

Aus dem Lehrstuhl
Für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
Prof. Dr. C. Bohr
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Zielgerichtete antiangiogenetische Therapie arteriovenöser Malformationen im
Zellkulturmodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Benedikt Christian Wiens

Aus dem Lehrstuhl
Für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
Prof. Dr. C. Bohr
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Zielgerichtete antiangiogenetische Therapie arteriovenöser Malformationen im
Zellkulturmodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Benedikt Christian Wiens

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Veronika Vielsmeier

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christina Wendl

Tag der mündlichen Prüfung:

02. Dezember 2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Vaskuläre Tumore	6
1.1.1	Benigne vaskuläre Tumore.....	6
1.1.2	Lokal aggressive/ intermediäre/ borderline vaskuläre Tumore	8
1.1.3	Maligne vaskuläre Tumore.....	8
1.2	Vaskuläre Malformationen.....	9
1.2.1	Kapilläre Malformationen	10
1.2.2	Lymphatische Malformationen	10
1.2.3	Venöse Malformationen	11
1.2.4	Arteriovenöse Malformationen	12
1.3	Grundlagen der Angiogenese arteriovenöser Malformationen	18
1.3.1	VEGF	19
1.3.2	VEGF-spezifische Pathogenese arteriovenöser Malformationen	20
1.3.3	Bevacizumab	20
1.3.4	Thalidomid	21
1.4	Zielsetzung dieser Promotionsarbeit	22
2	Methoden.....	23
2.1	Zellisolation aus Malformationsgewebe	23
2.2	Zellkultur	24
2.2.1	Zellkulturplatten coaten.....	24
2.2.2	Zellen einfrieren	24
2.2.3	Zellen auftauen und kultivieren.....	25
2.2.4	Zellen passagieren	25
2.2.5	Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer	26
2.3	Zellzahl.....	26
2.4	CD31 ⁺ Bead-Sorting.....	27

2.5	Wirkstoffkonzentrationen.....	28
2.5.1	Bevacizumab	28
2.5.2	Thalidomid	29
2.6	Zyklische mechanische Dehnung.....	29
2.7	VEGF-Nachweis mittels ELISA	32
2.8	Genexpressionsanalyse.....	33
2.8.1	RNA-Isolierung.....	33
2.8.2	Reverse Transkription der RNA in cDNA	34
2.8.3	GAPDH-PCR und Gelelektrophorese	35
2.8.4	Quantitative Echtzeit-PCR (RT qPCR).....	36
2.9	Tube-Formation-Assay.....	37
2.10	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Zellzahl.....	39
3.2	CD31 ⁺ -Bead-Sorting	39
3.3	Wirkstoffkonzentrationen.....	40
3.3.1	Bevacizumab	40
3.3.2	Thalidomid	42
3.4	Zyklische mechanische Dehnung.....	43
3.5	VEGF-Nachweis mittels ELISA	46
3.6	VEGF-Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR.....	47
3.7	Tube-Formation-Assay.....	49
4	Diskussion	52
4.1	Wirkung von Bevacizumab und Thalidomid auf AVM-Zellproliferation	52
4.2	Mechanische Scherbelastung und antiangiogenetische Therapie arteriovenöser Malformationen.....	53
4.2.1	Zellproliferation	54
4.2.2	VEGF-Proteinexpression	54

4.2.3	VEGF-Genexpression	55
4.3	In-vitro-Angiogenese	56
4.4	Limitationen	58
4.5	Klinische Bedeutung der antiangiogenetischen Therapie arteriovenöser Malformationen.....	59
5	Zusammenfassung.....	62
6	Anhang	64
6.1	Material	64
6.1.1	Zellkultur.....	64
6.1.2	Zellkulturmedien	64
6.1.3	Chemikalien und Lösungen.....	64
6.1.4	Medikamente	65
6.1.5	Assays.....	65
6.1.6	RNA-Isolierung, reverse Transkription in cDNA und PCR	66
6.1.7	Verbrauchsmaterialien	67
6.1.8	Geräte	68
6.2	Abbildungsverzeichnis	70
6.3	Tabellenverzeichnis.....	71
7	Literatur.....	72

1 Einleitung

Vaskuläre Anomalien sind eine diverse Gruppe von Gefäßfehlbildungen und gelten mit einer Prävalenz von weniger als 5 pro 10.000 Personen als seltene Erkrankungen (1,2). Die Entitäten erstrecken sich dabei von unkomplizierten Geburtsmalen bis hin zu lebensbedrohlichen Anomalien (3). Die ISSVA (International Society for the Study of Vascular Anomalies) ist eine multidisziplinäre Gesellschaft, die ein Interesse an frei verfügbarem, klinischen und experimentellen Wissen über vaskuläre Anomalien sowie an der bestmöglichen Diagnostik, Behandlung und Versorgung von Patienten mit einem dieser Krankheitsbilder hat (1). Die folgenden Kapitel orientieren sich an der 2014 herausgegebenen und 2018 zuletzt überarbeiteten Klassifikation der ISSVA sowie dem Update von 2025 (4,5). Die vielfältigen Krankheitsbilder mit unterschiedlichen pathophysiologischen und genetischen Grundlagen werden zunächst anhand ihrer Morphologie, des Zeitpunktes ihres Erscheinens, des Wachstumsverhaltens und der immunhistochemischen Expression bestimmter Marker in die beiden Gruppen der vaskulären Tumoren und vaskulären Malformationen eingeteilt (2,4,5).

Einige wenige vaskuläre Anomalien konnten bisher noch nicht genauer zugeteilt werden und verbleiben daher in der Gruppe vorläufig nicht klassifizierter vaskulärer Anomalien (3–5).

1.1 Vaskuläre Tumore

Vaskuläre Tumore lassen sich weiter in benigne, maligne und lokal aggressive/ borderline Tumore differenzieren (4,5). Außerdem lässt sich innerhalb dieser Gruppe eine immunhistochemische Unterteilung in das Glukosetransporter-1- (GLUT1-) exprimierende infantile Hämangiom sowie alle anderen GLUT1-negativen vaskulären Neoplasien treffen (6,7).

1.1.1 Benigne vaskuläre Tumore

Im Gegensatz zu malignen und lokal aggressiven vaskulären Tumoren, treten die gutartigen vaskulären Neoplasien relativ häufig im Kindesalter auf. Den häufigsten benignen Tumor stellt das infantile Hämangiom (Abbildung 1) dar, welches eine Dysregulation sowohl der Vaskulogenese als auch der Angiogenese mit einer VEGF-Überexpression zeigt. Als Folge dessen präsentiert sich das infantile Hämangiom klinisch mit einer Proliferation 1-3 Wochen nach der Geburt (8). Immunhistochemisch lässt sich das infantile Hämangiom von anderen vaskulären Neoplasien durch den Nachweis von GLUT1 abgrenzen (6,7,9).

Typischerweise lässt sich der Übergang der proliferativen Phase in eine involutive Phase an einer zwischenzeitlich stabilen Phase des infantilen Hämangioms sowie einem darauffolgenden

Regress erkennen. Eine spontane Ausheilung wird in 90 % der Fälle bis zum vierten Lebensjahr beobachtet. Aufgrund dessen ist eine Therapie nur bei persistierendem Hämangiom oder komplikationsreicher Lokalisation notwendig. Als Mittel der Wahl, mit einem Ansprechen von über 98 %, hat sich der Betablocker Propranolol etabliert. Dieser scheint über eine Inhibition des Transkriptionsfaktors SOX18 einen regulatorischen Effekt auf das Wachstum des infantilen Hämangioms zu haben (8–10).



Abbildung 1: Unkompliziertes infantiles Hämangiom Handgelenk rechts (9)

Dem gegenüber steht die Gruppe, der nicht GLUT1-exprimierenden gutartigen vaskulären Neoplasien. Das kongenitale Hämangiom ähnelt klinisch dem infantilen Hämangiom, zeigt aber eine vollständige intrauterine Proliferation mit konnatal ausgereiftem Krankheitsbild. Es lässt sich in das RICH (rapidly involuting congenital hemangioma) mit vollständigem Regress nach der Geburt und das NICH (non involuting congenital hemangioma), welches sich nicht zurückbildet, unterteilen. Aufgrund des konnatalen reifen Ausmaßes des Hämangioms treten nach der Geburt häufig Komplikationen wie Herzinsuffizienz und Thrombozytopenie auf, wodurch eine chirurgische Exzision und Rekonstruktion notwendig werden kann (7,8,11).

Das Granuloma pyogenicum manifestiert sich nur selten vor dem vierten Lebensmonat und unterscheidet sich dadurch von den anderen gutartigen vaskulären Tumoren. Pathogenetisch wird eine reaktive Hyperplasie als Folge von Minimaltraumen diskutiert. Im Kontrast zu dieser Theorie steht die Gegebenheit, dass das pyogene Granulom nicht nur an der Haut, sondern auch an Schleimhäuten des Darms und an parenchymatösen Organen auftritt. Klinisch manifestiert sich diese Neoplasie durch kleine, dunkelrote, leicht blutende Läsionen teilweise mit Ulzerationen. Sollten Komplikationen auftreten, ist trotz Tendenz zur Regression die Indikation zur chirurgischen Exzision gegeben (8,9).

1.1.2 Lokal aggressive/ intermediäre/ borderline vaskuläre Tumore

Die intermediären vaskulären Neoplasien umfassen das kaposiforme Hämangioendotheliom, das Kaposi-Sarkom und weitere Hämangioendotheliome. Das kaposiforme Hämangioendotheliom zeigt genauso wie das Tufted Angioma, welches von einigen Autoren zur selben Tumorentität gezählt wird, nach ISSVA-Klassifikation jedoch als benigne vaskuläre Neoplasie gilt, eine Verbrauchskoagulopathie einhergehend mit einer Thrombozytopenie und einer Hypofibrinogenämie. Dieses sogenannte Kasabach-Merritt-Phänomen (KMP) imponiert klinisch mit einer Verhärtung des Tumors bei gleichzeitigen lokalen Entzündungszeichen (4,5,12–14). Bei dem Kaposi-Sarkom können fünf Subtypen unterschieden werden. Eine davon ist das HIV-assoziierte Kaposi-Sarkom, welches als AIDS definierende Erkrankung gilt. Als Gemeinsamkeit liegt allen Unterformen die Ätiologie mit einer HHV-8- Infektion von vaskulären Endothelzellen zugrunde. Häufig sind kutane und mukosale Manifestationen. Da die Erkrankung aber auch weitere Gewebe und Organe befallen kann, zeigt sich klinisch teilweise ein mannigfaltiges Bild. Die Therapie unterscheidet sich entsprechend der Subtypen. Für das HIV-assoziierte Kaposi-Sarkom bietet Doxorubicin nach aktuellem Wissensstand die Standardtherapie (8,15).

1.1.3 Maligne vaskuläre Tumore

Aufgrund ihrer niedrigen Inzidenz und variablen klinischen Manifestation stellen maligne vaskuläre Neoplasien eine diagnostische und therapeutische Schwierigkeit dar. Im Wesentlichen lassen sich das Angiosarkom (Abbildung 2) und das epitheloide Hämangioendotheliom unterscheiden. Während ersteres aus dem Endothel jeglicher Gefäße einschließlich Lymphgefäße entstehen kann, beschränkt sich zweiteres auf mittelgroße bis große Blutgefäße (4,5,12,16). Als maligne Neoplasien zeigen beide Entitäten eine Metastasierungstendenz wodurch sich je nach Stadium verschiedene Therapieansätze ergeben. Die niedrige Inzidenz bedingt eine unzureichende Studienlage, jedoch ist nach aktuellem Erkenntnisstand die R0-Resektion bei lokalem Befall die kurative Therapie der Wahl.

Für das epitheloide Hämangioendotheliom stellt die Chemoembolisation eine Therapieoption bei Inoperabilität dar (8,16). Das unzureichende Ansprechen auf Chemotherapien im metastasierten Stadium führte zur vereinzelt Verwendung antiangiogenetischer Medikamente. In diesem Zusammenhang wurde auch für Thalidomid ein klinischer Benefit beschrieben, eine Untersuchung umfangreicherer Patientengruppen steht jedoch noch aus (16).

Für das Angiosarkom zeigt die adjuvante Radiotherapie im lokal begrenzten Stadium bei einer Häufung von Lokalrezidiven einen Benefit. Im metastasierten Stadium sind chemotherapeuti-

sche Schemata, die unter anderem Taxane, Doxorubicin, Anthrazyklin und Ifosfamid einschließen, wirkungsvoll. Randomisierte prospektive Studien, die fundierte Schemata für die Chemotherapie untersuchen, existieren aufgrund der geringen Inzidenz bisher noch nicht (16). Zusätzlich zu diesen malignen vaskulären Neoplasien endothelialen Ursprungs, existieren Tumore, die ihren Ursprung in anderen vaskulären Geweben haben (8).

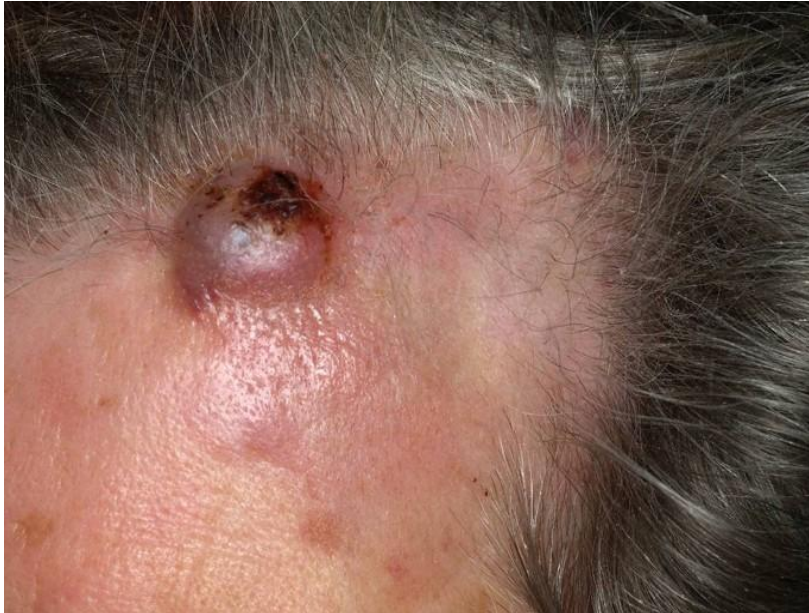


Abbildung 2: Kutanes Angiosarkom (17)

1.2 Vaskuläre Malformationen

Die vaskulären Malformationen liegen, in Abgrenzung zu den vaskulären Tumoren, bereits bei Geburt vor, sind jedoch nicht immer konnatal erkennbar. Des Weiteren wachsen die Malformationen proportional zum Patienten, weisen keinen spontanen Regress auf und können ausgelöst durch hormonelle oder mechanische Stimuli progredient werden (18). Ätiologisch wird von einer Entwicklungsfehlbildung, durch abnormale Signaltransduktionen bezüglich der Apoptose, Reifung und des Wachstums vaskulärer Zellen, ausgegangen (19). Die Malformationen weisen diverse klinische Manifestationen und damit auch diverse Komplikationsmöglichkeiten auf. Aufgrund von Läsionen in sichtbaren Bereichen wird der Leidensdruck der Erkrankungen durch eine psychosoziale Komponente erweitert (18). Die Klassifikation der vaskulären Malformation lässt sich nach der ISSVA in einfache vaskuläre Malformationen, kombinierte vaskuläre Malformationen, vaskuläre Malformationen benannt nach großen Gefäßen und vaskuläre Malformationen assoziiert mit anderen Anomalien einteilen (4,5,18). Zusätzlich dazu kann zwischen den slow-flow-Malformationen mit den kapillären, lymphatischen und venösen Malformationen sowie den fast-flow-Malformationen mit den arteriovenösen Malformationen

unterschieden werden (4,5,18,19). Diese zählen allesamt zu den einfachen vaskulären Malformationen. Es bestehen verschiedene kombinierte vaskuläre Malformationen dieser Entitäten (4,5).

1.2.1 Kapilläre Malformationen

Die auch als Naevus flammeus oder Portwein-Naevus bezeichneten kapillären Malformationen (Abbildung 3) beruhen auf einer Dilatation und Ektasie kapillärer Gefäße mit slow-flow-Strömungseigenschaften. Sie erscheinen klinisch als konnatale rosige oder livide Maculae, die persistieren und in Abgrenzung zu anderen klinisch ähnlich apparenten Läsionen nicht spontan verschwinden ((18,19). Die Pathogenese der kapillären Malformationen ist bis heute nicht genauer bekannt, es scheint aber ein Zusammenhang mit defekter neuronaler Innervation und Modulation der Kapillaren zu bestehen. Die Therapieoptionen bestehen in der Lasertherapie mit photothermolytischen Effekten sowie chirurgischen Maßnahmen bei Deformitäten des unterliegenden Gewebes (18).



Abbildung 3: Kapilläre Malformation rechter Fuß (20)

1.2.2 Lymphatische Malformationen

Lymphatische Malformationen umfassen zum einen die zystischen, schwammartigen oder bläschenartigen slow-flow-Läsionen der Lymphgefäße mit lokaler Begrenzung, zum anderen das primäre Lymphödem (Abbildung 4), welches durch eine defekte Lymphdrainage und daraus

resultierenden Lymphstau zu einer Schwellung des betroffenen Gewebes führt. Je nach Größe ist eine Unterscheidung in makrozystische und mikrozystische lymphatische Malformationen möglich. Klinisch werden diese häufig durch intraläsionale Einblutungen als kleine Knoten apparent. Eine signifikante Vergrößerung kann im Verlauf stattfinden und zu Deformitäten des umgebenden Gewebes führen. Etwa 75 % der Läsionen manifestieren sich cervicofazial und können durch Komplikationen wie Gewebeverdrängung, Blutungen und Zellulitis eine Intervention erforderlich machen. Neben supportiver Therapie bei Blutungen und Infektionen, stehen die Sklerotherapie, die chirurgische Resektion in toto und medikamentöse Therapien, z.B. mit mTOR-Inhibitoren, zur Verfügung (18,19,21,22).



Abbildung 4: Primäres Lymphödem und umschriebene lymphatische Malformation mit sichtbarer intraläsionaler Einblutung (21)

1.2.3 Venöse Malformationen

Venöse Malformationen sind die häufigsten vaskulären Malformationen mit einer Inzidenz von 1-2/10.000 und zeigen sich klinisch durch eine bläuliche, weiche, komprimierbare Läsion (Abbildung 5).



Abbildung 5: Venöse Malformation bei 4-jährigem Mädchen am rechten Ohr (22)

Histologisch zeigen sich unvollständig entwickelte, ektatische, tubuläre Gefäßstrukturen mit einem relativen Mangel an glatter Muskulatur (18,19,23,24). Letzterer ließe sich durch eine Hyperproliferation endothelialer Zellen oder eine mangelnde Rekrutierung glatter Muskelzellen erklären. Beide Erklärungsansätze könnten auf einer fehlerhaften intra- und interzellulären Kommunikation basieren (24). Häufige Komplikationen sind Schmerzen im Bereich der Läsionen, plötzliches Wachstum bei Traumata, Hormonänderungen und Infektionen, Schwellungen und chronische Anämie bei intestinal lokalisierten venösen Malformationen. Außerdem treten gehäuft Gerinnungsstörungen mit erhöhtem Risiko für Thrombosen und Thrombophlebitiden durch Gerinnungsaktivierungen in den slow-flow-Malformationen auf (18). Die therapeutischen Möglichkeiten unterteilen sich in medikamentöse, chirurgische und sklerosierende Therapien. Die symptomatische Therapie umfasst antiinflammatorische Medikamente, niedermolekulares Heparin und Acetylsalicylsäure. Neueren Erkenntnissen zufolge zeigt der mTOR-Inhibitor Sirolimus einen gewissen Erfolg in der Therapie von venösen und lymphatischen Malformationen (18,25).

1.2.4 Arteriovenöse Malformationen

Als fast-flow-Malformationen grenzen sich die arteriovenösen Malformationen (AVM) von den übrigen einfachen vaskulären Malformationen ab. Anatomisch handelt es sich hierbei um einen arteriovenösen Shunt unter kompletter oder partieller Umgehung des kapillären Systems mit dysplastischen dickwandigen Arterien und arterialisierten, dickwandigen Venen. Die bereits konnatal vorliegenden Fehlbildungen werden teilweise erst im Kindesalter apparent und präsentieren sich dann als rötliche, warme, pulsatile Läsionen (Abbildung 6).



Abbildung 6: Kongenitale fronto-palpebrale arteriovenöse Malformation (26)

Im zeitlichen Verlauf sind die AVM häufig progredient mit dem Potential zu exponentiellem Wachstum unter Stimuli wie Traumata und hormonellen Veränderungen (18,19,24). Durch die arteriovenösen Shunts kommt es im Verlauf häufig zu einer lokalen venösen Hypertension mit einer Minderperfusion des betroffenen und umliegenden Gewebes. Resultierend daraus entsteht eine lokale Ischämie, die klinisch durch Schmerzen und Gewebsulzerationen mit Blutungen in Erscheinung tritt. Arteriovenöse Fisteln sowie größere arteriovenöse Malformationen können zu einer Vorlaststeigerung am Herzen mit konsekutiver high-output Herzinsuffizienz führen (27).

Zur genetischen Betrachtung der arteriovenösen Malformationen muss zwischen sporadisch auftretenden AVM und AVM in Verbindung mit syndromalen Erkrankungen unterschieden werden. Eines dieser Syndrome, bei denen arteriovenöse Malformationen gehäuft auftreten, ist die hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT, Morbus Osler) (27). Klinisch zeigt sich die Erkrankung als Teleangiektasien im Bereich der Haut und Schleimhäute, mit dem Leitsymptom des Nasenblutens, welches bei 90 % der Patienten auftritt (28) (Abbildung 7).

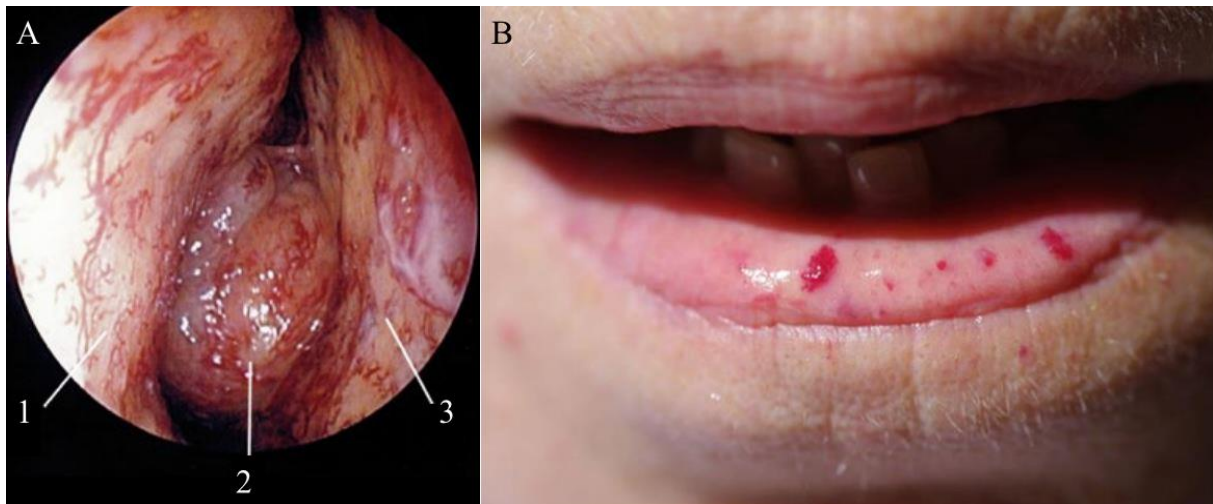


Abbildung 7: Hereditäre hämorrhagische Teleangiectasie (29,30)

(A): Teleangiectasien der Nasenschleimhaut an 1. Septum, 2. Polyp und 3. Lateraler Nasenwand (B): Teleangiectasien der Unterlippe

Neben diesen Teleangiectasien kommt es gehäuft zu arteriovenösen Malformationen größerer Gefäße, vor allem in Gehirn, Lunge und Leber. Bei der Mehrzahl der Patienten mit Morbus Osler lassen sich typische Veränderungen in Genen feststellen, die am TGF- β -Signalweg beteiligt sind. (27). Es konnte gezeigt werden, dass der TGF- β -Mangel zwar einen Effekt auf die Teleangiectasien, jedoch nicht auf postkapilläre Venolen sowie deren Rekrutierung supportiver Zellen hat. Damit scheint ein TGF- β -Mangel eine Rolle in der Entstehung von AVM bei HHT zu spielen, dies lässt sich jedoch nicht auf alleinstehende AVM übertragen (24). Weitere Syndrome, die in Verbindung mit AVM stehen, sind das PTEN-Hamartom-Tumor-Syndrom (PTEN = phosphatase and tensin homolog) und das CM-AVM-Syndrom (kapilläre-Malformation-arteriovenöse-Malformation-Syndrom). Für diese beiden Syndrome konnten ebenfalls typische genetische Veränderungen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ist der genetische Code alleinstehender arteriovenöser Malformationen bisher nicht gut aufgeklärt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass somatische genetische Varianten eine Rolle in der Entstehung von AVM spielen. So konnten für diese Malformationen teilweise Mutationen in MAP2K1 oder KRAS, mit Beeinträchtigungen des MAP-Kinase-Signalwegs, festgestellt werden (27,31).

Die Pathologie hinter der Entstehung arteriovenöser Malformationen ist bisher nicht abschließend geklärt. Aktuelle Hypothesen basieren auf klinisch-bildgebenden Verfahren, molekulargenetischen Untersuchungen menschlicher Gewebe und auf experimentellen Tierversuchen. Mittels licht- und elektronenmikroskopischer Betrachtungen von Teleangiectasien aus HHT-Biopsien konnten verschiedene morphologische Sequenzen abgegrenzt werden. Die zeitliche Rekonstruktion lässt vermuten, dass im ersten Schritt postkapilläre Venolen dilatieren und mo-

nozytäre Zellen das umgebende Gewebe infiltrieren. Im Folgenden steigen der Venolendurchmesser sowie die Wandstärke und es werden Perizyten rekrutiert. Zwischen vergrößerten Venolen und Arteriolen entsteht unter Dilatation und Wachstum der kapillären Segmente eine Verbindung. Im letzten Schritt wird das kapilläre Gewebe komplett durch arteriovenöse Kurzschlussverbindungen ersetzt. Diese Abfolge könnte durch Studien erklärt werden, die zeigen konnten, dass Kapillaren unter gesteigertem mikrovaskulärem Blutfluss zu Arteriolen transformieren. Außerdem ließen sich diese Ergebnisse durch hochauflösende computertomographische Bildgebungen bei pulmonalen AVM reproduzieren (27). In Tierversuchen konnte an Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass eine alleinige homozygote Deletion in HHT-Genen nicht ausreichend für die Bildung von AVM war, sondern dass zusätzlich proangiogenetische Moleküle wie VEGF oder LPS notwendig waren. Auch beim Menschen konnte eine VEGF-Expression in Exzisionsproben von zerebralen arteriovenösen Malformationen histologisch nachgewiesen werden (27,32). Auf die Rolle von VEGF soll in Anbetracht der Zielsetzung dieser Promotionsarbeit im Folgenden genauer eingegangen werden.

Die Diagnostik der arteriovenösen Malformationen setzt sich aus der klinisch-körperlichen Untersuchung und apparativen Verfahren zusammen. Dafür stehen verschiedene bildgebende Verfahren zur Verfügung. Die Sonographie stellt dabei durch ihre einfache Verfügbarkeit den nächsten Schritt dar. Farbdoppler-kodierte Bilder zeigen den arteriovenösen Shunt mit dilatierten Gefäßen bei fast-flow-Eigenschaften des Blutes. Außerdem zeigen auch die drainierten Venen durch die Kurzschlussverbindung ein arterielles, wellenförmiges Flussprofil (18) (Abbildung 8).

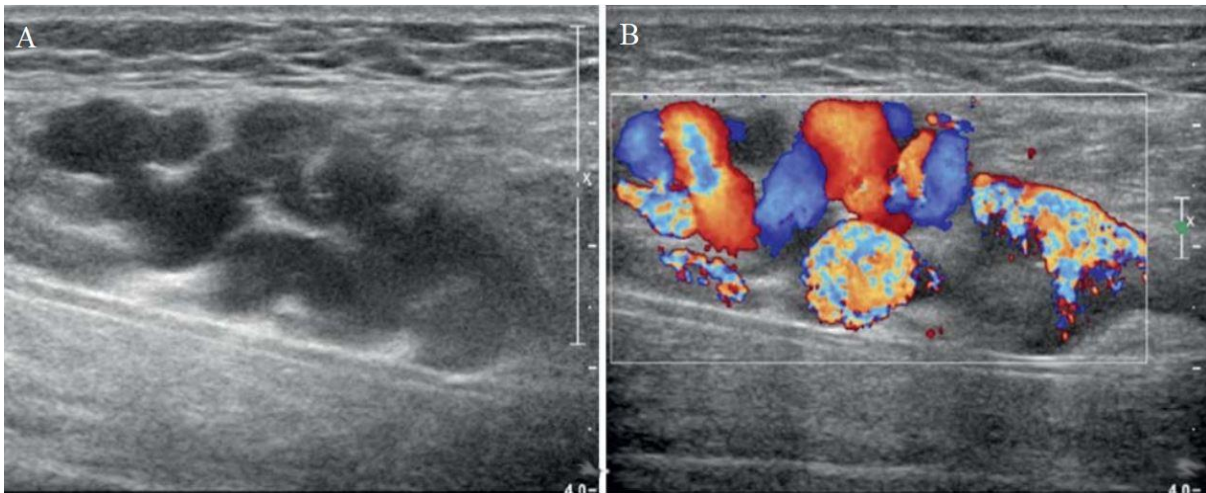


Abbildung 8: Intramuskuläre arteriovenöse Malformation der Wade im Ultraschall (33)

(A): B-Bild (B): Farbkodierte Doppler-Sonographie

Die Magnetresonanztomographie eignet sich vor allem zur Abklärung des Ausmaßes der Malformation. In der nativen MRT lässt sich die fast-flow-Malformation an einer Signalauslöschung erkennen. In der kontrastmittelverstärkten MR-Angiographie können die Blutflusseigenschaften der Arterien und Venen beurteilt werden. Die Computertomographie liefert weniger Informationen über die AVM als eine MRT, kann aber bei Abklärung von arteriovenösen Malformationen mit knöchernem Befall notwendig sein (18,19,27). Ein weiterer fester Bestandteil der AVM-Diagnostik sowie der Therapieplanung stellt die digitale Subtraktionsangiographie aufgrund der hohen örtlichen und zeitlichen Auflösung dar (34) (Abbildung 9).



Abbildung 9: Digitale Subtraktionsangiographie einer AVM der Orbita (35)

Anhand der Diagnostik kann eine klinische Einteilung in die Schobinger Stadien I (klinisch unauffällige Läsion, gegebenenfalls Überwärmung oder Verfärbung der darüberliegenden Haut) bis IV (erhöhte kardiale Belastung bis zur Herzinsuffizienz) erfolgen (36).

Therapeutisch stellen arteriovenöse Malformationen allein durch ihre Seltenheit eine Schwierigkeit dar. Die Wirksamkeit verschiedener Therapieoptionen ließ sich bisher schlecht vergleichen, da standardisierte Therapie- und Dokumentationsprotokolle fehlten und vorhandene Informationen überwiegend aus retrospektiven Studien sowie Fallberichten stammten (37,38). Mit Hilfe eines international ausgearbeiteten Protokolls sollen Therapieergebnisse in Zukunft standardisiert dokumentiert und damit besser vergleichbar gemacht werden (39). Aktuelle interventionelle Methoden umfassen operative Eingriffe und endovaskuläre Techniken (Abbildung 10). Das gemeinsame Ziel beider Therapieformen ist eine komplette Resektion oder vollständige Blockierung des Nidus (40).

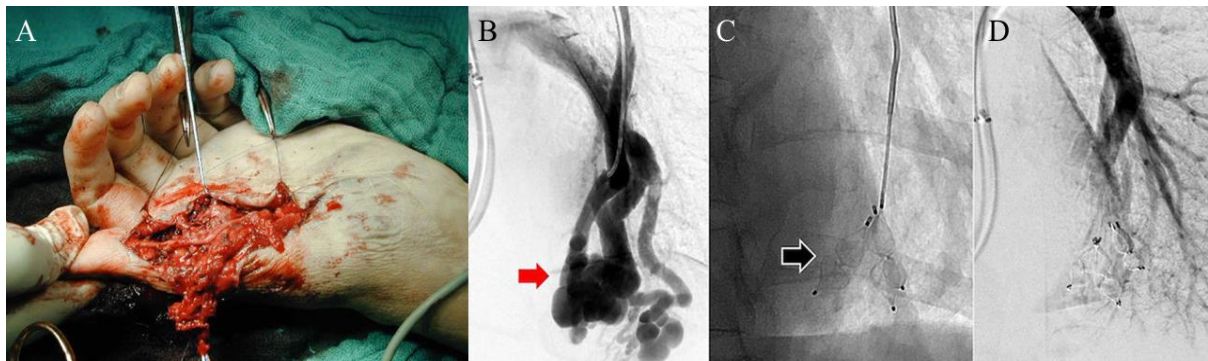


Abbildung 10: Therapie arteriovenöser Malformationen (41,42)

(A): Intraoperatives Bild einer AVM des Thenar der linken Hand (B): Pulmonale arteriovenöse Malformation vor Therapie (C): Embolisation mittels AVP-II Plugs (D): Vollständiger Verschluss der AVM nach Intervention

Endovaskuläre Therapien umfassen vor allem die Sklerotherapie und die Embolisation (37). Diese können je nach Zugänglichkeit der Läsion transarteriell, perkutan oder retrograd venös erfolgen. Die Embolisate umfassen unter anderem Coils, Plugs, Ethanol, Cyanoacrylate, Polyvinylalkohol und Fibrinkleber (40). Operative Methoden stellen einen vielversprechenden Ansatz bei gut lokalisierten Malformationen mit klar definierten Grenzen dar. Zur Blutungskontrolle wird eine präoperative Embolisation empfohlen. Die Resektion der AVM kann eine Rekonstruktion mittels lokaler oder mikrovaskulärer freier Lappenplastik notwendig machen. Diese multimodalen Therapieansätze reichen teilweise nicht aus, um arteriovenöse Malformationen komplett zu eliminieren. Verbleibende Reste der AVM können durch aggressives Wachstum des verbleibenden Nidus zu einer Aggravation der Erkrankung führen (31,40). Nicht zuletzt dadurch ist das interventionelle Management von arteriovenösen Malformationen schwierig und es ergibt sich ein Interesse an medikamentösen Therapieansätzen. Zum Einsatz

kommen antiangiogenetische Medikamente, die über VEGF wirksam werden, und zielgerichtete Medikamente auf spezifische Mutationen. Der Betablocker Propranolol, der vor allem bei infantilen Hämangiomen zum Einsatz kommt, konnte Fallberichten zufolge bei AVM-Patienten niedrig dosiert zur Schmerzkontrolle eingesetzt werden und potentiell ein weiteres Wachstum aufhalten (43). Als Medikament mit antiangiogenetischer Wirkung hat auch Thalidomid einen positiven Effekt auf Schmerzen und Blutungen bei AVM gezeigt (44). Als zielgerichtetes Medikament gegen eine der möglichen AVM-Mutationen im KRAS-Gen zeigte der MEK-Inhibitor Trametinib in einem Fallbericht, mit einer 75-prozentigen Reduktion des Blutflusses in der Läsion, eine signifikante Besserung (45).

Insgesamt lässt sich eine unzureichende Datenlage zu wirksamen medikamentösen Therapien für arteriovenöse Malformationen erkennen, welche viel Platz für weitere Forschung lässt. Diese Umstände motivierten zur Zielsetzung dieser Doktorarbeit, worauf im Folgenden genauer eingegangen wird.

1.3 Grundlagen der Angiogenese arteriovenöser Malformationen

Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) spielt eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese im gesunden menschlichen Gewebe (46). Als proangiogenetischer Faktor spielt er aber auch eine Rolle in der Pathogenese arteriovenöser Malformationen. So wurden beispielsweise bei Patienten mit zerebralen AVM sowie in pathologischen Resektionen von AVM erhöhte VEGF-Konzentrationen festgestellt (47). Vorversuche des Universitätsklinikums Regensburg (Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde) konnten VEGF-spezifische Veränderungen an arteriovenösen Malformationen feststellen, welche die Grundlage für die Versuche dieser Promotionsarbeiten darstellen. AVM-Zell-Mischkulturen wurden in Hinblick auf ihr Proliferationsverhalten sowie die Expression verschiedener Proteine mit NHF (normal human fibroblasts) und HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) verglichen. Ein weiterer Vergleich erfolgte zwischen Zellkulturen, die während der Inkubation zyklisch mechanisch gedehnt wurden, und Kontrollgruppen ohne zyklische mechanische Dehnung. Dabei zeigte sich zunächst eine erhöhte VEGF-A-Expression der AVM-Zellen gegenüber den NHF sowie HDMEC. Des Weiteren konnte eine signifikant erhöhte VEGF-A-Expression der AVM-Zellkulturen mit zyklischer mechanischer Dehnung gegenüber den gedehnten NHF und HDMEC sowie den ungedehnten AVM-Kontrollgruppen festgestellt werden (48).

1.3.1 VEGF

Der Vascular Endothelial Growth Factor ist ein Wachstumsfaktor, der über die Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen wirkt. Die Wirkung umfasst dabei die Endothelzellproliferation sowie ein Aussprossen von Kapillaren in Richtung der VEGF-Quelle (49). Der VEGF umfasst eine Gruppe dimerer Glykoproteine, die mit verschiedener Affinität an die verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen binden. Es werden VEGF-A, -B, -C, -D und PlGF (Placenta Growth Factor) sowie die Rezeptoren VEGFR-1, -2 und -3 unterschieden (50) (Abbildung 11). VEGF-A ist der in der Literatur meistbeschriebene Faktor innerhalb dieser Gruppe. Ihm wird eine Schlüsselrolle für das Wachstum von Blutgefäßen zugeschrieben, während VEGF-C und VEGF-D beispielsweise die lymphatische Angiogenese regulieren. Da es sich bei AVM um eine Fehlbildung von Blutgefäßen handelt, ist VEGF-A von besonderem Interesse für diese Promotionsarbeit. VEGFR-1 und -2 werden auf vaskulären Endothelzellen exprimiert, während VEGFR-3 auf lymphatischen Endothelzellen vorkommt. Diese Wirkung von VEGF auf vaskuläre Endothelzellen ist gut dokumentiert. Außerdem konnte in einigen Studien ein mitogener Effekt auf andere Zelltypen gezeigt werden (51).

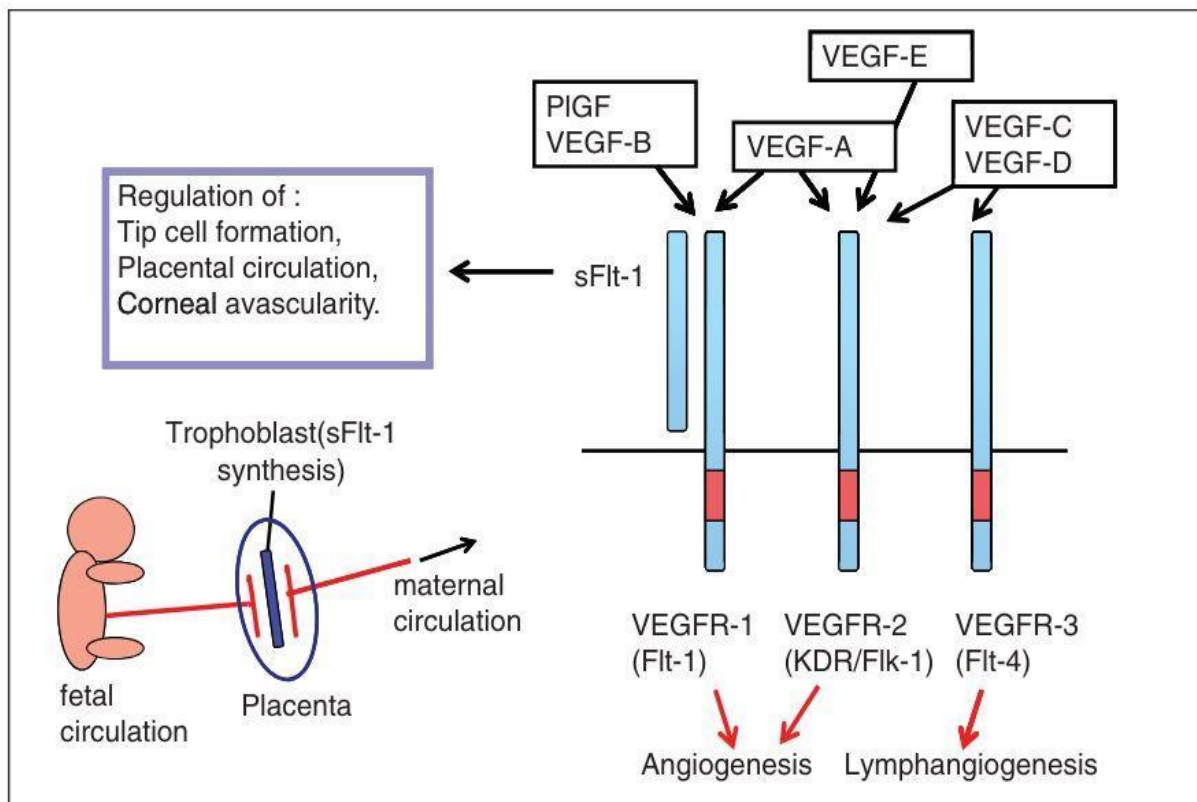


Abbildung 11: VEGF-Moleküle und ihre Rezeptoren (52)

Die Vermutung einer VEGF-Wirkung an unterschiedlichen Zelltypen konnte durch die VEGFR-1 Genexpressionsanalyse untermauert werden. Hierbei wurde eine Regulation über Hypoxie und den HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) mit einer Expression von VEGFR-1 in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) und Perizyten gezeigt (50). Die VEGF-Produktion ist ebenfalls nicht auf Endothelzellen beschränkt, sondern findet auch in Fibroblasten, Zellen der glatten Muskulatur und einigen Immunzellen statt (53).

1.3.2 VEGF-spezifische Pathogenese arteriovenöser Malformationen

Der genaue Pathomechanismus hinter der Entstehung arteriovenöser Malformationen ist bis heute nicht vollständig verstanden. Lange Zeit wurden die AVM als vollständig kongenital entstehende Malformationen eingestuft. Berichte über de-novo Entstehung, erneutes Wachstum und Progress unterstützen dieses rein kongenitale Modell nicht, sondern legen eine gewisse Neovaskularisation nahe (54). In Versuchen an einem Alk1-knockout-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zur Alk-1-Inaktivierung ein Second Hit wie das Hinzufügen einer Wunde in mukokutanem Gewebe für die AVM-Entstehung notwendig war. In einer darauf aufbauenden Versuchsreihe wurde nachgewiesen, dass in einem Wunden-induzierten-AVM-Modell die Neovaskularisation eine Rolle spielt und sich der arteriovenöse Shunt nicht durch Wachstum und Vergrößerung vorbestehender kapillärer Gefäße bildet. In diesem Modell konnte außerdem die Entstehung von AVM durch Bevacizumab inhibiert werden (55). In Zellkulturuntersuchungen von Endothelzellen aus künstlich erzeugten zerebralen arteriovenösen Malformationen in einem Rattenmodell zeigte sich eine signifikant erhöhte VEGF-Expression (56). Diese erhöhte VEGF-Expression von AVM bestätigte sich durch den Nachweis signifikant erhöhter Plasma-VEGF-Spiegel bei Patienten mit zerebralen arteriovenösen Malformationen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (54). Nach wie vor ist der Pathomechanismus arteriovenöser Malformationen nicht abschließend geklärt, es konnte jedoch eine gewisse Neovaskularisation sowie ein Zusammenhang mit dem proangiogenetischen Mitogen VEGF gezeigt werden.

1.3.3 Bevacizumab

Bei Bevacizumab handelt es sich mit einem humanisierten monoklonalen Antikörper gegen VEGF-A um den ersten zugelassenen Angiogenese-Inhibitor. Durch Bindung an VEGF-A verhindert der Antikörper die Interaktion zwischen VEGF-A und VEGF-Rezeptoren (VEGFR) und dadurch über Inhibition der Signalkaskaden eine Neovaskularisation (Abbildung 12).

Ursprünglich wurde der Antikörper für die Therapie kolorektaler Karzinome zugelassen. Heute existieren weitere Indikationen in der Krebstherapie. In In-vivo-Studien konnte gezeigt werden, dass unter Bevacizumab-Therapie das Gefäßwachstum inhibiert und ein Regress neugebildeter Gefäße induziert wurde, während Bevacizumab auch einen direkten Effekt auf Tumorzellen zu haben schien (57).

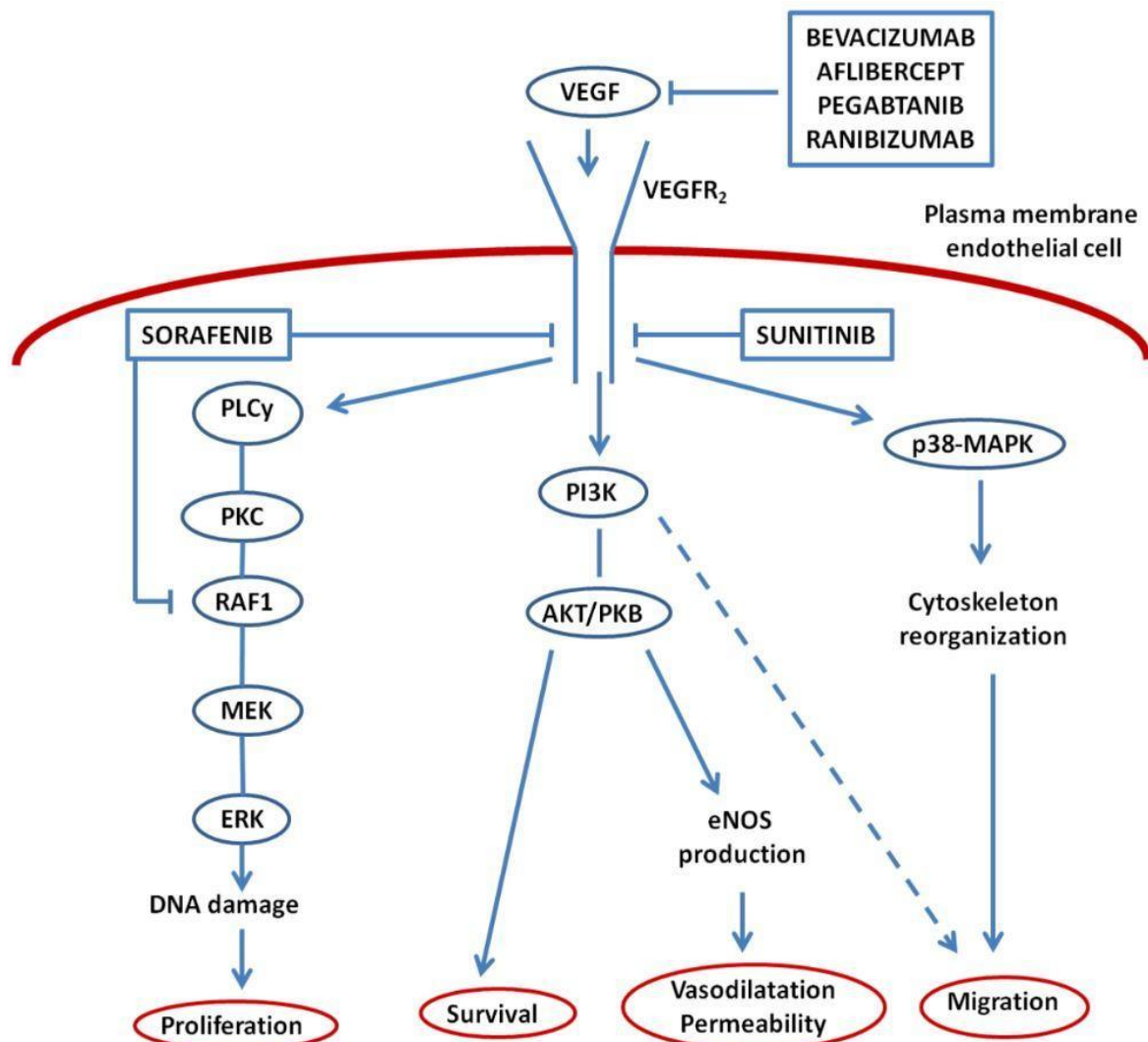


Abbildung 12: Signaltransduktion bei VEGF-A/VEGFR-2 Interaktion und potentielle medikamentöse Ansätze (58)

1.3.4 Thalidomid

Thalidomid wurde ursprünglich als Antikonvulsivum entwickelt. Bei fehlender Effizienz wurde Thalidomid daraufhin als Schlafmittel vermarktet und außerdem als Antiemetikum während der Schwangerschaft eingesetzt, bis eine schwere Teratogenität mit schwerwiegenden Fehlbildungen Neugeborener festgestellt wurde (59,60). Bei einem breiten biologischen Wirkspektrum wird Thalidomid heute als immunmodulatorisches Medikament klassifiziert. Bekannte Wirkungen sind TNF- α -Suppression, Stimulation proinflammatorischer Zytokine sowie Suppression der VEGF- und bFGF-Sekretion (basic fibroblast growth factor) und der zellulären Antwort auf

diese Botenstoffe. Daher zeigt Thalidomid einen antiangiogenetischen Effekt. Diese Wirkung konnte sich bei einigen malignen Entitäten, wie zum Beispiel dem multiplen Myelom, zunutze gemacht werden (59). An einigen spezialisierten Zentren wurde Thalidomid bereits bei Patienten mit arteriovenösen Malformationen eingesetzt und es wurde von einer positiven Wirkung auf Schmerzen und Blutungen berichtet (44).

1.4 Zielsetzung dieser Promotionsarbeit

Das Ziel dieser Promotionsarbeit liegt in der Untersuchung medikamentöser Behandlungsmöglichkeiten von arteriovenösen Malformationen im Zellkulturmodell. In Vorarbeiten am Universitätsklinikum Regensburg konnte ein Zusammenhang zwischen der Proliferation von Zellen aus AVM und VEGF-Expression beschrieben werden. Außerdem wurde eine Korrelation zwischen zyklischer mechanischer Dehnung und der VEGF-Expression in AVM-Zellen beschrieben (48). Diese Ergebnisse erlauben die Hypothese, dass eine vermehrte VEGF-Expression in arteriovenösen Malformationen stattfindet und diese einen Einfluss auf die Entstehung und den Progress des Krankheitsbildes haben. Weiterhin besteht die Vermutung, dass eine mechanische Belastung, im Sinne von fast-flow-Blutströmungseigenschaften und interventionellen Traumata im klinischen Kontext sowie als zyklische mechanische Dehnung im Zellkulturmodell, eine vermehrte VEGF-Expression und dadurch einen Krankheitsprogress zur Folge haben kann. Sollten diese Phänomene tatsächlich VEGF-vermittelt auftreten, könnten der Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab sowie das antiangiogenetische Medikament Thalidomid einen hemmenden Effekt auf das AVM-Wachstum haben. Für diese Hypothesen wurde das folgende experimentelle Konzept erstellt.

Da die Ergebnisse der Vorversuche durch die Untersuchung von Mischkulturen mit überwiegend perivaskulären Zellen aus arteriovenösen Malformationen zustande kamen, sollen für diese Promotionsarbeit ebenfalls solche Mischkulturen aus AVM verwendet werden. Als Referenzzellen dienen NHF, die morphologisch und funktionell am ehesten den perivaskulären Zellen entsprechen. Anhand dieser Zellkulturen soll der Einfluss von Bevacizumab und Thalidomid auf die Proliferation und VEGF-Expression von AVM-Zellen sowohl in Ruhe als auch unter zyklischer mechanischer Dehnung untersucht werden. Zusätzlich soll die Fähigkeit zur Bildung gefäßähnlicher Strukturen (Tube-Formation) der AVM-Zell-Mischkulturen gezeigt werden. Für diese Versuchsmodelle soll außerdem der Einfluss von Bevacizumab und Thalidomid auf diese Prozesse untersucht werden.

2 Methoden

Die Versuche dieser Doktorarbeit wurden anhand von Zellkulturen durchgeführt. Die dafür verwendeten Zellreihen stammen zum einen aus Zellisolationen arteriovenöser Malformationen (AVM), zum anderen wurden normale humane Fibroblasten (NHF) als Referenzkultur verwendet. Die NHF stammen von Bio Whittaker Europe (siehe Materialien). Die AVM-Zellen wurden intraoperativ am Universitätsklinikum Regensburg im Zeitraum vom 31.01.2018 bis zum 10.07.2019 sowie vom 07.05.2021 bis zum 01.07.2021 gewonnen und mit schriftlicher Zustimmung der Patienten aus den Malformations-Resektionen isoliert. Alle Arbeitsschritte an Zellkulturen wurden an einer sterilen Laminar-Flow-Werkbank durchgeführt.

2.1 Zellisolation aus Malformationsgewebe

Für die Medikamentenversuche wurden Malformationszellen benötigt, die aus operativen Resektionen von Malformationsgewebe durch die Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Regensburg stammen und nach Ethikvotum der Universitätsklinik Regensburg unter schriftlicher Zustimmung der Patienten für Forschungszwecke genutzt werden durften. Die pathohistologische Einteilung der Malformationen erfolgte durch das Institut für Pathologie der Universität Regensburg. Zur Vorbereitung für den Transport der im OP-Saal gewonnenen Proben in das Labor wurden 20 ml PBS gemischt mit 4 ml Heparin-Natrium (5.000 IE/ml) in einem 50-ml-Falcontube auf Eis gekühlt bereitgestellt, so dass die Probe direkt nach der Resektion gekühlt unter Verhinderung von Koagulation und Austrocknung gelagert und transportiert werden konnte. Für die Isolation wurde eine 6-Well-Platte auf zwei verschiedene Arten vorbereitet. Drei Wells wurden mit Fibronectin (0,95 µl/Well) und 1 ml Coating-Puffer behandelt und bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde der Coating-Puffer abgesaugt und die Wells drei Mal mit PBS gewaschen. Die anderen drei Wells wurden mit ECM-Gel behandelt. Das ECM-Gel wurde dafür im Kühlschrank über Nacht aufgetaut. Um eine vorzeitige Verfestigung des Gels zu verhindern, wurden die zu benutzenden Eppendorf-Spitzen, und die 6-Well-Platte ebenfalls über Nacht im Kühlschrank gelagert. An der sterilen Werkbank wurde aus demselben Grund auf Eis gearbeitet. Zur Beschichtung der Wells wurden 300 µl des aufgetauten ECM-Gels mit 300 µl gekühltem DMEM-low-glucose gemischt und dann je 200 µl des Gemischs pro Well eingesetzt und gleichmäßig verteilt. Die Platte wurde daraufhin zur Verfestigung des Gels für 40 Minuten bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ in den Brutschrank gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde der Überstand abpipettiert.

Die in PBS und Heparin-Natrium transportierte Probe wurde ebenfalls an der sterilen Werkbank auf Eis weiterverarbeitet. Zuerst wurden die Gewebestücke in eine Petrischale gegeben und mit einem sterilen Skalpell anhängende Strukturen, die nicht zur Malformation gehörten, entfernt. Das Gewebe wurde mehrfach mit einem PBS-Heparin-Gemisch gespült, um Blut auszuspülen und eine Koagulation in den Gefäßen der Malformation sowie das Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden die Gewebestücke mit dem sterilen Skalpell in schmale Streifen geschnitten, um die Oberfläche, die Kontakt mit dem ECM-Gel beziehungsweise dem Fibronectin hat, zu vergrößern. Die so gewonnenen Streifen wurden auf die Wells verteilt, nach wenigen Sekunden zur Anheftung der Streifen mit in etwa 100 µl EGM-2-Medium bedeckt und für 4-6 Stunden bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurden erneut in etwa 1000 µl EGM-2-Medium pro Well zugegeben. Die 6-Well-Platte wurde täglich kontrolliert. Abgelöste Gewebestücke wurden vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Bei sichtbarer Verfärbung des Mediums wurden erneut etwa 1000 µl EGM-2-Medium dazu pipettiert. Bei sichtbarem Wachstum wurden die Zellen weiter inkubiert bis diese 90 % konfluent waren und daraufhin trypsiniert und auf 55 cm²-T100-Platten überführt. Die hierbei gewonnenen Zellkulturen hatten damit die Passagezahl 1. Außerdem wurden die auf Fibronectin und auf ECM-Gel isolierten Zellen getrennt geführt und im weiteren Verlauf mit -FN/-ECM gekennzeichnet.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellkulturplatten coaten

Vor der Kultivierung der Zellkulturplatten, wurden diese mit Fibronectin gecoatet. Für eine P100-Platte wurden 6 µl Fibronectin eingesetzt. Für die 6-Well-Platten wurden entsprechend der Oberfläche 0,95 µl Fibronectin pro Well verwendet. Das Fibronectin wurde in einem ersten Schritt mit dem Coating-Puffer gemischt. Diese Lösung wurde auf die jeweilige Zellkulturplatte gegeben und für 30 Minuten bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ inkubiert. Nach den 30 Minuten wurde die Lösung abgesaugt, die Platte dreimal mit PBS gespült und direkt mit der Zellsuspension oder mit Medium bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern.

2.2.2 Zellen einfrieren

Durch die Isolation gewonnene Zellen sowie überschüssige Zellen der Zellkulturreihen wurden zur Lagerung bei -80°C eingefroren, sobald die Platten konfluent bewachsen waren. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die 55 cm²-T100-Platte mit sterilem PBS gewaschen. Die

Platte wurde dann mit 2 ml Trypsin behandelt und bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Zellablösung beobachtet und die Trypsinreaktion mit 5 ml EGM-2-Medium gestoppt. Nach dem Abstoppen der Trypsinreaktion wurden die Zellen in ein 15-ml-Falcontube überführt und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Suspension in dem 15-ml-Falcontube wurde bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit Einfriermedium (NHF oder AVM) resuspendiert, sodass ca. 500.000 Zellen pro ml in Kryoröhrchen pipettiert werden konnten. Diese wurden dann mit Hilfe eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälters langsam über 1°C pro Minute bei -80°C eingefroren und im -80°C-Gefrierschrank gelagert.

2.2.3 Zellen auftauen und kultivieren

Die bei -80°C in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen wurden unter leichtem Schwenken schnell in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann in ein 15-ml-Falcontube pipettiert, mit 5 ml EGM-2-Medium vermischt und daraufhin bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 10 ml EGM-2-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf eine gecoatete 55 cm²-T100-Platte pipettiert und im Brutschrank bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage.

2.2.4 Zellen passagieren

Sobald die Platten konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die P100-Platte mit sterilem PBS gewaschen. Die Platte wurde dann mit 2 ml Trypsin behandelt und bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde die Zellablösung beobachtet und die Trypsinreaktion mit 5 ml EGM-2-Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein 15-ml-Falcontube pipettiert und bei 1200 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet mit EGM-2-Medium resuspendiert und die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden dann auf gecoatete 55 cm²-T100-Platten mit ca. 500.000 Zellen pro Platte expandiert.

2.2.5 Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer

Zum Auszählen der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Diese wurde sowohl in der Zellkultur als auch zur Quantifizierung in den verschiedenen Versuchen verwendet. Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um einen Objektträger mit einer vertieften Mittelfläche sowie einem eingravierten Gitter. Auf diese Vertiefung wurde ein Deckglas gegeben und der korrekte Sitz durch die Sichtbarkeit newtonscher Ringe überprüft. Der entstandene Raum im Bereich der Vertiefung besitzt ein definiertes Volumen. Im nächsten Schritt wurden 10 µl der Zellsuspension an den Rand des Deckglases pipettiert. Für die Zählung wurde die Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Dabei wurden vier Eckquadrate eines Gitters ausgezählt. Jedes Eckquadrat beinhaltet ein Volumen von $0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ µl}$. Es muss dementsprechend ein Mittelwert aus den 4 Eckquadraten gebildet werden sowie die Zellzahl auf 1 ml genormt werden. Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl}}{4} \times 10.000 = \text{Zellzahl ml}^{-1}$$

Somit ergibt sich die Zellzahl pro Milliliter. Um die Zellzahl pro 55 cm²-T100-Platte oder Well zu berechnen, wurde noch die Verdünnung berücksichtigt, das heißt, die Zellzahl ml⁻¹ wurde mit dem Volumen (ml) multipliziert.

2.3 Zellzahl

Dieser Versuch diente der Ermittlung einer geeigneten Zellzahl auf den 6-Well-Platten, sodass das Wachstum hinreichend beurteilt werden konnte, ohne dass sich zu viele Zellen gegenseitig im Wachstum behindern.

Bei einem ersten Vorversuch zu der Medikamentenkonzentration zeigte sich, dass 20.000 Zellen pro Well zu wenig waren, um den Versuch nach 24 Stunden beginnen zu können und am Ende eine objektivierbare Zellzahl herauszubekommen. Deshalb wurden für diesen Versuch je drei Wells einer 6-Well-Platte mit NHF und drei Wells mit AVM-Zellen kultiviert. Durch Umrechnung der aus Erfahrung eingesetzten Zellzahl auf 55 cm²-T100-Platten auf die Oberfläche eines Wells der 6-Well-Platte, ergaben sich in etwa 80.000 Zellen pro Well. Die 6-Well-Platten wurden nach Protokoll gecoatet und auf diesen jeweils 50.000, 80.000 und 100.000 NHF und AVM pro Well eingesetzt. Das Wachstum wurde nach 24, 48 und 72 Stunden mikroskopisch beurteilt.

2.4 CD31⁺ Bead-Sorting

Als Marker für die Isolation von Endothelzellen aus den Mischkulturen eignet sich das Cluster-of-Differentiation-Protein CD31. Dieses wird von einigen Blutzellen sowie von Endothelzellen exprimiert, jedoch nicht von Fibroblasten oder perivaskulären Zellen. Um AVM-Endothelzellen aus der Mischkultur zu isolieren, wurden magnetische Dynabeads, welche ein CD31-IgG enthalten, benutzt.

Für die Auftrennung wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Im ersten Schritt mussten die Dynabeads gewaschen werden. Dazu wurde ein Puffer aus PBS und 0,1 % w/v BSA (Puffer 1) hergestellt. Die Dynabeads wurden suspendiert und die benötigte Menge wurde in einen Eppendorf-Cup überführt. In den Cup wurde mindestens 1 ml des zuvor hergestellten Puffer 1 gegeben und das Gemisch gevortext. Durch Platzieren des Eppendorf-Cups im Magneten wurden die Dynabeads zur magnetischen Seite hingezogen, sodass der Überstand abpipettiert werden konnte. Zuletzt wurden die Beads in dem initial eingesetzten Volumen resuspendiert.

Für die eigentliche Selektion wurden die Malformationszellen zuerst wie üblich mit PBS gewaschen, trypsiniert und die Reaktion dann mit EGM-2-Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde dann fünf Minuten bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert, sodass der Überstand abgesaugt werden konnte und die Zellen in Puffer 1 mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen ml⁻¹ in Eppendorf-Cups resuspendiert wurden. Pro 1 ml Zellsuspension wurden 25 µl der gewaschenen Dynabeads-Lösung hinzugegeben und dann für 20 Minuten bei 5°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Cups für zwei Minuten in den Magneten gestellt. Der Überstand wurde abpipettiert und später als Zellkultur AVM, CD31⁻ weiterverwendet. Zum Waschen der CD31⁺-Zellen, wurden diese dreimal in Puffer 1 resuspendiert und der Überstand abgesaugt. Nach Abschluss des Waschvorgangs wurden die Zellen mit 250 µl EGM-2-Medium pro Well auf eine gecoatete 96-Well-Platte gegeben und bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Bei der mikroskopischen Beobachtung der Zellkultur war ein starker Überschuss an Beads sichtbar. Diese hatten sich teilweise ohne Anheftung an Zellen zu größeren Formationen zusammengelegt und einen großen Teil der Oberfläche des Wells belegt. Um diese ungebundenen Dynabeads auszuwaschen, wurde bei dem ersten Mediumwechsel nach vier Tagen einmal mit PBS gewaschen. Da sich danach immer noch viele Beads in den Wells befanden, wurden die Zellen zwei Tage später trypsiniert. Bei diesem Schritt wurde ebenfalls einmal mit PBS und einmal mit 0,1 % w/v BSA-Puffer gewaschen. Die trypsinisierten Zellen wurden mit EGM-2-

Medium zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in EGM-2-Medium resuspendiert und auf drei Wells einer gecoateten 6-Well-Platte gegeben.

2.5 Wirkstoffkonzentrationen

2.5.1 Bevacizumab

Zur Ermittlung einer geeigneten Wirkstoffkonzentration mit antiangiogenetischer Wirkung ohne gleichzeitige Zytotoxizität, wurden Zellen aus arteriovenösen Malformationen (AVM) sowie normale humane Fibroblasten (NHF) mit verschiedenen Konzentrationen Bevacizumab behandelt. Dazu wurden zuerst NHF und AVM-Zellen aufgetaut und auf gecoatete 55 cm²-T100-Platten gegeben. Als diese 90–100 % konfluent bewachsen waren, wurden die Zellen trypsiniert und gezählt. Für den Versuchsaufbau wurden vier 6-Well-Platten wie im Kapitel „Zellkulturplatten Coaten“ beschrieben mit Fibronectin gecoatet. Auf diese wurden dann 20.000 Zellen mit jeweils 3 ml EGM-2-Medium pro Well gegeben. Dabei wurde die Hälfte der Wells mit AVM-Zellen kultiviert, die andere Hälfte mit NHF.

Nach 72 Stunden Inkubation der Kulturen bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ im Brutschrank ohne Mediumwechsel wurde der Versuch gestartet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und neues Medium versetzt mit Bevacizumab in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Dabei wurden 3 Wells mit NHF und 3 Wells mit AVM-Zellen als Kontrolle mit 2 ml EGM-2-Medium ohne Bevacizumab behandelt. Die anderen Wells wurden nach dem gleichen Muster, je 3 Wells NHF und 3 Wells AVM-Zellen, mit 2 ml EGM-2-Medium-Bevacizumab-Lösung mit den Bevacizumab-Konzentrationen 50 µg/ml, 100 µg/ml und 1000 µg/ml behandelt. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach den 24 Stunden wurde das Medium bei der Kontrollgruppe sowie die Lösung aus Medium mit Bevacizumab bei den Versuchsgruppen abgesaugt. Die Wells wurden dann mit PBS gewaschen, sodass die Zellen trypsiniert werden konnten. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese mit Medium in ein Falcontube pipettiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl der jeweiligen Wells ermittelt.

Um die Ergebnisse zu validieren, sollte dieser Versuch insgesamt dreimal durchgeführt werden. Aufgrund der Ergebnisse des parallellaufenden Vorversuchs zur eingesetzten Zellzahl wurde ab dem zweiten Durchlauf die eingesetzte Zellzahl auf 80.000 Zellen pro Well erhöht und die Zellen vor Einsetzen der verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen von Bevacizumab nur noch 24 Stunden bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Der weitere Versuchsablauf erfolgte genauso wie zuvor.

Das Wachstum der Zellen sollte ebenso bei einer Behandlung mit Bevacizumab über einen 48 Stunden-Zeitraum beurteilt werden. Für den Versuchsaufbau wurde genauso verfahren wie bei dem 24 Stunden Behandlungsversuch. Um über den längeren Zeitraum eine konstante Wirkstoffkonzentration zu erreichen, wurde nach 24 Stunden das jeweilige Medium der Wells abgesaugt und die gleiche Bevacizumab-Konzentration mit EGM-2-Medium erneut eingesetzt. 48 Stunden nach Behandlungsbeginn mit Bevacizumab wurden die Zellen trypsinisiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Nachdem erste Ergebnisse vorlagen und ersichtlich wurde, dass die Proliferation bei den niedrigeren Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zeigte, wurde die Bevacizumab-Konzentration auf 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml und 1000 µg/ml umgestellt. Mit den initialen Konzentrationen sowie dieser Umstellung wurde der Konzentrationsbereich abgedeckt, der in der Literatur als in-vitro Dosis mit Korrespondenz zu den klinisch relevanten Dosierungen beschrieben wird (60). Mit diesen Konzentrationen wurden drei Versuchsreihen mit 24 Stunden sowie mit 48 Stunden Behandlung durchgeführt.

2.5.2 Thalidomid

Der Versuchsaufbau für die Ermittlung einer geeigneten Thalidomid-Konzentration wurde aufgrund der Ergebnisse der Versuche zur Bevacizumab-Konzentration mit 80.000 Zellen pro Well sowie einer Inkubationszeit vor Behandlungsbeginn von 24 Stunden bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ gewählt. Der weitere Ablauf war derselbe wie in den Versuchen zur Wirkstoffkonzentration von Bevacizumab. Das Thalidomid wurde ebenfalls in EGM-2-Medium gelöst eingesetzt. Hierfür wurde Thalidomid zunächst in DMSO mit einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst. Für den Versuch wurde die Thalidomid-DMSO-Lösung mit PBS zu einer 1:10 Lösung verdünnt und dann eingesetzt. Die beobachteten Gruppen waren hier ebenfalls die Kontrolle sowie die Thalidomid-Wirkstoffkonzentrationen von 10 µM, 20 µM und 40 µM, entsprechend 2,58 µg/ml, 5,16 µg/ml und 10,32 µg/ml in EGM-2-Medium. Im Bereich dieser Molaritäten finden sich in der Literatur Hinweise auf in-vitro-Hemmung der Zellproliferation sowie eine beginnende Zytotoxizität bei 40 µM Thalidomid (61).

2.6 Zyklische mechanische Dehnung

Da sich arteriovenöse Malformationen als sogenannte fast-flow-Malformationen von anderen Gefäßmalformationen durch eine erhöhte mechanische Belastung der Gefäßwände unterscheiden, sollte diese pathophysiologische Gegebenheit in die Versuchsreihe aufgenommen werden.

Zur Simulation der mechanischen Belastung wurden 6-Well-Platten mit einer flexiblen Membran, die mittels Vakuumpumpe in einer Dehnkammer zyklisch in Bewegung versetzt wurde, verwendet.

Die Vakuumpumpe mit der Dehnkammer wurde eigens von der Labortechnik des Universitätsklinikums Regensburg für diesen Zweck entworfen (Abbildung 13). Dabei erzeugte die Dehnkammer über einen Schlauch und einen Filter einen Unterdruck von bis zu -0,3 bar auf die Dehnkammer und damit auf die 6-Well-Platte mit flexibler Membran (Abbildung 14). Wurde dieser Schwellendruck erreicht, stieg der Druck wieder auf 0 bar. Sobald dies erreicht war, startete die Vakuumpumpe den nächsten Zyklus. Dadurch wurden sowohl die Membran als auch die an ihr angehefteten Zellen zyklisch gedehnt.

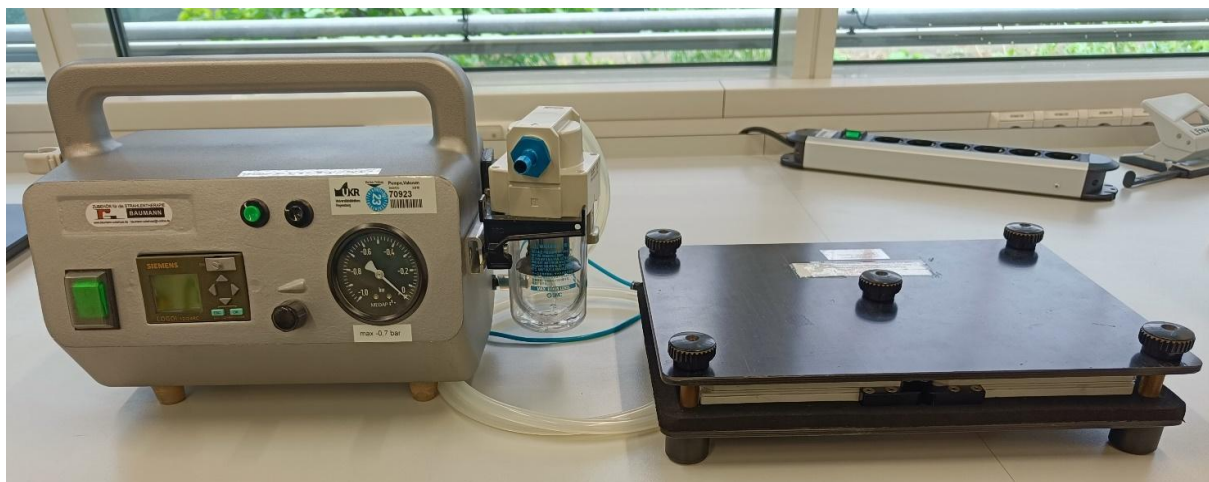


Abbildung 13: Vakuumpumpe und Dehnkammer für 6-Well-Platten mit flexibler Membran

Als Referenz wurde eine 6-Well-Platte mit flexibler Membran parallel ohne zyklische mechanische Dehnung inkubiert. Auf beiden Platten wurden jeweils zwei Wells als Kontrolle ausschließlich mit Medium sowie vier Wells als Behandlung inkubiert. Von diesen vier Wells wurden zwei mit 1000 $\mu\text{g/ml}$ Bevacizumab und zwei mit 20 μM Thalidomid behandelt. Um die Wirksamkeit der Medikamente auf die AVM-Zellen beurteilen zu können, wurde die Versuchsreihe identisch mit NHF durchgeführt.



Abbildung 14: 6-Well-Platte mit flexibler Membran

Die Platten mit der flexiblen Membran wurden genau wie bei den Proliferationsversuchen mit Fibronectin und Coating-Puffer gecoated, 30 Minuten bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ inkubiert und dann dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Daraufhin wurden 200.000 Zellen aus AVM beziehungsweise 150.000 NHF mit 2 ml Medium pro Well eingesetzt und zunächst für 24 Stunden ohne zyklische mechanische Dehnung bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ inkubiert, um eine Anheftung der Zellen zu gewährleisten. Die höhere Zellzahl im Vergleich zu den ungedehnten Proliferationsversuchen war notwendig, da sich bei Versuchen mit geringeren Zellzahlen pro Well keine ausreichenden Zell-Zell-Kontakte bildeten, sodass sich die jeweiligen Zellen unter Dehnung leicht von der flexiblen Membran lösten. Im nächsten Schritt wurde das Medium abgesaugt und für die Kontrolle 2 ml Medium, für die Behandlung Medium versetzt mit entweder Bevacizumab (Konzentration 1000 µg/ml) oder Thalidomid (Konzentration 20 µM) pro Well hinzugefügt. Für den 24-Stunden-Versuch wurde die eine Platte in die Dehnkammer gegeben und diese in den Inkubationsschrank gestellt, während die Referenzplatte ungedehnt inkubiert wurde. Der Versuchsaufbau für den 48-Stunden-Versuch war identisch. Nach Ablauf der 24 bzw. 48 Stunden, wurde das Medium abpipettiert und in 2-ml-Falcontubes bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden trypsiniert, in 2-ml-Falcontubes gegeben und die Zellzahl pro Well mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Daraufhin wurden die Falcontubes für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bei -80°C eingefroren. Der Versuch mit 24-stündiger Behandlung wurde dreimal wiederholt. Aufgrund technischer Probleme mit der Vakuumpumpe und der Dehnkammer konnte der 48 Stunden Versuch nicht dreimal durchgeführt werden.

2.7 VEGF-Nachweis mittels ELISA

Das Medium, das bei den Dehnungsversuchen abpipettiert und eingefroren wurde, sollte im Nachhinein mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) auf VEGF untersucht werden. Dafür wurde das „DuoSet ELISA Human VEGF“ von R&D Systems verwendet und nach Protokoll des Herstellers verfahren. In einem ersten Schritt wurde ein Reagenzien-Verdünnungsmittel hergestellt. Hierfür wurde PBS mit 1% BSA in ein Becherglas gegeben und für ca. 10 Minuten mit dem Magnetrührer gemischt, sodass sich das BSA lösen konnte. Daraufhin wurde die Lösung mit einem 0,2-µm-Filter steril filtriert, um ungelöstes BSA herauszufiltern. Das fertige Verdünnungsmittel wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Außerdem wurde ein Waschpuffer aus PBS und 0,05 % Tween 20 (Polysorbat 20) hergestellt. Für die weitere Vorbereitung des ELISAs wurde der Capture-Antikörper für VEGF in PBS gelöst und aliquotiert. Genauso wurden der Detection-Antikörper und der VEGF-Standard in dem zuvor hergestellten Reagenzien-Verdünnungsmittel gelöst und aliquotiert. Die Eppendorf-Cups mit den Aliquoten wurden bei -20°C eingefroren.

Um den ELISA zu starten, wurde ein Aliquot des Capture-Antikörpers aufgetaut und in 10 ml PBS gelöst, sodass sich eine Arbeitskonzentration von 1,00 µg/ml ergibt. Daraufhin wurden 100 µl der Lösung in jedes Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit einem Deckel abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die 96-Well-Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen und daraufhin mit 300 µl Reagenzien-Verdünnungsmittel pro Well geblockt. Die geblockte Platte wurde wieder abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Platte erneut dreimal gewaschen und es wurden die ersten 16 Wells in einer Doppelbestimmung mit je 100 µl des VEGF-Standards der Konzentrationen 2000 pg/ml – 31,25 pg/ml sowie einer Doppelbestimmung des Blanks befüllt. Die übrigen Wells konnten für die Bestimmung der zu untersuchenden Medienproben genutzt werden. Hierfür wurden die Eppendorf-Cups mit den Medienüberständen der Dehnungsversuche aufgetaut und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Genauso wie der Standard wurden die Medien in Doppelbestimmung untersucht. Für jede Probe wurden jeweils 100 µl des Mediums in zwei Wells pipettiert. Nachdem in alle Wells entweder der Standard oder eine Probe pipettiert worden war, wurde die Platte erneut abgedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt adsorbieren die VEGF-Moleküle an den Capture-Antikörper.

Im nächsten Schritt wurde die Platte wieder dreimal gewaschen, um nicht gebundene Substanzen aus den Wells zu entfernen, sodass nur VEGF zurückblieb. Ein Aliquot des Detection-

Antikörpers wurde in 10 ml Reagenzien-Verdünnungsmittel gelöst, sodass sich eine Arbeitskonzentration von 100 ng/ml ergab. Von dieser Lösung wurden 100 µl in jedes Well pipettiert und die Platte nochmals abgedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Detection-Antikörper bindet dabei ebenfalls an VEGF.

Die Platte wurde wieder dreimal gewaschen, um überschüssigen Detection-Antikörper zu entfernen und Streptavidin-HRP wurde 1:40 auf insgesamt 10 ml mit dem Reagenzien-Verdünnungsmittel verdünnt. Streptavidin-HRP besteht aus einer an Streptavidin gebundenen Peroxidase, die dadurch an den Detektionsantikörper binden kann. Von der Streptavidin-HRP Arbeitslösung wurden 100 µl in jedes Well pipettiert und die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne direkte Lichteinstrahlung inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde eine Lösung im Verhältnis 1:1 aus Substrate-Solution-A und Substrate-Solution-B hergestellt. Die Platte wurde nach Ablauf der 20 Minuten ein letztes Mal in drei Waschschritten gewaschen. Anschließend wurden 100 µl der 1:1-Substratlösung in jedes Well pipettiert um die Platte erneut für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne direkte Lichteinstrahlung zu inkubieren. In diesem Schritt wird durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP) die enzymatische Farbreaktion katalysiert.

Durch die Zugabe von 50 µl einer Stop-Lösung und leichtes Schwenken der Platte konnte die Enzymreaktion beendet werden. Damit war der ELISA abgeschlossen und es wurde direkt im Anschluss mittels Varioscan die optische Dichte bei 450 nm ermittelt.

2.8 Genexpressionsanalyse

2.8.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte aus den Zellpellets die bei den Dehnungsversuchen gewonnen und bei -80°C eingefroren wurden. Hierfür wurde das RNeasy Mini Kit® der Firma Qiagen verwendet. Nach Protokoll des Herstellers wurde als Erstes der RT-Puffer, bestehend aus 1 ml des RLT-Puffers und 10 µl β-Mercaptoethanol, hergestellt. Der RPE-Puffer wurde ebenfalls nach Protokoll des Herstellers in einem 1:4 Verhältnis mit Ethanol (96-100%) verdünnt.

Im ersten Schritt der Isolierung wurden 350 µl des RT-Puffers auf die Zellpellets gegeben und durch Vortexen eine homogene Suspension erzeugt. Zu der Suspension wurden 350 µl Ethanol (70 %) gegeben und mit der Pipette auf- und abpipettiert. Dabei fällt teilweise sichtbare RNA aus. Eine Zentrifugensäule wurde in einem 2-ml-Eppendorf-Cup platziert und die 700 µl Probe auf die Säule gegeben. Im Anschluss wurden die Eppendorf-Cups für 15 Sekunden bei > 8000

rpm zentrifugiert. Hierbei adsorbiert die RNA durch ionische Wechselwirkungen an einer Silicagel-Membran. Der Durchfluss wurde verworfen. Als Nächstes wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und die Eppendorf-Cups erneut für 15 Sekunden bei >8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss sowie die Eppendorf-Cups wurden verworfen. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 350 µl RW1-Puffer wiederholt. Für das Waschen wurden die Säulen dann in neuen Eppendorf-Cups platziert und 500 µl der RPE-Puffer-Ethanol-Lösung hinzugefügt. Die Eppendorf-Cups wurden wieder für 15 Sekunden bei > 8000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. In einem zweiten Durchlauf dieses Schrittes wurden die Eppendorf-Cups für 2 Minuten bei > 8000 rpm zentrifugiert, um die Silicagel-Membran zu trocknen.

Im letzten Schritt wurden die Zentrifugensäulen in 1,5-ml-Eppendorf-Cups platziert, 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säulen gegeben und die Cups für 1 Minute bei > 8000 rpm zentrifugiert. Dabei löst sich die RNA von der Silicagel-Membran und wird in die Eppendorf-Cups ausgewaschen. Nach Ende des Zentrifugierens wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers die RNA-Konzentration in dem RNase-freien Wasser bestimmt und die Cups bei -80°C eingefroren.

2.8.2 Reverse Transkription der RNA in cDNA

In Vorbereitung auf die qPCR war es notwendig, die bei den Dehnungsversuchen gewonnene RNA in cDNA zu transkribieren. Für die reverse Transkription sollte jeweils 1 µg RNA eingesetzt werden. Da sich in der Spektralphotometrie zeigte, dass in den einzelnen Proben teilweise zu wenig RNA vorhanden war, wurden die jeweiligen biologischen Duplikate aus den Dehnungsversuchen zu einer Probe zusammengeführt und erneut die RNA-Konzentration mittels Spektralphotometrie bestimmt. Das Protokoll für die reverse Transkription sah vor, dass maximal 10 µl der RNA-Lösung eingesetzt werden. Deshalb wurde bei Proben, in denen 10 µl weniger als 1 µg RNA enthielten, die vollen 10 µl eingesetzt, bei höher konzentrierten Lösungen das Äquivalenzvolumen eingesetzt und dieses dann auf 10 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Zu den RNA-Ansätzen wurden 1 µl DNTP-Mix (Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix) und 1 µl Random-Primer gegeben. Das Gemisch wurde im PCR-Cycler für 5 Minuten bei 65°C und danach für eine 1 Minute bei 4°C inkubiert. Dazu wurden dann 4 µl 5x First Strand Buffer und 2 µl 0,1 M DTT pipettiert. Die Cups wurden dann für 2 Minuten bei 25°C im PCR-Cycler inkubiert. Als Letztes wurden jeweils 1 µl Superscript II RT (reverse Transkriptase) und 1 µl H₂O hinzu pipettiert. Die Lösung wurde mehrfach auf- und abpipettiert. Das Endvolumen von 20 µl wurde für folgendes Programm im PCR-Cycler inkubiert:

1. 10 Minuten 25°C

2. 50 Minuten 42°C
3. 15 Minuten 70°C
4. Abkühlen auf 4°C

Bei diesem Zyklus entstand die cDNA durch reverse Transkription aus der RNA. Die Cups wurden am Ende auf 100 µl mit H₂O aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

2.8.3 GAPDH-PCR und Gelelektrophorese

Bevor die VEGF-RT-qPCR erfolgen konnte, sollte zunächst mit einer GAPDH-PCR und einer Gelelektrophorese nachgewiesen werden, dass in allen Proben cDNA vorhanden war und somit kein Fehler in einem der Zwischenschritte vorgefallen ist. Die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) ist ein Enzym, welches in allen menschlichen Zellen exprimiert wird und keiner Regulation unterliegt. Somit stellt der entsprechende Genabschnitt ein Haushaltsgen dar und eignet sich gut als Referenzwert für die Aktivität der Zellen.

Für die PCR wurde ein 25 µl Ansatz mit folgenden Komponenten gebildet:

12,5 µl Taq PCR Mastermix (enthält hitzestabile Taq-Polymerase), 1,0 µl GAPDH forward Primer, 1,0 µl reverse Primer, 9,5 µl H₂O (steriles, Nuklease-freies DEPC-behandeltes Wasser aus dem PCR-Kit) und 1,0 µl cDNA.

Mit diesem Ansatz wurde die PCR unter folgendem Programm im PCR-Cycler durchgeführt:

1. 1 Zyklus: 5 Minuten bei 94°C
2. 30 Zyklen: 30 Sekunden bei 94°C, 1 Minute bei 66°C, 2 Minuten bei 72°C
3. 8 Minuten bei 72°C
4. Abkühlen auf 4°C

Der Schritt 2 entspricht dabei der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation, sodass in 30 Zyklen das GAPDH-DNA-Fragment gebildet wurde.

In der Zwischenzeit wurde das Agarosegel für die Gelelektrophorese hergestellt. Es wurden 2,5 g Agarosepulver in 100 ml TBE-Puffer gegeben und für einige Minuten erhitzt. Hierzu wurden 5 µl Ethidiumbromid gegeben und das fertige Gel in die Gelkammer gegeben, um für 20 Minuten auszuhärten.

Von den fertigen PCR-Produkten wurden von jeder Probe jeweils 10 µl mit 2 µl Ladepuffer gemischt und in die Kammern des Gels pipettiert. In die erste Kammer jeder Bahn wurden 5 µl eines 25-500-bp-Standards pipettiert. Als Letztes wurde eine Spannung von 100 V angelegt und somit die Gelelektrophorese gestartet. Nach 75 Minuten wurde die Gelelektrophorese gestoppt und die Gele in einer Fotokammer fotografiert.

2.8.4 Quantitative Echtzeit-PCR (RT qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR dient der Bestimmung der Expression bestimmter Gene. In unserem Versuch sollte gezeigt werden, inwiefern sich die Expression von VEGF zwischen den AVM-Zellen und den NHF sowie zwischen den Kontrollgruppen, den Gruppen mit zyklischer mechanischer Dehnung und den Behandlungen mit Bevacizumab und Thalidomid unterscheidet. Um einen Referenzwert für die Anzahl der eingesetzten Zellen, mit denen die Menge der gebildeten cDNA korreliert, sowie für die Aktivität der Zellen zu erhalten, wurde zusätzlich zum VEGF-hu-4-Genabschnitt, als Haushaltsgen der GAPDH-Genabschnitt in der RT qPCR ermittelt. Die RT qPCR ermittelt während der PCR-Zyklen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Sybr-Green den CT-Wert (cycle-threshold) entsprechend einem Grenzwert für die Anzahl an Zyklen, ab dem der amplifizierte DNA-Abschnitt nachweisbar ist.

Die Proben sollten jeweils auf das GAPDH-Gen sowie auf das VEGF-hu-4-Gen in einer Doppelbestimmung untersucht werden. Zusätzlich erfolgte auf jeder qPCR-Platte eine Doppelbestimmung der beiden Gene für eine Standardkurve bestehend aus einem Pool der zu untersuchenden Proben sowie deren Verdünnungen im Verhältnis 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243 und eine NTC (no template control).

Zum Schutz der cDNA sowie der notwendigen Reagenzien wurden alle benötigten Substanzen langsam auf Eis aufgetaut, während des Versuchstags auf Eis gelagert, und sobald sie nicht mehr benötigt wurden, erneut bei -20°C (cDNA) oder -80°C (übrige Substanzen) eingefroren. Als Erstes wurde daraufhin jeweils ein Mastermix für die beiden Gene GAPDH und VEGF-hu-4 bestehend aus 10 µl Sybr-Green Mix, 0,5 µl Forward-Primer (GAPDHrat bzw. VEGF-hu-4), Reverse-Primer (GAPDHrat bzw. VEGF-hu-4) und 5 µl H₂O multipliziert mit der Anzahl der Wells hergestellt. Daraufhin wurden in jedes Well der Platte 16 µl des jeweiligen Mastermixes pipettiert. Außerdem wurden 4 µl der jeweiligen Probe, der Standardverdünnungsreihe oder H₂O für die NTC durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren dazugegeben, um zu gewährleisten, dass die Pipettenspitze vollständig entleert wurde. Die Platten wurden danach mit einem Coversheet abgedeckt und bei 2500 rpm für 1 Minute zentrifugiert.

Als Letztes wurden die Platten in den PCR-Cycler gestellt und die RT-qPCR mit folgendem Programm durchgeführt:

1. 1 Zyklus: 3 Minuten bei 95°C
2. 40 Zyklen: 15 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 58°C
3. 30 Sekunden bei 72°C
4. 30 Sekunden bei 95°C

Der Schritt 2 entspricht dabei den 40 Zyklen der cDNA-Amplifikation, während derer photometrisch der CT-Wert bestimmt wurde.

2.9 Tube-Formation-Assay

Da die Angiogenese in-vivo VEGF-abhängig ist, wurde, außer bei dem Kontrollansatz ohne Behandlung, VEGF-A zu den Versuchsansätzen gegeben. Als Wirkstoffkonzentrationen wurden 1000 µg/ml Bevacizumab und 20 µM Thalidomid gewählt. Thalidomid wurde, wie bei den Dehnungsversuchen, in der DMSO-PBS-Lösung verwendet, Bevacizumab in der vorgefertigten 0,9-%-NaCl-Lösung des Zytostatika-Labors. Zur Vorbereitung für die Tube-Formation-Assays wurde VEGF-A in PBS mit 0,1 % FCS mit einer Konzentration von 100 µg/ml gelöst, à 50 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die finale Konzentration an VEGF-A sollte 25 ng/ml betragen. Dadurch ergeben sich die vier Ansätze: Negativkontrolle (7 ml EBM-Medium mit 0,1 % FCS), Positivkontrolle (7 ml EBM-Medium mit 0,1 % FCS + 1,75 µl VEGF-A), Bevacizumab (3,412 ml EBM-Medium mit 0,1 % FCS + 1,75 µl VEGF-A + 3,588 ml Bevacizumab) und Thalidomid (6,991 ml EBM-Medium mit 0,1 % FCS + 1,75 µl VEGF-A + 9 µl Thalidomid).

Vor Start des Assays wurden die AVM-Zellen in 4 Wells einer mit Fibronectin gecoateten 6-Well-Platte für 24 Stunden inkubiert. Am Tag des Assay-Starts konnte somit eine Vorbehandlung mit den unterschiedlichen Ansätzen erfolgen, während die Assay-Platte vorbereitet wurde. Es wurde also das Medium abgesaugt und 4 ml des jeweiligen Ansatzes hinzugegeben und für eine Stunde bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ inkubiert. Als Nächstes musste eine 24-Well-Platte mit Matrigel gecoatet werden. Das Coaten wurde auf Eis und mit zuvor im Kühlschrank gelagerten Pipettenspitzen durchgeführt. Unter Verhinderung von Lufteingüssen wurden 150 µl Matrigel in jedes Well pipettiert und die Platte daraufhin für eine Stunde bei 37,0°C und 5,0 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit der Vorbehandlung wurden die unterschiedlichen Wells gesplittet, die Zellen ausgezählt und überschüssige Zellen verworfen. Es wurden verschiedene eingesetzte Zellzahlen für die Tube-Formation ausprobiert. In einem ersten Versuchsansatz wurden jeweils zwei Wells mit 40.000 und mit 80.000 Zellen pro Well eingesetzt. Da die 40.000 Zellen kein ausreichendes Ergebnis lieferten, erfolgten drei weitere Versuchsdurchläufe in Doppelbestimmung mit 150.000, 100.000 und 80.000 AVM-Zellen pro Well. Die Wells wurden nach 6, 24, 30 und 48 Stunden fotografiert.

Zusätzlich erfolgte eine Doppelbestimmung von NHF im VEGF-A-Ansatz (7 ml EBM-Medium mit 0,1 % FCS + 1,75 µl VEGF-A) einmal mit 150.000 Zellen pro Well und ein zweites Mal mit 75.000 Zellen pro Well. Die Auswertung der Fotos erfolgte in Hinblick auf die Anzahl

sowie die Fläche der gebildeten Tubes mit Fiji (ImageJ). Dabei wurde die Anzahl der Tubes manuell ausgezählt. Zur Bestimmung der Fläche der gebildeten Tubes wurde im ersten Schritt anhand einer am Mikroskop eingefügten Skala, die korrespondierende Pixelanzahl zur Länge in μm bestimmt. Im zweiten Schritt wurde in Fiji (ImageJ) eine Skala mit der Pixelanzahl pro μm definiert. Im letzten Schritt wurden die gebildeten Tubes manuell umfahren und anhand der definierten Skala die so eingeschlossene Fläche der Tubes bestimmt.

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism. Die statistischen Unterschiede wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-way ANOVA) gefolgt von einer Bonferroni-Korrektur bei multiplen Testen, ermittelt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Zellzahl

In diesem Versuchsaufbau wurde die geeignete Zellzahl von NHF und AVM-Zellen für die Versuche auf 6-Well-Platten sowie den speziellen 6-Well-Platten mit flexibler Membran für die zyklische mechanische Dehnung ermittelt. Die Zellen wuchsen vor dem Versuchsstart 24 Stunden auf der Oberfläche an. Anschließend wurde das Wachstum über 48 Stunden ermittelt. Deshalb war ein Beobachtungszeitraum von 72 Stunden notwendig.

Nach 72 Stunden zeigte sich in den Wells mit 50.000 NHF und AVM-Zellen noch kein konfluentes Wachstum. In den Wells mit 80.000 Zellen war das Wachstum nach 72 Stunden subkonfluent (Abbildung 15). Bei 100.000 Zellen pro Well zeigte sich ein konfluentes Wachstum bereits vor Ablauf der 72 Stunden und die Zellen begannen sich nach 72 Stunden zum Teil loszulösen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde für die Folgeversuche eine initiale Zellzahl von 80.000 pro Well gewählt.

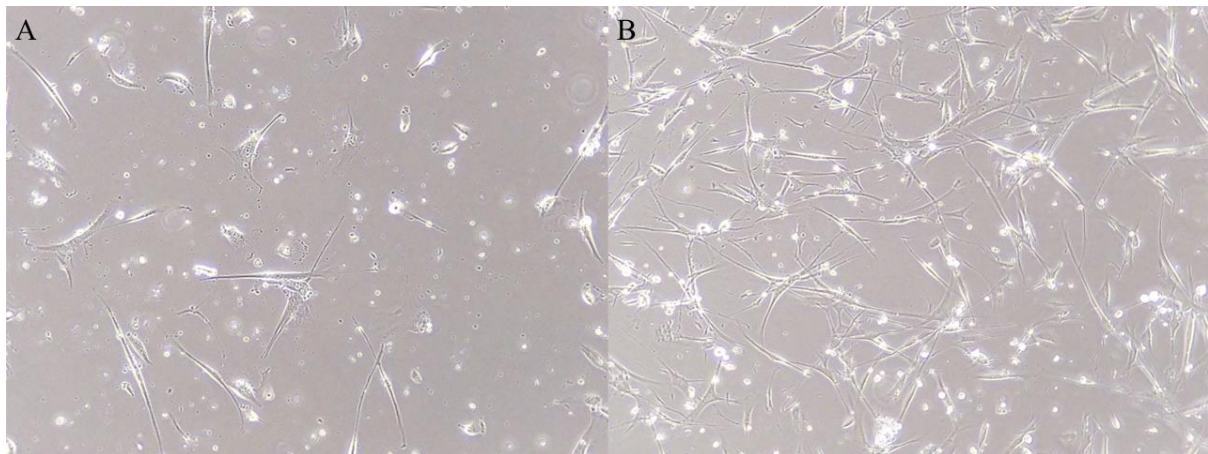


Abbildung 15: AVM-Zellzahl nach 72 Stunden Wachstum

(A): AVM-Zellen mit nicht konfluentem Wachstum nach 72 Stunden (eingesetzt 50.000 AVM-Zellen) (B): AVM-Zellen mit subkonfluentem Wachstum nach 72 Stunden (eingesetzt 80.000 AVM-Zellen)

3.2 CD31⁺-Bead-Sorting

Das Bead-Sorting mit magnetischen Beads und daran fixierten Anti-CD31-IgG erlaubt das Auftrennen der Zellen aus AVM-Mischkulturen nach dem Merkmal CD31⁺ und CD31⁻. CD31 findet sich auf Endothelzellen, sodass durch diesen Versuch die Unterscheidung dieser von perivaskulären Zellen möglich war.

Abbildung 16A demonstriert das Aussehen der Beads unter dem Mikroskop. Man erkennt durch eine sehr hohe eingesetzte Zahl an Dynabeads die Adhäsion sowohl an Zellen von fibroblastischem als auch endothelähnlichem Wachstumstyp. Bei Einsetzen geringerer Dynabeads Konzentrationen und darauffolgend mehreren Waschgängen und Splitten der Zellkultur erhält man ein Wachstumsmuster wie in Abbildung 16B mit überwiegend Zellen von endothelähnlichem Typ, welche CD31-positiv sind, durchsetzt mit vereinzelt Zellen von fibroblastischem Wachstumstyp. Diese mikroskopischen Beobachtungen beweisen das Vorhandensein von sowohl Endothelzellen als auch perivaskulären Zellen. Anhand des typischen mikroskopischen Zellbilds nach Versuchsauswertung der weiteren Versuchsreihen ließ sich im Vergleich mit der Morphologie CD31⁺- und CD31⁻-Zellen festmachen, dass der überwiegende Wachstumstyp hier den perivaskulären Zellen entsprach.

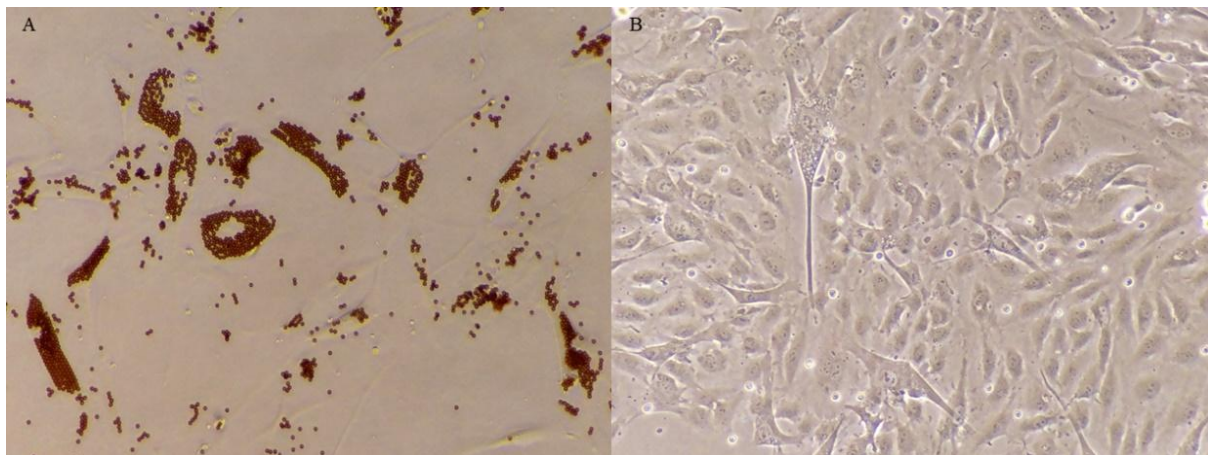


Abbildung 16: AVM-Zellen nach Bead-Sorting mit Anti-CD31-IgG-Beads

(A): AVM-Zellen, nach erstem Bead-Sorting mit sehr hoher Anzahl an Beads (B): Überwiegend CD31⁺-Zellen aus AVM-Kultur mit endothelartigem Wachstum

3.3 Wirkstoffkonzentrationen

3.3.1 Bevacizumab

Die Zellproliferation von AVM-Zellen und NHF unter Behandlung mit Bevacizumab in den Konzentrationen 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml und 1000µg/ml wurde in zwei verschiedenen Versuchsreihen nach einmal 24 Stunden und einmal 48 Stunden anhand der posttherapeutischen Zellzahl bestimmt.

Nach 24 Stunden Behandlung der AVM-Zell-Mischkultur mit Bevacizumab 1000µg/ml zeigte sich das Wachstum um 37,44% signifikant ($p=0,0176$) gesenkt im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe. Ebenfalls erkennt man ein geringeres Wachstum bei 250 µg/ml (9,48%), 500 µg/ml (20,38%) und 750 µg/ml 26,07%). Diese Ergebnisse sind jedoch bei $p > 0,05$ nicht

signifikant (Abbildung 17A). Betrachtet man das Wachstum als prozentuales Wachstum bezogen auf das Zellwachstum der Kontrollpopulation, ergibt sich ein um 25,87 % signifikant geringeres Wachstum ($p = 0,0202$) bereits bei 500 $\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 17B). In der Vergleichsgruppe der NHF ließ sich keine signifikante Minderung im Wachstum der Zellkulturen durch Behandlung mit Bevacizumab nachweisen (Abbildung 17E, F).

Bei Behandlung der AVM-Zellen über 48 Stunden mit 1000 $\mu\text{g/ml}$ Bevacizumab ließ sich das Wachstum um 49,28 % signifikant ($p = 0,0038$) senken (Abbildung 17C). Hier lässt sich in der prozentualen Umrechnung bereits eine signifikante ($p = 0,0446$) Senkung (15,22 %) des Zellwachstums mit 250 $\mu\text{g/ml}$ Bevacizumab erkennen (Abbildung 17D). Auch nach 48 Stunden Behandlung der NHF mit Bevacizumab zeigt sich kein signifikant verändertes Wachstum im Vergleich zu der Kontrollkultur (Abbildung 17G, H).

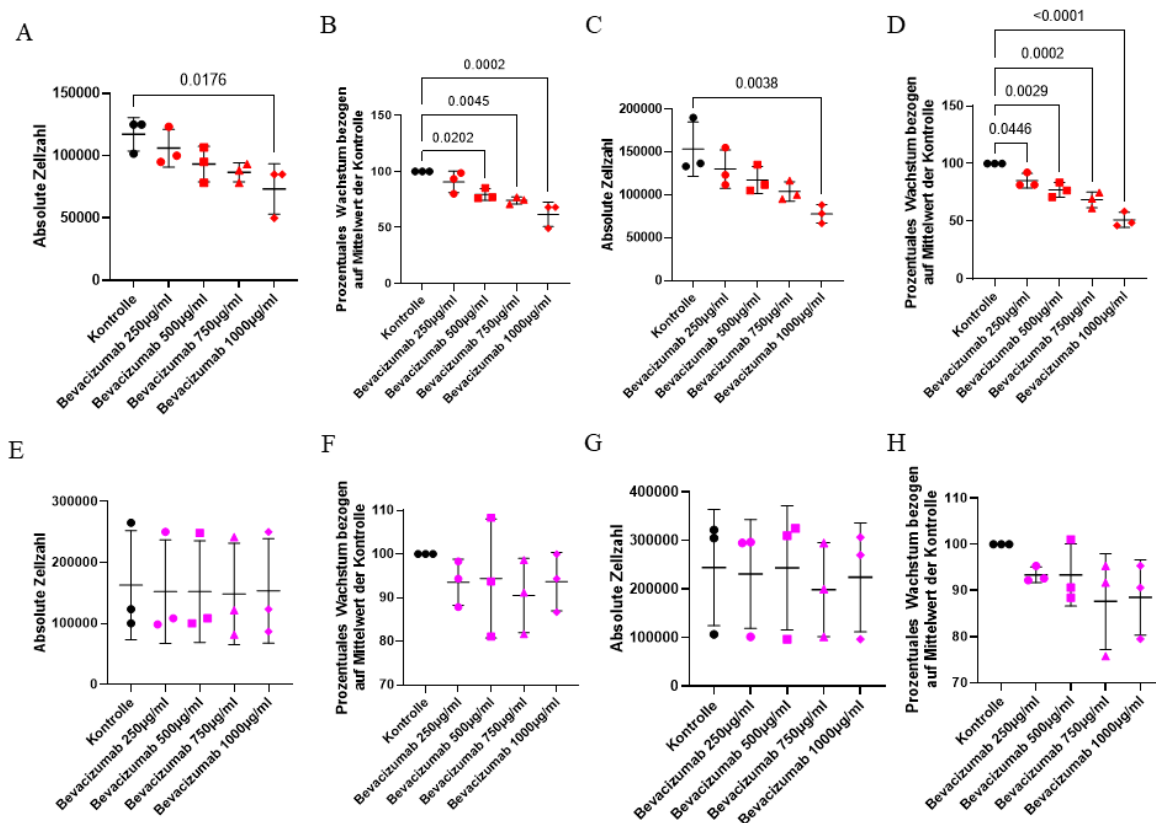


Abbildung 17: Proliferation Bevacizumab

(A): Absolute Zellzahlen der AVM-Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit Bevacizumab in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ sowie unbehandelte Kontrolle (B): Relative Zellzahlen der AVM-Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit Bevacizumab in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ sowie unbehandelte Kontrolle (C): Absolute Zellzahlen der AVM-Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit Bevacizumab in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ sowie unbehandelte Kontrolle (D): Relative Zellzahlen der AVM-Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit Bevacizumab in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ sowie unbehandelte Kontrolle (E): Absolute Zellzahlen der NHF nach 24 Stunden Behandlung mit Bevacizumab in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ sowie unbehandelte Kontrolle (F): Relative Zellzahlen der NHF nach 24 Stunden Behandlung mit Bevacizumab in von 250 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ sowie unbehandelte Kontrolle (G): Absolute Zellzahlen der NHF nach 48 Stunden Behandlung mit Bevacizumab in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ sowie unbehandelte Kontrolle (H): Relative Zellzahlen der NHF nach 48 Stunden Behandlung mit Bevacizumab in Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ sowie unbehandelte Kontrolle

Die Ergebnisse zeigen zusammenfassend eine signifikante Inhibition der Proliferation von Zellen aus arteriovenösen Malformationen in der Zellkultur unter Behandlung mit Bevacizumab. Da sich signifikante Ergebnisse vor allem unter der Bevacizumab-Konzentration 1000 µg/ml zeigten, wurde diese Konzentration für die weiteren Versuchsreihen gewählt.

3.3.2 Thalidomid

Die Zellproliferation von AVM-Zellen und NHF wurde analog zu dem vorherigen Versuch auch mit Thalidomid in den Konzentrationen 2,58 µg/ml, 5,16 µg/ml und 10,32 µg/ml (entsprechend 10 µM, 20 µM und 40 µM, im Folgenden werden aufgrund der Übersichtlichkeit die Molaritäten verwendet) durchgeführt.

Durch Thalidomid 40 µM ließ sich in den Proliferationsversuche der AVM nach 24 Stunden ein um 40,89 % signifikant ($p = 0,0104$) verringertes Wachstum im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe erzielen (Abbildung 18A). Wird hier ebenfalls das Wachstum als prozentual im Vergleich zur Kontrollgruppe berechnet, erkennt man eine Signifikanz ($p = 0,0336$) bereits bei Behandlung mit 20 µM Thalidomid durch ein um 23,01 % verringertes Wachstum (Abbildung 18B). Nach 48 Stunden Proliferation und Behandlung mit Thalidomid lässt sich ein signifikant ($p = 0,0283$) verringertes Wachstum um 26,91 % bereits in der 10 µM Gruppe verzeichnen. Nach Umrechnung auf ein prozentuales Wachstum in Bezug auf die Kontrollgruppe, ist eine Signifikanz ($p = 0,0217$) erst ab 20 µM (33,78%) zu erkennen (Abbildung 18C, D). Im Vergleich dazu ließ sich das Wachstum in den Referenzkulturen der NHF nicht durch die Behandlung mit Thalidomid signifikant hemmen (Abbildung 18E-H).

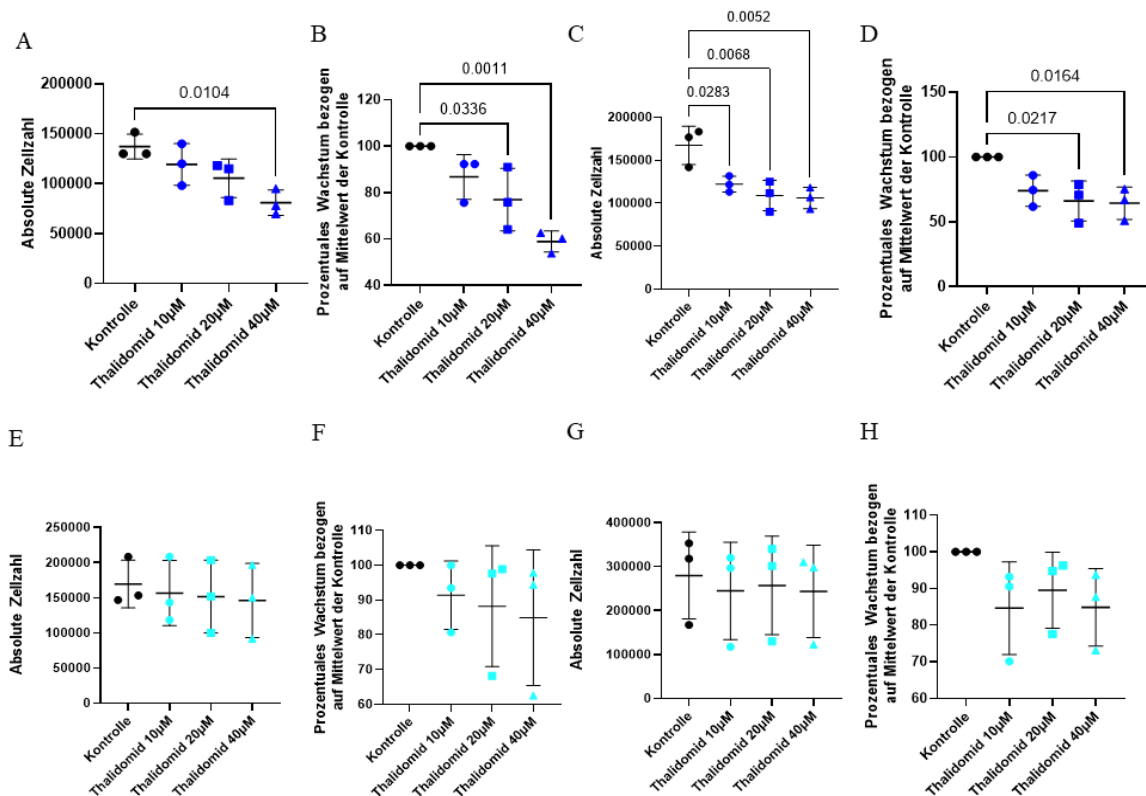


Abbildung 18: Proliferation Thalidomid

(A): Absolute Zellzahlen der AVM nach 24 Stunden Behandlung mit Thalidomid in Konzentrationen von 10 µM bis 40 µM sowie unbehandelte Kontrolle (B): Relative Zellzahlen der AVM-Zellen nach 24 Stunden Behandlung mit Thalidomid in Konzentrationen von 10 µM bis 40 µM sowie unbehandelte Kontrolle (C): Absolute Zellzahlen der AVM-Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit Thalidomid in Konzentrationen von 10 µM bis 40 µM sowie unbehandelte Kontrolle (D): Relative Zellzahlen der AVM-Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit Thalidomid in Konzentrationen von 10 µM bis 40 µM sowie unbehandelte Kontrolle (E): Absolute Zellzahlen der NHF nach 24 Stunden Behandlung mit Thalidomid in Konzentrationen von 10 µM bis 40 µM sowie unbehandelte Kontrolle (F): Relative Zellzahlen der NHF nach 24 Stunden Behandlung mit Thalidomid in Konzentrationen von 10 µM bis 40 µM sowie unbehandelte Kontrolle (G): Absolute Zellzahlen der NHF nach 48 Stunden Behandlung mit Thalidomid in Konzentrationen von 10 µM bis 40 µM sowie unbehandelte Kontrolle (H): Relative Zellzahlen der NHF nach 48 Stunden Behandlung mit Thalidomid in Konzentrationen von 10 µM bis 40 µM sowie unbehandelte Kontrolle

Die Proliferation von AVM-Zellen wurde durch Thalidomid signifikant gehemmt. Bei teilweise bereits signifikanter Inhibition der Proliferation durch 20 µM Thalidomid, wurde diese Molarität für alle weiteren Versuchsreihen gewählt.

3.4 Zyklische mechanische Dehnung

In der Versuchsreihe der zyklischen mechanischen Dehnung wurde die pathophysiologisch in arteriovenösen Malformationen vorkommende mechanische Scherbelastung auf die Zellen simuliert.

In der Kontrollgruppe ohne zyklische mechanische Dehnung konnte hier ebenfalls ein signifikant verringertes Wachstum nach 24 Stunden Behandlung mit Bevacizumab 1000 µg/ml ($p = 0,0286$) und Thalidomid 20 µM ($p = 0,0064$) gezeigt werden (Abbildung 19A). Auch hier lässt

sich das Ergebnis als prozentuales Wachstum in Bezug auf die Kontrollgruppe ohne Medikamentenbehandlung darstellen, wodurch man die p-Werte 0,0075 für Bevacizumab 1000 µg/ml und 0,0328 für Thalidomid 20 µM erhält (Abbildung 19B). In den Kulturen, die über 24 Stunden zyklisch mechanisch gedehnt wurden, lässt sich eine leichte Tendenz zu einem geringeren Wachstum gegenüber der ungedehnten Kontrolle erkennen, jedoch kann man keine signifikanten Unterschiede verzeichnen (Abbildung 19A, B). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der ungedehnten Gruppen, weisen die mit Bevacizumab und Thalidomid behandelten Kulturen nach 24 Stunden zyklischer mechanischer Dehnung lediglich ein geringfügiges und nicht signifikantes vermindertes Wachstum gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf (Abbildung 19A, B).

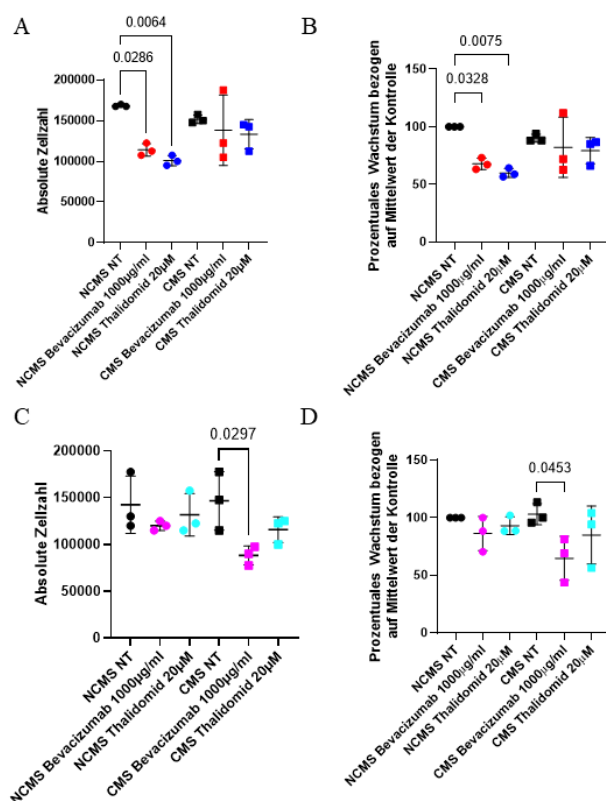


Abbildung 19: Zyklische mechanische Dehnung

(A): Absolute Zellzahlen der AVM-Zellen nach 24 Stunden zyklischer mechanischer Dehnung und unbehandelte Kontrollen (B): Relative Zellzahlen der AVM-Zellen nach 24 Stunden zyklischer mechanischer Dehnung und unbehandelte Kontrollen (C): Absolute Zellzahlen der NHF nach 24 Stunden zyklischer mechanischer Dehnung und unbehandelte Kontrollen (D): Relative Zellzahlen der NHF nach 24 Stunden zyklischer mechanischer Dehnung und unbehandelte Kontrollen

NCMS = no cyclic mechanical stretching CMS = cyclic mechanical stretching NT = no treatment

Beachtet man, dass initial 200.000 AVM-Zellen beziehungsweise 200.000 NHF pro Well eingesetzt wurden, erkennt man, dass unabhängig von der Behandlungsgruppe sowohl bei den AVM-Zellen als auch bei den NHF keine objektivierbare Zellproliferation stattgefunden hat (Abbildung 19A, C). Tatsächlich wurden in allen Versuchsansätzen weniger als die initialen 200.000 Zellen ausgezählt.

Betrachtet man dazu im Vergleich die Bilder der AVM-Zellen nach 24 Stunden Wachstum auf den 6-Well-Platten mit flexibler Membran aber noch vor Dehnungsstart, erkennt man sowohl Zellen mit typischer Wachstumsform der perivaskulären Zellen mit guter Adhäsion an die Platte, als auch kleinere kugelige Zellen, in denen nur wenig Zytoplasma um den Zellkernen zu erkennen ist (Abbildung 20). Die Zweiten entsprechen Zellen, bei denen keine Adhäsion an die Oberfläche der Platte stattgefunden hat. Mit dem Mediumwechsel vor Versuchsstart wurden diese abgesaugt, sodass die tatsächliche Zellzahl zum Start der zyklischen mechanischen Dehnung dementsprechend geringer als 200.000 Zellen pro Well war.

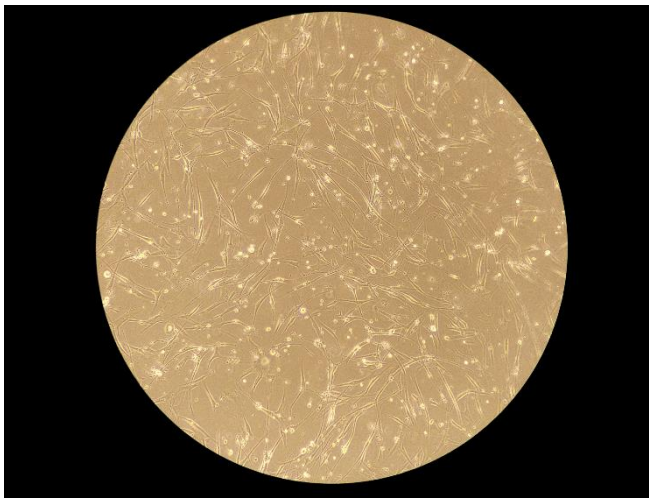


Abbildung 20: AVM-Zellen nach 24 Stunden Proliferation auf 6-Well-Platte mit flexibler Membran vor CMS-Start

Abbildung 21 zeigt exemplarisch die verschiedenen Untersuchungsgruppen am Versuchsende. Die mikroskopische Beobachtung dient hier als orientierende Einordnung des Wachstumsmusters und der Konfluenz der jeweiligen Versuchsansätze. Im Einklang mit den manuell ausgezählten Ergebnissen, lässt sich auch hier kein eindeutiger Unterschied in der Konfluenz oder dem Wachstumsmuster der verschiedenen Untersuchungsgruppen feststellen.

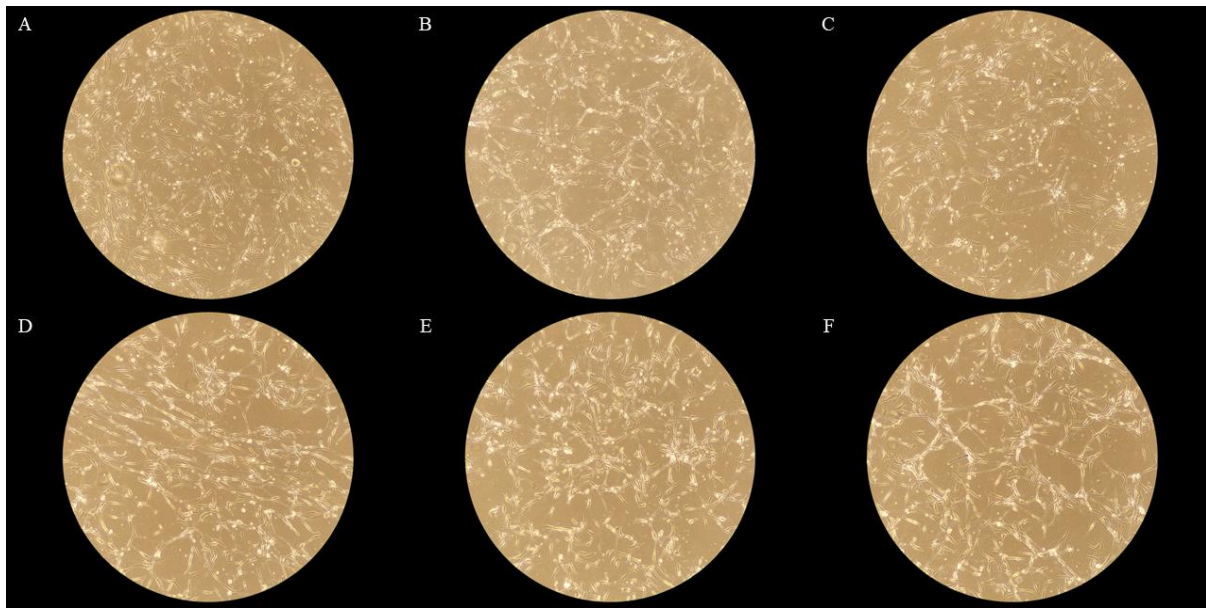


Abbildung 21: AVM-Zellen nach zyklischer mechanischer Dehnung

(A): NCMS NT (B): NCMS Bevacizumab 1000 $\mu\text{g/ml}$ (C): NCMS Thalidomid 20 μM (D): CMS NT (E): CMS Bevacizumab 1000 $\mu\text{g/ml}$ (F): CMS Thalidomid 20 μM

NCMS = no cyclic mechanical stretching CMS = cyclic mechanical stretching NT = no treatment

Zusammenfassend ließen sich die Ergebnisse bezüglich der Medikamentenbehandlung aus den Proliferationsversuchen auf den Platten ohne zyklische mechanische Dehnung reproduzieren. Unter zyklischer mechanischer Dehnung hingegen zeigte sich durch Bevacizumab und Thalidomid kein signifikant reduziertes Wachstum gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe.

3.5 VEGF-Nachweis mittels ELISA

Mittels VEGF-ELISA sollte gezeigt werden, inwiefern sich die zyklische mechanische Dehnung auf VEGF-Level auswirkt und wie sich die VEGF-Bildung durch die AVM-Zellen mittels Bevacizumab und Thalidomid hemmen lässt.

Man erkennt im Vergleich der beiden Gruppen NCMS NT (no cyclic mechanical stretching, no treatment) und CMS NT (cyclic mechanical stretching, no treatment), welche den Kontrollen ohne medikamentöse Behandlung entsprechen, dass unter zyklischer mechanischer Dehnung eine Tendenz zur vermehrten VEGF-Bildung besteht (Abbildung 22A).

In Abbildung 22A erkennt man außerdem eine signifikant ($p = 0,0132$) verringerte VEGF-Bildung in der NCMS Bevacizumab Gruppe im Vergleich zu der NCMS-Gruppe ohne medikamentöse Behandlung. Eine ähnliche Entwicklung zeigt sich innerhalb der Gruppen mit zyklischer mechanischer Dehnung, wo ebenfalls die VEGF-Bildung signifikant ($p = 0,0009$) geringer in der CMS Bevacizumab im Vergleich zur CMS-Gruppe ohne Behandlung ist (Abbildung 22A).

Unter Behandlung mit Thalidomid ließ sich weder in der NCMS- noch in der CMS-Gruppe eine verringerte VEGF-Bildung im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne medikamentöse Behandlung verzeichnen (Abbildung 22A).

Bei bereits im Medium vorhandenem VEGF lässt sich ebenfalls im Kontrollversuch mit den NHF VEGF im ELISA nachweisen. Unter Bevacizumab-Behandlung wurde das VEGF analog zum Versuch mit AVM-Zellen eliminiert, sodass sich hier signifikant niedrigere VEGF-Level zeigen (Abbildung 22B). Durch Thalidomid ließ sich der bereits vorhandene Wachstumsfaktor VEGF nicht eliminieren (Abbildung 22B).

Weiterhin erkennt man im Vergleich von Abbildung 22A und Abbildung 22B, dass die VEGF-Level im Versuchsansatz mit den AVM-Zellen durchschnittlich höher sind als in den Kontrollgruppen mit NHF.

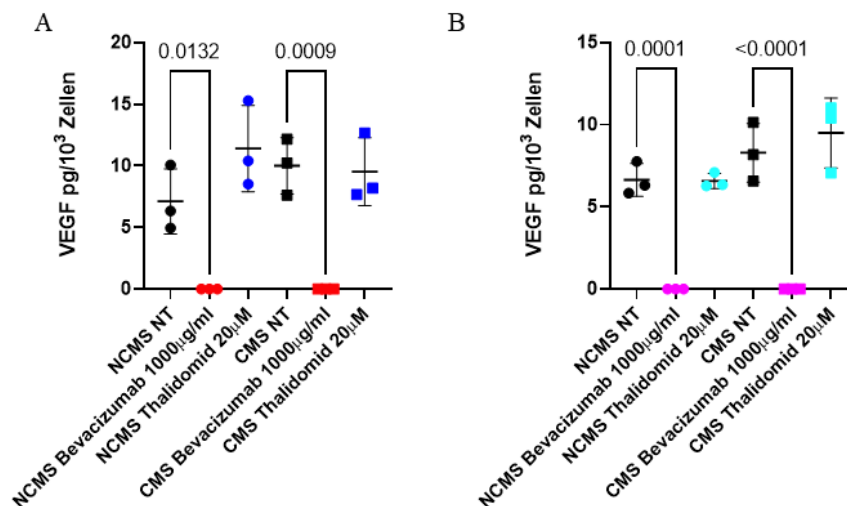


Abbildung 22: VEGF-ELISA

(A): VEGF-ELISA AVM (B): VEGF-ELISA NHF

NCMS = no cyclic mechanical stretching CMS = cyclic mechanical stretching NT = no treatment

Zusammenfassend lassen sich tendenziell erhöhte VEGF-Level in den Versuchen mit AVM-Zellen, sowie ebenfalls eine in der Tendenz verstärkte VEGF-Bildung in der zyklischen mechanischen Dehnung festhalten. Bevacizumab führte zu einer vollständigen Suppression messbarer VEGF-Level im ELISA, wohingegen Thalidomid keinen signifikanten Effekt auf die posttherapeutischen VEGF-Werte hatte.

3.6 VEGF-Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR

Die VEGF-Genexpression der AVM-Zellen sowie der NHF-Kulturen als Referenz wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Hierbei zeigten die Zellen aus arteriovenösen Malformationen in der

Gruppe mit zyklischer mechanischer Dehnung, aber ohne Medikamentenbehandlung (CMS NT), eine um 66,6 % gesteigerte VEGF-Genexpression im Vergleich zur Gruppe ohne Behandlung und zyklischer mechanischer Dehnung (NCMS NT) (Abbildung 23A).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei zyklischer mechanischer Dehnung die VEGF-Genexpression durch Bevacizumab (CMS-Bevacizumab) um 45,6 % ($p=0,1966$) im Vergleich zur nicht medikamentös behandelten Gruppe (CMS NT) gesenkt werden konnte. Eine Thalidomid-Behandlung (CMS-Thalidomid) führte mit einer um 64,6 % ($p=0,0333$) verminderten Genexpression zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zur nicht medikamentös behandelten Gruppe (CMS NT).

Ohne zyklische mechanische Dehnung ließen sich jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen (NCMS-Bevacizumab und NCMS-Thalidomid) und der Kontrolle (NCMS NT) feststellen

In der Referenzgruppe der NHF konnte kein Unterschied zwischen nicht gedehnter (NCMS NT) und zyklisch mechanisch gedehnter Gruppe (CMS NT) festgestellt werden. Ebenfalls ließ sich keine verminderte Genexpression durch die beiden medikamentösen Therapien verzeichnen. Im Gegenteil stellt sich eine gesteigerte VEGF-Genexpression normiert auf GAPDH unter Bevacizumab-Behandlung sowohl bei der Kontrollgruppe ($p=0,0014$) als auch in der Gruppe mit zyklischer mechanischer Dehnung ($p=0,0010$) dar (Abbildung 23B).

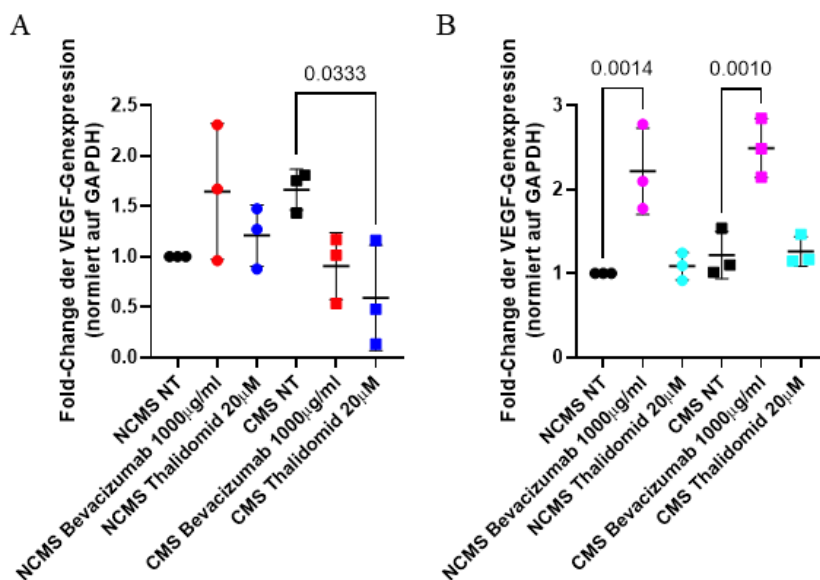


Abbildung 23: Fold-Change der VEGF-Genexpression (normiert auf GAPDH)

(A): VEGF-Genexpression in AVM-Zellen (B): VEGF-Genexpression in NHF

NCMS = no cyclic mechanical stretching CMS = cyclic mechanical stretching NT = no treatment

Insgesamt zeigten die AVM-Zellen eine verstärkte VEGF-Genexpression durch die zyklische mechanische Dehnung. Dieser Effekt ließ sich bei zyklischer mechanischer Dehnung sowohl durch Bevacizumab als auch durch Thalidomid hemmen, wobei nur die Ergebnisse durch letzteres Medikament signifikant waren.

3.7 Tube-Formation-Assay

Der Tube-Formation-Assay evaluierte die Fähigkeit arteriovenöser Malformationszellen im Gegensatz zu Fibroblasten gefäßähnliche Strukturen (Tubes) zu bilden. Des Weiteren wurde untersucht, inwiefern sich die Bildung solcher gefäßähnlichen Strukturen durch Bevacizumab und Thalidomid hemmen lässt.

In der Auswertung der Anzahl gebildeter Tubes sowie deren Fläche erkennt man, dass die AVM-Zellen in der Negativkontrollgruppe, in der sich Medium ohne VEGF in den Wells befand, kaum Tubes gebildet haben. Dahingegen zeigt sich bei der Positivkontrolle unter Zugabe von VEGF-A eine signifikant ($p = 0,0216$) erhöhte Bildung an Tubes (Abbildung 24A und Abbildung 25A, B). Ebenso steigt mit der Anzahl der Tubes auch die Fläche, die diese gefäßähnlichen Formationen umschließen (Abbildung 24B und Abbildung 25A, B).

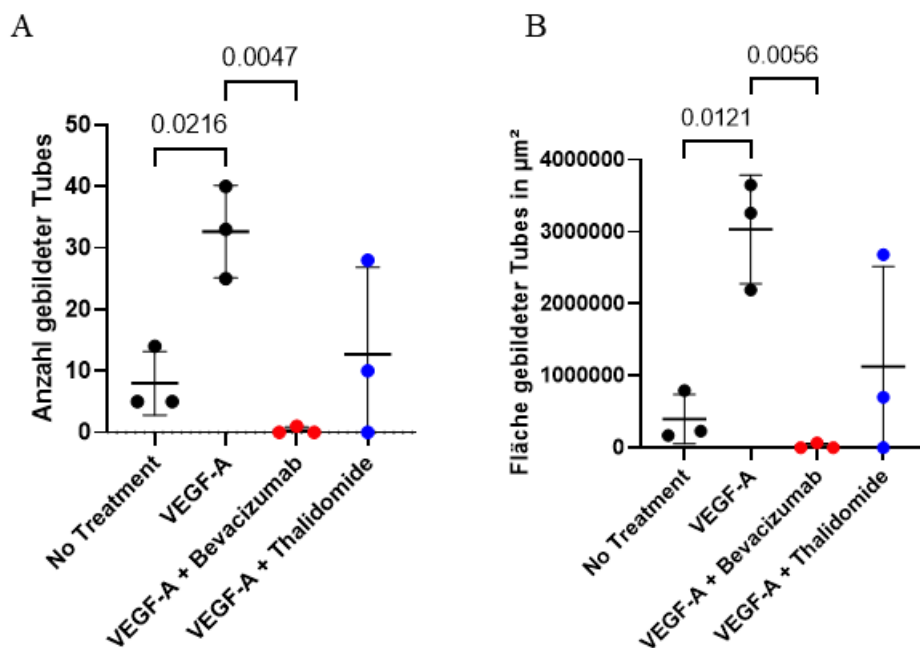


Abbildung 24: Tube-Formation-Assay mit AVM-Zellen

(A): Anzahl der gebildeten Tubes (B): Fläche der gebildeten Tubes

In der Versuchsreihe ließ sich außerdem die Anzahl gebildeter Tubes durch Zugabe von Bevacizumab zu dem Medium mit VEGF-A um 98,98 % senken ($p = 0,0047$) (Abbildung 24A). Analog dazu ließ sich auch die gebildete Fläche durch Bevacizumab um 99,26 % senken ($p =$

0,0056) (Abbildung 24B). Diese Hemmung der Tube-Bildung zeigt sich ebenfalls im exemplarischen mikroskopischen Bild eines durchgeführten Tube-Formation-Assays (Abbildung 25C), in dem sich keine gefäßähnlichen Strukturen erkennen lassen. Auch durch Thalidomid ließ sich die Anzahl und die Fläche der gebildeten Tubes um 61,22 % ($p = 0,0595$) beziehungsweise 62,80 % ($p = 0,0613$) senken (Abbildung 24). Dies spiegelt sich in den mikroskopischen Bildern wider, wo man durchaus eine Bildung von Tubes erkennen kann (Abbildung 25D), jedoch deutlich weniger ausgeprägt als in der VEGF-A-Kontrolle ohne Behandlung (Abbildung 25B).

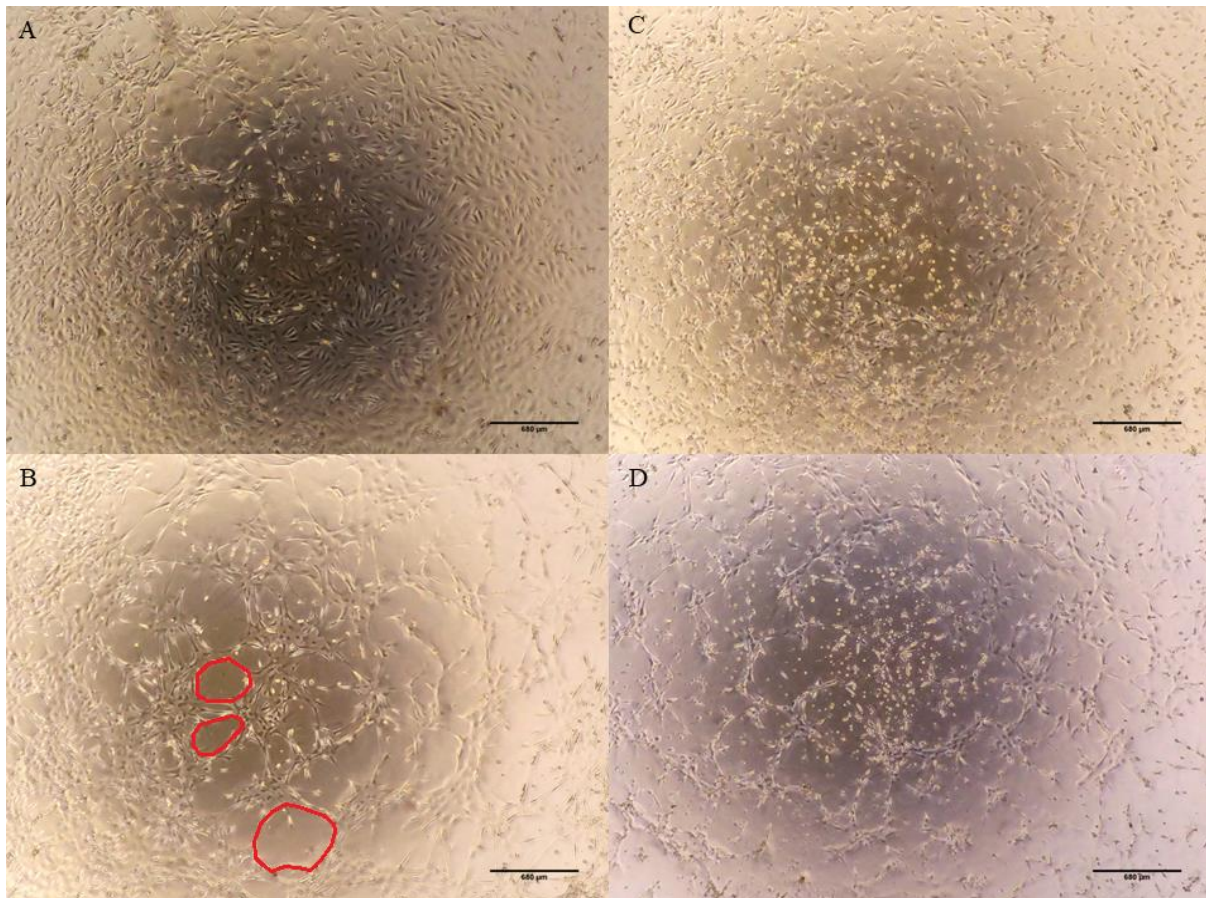


Abbildung 25: Exemplarisches Bild der Tube-Formation-Assays mit AVM-Zellen

(A): Kontrollmedium ohne VEGF (B): Zugabe von VEGF-A zu Medium, Tubes exemplarisch rot markiert (C): Zugabe von VEGF-A und Bevacizumab 1000 µg/ml zu Medium (D): Zugabe von VEGF-A und Thalidomid 20 µM zu Medium

Abbildung 26 zeigt das mikroskopische Ergebnis eines Tube-Formation-Assays mit NHF und dem Positivkontrollansatz, entsprechend Medium versetzt mit VEGF-A. Anhand der Abbildung kann man erkennen, dass Fibroblasten auch unter VEGF-A-Stimulation keine Tubes bilden.



Abbildung 26: Tube-Formation-Assay mit NHF

4 Diskussion

4.1 Wirkung von Bevacizumab und Thalidomid auf AVM-Zellproliferation

Bevacizumab und Thalidomid sind antiangiogenetische Medikamente, die in dieser Promotionsarbeit zu der in-vitro-Behandlung arteriovenöser Malformationen zum Einsatz kamen. Anhand der Ergebnisse der Proliferationsversuche mit verschiedenen Konzentrationen von Bevacizumab und Thalidomid ließ sich ein signifikant gehemmtes Wachstum der AVM-Zellen durch diese beiden Medikamente feststellen. Diese antiangiogenetische Wirkung von Bevacizumab und Thalidomid in-vitro findet sich in der aktuellen Literatur wieder. Für Bevacizumab konjugiert in Quantum Dots wurde eine signifikant verminderte Neovaskularisation im CAM-Assay (chorio-allantoic membrane assay) nachgewiesen (61). Thalidomid wies in einem Proliferations-Assay an HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) eine signifikante Inhibition der Proliferation auf (62).

Im Vergleich zu dieser in-vitro Proliferationshemmung der Zellkulturen weist die aktuelle Literatur ähnliche Ergebnisse im Tierversuch zu arteriovenösen Malformationen auf. Eine labor-technisch induzierte Angiogenese und AVM-Bildung ließen sich durch Bevacizumab-Injektionen in-vivo hemmen. Hierfür wurde Mäusen ein adenoviraler Vektor, der den Genabschnitt für menschliches VEGF trägt, intrazerebral injiziert. Gleichzeitig erfolgte die Behandlung in zwei Versuchsgruppen mit Bevacizumab und Trastuzumab sowie die Untersuchung einer Kontrollgruppe ohne Antikörperinjektionen. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant verminderte Dichte gebildeter Gefäße unter Bevacizumab-Injektionen. Außerdem wurde die Auswirkung auf bereits gebildete, dysplastische, AVM-ähnliche Gefäße untersucht. Hierfür wurden die Mäuse ab sechs Wochen nach der Induktion mit dem adenoviralen VEGF-Vektor mit Bevacizumab behandelt. Darunter zeigte sich eine Rückbildung der induzierten dysplastischen Gefäße (63). Auch eine Thalidomid-Therapie in Tierversuchen zeigte einen positiven Effekt auf arteriovenöse Malformationen. Durch Gendeletion der Activin-like Kinase 1, konnten zerebrale AVM bei Mäusen induziert werden. Unter intraperitonealen Thalidomid-Injektionen über 6 Wochen mit Start der Therapie 8 Wochen nach AVM-Induktion, zeigten sich signifikant verringerte Zahlen dysplastischer Gefäße sowie signifikant weniger hämorrhagische Ereignisse (64). Die Ergebnisse bezüglich der Wirkung von Thalidomid und Bevacizumab aus den humanen AVM-Zellproliferationsversuchen weisen dementsprechend eine Konkordanz mit experimentellen in-vivo Tierversuchen auf.

4.2 Mechanische Scherbelastung und antiangiogenetische Therapie arteriovenöser Malformationen

Als fast-flow-Malformationen üben intraläsionale Blutströmungseigenschaften der arteriovenösen Malformationen mechanische Belastung auf die beteiligten Zellen aus. Auch eine externe mechanische Belastung im Sinne einer vermehrten Beanspruchung der Körperregion oder Traumata zeigt bei Patienten mit hereditärer hämorrhagischer Teleangiektasie ein vermehrtes Auftreten von Teleangiektasien und AVM (65). Interventionelle Therapieverfahren können durch die hervorgerufene mechanische Belastung bei nicht vollständig eliminierten AVM ein massives Wachstum hervorrufen (40). Entsprechend diesen Erkenntnissen bestand eine grundlegende Überlegung zur Zielsetzung dieser Dissertation darin, dass die mechanische Beanspruchung innerhalb der AVM zu einer vermehrten VEGF-Freisetzung führt, wodurch wiederum deren Wachstum stimuliert wird. Ryu et al. konnten bereits zeigen, dass oszillatorische Scherbelastung, herbeigeführt durch ein Pumpensystem mit Blutströmungsimitation, in Endothelzell- und glatten Muskelzellisolation aus arteriovenösen Malformationen zu einer signifikanten Hochregulation der untersuchten Gene AGP2 und TGF β R1 führte (66,67). Diese vermehrte Genexpression zeigt bereits einen Einfluss der mechanischen Umstände auf die Zellen in arteriovenösen Malformationen. Die in-vivo vorliegenden mechanischen Effekte durch Traumata und Scherbelastungen auf AVM-Zellen wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit in einem experimentellen Kontext durch zyklische mechanische Dehnung auf Zellkulturplatten mit flexibler Membran simuliert. Eine Stimulation der perivaskulären Zellen aus arteriovenösen Malformationen sollte sich dementsprechend in einer verstärkten Proliferation der Zellen und vermehrten Bildung von VEGF widerspiegeln. Vorherige Versuche des Universitätsklinikums Regensburg (Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde) zeigten bereits eine signifikant gesteigerte Expression der VEGF-mRNA und VEGF-Moleküle unter zyklischer mechanischer Dehnung von AVM-Zellen (48). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit zeigte sich ebenfalls eine vermehrte VEGF-Gen- und -Protein-Expression, was die Hypothese einer VEGF-vermittelten Wachstumssteigerung von AVM unter mechanischer Belastung weiterhin verstärkt. Im Einklang dazu stehen die Versuchsergebnisse von Walker et al., die durch adenovirale VEGF-Vektoren in Mausversuchen dysplastische Gefäße ähnlich zerebraler AVM induzieren konnten und somit zeigten, dass VEGF eine entscheidende Rolle bei der Entstehung arteriovenöser Malformationen spielt (63).

Unter der Hypothese, dass die mechanische Belastung über eine VEGF-Induktion eine verstärkte Proliferation der AVM-Zellen bewirkt, erfolgte die Austestung der beiden Medikamente Bevacizumab und Thalidomid in der Versuchsreihe der zyklischen mechanischen Dehnung.

Ermittelt wurden hier die Zellproliferation, die VEGF-Proteinexpression und die VEGF-Genexpression in der Kontrollgruppe sowie in der Versuchsgruppe mit simulierter mechanischer Scherbelastung.

4.2.1 Zellproliferation

In der Versuchsgruppe ohne zyklische mechanische Dehnung ließ sich die Zellproliferation durch Bevacizumab und Thalidomid hemmen. Unter zyklischer mechanischer Dehnung erfolgte keine signifikante Inhibition der Zellproliferation durch Bevacizumab und Thalidomid. Dies bestätigt zum einen die Wirksamkeit der beiden Medikamente auf die Zellproliferation in arteriovenösen Malformationen und wirft zum anderen die Frage auf, weshalb diese Wirksamkeit unter mechanischer Belastung nicht ausreichend gegeben ist. Unter der Prämisse, dass die mechanische Scherbelastung über eine VEGF-Stimulation die Proliferation von Zellen aus arteriovenösen Malformationen steigert, lässt sich die Vermutung anstellen, dass bei steigender VEGF-Konzentration auch erhöhte Wirkstoffkonzentrationen von Bevacizumab und Thalidomid nötig sind, um eine signifikante Suppression der Zellproliferation zu erzielen. Zu beachten sind hierbei möglicherweise auftretende zytotoxische Effekte durch eine erhöhte Wirkstoffkonzentration. Weiterhin müssen bei diesen Überlegungen VEGF-vermittelte Veränderungen von weiteren Pathomechanismen arteriovenöser Malformationen unterschieden werden. Die in dieser Promotionsarbeit untersuchte VEGF-spezifische Pathophysiologie lässt sich als Hyperstimulation physiologischer Proliferationsprozesse beschreiben. Dabei hat VEGF unter physiologischen Bedingungen im Sinne einer negativen Rückkopplung eine Wirkung auf die VEGF-Induktion (68). Unter pathologischen Bedingungen werden solche Rückkopplungsmechanismen teilweise unterbunden. So zeigt sich in der Pathogenese von vaskulären Malformationen eine Dysregulation des Zellzyklus mit dem Effekt einer Entkopplung von physiologischen Wachstumskaskaden und einer dysregulierten Zellproliferation (69). Eine zielgerichtete Anti-VEGF-Therapie beider Wirkstoffe kann demzufolge zu einem gewissen Grad die Proliferation arteriovenöser Malformationen inhibieren, hat aber hingegen keinen Einfluss auf proliferationsstimulierende Prozesse abseits dieses Signalwegs. Weitere Studien sind notwendig, um den vollständigen Pathomechanismus der Proliferation von AVM-Zellen zu verstehen.

4.2.2 VEGF-Proteinexpression

Als weiterer Parameter zur Bestimmung der Auswirkung der zyklischen mechanischen Dehnung auf AVM-Zellen sowie der Möglichkeiten zur medikamentösen Therapie lässt sich der VEGF-ELISA heranziehen. Im VEGF-ELISA ließ sich unter Bevacizumab-Therapie sowohl in

der NCMS-Kontrolle als auch im CMS-Versuch kein VEGF nachweisen. Als monoklonales Immunglobulin G1 gegen VEGF (70) verhindert Bevacizumab nicht die Bildung von VEGF, sondern bindet an die bereits gebildeten Moleküle. Infolgedessen können die jeweiligen Zellen durch das gebundene VEGF-Molekül nicht mehr stimuliert werden, sodass eine geringere VEGF-vermittelte Stoffwechselaktivität resultiert. Unter zyklischer mechanischer Dehnung zeigt Bevacizumab bei dysreguliertem Zellwachstum keine ausreichende Wirksamkeit auf die Proliferation in AVM, kann jedoch effektiv die gebildeten VEGF-Moleküle eliminieren.

Thalidomid hingegen supprimiert die VEGF-Sekretion sowie die zelluläre Antwort auf VEGF-Stimulation (59). Dementsprechend ist im ELISA unter Thalidomid-Therapie nicht mit einer vollständigen Eliminierung von VEGF, jedoch mit einer Verminderung der VEGF-Produktion und -Sekretion zu rechnen. Entgegen der Vermutung ließen sich keine signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe ohne medikamentöse Therapie beobachten. Ein Erklärungsansatz für diesen Umstand stellt die im vorherigen Kapitel dargelegte Dysregulation physiologischer Signaltransduktionsprozesse dar. Als Resultat findet nach Stimulation der AVM-Zellen mittels zyklischer mechanischer Dehnung keine ausreichende VEGF-Suppression durch Thalidomid statt.

4.2.3 VEGF-Genexpression

Als letzter Parameter zur Bestimmung der Auswirkung zyklischer mechanischer Dehnung sowie der medikamentösen Behandlung wurde die zelluläre VEGF-Genexpression mittels RT-qPCR ermittelt. Unter Behandlung mit Bevacizumab und Thalidomid zeigte sich bei zyklischer mechanischer Dehnung ein Abfall der VEGF-Genexpression durch Bevacizumab und Thalidomid. Diese Ergebnisse entsprechen, auf Grundlage der Funktionsweise beider Medikamente, den zu erwartenden Beobachtungen. Als extrazellulär wirkender Antikörper hat Bevacizumab keinen direkten Einfluss auf die Genexpression, kann diese jedoch bei eliminierten VEGF-Molekülen über eine verminderte Aktivierung der AVM-Zellen beeinflussen (70). Der Effekt von Thalidomid tritt hingegen vermutlich intrazellulär auf. Molekulare Untersuchungen konnten zeigen, dass Thalidomid über CRBN (Cereblon) vermittelt wirkt. An Zebrafisch-Mutanten mit CRBN ohne Bindungsstelle für Thalidomid konnte eine Resistenz gegenüber der teratogenen Wirkung von Thalidomid gezeigt werden (60). Bereits 1994 konnte eine Korrelation zwischen der Teratogenität und der antiangiogenetischen Aktivität von Thalidomid gezeigt werden (71). Die Teratogenität und folglich auch die antiangiogenetischen Effekte von Thalidomid lassen sich über CRBN auf intrazelluläre Prozesse zurückführen. Dies legt nahe, dass Thalidomid direkt Einfluss auf die VEGF-Genexpression ausübt. Dies erklärt auch, weshalb sich die VEGF-

mRNA-Bildung in arteriovenösen Malformationen während der zyklischen mechanischen Dehnung durch Thalidomid hemmen ließ. Dieser inhibitorische Effekt auf die VEGF-Genexpression durch Thalidomid konnte bei Untersuchungen zur Osteoarthritis an Mäusen ebenfalls festgestellt werden (72).

Interessanterweise zeigte sich bei den NHF eine vermehrte VEGF-Genexpression unter Bevacizumab-Therapie. Dabei ist zu beachten, dass die VEGF-Genexpression auf die Genexpression des Haushaltsgens GAPDH normiert wurde. Demnach lässt sich diese scheinbar erhöhte Genexpression auf eine verminderte GAPDH-Genexpression zurückführen. Diese Wirkung von Bevacizumab auf nicht pathologisch veränderte Zellen könnte sich klinisch als Nebenwirkung einer Bevacizumab-Therapie zeigen. Hier sind vor allem gastrointestinale Blutungen, Wundheilungsstörungen, Thromboembolien, Proteinurie und arterielle Hypertonie beschrieben (73). Zusammenfassend zeigen Bevacizumab und Thalidomid unter zyklischer mechanischer Dehnung nur noch eine abgeschwächte Wirkung auf die Zellproliferation, bei weiterhin gegebener Inhibition der VEGF-Gen- und -Proteinexpression und damit auch unter mechanischer Scherbelastung einen antiangiogenetischen Effekt.

4.3 In-vitro-Angiogenese

Eine Proliferation von Zellen aus arteriovenösen Malformationen in-vitro kann Hinweise auf die Pathophysiologie der AVM geben, alleinstehend ist jedoch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in-vivo Mechanismen begrenzt, da ein entscheidender Parameter in der Bildung von arteriovenösen Malformationen die Angiogenese ist. Eine reine Proliferation von Zellen ohne organisiertes Wachstum führt möglicherweise zu einem Tumor, jedoch nicht zu einer vaskulären Malformation. Um die Übertragbarkeit auf die in-vivo-Pathophysiologie sowie die Möglichkeiten einer medikamentösen Therapie genauer zu untersuchen, wurden Tube-Formation-Assays durchgeführt. Anhand der Ergebnisse lassen sich zwei bedeutende Grundlagen für die Tube-Formation ableiten, die ebenfalls in arteriovenösen Malformationen erfüllt sein müssen, damit sich Gefäße bilden. Zum einen zeigen die Ergebnisse, dass Zellen aus arteriovenösen Malformationen nur unter VEGF-Behandlung Tubes bilden. Zum anderen konnten wir zeigen, dass andere Bindegewebszellen ohne vaskulären Zusammenhang, namentlich die NHF, auch unter VEGF-Stimulation keine Tubes bilden. Es ist bekannt, dass VEGF die Angiogenese induziert und verstärkt, sowie für die Zellproliferation und -migration im Rahmen der Angiogenese relevant ist (53). Aus den Ergebnissen der Tube-Formation-Assays lässt sich der Rückschluss ziehen, dass eine Kombination aus Zellen mit geeigneter Differenzierung und Stimulation durch VEGF für die Angiogenese in arteriovenösen Malformationen notwendig ist. Ein

entscheidender Unterschied der pathologischen arteriovenösen Malformationen gegenüber gesundem Gewebe besteht in der Fähigkeit zur Autostimulation. Bereits in vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Zellen aus arteriovenösen Malformationen VEGF bilden und somit in der Lage sind, sich selbst zu stimulieren. Anhand der Negativkontrolle der Tube-Formation-Assays lässt sich dieser Umstand erneut ableiten. Es wurde festgestellt, dass bei Zugabe von VEGF-A zum Medium eine deutlich verstärkte Bildung gefäßähnlicher Strukturen stattfindet. Setzt man also die Gegenwart von VEGF im Medium als Voraussetzung für die Tube-Formation, bedeutet eine, wenn auch deutlich verminderte, aber dennoch vorhandene Tube-Formation in der Negativkontrolle mit AVM-Zellen, dass hier VEGF gebildet werden musste. Diese Beobachtung unterstützt die Überlegungen zur Pathophysiologie arteriovenöser Malformationen, dass das massive Wachstum der Läsionen durch eine Autostimulation mit VEGF zustande kommt.

Tube-Formation-Assays sind vielfach mit Endothelzellen erfolgreich durchgeführt worden (74). Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Tube-Formation-Assays erfolgten mit einer Mischkultur aus überwiegend perivaskulären Zellen und Endothelzellen. Wir konnten also zeigen, dass an der Angiogenese in arteriovenösen Malformationen nicht nur Endothelzellen, sondern auch die in den Tube-Formation-Assays mikroskopisch identifizierbaren perivaskulären Zellen beteiligt sind. Im Einklang mit unseren Ergebnissen steht die Forschungsarbeit von Koukorava et al., die zeigen konnten, dass mesotheliale Zellen in der Lage sind, den Phänotyp perivaskulärer Zellen anzunehmen und hierdurch die Angiogenese zu unterstützen (75).

Da es sich bei arteriovenösen Malformationen um Läsionen handelt, die kongenital bereits vorliegen, ist auch das Vorhandensein der Zellen mit der nötigen Differenzierung zur Angiogenese und damit auch zur pathologischen Bildung von Gefäßen gegeben. Dahingegen stellt die Stimulation durch VEGF eine von außen beeinflussbare Variable dar und bietet somit einen möglichen Angriffspunkt für die medikamentöse Therapie arteriovenöser Malformationen. Diese Therapiemöglichkeit wurde ebenfalls anhand der Tube-Formation-Assays untersucht. In den Ergebnissen zeigte sich eine vollständige Inhibition der Tube-Bildung unter Bevacizumab-Behandlung. Die experimentellen Ergebnisse konnten dementsprechend für Bevacizumab eine Inhibition der VEGF-vermittelten Angiogenese in arteriovenösen Malformationen zeigen. Die Ergebnisse von Walker et al. zur Wirksamkeit von Bevacizumab in Mausversuchen auf die Dichte dysplastischer Gefäße bei induzierten zerebralen AVM, welche bereits in den Kapiteln 4.1 und 4.2 diskutiert wurden, zeigen, dass die Ergebnisse der Tube-Formation-Assays über die Zellkultur hinaus auf experimentelle Tierversuche übertragen werden können (63).

4.4 Limitationen

Die experimentellen Untersuchungen zu AVM-Proliferation, -Protein- und -Genexpression unter zyklischer mechanischer Dehnung sowie medikamentöser Therapie mit Bevacizumab und Thalidomid zeigen die in-vitro Effekte dieses Modells. Zur weiteren Eignung der Übertragung auf das klinische Krankheitsbild arteriovenöser Malformationen wurde außerdem der Aspekt der Angiogenese durch das Modell der Tube-Formation-Assays hinzugefügt. Die Forschungsergebnisse beschränken sich jedoch auf die Zellproliferation, Angiogenese und VEGF-Effekte und vernachlässigen weitere Bestandteile der Mikroumgebung wie TGF- β (48). Dadurch beschränkt sich das experimentelle Modell auf einen Ausschnitt der in-vivo herrschenden biochemischen Gegebenheiten. Dieses Modell ist somit ein Versuch einen Teil der AVM-spezifischen Pathophysiologie zu untersuchen und daraus Konsequenzen für die klinische Therapie abzuleiten. Diese Ergebnisse eignen sich als Grundlage für die Planung individueller klinischer Therapieversuche. Zur Untersuchung der tatsächlichen Wirksamkeit antiangiogenetischer Therapien bei Patienten mit arteriovenösen Malformationen sind klinische Studien unabdingbar.

In allen Versuchsreihen wurde die absolute Zellzahl nach dem Wachstum in Zellkultur als Parameter für die Proliferation verwendet. Auf den gewöhnlichen Zellkulturplatten ergaben sich so gute Ergebnisse, die repräsentativ für die Proliferation verwendet werden konnten. Auf den Zellkulturplatten für die zyklische mechanische Dehnung hingegen stellte die mangelnde Adhäsion der Zellen an die flexiblen Membranen ein Problem dar. Zur Adhäsion der Zellen wurde Fibronectin, ein Glykoprotein, das in-vivo Bestandteil der extrazellulären Matrix ist und an der Zell-ECM-Adhäsion über Integrin-Rezeptoren beteiligt ist, eingesetzt (76). Verbleiben die Membranen nicht in Ruhe, sondern werden durch den zyklischen Unterdruck in Bewegung versetzt und gedehnt, wird auch eine mechanische Belastung auf die nicht-kovalente Bindung zwischen Integrin und Fibronectin sowie zwischen Fibronectin und der flexiblen Membran ausgeübt. Als Folge dessen lösen sich die Zellen von der Membran ab. Hierdurch eignet sich die absolute Zellzahl nicht mehr als zuverlässiger Parameter für die Proliferation. Aufgrund dieser Störgröße ließ sich eine Tendenz, jedoch keine signifikante Inhibition der Zellproliferation unter zyklischer mechanischer Dehnung sowie medikamentöser Therapie feststellen. Dies erschwert die genaue Bestimmung der Proliferationsrate sowie des tatsächlichen Effekts der antiangiogenetischen Therapie.

Die Zellkulturergebnisse wurden zur Sicherung eines statistischen Standards in Doppelbestimmungen bei drei Versuchsdurchläufen erhoben, sodass sich signifikante Resultate zeigten. Dennoch bedingt die kleine Stichprobe eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine statistische Varia-

bilität. Ebenso wurden die Versuche mit einer kleinen Stichprobe arteriovenöser Malformationen aus Isolationen durch die Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt, wodurch nur eine eingeschränkte Übertragbarkeit auf die Grundgesamtheit gegeben ist. Dieses Problem besteht über die Forschung zu arteriovenösen Malformationen am Universitätsklinikum Regensburg hinaus. Die niedrige Prävalenz des Krankheitsbildes resultiert bei klinischen sowie experimentellen Studien in einer geringen Stichprobenzahl und erschwert den Fortschritt bei der Erhebung von Daten mit dem Ziel einer optimierten Behandlungsstrategie.

4.5 Klinische Bedeutung der antiangiogenetischen Therapie arteriovenöser Malformationen

Arteriovenöse Malformationen sind eine seltene Erkrankung, die im klinischen Verlauf mit schwerwiegenden bis tödlichen Komplikationen wie Ischämien mit Nekrosen und Ulcera, Blutungen, chronisch venöser Insuffizienz, sowie bei großen Läsionen mit hohem Shuntvolumen high-output Herzinsuffizienz mit dem Risiko für Tachyarrhythmien einhergehen (27,77). Zur Vermeidung komplizierter Verläufe stehen verschiedene Therapieoptionen mit konservativen und interventionellen Ansätzen zur Verfügung. Die interventionelle Therapie umfasst endovaskuläre und chirurgische Verfahren. Für eine erfolgreiche Behandlung ist ein vollständiger Verschluss oder eine vollständige Resektion des AVM-Nidus notwendig, bei subtotalem Verschluss oder Resektion kommt es zu einer Revaskularisation. Ein chirurgischer oder endovaskulärer Verschluss zuführender Arterien ist häufig nicht zielführend, da sich Kollateralen herausbilden und dadurch eine zukünftige endovaskuläre Therapie erschwert wird. Eine alleinstehende chirurgische Therapie ist durch Blutungskomplikationen schwierig und macht häufig einen multimodalen Therapieansatz mit vorheriger Embolisation notwendig (27,39,40). Weiterhin kann ein chirurgisches oder interventionelles Trauma ohne vollständige Elimination der AVM in Konkordanz zur zyklischen mechanischen Dehnung ein aggressives Wachstum provozieren (40). Aufgrund der Komplexität der AVM-Therapie besteht weiterhin eine relevante Morbidität und Mortalität arteriovenöser Malformationen. Diesbezüglich ist die verfügbare Datenlage zu extrakraniellen AVM begrenzt, für die deutlich häufiger vorkommenden zerebralen AVM beschreiben Karlsson et al. ein jährliches Rupturrisiko von 3,1% mit einem Mortalitätsrisiko von 21% als Folge der intrakraniellen Hämorrhagie (78). Um schwerwiegenden Verläufen extrakranieller und zerebraler AVM vorzubeugen, stellt eine frühzeitige medikamentöse Therapie in Ergänzung zu den interventionellen Therapieoptionen möglicherweise eine wertvolle Strategie dar. Neben dem inhibitorischen Effekt von Bevacizumab auf Proliferation,

VEGF-Gen- und -Proteinexpression und Gefäßbildung in der Zellkulturforschung bewirkte das monoklonale VEGF-IgG1 in systemischer off-label-Anwendung an drei Patienten mit therapie-refraktären arteriovenösen Malformationen eine Reduktion malformationsassoziiierter Symptome wie Blutungen und Pulsation sowie eine Aufhellung der Läsionen. Bei einem der Patienten war die Läsionsgröße unter Bevacizumab-Therapie regredient, bei den anderen beiden Patienten konnte das progrediente Wachstum der arteriovenösen Malformationen gehemmt werden. Außerdem wurden keine relevanten Nebenwirkungen verzeichnet (48). Weiterhin wurde Bevacizumab bereits im klinischen Kontext bei weiteren Erkrankungen aus der Gruppe der vaskulären Malformationen wie der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie angewendet. Es zeigte hier einen Rückgang der dysplastischen Gefäße und der krankheitsassoziierten Symptome (79). In der Onkologie ist Bevacizumab bereits in die klinische Therapie integriert und kommt bei einigen soliden Tumoren zum Einsatz (80). Betrachtet man das Nebenwirkungsprofil, wird auch hier generell eine gute Verträglichkeit beschrieben. Wichtige unerwünschte Nebenwirkungen in der onkologischen Therapie sind gastrointestinale Perforationen, thromboembolische Ereignisse und Hypertension (81,82). Auch wenn bei der Therapie der Patienten mit arteriovenösen Malformationen mit Bevacizumab bisher keine relevanten Nebenwirkungen beobachtet wurden, sollte aufgrund dieser Ergebnisse bei onkologischer Therapie mit Bevacizumab eine Nutzen-Risiken-Abwägung in der Behandlung vaskulärer Malformationen mit Bevacizumab erfolgen. Unter Berücksichtigung dieser bekannten Nebenwirkungen und Auswahl geeigneter Patienten, könnte durch eine frühzeitige Therapie mit Bevacizumab ein AVM-Wachstum gestoppt werden, sodass progrediente Symptome sowie Rezidive nach interventioneller Therapie verhindert werden können. Bezüglich der Rezidivprophylaxe kommt den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit eine besondere Bedeutung zu. Das interventionelle Trauma stellt eine mechanische Belastung, vergleichbar mit der zyklischen mechanischen Dehnung, dar. Ein hierdurch hervorgerufenen stimuliertes AVM-Wachstum wäre möglicherweise ein vielversprechender Angriffspunkt für eine medikamentöse antiangiogenetische Therapie.

In der Literatur findet man ebenfalls einige Beispiele für den klinischen Einsatz von Thalidomid bei AVM-Patienten. In einem Case-Report über 18 Patienten mit AVM zeigte eine Thalidomid-Therapie eine effiziente Reduktion chronischer Schmerzen, Blutungen sowie Ulzerationen (44). Ähnliche Ergebnisse zeigt eine retrospektive Fallstudie, in der die Fälle von elf Patienten mit komplexen, proliferativen arteriovenösen Malformationen und stattgefundenen Thalidomid-Therapie untersucht wurden. Es zeigte sich ebenfalls eine Verbesserung der Schmerzsymptomatik, Schwellung und Blutungsereignisse. Bei 45 % der Patienten konnte außerdem ein nicht-proliferatives Stadium erzielt werden. Als häufige Nebenwirkung der Therapie trat Fatigue auf

(83). Nicht zu vernachlässigen sind jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen wie eine Neutropenie, sensomotorische periphere Polyneuropathien, tiefe Venenthrombosen und das Stevens-Johnson-Syndrom (83,84). Diese Nebenwirkungen machen eine strenge Nutzen-Risiken-Abwägung für die Therapie arteriovenöser Malformationen mit Thalidomid notwendig und limitieren dadurch die klinische Anwendung.

Im direkten Vergleich der ausgetesteten Medikamente Bevacizumab und Thalidomid zeigen sich für beide positive Effekte auf den Krankheitsverlauf arteriovenöser Malformationen in der klinischen Therapie, die über den experimentellen Kontext hinausgehen. Bevacizumab ist Thalidomid dabei durch ein günstigeres Nebenwirkungsprofil überlegen. Die aktuellen Fallzahlen klinischer Anwendung von Thalidomid und Bevacizumab bei Patienten mit arteriovenösen Malformationen sind noch sehr gering, dennoch eignen sich beide Medikamente unter Nutzen-Risiken-Abwägung als individuelle Therapieoptionen arteriovenöser Malformationen. Zur genaueren Einschätzung der Wirksamkeit sind weitere Daten aus klinischen Szenarien notwendig. Durch ein besseres Verständnis der Wirksamkeit und des Nebenwirkungsprofils bei AVM-wirksamen Dosen könnten Bevacizumab und Thalidomid in Zukunft im klinischen Kontext dazu beitragen, schwerwiegende und letale Komplikationen arteriovenöser Malformationen sowie Rezidive nach Interventionen zu verhindern.

5 Zusammenfassung

Arteriovenöse Malformationen stellen aufgrund ihrer Seltenheit, interindividuell unterschiedlichen Krankheitsverläufe, unberechenbaren Wachstums, komplizierter anatomischer Interventionsverhältnisse mit einem hohen Blutungs- und Rezidivrisiko sowie ihrer nicht vollständig geklärten Pathophysiologie eine therapeutische Herausforderung dar. Diese Promotionsarbeit sollte einen Angriffspunkt für medikamentöse Therapien zur Verhinderung von malformationssassoziierter Morbidität und als Rezidivprophylaxe nach Interventionen ergründen. Die experimentelle Untersuchung von Zellkulturen mit Zellen aus arteriovenösen Malformationen erfolgte unter der Annahme, dass die fast-flow-Eigenschaften sowie interventionelle Traumata eine mechanische Belastung für die Zellen der arteriovenösen Malformationen darstellen und diese mechanische Belastung über eine vermehrte VEGF-Freisetzung eine Autostimulation der Proliferation und Angiogenese innerhalb der Läsion hervorruft. Um in diese Kaskade therapeutisch einzugreifen, wurden Bevacizumab und Thalidomid als VEGF-antagonistisch wirkende Medikamente ausgewählt. Vorbestehende Forschungsergebnisse des Universitätsklinikums Regensburg (Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde) konnten bei arteriovenösen Malformationen in Zellkulturen eine vermehrte Proliferation sowie VEGF-Gen- und Proteinexpression unter zyklischer mechanischer Dehnung nachweisen. Diese Ergebnisse konnten wir reproduzieren und zusätzlich anhand von Tube-Formation-Assays zeigen, dass eine Bildung gefäßähnlicher Strukturen durch AVM-Zellen nur in Anwesenheit von VEGF stattfindet. Die antiangiogenetische Therapie mit dem monoklonalen anti-VEGF-IgG1 Bevacizumab verminderte die Proliferation von AVM-Zellen in der Zellkultur signifikant. Weiterhin wurde die durch zyklische mechanische Dehnung gesteigerte VEGF-Proteinexpression supprimiert. Auch die VEGF-Genexpression war unter Bevacizumab-Behandlung vermindert. Zuletzt zeigte sich durch eine Bevacizumab-Therapie in den Tube-Formation-Assays eine vollständige Suppression der Angiogenese.

Thalidomid als immunmodulatorisches Medikament mit einer intrazellulären Wirkung gegen VEGF zeigte ebenfalls eine Hemmung der Proliferation von AVM-Zellen. Die durch zyklische mechanische Dehnung verstärkte VEGF-Genexpression wurde durch Thalidomid gesenkt. In den Tube-Formation-Assays zeigte sich ein hemmender Einfluss auf die Angiogenese.

Die experimentellen Ergebnisse dieser Promotionsarbeit zeigen, dass VEGF eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese und der Progredienz der AVM spielt. Eine VEGF-antagonistische Therapie erzielte unter experimentellen Bedingungen überzeugende Ergebnisse in Hinblick auf die Proliferation und Angiogenese von AVM-Zellen.

In Zusammenschau der aktuellen Literatur ergibt sich vor allem für Bevacizumab eine vielversprechende antiangiogenetische Wirkung auf arteriovenöse Malformationen im experimentellen sowie klinischen Kontext, sodass ein vermehrter Einsatz in der klinischen Therapie zur Reduktion von Morbidität, Rezidiven und Mortalität denkbar ist. Thalidomid wies ebenfalls eine antiangiogenetische Wirkung auf arteriovenöse Malformationen auf und verzeichnete in der klinischen Therapie Erfolge bei der Behandlung von Patienten mit arteriovenösen Malformationen. Aufgrund eines ausgeprägten Nebenwirkungsprofils ist jedoch eine strenge Nutzen-Risiken-Abwägung zu beachten. Insgesamt weisen die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit auf eine gute Wirksamkeit von Bevacizumab und Thalidomid auf den Progress arteriovenöser Malformationen hin und bilden somit die Grundlage für eine intensiviertere Datenerhebung im Rahmen von klinischen Studien und für individuelle Therapieversuche zur Reduktion von AVM-Rezidiven und malformationsassoziierten Komplikationen.

6 Anhang

6.1 Material

6.1.1 Zellkultur

Bezeichnung	Herkunft
Malformationszellen	Universitätsklinikum Regensburg
NHF	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien

Tabelle 1: Zellkultur

6.1.2 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Herkunft
Endothelial Cell Basal Medium-2	Lonza group Ltd, Basel, Switzerland
EGM-2 Endothelial SingleQuots Kit	Lonza group Ltd, Basel, Switzerland
FCS-10	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine, 100x [+] 29,2 mg/mL L-glutamine	Corning Incorporated, NY, USA
EGM-2-Medium	500 ml Endothelial Cell Basal Medium-2 + EGM-2 Endothelial SingleQuots Kit (ohne Hydrocortison) + 50 ml FCS-10 + 5 ml Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine
DMEM, low glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate	Gibco by Life Technologies Corporation, Grand Island, USA
AVM-Einfriermedium	Eigenanfertigung (siehe Methoden)
NHF-Einfriermedium	Eigenanfertigung (siehe Methoden)

Tabelle 2: Zellkulturmedien

6.1.3 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Herkunft
Coating Puffer	Wasser (destilliert) + 10,6 µg/ml Natriumcarbonat, pH=9,4
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco by Life Technologies Limited, Paisley, UK
Trypsin/ EDTA (0,04%/0,03%)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Heparin-Natrium 5.000 I.E./ml, 5ml	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
ECM (Matrigel)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure (1N)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
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
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fibronectin human	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Recombinant human VEGF 165 Protein (VEGF-A)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Dynabeads™ CD31 Endothelial Cell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BSA (1%)	Antigenix america, Huntington Station, USA
TMB Substrate Solution (2NH ₂ SO ₄), Part A und B	Antigenix america, Huntington Station, USA
Beta-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen

6.1.4 Medikamente

Bezeichnung	Herkunft
(+/-) - Thalidomid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bevacizumab (Avastin) gelöst in NaCl 0,9 %	Zytostatikalarb. Universitätsklinikum Regensburg, Regensburg Deutschland

Tabelle 4: Medikamente

6.1.5 Assays

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

Tabelle 5: Assays

6.1.6 RNA-Isolierung, reverse Transkription in cDNA und 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 forward (GAPDHrat)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Primer reverse (GAPDHrat)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Borsäure	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

Tabelle 6: RNA-Isolierung, reverse Transkription in cDNA und PCR

6.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Herkunft
Zellkulturplatte T100, Corning „Not TC-Treated Culture Dishes“, 55 cm ²	Corning Incorporated, NY, USA
"Cellstar" Multiwellplatte, 6-Well	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatte, 24-Well, PS	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
BioFlex Culture Plate – Untreated 6-Well	Flexcell International Corporation, Burlington, USA
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
Falcontube 15 ml	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Falcontube 50 ml	greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Cryogenic Vials „Nalgene Cryoware“	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
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
Pipettenspitzen 0,1-10 µl „epT.I.P.S“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 2-200 µl „epT.I.P.S“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 50-1000 µl „epT.I.P.S“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipettenspitze 1 ml "eppendorf biopur"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipettenspitze 5 ml "eppendorf biopur"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multipipettenspitze 10 ml "eppendorf biopur"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Steriler Filter "Chromafil A-20/25"	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Eppendorf-Tubes 2 ml "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
Einwegskalpell	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Selbstklebendes steriles Abdecktuch "Foliodrape"	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Glaspasteurpipetten	Brand GmbH + Co, Wertheim, Deutschland
Parafilm	Bemis Company, Oshkosh USA

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

6.1.8 Geräte

Bezeichnung	Herkunft
Pipettenfüller „easypet 3“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellenzähler "Upgreen Counter"	Upgreen, Taichung City, Taiwan
Freezing Container "Mr. Frosty Cryo 1°C"	NALGENE nunc, Rochester, USA
Dehnungskammer	Labor für plastische Gesichtschirurgie, Universitätsklinikums Regensburg, Deutschland
Vakuumpumpe	Baumann GmbH & Co. KG, Wörth an der Donau, Germany
Magnetrührstab "VITLAB X3"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Rührer (magnetisch, beheizt)	RCT basic IKA WERKE
Vortexer "Vortex-Genie 2"	Scientific industries, Bohemia, USA
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
Waage "PM 3000"	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
37°C-Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Mikroskop „Discover Echo Rebel Brightfield - REB-01-D)	Discover Echo, BICO Group, San Diego, USA

Zentrifuge "Centrifuge 5810 R"	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Magnet	
Varioscan "Flash"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektralphotometer: NanoDrop One/One ^C Mikrovolumen-UV/VIS-Spektralphotometer mit WLAN	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermocycler "DOPPIO"	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikrowelle "privileg"	Bauknecht Hausgeräte GmbH, Stuttgart, Deutschland
Gelelektrophorese-System	Peqlab/VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rainbow RMB92 CCTV monitor	Rainbow Security Systems, Northampton, England
Fotokammer	Peqlab/VWR international GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR Cycler "Stratagene Mx 3005 P"	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer "Bio Vortex V1"	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland

Tabelle 8: Geräte

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unkompliziertes infantiles Hämangiom Handgelenk rechts (9)	7
Abbildung 2: Kutanes Angiosarkom (17)	9
Abbildung 3: Kapilläre Malformation rechter Fuß (20)	10
Abbildung 4: Primäres Lymphödem und umschriebene lymphatische Malformation mit sichtbarer intraläsionaler Einblutung (21)	11
Abbildung 5: Venöse Malformation bei 4-jährigem Mädchen am rechten Ohr (22)	12
Abbildung 6: Kongenitale fronto-palpebrale arteriovenöse Malformation (26)	13
Abbildung 7: Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (29,30)	14
Abbildung 8: Intramuskuläre arteriovenöse Malformation der Wade im Ultraschall (33)	16
Abbildung 9: Digitale Subtraktionsangiografie einer AVM der Orbita (35)	16
Abbildung 10: Therapie arteriovenöser Malformationen (41,42)	17
Abbildung 11: VEGF-Moleküle und ihre Rezeptoren (52)	19
Abbildung 12: Signaltransduktion bei VEGF-A/VEGFR-2 Interaktion und potentielle medikamentöse Ansätze (58)	21
Abbildung 13: Vakuumpumpe und Dehnkammer für 6-Well-Platten mit flexibler Membran	30
Abbildung 14: 6-Well-Platte mit flexibler Membran	31
Abbildung 15: AVM-Zellzahl nach 72 Stunden Wachstum	39
Abbildung 16: AVM-Zellen nach Bead-Sorting mit Anti-CD31-IgG-Beads	40
Abbildung 17: Proliferation Bevacizumab	41
Abbildung 18: Proliferation Thalidomid	43
Abbildung 19: Zyklische mechanische Dehnung	44
Abbildung 20: AVM-Zellen nach 24 Stunden Proliferation auf 6-Well-Platte mit flexibler Membran vor CMS-Start	45
Abbildung 21: AVM-Zellen nach zyklischer mechanischer Dehnung	46
Abbildung 22: VEGF-ELISA	47
Abbildung 23: Fold-Change der VEGF-Genexpression (normiert auf GAPDH)	48
Abbildung 24: Tube-Formation-Assay mit AVM-Zellen	49
Abbildung 25: Exemplarisches Bild der Tube-Formation-Assays mit AVM-Zellen	50
Abbildung 26: Tube-Formation-Assay mit NHF	51

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkultur	64
Tabelle 2: Zellkulturmedien	64
Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen	65
Tabelle 4: Medikamente	65
Tabelle 5: Assays	65
Tabelle 6: RNA-Isolierung, reverse Transkription in cDNA und PCR	66
Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien	68
Tabelle 8: Geräte	69

7 Literatur

1. About ISSVA | International Society for the Study of Vascular Anomalies [Internet]. [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.issva.org/about-issva>
2. Sadick M, Wohlgemuth WA. Compgefa: Gefäßanomalien – Nach welchen Kriterien wird unterschieden? [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/die-klassifikation-der-gefaessanomalien>
3. Wassef M, Blei F, Adams D, Alomari A, Baselga E, Berenstein A, et al. Vascular Anomalies Classification: Recommendations From the International Society for the Study of Vascular Anomalies. *Pediatrics*. 2015 Jul 1;136(1):e203–14.
4. ISSVA. ISSVA classification for vascular anomalies [Internet]. 2018 [cited 2025 May 7]. Available from: <https://www.issva.org/UserFiles/file/ISSVA-Classification-2018.pdf>
5. ISSVA. ISSVA updated flowdiagram 03152025 [Internet]. 2025 [cited 2025 May 7]. Available from: https://www.issva.org/UserFiles/file/ISSVAGLOSSARY_UpdatedFullVersion_03152025_Submission_copyright.pdf
6. Trindade F, Tellechea Ó, Torrelo A, Requena L, Colmenero I. Wilms Tumor 1 Expression in Vascular Neoplasms and Vascular Malformations. *The American Journal of Dermatopathology*. 2011 Aug;33(6):569–72.
7. Hoeger PH, Colmenero I. Vascular tumours in infants. Part I: benign vascular tumours other than infantile haemangioma. *Br J Dermatol*. 2014 Sep;171(3):466–73.
8. Wildgruber M, Sadick M, Müller-Wille R, Wohlgemuth WA. Vascular tumors in infants and adolescents. *Insights Imaging*. 2019 Dec;10(1):30.
9. Evert K, Ott H. Compgefa: Infantiles Hämangiom [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/infantiles-haemangiom>
10. Seebauer CT, Graus MS, Huang L, McCann A, Wylie-Sears J, Fontaine F, et al. Non-beta blocker enantiomers of propranolol and atenolol inhibit vasculogenesis in infantile hemangioma. *J Clin Invest*. 2022 Feb 1;132(3):e151109.
11. Liang MG, Frieden IJ. Infantile and congenital hemangiomas. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2014 Aug;23(4):162–7.
12. Wildgruber M, Sadick M, Müller-Wille R, Wohlgemuth WA. Vascular tumors in infants and adolescents. *Insights into Imaging*. 2019 Mar 13;10(1):30.
13. Evert K, Ott H. Compgefa: Granuloma pyogenicum [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/granuloma-pyogenicum>
14. Evert K, Ott H. Compgefa: Kaposiformes Hämangioendotheliom [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/kaposiformes-haemangioendotheliom>
15. A. Mosthaf F. Das Kaposi-Sarkom*. *InFo Hämatol Onkol*. 2021 Nov 1;24(11):22–7.

16. Wiegand S, Dietz A, Wichmann G. Malignant Vascular Tumors of the Head and Neck—Which Type of Therapy Works Best? *Cancers*. 2021 Jan;13(24):6201.
17. Bönisch N, Langan EA, Terheyden P. Kutaner Angiosarkom. *Hautarzt*. 2019 Sep 1;70(9):700–6.
18. Carqueja IM, Sousa J, Mansilha A. Vascular malformations: classification, diagnosis and treatment. *Int Angiol [Internet]*. 2018 Mar [cited 2023 Feb 23];37(2). Available from: <https://www.minervamedica.it/index2.php?show=R34Y2018N02A0127>
19. Cox J, Bartlett E, Lee E. Vascular Malformations: A Review. *Seminars in Plastic Surgery*. 2014 May 31;28(02):058–63.
20. Ott H. Compgefa: Kapilläre Malformationen [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/kapillaere-malformationen>
21. Meyer L. Compgefa: Lymphatische Malformationen [Internet]. 2021 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/lymphatische-malformationen>
22. Wolter JK, Valencia-Sama I, Osborn AJ, Propst EJ, Irwin MS, Papsin B, et al. Combination mTOR and SHP2 inhibitor treatment of lymphatic malformation endothelial cells. *Microvasc Res*. 2022 Sep;143:104397.
23. Barbera LC, Wohlgemuth WA. Compgefa: Venöse Malformationen [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/venoese-malformationen>
24. Vikkula M, Boon LM, Mulliken JB. Molecular genetics of vascular malformations. *Matrix Biology*. 2001 Sep 1;20(5):327–35.
25. Léauté-Labrèze C. Medical management of vascular anomalies of the head and neck. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2022;51(10):837–43.
26. Abreu MC, Pinto J, Rocha G, Garcia M, Bom-Sucesso M do, Madureira AM, et al. Arteriovenous malformations in the neonatal period: case report and literature review. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine (JPNIM)*. 2020 Apr 28;9(1):e090126–e090126.
27. Schimmel K, Ali MK, Tan SY, Teng J, Do HM, Steinberg GK, et al. Arteriovenous Malformations—Current Understanding of the Pathogenesis with Implications for Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan;22(16):9037.
28. Kühnel T. Compgefa: Morbus Osler bzw. HHT – Was bedeutet das? [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/hht-morbus-osler>
29. Füeßl HS. Morbus Osler der Nasenschleimhaut. *MMW - Fortschritte der Medizin*. 2015 Jun;157(12):42–42.
30. Lücke E, Schreiber J, Zencker M, Braun-Dullaeus R, Herold J. Morbus Osler: Mehr als nur Nasenbluten. *Internist*. 2016 Jun;57(6):610–5.
31. Queisser A, Seront E, Boon LM, Vikkula M. Genetic Basis and Therapies for Vascular Anomalies. *Circulation Research*. 2021 Jun 25;129(1):155–73.

32. Marutani A, Nakano R, Yamada T. Recurrence of arteriovenous malformation in adulthood five years after complete surgical resection: A case report. *Neurochirurgie*. 2020 Nov;66(5):405–7.
33. Sadick M, Müller-Wille R, Wildgruber M, Wohlgemuth W. Vascular Anomalies (Part I): Classification and Diagnostics of Vascular Anomalies. *Fortschr Röntgenstr*. 2018 Sep;190(09):825–35.
34. Müller-Wille R. Compgefa: Digitale Subtraktionsangiographie [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/digitale-subtraktionsangiographie>
35. Butsch CS, Heider J, Brockmann MA, Pfeiffer N, Ringel FA, Schwandt E, et al. Pulsieren der Orbitatumor. *Ophthalmologe*. 2021 Jan 1;118(1):60–4.
36. Uller W. Compgefa: Klinisches Erscheinungsbild — Arteriovenöse Malformation [Internet]. 2020 [cited 2025 May 6]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/klinisches-erscheinungsbild-arteriovenoese-malformation>
37. Lilje D, Wiesmann M, Hasan D, Riabikin A, Ridwan H, Hölzle F, et al. Interventional therapy of extracranial arteriovenous malformations of the head and neck—A systematic review. *PLOS ONE*. 2022 Jul 15;17(7):e0268809.
38. Timbang MR, Richter GT. Update on extracranial arteriovenous malformations: A staged multidisciplinary approach. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2020 Oct 1;29(5):150965.
39. Uller W. Compgefa: Therapieverfahren — Arteriovenöse Malformation [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/therapieverfahren-arteriovenoese-malformation>
40. Fernández-Alvarez V, Suárez C, de Bree R, Nixon IJ, Mäkitie AA, Rinaldo A, et al. Management of extracranial arteriovenous malformations of the head and neck. *Auris Nasus Larynx*. 2020 Apr;47(2):181–90.
41. Barbera LC. Compva: Soft tissue surgery of the extremities [Internet]. 2021 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compva.com/science/soft-tissue-surgery-of-the-extremities>
42. Müller-Wille R. Compgefa: Embolisation [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/embolisation>
43. Rodríguez-Jiménez P, Uceda M, Ramirez-Bellver JL, Ruiz-Rodríguez R, Sánchez-Carpintero I. Oral propranolol as palliative treatment for a recurrent arteriovenous malformation. *Dermatologic Therapy [Internet]*. 2019 Nov [cited 2023 Feb 25];32(6). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/dth.13075>
44. Boon LM, Dekeuleneer V, Coulie J, Marot L, Bataille AC, Hammer F, et al. Case report study of thalidomide therapy in 18 patients with severe arteriovenous malformation s. *Nat Cardiovasc Res*. 2022 Jun;1(6):562–7.
45. Edwards EA, Phelps AS, Cooke D, Frieden IJ, Zapala MA, Fullerton HJ, et al. Monitoring Arteriovenous Malformation Response to Genotype-Targeted Therapy. *Pediatrics*. 2020 Sep 1;146(3):e20193206.

46. Krüger-Genge, Blocki, Franke, Jung. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *IJMS*. 2019 Sep 7;20(18):4411.
47. Raper DMS, Winkler EA, Rutledge CW, Cooke DL, Abila AA. An Update on Medications for Brain Arteriovenous Malformations. *Neurosurgery*. 2020 Nov;87(5):871–8.
48. Seebauer CT, Wiens B, Hintschich CA, Platz Batista da Silva N, Evert K, Haubner F, et al. Targeting the microenvironment in the treatment of arteriovenous malformations. *Angiogenesis*. 2024;27(1):91–103.
49. Rassow J, Netzer R, Hauser K. *Duale Reihe Biochemie*. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2016. 880 p.
50. Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF Receptor Signal Transduction. *Science's STKE*. 2001 Dec 11;2001(112):re21–re21.
51. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. In: Clauss M, Breier G, editors. *Mechanisms of Angiogenesis* [Internet]. Basel: Birkhäuser Basel; 2005 [cited 2023 Mar 2]. p. 209–31. Available from: https://link.springer.com/10.1007/3-7643-7311-3_15
52. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis. *Genes Cancer*. 2011 Dec;2(12):1097–105.
53. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudła B. Vascular endothelial growth factor (VEGF) — part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynologia Polska*. 2011;62(5):444–55.
54. Sandalcioğlu IE, Wende D, Eggert A, Müller D, Roggenbuck U, Gasser T, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Plasma Levels Are Significantly Elevated in Patients with Cerebral Arteriovenous Malformations. *Cerebrovasc Dis*. 2006;21(3):154–8.
55. Han C, Choe S woon, Kim YH, Acharya AP, Keselowsky BG, Sorg BS, et al. VEGF neutralization can prevent and normalize arteriovenous malformations in an animal model for hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. *Angiogenesis*. 2014 Oct;17(4):823–30.
56. Jia YC, Fu JY, Huang P, Zhang ZP, Chao B, Bai J. Characterization of Endothelial Cells Associated with Cerebral Arteriovenous Malformation. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2020 Dec 31;16:1015–22.
57. Garcia J, Hurwitz HI, Sandler AB, Miles D, Coleman RL, Deurloo R, et al. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treatment Reviews*. 2020 Jun 1;86:102017.
58. Melincovici CS, Bo AB, Miha C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis.
59. Melchert M, List A. The thalidomide saga. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007 Jul 1;39(7):1489–99.
60. Ito T, Handa H. Molecular mechanisms of thalidomide and its derivatives. *Proc Jpn Acad, Ser B*. 2020 Jun 11;96(6):189–203.

61. Santana CP, Mansur AAP, Mansur HS, Silva-Cunha AD. Bevacizumab-Conjugated Quantum Dots: *In Vitro* Antiangiogenic Potential and Biosafety in Rat Retina. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2020 Jul 1;36(6):467–83.
62. Wang L, Wang S, Xue A, Shi J, Zheng C, Huang Y. Thalidomide Inhibits Angiogenesis via Downregulation of VEGF and Angiopoietin-2 in Crohn's Disease. *Inflammation*. 2021 Apr;44(2):795–807.
63. Walker EJ, Su H, Shen F, Degos V, Amend G, Jun K, et al. Bevacizumab attenuates VEGF-induced angiogenesis and vascular malformations in the adult mouse brain. *Stroke*. 2012 Jul;43(7):1925–30.
64. Zhu W, Chen W, Zou D, Wang L, Bao C, Zhan L, et al. Thalidomide Reduces Hemorrhage of Brain Arteriovenous Malformations in a Mouse Model. *Stroke*. 2018 May;49(5):1232–40.
65. Bernabeu C, Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Letarte M. Potential Second-Hits in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *J Clin Med*. 2020 Nov 5;9(11):3571.
66. Ryu JY, Kim YH, Lee JS, Lee JW, Oh EJ, Kim HM, et al. Oscillatory shear stress promotes angiogenic effects in arteriovenous malformations endothelial cells. *Molecular Medicine*. 2021 Mar 31;27(1):31.
67. Ryu JY, Park TH, Lee JS, Oh EJ, Kim HM, Lee SJ, et al. Wall shear stress on vascular smooth muscle cells exerts angiogenic effects on extracranial arteriovenous malformations. *Arch Plast Surg*. 2022 Jan;49(1):115–20.
68. Messmer-Blust A, An X, Li J. Hypoxia-Regulated Angiogenic Inhibitors. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2009 Nov 1;19(8):252–6.
69. Genet G, Genet N, Paila U, Cain SR, Cwiek A, Chavkin NW, et al. Induced Endothelial Cell Cycle Arrest Prevents Arteriovenous Malformations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Circulation*. 2024 Mar 19;149(12):944–62.
70. Limaverde-Sousa G, Sternberg C, Ferreira CG. Antiangiogenesis beyond VEGF inhibition: A journey from antiangiogenic single-target to broad-spectrum agents. *Cancer Treatment Reviews*. 2014 May;40(4):548–57.
71. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Apr 26;91(9):4082–5.
72. Song JL, Li DL, Fang H, Cai DZ. Intraperitoneal injection of thalidomide alleviates early osteoarthritis development by suppressing vascular endothelial growth factor expression in mice. *Molecular Medicine Reports*. 2018 Jul 1;18(1):571–9.
73. Li M, Kroetz DL. Bevacizumab-induced hypertension: Clinical presentation and molecular understanding. *Pharmacol Ther*. 2018 Feb;182:152–60.
74. Kelley M, Fierstein S, Purkey L, DeCicco-Skinner K. Endothelial Cell Tube Formation Assay: An *In Vitro* Model for Angiogenesis. *Methods Mol Biol*. 2022;2475:187–96.

75. Koukorava C, Ward K, Ahmed K, Almaghrabi S, Dauleh S, Pereira SM, et al. Mesothelial Cells Exhibit Characteristics of Perivascular Cells in an In Vitro Angiogenesis Assay. *Cells*. 2023 Oct 11;12(20):2436.
76. Berrier AL, Yamada KM. Cell–matrix adhesion. *Journal Cellular Physiology*. 2007 Dec;213(3):565–73.
77. Uller W. Compgefa: Komplikationen im natürlichen Verlauf — Arteriovenöse Malformation [Internet]. 2020 [cited 2025 May 5]. Available from: <https://www.compgefa.de/wissen/komplikationen-im-natuerlichen-verlauf-arteriovenoese-malformation>
78. Karlsson B, Jokura H, Yang HC, Yamamoto M, Martinez R, Kawagishi J, et al. Clinical outcome following cerebral AVM hemorrhage. *Acta Neurochir*. 2020 Jul 1;162(7):1759–66.
79. Robert F, Desroches-Castan A, Bailly S, Dupuis-Girod S, Feige JJ. Future treatments for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2020 Jan 7;15:4.
80. Engelhardt M, Berger DP, Mertelsmann R, Duyster J, editors. *Das Blaue Buch: Chemotherapie-Manual Hämatologie und Onkologie* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017 [cited 2024 Apr 20]. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-662-51420-7>
81. Zhang W, Shen Z, Luo H, Hu X, Zheng L, Zhu X. The Benefits and Side Effects of Bevacizumab for the Treatment of Recurrent Ovarian Cancer. *Curr Drug Targets*. 2017;18(10):1125–31.
82. Taugourdeau-Raymond S, Rouby F, Default A, Jean-Pastor MJ, French Network of Pharmacovigilance Centers. Bevacizumab-induced serious side-effects: a review of the French pharmacovigilance database. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012 Jul;68(7):1103–7.
83. Nip L, Evans N, Bali S, Hopper C, Papadopoulou A, Khalifa M, et al. Early experience of thalidomide therapy for high-grade peripheral and facial arteriovenous malformations. *Int Angiol*. 2023 Oct;42(5):448–56.
84. Ghobrial IM, Rajkumar SV. Management of Thalidomide Toxicity. *J Support Oncol*. 2003;1(3):194–205.

Danksagung

Am Ende dieser Dissertation möchte ich allen Personen danken, die mich auf dem Weg der Forschung und Verfassung der Promotionsarbeit begleitet haben. Ein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Veronika Vielsmeier, meiner Betreuerin Frau PD Dr. Caroline Seebauer sowie der Arbeitsgruppe „Vaskuläre Malformationen“ der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Regensburg, die durch ihre fachliche Expertise und Unterstützung die Promotion ermöglicht haben. Ebenso danke ich meinen Eltern, ohne deren Wertschätzung, sowie emotionale und finanzielle Unterstützung das Humanmedizinstudium und die Promotion nicht möglich gewesen wären. Ich danke meiner Schwester, die als Motivationshilfe während des Schreibens neben mir ihre Masterarbeit verfasst hat. Ich danke meinen Freunden und meiner gesamten Familie, die mich in stressigen Zeiten unterstützt haben und mir jederzeit mit Freizeitaktivitäten als Ausgleich beigestanden sind.