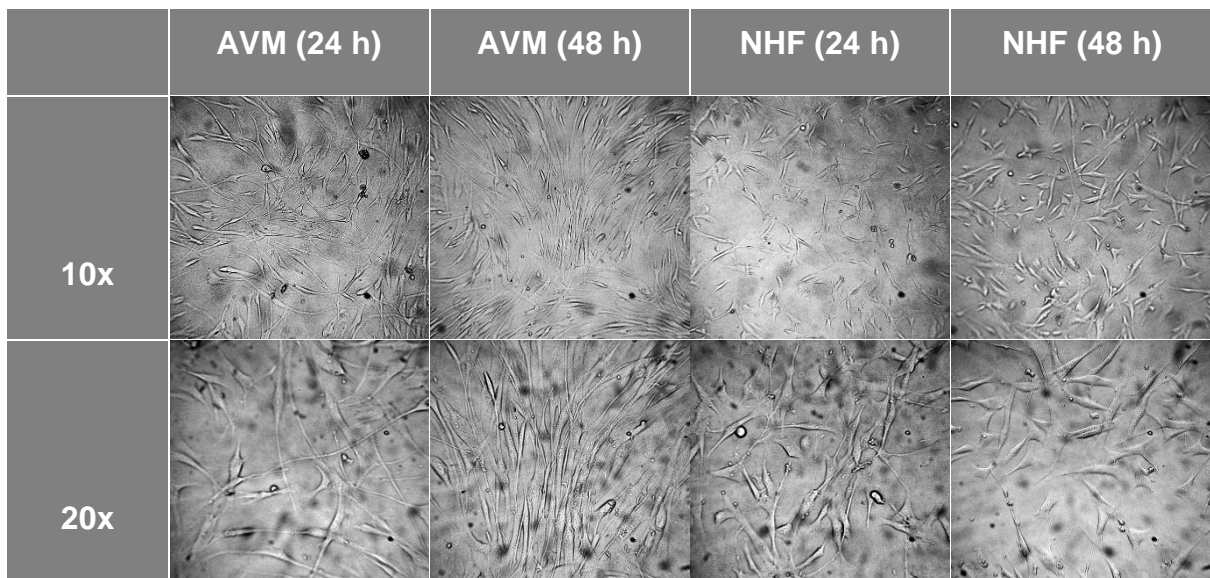
3.1.2 Allgemeine Zellzählung ungedehnter Zellen in 6-Well-Platte

Die Beurteilung der Zellproliferation in einem 6-Well-Plattensystem über 48 Stunden angewachsener NHF und AVM durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer ergab ein ähnliches Bild, wie es im Resazurin-Assay zu erkennen war. Die NHF zeigten hierbei ein signifikantes, im Mittel um 48,13 % schnelleres Zellwachstum als die AVM ($p < 0,0269$) (siehe Abb. 15). Bei 100.000 pro Well ausgesäten Zellen der jeweiligen Zellentität vermehrten sich die NHF im Durchschnitt um ca. 402 % pro Well, wohingegen die AVM sich um durchschnittlich ca. 208 % vermehrten. Das 95%-Konfidenzintervall lag bei 87,24 bis 9,029 %.



▲ **Abb. 15: Zellproliferation der AVM im Vergleich zu NHF nach 48 Stunden Inkubation in 6-Wellplatte.** * = $p < 0,05$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.

Über eine Fotodokumentation zum Zeitpunkt 24h und 48h nach Aussäen der Zellen in die 6-Well-Platte wurde das Wachstum der AVM und NHF bildlich festgehalten (siehe Abb. 16). Hierbei wurde die im Zeitraum von 24-48 Stunden zunehmende Konfluenz innerhalb der 6-Well-Platte deutlich. Unterschiede der Konfluenz zwischen AVM und NHF waren mit dem bloßen Auge schwer auszumachen.



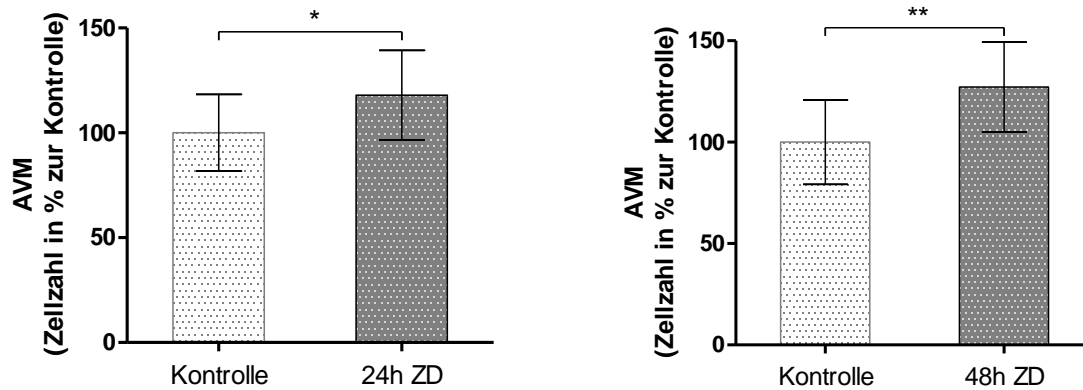
▲ **Abb. 16: Fotos der AVM und NHF nach 24 Stunden und nach 48 h Inkubation. Quelle: Eigene Darstellung**

3.1.3 Zellzählung im Dehnungsversuch in 6-Well-Platte

3.1.3.1 Vergleich innerhalb der Entitäten zwischen Dehnungs- und Kontrollgruppe

Die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer nach 24 h Dehnung ergab eine signifikant höhere Zellzahl der gedehnten AVM-Zellen von 17,94 % im Vergleich zur Zellzahl der AVM-Zellen in der Kontrollgruppe ($p < 0,0122$) (siehe Abb. 17a). Das 95%-Konfidenzintervall zeigte Werte von 5,283 bis 30,59 %.

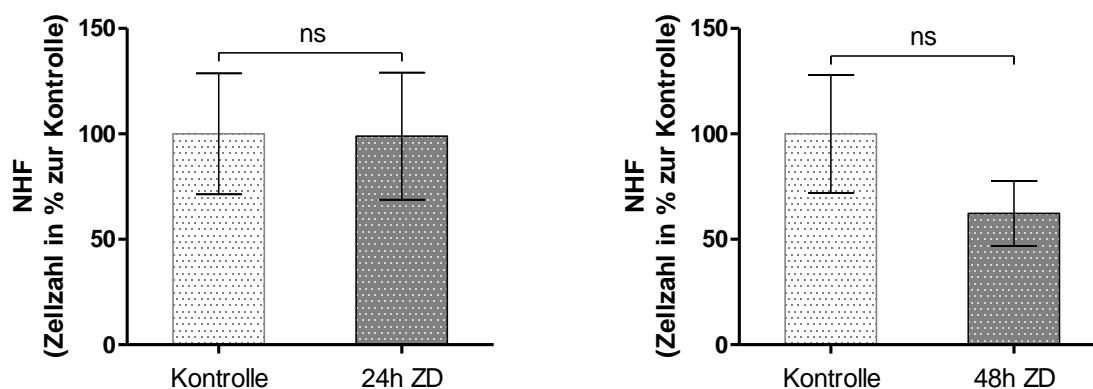
Dieses Bild wurde nach 48 Stunden Dehnung bestätigt. Hier war die Zahl gezählter AVM-Zellen in der Dehnungsgruppe im Vergleich zur Anzahl der AVM der Kontrollgruppe im Durchschnitt um 27,18 % signifikant erhöht ($p < 0,0041$) und wartete mit einem 95%-Konfidenzintervall von 11,85 bis 42,50 % auf (siehe Abb. 17b).



▲ **Abb. 17: Anzahl der AVM-Zellen in der Dehnungsgruppe in Prozent zur Anzahl der AVM-Zellen in der Kontrollgruppe nach 24h bzw. 48h Dehnung. ZD = Zyklische Dehnung. * = $p < 0,05$. ** = $p \leq 0,01$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.**

Die NHF-Zellen wiesen nach 24 Stunden Dehnung in Dehnungs- und Kontrollgruppe eine ähnliche Zellzahl auf ($p=0,8099$) (siehe Abb. 18a). Im 95%-Konfidenzintervall war eine Bandbreite von 11,16 bis 9,025 % zu erkennen.

Nach 48 Stunden Dehnung war die Zellzahl der gedehnten NHF mit einem 95%-Konfidenzintervall zwischen -88,46 und 13,00% im Durchschnitt mit einer Tendenz um 37,73% niedriger als die der ungedehnten NHF ($p=0,1141$) (siehe Abb. 18b).

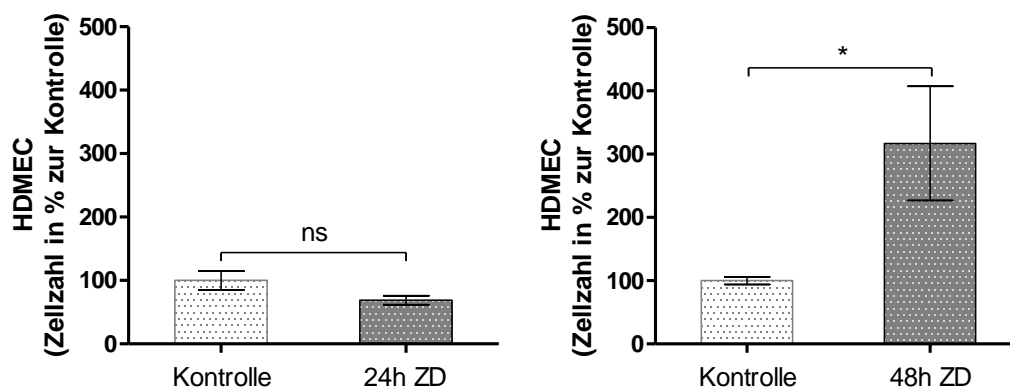


▲ **Abb. 18: Anzahl der NHF-Zellen in der Dehnungsgruppe in Prozent zur Anzahl der NHF-Zellen in der Kontrollgruppe nach 24 h bzw. 48h Dehnung. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0,05$). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.**

Die Zellzählung der HDMEC-Zellen nach 24 Dehnung ergab eine im Durchschnitt um 31,03 % tendenziell niedrigere Zellzahl der gedehnten HDMEC-Zellen als die der

HDMEC-Zellen der Kontrollgruppe ($p=0,1220$) (siehe Abb.19a). Das 95%-Konfidenzintervall lag bei -72,77 bis 10,70 %.

Dieses Bild änderte sich nach 48 Stunden. Hierbei ergab sich eine um 217,1 % signifikant höhere Zellzahl der HDMEC in der Dehnungsgruppe gegenüber den ungedehnten HDMEC ($p<0,0466$) mit einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 4,259 und 429,9 % (siehe Abb. 19b).



▲ **Abb. 19: Anzahl der HDMEC-Zellen in der Dehnungsgruppe in Prozent zur Anzahl der HDMEC-Zellen in der Kontrollgruppe nach 24 h bzw. 48h Dehnung. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0,05$). * = $p < 0,05$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.**

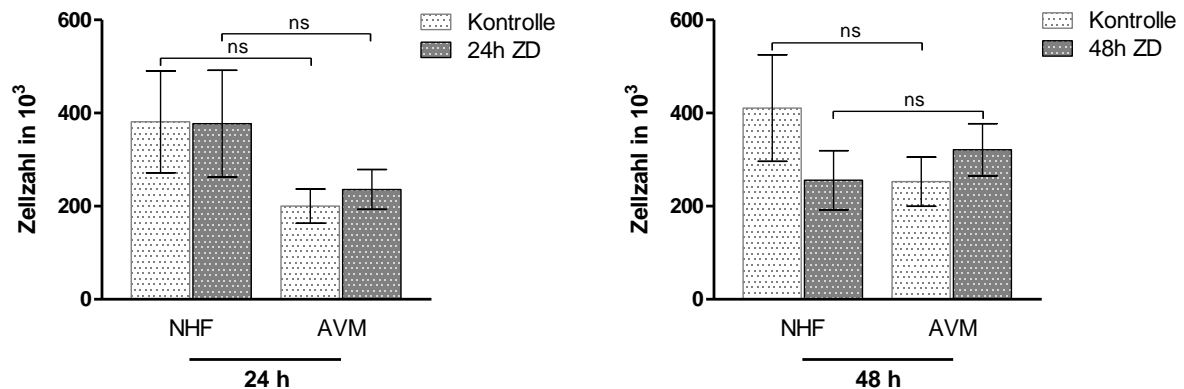
3.1.3.2 Vergleich zwischen AVM, HDMEC und NHF

Der direkte Vergleich zwischen den Entitäten der AVM-Zellen und der NHF-Zellen in der Gruppe der gedehnten Zellen ergab eine mit klarer Tendenz erniedrigte Zellzahl der AVM-Zellen gegenüber den NHF-Zellen nach 24-stündiger Dehnung ($p=0,2678$) und ein damit verbundenes niedrigeres Zellwachstum (siehe Abb. 20a). Das 95%-Konfidenzintervall erstreckte sich über eine Bandbreite von -403,8 bis 121,3.

Ähnlich verhielten sich die in der Kontrollgruppe erfassten Zellen. Hierbei war ebenfalls eine tendenziell erniedrigte Zellzahl auf Seiten der AVM-Zellen im Vergleich zu den NHF-Zellen ($p=0,1379$) mit einem 95%-Konfidenzintervall von -428,2 bis 65,79 zu erkennen (siehe Abb. 20a).

Nach 48h Dehnung änderten sich die Verhältnisse. Die gedehnten AVM wiesen eine tendenziell erhöhte Zellzahl im Vergleich zu den gedehnten NHF-Zellen ($p=0,4564$) mit einem 95%-Konfidenzintervall von -119,6 bis 250,2 auf (siehe Abb. 20b).

In der Gruppe der ungedehnten Zellen zeigte sich dagegen bei einem 95%-Konfidenzintervall zwischen -410,0 und 93,37 eine in der Tendenz erniedrigte Zellzahl der AVM-Zellen gegenüber den NHF-Zellen der Kontrollgruppe ($p=0,1956$) (siehe Abb.20b).



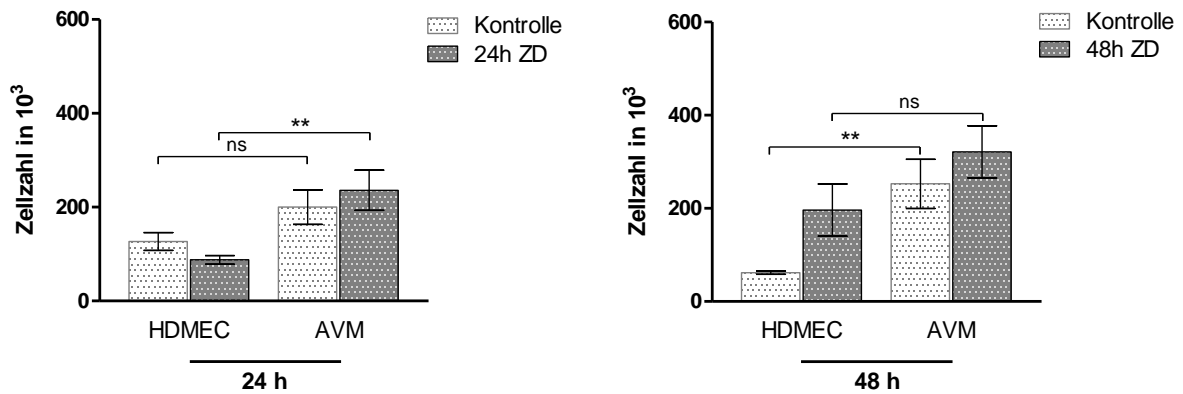
▲ **Abb. 20: Anzahl der AVM-Zellen im Vergleich zur Anzahl der NHF-Zellen nach 24h bzw. 48h in Dehnungs- und Kontrollgruppe in 10^3 . ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0,05$). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.**

Gegenüber den über 24h gedehnten HDMEC-Zellen zeigten die AVM-Zellen der Dehnungsgruppe eine deutlich signifikant erhöhte Zellzahl ($p < 0,0043$) mit einem 95%-Konfidenzintervall von 54,72 bis 242,0 (siehe Abb. 21a).

In der Kontrollgruppe ließ sich ebenfalls eine mit klarer Tendenz erhöhte Zellzahl der AVM-Zellen im Vergleich zu den ungedehnten HDMEC-Zellen erkennen ($p = 0,0970$). Das 95%-Konfidenzintervall lag hierbei zwischen -15,07 und 161,3 (siehe Abb. 21a).

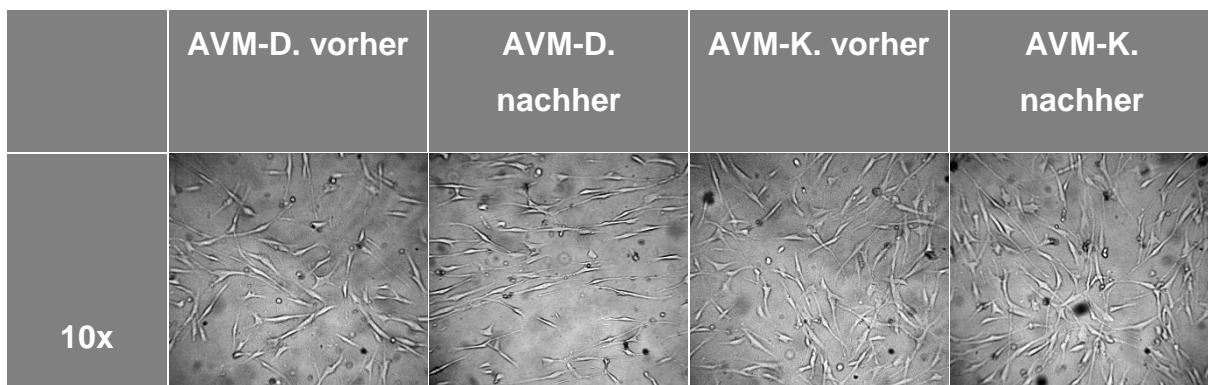
Nach 48h Dehnung ergab sich wie zuvor auch schon nach 24h eine in ihrer Tendenz erhöhte Zellzahl auf Seiten der gedehnten AVM-Zellen im Vergleich zu den gedehnten HDMEC-Zellen ($p = 0,1366$) (siehe Abb. 21a). Das 95%-Konfidenzintervall betrug dabei zwischen -44,78 und 294,7.

In der Kontrollgruppe zeigte sich nach 48h eine signifikant höhere Zellzahl der AVM-Zellen gegenüber den HDMEC-Zellen ($p < 0,0028$) mit einem 95%-Konfidenzintervall von 77,52 bis 303,7 (siehe Abb. 21b).

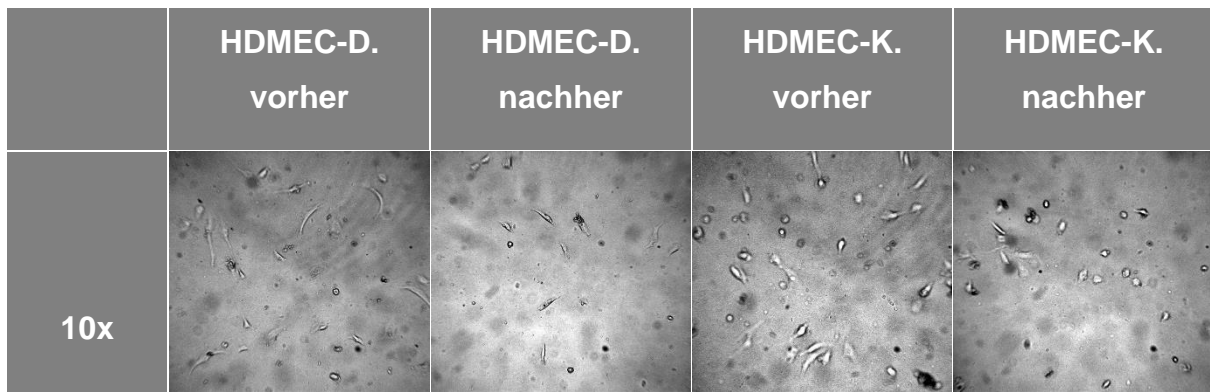


▲ **Abb. 21: Anzahl der AVM-Zellen im Vergleich zur Anzahl der HDMEC-Zellen nach 24h bzw. 48h in Dehnungs- und Kontrollgruppe in 10³. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0.05$). ** = $p \leq 0.01$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.**

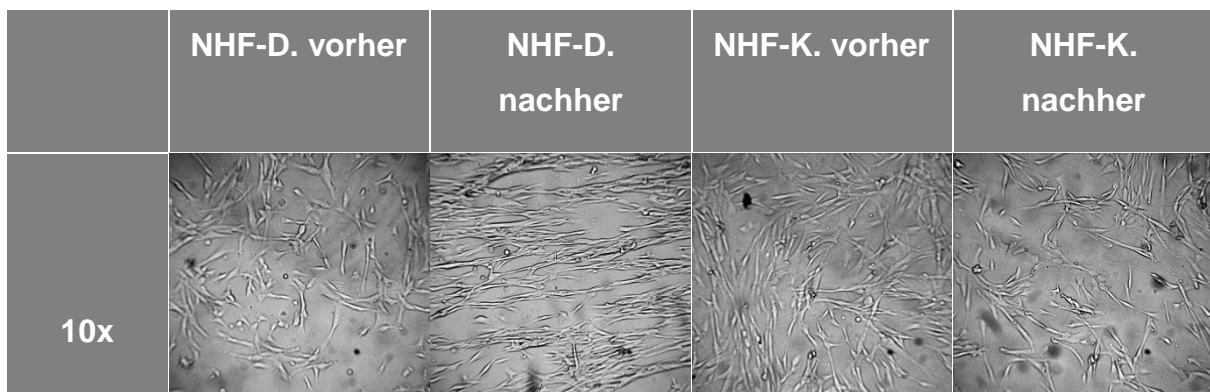
Zur bildlichen Beurteilung des Einflusses zyklischer Dehnung auf das Wachstum von AVM, HDMEC und NHF erfolgte eine digitale Fotodokumentation der Zellen innerhalb der 6-Well-Platten zum Zeitpunkt des Dehnungsstarts und nach 24 Stunden Dehnung. Die Auswirkung auf die Gruppe der HDMEC war durch ein zu geringes Zellwachstum schlecht beurteilbar (siehe Abb. 23). Die AVM und NHF zeigten vor dem Start der Dehnung ein ungerichtetes Wachstum. Nach 24 Stunden Dehnung fiel ein gerichtetes Wachstum beider Zellentitäten auf. Es ergab sich eine Tendenz zur parallelen Anordnung der Zellen innerhalb der Wells. Die ungedehnten AVM- und NHF-Zellen hingegen wiesen nach 24 Stunden ein ebenso ungerichtetes Wachstum auf wie zum Zeitpunkt 0h (siehe Abb. 22/24).



▲ **Abb. 22: Fotos der AVM in Dehnungs- und Kontrollgruppe vor und nach abgelaufener Dehnung in 10facher Vergrößerung. D = Dehnungsgruppe. K = Kontrollgruppe. Quelle: Eigene Darstellung**



▲ **Abb. 23: Fotos der HDMEC in Dehnungs- und Kontrollgruppe vor und nach abgelaufener Dehnung in 10facher Vergrößerung. D = Dehnungsgruppe. K = Kontrollgruppe. Quelle: Eigene Darstellung**



▲ **Abb. 24: Fotos der NHF in Dehnungs- und Kontrollgruppe vor und nach abgelaufener Dehnung in 10facher Vergrößerung. D = Dehnungsgruppe. K = Kontrollgruppe. Quelle: Eigene Darstellung**

3.2 Proteinexpression

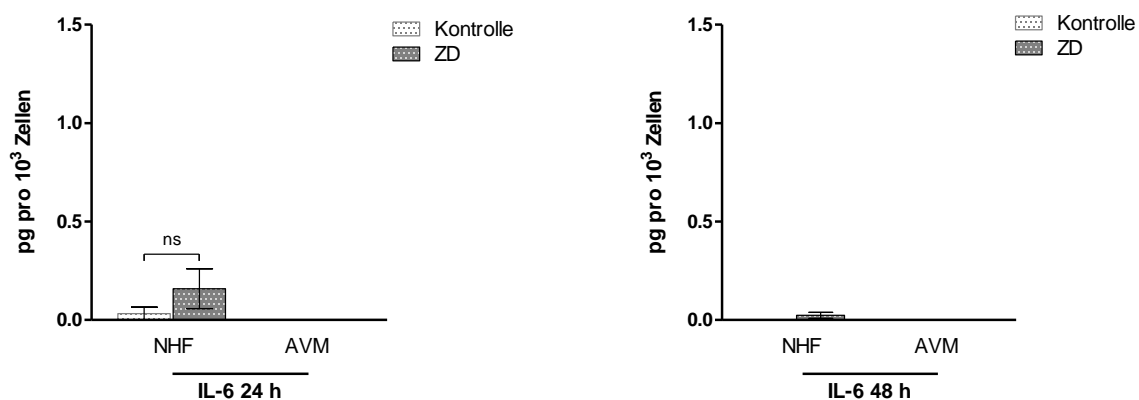
Die Proteinexpressionsanalyse der AVM, HDMEC und NHF erfolgte unter Verwendung der Zellüberstände sowohl aus der Gruppe der gedehnten Zellen als auch der Zellen der Kontrollgruppe, die keiner Dehnung ausgesetzt waren. Die Graphen zeigen die Menge an exprimiertem Protein in Pikogramm pro 1000 Zellen. Die Ergebnisse der über 24 Stunden ablaufenden Dehnung sind denen der über 48 Stunden ablaufenden Dehnung gegenübergestellt.

3.2.1. Interleukin 6 (IL-6)

Im Sandwich-ELISA mit Detektion von IL-6 zeigte sich nach 24-stündiger Dehnung eine geringfügige IL-6-Expression der NHF sowohl in der Dehnungs- als auch in der

Kontrollgruppe. Die Expression innerhalb der Gruppe gedehnter NHF-Zellen war hierbei zur Expression der Gruppe ungedehnter NHF-Zellen mit klarer Tendenz erhöht ($p=0,2539$) und bot ein 95%-Konfidenzintervall von -0,3538 bis 0,1013. Die AVM-Zellen ließen im Vergleich dazu keine IL-6-Expression erkennen (siehe Abb. 25a).

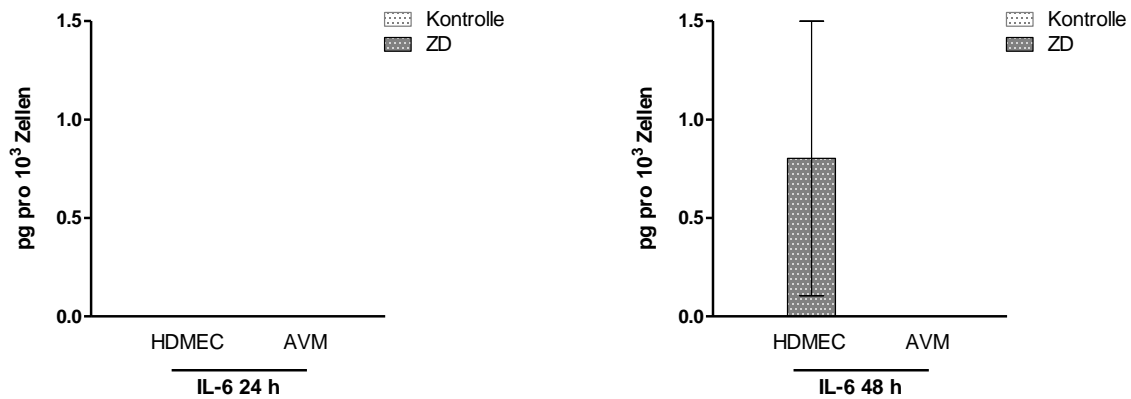
Nach 48-stündiger Dehnung war kein markanter Unterschied der IL-6-Expression zwischen den Entitäten von NHF und AVM zu erkennen, die alle keine Expression von IL-6 zeigten. Nur die über 48 Stunden gedehnten NHF wiesen eine marginal erscheinende Expression auf (siehe Abb. 25b).



▲ Abb. 25: Menge an exprimiertem IL-6 in pg pro 1000 Zellen durch NHF im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48h. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0.05$). Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.

Bei Betrachtung der HDMEC-Zellen nach 24 Stunden Dehnung war weder in der Dehnungs- noch in der Kontrollgruppe eine IL-6-Expression zu erkennen (siehe Abb. 26a).

In der Gruppe der über 48 Stunden gedehnten Zellen zeigten die HDMEC der Dehnungsgruppe eine tendenziell erhöhte IL-6-Expression gegenüber den gedehnten AVM, bei denen keine Expression von IL-6 auszumachen war. Die HDMEC-Zellen der Kontrollgruppe zeigten hingegen auch nach 48 Stunden keine IL-6-Expression (siehe Abb. 26b).



▲ **Abb. 26:** Menge an exprimiertem IL-6 in pg pro 1000 Zellen durch HDMEC im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48 h. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.

3.2.2. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Die VEGF-Proteinexpressionsanalyse ergab in der Gruppe der über 24 Stunden gedehnten Zellen folgendes Bild: Die gedehnten AVM exprimierten mit einem 95%-Konfidenzintervall von -0,4583 bis -0,006704 signifikant mehr VEGF als die gedehnten NHF ($p < 0,0453$) und mit einem 95%-Konfidenzintervall von -0,5262 bis -0,2088 signifikant mehr als die gedehnten HDMEC ($p < 0,0013$) (siehe Abb. 27a/28a).

In der dazugehörigen Kontrollgruppe exprimierten ebenfalls die AVM, in diesem Fall die ungedehnten, signifikant mehr VEGF im Vergleich zu den ungedehnten NHF ($p = 0,0570$) bei einem 95%-Konfidenzintervall von -0,3083 bis 0,006605 und signifikant mehr VEGF als die ungedehnten HDMEC ($p < 0,0060$) bei einem 95%-Konfidenzintervall von -0,2943 bis -0,08235. Zudem wurde eine klare Tendenz der gedehnten AVM gegenüber den ungedehnten AVM zur erhöhten VEGF-Expression ersichtlich ($p = 0,06$) (siehe Abb. 27a/28a). Das 95%-Konfidenzintervall lag hierbei zwischen -0,4000 und 0,01167.

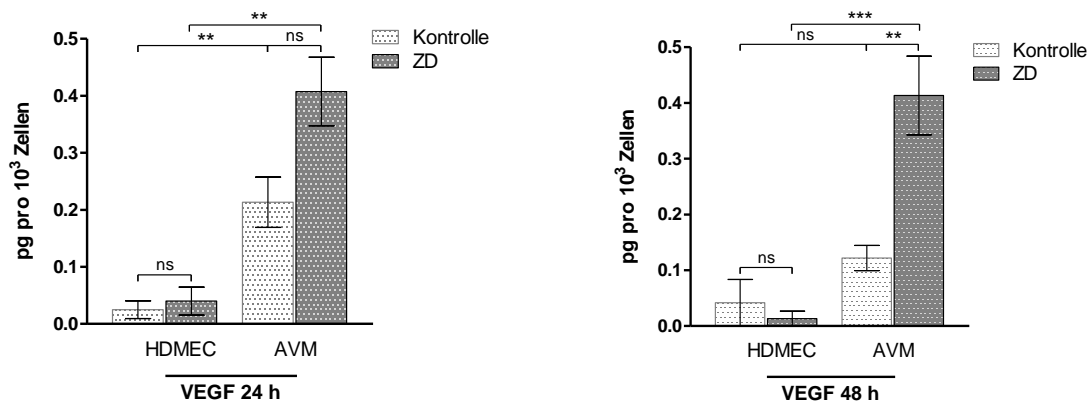
Auch nach 48 Stunden Dehnung wiesen die gedehnten AVM eine signifikant erhöhte VEGF-Expression gegenüber den gedehnten NHF ($p < 0,0077$; 95%-Konfidenzintervall=-0,5841 bis -0,1225) und den gedehnten HDMEC ($p < 0,0002$; 95%-Konfidenzintervall=-0,5599 bis -0,2401) auf. Mit deutlicher Signifikanz zeigte sich der Unterschied zwischen der Menge an exprimiertem VEGF-A zwischen den gedehnten AVM und den ungedehnten Vertretern der eigenen Zellpopulation, den AVM der Kontrollgruppe mit $p < 0,0056$ und einem 95%-Konfidenzintervall von -0,4736 bis -0,1090 (siehe Abb. 27b/28b). Die nach 24 Stunden bereits erkennbare Tendenz

erhöhter VEGF-Expression der gedehnten AVM im Vergleich zu den ungedehnten AVM-Zellen wurde nach 48 Stunden als signifikanter Unterschied deutlich.

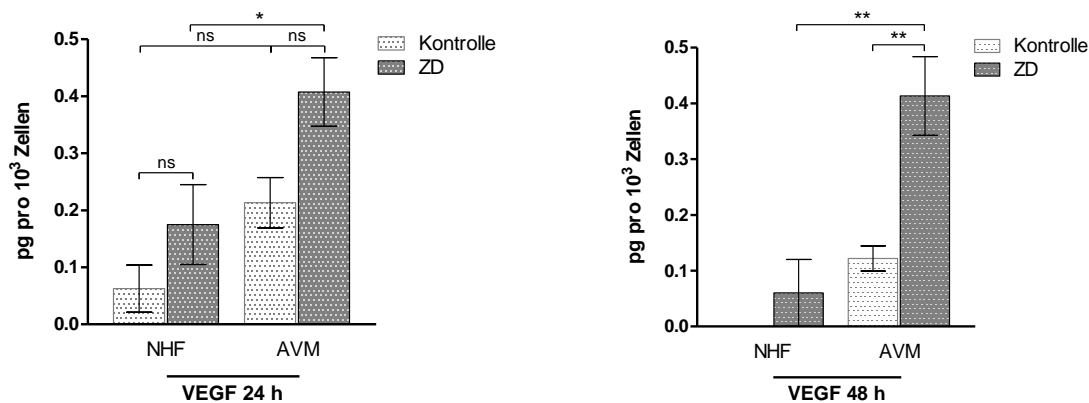
Die ungedehnten AVM stellten innerhalb der Gruppe der ungedehnten Zellen, die Zellart mit der höchsten Expression von VEGF dar. Während die ungedehnten HDMEC-Zellen bei einem 95%-Konfidenzintervall von -0,1944 bis 0,03368 geringfügig weniger VEGF exprimierten ($p=0,1455$), ließen die ungedehnten NHF nach 48 Stunden keine Expression von VEGF erkennen.

Innerhalb der Gruppe der HDMEC-Zellen zeigte sich nach 24h ein ähnliches Expressionsprofil der gedehnten HDMEC-Zellen im Vergleich zu den ungedehnten HDMEC-Zellen ($p= 0,6236$) mit minimaler Tendenz zu erhöhter Expression in der Gruppe der gedehnten Zellen und einem 95%-Konfidenzintervall von -0,08599 bis 0,05599. Nach 48h ($p=0,5318$) kam es zu einer Änderung der Verhältnisse, indem die Zellen der Kontrollgruppe mit klarer Tendenz mehr VEGF exprimierten als die Zellen der Dehnungsgruppe (siehe Abb. 27a/b). Das 95%-Konfidenzintervall lag hierbei zwischen -0,06914 und 0,1258.

In der Gruppe der NHF-Zellen war ebenfalls nach 24h eine tendenziell erhöhte VEGF-Expression der gedehnten NHF-Zellen verglichen mit den ungedehnten NHF-Zellen zu beobachten ($p= 0,2159$; 95%-Konfidenzintervall = -0,3115 bis 0,08651). Nach 48h war die VEGF-Expression der ungedehnten NHF-Zellen so gering, dass kein ungepaarter t-Test durchgeführt werden konnte. Die VEGF-Expression der gedehnten NHF-Zellen war demnach auch nach 48h mit deutlich ersichtlicher Tendenz erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 28a/b).



▲ **Abb. 27:** Menge an exprimiertem VEGF in pg pro 1000 Zellen durch HDMEC im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48h. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0.05$). ** = $p \leq 0.01$. *** = $p \leq 0.001$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.



▲ **Abb. 28:** Menge an exprimiertem VEGF in pg pro 1000 Zellen durch NHF im Vergleich zu AVM nach 24h. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0.05$). * = $p \leq 0.05$. ** = $p \leq 0.01$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.

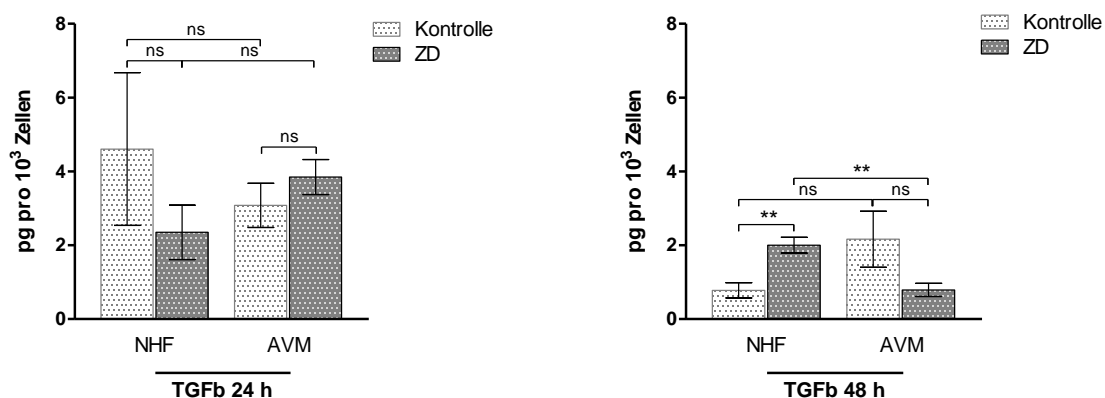
3.2.3 Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)

Die Auswertung der TGF- β 1-Expression nach 24stündiger Dehnung ergab eine in ihrer Tendenz verminderte Expression durch die gedehnten NHF-Zellen gegenüber den gedehnten AVM-Zellen ($p=0,1377$) mit einem 95%-Konfidenzintervall von -3,638 bis 0.6427. In der Kontrollgruppe zeigte sich im Gegensatz dazu eine tendenziell erhöhte TGF- β 1-Expression der NHF-Zellen gegenüber den AVM-Zellen ($p=0,5057$) (siehe Abb. 30a). Hierbei lag das 95%-Konfidenzintervall zwischen -3,748 und 6,798, was die deutlichen Schwankungen der Ergebnisse dieser Gruppe hervorhebt.

Anders stellte sich dies nach 48-stündiger Dehnung dar. Hier kam es zu einer signifikant höheren TGF- β 1-Expression der NHF-Zellen der Dehnungsgruppe im

Vergleich zu den in der Dehnungsgruppe befindlichen AVM-Zellen ($p < 0,0025$). Das 95%-Konfidenzintervall erstreckte sich in diesem Fall auf ein Spektrum von 0,5659 bis 1,859. In der Kontrollgruppe dagegen zeigten die AVM-Zellen eine mit klarer Tendenz erhöhte TGF- β 1-Expression gegenüber den ungedehnten NHF-Zellen ($p = 0,1090$) mit einem 95%-Konfidenzintervall von -3,139 bis 0,3689 (siehe Abb. 29b).

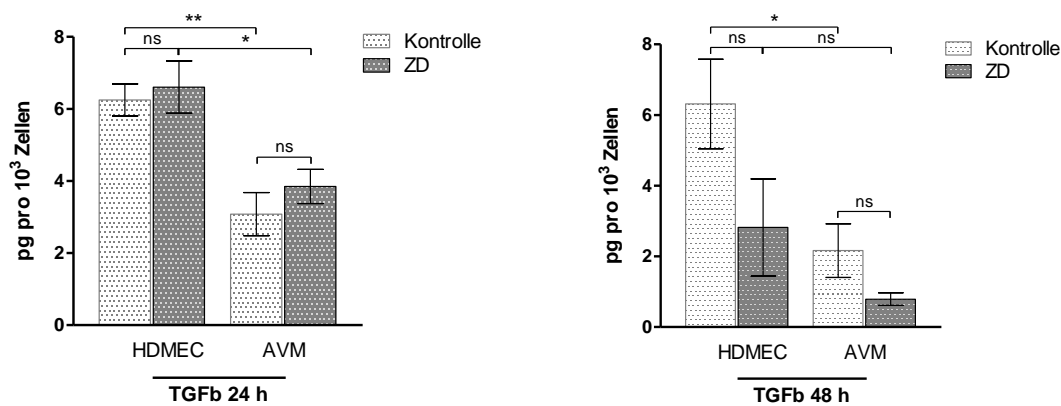
Der Vergleich innerhalb der Gruppe der AVM-Zellen ließ nach 24-stündiger Dehnung bei einem 95%-Konfidenzintervall von -2,638 bis 1,103 keine signifikanten Unterschiede in der TGF- β 1-Expression zwischen den gedehnten Zellen und den ungedehnten Zellen erkennen ($p = 0,3541$) (siehe Abb. 29a). Nach 48 Stunden Dehnung wandelte sich dies zugunsten einer mit deutlicher Tendenz ersichtlichen höheren TGF- β 1-Expression der Zellen der Kontrollgruppe im Vergleich zu derer der gedehnten Zellen ($p = 0,1089$) (siehe Abb. 29b). Das 95%-Konfidenzintervall lag diesbezüglich zwischen -2,638 und 1,103.



▲ **Abb. 29: Menge an exprimiertem TGF- β 1 in pg pro 1000 Zellen durch NHF im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48h. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0,05$). ** = $p \leq 0,01$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.**

Die Gruppe der über 24 Stunden gedehnten HDMEC-Zellen ließ gegenüber den gedehnten AVM-Zellen eine signifikant erhöhte TGF- β 1-Expression ($p < 0,0189$) mit 95%-Konfidenzintervall von 0,6403 bis 4,875 erkennen. In der Kontrollgruppe wiesen die ungedehnten HDMEC eine signifikant höhere Expression an TGF- β 1 im Vergleich zu den ungedehnten AVM auf ($p < 0,0055$; 95%-Konfidenzintervall=1,337 bis 4,998) (siehe Abb. 30a).

Ein ähnliches Bild ließ sich auch nach 48 Stunden Dehnung erkennen. Hierbei fiel ebenfalls eine signifikant höhere TGF- β 1-Expression der ungedehnten HDMEC-Zellen im Vergleich zu den ungedehnten AVM-Zellen mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,8586 bis 7,441 auf ($p < 0,0185$). In der Dehnungsgruppe zeigten die HDMEC-Zellen eine mit klarer Tendenz erhöhte Expression von TGF- β 1 gegenüber den AVM-Zellen ($p = 0,1740$) (siehe Abb. 30b). In diesem Fall ließ sich ein 95%-Konfidenzintervall von -1,059 bis 5,116 ausmachen.



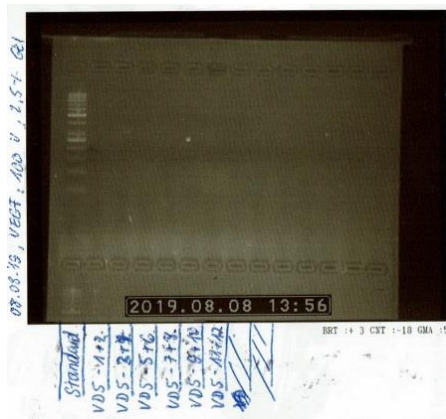
▲ **Abb. 30:** Menge an exprimiertem TGF- β 1 in pg pro 1000 Zellen durch HDMEC im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48h. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0.05$). * = $p \leq 0.05$. ** = $p \leq 0.01$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.

3.3 Genexpression

Neben der Proteinexpressionsanalyse wurde die Expression von VEGF-A über eine Genexpressionsanalyse auch auf Ebene der RNA untersucht. Hierzu wurde vor der angestrebten quantitativen Real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR) eine PCR mit Gelelektrophorese durchgeführt, um sicherzustellen, dass eine allgemeine VEGF-A-Expression der RNA-Proben bestand, und um die verwendeten VEGF-Primer zu testen.

3.3.1 PCR mit GAPDHrat, VEGF-A mit Primer VEGF1-hu und VEGF4-hu

Die in einem ersten PCR-Durchlauf verwendeten VEGF-A-Primer VEGF1-hu ließen keine Banden im elektrophoretisch behandelten Gel erkennen (siehe Abb. 31).



▲ **Abb. 31: Ergebnis der Gelelektrophorese nach PCR bei 100 Volt unter Verwendung eines 2,5%igen Agarosegels mit Detektion von VEGF1-hu in den cDNA-Proben von Dehnungsversuch 5 (VD5). Quelle: eigene Darstellung**

Anders bei Verwendung der VEGF-A-Primer VEGF4-hu. Hier zeigten sich Banden im Bereich der Coding-Sequenzen VEGF121, 165 und 189 (siehe Abb. 32). Die hiermit detektierten spezifischen Isoformen von VEGF-A waren demnach in den RNA-Proben exprimiert worden.



▲ **Abb. 32: Ergebnis der Gelelektrophorese nach PCR bei 100 Volt unter Verwendung eines 2,5%igen Agarosegels mit Detektion von VEGF4-hu in den cDNA-Proben. Quelle: eigene Darstellung**

Die Kontrolle mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Ladekontrollen-Antikörper bewies die Funktionalität der durchgeführten cDNA-Transkription und der anschließenden Gelelektrophorese (siehe Abb.33).



▲ **Abb. 33: Ergebnis der Gelelektrophorese nach PCR bei 100 Volt unter Verwendung eines 2,5%igen Agarosegels mit Detektion von GAPDHrat in den cDNA-Proben. Quelle: eigene Darstellung**

3.3.2 Quantitative Real-Time PCR mit GAPDHrat und VEGF4-hu

In der vergleichenden Betrachtung der VEGF-Detektion bei AVM-Zellen und NHF-Zellen über eine quantitative Real-Time PCR mit Normierung auf GAPDH zeigte sich nach 24h eine signifikant erhöhte Expression von VEGF in der AVM-Dehnungsgruppe im Vergleich zur Dehnungsgruppe der NHF-Zellen ($p < 0,0269$) mit einem 95%-Konfidenzintervall von -9,902 bis -1,024 (siehe Abb. 34a).

Die VEGF-Detektion innerhalb der Gruppe der ungedehnten AVM-Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Gruppe ungedehnter NHF-Zellen ($p = 0,4203$). Das 95%-Konfidenzintervall lag hierbei zwischen -1,118 und 0,5720.

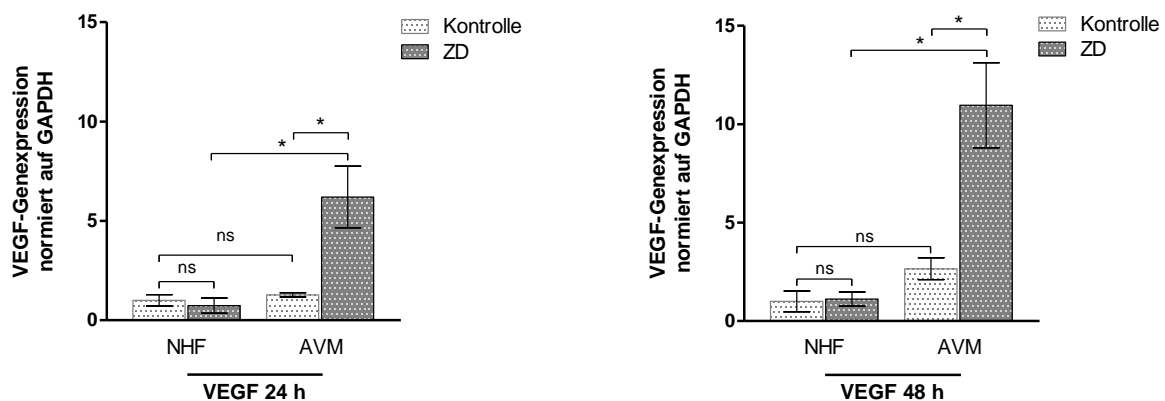
Innerhalb der eigenen Zellentität der AVM-Zellen war eine signifikant höhere VEGF-Genexpression in der Dehnungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,0340$; 95%-Konfidenzintervall = -9,251 bis -0,6058) zu erkennen, wohingegen die NHF-Zellen der Dehnungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe der eigenen Entität keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Genexpression aufwiesen ($p = 0,6111$; 95%-Konfidenzintervall = -1,056 bis 1,579).

Nach 48h bestätigte sich dieses Bild in der Weise, dass die gedehnten AVM-Zellen auch in diesem Fall eine signifikant höhere VEGF-Genexpression aufwiesen als die gegenübergestellten gedehnten NHF-Zellen ($p < 0,0108$). Das 95%-Konfidenzintervall erstreckte sich hierbei über einen Bereich von -15,92 bis -3,769.

In der Kontrollgruppe ergab sich bei einem 95%-Konfidenzintervall von -3,788 bis 0,4745 ebenfalls ein Unterschied im Sinne einer Tendenz zur erhöhten Genexpression

der ungedehnten AVM-Zellen verglichen mit den ungedehnten NHF-Zellen ($p=0,0971$).

Innerhalb der Gruppe der AVM-Zellen wurde eine signifikant stärkere Genexpression der gedehnten Zellen im Vergleich zu den ungedehnten Zellen ($p<0,0204$) mit einem 95%-Konfidenzintervall von -14,50 bis -2,109 deutlich. Die Genexpression der NHF-Zellen unterschied sich hingegen nur marginal zwischen Dehnungs- und Kontrollgruppe ($p=0,8668$; 95%-Konfidenzintervall=-1,879 bis 1,652) (siehe Abb. 34b).



▲ **Abb. 34: Quantitativer Unterschied an detektiertem VEGF normiert auf GAPDH zwischen den gedehnten AVM und NHF und der jeweils dazugehörigen Kontrollgruppe nach 24h bzw. 48h. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0.05$). * = $p \leq 0.05$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.**

Die quantitative Real-Time PCR zeigte nach 24h eine signifikant höhere VEGF-Expression der AVM-Dehnungsgruppe im Vergleich zur HDMEC-Dehnungsgruppe ($p<0,0290$) bei einem 95%-Konfidenzintervall von -37,45 bis -3,416 auf.

Die VEGF-Expression der ungedehnten AVM-Zellen war ebenfalls signifikant höher als die der ungedehnten HDMEC-Zellen ($p<0,0014$). In diesem Fall war ein 95%-Konfidenzintervall von -5,439 bis -2,601 gegeben.

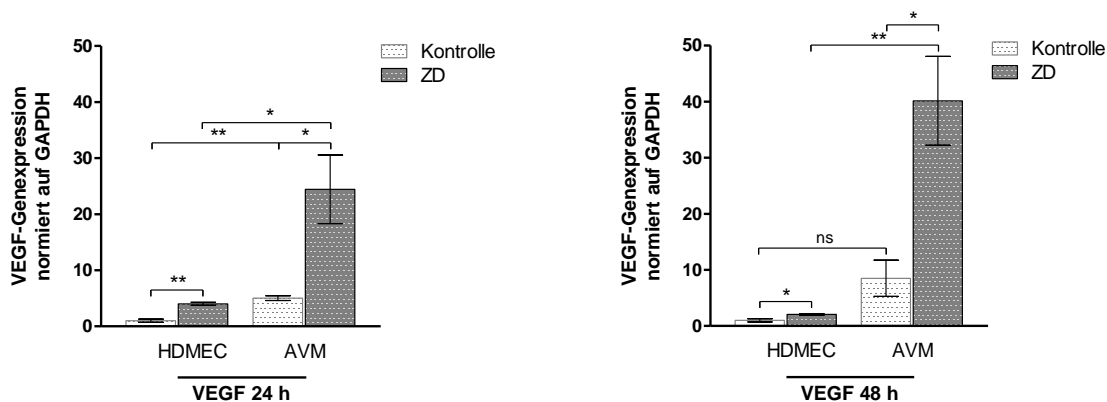
Ebenso zu erkennen war eine signifikant höhere VEGF-Genexpression der gedehnten AVM-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe der eigenen Zellentität ($p<0,0340$; 95%-Konfidenzintervall= -36,48 bis -2,389). Auch die gedehnten HDMEC-Zellen wiesen eine signifikant höhere Genexpression im Vergleich zur eigenen Kontrollgruppe auf

($p < 0,0014$) (siehe Abb. 35a). Das 95%-Konfidenzintervall lag hierbei zwischen -4,082 bis -1,954.

In der Gruppe der über 48h gedehnten AVM-Zellen wurde wie auch schon nach 24h eine signifikant höhere VEGF-Genexpression in Gegenüberstellung der gedehnten HDMEC-Zellen deutlich ($p < 0,0086$; 95%-Konfidenzintervall= -60,07 bis -16,13).

Die Kontrollgruppe der AVM-Zellen zeigte bei einem 95%-Konfidenzintervall von -16,51 bis 1,518 ebenfalls eine in ihrer Tendenz höhere Genexpression als die Kontrollgruppe der HDMEC-Zellen ($p = 0,0822$).

Innerhalb ihrer eigenen Entität wiesen sowohl die AVM-Zellen ($p < 0,0208$; 95%-Konfidenzintervall= -55,39 bis -7,926) als auch die HDMEC-Zellen ($p < 0,0287$; 95%-Konfidenzintervall= -1,924 bis -0,1791) eine signifikant höhere VEGF-Genexpression der gedehnten Zellen gegenüber den ungedehnten Zellen auf (siehe Abb. 35b).



▲ **Abb. 35: Quantitativer Unterschied an detektiertem VEGF normiert auf GAPDH zwischen den gedehnten AVM und HDMEC und der jeweils dazugehörigen Kontrollgruppe nach 24h bzw. 48h. ZD = Zyklische Dehnung. ns = nicht signifikant ($p > 0.05$). * = $p \leq 0.05$. ** = $p \leq 0.01$. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler.**

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.4.1 Proliferationsversuche

Im Resazurin-Assay sowie bei der allgemeinen Zellzählung in der 6-Well-Platte zeigte sich eine signifikant höhere Zellvermehrung der NHF im Vergleich zu den AVM. Dagegen wiesen die HDMEC-Zellen verglichen mit den AVM-Zellen eine stark signifikante niedrigere Zellvermehrung auf.

Die Dehnung der Zellen bewirkte eine signifikant erhöhte Zellproliferation der AVM verglichen mit der ungedehnten Kontrollgruppe. Nach 48h zeigte sich tendenziell eine erhöhte Zellproliferation der gedehnten AVM-Zellen verglichen mit den ebenfalls gedehnten NHF und HDMEC.

In der Fotodokumentation der Zellen konnte ein durch Dehnung ausgelöster Wandel von ungerichtetem zu gerichtetem Wachstum von AVM und NHF beobachtet werden.

3.4.2 Expression von Wachstumsfaktoren

Die Expression von IL-6 zeigte sich durch die Dehnung der Zellen weitgehend unbeeinflusst.

Dagegen ließen die gedehnten AVM sowohl auf Ebene der Proteinexpression als auch auf Ebene der Genexpression eine signifikant höhere VEGF-Expression verglichen mit der AVM-Kontrollgruppe sowie den gedehnten NHF und den gedehnten HDMEC erkennen. Nach 48 Stunden Dehnung zeigten die Unterschiede in der Expression eine höhere Signifikanz als nach 24 Stunden.

Die Auswertung der TGF- β 1-Expression wies erst nach 48-stündiger Dehnung signifikante Ergebnisse auf, die denen der VEGF-Expression entgegengesetzt erscheinen. Die Dehnung bewirkte eine niedrigere Proteinexpression der gedehnten AVM-Zellen wie auch der HDMEC verglichen mit ihren Kontrollgruppen sowie eine signifikant höhere Proteinexpression der gedehnten NHF-Zellen verglichen mit ihrer Kontrollgruppe. Die TGF- β 1-Expression der gedehnten NHF zeigte sich zudem signifikant höher als die der gedehnten AVM.

4 Diskussion

4.1 Wachstumsverhalten der Zellen

Bei vaskulären Malformationen kommt es aufgrund einer pathologischen Vaskulogenese bzw. Angiogenese zu erkennbaren vaskulären Läsionen und daraus hervorgehenden Deformitäten (1). Als Triggerfaktoren für das meist expansive Wachstum dieser Läsionen werden neben dem allgemeinen Körperwachstum sowohl hypoxische Verhältnisse, hormonelle Schwankungen oder Veränderungen wie in Pubertät oder Schwangerschaft, lokale Traumata als auch operative oder endovaskuläre Eingriffe angesehen (3,12,16,112).

Kuwano et. al. benennt Wachstumsfaktoren wie Vascular endothelial growth factor (VEGF) und Transforming growth factor- β (TGF- β), Chemokine und Proteasen sowie Zytokine wie zum Beispiel Interleukine als wichtige angiogene Faktoren (54). Diese sind verantwortlich für den koordinierten Fortgang der einzelnen Schritte in Vaskulo- und Angiogenese (55).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das Wachstumsverhalten von arteriovenösen Malformationszellen im Vergleich zu normalen Endothelzellen und Fibroblasten untersucht und Unterschiede in Bezug auf die Expression angiogener Faktoren wie VEGF, TGF- β und IL-6 untersucht.

4.1.1 Basales Wachstumsverhalten der AVM verglichen mit gesunden Zellen des vaskulären Systems

Das basale Wachstumsverhalten der AVM wurde mithilfe eines Proliferationsversuchs in einer 6-Well-Platte sowie eines Resazurin-Assays dem Wachstumsverhalten der NHF und HDMEC gegenübergestellt. Die Auswahl von NHF und HDMEC als Gegenproben lag darin begründet, dass es sich bei den im Rahmen operativer Resektionen am Universitätsklinikum Regensburg gewonnenen arteriovenösen Malformationszellen um eine Mischkultur aus Endothelzellen und Fibroblasten handelte.

Im Resazurin-Assay sowie im Proliferationsversuch konnte eine signifikant höhere Viabilität der NHF-Zellen im Vergleich zu den AVM-Zellen beobachtet werden. Da diesbezüglich keine ähnlichen Untersuchungen vorlagen, konnte kein Vergleich mit einem literarischen Äquivalent durchgeführt werden. Das Wachstumsverhalten der

HDMEC-Zellen war dagegen gegenüber dem der AVM-Zellen signifikant erniedrigt. Dies bestätigt die Beobachtungen von *Wautier et. al.*, die eine erhöhte spontane Proliferationsrate der untersuchten AVMs im Vergleich zu aus der Nabelschnur entnommenen venösen, arteriellen und mikrovaskulären Endothelzellen feststellen (71). Dementsprechend zeigten die HDMEC-Zellen eine mit deutlicher Signifikanz versehene niedrigere Zellviabilität im Vergleich zu den NHF-Zellen. Dieses Ergebnis widerspricht *Geyer et. al.* Seinen Ausführungen zufolge lässt sich ein erhöhtes Wachstum der HDMEC-Zellen nach 96h im Vergleich zur Gruppe der NHF-Zellen erkennen (120). Da ähnliche Kultivierungsbedingungen vorlagen, lässt sich die Diskrepanz der Ergebnisse möglicherweise dadurch erklären, dass die Zellviabilitätsmessung in Form des Resazurin-Assays in *Geyer et. al.* erst nach 96h erfolgte, in unserem Versuchsaufbau jedoch schon nach 48h.

Die AVM zeigten eine der Mischkultur entsprechende moderate Wachstumsrate zwischen der höheren Rate der Fibroblasten und der deutlich niedrigeren Rate der Endothelzellen.

4.1.2 Wachstumsverhalten der gedehnten AVM, NHF und HDMEC

Die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer, sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Dehnung ergab eine im Durchschnitt signifikant höhere Zellzahl der gedehnten AVM-Zellen als die der AVM-Zellen der Kontrollgruppe. Dies spricht für die durch *Manzocchi et. al.* getätigten Beobachtungen eines animierten Wachstums von AVM durch mechanische Einflussfaktoren (16).

Die vergleichende Betrachtung der gedehnten Zellen der Entitäten ergab eine niedrigere AVM-Zellzahl nach 24h gegenüber den NHF-Zellen. Nach 48h Dehnung wandelte sich dies jedoch zugunsten einer erhöhten Zellzahl der AVM-Zellen im Vergleich zu den NHF-Zellen. Bezeichnenderweise blieb das Verhältnis zwischen AVM- und NHF-Zellen der Kontrollgruppen mit einer erhöhten Zellzahl auf Seiten der NHF-Zellen bestehen. In Bezug auf die gedehnten HDMEC-Zellen zeigten die gedehnten AVM-Zellen sowohl nach 24h als auch nach 48h eine teils signifikant höhere Viabilität. Dies impliziert, dass der mechanische Stimulus in Form zyklischer mechanischer Dehnung einen größeren Einfluss auf das Wachstum arteriovenöser Malformationszellen ausübt als auf das Wachstum von Endothelzellen und Fibroblasten. Die Kontrollgruppen von AVM, NHF und HDMEC vergleichend zeigte

sich, dass AVM auch ohne die Einwirkung von Dehnung ein teils signifikant höheres Wachstum aufwies als die ungedehnten HDMEC. Dies entspricht Beobachtungen durch *Wautier et al.*, nach denen eine erhöhte Endothelzellproliferation bei AVM im Vergleich zu gesunden umbilikalen Endothelzellen festgestellt werden konnte (71).

Die Fotodokumentation steht im Einklang mit den Ergebnissen der Zellproliferationsanalyse. Sowohl die fotografierten AVM als auch NHF zeigen ein ungerichtetes Wachstum vor der Dehnung. Verglichen dazu lassen sie nach der Dehnung ein gerichtetes Wachstum erkennen, in dessen Folge die Zellen parallel zueinander angelegt sind. Die zyklische mechanische Dehnung bewirkt demzufolge eine optisch erfassbare Veränderung des Zellwachstums. Im Falle der HDMEC ist eine genaue Beurteilung durch das nur mäßige Wachstum mit dem bloßen Auge nicht zu treffen. Es ist jedoch durch Verweis auf Beispiele in der Literatur wie *Zielinski et al.* anzunehmen, dass HDMEC bei Einfluss zyklischer Dehnung ein ähnlich gerichtetes Zellwachstum annehmen. Hierbei zeigten humane Endothelzellen eine deutliche Anpassung in Form der senkrecht zum Dehnungszug gesetzten Ausrichtung ihres Zellkörpers (121).

In Zusammenschau der Ergebnisse stützt dies die Hypothese, dass sich mechanischer Einfluss in Form zyklischer Dehnung wachstumsfördernd auf arteriovenöse Malformationszellen auswirkt (3,12,112). Auch gesunde Endothelzellen können laut *Zheng et al.* in ihrem Wachstum durch exogene mechanische Stimuli wie zyklische Dehnung durch Proliferationssteigerung gefördert werden (63). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch eine ersichtlich signifikant höhere Proliferation gedehnter HDMEC-Zellen nach 48-stündiger Dehnung bestätigt werden. Die nach 24h erniedrigte Zahl der HDMEC gegenüber ihrer Kontrollgruppe könnte dadurch begründet sein, dass die Dehnungsstärke nicht derjenigen des Vergleichsexperiments durch *Zheng et al.* entsprach. Dies alles lässt darauf schließen, dass der Einfluss zyklischer Dehnung auf das Wachstum arteriovenöser Malformationen als signifikant größer anzusehen ist als der Einfluss auf das Wachstum gesunder Endothelzellen und Fibroblasten. Je länger es zu einer Einwirkung durch den mechanischen Stimulus kommt, desto höher die Steigerung der Proliferationsrate arteriovenöser Malformation im Unterschied zu gegenübergestellten Endothelzellen und Fibroblasten gesunder Gefäße. Rückschließend bekräftigt dies die Annahme einer Stimulation des Wachstums arteriovenöser Malformationen durch externe Stimuli, die einer zyklischen Dehnung

entsprechen, wie zum Beispiel der erhöhte mechanische Stress, der auf die Zellen der arteriovenösen Malformation durch den erhöhten Blutfluss und den Druck an den Gefäßwänden wirkt.

4.2 Expression von Wachstumsfaktoren mit und ohne mechanische Belastung

Das mit dem allgemeinen Körperwachstum einhergehende Wachstum vaskulärer Malformationen ist Teil einer pathologischen Angiogenese, die den Malformationszellen mit einer zuvor schon embryonal fehlerhaft ablaufenden Vaskulogenese zu eigen ist (3). Mehrere Wachstumsfaktoren wie der Vascular endothelial growth factor (VEGF) und der Transforming growth factor- β (TGF- β) sowie Zytokine wie Interleukin 6 nehmen entsprechend der Aussagen von *Kuwano et al.* Einfluss auf den Prozess der Vaskulo- und Angiogenese und garantieren deren koordinierten Ablauf (54,55). Deren Über- bzw. Unterexpression führt dementsprechend zu einem gestörten Ablauf der Blutgefäßentwicklung. Dies ist auch in der Genese vieler Tumorerkrankungen beobachtbar (67–69). Einfluss auf die Expression erwähnter Faktoren scheinen laut *Bai et al.* in Bezug auf VEGF und *Zhou et al.* in Bezug TGF- β neben hypoxischen Bedingungen auch externe mechanische Stimuli wie geringe und oszillatorische Scherspannung zu nehmen (58,61). Aus diesem Grund wurde sowohl das Expressionsprofil auf Proteinebene von VEGF als auch von TGF- β und IL-6 in vorliegender Arbeit abhängig von auf AVM-, NHF- und HDMEC-Zellen einwirkender zyklischer Dehnung untersucht. Der durch die Proteinexpressionsanalyse mittels ELISA festgestellte Zusammenhang zwischen zyklischer mechanischer Dehnung und der Expression von VEGF-A wurde anschließend im Rahmen einer Genexpressionsanalyse verifiziert.

4.2.1 Interleukin 6 (IL-6)

Nilsson et al. beschreibt Interleukin 6 (IL-6) als Faktor, der die endotheliale Zellmigration im Verlauf der Angiogenese stimuliert und dem in der Neovaskularisierung eine Rolle als Induktor zuzuschreiben ist (110). Neue Studien erkennen IL-6 als ähnlich potenten Induktor des Angiogenese-Sproutings wie VEGF an, mit dem Ergebnis defekter Gefäße (111). In Bezug auf seinen Beitrag an pathologischen Geschehen innerhalb der Gefäßentwicklung stellt *Zhang et. al* einen Zusammenhang zwischen IL-6-Überexpression und tumorassoziierter Angiogenese

beim kolorektalen Karzinom her (69). Zu einem möglichen Einfluss von IL-6 auf die Pathogenese vaskulärer Malformationen bestehen bisher keine Daten. Eine derartige Hypothese kann durch die vorliegenden Untersuchungen auch nicht bekräftigt werden. Die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalyse von IL-6 lassen keine Expression des Zytokins durch AVM-Zellen erkennen. Weder die gedehnten Zellen noch die Zellen der Kontrollgruppe wiesen erhöhte Werte an exprimiertem IL-6 auf. Es ist daher davon auszugehen, dass mechanische Belastung keinen Einfluss auf die Expression von IL-6 in AVM nimmt. Die gesunden Fibroblasten der Dehnungsgruppe ließen nach 24h höhere IL-6 Werte erkennen als die gesunden Endothelzellen. Nach 48h fiel das Ergebnis im Gegenteil zugunsten einer höheren IL-6-Expression der HDMEC-Zellen im Vergleich zu den NHF-Zellen aus.

4.2.2 Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)

Vascular endothelial growth factor (VEGF), einem in vitro vorkommenden endothelial und zell-spezifischen Mitogen und in vivo auftretendem Angiogenese-Induktor, wird von *Guerrero et al.* eine große Bedeutung in Vaskulo- und Angiogenese zugemessen (74,75). Seine regulativen Einflüsse finden sich schon während der ersten Schritte der Blutgefäßentwicklung in Form einer Anregung der vaskulären Vorläufer-Differenzierung zu Angioblasten (78). Besonders viele Forschungsergebnisse finden sich bezüglich der Rolle von VEGF-A und dem zugehörigen Rezeptor VEGFR-2 in der Angiogenese. Quellen wie *Napione et. al.* sprechen von einem obligaten Einwirken von VEGF auf Zellüberleben, -invasion, -migration und -proliferation (49,55,75,79). Präzisiert wird dies durch Aussagen in *Jarad et. al.*, wonach VEGF zur Förderung der Entwicklung von Tip-cells und Stalk-cells und deren Migration bzw. Proliferation im Rahmen des sogenannten "Sproutings" beiträgt (96). Eine weitere wichtige Funktion von VEGF bzw. seines Rezeptors VEGFR2 wird in der Aktivierung der TGF- β 1 vermittelten Apoptoseinduktion im Verlauf der Angiogenese gesehen (80). In Zellstudien nach *Lakoonen et al.* konnte gezeigt werden, dass gesunde Endothelzellen die Zellentität mit der größten VEGF-Interaktion darstellen und Isoformen des Wachstumsfaktors exprimieren (76). Auch seine Rolle als profibrogener Faktor ist nicht zu verkennen. Hierbei bewirkt VEGF in Form von VEGF-D die Stimulation von Fibroblasten zur Proliferation und Aktivierung hin zu Myofibroblasten (77). *Ferrara et al.* verweist auf die Tatsache, dass in den meisten menschlichen Tumoren VEGF-mRNA nachgewiesen werden kann (81). Neueste Forschungsergebnisse zeigen eine

vermehrte Ausschüttung von VEGF-A, VEGF-C und VEGF-D bei Mammakarzinomen und werden mit der tumorassoziierten Angio- und Lymphangiogenese in Verbindung gebracht (67). In Bezug auf vaskuläre Malformationen sind Mutationen bekannt, die den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg betreffen. Dieser Signalweg scheint die Expression einiger Angiogenesefaktoren, darunter auch VEGF, zu beeinflussen (122).

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Proteinexpressionsanalyse von VEGF-A für die aktuelle Arbeit fällt eine höhere Expression von VEGF-A durch die ungedehnten AVM im Vergleich zu den ebenfalls ungedehnten HDMEC und NHF auf, was auch auf RNA-Ebene mit deutlich signifikanten Werten betont wird. Dies korreliert mit Ergebnissen von *Jabbour et al.*, nach denen Endothelzellen innerhalb arteriovenöser Malformationen auch ohne mechanischen Einfluss eine hohe VEGF-Expression aufweisen (87). *Di Stefano et al.* präsentiert hierzu passend eine Studie, in der eine erhöhte Serumkonzentration von VEGF bei mit vaskulären Malformationen vorstellig gewordenen Patienten verglichen mit gesunden Kontrollgruppen festgestellt werden konnte (82). Dies bestätigt eine Studie von *Oh et al.*, nach der die VEGF-Werte in von Alk1-Mutationen betroffenen Embryos signifikant erhöht waren (101). Zudem findet *Di Stefano et al.* einen Ansatz zur Aufklärung der VEGF einbindenden Pathogenese. Die Studie zeigt eine Korrelation zwischen einer durch KRIT1-Depletion verursachten VEGFR2-Aktivierung und einer verstärkten Bildung von CCMs (Cerebral Cavernous Malformations) bei Mäusen (83). KRIT1, ein in die Gefäßbildung integriertes Gen, ist Teil eines Komplexes, der die Suppression des Signalmoleküls RhoA-GTPase forciert. Rho GTPasen beeinflussen das Wachstum und Bestehen von Blutgefäßen. Fällt deren Inhibition durch KRIT1 weg, bewirken diese GTPasen gemäß *Richardson et al.* strukturelle Defekte der Gefäße infolge fehlerhafter Zellverbindungen, wie sie bei vaskulären Malformationen, insbesondere CCM, zu finden sind (84–86). *Tual-Chalot et al.* legt zudem dar, dass ein defektes ENG, wie es in arteriovenösen Malformationen beobachtet werden kann, zu erhöhter Sensitivität der Endothelzellen gegenüber VEGF und einer daraus resultierenden enthemmten VEGF-vermittelten Endothelzellproliferation führt (92). Einen allgemein erhöhten VEGF-Gehalt im Serum von durch vaskuläre Malformationen betroffenen Patienten verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe beschreibt auch *El-Raggal et al.* (82).

In Bezug auf die Zellen der Dehnungsgruppen ergibt sich ein ähnliches, in diesem Fall deutlich signifikantes Verhältnis der höheren VEGF-A-Expression durch die gedehnten

AVM verglichen mit den gedehnten Vertretern von NHF und HDMEC, das in der Genexpressionsanalyse bestätigt werden konnte. Auch hier zeigten die gedehnten AVM-Zellen ein signifikant höheres VEGF-Expressionsniveau gegenüber den NHF- und HDMEC-Zellen der Dehnungsgruppe. Demnach erweist sich zyklische mechanische Dehnung als deutlich effektiverer Stimulus auf die VEGF-vermittelte AVM-Zellproliferation als auf die Proliferation von normalen Endothelzellen und Fibroblasten.

Zudem besteht eine signifikant höhere VEGF-Expression der gedehnten AVM in Gegenüberstellung zu den AVM der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR bestätigen das bereits auf Proteinebene erhaltene Bild durch deutlich signifikante Werte. Seiner Funktion als von *Napione et al.* beschriebenem Angiogenese-Induktor gedenkend, bestätigt dies die Auffassung von *Manzocchi et al.*, *Theiler et al.* und *Holcomb et al.*, dass mechanische Einflüsse zu einer Stimulation des Wachstums vaskulärer Malformationen, insbesondere arteriovenöser Malformationen, führen (112). *Jin et al.* beschreibt hierzu eine durch Loss-of-function-Mutation von ENG im Rahmen einer HHT-1-Erkrankung auftretende erhöhte VEGF-A-Expression (93). Bestimmender Faktor für die VEGF-vermittelte Steigerung der Endothelzellproliferation könnte der in *Tual-Chalot et al.* beschriebene Defekt des endothelialen Endoglin sein. Fällt Endoglin, das unter physiologischen Bedingungen für eine ausgeglichene Empfindlichkeit der Endothelzellen auf Aktivierungsreize von VEGF sorgt, als regulierenden Faktor weg, setzt eine enthemmte VEGF-vermittelte Endothelzellproliferation ein (92). Neben der Mutation von Endoglin könnte auch eine Deletionsmutation von Alk1, wie *Choi et al.* es zu beschreiben weiß, möglicherweise für die VEGF-Aktivierung verantwortlich sein (94). Die genauen Umstände gilt es nun im Rahmen weiterer Studien aufzuklären.

Die gedehnten HDMEC zeigten nach 24h ein mit minimaler Tendenz erhöhtes Expressionsprofil im Vergleich zu den ungedehnten HDMEC-Zellen. Diese Verhältnisse kehrten sich allerdings nach 48h um, indem die Zellen der Kontrollgruppe tendenziell mehr VEGF exprimierten als die Zellen der Dehnungsgruppe. Dies folgt der in *Hurley et al.* dargelegten Beobachtung einer anfänglich durch zyklische Dehnung induzierten Erhöhung der Expression von VEGF-A, die sich allerdings bei anhaltender Dehnungseinwirkung wieder der basalen VEGF-A-Expression annähert (61). Auf RNA-Ebene war die Einwirkung zyklischer Dehnung innerhalb der Gruppe der

gesunden Endothelzellen mit einer deutlich signifikant erhöhten VEGF-Expression verbunden. Dies lässt sich im Kontext zu *Fang et al.* einordnen, wonach gesunde Endothelzellen bei mechanischer Stimulation mittels Scherspannung oder zyklischer Dehnung über Alk1, Notch1 oder Notch4 mit anschließender Expression von VEGF strukturellen zellulären Veränderungen in Form eines Remodellings unterzogen werden (60).

In der Gruppe der NHF-Zellen war nach 24h und 48h eine nicht signifikant erhöhte VEGF-Expression der gedehnten NHF-Zellen verglichen mit den ungedehnten NHF-Zellen zu beobachten. Auch in der Genexpressionsanalyse konnte in Bezug auf die gesunden Fibroblasten kein Einfluss zyklischer Dehnung auf die VEGF-Expression festgestellt werden, da Dehnungs- und Kontrollgruppe nur sehr geringe Unterschiede in der VEGF-Expression aufwiesen. Eine erhöhte VEGF-Expression spricht laut *Tieqiang et al.* für eine erhöhte Stimulation der Fibroblastenproliferation durch VEGF als profibrogenem Faktor (77). In der Literatur wird dem Wachstumsfaktor VEGF-D eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Fibroblastenproliferation zugesprochen. In unserem Versuchsaufbau wurden die NHF jedoch auf Expression des Faktors VEGF-A überprüft. Dies dürfte möglicherweise als Erklärung dafür gereichen, dass die Unterschiede in der VEGF-Expression zwischen ungedehnten und gedehnten NHF-Zellen keine Signifikanz aufweisen.

Unter Zusammenfassung aller Ergebnisse spricht dies für einen stimulierenden Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf die VEGF-Expression arteriovenöser Malformationszellen auf Protein- und RNA-Ebene und impliziert damit einen stimulierenden Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf das Wachstum arteriovenöser Malformationen.

4.2.3 Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)

Wie *Jarad et al.* beschreibt, wird TGF- β als Angiogenesefaktor mit ebenso angiogenen wie auch angiostatischen Qualitäten betrachtet (74,96,97). *Dijke et al.* unterstreicht dabei vor allem die entscheidende Rolle von TGF- β 1 in der Angiogenese (50). Hierbei kommt es zu einer durch VEGF stimulierten TGF- β 1 induzierten Apoptose und einem Verlust der zelleigenen Tip-cell- und Stalk-cell-Identität (80,96). Die durch TGF- β 1 initiierten Signalwege sind zudem an der Rekrutierung und Differenzierung von glatten Muskelzellen beteiligt, die zur Stabilisierung der Gefäßwand benötigt werden (50,51).

Demnach wirkt TGF- β über VEGF-Stimulation als regulatorischer Faktor in Vaskulo- und Angiogenese ein (80,97). Studien nach *Chen et al.* aus dem Jahr 2017 erkannten TGF- β 1 als entscheidenden Faktor innerhalb eines die Angiogenese hepatozellulärer Karzinome bestimmenden Signalwegs (68).

Die Ergebnisse der Proteinexpressionsanalyse auf TGF- β 1 zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Endothelzellen und arteriovenösen Malformationszellen auf. Die HDMEC-Zellen ließen sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden eine signifikant höhere Expression von TGF- β 1 gegenüber den AVM erkennen. Dies kann in Anlehnung an die Ergebnisse von *Goumans et al.* erklärt werden. Sie führt an, dass die Rezeptorbindung von TGF- β 1 an Alk1 eine Aktivierung von Zellproliferation, -migration und -invasion induziert. Die Rezeptorstimulation wird hierbei durch eine geringe TGF- β 1-Expression herbeigeführt. Demnach sind bei einem Alk1-Defekt pathologische Werte von TGF- β 1 zu erwarten. Entsprechend der für die Aktivierung erforderlichen niedrigen TGF- β 1-Werte kann also möglicherweise eine regulativ auf die Alk1 einwirkende signifikant niedrigere TGF- β 1-Expression in AVM als in gesunden Endothelzellen erwartet werden, was durch die vorliegenden Ergebnisse Bestätigung fände. Die Ergebnisse bezüglich der Unterschiede in der TGF- β 1-Expression zwischen NHF und AVM konnten in keinen literarischen Kontext eingeordnet werden, da hierzu keine vergleichbaren Versuche vorliegen. Nach 24-stündiger Dehnung ergab sich eine in ihrer Tendenz verminderte Expression durch die gedehnten NHF-Zellen gegenüber den gedehnten AVM-Zellen. In der Kontrollgruppe zeigte sich im Gegensatz dazu eine tendenziell erhöhte TGF- β 1-Expression der NHF-Zellen gegenüber den AVM-Zellen. Anders stellte sich dies nach 48-stündiger Dehnung dar. Hier kam es zu einer signifikant höheren TGF- β 1-Expression der NHF-Zellen der Dehnungsgruppe im Vergleich zu den in der Dehnungsgruppe befindlichen AVM-Zellen. In der Kontrollgruppe dagegen zeigten die AVM-Zellen eine in ihrer Tendenz erhöhte TGF- β 1-Expression gegenüber den ungedehnten NHF-Zellen. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass länger ausgeübte zyklische Dehnung, in unserem Fall über 48h, zu einer erhöhten TGF- β 1-Expression gesunder Fibroblasten, wie es auch in *Hsu et. al.* beschrieben wird, nicht jedoch von AVM führt (109).

Die Ergebnisse innerhalb der Gruppe der AVM weisen darauf hin, dass die zyklische Dehnung keinen Einfluss auf die Expression von TGF- β 1 in AVM hat, da sich die Menge an exprimiertem TGF- β 1 zwischen gedehnten AVM und ungedehnten AVM

nicht signifikant unterschied. Nach 24h Dehnung zeigte sich eine leicht erhöhte TGF- β 1-Expression der gedehnten AVM-Zellen im Vergleich zum ungedehnten Zellpendant, das sich nach 48 Stunden Dehnung hin zu einer höheren TGF- β 1-Expression der ungedehnten gegenüber den gedehnten AVM änderte. *Baeyens et al.* stellte die Beobachtung auf, dass eine im Rahmen von HHT auftretende Mutation und der damit einhergehende Funktionsverlust des Alk1-Endoglin-Komplexes zu Teleangiectasien und AVM mit charakteristisch dilatierten, defekten Gefäßen führt. Dies geht auf die in *David et al.* verdeutlichte fehlende Inhibition der Endothelzellproliferation und die fehlende Rekrutierung muraler Zellen durch das an den Komplex bindende BMP9 zurück, was physiologischerweise für eine Stabilisierung der Blutgefäße sorgt. Dieser Prozess der Blutgefäßstabilisierung wird normalerweise durch Scherspannung verstärkt (104,106). Ob dies im gesunden oder erkrankten Zustand jedoch mit einer Steigerung oder Erniedrigung der TGF- β 1-Expression einhergeht, lässt sich aus den vorliegenden Quellen nicht ableiten. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse lassen keine bedeutende Auswirkung zyklischer Dehnung auf die TGF- β 1-Expression sowohl von arteriovenösen Malformationszellen als auch gesunden Endothelzellen erkennen, die sich in signifikanten Werten niederschlagen würde. Nur bezüglich der über 48 Stunden gedehnten NHF-Zellen zeigt sich eine erhöhte TGF- β 1-Expression der gedehnten NHF-Zellen gegenüber den NHF-Zellen der Kontrollgruppe mit deutlicher Signifikanz, was die Ergebnisse aus *Hsu et al.* bestätigt (109).

In Zusammenschau der Ergebnisse ist anzunehmen, dass zyklische Dehnung keinen Einfluss auf die zelluläre Expression von TGF- β 1 bei arteriovenösen Malformationen hat.

4.3 Klinische Anwendung der Forschungsergebnisse

Die Forschungsergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten Anstöße für das therapeutische Vorgehen in der Versorgung arteriovenöser Malformationen geben und somit auch klinisch Anwendung finden.

4.3.1 VEGF-Inhibitor Bevacizumab

In dieser Arbeit erfolgte der Nachweis einer durch zyklische Dehnung stimulierten Expressionssteigerung von Vascular endothelial growth factor in arteriovenösen Malformationszellen. Es ist also anzunehmen, dass VEGF in seiner Rolle als

Angiogenese-Induktor als wichtiger Antriebsfaktor in der Größenprogression arteriovenöser Malformationen betrachtet werden kann.

Dem kann therapeutisch durch Verwendung sogenannter VEGF-Inhibitoren entgegengewirkt werden. In dieser Hinsicht bereits seit mehreren Jahren erprobt ist der VEGF-Inhibitor Bevacizumab, dessen primärer Einsatz in der Tumorthherapie erfolgte (31,32, 33).

Abgeleitet von seinem Wirkmechanismus konnte in mehreren Studien auch ein therapeutischer Nutzen des VEGF-Inhibitors in Bezug auf arteriovenöse Malformationen festgestellt werden. So beobachtete *Rohrmeier et al.* einen positiven Effekt von submukös injiziertem Bevacizumab (Avastin) auf die therapierefraktäre Epistaxis im Rahmen eines Morbus Oslers (34). Auch in Kombination mit einer Nd:YAG-Laser-Therapie konnten verbesserte Ergebnisse in der Behandlung der HHT erzielt werden, aus denen die Annahme einer Überlegenheit der Dualtherapie verglichen mit der alleinigen Nd:YAG-Laser-Therapie resultiert (35). Im Mausmodell konstatierte *Han et al.* eine durch topische Applikation von Bevacizumab induzierte Verminderung der Entwicklung und Progression von AVM sowie von Blutungskomplikationen im Verlauf der Erkrankung (36). Ähnliches weiß *Walker et al.* in Bezug auf die intraperitoneale Gabe von Bevacizumab bei AVM des Gehirns in Mäusen zu berichten (37).

In der Therapie arteriovenöser Malformationen erfolgt die Gabe von Bevacizumab noch im Rahmen des Off-Label Uses. Für eine breitere Anwendung bedarf es weiterer Studien mit größerem Patientenkollektiv, um den Nutzen der Therapie gegen möglicherweise auftretende Nebenwirkungen abwägen zu können und neue Erkenntnisse z.B. in Bezug auf eine sinnvolle Dosierung zu gewinnen.

4.3.2 MEK-Inhibitor Trametinib

Die in dieser Forschungsarbeit beobachtete VEGF-Expressionssteigerung von AVM in Folge der Einwirkung zyklischer Dehnung kann Auswirkungen auf diverse Signalwege haben, die eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielen. Hierzu gehört der durch VEGF induzierbare RAS/MAPK/ERK-Signalweg (123). In Studien wurden bezüglich arteriovenöser Malformationen Mutationen erkannt, die genau diesen Signalweg betreffen. Dazu gehören sowohl KRAS-(Kirsten Rat Sarcoma virus-) Mutationen als auch somatische Mutationen des MAPK2K1. In mutierten

Endothelzellen kommt es zur pathologischen Aktivierung der Angiogenese und somit zur AVM-Progression (40,73).

Trametinib ist neben Cobimetinib und Binimetinib ein seit einiger Zeit in der Tumorthherapie eingesetzter MEK-Inhibitor, der den RAS/MAPK/ERK Signalweg deaktiviert (39).

Studien zum Einsatz Trametinibs in der Behandlung arteriovenöser Malformationen wie *Smits et al.* beobachteten eine durch Trametinib hervorgerufene Reduktion der ERK1/2-Aktivierung und der damit assoziierten Gefäßproliferation in MAPK2K1-mutierten AVM (40). In einer Fallstudie zu im KRAS-Gen mutierten AVM konnte durch Trametinib-Substitution eine signifikante Reduktion des arteriellen Flusses innerhalb der Läsion erzielt werden (41).

4.3.3 NRP1-Inhibitor EG00229

Neuropilin-1 (NRP1), ein Ko-Rezeptor von VEGFR-2, wirkt über Bindung an KDR und VEGF in Form eines Komplexes aktivierend auf p38MAPK und somit auf die Angioproliferation (88–90). Der sogenannten VEGF-A/NRP-1-Achse wurde hierbei durch *Zhang et al.* eine entscheidende Rolle in der Progression von Mamma-Karzinomen zugeschrieben (124). Dieser Beobachtung wurde nicht nur in der Therapie des Mamma-Karzinoms Rechnung getragen, sondern beispielsweise in der Therapie von Gliomen, Nieren-Karzinomen u.a. Unter Einsatz von EG00229, einem NRP1-Inhibitor, konnte der Tumorprogression erfolgreich entgegengewirkt und die Tumorgroße sogar vermindert werden (125–128).

Lu et al. zog eine Verbindung zwischen arteriovenösen Malformationen und auffälligen Werten von NRP1 und NRP2. In der Studie konnte eine höhere NRP1/NRP2-Expression der AVMs in Stadium III der Schobinger Klassifikation verglichen mit Stadium II detektiert werden, was für einen Zusammenhang dieser Faktoren mit der AVM-Progression spricht (91). Folglich wäre wohl eine Therapie arteriovenöser Malformationen mit NRP1-Inhibitoren in Anlehnung an die Tumorthherapie eine Option, die es zu überprüfen gilt.

4.3.4 Ausblick

Fasst man die vorliegenden Studien und deren erfolgsversprechende Ergebnisse zusammen, rückt die Frage auf eine mögliche Dualtherapie mit VEGF- und MEK-

Inhibitoren in den Fokus. Um daraus allerdings Schlüsse für zukünftige Therapie-Schemata zu ziehen, sind weitere Grundlagenstudien nötig. Dies gilt auch für eine mögliche Anwendung von NRP1-Inhibitoren in der Behandlung arteriovenöser Malformationen. Hierzu bedarf es grundlegender Studien, ob sich diese Art der Therapie ebenso positiv auf die Progression von arteriovenösen Malformationen wie auf die von Tumoren auswirkt.

4.3.5 Limitationen der Arbeit

Nicht außer Acht gelassen werden darf die durch eine geringe Anzahl an Patientenproben bestehende Limitierung dieser Arbeit.

Zudem handelt es sich bei den Vergleichsgruppen der HDMEC und NHF zwar um der in AVM enthaltenen Mischkultur ähnlichen Fibroblasten und Endothelzellen, jedoch nicht identischen Zellen. HDMEC und AVM verbindet die Expression von CD31 sowie die sogenannte „tube formation“ im Rahmen der mikrovaskulären Entwicklung. Weitere Oberflächenmarker und Entwicklungscharakteristika wurden jedoch nicht berücksichtigt. Die NHF zeigten sich als besonders geeignet aufgrund bereits vorheriger Studien mit ähnlichem Versuchsaufbau. Weitere Eigenschaften im Kontext höherer Kompatibilität wurden in diesem Fall nicht überprüft.

5 Zusammenfassung

Vaskuläre Anomalien stellen eine heterogene Gruppe an seltenen Erkrankungen dar, die mit Störungen der Gefäßentwicklung einhergehen. Die pathologische Vaskulogenese bzw. Angiogenese führt zu erkennbaren vaskulären Läsionen und daraus hervorgehenden Deformitäten. Vaskuläre Malformationen, die im Unterschied zu vaskulären Neoplasien schon zum Zeitpunkt der Geburt bestehen, werden in Fast-Flow- und Low-Flow Malformationen unterteilt. Sie besitzen das Charakteristikum eines mit dem allgemeinen Körperwachstum einhergehenden Wachstums. Dieses Wachstum kann, insbesondere bei arteriovenösen Malformationen, durch externe Stimuli wie hypoxische Verhältnisse, hormonelle Schwankungen, lokale Traumata oder operative Eingriffe getriggert werden und zu einer plötzlichen Progredienz der Erkrankung führen. Der Pathomechanismus dahinter ist weitgehend ungeklärt. Daher gilt es, eine Krankheitsprogredienz, ausgelöst durch ein getriggertes Wachstum der Malformation, zu verhindern. Hierfür besteht der Bedarf eines besseren Verständnisses des zugrundeliegenden Pathomechanismus.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern eine Korrelation zwischen mechanischen Einflussfaktoren und dem Wachstum der arteriovenösen Malformation besteht bzw. ob der auf die Malformation ausgeübte mechanische Stress als Wachstumsreiz wirkt. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen operativer Resektionen in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Regensburg gewonnene arteriovenöse Malformationszellen, einer Mischkultur aus Endothelzellen und Fibroblasten, einem Pendant gesunder Endothelzellen (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells, HDMEC) und Fibroblasten (Normal Human Fibroblasts, NHF) gegenübergestellt. Das basale Wachstumsverhalten der Zellen wurde mithilfe eines Proliferationsversuchs in einer 6-Well-Platte sowie eines Resazurin-Assays ermittelt. Die AVM zeigten eine der Mischkultur entsprechende moderate Wachstumsrate zwischen der höheren Rate der Fibroblasten und der deutlich niedrigeren Rate der Endothelzellen. Anschließend wurden die Zellen über 24h bzw. 48h mechanischer Belastung in Form zyklischer Dehnung in einer Dehnungskammer ausgesetzt. In der anschließenden Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer zeigte sich eine deutlich erhöhte Zellviabilität der gedehnten AVM gegenüber der eigenen Kontrollgruppe und gegenüber den ebenfalls gedehnten HDMEC und NHF. Dies lässt darauf schließen, dass der Einfluss zyklischer Dehnung

auf das Wachstum arteriovenöser Malformationen als signifikant größer anzusehen ist als der Einfluss auf das Wachstum gesunder Endothelzellen und Fibroblasten. Je länger es zu einer Einwirkung durch den mechanischen Stimulus kommt, desto höher die Steigerung der Proliferationsrate arteriovenöser Malformation im Unterschied zu gegenübergestellten Endothelzellen und Fibroblasten gesunder Gefäße. Auch die Fotodokumentation des Dehnungsprozesses erlaubt dem Beobachter einen Einfluss der Dehnung in Form einer Änderung der Zellausrichtung zu erkennen.

Die darauffolgende Proteinexpressionsanalyse auf die in die Vaskulo- und Angiogenese integrierten Faktoren IL-6, VEGF-A und TGF- β 1, zeigte eine deutliche Korrelation zwischen einem Einfluss durch zyklische Dehnung und einer gesteigerten VEGF-A-Expression der AVM-Zellen, da die gedehnten AVM-Zellen sowohl gegenüber den ungedehnten Zellen der eigenen Zellentität als auch gegenüber den HDMEC-Zellen und NHF-Zellen der Dehnungsgruppe signifikant mehr VEGF-A exprimierten. Auch die ungedehnten AVM-Zellen exprimierten mehr VEGF-A als die ungedehnten HDMEC- und NHF-Zellen, was Studien bestätigt, die von einer im Vergleich zu gesunden Endothelzellen hohen VEGF-Expression zerebraler AVM-Endothelzellen berichten. Hinsichtlich IL-6 und TGF- β 1 ließ sich kein direkter Zusammenhang zwischen zyklischer Dehnung und einem gesteigerten Expressionsprofil der AVM-Zellen erkennen. Daher wurde die anschließende quantitative Real-time PCR zur Verifizierung der in der Proteinexpressionsanalyse getätigten Beobachtungen auf RNA-Ebene ausschließlich mit Detektion von VEGF-A durchgeführt. Die Ergebnisse der qPCR bestätigen das bereits auf Proteinebene erhaltene Bild. Innerhalb der Gruppe der AVM-Zellen zeigte sich eine signifikant höhere Expression von VEGF auf Seiten der gedehnten AVM-Zellen verglichen mit den ungedehnten AVM-Zellen und den gedehnten HDMEC- und NHF-Zellen. In seiner Funktion als Angiogenese-Induktor induziert VEGF das Wachstum arteriovenöser Malformationen, was rückschließend für eine Stimulation des AVM-Wachstums durch äußere Einwirkung zyklischer Dehnung spricht.

Unter Zusammenfassung aller Ergebnisse spricht dies für einen stimulierenden Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf die VEGF-Expression arteriovenöser Malformationszellen und impliziert somit einen stimulierenden Einfluss zyklischer mechanischer Dehnung auf das Wachstum arteriovenöser Malformationen. Die Inhibition von VEGF und VEGF initiierten Signalwegen durch Bevacizumab,

Trametinib oder EG00229 kann somit eine erfolgsversprechende Ergänzung zu momentanen therapeutischen Schemata darstellen. Dies gilt es in weiteren Grundlagenstudien zu erörtern.

6 Literaturverzeichnis

1. About ISSVA | International Society for the Study of Vascular Anomalies [Internet] [cited 2019 Mar 30]. Available from: <http://www.issva.org/about-issva>
2. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671–4. doi:10.1038/386671a0
3. Holcomb GW III, Murphy PJ, editors. *Ashcraft's Pediatric Surgery*. 5th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 2010.
4. International Society for the Study of Vascular Anomalies. ISSVA classification for vascular anomalies; 2018. Available from: www.issva.org/classification
5. Colletti G, Valassina D, Bertossi D, Melchiorre F, Vercellio G, Brusati R. Contemporary management of vascular malformations. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(3):510–28. doi:10.1016/j.joms.2013.08.008 Cited in: PubMed; PMID 24139296.
6. Cohen MM. Vascular update: morphogenesis, tumors, malformations, and molecular dimensions. *Am J Med Genet A*. 2006;140(19):2013–38. doi:10.1002/ajmg.a.31333 Cited in: PubMed; PMID 16958055.
7. Mallucci P. Vascular anomalies must be properly classified. *BMJ*. 1999;319(7214):919. doi:10.1136/bmj.319.7214.919 Cited in: PubMed; PMID 10506062.
8. Cox JA, Bartlett E, Lee EI. Vascular malformations: a review. *Semin Plast Surg*. 2014;28(2):58–63. doi:10.1055/s-0034-1376263 Cited in: PubMed; PMID 25045330.
9. Bataille A-C, Boon L-M. Aspects cliniques des malformations capillaires [Clinical aspects of capillary malformations]. *Ann Chir Plast Esthet*. 2006;51(4-5):347–56. fre. doi:10.1016/j.anplas.2006.07.007 Cited in: PubMed; PMID 17007980.
10. Eerola I, Boon LM, Mulliken JB, Burrows PE, Domp Martin A, Watanabe S, Vanwijck R, Vikkula M. Capillary Malformation–Arteriovenous Malformation, a New Clinical and Genetic Disorder Caused by RASA1 Mutations. *Am J Hum Genet*. 2003;73(6):1240–9. Cited in: PubMed; PMID 14639529.

11. Barsky SH, Rosen S, Geer DE, Noe JM. The Nature and Evolution of Port Wine Stains: A Computer-assisted Study. *Journal of Investigative Dermatology*. 1980;74(3):154–7. doi:10.1111/1523-1747.ep12535052
12. Murthy J. Vascular anomalies. *Indian Journal of Plastic Surgery* [Internet]. 2005;;(38):56–62. Available from: <http://www.ijps.org/text.asp?2005/38/1/56/16500>
13. Müller-Wille R, Wildgruber M, Sadick M, Wohlgemuth WA. Gefäßanomalien (Teil II): Interventionelle Therapie von peripheren Gefäßmalformationen [Vascular Anomalies (Part II): Interventional Therapy of Peripheral Vascular Malformations]. *Rofo*. 2018. doi:10.1055/s-0044-101266 Cited in: PubMed; PMID 29415296.
14. Lungren MP, Patel MN. Endovascular Management of Head and Neck Vascular Malformations. *Curr Otorhinolaryngol Rep*. 2014;2(4):273–84. doi:10.1007/s40136-014-0053-x
15. Miller DD, Gupta A. Histopathology of vascular anomalies: update based on the revised 2014 ISSVA classification. *Semin Cutan Med Surg*. 2016;35(3):137–46. doi:10.12788/j.sder.2016.053 Cited in: PubMed; PMID 27607322.
16. Manzocchi Besson S, Jastrow Meyer N, Bounameaux H, La Scala GC, Calza A-M, Yilmaz H, Righini M, Robert-Ebadi H. Multiple arteriovenous malformations caused by RASA1 gene mutation presenting during pregnancy - a case report and review of the literature. *VASA*. 2019;48(3):276–80. doi:10.1024/0301-1526/a000770 Cited in: PubMed; PMID 30526434.
17. PD Dr. med. Wibke Uller. Arteriovenöse Malformation, Arteriovenöse Fistel | compgefa.de [Internet] [cited 2019 May 8]. Available from: <https://www.compgefa.de/arteriovenoese-malformation-arteriovenoese-fistel>
18. Zakharkina MV, Chechetkin AO, Krotenkova MV, Konovalov RN. Ultrasound diagnostics of a spontaneous arteriovenous fistula of the head and neck. *J Ultrason*. 2017;17(70):217–21. doi:10.15557/JoU.2017.0032 Cited in: PubMed; PMID 29075528.
19. Jayroe H, Foley K. Arteriovenous Fistula [Internet]. *StatPearls* [Internet]. 2021 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559213/>

20. Jayroe H, Foley K. StatPearls: Arteriovenous Fistula. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL); 2021.
21. Majewska NK, Stajgis P, Wykrętowicz M, Stajgis M, Oszkinis G, Katulska K. Peripheral vascular malformations - modern imaging. *Pol J Radiol.* 2018;83:e253-e259. doi:10.5114/pjr.2018.75724 Cited in: PubMed; PMID 30627244.
22. Lowe LH, Marchant TC, Rivard DC, Scherbel AJ. Vascular malformations: classification and terminology the radiologist needs to know. *Semin Roentgenol.* 2012;47(2):106–17. doi:10.1053/j.ro.2011.11.002 Cited in: PubMed; PMID 22370189.
23. Dubois J, Garel L. Imaging and therapeutic approach of hemangiomas and vascular malformations in the pediatric age group;879–80.
24. Hyodoh H, Hori M, Akiba H, Tamakawa M, Hyodoh K, Hareyama M. Peripheral vascular malformations: imaging, treatment approaches, and therapeutic issues. *Radiographics.* 2005;25 Suppl 1S159-71. doi:10.1148/rg.25si055509 Cited in: PubMed; PMID 16227489.
25. Bello HR, Moe DC, Simpson PM, Yan K, Burrows PE. Step-table venography in young patients with vascular malformations. *Journal of Vascular and Interventional Radiology.* 2015;26(2):S175-S176. doi:10.1016/j.jvir.2014.12.471
26. Müller-Wille R. Endoluminale Verfahren | compgefa.de [Internet] [cited 2019 May 17]. Available from: <https://www.compgefa.de/endoluminale-verfahren>
27. Berlien HP. Laser Therapy of Vascular Malformations. In: Mattassi R, Loose DA, Vaghi M, editors. *Hemangiomas and Vascular Malformations, An Atlas of Diagnosis and Treatment*: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 181–94.
28. Buckmiller LM, Richter GT, Suen JY. Diagnosis and management of hemangiomas and vascular malformations of the head and neck. *Oral Diseases.* 2010;(16):405–18.
29. Enjolras O, Ciabrini D, Mazoyer E, Laurian C, Herbreteau D. Extensive pure venous malformations in the upper or lower limb: A review of 27 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 1997;36(2):219–25.
30. Hein KD, Mulliken JB, Kozakewich HPW, Upton J, Burrows PE. Venous malformations of skeletal muscle. *Plastic and Reconstructive Surgery.*

- 2002;110(7):1625–35. doi:10.1097/01.PRS.0000033021.60657.74 Cited in: PubMed; PMID 12447041.
31. Muller YA, Chen Y, Christinger HW, Li B, Cunningham BC, Lowman HB, Vos AM de. VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface. *Structure* (London, England: 1993). 1998;6(9):1153–67. doi:10.1016/s0969-2126(98)00116-6 Cited in: PubMed; PMID 9753694.
 32. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* [Internet]. 1997;57(20):4593–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9377574/> Cited in: PubMed; PMID 9377574.
 33. Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, Miles D, Coleman RL, Deurloo R, Chinot OL. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat Rev*. 2020;86:102017. doi:10.1016/j.ctrv.2020.102017 Cited in: PubMed; PMID 32335505.
 34. Rohrmeier C, Kühnel TS. Bevacizumab bei therapierefraktärer Epistaxis: Fallbericht einer niedrigdosierten, submukös injizierten Antikörpertherapie bei M. Osler [Bevacizumab in therapy-refractory epistaxis: case report of low-dose antibody therapy for hereditary hemorrhagic telangiectasia]. *HNO*. 2012;60(11):1003–6. ger. doi:10.1007/s00106-011-2458-x Cited in: PubMed; PMID 22706563.
 35. Rohrmeier C, Sachs HG, Kuehnel TS. A retrospective analysis of low dose, intranasal injected bevacizumab (Avastin) in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012;269(2):531–6. doi:10.1007/s00405-011-1721-9 Cited in: PubMed; PMID 21805356.
 36. Han C, Choe S-W, Kim YH, Acharya AP, Keselowsky BG, Sorg BS, Lee Y-J, Oh SP. VEGF neutralization can prevent and normalize arteriovenous malformations in an animal model for hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. *Angiogenesis*. 2014;17(4):823–30. doi:10.1007/s10456-014-9436-3 Cited in: PubMed; PMID 24957885.

37. Walker EJ, Su H, Shen F, Degos V, Amend G, Jun K, Young WL. Bevacizumab attenuates VEGF-induced angiogenesis and vascular malformations in the adult mouse brain. *Stroke*. 2012;43(7):1925–30. doi:10.1161/STROKEAHA.111.647982 Cited in: PubMed; PMID 22569934.
38. Amanzada A, Töppler G-J, Cameron S, Schwörer H, Ramadori G. A case report of a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia treated successively with thalidomide and bevacizumab. *Case Rep Oncol*. 2010;3(3):463–70. doi:10.1159/000323152 Cited in: PubMed; PMID 21611144.
39. Raper DMS, Winkler EA, Rutledge WC, Cooke DL, Abla AA. An Update on Medications for Brain Arteriovenous Malformations. *Neurosurgery*. 2020;87(5):871–8. doi:10.1093/neuros/nyaa192 Cited in: PubMed; PMID 32433738.
40. Smits PJ, Konczyk DJ, Sudduth CL, Goss JA, Greene AK. Endothelial MAP2K1 mutations in arteriovenous malformation activate the RAS/MAPK pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2020;529(2):450–4. doi:10.1016/j.bbrc.2020.06.022 Cited in: PubMed; PMID 32703450.
41. Edwards EA, Phelps AS, Cooke D, Frieden IJ, Zapala MA, Fullerton HJ, Shimano KA. Monitoring Arteriovenous Malformation Response to Genotype-Targeted Therapy. *Pediatrics*. 2020;146(3). doi:10.1542/peds.2019-3206 Cited in: PubMed; PMID 32859736.
42. Chandel V, Jangra B, Khurana N, Garg A, Devashish. Venous malformations management by Er,Cr:YSGG laser: An Alternative approach. *Laser Ther*. 2017;26(4):305–10. doi:10.5978/islsm.17-OR-20 Cited in: PubMed; PMID 29434431.
43. Cabrera JC, Loose DA. Sclerotherapy in Vascular Malformations. In: Mattassi R, Loose DA, Vaghi M, editors. *Hemangiomas and Vascular Malformations, An Atlas of Diagnosis and Treatment*: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 171–80.
44. Noshier JL, Murillo PG, Liszewski M, Gendel V, Gribbin CE. Vascular anomalies: A pictorial review of nomenclature, diagnosis and treatment. *World J Radiol*. 2014;6(9):677–92. doi:10.4329/wjr.v6.i9.677 Cited in: PubMed; PMID 25276311.

45. Weber JH. Interventional Therapy in Arteriovenous Congenital Malformations. In: Mattassi R, Loose DA, Vaghi M, editors. Hemangiomas and Vascular Malformations, An Atlas of Diagnosis and Treatment: Springer Berlin Heidelberg; 2009. 153-162.
46. Mattassi R. Multidisciplinary Surgical Treatment of Vascular Malformations. In: Mattassi R, Loose DA, Vaghi M, editors. Hemangiomas and Vascular Malformations, An Atlas of Diagnosis and Treatment: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 205–8.
47. Dasgupta R. Surgical Management of Vascular anomalies. *Curr Otorhinolaryngol Rep.* 2014;2(4):285–91. doi:10.1007/s40136-014-0066-5
48. Parwal C, Choudhary L, Pandey A, Kumar V, Singh P, Ragi J. Harmonic Devices: The Workhorse for Surgical Resection of Vascular Malformations. *J Cutan Aesthet Surg.* 2018;11(3):157–60. doi:10.4103/JCAS.JCAS_52_17 Cited in: PubMed; PMID 30533994.
49. Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol.* 2011;55(4-5):353–63. doi:10.1387/ijdb.103213sp Cited in: PubMed; PMID 21732275.
50. Dijke P ten, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):857–69. doi:10.1038/nrm2262 Cited in: PubMed; PMID 17895899.
51. Carvalho RLC, Jonker L, Goumans M-J, Larsson J, Bouwman P, Karlsson S, Dijke P ten, Arthur HM, Mummery CL. Defective paracrine signalling by TGFbeta in yolk sac vasculature of endoglin mutant mice: a paradigm for hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Development.* 2004;131(24):6237–47. doi:10.1242/dev.01529 Cited in: PubMed; PMID 15548578.
52. Pollman MJ, Naumovski L, Gibbons GH. Endothelial cell apoptosis in capillary network remodeling. *J. Cell. Physiol.* 1999;178(3):359–70. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199903)178:3<359:AID-JCP10>3.0.CO;2-O
53. Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(1):a006569. doi:10.1101/cshperspect.a006569 Cited in: PubMed; PMID 23085847.

54. Kuwano M, Fukushi J, Okamoto M, Nishie A, Goto H, Ishibashi T, Ono M. Angiogenesis factors. Intern Med. 2001;40(7):565–72. doi:10.2169/internalmedicine.40.565 Cited in: PubMed; PMID 11506294.
55. Hofer E, Schweighofer B. Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. Thromb Haemost. 2007;97(3):355–63. Cited in: PubMed; PMID 17334501.
56. Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. J Intern Med. 2006;259(4):381–92. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01624.x Cited in: PubMed; PMID 16594906.
57. Benedito R, Roca C, Sørensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M, Adams RH. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. Cell. 2009;137(6):1124–35. doi:10.1016/j.cell.2009.03.025 Cited in: PubMed; PMID 19524514.
58. Zhou J, Lee P-L, Lee C-I, Wei S-Y, Lim SH, Lin T-E, Chien S, Chiu J-J. BMP receptor-integrin interaction mediates responses of vascular endothelial Smad1/5 and proliferation to disturbed flow. J Thromb Haemost. 2013;11(4):741–55. doi:10.1111/jth.12159 Cited in: PubMed; PMID 23387849.
59. Courchaine K, Rugonyi S. Quantifying blood flow dynamics during cardiac development: demystifying computational methods. Philos Trans R Soc Lond , B, Biol Sci. 2018;373(1759). doi:10.1098/rstb.2017.0330 Cited in: PubMed; PMID 30249779.
60. Fang J, Hirschi K. Molecular regulation of arteriovenous endothelial cell specification. F1000Res. 2019;8. doi:10.12688/f1000research.16701.1 Cited in: PubMed; PMID 31448079.
61. Bai J, Wang Y-J, Liu L, Zhao Y-L. Ephrin B2 and EphB4 selectively mark arterial and venous vessels in cerebral arteriovenous malformation. J Int Med Res. 2014;42(2):405–15. doi:10.1177/0300060513478091 Cited in: PubMed; PMID 24517927.
62. Hurley NE, Schildmeyer LA, Bosworth KA, Sakurai Y, Eskin SG, Hurley LH, McIntire LV. Modulating the Functional Contributions of c-Myc to the Human

- Endothelial Cell Cyclic Strain Response. *J Vasc Res.* 2010;47(1):80–90. doi:10.1159/000235928 Cited in: PubMed; PMID 19729955.
63. Zheng W, Christensen LP, Tomanek RJ. Differential effects of cyclic and static stretch on coronary microvascular endothelial cell receptors and vasculogenic/angiogenic responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(2):H794-800. doi:10.1152/ajpheart.00343.2008 Cited in: PubMed; PMID 18586890.
 64. Zhou J, Lee P-L, Tsai C-S, Lee C-I, Yang T-L, Chuang H-S, Lin W-W, Lin T-E, Lim SH, Wei S-Y, Chen Y-L, Chien S, Chiu J-J. Force-specific activation of Smad1/5 regulates vascular endothelial cell cycle progression in response to disturbed flow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(20):7770–5. doi:10.1073/pnas.1205476109 Cited in: PubMed; PMID 22550179.
 65. Sho E, Komatsu M, Sho M, Nanjo H, Singh TM, Xu C, Masuda H, Zarins CK. High flow drives vascular endothelial cell proliferation during flow-induced arterial remodeling associated with the expression of vascular endothelial growth factor. *Experimental and Molecular Pathology.* 2003;75(1):1–11. doi:10.1016/S0014-4800(03)00032-7
 66. Vion A-C, Alt S, Klaus-Bergmann A, Szymborska A, Zheng T, Perovic T, Hammoutene A, Oliveira MB, Bartels-Klein E, Hollfinger I, Rautou P-E, Bernabeu MO, Gerhardt H. Primary cilia sensitize endothelial cells to BMP and prevent excessive vascular regression. *J Cell Biol.* 2018;217(5):1651–65. doi:10.1083/jcb.201706151 Cited in: PubMed; PMID 29500191.
 67. Hunter S, Nault B, Ugwuagbo KC, Maiti S, Majumder M. Mir526b and Mir655 Promote Tumour Associated Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11(7):1–20. doi:10.3390/cancers11070938 Cited in: PubMed; PMID 31277414.
 68. Chen G, Nakamura I, Dhanasekaran R, Iguchi E, Tolosa EJ, Romecin PA, Vera RE, Almada LL, Miamen AG, Chaiteerakij R, Zhou M, Asiedu MK, Moser CD, Han S, Hu C, Banini BA, Oseini AM, Chen Y, Fang Y, Yang D, Shaleh HM, Wang S, Wu D, Song T, Lee J-S, Thorgeirsson SS, Chevet E, Shah VH, Fernandez-Zapico ME, Roberts LR. Transcriptional Induction of Periostin by a Sulfatase 2-TGFβ1-SMAD Signaling Axis Mediates Tumor Angiogenesis in Hepatocellular

- Carcinoma. *Cancer Res.* 2017;77(3):632–45. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2556 Cited in: PubMed; PMID 27872089.
69. Zhang T, Liu L, Lai W, Zeng Y, Xu H, Lan Q, Su P, Chu Z. Interaction with tumor-associated macrophages promotes PRL-3-induced invasion of colorectal cancer cells via MAPK pathway-induced EMT and NF- κ B signaling-induced angiogenesis. *Oncol Rep.* 2019;41(5):2790–802. doi:10.3892/or.2019.7049 Cited in: PubMed; PMID 30864736.
70. Nguyen H-L, Boon LM, Vikkula M. Vascular Anomalies Caused by Abnormal Signaling within Endothelial Cells: Targets for Novel Therapies. *Semin Intervent Radiol.* 2017;34(3):233–8. doi:10.1055/s-0037-1604296 Cited in: PubMed; PMID 28955112.
71. Wautier M-P, Boval B, Chappey O, Enjolras O, Wernert N, Merland J-J, Wautier J-L. Cultured Endothelial Cells From Human Arteriovenous Malformations Have Defective Growth Regulation. *Blood.* 1999;94(6):2020–8. doi:10.1182/blood.V94.6.2020.418a23_2020_2028
72. Fereydooni A, Dardik A, Nassiri N. Molecular changes associated with vascular malformations. *J Vasc Surg.* 2019. doi:10.1016/j.jvs.2018.12.033 Cited in: PubMed; PMID 30922748.
73. Nikolaev SI, Vetiska S, Bonilla X, Boudreau E, Jauhiainen S, Rezai Jahromi B, Khyzha N, DiStefano PV, Suutarinen S, Kiehl T-R, Mendes Pereira V, Herman AM, Krings T, Andrade-Barazarte H, Tung T, Valiante T, Zadeh G, Tymianski M, Rauramaa T, Ylä-Herttua S, Wythe JD, Antonarakis SE, Frösen J, Fish JE, Radovanovic I. Somatic Activating KRAS Mutations in Arteriovenous Malformations of the Brain. *N Engl J Med.* 2018;378(3):250–61. doi:10.1056/NEJMoa1709449 Cited in: PubMed; PMID 29298116.
74. Guerrero PA, McCarty JH. TGF- β Activation and Signaling in Angiogenesis. In: Simionescu D, Simionescu A, editors. *Physiologic and pathologic angiogenesis, Signaling mechanisms and targeted therapy.* Rijeka, Croatia: InTech; 2017. p. 1–23.
75. Napione L, Alvaro M, Bussolino F. VEGF-Mediated Signal Transduction in Tumor Angiogenesis. In: Simionescu D, Simionescu A, editors. *Physiologic and*

- pathologic angiogenesis, Signaling mechanisms and targeted therapy. Rijeka, Croatia: InTech; 2017.
76. Laakkonen JP, Lähteenvuo J, Jauhiainen S, Heikura T, Ylä-Herttuala S. Beyond endothelial cells: Vascular endothelial growth factors in heart, vascular anomalies and placenta. *Vascul Pharmacol.* 2019;11291–101. doi:10.1016/j.vph.2018.10.005 Cited in: PubMed; PMID 30342234.
 77. Tieqiang Zhao, Wenyuan Zhao, Weixin Meng, Chang Liu, Yuanjian Chen, Syamal K. Bhattacharya, Yao Sun. Vascular endothelial growth factor-D mediates fibrogenic response in myofibroblasts. *Mol Cell Biochem.* 2016;413(1):127–35. En;en. doi:10.1007/s11010-015-2646-1
 78. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development.* 1998;125(4):725–32. Cited in: PubMed; PMID 9435292.
 79. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005;23(5):1011–27. doi:10.1200/JCO.2005.06.081 Cited in: PubMed; PMID 15585754.
 80. Ferrari G, Cook BD, Terushkin V, Pintucci G, Mignatti P. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *J Cell Physiol.* 2009;219(2):449–58. doi:10.1002/jcp.21706 Cited in: PubMed; PMID 19180561.
 81. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 2004;25(4):581–611. doi:10.1210/er.2003-0027 Cited in: PubMed; PMID 15294883.
 82. El-Raggal NM, El-Farrash RA, Saad AA, Attia EAS, Saafan HA, Shaaban IS. Circulating Levels of Vascular Endothelial Growth Factor and Basic Fibroblastic Growth Factor in Infantile Hemangioma Versus Vascular Malformations. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018;24(4):663–8. doi:10.1177/1076029617710333 Cited in: PubMed; PMID 28595487.
 83. DiStefano PV, Glading AJ. VEGF signalling enhances lesion burden in KRIT1 deficient mice. *J Cell Mol Med.* 2020;24(1):632–9. doi:10.1111/jcmm.14773 Cited in: PubMed; PMID 31746130.

84. Reference GH. KRIT1 gene [Internet]. 2020 [updated 2020 Apr 15; cited 2020 Apr 20]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRIT1>
85. Richardson BT, Dibble CF, Borikova AL, Johnson GL. Cerebral cavernous malformation is a vascular disease associated with activated RhoA signaling. *Biol Chem*. 2013;394(1):35–42. doi:10.1515/hsz-2012-0243 Cited in: PubMed; PMID 23096573.
86. Barlow HR, Cleaver O. Building Blood Vessels-One Rho GTPase at a Time. *Cells*. 2019;8(6). doi:10.3390/cells8060545 Cited in: PubMed; PMID 31174284.
87. Jabbour MN, Elder JB, Samuelson CG, Khashabi S, Hofman FM, Giannotta SL, Liu CY. Aberrant angiogenic characteristics of human brain arteriovenous malformation endothelial cells. *Neurosurgery*. 2009;64(1):139-46; discussion 146-8. doi:10.1227/01.NEU.0000334417.56742.24 Cited in: PubMed; PMID 19145162.
88. Kawamura H, Li X, Goishi K, van Meeteren LA, Jakobsson L, Cébe-Suarez S, Shimizu A, Edholm D, Ballmer-Hofer K, Kjellén L, Klagsbrun M, Claesson-Welsh L. Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood*. 2008;112(9):3638–49. doi:10.1182/blood-2007-12-125856 Cited in: PubMed; PMID 18664627.
89. Soker S, Miao H-Q, Nomi M, Takashima S, Klagsbrun M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem*. 2002;85(2):357–68. doi:10.1002/jcb.10140 Cited in: PubMed; PMID 11948691.
90. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. *Cell*. 1998;92(6):735–45. doi:10.1016/S0092-8674(00)81402-6
91. Lu L, Bischoff J, Mulliken JB, Bielenberg DR, Fishman SJ, Greene AK. Increased endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in higher-staged arteriovenous malformations. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2011;128(4):260e-269e. doi:10.1097/PRS.0b013e3182268afd Cited in: PubMed; PMID 21921738.

92. Tual-Chalot S, Garcia-Collado M, Redgrave RE, Singh E, Davison B, Park C, Lin H, Luli S, Jin Y, Wang Y, Lawrie A, Jakobsson L, Arthur HM. Loss of Endothelial Endoglin Promotes High-Output Heart Failure Through Peripheral Arteriovenous Shunting Driven by VEGF Signaling. *Circ Res.* 2020;126(2):243–57. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315974 Cited in: PubMed; PMID 31805812.
93. Jin Y, Muhl L, Burmakin M, Wang Y, Duchez A-C, Betsholtz C, Arthur HM, Jakobsson L. Endoglin prevents vascular malformation by regulating flow-induced cell migration and specification through VEGFR2 signalling. *Nat Cell Biol.* 2017;19(6):639–52. doi:10.1038/ncb3534 Cited in: PubMed; PMID 28530660.
94. Choi E-J, Walker EJ, Shen F, Oh SP, Arthur HM, Young WL, Su H. Minimal homozygous endothelial deletion of Eng with VEGF stimulation is sufficient to cause cerebrovascular dysplasia in the adult mouse. *Cerebrovasc Dis.* 2012;33(6):540–7. doi:10.1159/000337762 Cited in: PubMed; PMID 22571958.
95. Pellettieri L, Svendsen P, Wikholm G, Carlsson C-A. Hidden compartments in AVMs — A new concept. *SRAD.* 1997;38(1):2–7. doi:10.3109/02841859709171233
96. Jarad M, Kuczynski EA, Morrison J, Vilorio-Petit AM, Coomber BL. Release of endothelial cell associated VEGFR2 during TGF- β modulated angiogenesis in vitro. *BMC Cell Biol.* 2017;18(1):1–10. doi:10.1186/s12860-017-0127-y Cited in: PubMed; PMID 28114883.
97. Massagué J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(10):616–30. doi:10.1038/nrm3434 Cited in: PubMed; PMID 22992590.
98. Benzinou M, Clermont FF, Letteboer TGW, Kim J-H, Espejel S, Harradine KA, Arbelaez J, Luu MT, Roy R, Quigley D, Higgins MN, Zaid M, Aouizerat BE, van Amstel JKP, Giraud S, Dupuis-Girod S, Lesca G, Plauchu H, Hughes CCW, Westermann CJJ, Akhurst RJ. Mouse and human strategies identify PTPN14 as a modifier of angiogenesis and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nat Commun.* 2012;3616. doi:10.1038/ncomms1633 Cited in: PubMed; PMID 22233626.
99. Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and differentiation.

100. Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, Dijke P ten. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 2002;21(7):1743–53. doi:10.1093/emboj/21.7.1743 Cited in: PubMed; PMID 11927558.
101. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, Dijke P ten, Kim S, Li E. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(6):2626–31. doi:10.1073/pnas.97.6.2626 Cited in: PubMed; PMID 10716993.
102. Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Pérez-Molino A, Hebbel RP, Nguyen J, Bernabéu C, Botella L-M. Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res.* 2005;68(2):235–48. doi:10.1016/j.cardiores.2005.06.009 Cited in: PubMed; PMID 15993872.
103. Kühnel T, Wirsching K, Wohlgemuth W, Chavan A, Evert K, Vielsmeier V. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Otolaryngol Clin North Am.* 2018;51(1):237–54. doi:10.1016/j.otc.2017.09.017 Cited in: PubMed; PMID 29217066.
104. David L, Mallet C, Keramidas M, Lamandé N, Gasc J-M, Dupuis-Girod S, Plauchu H, Feige J-J, Bailly S. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res.* 2008;102(8):914–22. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.165530 Cited in: PubMed; PMID 18309101.
105. Ning J, Zhao Y, Ye Y, Yu J. Opposing roles and potential antagonistic mechanism between TGF- β and BMP pathways: Implications for cancer progression. *EBioMedicine.* 2019;41702–10. doi:10.1016/j.ebiom.2019.02.033 Cited in: PubMed; PMID 30808576.
106. Baeyens N, Larrivé B, Ola R, Hayward-Piatkowskyi B, Dubrac A, Huang B, Ross TD, Coon BG, Min E, Tsarfati M, Tong H, Eichmann A, Schwartz MA. Defective fluid shear stress mechanotransduction mediates hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Cell Biol.* 2016;214(7):807–16. doi:10.1083/jcb.201603106 Cited in: PubMed; PMID 27646277.

107. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek H-H, Miller R, Adamkiewicz J. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF- β -receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *Int. J. Cancer.* 1999;81(4):568–72. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990517)81:4<568:AID-IJC11>3.0.CO;2-X
108. Park S, Dimaio TA, Liu W, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N. Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF- β signaling pathways. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 6):1392–405. doi:10.1242/jcs.117275 Cited in: PubMed; PMID 23418351.
109. Hsu W-H, Peng K-T, Lai L-J, Hung C-H, Chang P-J. Cellular senescence occurring in the rabbit medial collateral ligament during healing. *J Orthop Res.* 2013;31(1):81–90. doi:10.1002/jor.22194 Cited in: PubMed; PMID 22952049.
110. Nilsson MB, Langley RR, Fidler IJ. Interleukin-6, Secreted by Human Ovarian Carcinoma Cells, Is a Potent Proangiogenic Cytokine. *Cancer Res.* 2005;65(23):10794–800. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0623 Cited in: PubMed; PMID 16322225.
111. Gopinathan G, Milagre C, Pearce OMT, Reynolds LE, Hovidala-Dilke K, Leinster DA, Zhong H, Hollingsworth RE, Thompson R, Whiteford JR, Balkwill F. Interleukin-6 Stimulates Defective Angiogenesis. *Cancer Res.* 2015;75(15):3098–107. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1227 Cited in: PubMed; PMID 26081809.
112. Theiler M, Wälchli R, Weibel L. Vascular anomalies - a practical approach. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2013;11(5):397–405. doi:10.1111/ddg.12046 Cited in: PubMed; PMID 23464752.
113. Venkataramani V, Küffer S, Cheung K, Jiang X, Trümper L, Wulf GG, Ströbel P. CD31 Expression Determines Redox Status and Chemoresistance in Human Angiosarcomas. *Clin Cancer Res.* 2018;24(2):460–73. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1778 Cited in: PubMed; PMID 29084920.
114. Koh W, Stratman AN, Sacharidou A, Davis GE. In vitro three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis: *Methods Enzymol* ;. 2008;83–101.

115. Förstl I. Zellbiologische Charakterisierung kutaner Keloide - Eine In-Vitro-Studie. Regensburg: Universität Regensburg; 2014. 108 p.
116. Hao Q, Chen X-L, Ma L, Wang T-T, Hu Y, Zhao Y-L. Procedure for the Isolation of Endothelial Cells from Human Cerebral Arteriovenous Malformation (cAVM) Tissues. *Front Cell Neurosci.* 2018;121–30. doi:10.3389/fncel.2018.00030 Cited in: PubMed; PMID 29467624.
117. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 2000;(267):5421–6.
118. Medford ARL, Douglas SK, Godinho SIH, Uppington KM, Armstrong L, Gillespie KM, van Zyl B, Tetley TD, Ibrahim NBN, Millar AB. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) isoform expression and activity in human and murine lung injury. *Respir Res.* 2009;101–27. doi:10.1186/1465-9921-10-27 Cited in: PubMed; PMID 19358726.
119. Real-Time PCR: Ct-Wert verstehen | Thermo Fisher Scientific - DE [Internet] [cited 2020 Feb 18]. Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>
120. Geyer F. Untersuchungen zum Einfluss von externer Bestrahlung auf zelluläre Vitalitätsparameter und die Expression von Hitzeschockproteinen in dermalen Fibroblasten, mikrovaskulären Endothelzellen und verschiedenen Plattenepithelkarzinomzellen. Regensburg: Universität Regensburg; 2017. 95 p.
121. Zielinski A. Untersuchung der Antwort humaner Endothelzellen auf Substratdeformation. 151 p.
122. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* 2011;451. doi:10.3389/fnmol.2011.00051 Cited in: PubMed; PMID 22144946.
123. Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem.* 2001;276(52):49289–98. doi:10.1074/jbc.M108069200 Cited in: PubMed; PMID 11682481.

124. Zhang L, Wang H, Li C, Zhao Y, Wu L, Du X, Han Z. VEGF-A/Neuropilin 1 Pathway Confers Cancer Stemness via Activating Wnt/ β -Catenin Axis in Breast Cancer Cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2017;44(3):1251–62. doi:10.1159/000485455 Cited in: PubMed; PMID 29179185.
125. Pal K, Madamsetty VS, Dutta SK, Wang E, Angom RS, Mukhopadhyay D. Synchronous inhibition of mTOR and VEGF/NRP1 axis impedes tumor growth and metastasis in renal cancer. *NPJ Precis Oncol*. 2019;331. doi:10.1038/s41698-019-0105-2 Cited in: PubMed; PMID 31840081.
126. Pan Q, Chanthery Y, Liang W-C, Stawicki S, Mak J, Rathore N, Tong RK, Kowalski J, Yee SF, Pacheco G, Ross S, Cheng Z, Le Couter J, Plowman G, Peale F, Koch AW, Wu Y, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts RJ. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell*. 2007;11(1):53–67. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.018 Cited in: PubMed; PMID 17222790.
127. Jarvis A, Allerston CK, Jia H, Herzog B, Garza-Garcia A, Winfield N, Ellard K, Aqil R, Lynch R, Chapman C, Hartzoulakis B, Nally J, Stewart M, Cheng L, Menon M, Tickner M, Djordjevic S, Driscoll PC, Zachary I, Selwood DL. Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction. *J Med Chem*. 2010;53(5):2215–26. doi:10.1021/jm901755g Cited in: PubMed; PMID 20151671.
128. Miyauchi JT, Chen D, Choi M, Nissen JC, Shroyer KR, Djordevic S, Zachary IC, Selwood D, Tsirka SE. Ablation of Neuropilin 1 from glioma-associated microglia and macrophages slows tumor progression. *Oncotarget*. 2016;7(9):9801–14. doi:10.18632/oncotarget.6877 Cited in: PubMed; PMID 26755653.

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

▼ Tab. 1: Schobinger Klassifikation.....	9
▼ Tab. 2: Angaben zu den PatientInnen.....	26
▼ Tab. 3: Herstellung des Endothelzellnährmediums	29
▼ Tab. 4: Verwendete Zellkulturen	XI
▼ Tab. 5: Verwendetes Zellkulturmedium und Medienzusätze	XI
▼ Tab. 6: Verwendete Chemikalien und Lösungen	XII
▼ Tab. 7: Verwendete Assays	XIII
▼ Tab. 8: Verwendetes Material für RNA-Isolation, Transkription in cDNA, PCR...XIV	
▼ Tab. 9: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial	XVI

7.2 Abbildungsverzeichnis

▲ Abb. 1: (1) AVM des Auges. (2) Palmare AVM des Fußes.	10
▲ Abb. 2: AVM des rechten Frontallappens.....	16
▲ Abb. 3: AVM des linken Ohres im Stadium II mit Ulzerationen des umliegenden Gewebes	17
▲ Abb. 4: Schema der extraembryonalen Vaskulogenese	18
▲ Abb. 5: Angiogenese.....	19
▲ Abb. 6: CD 31-Färbung bei AVM, NHF und HDMEC.	28
▲ Abb. 7: Resazurin-Assay.....	32
▲ Abb. 8: (1) Dehnungskammer mit 6-Well-Platte. (2) Vakuumpumpe mit integrierter Zeitschaltuhr und daran angeschlossener Dehnungskammer.....	32
▲ Abb. 9: 6-Well-Platten	33
▲ Abb. 10: qPCR mit Proben VD4-5; Standardkurve.....	39
▲ Abb. 11: qPCR mit Proben VD4-5; Amplification Plots.....	40
▲ Abb. 12: qPCR mit Proben VD4-5; Schmelzkurve	41
▲ Abb. 13: Zellviabilität der AVM in Prozent zur Zellviabilität der NHF nach 48h und 48+72h.	42
▲ Abb. 14: Zellviabilität der AVM in Prozent zur Zellviabilität der HDMEC nach 48h und 48+72h.	43
▲ Abb. 15: Zellproliferation der AVM im Vergleich zu NHF nach 48 Stunden Inkubation in 6-Wellplatte.....	43
▲ Abb. 16: Fotos der AVM und NHF nach 24 Stunden und nach 48 h Inkubation ..	44
▲ Abb. 17: Anzahl der AVM-Zellen in der Dehnungsgruppe in Prozent zur Anzahl der AVM-Zellen in der Kontrollgruppe nach 24 h bzw. 48h Dehnung.	45
▲ Abb. 18: Anzahl der NHF-Zellen in der Dehnungsgruppe in Prozent zur Anzahl der NHF-Zellen in der Kontrollgruppe nach 24 h bzw. 48h Dehnung.....	45
▲ Abb. 19: Anzahl der HDMEC-Zellen in der Dehnungsgruppe in Prozent zur Anzahl der HDMEC-Zellen in der Kontrollgruppe nach 24 h bzw. 48h Dehnung.....	46

▲ Abb. 20: Anzahl der AVM-Zellen im Vergleich zur Anzahl der NHF-Zellen nach 24h bzw. 48h in Dehnungs- und Kontrollgruppe.....	47
▲ Abb. 21: Anzahl der AVM-Zellen im Vergleich zur Anzahl der HDMEC-Zellen nach 24h bzw. 48h in Dehnungs- und Kontrollgruppe.....	48
▲ Abb. 22: Fotos der AVM in Dehnungs- und Kontrollgruppe vor und nach abgelaufener Dehnung in 10facher Vergrößerung	48
▲ Abb. 23: Fotos der HDMEC in Dehnungs- und Kontrollgruppe vor und nach abgelaufener Dehnung in 10facher Vergrößerung	49
▲ Abb. 24: Fotos der NHF in Dehnungs- und Kontrollgruppe vor und nach abgelaufener Dehnung in 10facher Vergrößerung	49
▲ Abb. 25: Menge an exprimiertem IL-6 in pg pro 1000 Zellen durch NHF im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48h.....	50
▲ Abb. 26: Menge an exprimiertem IL-6 in pg pro 1000 Zellen durch HDMEC im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48 h.....	51
▲ Abb. 27: Menge an exprimiertem VEGF in pg pro 1000 Zellen durch HDMEC im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48h.....	53
▲ Abb. 28: Menge an exprimiertem VEGF in pg pro 1000 Zellen durch NHF im Vergleich zu AVM nach 24h	53
▲ Abb. 29: Menge an exprimiertem TGF- β 1 in pg pro 1000 Zellen durch NHF im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48h.....	54
▲ Abb. 30: Menge an exprimiertem TGF- β 1 in pg pro 1000 Zellen durch HDMEC im Vergleich zu AVM nach 24h bzw. 48h.....	55
▲ Abb. 31: Ergebnis der Gelelektrophorese nach PCR mit Detektion von VEGF1-hu in den cDNA-Proben von Dehnungsversuch 5 (VD5).....	56
▲ Abb. 32: Ergebnis der Gelelektrophorese nach PCR mit Detektion von VEGF4-hu in den cDNA-Proben.....	56
▲ Abb. 33: Ergebnis der Gelelektrophorese nach PCR mit Detektion von GAPDHrat in den cDNA-Proben.....	57

▲ <i>Abb. 34: Quantitativer Unterschied an detektiertem VEGF normiert auf GAPDH zwischen den gedehnten AVM und NHF und der jeweils dazugehörigen Kontrollgruppe nach 24h bzw. 48h</i>	58
▲ <i>Abb. 35: Quantitativer Unterschied an detektiertem VEGF normiert auf GAPDH zwischen den gedehnten AVM und HDMEC und der jeweils dazugehörigen Kontrollgruppe nach 24 h bzw. 48h.</i>	59
▲ <i>Abb. 36: Bindungsaffinität bestimmter VEGF und ihrer Rezeptoren</i>	IX
▲ <i>Abb. 37: Das durch den TGF-β/Alk1- und TGF-β/Alk5-Signalweg entstehende Gleichgewicht der Inhibition und Aktivierung von Zellproliferation, -migration und -invasion</i>	X
▲ <i>Abb. 38: TGF-β1 in Vaskulo- und Angiogenese</i>	XI

7.3 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Alk1	Activin receptor-like kinase 1
AVF	Arteriovenöse Fistel
AVM	Arteriovenöse Malformationen
BMPR	Bone morphogenic protein receptor
BSA	Bovines Serumalbumin
CCMs	Cerebral Cavernous Malformations
CD-31	Cluster of Differentiation 31
cDNA	complementary Desoxyribonucleid Acid
CLVM	Capillary Lymphaticovenous Malformation
CM	Capillary Malformationen
CMS	Cyclic Mechanical Stretching
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cryo-SFM	Cryopreservation Freezing Medium
CT	Computertomographie
C _t -Wert	Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus
DCE-MRT	Dynamic contrast-enhanced Magnetresonanztomographie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleid Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreiol
ECGS/H	Endothelial cell growth supplement/Heparin
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat

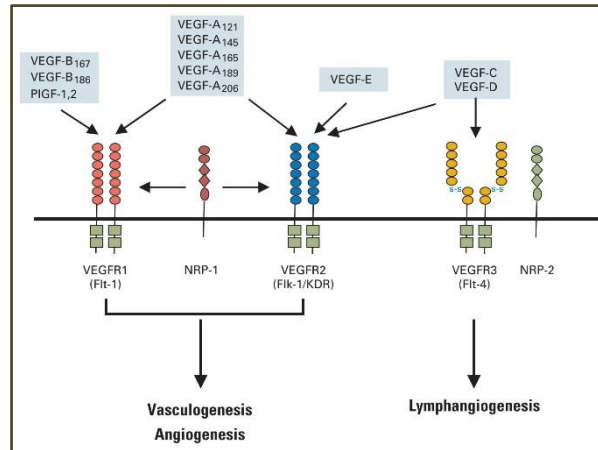
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENG	Endoglin
EPCs	Endothelial Progenitor Cells
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EVOH	Ethylen-Vinylalkohol-Copolymer
FCS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GLUT-1	Glucose-Transporter-1
GTP	Guanosintriphosphat
hbFGF	human basic Fibroblast Growth Factor
HCL	Salzsäure
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
hEGF	human Epidermal Growth Factor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHT	hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN- γ	Interferon γ
IL-6	Interleukin 6
IL-1b	Interleukin 1b
IPL	Intense pulsed light-Technik
ISSVA	International Society for the Study of Vascular Anomalies
KDR	Kinase insert domain-containing receptor
KTP	Kaliumtitanylphosphat
LM	Lymphatische Malformationen
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MRT	Magnetresonanztomographie

mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NaOH	Natriumhydroxid
NBCA	n-Butylcyanoacrylat (NBCA)
Nd:YAG	Neodym-dotiertes Yttrium-Aluminium-Granat
NHF	Normal Human Fibroblasts
NOAK	Neue orale Koagulanzen
NRP	Neuropilin
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OK-432	Picibanil
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PES	Postembolization syndrome
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K/AKT	Phosphoinositide 3-kinase/akt
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PIGF	Placenta growth factor
RAS	Rat Sarcoma
RD	Reagent Diluent
RDD	DNA Digest-Puffer
RLT	RNeasy Lysis Buffer
RNA	Ribonucleid Acid
RPE	concentrated wash buffer
Rsq-Wert	Respective correlation coefficient
RT	Reverse Transkriptase
RW1	Washing Buffer for membrane-bound RNA
SE	Spin Echo

Smad 1/5	Gruppe von Signalleitungsproteinen
SMC	Smooth Muscle Cells
STIR	Short-Tau Inversion Recovery
STS	Sodium-Tetradecylsulfat
TIE-2	zell-spezifische Rezeptortyrosinkinase 2
TGF- β 1	Transforming growth factor β 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TNS	6-(p-Toluidino)-2-naphtalenesulfonic acid sodium salt
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VM	Venöse Malformationen
VMGLOM	Venous malformation with glomus cells

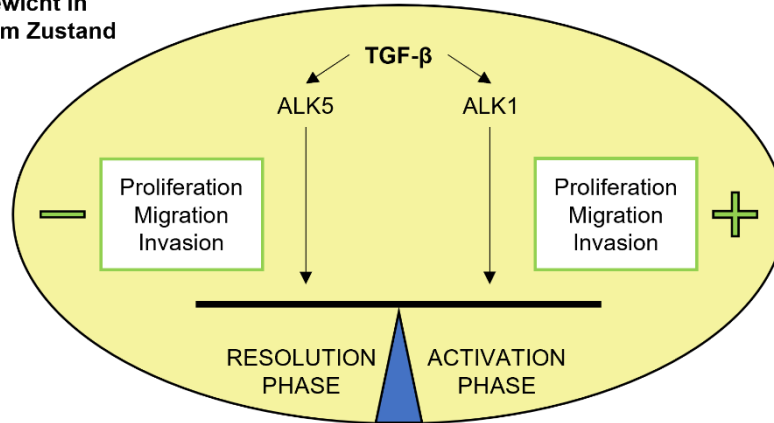
7.4 Ergänzende Informationen

7.4.1 Abbildungen

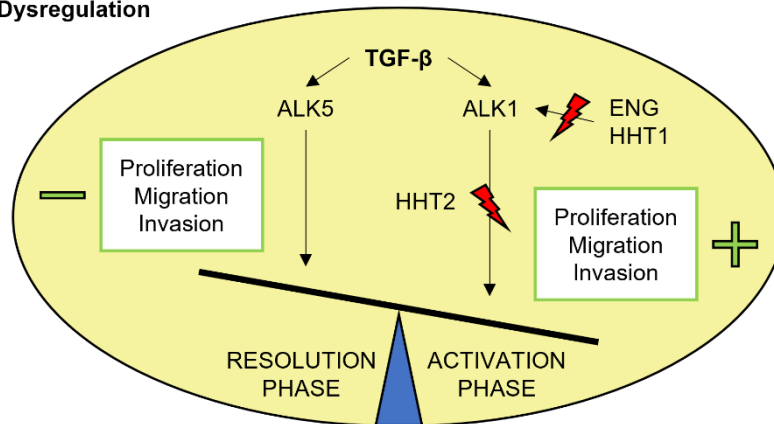


▲ **Abb. 36:** Bindungsaffinität bestimmter VEGF und ihrer Rezeptoren. PlGF = Placenta growth factor. NRP = Neuropilin, ein Co-Rezeptor für bestimmte VEGF-Isoformen. Quelle: Hicklin DJ et al., 2005, S. 1012

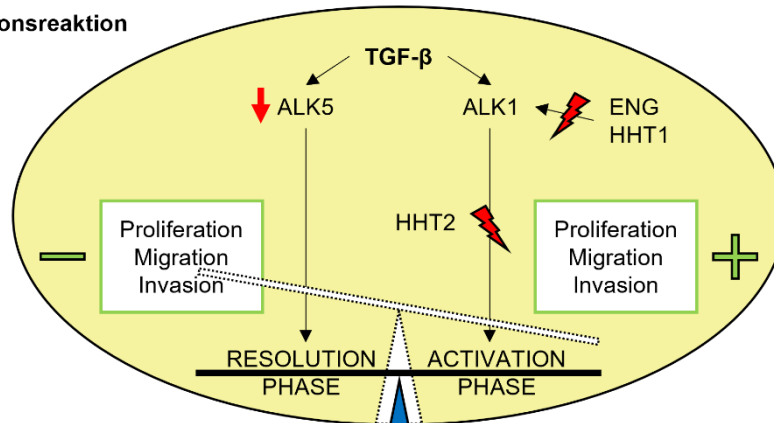
Gleichgewicht in
gesundem Zustand



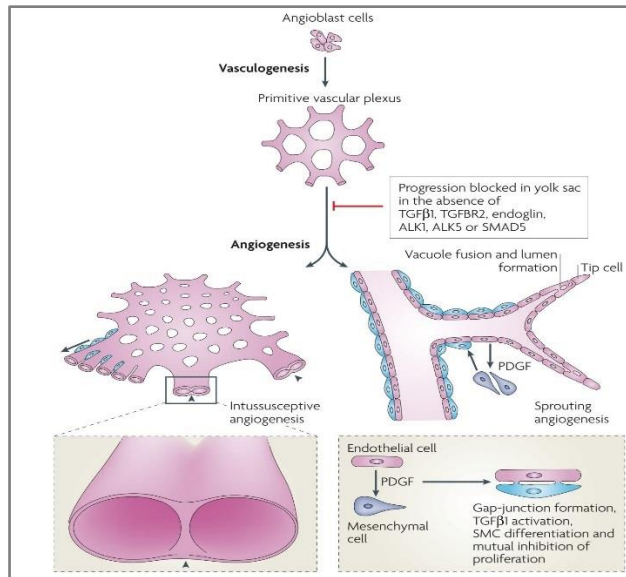
Primäre Dysregulation
bei HHT



Adaptationsreaktion
bei HHT



▲ **Abb. 37:** Das durch den TGF- β /Alk1- und TGF- β /Alk5-Signalweg entstehende Gleichgewicht der Inhibition und Aktivierung von Zellproliferation, -migration und -invasion. Fernández-L A. et al., 2006, S. 73



▲ **Abb. 38: TGF- β 1 in Vaskulo- und Angiogenese. SMC = glatte Muskelzellen; PDGF = Platelet-derived growth factor.** Quelle: Dijke P. et al., 2007, S. 863

7.4.2 Informationen zu verwendetem/r Labormaterial/-ausstattung

▼ **Tab. 4: Verwendete Zellkulturen**

Bezeichnung	Herkunft
HDMEC-Zellen	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
Malformationszellen	Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland
NHF-Zellen	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien

▼ **Tab. 5: Verwendetes Zellkulturmedium und Medienzusätze**

Bezeichnung	Herkunft
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland

Gentamicin solution	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Amphotericin B	gibco by Life Technologies Corporation, Grand Island, USA
L-Glutamine solution	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
FCS-10	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
ECGS/H	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
hEGF-0.05	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
hbFGF-0.5	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
Hydrocortison (HC-500)	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
Cryo-SFM	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland

▼ Tab. 6: Verwendete Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Herkunft
Heparin-Natrium 5.000 I.E./ml, 5 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
ECM (Matrigel)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Trypsin/ EDTA (0,04 %/0,03%)	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
TNS (0,05% Trypsin Inhibitor/0,1% BSA)	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), gibco	Life Technologies Limited, Paisley, UK
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

DMEM Low Glucose	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Monoclonal Mouse Anti-Human CD31	Dako, Glostrup, Denmark
Glycin	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
BSA (1%)	Antigenix america, Huntington Station, USA
TMB Substrate Solution (2NH ₂ SO ₄), Part A und B	Antigenix america, Huntington Station, USA
Stop Solution	R&D Systems, Minneapolis, USA
1 N HCL	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Resazurin Solution	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland

▼ Tab. 7: Verwendete Assays

Bezeichnung	Herkunft
ELISA-Kit "DuoSet" Human TGF- β 1 - Human TGF-Beta1 Standard - Human TGF-Beta1 Capture Antibody - Human TGF-Beta1 Detection Antibody - Streptavidin-HRP B	R&D Systems, Minneapolis, USA

ELISA-Kit "DuoSet" Human IL-6 <ul style="list-style-type: none"> - Human IL-6 Standard - Human IL-6 Capture Antibody - Human IL-6 Detection Antibody - Streptavidin-HRP B 	R&D Systems, Minneapolis, USA
ELISA-Kit "DuoSet" Human VEGF <ul style="list-style-type: none"> - Human VEGF Standard - Human VEGF Capture Antibody - Human VEGF Detection Antibody - Streptavidin-HRP B 	R&D Systems, Minneapolis, USA

▼ Tab. 8: Verwendetes Material für RNA-Isolation, Transkription in cDNA, PCR.

Bezeichnung	Herkunft
Rneasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Rnase-Free Dnase Set	Quiagen, Hilden, Deutschland
Rnase-freies Wasser	Quiagen, Hilden, Deutschland
RLT Buffer (Lyse-Puffer)	Quiagen, Hilden, Deutschland
RPE Buffer (Waschpuffer)	Quiagen, Hilden, Deutschland
RW1 Buffer (Waschpuffer)	Quiagen, Hilden, Deutschland
Buffer RDD	Quiagen, Hilden, Deutschland
Pequgold dNTP-Mix	Peqlab/VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

0,1 M DTT	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
5 X First Strand Buffer	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Primer Random	Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Taq PCR Master Mix Kit (250 U)	Quiagen, Hilden, Deutschland
Primer VEGF4-hu-sense	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Primer VEGF4-hu-antisense	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Primer VEGF1-hu-sense	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Primer VEGF1-hu-antisense	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Primer forward (GAPDHrat)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Primer reverse (GAPDHrat)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Boric acid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris	USB Corporation, Cleveland, USA
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Gene Ruler 50 bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Blue Loading Buffer	Peqlab/VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

▼ Tab. 9: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Herkunft
Zellkulturflasche 75 cm ² "Corning"	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturflasche 25 cm ² "Corning Flask"	Corning Incorporated, Corning, USA
Falcon 50 ml "Cellstar"	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Falcon 15 ml	Corning Science México S.A. de C.V., Reynosa, México
Pipettenfüller "easypet 3"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 10 ml	nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml	nerbe plus GmbH, Winsen, Deutschland
Multipipette 1µl-10ml "M4"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Multipipettenspitze 1 ml "Eppendorf biopur"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipettenspitze 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipettenspitze 10 ml "Eppendorf biopur"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipette 0,5-10 µl "Corning Lambda"	Corning Incorporated, Corning, USA
Pipette 10-100 µl "Corning Lambda"	Corning Incorporated, Corning, USA
Pipette 100-1000 µl "Corning Lambda"	Corning Incorporated, Corning, USA
Pipettenspitzen 0,1-10 µl "epT.I.P.S"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10-100 µl	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 100-1000 µl "epT.I.P.S"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
gestopfte Pipettenspitzen 0,5-20 µl "Biosphere plus"	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen "Premium Tips" 100-1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Eppendorf-Tubes 2ml "Safe Lock Tubes"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Collection Tubes 1.5 ml	Quiagen, Hilden, Deutschland
Rneasy Mini Spin Column	Quiagen, Hilden, Deutschland

PCR Soft Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Cryogenic Vials "Nalgene Cryoware"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterile Spritze "Discardit" 20 ml	Becton Dickinson GmbH, Braunschweig, Deutschland
Sterile Spritze "Discardit" 5 ml	Becton Dickinson GmbH, Braunschweig, Deutschland
Steriler Filter "Chromafil A-20/25"	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Sicherheitsvenenverweilkatheter mit Injektionsport "Vasofix Safety"	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
96-Well-Mikroplatte "Maxisorp"	NALGENE nunc, Rochester, USA
96-Well-Platte "Flat Bottom Tissue Culture Plate"	Corning Incorporated, Corning, USA
PCR 96-Well-TW-MT-Platte	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
12-Well-Platte "Falcon"	Corning Incorporated, Corning, USA
6-Well-Platte "Cellstar"	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
6-Well-Zellkulturplatte "Bioflex plates"	Flexcell International Corporation, Burlington, USA
Parafilm	Bemis Company, Oshkosh USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland

Zellenzähler "Upgreen Counter"	Upgreen, Taichung City, Taiwan
Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co., Oskana, Japan
Selbstklebendes steriles Abdecktuch "Foliodrape"	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Freezing Container "Mr. Frosty Cryo 1°C"	NALGENE nunc, Rochester, USA
Dehnungskammer	Universitätsklinikums Regensburg, Deutschland
Vakuumpumpe	Baumann GmbH & Co. KG, Wörth an der Donau, Germany
Mikroskop "Axiovert 25"	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Magnetrührstab "VITLAB X3"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rührer (magnetisch, beheizt)	RCT basic IKA WERKE
Vortexer "Vortex-Genie 2"	Scientific industries, Bohemia, USA
Zentrifuge "Centrifuge 5810 R"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank -20°C "privileg öko"	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank -80°C "Hera freeze"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank "Hera cell 150"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Werkbank "Hera safe"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuumsauger "Integra Vacusafe"	GENEO BioTechProducts GmbH, Hamburg, Deutschland

Glaspasteurpipetten	Brand GmbH + Co, Wertheim, Deutschland
Varioscan "Flash"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nanophotometer "IMPLEN"	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Thermocycler "DOPPIO"	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage "PM 3000"	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
37°C-Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Mikrowelle "privileg"	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Stuttgart, Deutschland
Gelelektrophorese-System	Peqlab/VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
Drucker	Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen, Deutschland
Rainbow RMB92 CCTV monitor	Rainbow Security Systems, Northampton, England
Fotokammer	Peqlab/VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
Digitalkamera	Canon, Krefeld, Deutschland
PCR Cycler "Stratagene Mx 3005 P"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer "Bio Vortex V1"	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland

7.5 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. Veronika Vielsmeier für die intensive Auseinandersetzung mit meiner Doktorarbeit, ihre konstruktiven Denkanstöße und die große Unterstützung, durch die die erfolgreiche Fertigstellung meiner Arbeit erst möglich war.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Caroline Seebauer für die außerordentliche und engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Sie war für mich in all den Jahren zu jeder Zeit erreichbar und hat mir durch ihre Begeisterung einen neuen Blick auf wissenschaftliches Arbeiten im Bereich der Grundlagenforschung ermöglicht.

Sehr dankbar bin ich auch Frau Petra Eberl mit ihrer warmherzigen, humorvollen Art für die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit im Labor.

Mein abschließender und ganz besonderer Dank gilt Gerrit, meiner Familie und meinen Freunden, die ich immer hinter mir weiß.