

Aus der Frauenklinik
des Universitätsklinikums Würzburg
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Wöckel

Auswirkungen physiologischer Konzentrationen von Beta-Hydroxybutyrat auf vaskuläre Endothelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Niklas Hahn
aus Würzburg

Würzburg, August 2017

Referent bzw. Referentin: apl. Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer

Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. med. Thomas Wurmb

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2018

Der Promovend ist Arzt.

INHALTSVERZEICHNIS

| | Seite |
|---|-------|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Das Gefäßendothel: Aufbau, Aufgaben und Funktion | 1 |
| 1.2 Rolle der endothelialen Dysfunktion beim Intensivpatienten | 4 |
| 1.3 Der Ketonkörpermetabolismus: Physiologie und Pathophysiologie | 8 |
| 1.4 Ziel der Arbeit | 11 |
| | |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 13 |
| 2.1 Material | 13 |
| 2.1.1 Geräte | 13 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterial | 13 |
| 2.1.3 Reagenzien | 14 |
| 2.1.4 Zelllinien | 15 |
| 2.2 Methoden | 15 |
| 2.2.1 Zellkultur | 15 |
| 2.2.2 PCR-Analysen | 16 |
| 2.2.3 Proteinbiochemie | 18 |
| 2.2.4 Scratch Assay | 20 |
| 2.2.5 Matrigel-basierter Angiogeneseassay | 21 |
| 2.2.6 Methoden der Statistik | 21 |

| | | |
|-----|---|----|
| 3 | ERGEBNISSE | 22 |
| 3.1 | Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die mRNA- und Proteinexpressionsprofile in HUVEC-Zellen | 22 |
| 3.2 | Auswirkung von Ketonkörper- und Sauerstoffkonzentration auf Migrationsverhalten und Angiogenesekapazität von HUVEC-Zellen..... | 28 |
| 4 | DISKUSSION..... | 38 |
| 4.1 | Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke auf den endothelialen Energiestoffwechsel | 38 |
| 4.2 | Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke auf die Freisetzung endothelialer Zytokine | 39 |
| 4.3 | Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke sowie der Exposition gegenüber Ketonkörpern auf die endotheliale Zellmigration | 41 |
| 4.4 | Einfluss der Exposition von Endothelzellen gegenüber Ketonkörpern auf die Angiogenese | 42 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 45 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 47 |
| 7 | LEBENS LAUF | 56 |
| 8 | DANKSAGUNG | 57 |

1 EINLEITUNG

1.1 Das Gefäßendothel: Aufbau, Aufgaben und Funktion

Die menschlichen Blutgefäße sind für den Transport von Sauerstoff und Nährstoffen überlebensnotwendig. Die Sicherstellung der Durchblutung lebenswichtiger Organe ist daher in der Notfall- und Intensivmedizin von allerhöchster Bedeutung. Der Grundaufbau der größeren Gefäße ist zwischen Venen und Arterien ähnlich; während bei Arterien allerdings die Muskelwand (Tunica media) prominenter ausgebildet ist, besitzen venöse Gefäße Klappen, um den Rückfluss des venösen Blutes entlang der Schwerkraft zu verhindern (Auerbach, 1864; Schultz, 1927; Benninghoff *et al.*, 1930). Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau menschlicher Blutgefäße. Kleine Kapillaren, die dem arteriellen und venösen Schenkel zwischengeschaltet sind und zur eigentlichen Sauerstoffversorgung des dort liegenden Gewebes dienen, besitzen keine Tunica media, sondern lediglich eine schmale Perizytenhülle, was den Stoffaustausch begünstigt (Mescher, 2010).

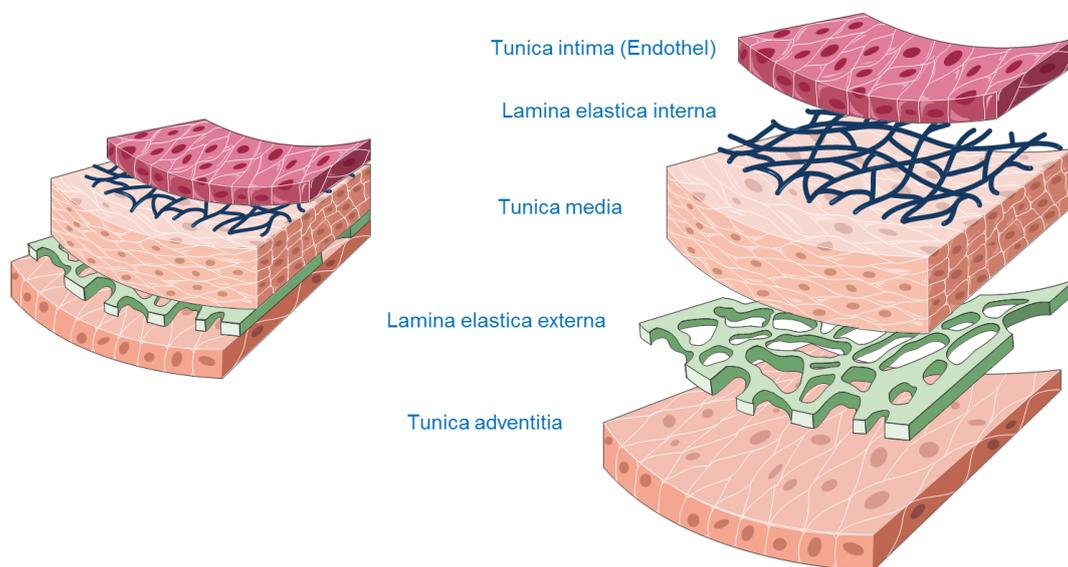


Abbildung 1: Schematischer Wandaufbau menschlicher Blutgefäße (eigene Darstellung)

Die Tunica adventitia verankert die Blutgefäße im umgebenden Bindegewebe und verfügt auch über eine gewisse Schutzfunktion. So kann bei der Ruptur einer Gefäßaussackung (Aneurysma) oder bei einer Wühlblutung in der Gefäßwand (Dissektion) die Tunica adventitia als letzte Schicht ein inneres Verbluten zumindest verzögern (Roberts, 1981).

Die Tunica media, die bei Arterien stärker ausgebildet ist als bei Venen, kann kontraktionsabhängig den Widerstand im Blutgefäß regulieren und trägt somit entscheidend zur Regulation des lokalen und systemischen Blutdrucks bei. Die glatte Gefäßmuskulatur trägt zu diesem Zweck Rezeptoren für Katecholamine und Acetylcholin; weiterhin haben unter anderem die lokalen Konzentrationen von Stickstoffmonoxid, Kalzium und Aldosteron Einfluss auf den Gefäßtonus (Vanhoutte, 1993).

Endothelzellen stellen schließlich die innere Auskleidung der Blutgefäße dar. Inzwischen wird angenommen, dass sich die Endothelien, anders als die glatte Gefäßmuskulatur, die aus perivaskulären Perizytenvorläufern entsteht, aus hämatopoetischen Progenitorzellen entwickeln (Bai und Wang, 2008). Endothelzellen können *de novo* gebildet werden (Vaskulogenese) oder aus bestehenden Gefäßen aussprosseln (Angiogenese); in beiden Fällen bilden sich zuerst unreife Gefäßschläuche (sog. „leaky vessels“), ein Prozess, der wesentlich von der Stimulation durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor, VEGF) abhängt (Luttun und Carmeliet, 2014).

In ausgereiften Gefäßen sind die Endothelzellen durch dichte „tight junctions“ verbunden, die eine geschlossene Auskleidung des Blutgefäßes ermöglichen. Allerdings sind die Endothelzellen Ziel zahlreicher Signalmoleküle, die von intra- und/oder extravaskulär auf sie einwirken und das zelluläre Verhalten, die endotheliale Zellproliferation und die Zell-Zell-Interaktion mit anderen Endothelzellen sowie Zellen des Immunsystems modulieren (Zimmerman *et al.*, 1992; Irani, 2000; Gould *et al.*, 2014). Diese in den Endothelzellen ablaufenden Signalkaskaden stellen somit die molekulare Grundlage für zahlreiche physiologische und pathologische Prozesse dar.

Die Bindung von VEGF an den VEGF-Rezeptor auf den Endothelzellen stimuliert die Aktivität des „mitogen-associated protein kinase“- (MAPK)-Signalweges und regt

somit die Zellteilung an, was die Bildung neuer Blutgefäße fördert (Angiogenese) (Neufeld *et al.*, 1999). Zudem fördert VEGF, der zur Familie der vaskulären Permeabilitätsfaktoren (VPF) gehört, die Durchlässigkeit des Endothels (Dvorak, 2002). Scherstress, Thrombin und aus aggregierten Thrombozyten freigesetztes Serotonin sowie Adrenalin und Noradrenalin fördern über die Bindung an spezifische Rezeptoren die Transkription der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), was die Freisetzung von endotheliale Stickstoffmonoxid (eNO) fördert (schematische Darstellung in Abbildung 2) (Otsuka *et al.*, 2012). Hält diese Form der Stimulation an, wird zudem die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) heraufreguliert, die mit eNOS in zahlreichen Wechselwirkungen steht und in einem gemeinsamen Signalweg mündet (Colasanti und Suzuki, 2000). Das durch eNOS/iNOS bereitgestellte NO wird von den Endothelzellen freigesetzt und hat zahlreiche autokrine und parakrine Wirkungen auf die umgebenden Endothelien und die glatte Gefäßmuskulatur. So wird die Proliferation und Kontraktion von glatten Gefäßmuskelzellen gehemmt, was den Gefäßtonus reduziert und zum Blutdruckabfall führt. Die Thrombozytenaggregation sowie die Thrombozytenadhäsion an das Endothel werden ebenfalls gehemmt. Schließlich wird die Expression von Adhäsionsmolekülen (Selektinen) auf der Zelloberfläche reduziert, was die Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel hemmt (Otsuka *et al.*, 2012). Das Enzym Arginase schließlich steht in einer reziproken Wechselwirkung mit der eNOS-Aktivität und kann somit durch überschießende Aktivität zur endothelialen Dysfunktion, beispielsweise im Rahmen der pulmonalen Hypertension, beitragen (Berkowitz *et al.*, 2003).

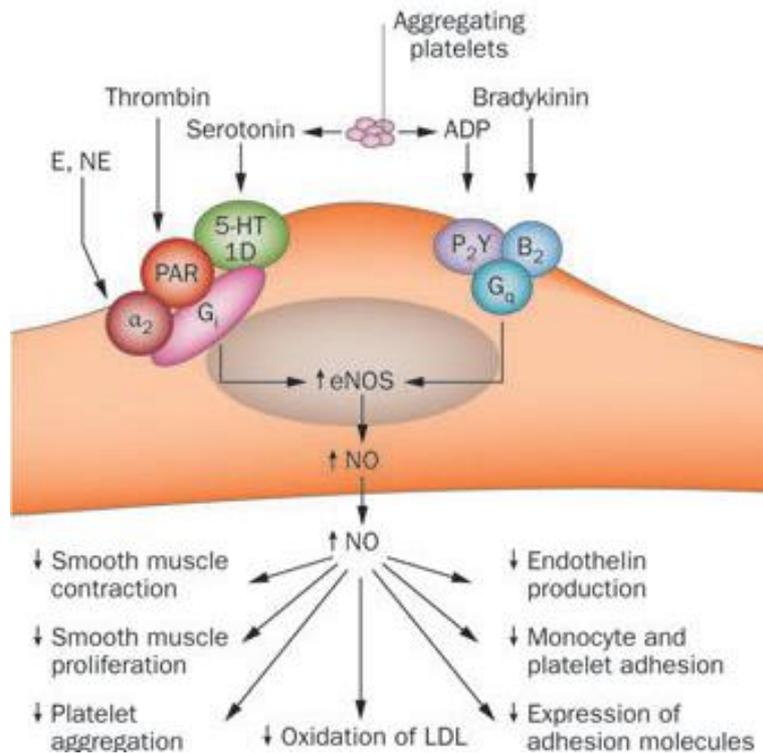


Abbildung 2: Wirkung von Signalmolekülen auf die Endothelzelle (eigene Darstellung, modifiziert aus (Otsuka *et al.*, 2012))

1.2 Rolle der endothelialen Dysfunktion beim Intensivpatienten

Die beschriebene Autoregulation des Endothels kann in verschiedenen pathologischen Zuständen beeinträchtigt sein, was zu teils lebensbedrohlichen Beeinträchtigungen des Kreislaufs und der Blutgerinnung führen kann. So führt eine anhaltende (chronische) Schädigung des Endothels, beispielsweise durch Bluthochdruck, oxidativen Stress, Hyperglykämie, Nikotinabusus oder durch Akkumulation von toxischen Stoffwechselendprodukten schließlich zu einer endothelialen Dysfunktion (Cai und Harrison, 2000). Diese ist unter anderem durch eine Freisetzung von Entzündungsmediatoren und eine Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen gekennzeichnet, welche die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Adhäsion von Entzündungszellen an das Endothel fördert (Davignon und Ganz, 2004).

Hierdurch wird eine lokale Entzündungsreaktion in der Gefäßwand unterhalten, die durch Ablagerung von Lipiden und Einwanderung von Makrophagen, die sich zu Schaumzellen umwandeln, die Bildung von atherosklerotischen Plaques fördert. Eine Ruptur der dünnen Endothelkappe über diesen Plaques kann durch plötzliche Freilegung thrombogener Oberflächen die lokale Blutgerinnung induzieren durch lokalen Gefäßverschluss oder Verschleppung eines Plaques einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall (Apoplex) auslösen.

Akute Endothelschädigungen können bei systemischen Entzündungsreaktionen, beispielsweise im Rahmen eines Polytraumas oder bei Infektionen entstehen. Großflächige Gewebeuntergänge, wie sie bei Verbrennungen, Polytraumen oder Ischämien entstehen, führen zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Zytokine, Arachidonsäuremetaboliten, Akute-Phase-Proteine, Koagulationsfaktoren und Stresshormone) (Keel und Trentz, 2005). Diese Reaktion des Organismus wird auch als systemisches *inflammatory response syndrome* (SIRS) bezeichnet. Tabelle 1 fasst die klinischen Parameter des SIRS zusammen.

Tabelle 1: Klinische Kriterien für das systemische *inflammatory response syndrome* (SIRS). Für die Diagnose eines SIRS müssen zwei oder mehr Parameter erfüllt sein (eigene Darstellung nach (Keel und Trentz, 2005))

| | |
|----|---|
| 1. | Herzfrequenz > 90/min |
| 2. | Atemfrequenz > 20/min bzw. Hyperventilation mit Abfall des arteriellen CO ₂ -Partialdrucks (P _a CO ₂) < 32 mmHg |
| 3. | Körperkerntemperatur > 38 oder < 36°C |
| 4. | Leukozyten > 12.000 oder < 4.000/mm ³ oder Linksverschiebung |

Sofern beim SIRS ein Infektfokus bzw. eine Bakteriämie nachgewiesen werden kann, liegt das klinische Bild einer Sepsis vor (Bone *et al.*, 1992).

Das Endothel spielt bei der Pathophysiologie des SIRS eine zentrale Rolle und das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion ist ein entscheidender Parameter für den Outcome bei kritisch kranken Patienten. Ältere Arbeiten zeigten bereits, dass die erhöhte Serumkonzentration des von-Willebrand-Faktors (vWF) bei Sepsispatienten

im Wesentlichen durch die Schädigung von Endothelzellen bedingt ist (McGill *et al.*, 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die 28-Tage-Mortalität und das Risiko für den Ausfall von Organsystemen signifikant mit den Plasmakonzentrationen von Markern für die endotheliale Dysfunktion korrelieren (Angiopoietin-1 und -2 sowie sVCAM-1) (Hahn *et al.*, 2015; Mikacenic *et al.*, 2015). Angiopoietin-2 ist hierbei ein Marker für die endotheliale Durchlässigkeit. Weiterhin konnte eine erhöhte Freisetzung endothelialer Mikropartikel bei Patienten mit SIRS nachgewiesen werden; die In-vitro-Behandlung endothelialer Progenitorzellen mit Serum von SIRS-Patienten induzierte in diesen einen erhöhten oxidativen Stress und die Proliferationsaktivität (Pang *et al.*, 2013; Werner und Sinning, 2016). Erhöhte Spiegel des Entzündungsmarkers Tumornekrosefaktor α (TNF- α) führen bei SIRS-Patienten über die Aktivierung des NF κ B-Signalweges und p38-MAPK zur endothelialen Dysfunktion (Liang *et al.*, 2014).

Bei Sepsispatienten kommen zu den zirkulierenden Entzündungsmediatoren zusätzlich noch bakterielle Toxine, die eine direkte Wirkung auf das Endothel entfalten können. So aktiviert die Bindung von Lipopolysacchariden (LPS), die Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien sind, an endotheliale *Toll-like*-Rezeptoren den NF κ B-Signalweg, was zur Freisetzung von entzündungsfördernden Zytokinen (TNF- α , IL-1) durch die Endothelzelle führt (Peters *et al.*, 2003). Zudem werden Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM) heraufreguliert, welche die Bindung von zirkulierenden Entzündungszellen an die Endothelzelle fördern. Bei durch grampositive Bakterien verursachten Entzündungen können Peptidoglykane und Lipoteichonsäure aus der bakteriellen Membran ähnliche Effekte hervorrufen. Abbildung 3 zeigt schematisch die Kaskade der endothelialen Aktivierung im Rahmen von SIRS und Sepsis.

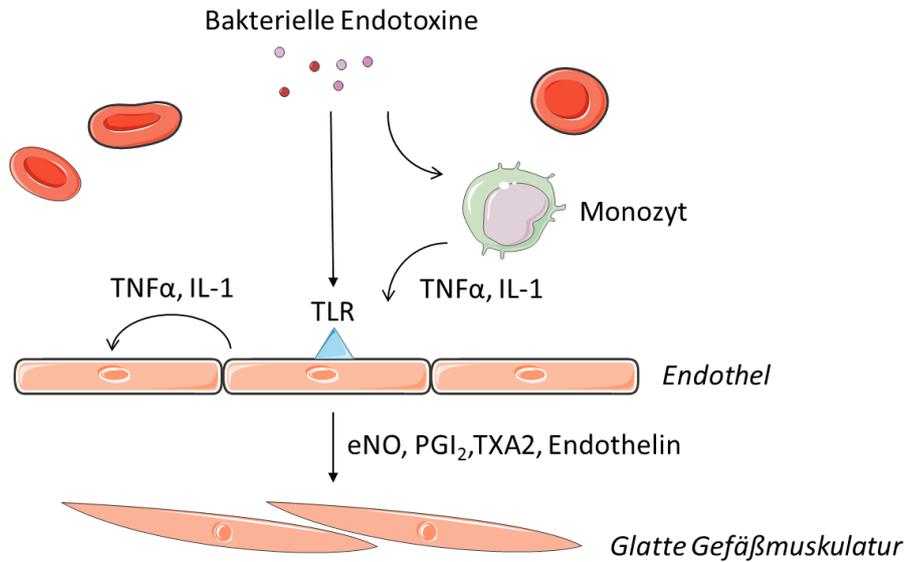


Abbildung 3: Aktivierung des Endothels bei SIRS und Sepsis. Bakterielle Endotoxine aktivieren Makrophagen oder über Toll-like-Rezeptoren direkt das Endothel (Sepsis); bei SIRS erfolgt eine Aktivierung durch zirkulierende Entzündungsmediatoren. Hierdurch wird eine systemische und/oder parakrine Freisetzung von TNF α und IL-1 bedingt, was in den Endothelzellen unter anderem die Transkription der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) fördert. Durch Bildung von NO und Entzündungsmediatoren wird der Gefäßtonus reguliert. *TLR*, Toll-like-Rezeptor; *TNF α* , Tumornekrosefaktor α ; *IL-1*, Interleukin 1; *eNO*, endotheliales Stickstoffmonoxid; *PGI₂*, Prostaglandin *I*₂, *TXA₂*, Thromboxan *A*₂ (eigene Abbildung)

Eine wesentliche Komplikation der SIRS bzw. der Sepsis ist der Verlust der endothelialen Barrierefunktion, der zum Austritt von Flüssigkeit in den extravaskulären Raum und zur Bildung von Ödemen führt (sogenanntes „Capillary-leak“-Phänomen). Dies geschieht insbesondere in der Lunge, der Niere und dem Gehirn. Die molekularen Grundlagen hierfür sind bislang noch unzureichend verstanden; es ist jedoch bekannt, dass TNF- α und LPS zu einer proteolytischen Spaltung von Zelladhäsionsmolekülen führen, was den Austritt von Flüssigkeit zwischen den normalerweise fest verbundenen Endothelzellen ermöglicht (Bannerman *et al.*, 1998). Zudem scheinen die Endothelzellen direkt strukturellen Schaden zu nehmen und die Aktivierung apoptotischer Signalwege lässt Endothelzellen untergehen (Hauptmann *et al.*, 1994; Frey und Finlay, 1998).

Schließlich führt eine durch Sauerstoff- oder Glukosemangel bedingte ATP-Depletion in den Endothelzellen zum Zerreißen von Aktinfilamenten, was eine weitere Schädigung der endothelialen Integrität bedeutet und den Flüssigkeitsaustritt zwischen den Endothelien begünstigt (Hinshaw *et al.*, 1993). Hierbei spielt auch der vermehrte oxidative Stress eine wesentliche Rolle, da durch neutrophile Granulozyten freigesetztes H_2O_2 (*respiratory burst*) die intrazellulären Kalzium- und ATP-Spiegel beeinflusst und so zu einer Änderung der Zellmorphologie führt (Hinshaw *et al.*, 1989; Salvemini und Cuzzocrea, 2002). Änderungen des Energiehaushaltes der Endothelzellen haben so über die Durchlässigkeit des Endothels einen direkten Einfluss auf die Entwicklung des *Capillary-leak*-Syndroms.

1.3 Der Ketonkörpermetabolismus: Physiologie und Pathophysiologie

Zellen als biologische Grundeinheiten benötigen für die Erhaltung ihrer Grundfunktionen und Erfüllung ihrer jeweiligen Aufgaben Energie, die in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt wird. Der Bedarf an ATP unterscheidet sich von Gewebe zu Gewebe je nach Zelltyp, aus dem der jeweilige Gewebeverband aufgebaut ist. So benötigen beispielsweise das Gehirn, die Herz- und die arbeitende Skelettmuskulatur viel Energie, während wenig stoffwechselaktive Gewebe (wie Knorpel und Knochen) auch länger anhaltende Energieknappheit ohne Probleme überdauern können (Ulmer, 1997).

Die Herstellung von ATP ist in den meisten Zellen und im normalen Ernährungszustand in erster Linie von Glukose abhängig. Bei der Glykolyse werden durch den Abbau dieses Kohlenhydrates ATP, Redoxäquivalente sowie Pyruvat als Ausgangsstoff für die weit effektivere ATP-Erzeugung im Citratzyklus und in der Atmungskette (oxidative Phosphorylierung) erzeugt (Rona, 1911; Negelein, 1925; Lenzen, 2014). Aus einem Glukosemolekül werden bei der Glykolyse zwei Moleküle Pyruvat und zwei Moleküle ATP gebildet. Zudem werden zwei Moleküle Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) zu $NADH^+$ reduziert. Mit der Erzeugung von zwei Molekülen ATP ist die Glykolyse zwar nicht annähernd so effektiv wie die Energieerzeugung im Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung, kann aber im Gegensatz zu diesen auch unter anaeroben Bedingungen ablaufen.

Pyruvat als Glykolyse-Endprodukt wird durch die Laktatdehydrogenase in Laktat abgebaut. Damit die Zelle nicht übersäuert, sorgen Monocarboxylattransporter (MCTs) für eine rasche Ausschleusung des Laktats. Die Glykolyse ist unter zahlreichen Arten hochkonserviert, was evolutionsgeschichtlich auf eine sehr frühe Entstehung dieses Stoffwechselweges hindeutet (Heinrich *et al.*, 1987). Normalerweise wird Glukose über Glukosetransporter (Glut/GluT 1-13, organspezifische Expressionsunterschiede) in die Zelle aufgenommen (Thorens und Mueckler, 2010). Liegt ein relativer oder absoluter Glukosemangel vor, beispielsweise bei Hungerzuständen, besitzt der Körper Ausweichstrategien, um auf andere Arten Energie zu erzeugen. Kurzfristig kann Glukose aus den Glykogenspeichern (insbesondere in der Leber) bereitgestellt werden. Längere Kalorienrestriktion führt allerdings zur raschen Depletion dieser Glykogenspeicher. Insbesondere in der Leber wird daher aus freien Fettsäuren durch β -Oxidierung Acetyl-CoA erzeugt. Ein Teil dieses Acetyl-CoA tritt als Substrat direkt in den Citratzyklus über, der Rest wird über Acetoacetat zu Acetacetat und β -Hydroxybutyrat verstoffwechselt (Ketogenese). Acetacetat und β -Hydroxybutyrat werden mit dem Blutstrom zu den Körperzellen transportiert, wo aus ihnen über die Ketolyse wieder Acetyl-CoA als Substrat für die ATP-Erzeugung über den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung erzeugt wird (Stanley *et al.*, 2014). Acetacetat kann spontan zu Aceton decarboxylieren. Aceton wird als toxische Substanz über die Atmung bzw. den Urin aus dem Körper ausgeschieden. Übersteigt die Acetacetatkonzentration die Nierenschwelle von 10 mmol/l (Schmidt, Thews, Lang "Physiologie des Menschen", 28. Aufl.), wird dieses ebenfalls ausgeschieden. Eine schematische Darstellung des Ketonkörpermetabolismus zeigt Abbildung 4.

Beim SIRS kommt es durch den erhöhten Energiebedarf zu einer raschen Entleerung der Glykogenspeicher und demzufolge zu einem Anstieg der zirkulierenden Ketonkörper (Waelput *et al.*, 2006). Lee *et al.* zeigten, dass das arterielle Ketonkörperverhältnis (*arterial ketone body ratio*, AKBR; Verhältnis von Acetacetat zu β -Hydroxybutyrat) bei Sepsispatienten mit einem infausten Verlauf im Vergleich zu Patienten mit einer guten Prognose an den ersten drei Intensivtagen signifikant erniedrigt war; dieser Unterschied war zu den späteren Beobachtungspunkten (Tage 4–14) allerdings nicht mehr signifikant (Lee *et al.*, 2004).

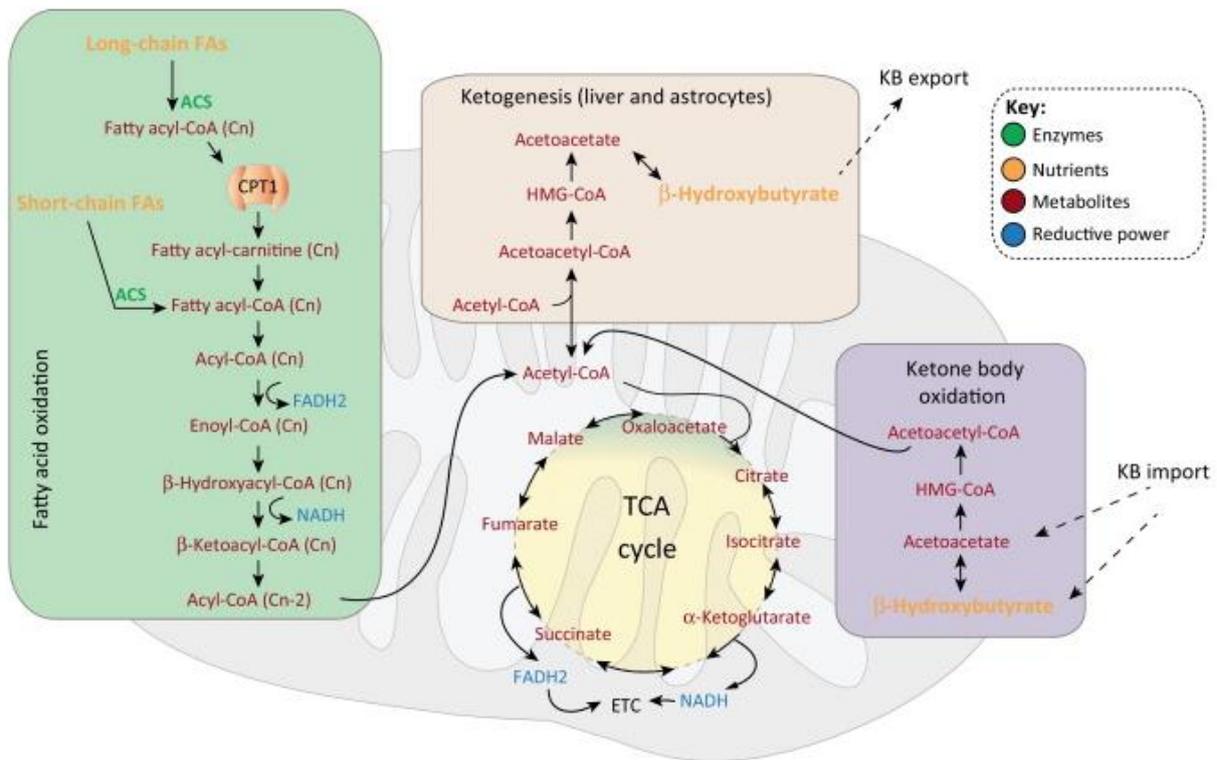


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ketonkörpermetabolismus. Fettsäureoxidierung erzeugt Acetyl-CoA. Dieses kann in den Citratzyklus eingeschleust werden oder es werden lösliche Ketonkörper (β -Hydroxybutyrat) erzeugt, aus denen in der Zielzelle über die Ketonkörper-Oxidierung erneut Acetyl-CoA als Substrat für den Citratzyklus hergestellt wird (Stanley *et al.*, 2014)

Eine weitere Arbeit an 20 Intensivpatienten mit postoperativer Sepsis bestätigte diese Ergebnisse; auch hier war bei Patienten mit ungünstigem Verlauf die AKBR signifikant erniedrigt, was die Autoren auf ein zunehmendes NO-induziertes Leberversagen bei diesen Patienten zurückführten (Satoi *et al.*, 2000). Eine Messung der Ketonkörper in der Ausatemluft als prognostischer Biomarker bei Sepsispatienten wurde daher bereits diskutiert (Schubert *et al.*, 2004). In der Zusammenschau scheint die Produktion von Ketonkörpern bei SIRS-Patienten initial zuzunehmen, um die Depletion der vorhandenen Glykogenspeicher auszugleichen. Tritt allerdings im Krankheitsverlauf ein Leberversagen ein, ist nach den vorliegenden Resultaten die Abnahme der Ketonkörper ein prognostisch ungünstiges Zeichen.

Während die allermeisten Zellen im menschlichen Organismus den Großteil ihres Energiebedarfs über die Atmungskette generieren, wird in Endothelzellen ATP zu nahezu gleichen Teilen über die oxidative Phosphorylierung (sauerstoffabhängig) und die Glykolyse (sauerstoffunabhängig) erzeugt (Culic *et al.*, 1997). Dies führt dazu, dass Endothelzellen eine relative hohe Hypoxietoleranz besitzen, bevor es zum Zelluntergang kommt. Ketonkörper (zirkulierendes β -Hydroxybutyrat und Acetacetat), die bei SIRS-/Sepsispatienten initial erhöht sind, stellen eine weitere mögliche Energiequelle für vaskuläre Endothelzellen dar.

Einzelne Arbeiten untersuchten den Zusammenhang zwischen Ketonkörpern und vaskulärer Permeabilität. So erhöht die Exposition von mikrovaskulären Endothelzellen der Maus (MBEC) gegenüber β -Hydroxybutyrat die Freisetzung von VEGF-1, was die vaskuläre Permeabilität erhöht; im Gegensatz hierzu führt Acetacetat zur Sekretion von Endothelin-1, einem potenten Vasokonstriktor (Isales *et al.*, 1999). Weiterhin werden durch Acetacetat die Herstellung von Sauerstoffradikalen und die Lipidperoxidation in Endothelien gefördert, was in diesem Modell zu einer Wachstumshemmung der Zellen führte (Jain *et al.*, 1998). Zudem soll durch die Ketonkörper induzierter oxidativer Stress die Leukozytenadhäsion an das Endothel durch Heraufregulation von ICAM-1 fördern (Kanikarla-Marie und Jain, 2015). Dies soll jedoch durch Vitamin-D-Supplementierung blockiert werden können (Marie und Jain, 2015). Neuere Untersuchungen in Kühen ergaben, dass die Exposition von Endothelzellen gegenüber Ketonkörpern hier zu einer Heraufregulation von Zelladhäsionsmolekülen (Connexin-43) führte, was die Durchlässigkeit des Endothels verminderte (Ho *et al.*, 2013).

1.4 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, wie sich die Exposition gegenüber unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen sowie gegenüber β -Hydroxybutyrat im Hinblick auf den Energiestoffwechsel, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und die Angiogenese in menschlichen Endothelzellen auswirkt. Als zelluläres Modell hierfür dienen menschliche Nabelschnurendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC), die *in vitro* mit unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken sowie verschiedenen Konzentrationen von Ketonkörpern behandelt werden.

Die Arbeit ist von klinischem Interesse, da beatmete Intensivpatienten zum einen oftmals eine endotheliale Dysfunktion mit Flüssigkeitsaustritten durch die Gefäßwand und Bildung von Ödemen zeigen, zum anderen liegt bei diesen Patienten häufig eine dysregulierte Stoffwechsellage mit Depletion der körpereigenen Glykogenspeicher vor. Die Ergebnisse dieser Arbeit können dazu beitragen, über ein besseres Verständnis der zellulären Vorgänge in den Endothelzellen die mögliche protektive Rolle einer physiologischen Ketose bei Intensivpatienten zu evaluieren. Langfristig könnte hierdurch eine therapeutische Strategie entwickelt werden, um dem *Capillary-leak*-Syndrom und der Ausbildung lebensbedrohlicher Ödeme bei diesen Patienten zu begegnen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Folgende Geräte wurden bei der Erstellung dieser Arbeit verwendet:

- Fotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Gelkammer (OWL/Thermo Fisher, Madison, USA)
- Gelkammer PerfectBlue Twin S (peqlab, Erlangen, Deutschland)
- CO₂ Inkubator (LaboTec, Göttingen, Deutschland)
- UV-Schirm TFX 20M (Vilbert Lourmat, Frankreich)
- Canon Digitalkamera (Canon, Tokio, Japan)
- Thermocycler Progene Reference(Techne, Cambridge, England)
- Power Supply Consort (Consort, Turnhout, Belgien)
- Röntgenkassette (Dr Goos Suprema, Heidelberg, Deutschland)
- Semi-Dry-Electroblotter SEDEC M (peqlab, Erlangen, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

- Zellkultur-Plastikwaren (TPP, Berlin, Deutschland)
- Proteinaufreinigungssäule / QiaShredder(Qiagen,Hilden, Deutschland)
- Nitrocellulosemembran Protan (GE healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland)
- Blotting-Papier Whatman (GE healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland)
- Röntgenfilme Fuji Medical X-Ray (Fuji EuropoeGmbH, Düsseldorf, Germany)

2.1.3 Reagenzien

Folgende Reagenzien bzw. Kits wurden bei der Erstellung dieser Arbeit verwendet:

- Collagenase I (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- DNase (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Hyaluronidase (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- RPMI Medium (Gibco, Darmstadt, Deutschland)
- Endothel Cell Growth II Media (Promocell, Heidelberg, Deutschland)
- Gentamycin (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Amphotericin B (Biocrom, Berlin, Deutschland)
- PBS Dulbecco (Biocrom, Berlin, Deutschland)
- Trypsin/ EDTA-Lösung (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA)
- RevertAid H minusFirst Strand cDNA-Kit (Fermentas, Waltham, USA)
- DNA loading dye (Thermo Fisher, Madison, USA)
- GeneRuler DNA ladder (Thermo Fisher, Madison, USA)
- Agarosegel TopVision (Fermentas, Waltham, USA)
- TBE-Puffer (Fermentas, Waltham, USA)
- PCR-Primer (mwg urofins, Martinsried, Deutschland)
- Bradford Reagenz/ RotiQuant (Roth, Herrenberg, Deutschland)
- Acrylamid-Bisacrylamid 30% (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- SDS (Roth, Herrenberg, Deutschland)
- Glycine (Roth, Herrenberg, Deutschland)
- Tris / base (Roth, Herrenberg, Deutschland)
- Temed (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Ammoniumpersulfat (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- RIPA-Lysepuffer (Thermo Fischer, Darmstadt, D)
- DTT (Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Magermilchpulver (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Fotochemikalien Carestream GBX (Carestream Health, Belgien)

- ECL-Substrat (Thermo Fisher, Langenselbold, D)
- RayBio Cytokin / Angiogenese-Array (RayBiotech, Norcross, USA)
- Matrigel BD (BD, Heidelberg, Deutschland)

2.1.4 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden menschliche Nabelschnur-Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) verwendet, welche direkt aus Nabelschnüren isoliert wurden. Nabelschnüre wurden kurz nach der Geburt von der Plazenta getrennt und bis max. 24h in sterilem RPMI/ Gentamycin bei 4°C verwahrt, mit Alkohol desinfiziert und abgetrocknet. Die Vene wurde mit einer Knopfkanüle sondiert, Blutreste wurden mithilfe einer Spülung mit PBS entfernt. Zum Ablösen der Zellen wurde die Nabelschnur mit Kollagenase-Lösung (400U/ml Collagenase I, 480U/ml DNase, 200U/ml Hyaluronidase) gefüllt, mit sterilen Klemmen verschlossen und bei 37°C für 20 min inkubiert. Die danach aus der Vene mit 50 ml sterilem PBS ausgespülte Zellsuspension wurde in einem Röhrchen aufgefangen, durch Zentrifugation bei 280g für 10 min pelletiert, in Endothelial Cell Growth Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Die Verwendung der Nabelschnüre wurde durch ein Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg (103/15) genehmigt und die Patientinnen haben ihr schriftliches Einverständnis zur Isolation gegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die HUVEC-Zellen wurden unter sterilen Zellkulturstandardbedingungen bzw. den jeweils angegebenen experimentabhängigen Umgebungsbedingungen kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde Promocell Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, Heidelberg; C-22010) mit Supplement-Mix (C-39215) + Gentamycin und Amphotericin B verwendet. Die Zellen wurden regelmäßig mikroskopisch und makroskopisch auf das Vorliegen von Infektionen überprüft und bei Erreichen von 80 % Konfluenz subkultiviert. Hierzu wurden die adhärenenten Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst.

Nach Aufnahme der Zellsuspension, mikroskopischer Zellzählung und Abzentrifugieren des Zellpellets wurde dieses im Zielvolumen aufgenommen und auf die gewünschte Anzahl von Zellkulturflaschen aufgeteilt („gesplittet“). Die exakten Umgebungsbedingungen jedes Versuchs sind bei den jeweiligen experimentellen Resultaten mit angegeben.

2.2.2 PCR-Analysen

Der Nachweis gesuchter mRNA erfolgte mittels RT-PCR. Hierzu wurde aus HUVEC-Zellen bei 80 % Konfluenz unter Einsatz des RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers Gesamt-RNA isoliert. Hierzu wurden Zellen mit PBS gewaschen und pelletiert. Mit Hilfe des im Kit enthaltenen Lysepuffers wurden die Zellen lysiert und homogenisiert. Über eine Siliciummembran und mehrere Zentrifugationsschritte mit unterschiedlichen Puffern wird hierbei RNA in der Säuleneinheit spezifisch auf der Membran gebunden, genomische DNA durch DNAsen-Verdau entfernt und RNA mittels RNase-freiem Wasser isoliert. Die Degradation der RNA wurde durch Zugabe von RNAsin Ribonuclease Inhibitor (1:40; Promega, Madison, USA) verhindert. Die RNA-Konzentration und die Reinheit der Probe wurde im Fotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260/280 nm bestimmt. Im Anschluss wurde über die Reverse Transkriptase (RT)- Reaktion ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) gemäß Herstellerprotokoll mit dem RevertAid H minusFirst Strand cDNA-Kit (Fermentas, Waltham, USA) als Ausgangsmaterial für die darauf folgende Polymerase Ketten Reaktion (PCR) erzeugt. Hierzu wurde das gewonnene RNA-Template (500 ng) mit spezifischen Oligo-dT-Primern und nukleasefreiem Wasser versetzt; anschließend wurde 5fach Reaktionspuffer, RNase-Inhibitor und 10 nM dNTP-Mix sowie Reverse Transkriptase hinzugegeben. Es folgte eine 5minütige Inkubation bei 25°C sowie eine 60minütige Inkubation bei 42°C. Die Reaktion wurde mit 10minütiger Inkubation bei 85°C beendet.

Für die PCR wurden folgende Primer verwendet (bezogen von mwg eurofins, Martinsried, Deutschland; FW: forward-, RV: reverse-Primer):

| | | |
|-----------------|----|---------------------------------|
| Arginase | FW | 5'-GTTTTGATGTTGACGGACTG-3' |
| | RV | 3'-GTTCACTGTTTCGAGTTACTTC-5' |
| iNos | FW | 5'-TCCAAGGTATCCTGGAGCGA-3' |
| | RV | 3'-CAGGGACGGGAACCTCCTCTA-5' |
| Glut1 | FW | 5'-AGCAGCAAGAAGCTGACGGGT-3' |
| | RV | 3'-CGCCGGCCAAAGCGGTAAAC-5' |
| MCT1 | FW | 5'-CAACAAGGTCCATCAATGTTTCAA-3' |
| | RV | 3'-GGAGGTCTTGGGCTTGCCTTCAACT-5' |
| MCT4 | FW | 5'-ACCAACCCTCCTGGCCATGGGA-3' |
| | RV | 3'-GCCAAACCCAACCCGTGATG-5' |

PCR-Ansatz:

- 12,5µl GoTaq-Polymerase
- 1 µl FW Primer
- 1 µl RV Primer
- 9,5 µl A. dest.
- 1 µl cDNA

PCR-Protokoll:

| Primer | Annealing | Zyklen | cDNA |
|---------------|------------------|---------------|-------------|
| Glut-1 | 60°C | 38 | 1 µl |
| MCT1 | 60°C | 30 | 1 µl |
| MCT4 | 62°C | 38 | 1 µl |
| Arginase | 57°C | 40 | 1 µl |
| iNos | 62°C | 40 | 2 µl |

Die Vervielfältigung der eingesetzten cDNA erfolgte nach oben aufgeführten Angaben in einem Thermocycler.

Anschließend wurden 10 µl der PCR-Produkte mit Auftragspuffer (2 µl 6-fach DNA Loading Dye, Thermo Fisher, Bergisch Gladbach, DE) gemischt und auf einem 1,5%-Agarosegel (in TBE-Puffer) aufgetragen. Die DNA Proben wurden bei einer Spannung von 125 V und 180 mA für 45 min im elektrischen Feld der Größe nach getrennt. Ein mitgeführter Größenstandard (GeneRuler 1kb Plus DNA ladder, Bergisch Gladbach, DE) definiert den Bereich der zu erwartenden Basenpaare. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurden dem Gel 5 µl Ethidiumbromid zugegeben. Das Ergebnis wurde im UV-Licht (UV-Schirm bei 300 nm) sichtbar gemacht und fotodokumentiert.

2.2.3 Proteinbiochemie

Für die Proteinisolierung wurden HUVEC-Zellen aus einer laufenden Kultur trypsinisiert, gewaschen und mit 200 µl (RIPA)-Zellysepuffer versetzt. Nach mehrmaliger Durchmischung und 30minütiger Inkubation auf Eis wurden Proteine über eine Proteinisolationssäule (Quiagen) und Zentrifugation aufgereinigt. Proteinkonzentrationen der gewonnenen Proteinlysate wurden mittels der Bradford-Methode im Fotometer bestimmt. 10 µg jeder Probe wurde mit RIPA-Puffer auf ein einheitliches Volumen gebracht, mit entsprechender Menge 2-fach Laemmli-Puffer mit Bromphenolblau und DTT versetzt und 5 min gekocht. Dadurch werden Disulfid- und Wasserstoffbrückenbindungen gelöst, Proteine denaturiert und linearisiert und eine konstante negative Ladungsverteilung erreicht. Dies erlaubt eine Trennung nach Molekülmasse im elektrischen Feld.

Zur Auftrennung der denaturierten Proteinlysate werden diese auf ein 9% SDS-Gel aufgetragen und bei einer elektrischen Spannung von 120 V eine Migration der negativ geladenen Moleküle durch das Gel provoziert. Dabei werden kleine, schnell wandernde Proteine von größeren getrennt. Die Proteine wurden anschließend in methanolhaltigem (20%) Blotpuffer im Semidry-Blotverfahren auf eine Nitrocellulose Membran transferiert (10 V, 65 mA). Der Erfolg des Transfers aus dem Gel auf die Membran wird mit Ponceau-Rot überprüft. Eine einstündige Inkubation der Membran in einer 5%-igen Magermilch / PBS / Tween-20 Lösung vermindert die unspezifische

Bindung von Immunglobulinen. Proteinbanden werden mit spezifischen primären Antikörpern und enzymgekoppelter Zweitantikörperbindung sichtbar gemacht. Die Inkubation mit einem spezifischen Substrat (ECL-Reagenz) setzt in einer Reaktion das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym um und kann als Chemiluminiszenz einen Röntgenfilm schwärzen und somit detektiert werden. Die Auswertung (Quantifizierung der Bandenstärke) erfolgte mit Image J.

Verwendete Antikörper und Konzentrationen:

| Antikörper/ Spezies | Hersteller | Konzentration |
|----------------------------|-------------------|----------------------|
| Glut-1 rabbit | Abcam ab32551 | 1:500 |
| MCT1 rabbit | Sigma HPA003324 | 1:1000 |
| MCT4 rabbit | Sigma HPA021451 | 1:1000 |
| Arginase rabbit | LSBio LS-C179028 | 1:2000 |
| iNOS mouse | LSBio LS-B10049 | 1:1000 |
| Beta-Actin mouse | Abcam ab8226 | 1:10 000 |

Selbst hergestellter ECL-Puffer:

- Solution A (SA): 200 ml 0,1M TRIS-HCl (pH 8,6) 50 mg Luminol (Sigma A4685)
- Solution B (SB): 1 mg para-Hydroxycoumarinsäure (Sigma C9008) in 10 ml DMSO lösen
- H₂O₂ (35 %)

Einsatz der Gebrauchslösung:

- 1 ml SA + 0,3 µl H₂O₂ (30 %) + 100 µl SB mischen
- Blot-Membran 2 min inkubieren (Lösung dabei gut verteilen)
- Filmexposition Für eine 13 x 7 cm große Membran genügen 4 ml Lösung (4 ml SA + 1,2 µl H₂O₂ (30 %) + 400 µl SB mischen).

Antibody Array

Zur Detektion von Zytokinen und Angiogenesefaktoren in Zelllysate und Zellkulturüberstand wurde nach der jeweiligen experimentellen Vorbehandlung der RayBio Human Cytokine Antibody Array G-Series 3 bzw. der RayBio Human Angiogenesis Antibody Array C2 (RayBiotech, Norcross, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei erfolgte eine Inkubation des Probenmaterials (800 µg/Ansatz) auf einer Nitrocellulosemembran mit immobilisierten Antikörpern. Durch Inkubation mit einer antigenspezifischen Antikörpermischung wurden die an die Membran gebundenen Antigene markiert und in einer anschließenden Chemolumineszenzreaktion auf Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Die Intensität der Chemilumineszenz ist bei beiden Methoden (Western Blot und Antikörperarray) von der Konzentration des jeweiligen Proteins abhängig.

Die Dokumentation von Antikörperarrays und Western Blots erfolgte durch Scannen der Röntgenfilme und Quantifizierung der Intensität der Grauwerte unter Verwendung der Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

2.2.4 Scratch Assay

Zur Quantifizierung der Zellmigration wurde in adhärenz Zellkulturen mit vollständiger Konfluenz (100%) mit einer sterilen Pipettenspitze eine Schneise mit definierter Breite gesetzt (Nullwert), um anschließend die Migration der Zellen in die so entstandene Schneise unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen sowie nach Exposition gegenüber ansteigenden Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat zu untersuchen.

Die Migration der Zellen in die so entstandene Schneise wurde unter unterschiedlichen Kulturbedingungen (bei den jeweiligen Ergebnissen mit angegeben) zu definierten Zeitpunkten fotodokumentiert. Die Abstände wurden digital vermessen und die Unterschiede statistisch ausgewertet (s. u.). Die exakten Umgebungsbedingungen sind bei jedem Experiment mit angegeben.

2.2.5 Matrigel-basierter Angiogeneseassay

Zellkulturoberflächen einer 24-well Platte wurden mit 150 μ l Matrigel/well nach Angaben des Herstellers beschichtet und die Zellen in einer Konzentration von 100.000 in 350 μ l und well hierauf ausgesät. Die Bildung neuer Gefäßstrukturen wurde zu festgelegten Zeitpunkten und unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen fotodokumentiert. Die Auswertung der digitalen Bilder erfolgte mit der Freeware AngioTool64, v. 06.a (Zudaire *et al.*, 2011). Die Software ermöglicht unter anderem die Messung der Gefäßlänge, der Gefäßdichte sowie der Anzahl der Verzweigungspunkte. Unterschiede wurden statistisch ausgewertet (s. u.).

2.2.6 Methoden der Statistik

Messwerte wurden in Excel erfasst (Microsoft Seattle, USA). Alle statistischen Berechnungen erfolgten unter Verwendung der Software GraphPad Prism (GraphPad, LaJolla, USA). Zum Vergleich zweier kontinuierlicher Variablen wurde (bei normalverteilter Grundgesamtheit) der studentische t-Test, für mehr als zwei Gruppen die Varianzanalyse (ANOVA, Kruskal-Wallis-Test) mit anschließenden multiplen Gruppenvergleichen durchgeführt. Zur Überprüfung von Korrelationen wurden Pearson-Korrelationskoeffizienten bestimmt. Diagramme wurden ebenfalls in GraphPad erstellt. Als Signifikanzschwelle wurde $p = 0,05$ festgelegt; zur Kennzeichnung wurde folgende Sternsymbolik verwendet: *, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3 ERGEBNISSE

3.1 Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen auf die mRNA- und Proteinexpressionsprofile in HUVEC-Zellen

In einem ersten Schritt wurde untersucht, wie sich unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen auf die Expression von mRNAs für die Transportermoleküle des Zucker- und Ketonstoffwechsels sowie für die Schlüsselenzyme der Immunmodulation auswirken. Hierzu wurden nach Isolation von Gesamt-mRNA aus den unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen inkubierten HUVEC-Zellen RT-PCR-Untersuchungen mit spezifischen Primern für die zu untersuchenden mRNAs durchgeführt. Abbildung 5 zeigt die auf ein Agarosegel aufgetragenen Amplifikate für die untersuchten Ziel-mRNAs nach Agarose-Gelelektrophorese (Auftrennung nach Fragmentgröße). Die Ziel-mRNAs waren die mRNAs für die Monocarboxylattransporter (MCT) 1 und 4, den Glukosetransporter 1 (Glut1), die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und das Enzym Arginase.

MCT1, MCT4 und Glut1 wurden auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Linien exprimiert. Die iNOS hingegen wurde nur in der 1. untersuchten Charge bei 21% und 5% Sauerstoff, in der 2. und 3. Charge hingegen schwach bei 1% Sauerstoff nachgewiesen. Das Expressionsmuster der mRNA für die Arginase ähnelte jenem der mRNA von iNOS.

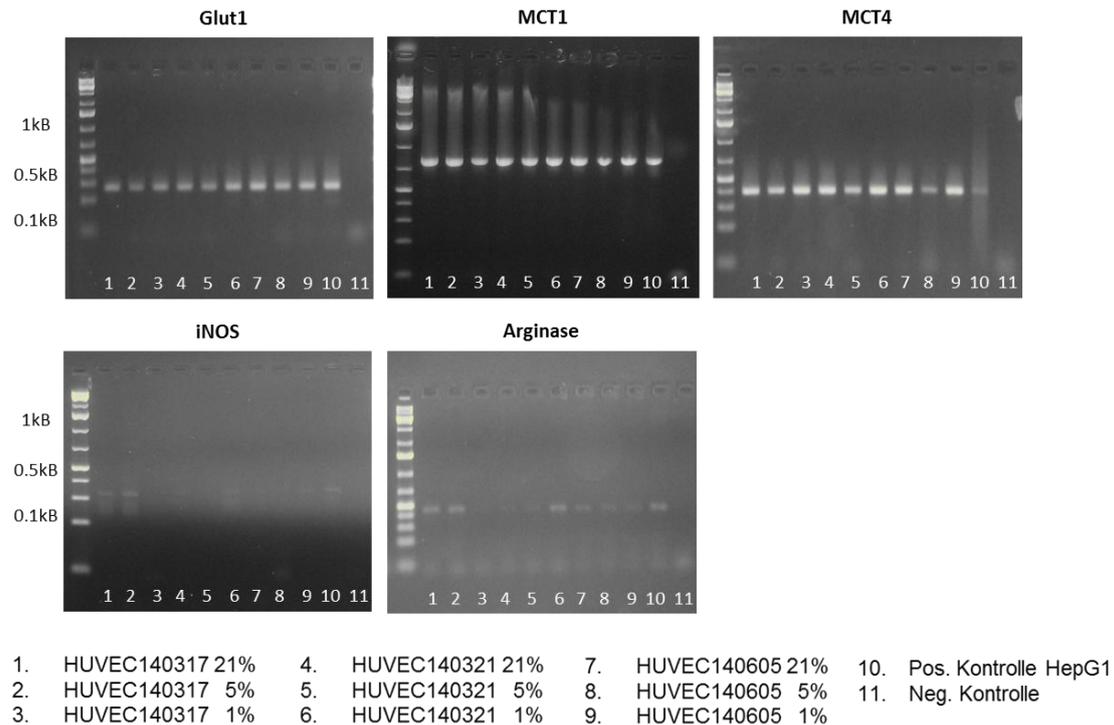
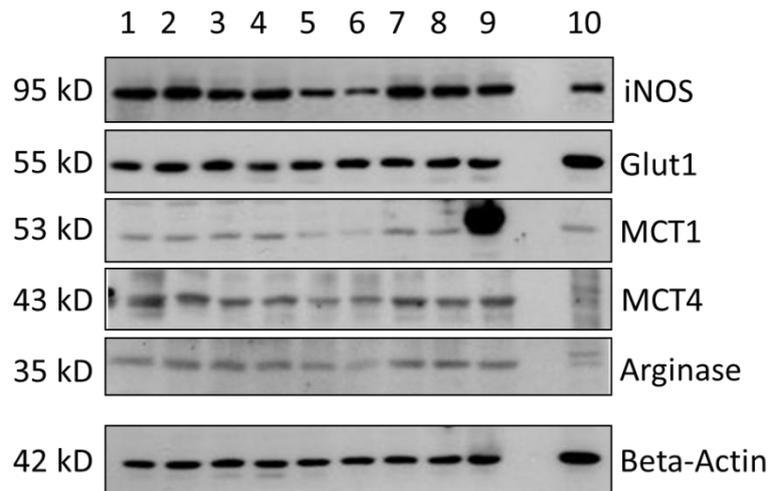


Abbildung 5: RT-PCR zum Nachweis der mRNAs von hsGLT1, MCT1, MCT4, Glut1, iNOS und Arginase

Anschließend wurde zur Detektion der Proteinexpression von Glut1, MCT1 und -4 sowie von iNOS und Arginase ein Western Blot von Gesamtproteinlysate der mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen inkubierten HUVEC-Zelllinien durchgeführt (Abbildung 6). Als Ladungskontrolle diente Beta-Actin. Es zeigte sich, dass auf Proteinebene keine wesentlichen Unterschiede der Expression nachweisbar waren; lediglich HUVEC-Zellen der 2. Charge zeigten unter 1% Sauerstoff eine etwas schwächere Proteinexpression von iNOS, Glut1, MCT1 und Arginase. iNOS nimmt von 4 nach 5 nach 6 ab und ebenso von / nach 9, d.h. in zwei Chargen wird iNOS bei Hypoxie schlechter gebildet und auch in der ersten Charge ist in Reihe 3 weniger iNOS als in Reihe 2.



- | | | |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 1. HUVEC 140317/2 - 21% | 4. HUVEC 140321/2 - 21% | 7. HUVEC 140506 - 21% |
| 2. HUVEC 140317/2 - 5% | 5. HUVEC 140321/2 - 5% | 8. HUVEC 140506 - 5% |
| 3. HUVEC 140317/2 - 1% | 6. HUVEC 140321/2 - 1% | 9. HUVEC 140506 - 1% |
| | | 10. Kontrolle HepG2 |

Abbildung 6: Western Blot zum Nachweis der Proteinexpression von hsGLT1, MCT1, MCT4, Glut1, iNOS und Arginase

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich die Kultivierung unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen auf die Freisetzung von Zytokinen durch die HUVEC-Zellen auswirkte. Hierzu wurde der RayBio Human Cytokine Antibody Array G-Series 3 verwendet, dessen Signale ebenfalls mittels Chemilumineszenz detektiert wurden. Die Auswertung erfolgte mittels digitaler Bildanalyse (ImageJ), wobei die Intensitätswerte der Chemilumineszenzsignale untereinander sowie gegen den Mittelwert der Positivkontrolle (Leerwert, in der Abb. 7 ganz links) verglichen wurden (Abbildungen 7 und 8-11).

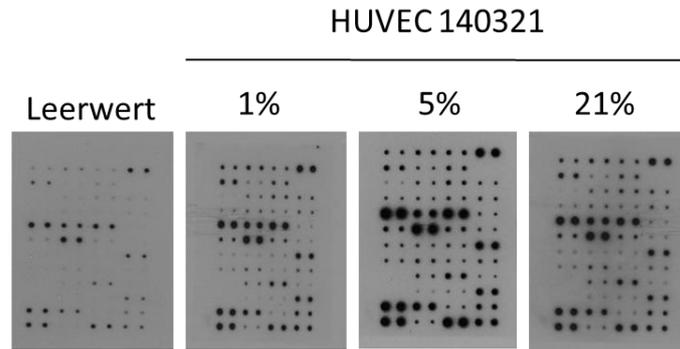
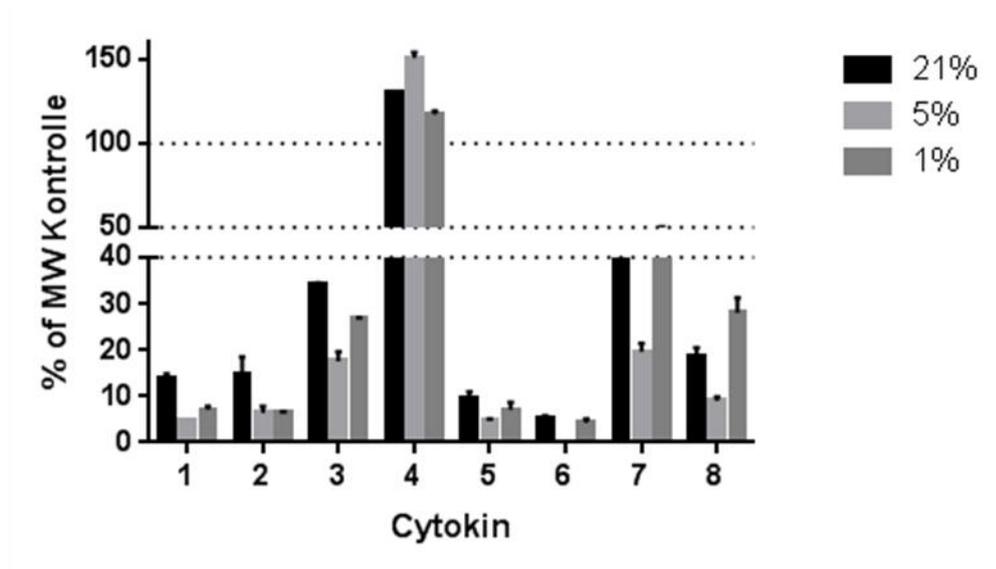


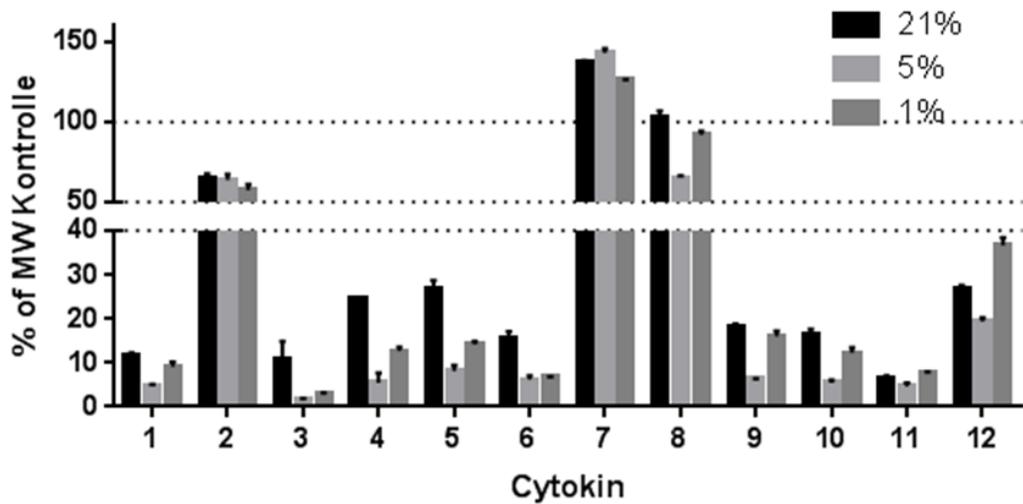
Abbildung 7: RayBio Human Cytokine Antibody Array zum Nachweis der Expression 42 humaner Zytokine



1: ENA-78 2: GCSF 3: GM-CSF 4: GRO a/b/g 5: GRO-alpha 6: I-309
 7: IL-1 alpha 8: IL-1 beta

Abbildung 8: Auswertung des Cytokine Antibody Array zum Nachweis der Zytokinexpression (Teil I)

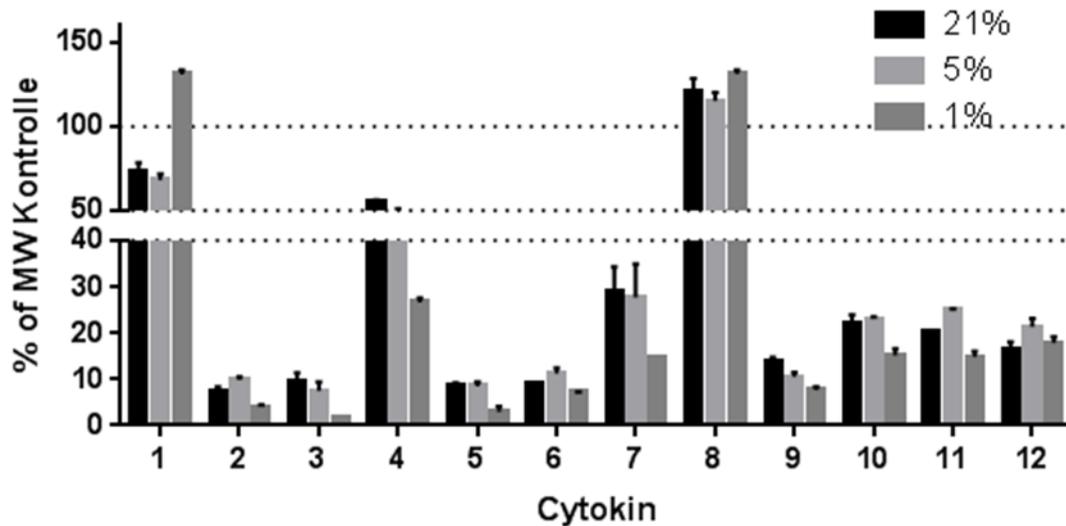
Die Auswertung zeigte einen deutlichen Abfall der Expression von ENA-78, GCSF und GM-CSF mit Abfall der Sauerstoffkonzentration. IL-1 alpha und IL-1 beta zeigten einen Abfall bei 5%, jedoch einen Wiederanstieg bei 1% Sauerstoffkonzentration (Abbildung 8). Aufgrund des geringen Probenumfangs konnte keine statistische Berechnung durchgeführt werden, der Trend ist aber offensichtlich und kann als Ausgangsbasis für künftige Untersuchungen genutzt werden.



1: IL-2 2: IL-3 3: IL-4 4: IL-5 5: IL-6 6: IL-7
 7: IL-8 8: IL-10 9: IL-12 10: IL-13 11: IL-15 12: IFN-gamma

Abbildung 9: Auswertung des Cytokine Antibody Array zum Nachweis der Zytokinexpression (Teil II)

Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Abfall der Expression der Interleukine 4, 5, 6 und 7 mit Abfall der Sauerstoffkonzentration. IL-10, 12, 13 und Interferon-gamma zeigten einen Abfall bei 5%, jedoch einen Wiederanstieg bei 1% Sauerstoffkonzentration (Abbildung 9).



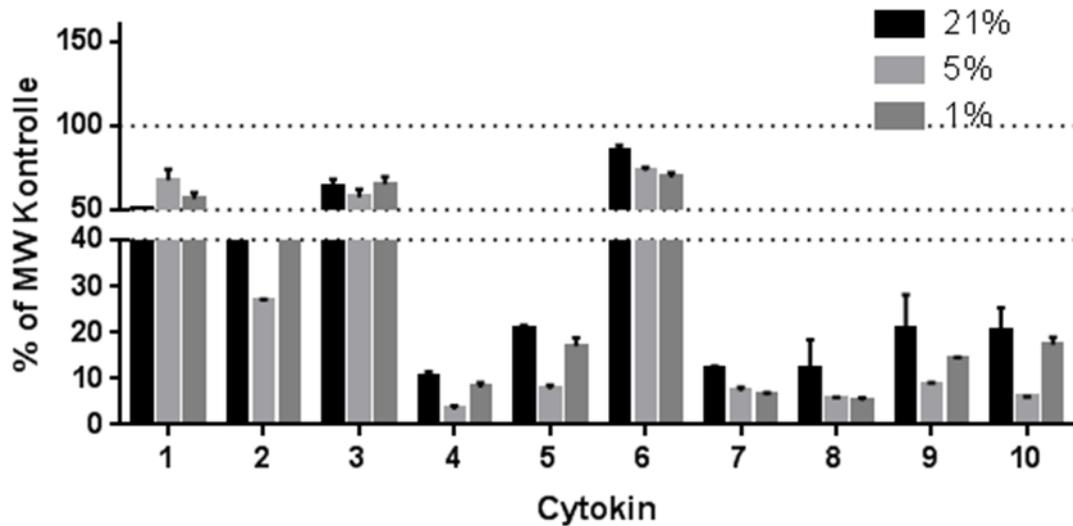
1: MCP-1 2: MCP-2 3: MCP-3 4: M-CSF 5: MDC 6: MIG
 7: MIP-1 8: RANTES 9: SCF 10: SDF-1 11: TARC 12: TGF beta1

Abbildung 10: Auswertung des Cytokine Antibody Array zum Nachweis der Zytokinexpression (Teil III)

Schließlich zeigte sich ein Abfall der Expression von MCP-3, M-CSF, MDC und MIP-1 sowie SCF mit Abfall der Sauerstoffkonzentration (Abbildung 10). Auch zeigte sich noch ein Abfall mit anschließendem Wiederanstieg der Expression von IGF-1, Angiogenin, PDGF-BB und Leptin (Abbildung 11).

Bei den übrigen untersuchten Zytokinen ergaben sich keine eindeutigen Unterschiede. Eine insgesamt erhöhte Zytokinfreisetzung im Vergleich zur Positivkontrolle (Werte >100%) zeigte sich für GRO-a/b/g (CXCL1-3), IL-8, MCP-1 (unter 21% Sauerstoff) und RANTES (CCL-5).

Fazit: die HUVEC-Zellen zeigen sich hinsichtlich ihrer Cytokinproduktion sehr robust gegenüber Änderungen der Sauerstoffkonzentrationen, da auch die beschriebenen Unterschiede überwiegend klein ausfallen.



1: TNF-alpha 2: TNF beta 3: EGF 4: IGF-1 5: Angiogenin 6: OSM
 7: TPO 8: VEGF-A 9: PDGF-BB 10: Leptin

Abbildung 11: Auswertung des RayBio Human Cytokine Antibody Array zum Nachweis der Zytokinexpression (Teil IV)

3.2 Auswirkung von Ketonkörper- und Sauerstoffkonzentration auf Migrationsverhalten und Angiogenesekapazität von HUVEC-Zellen

Zur Analyse des Migrationsverhaltens der HUVEC-Zellen unter verschiedenen Bedingungen wurde ein *scratch assay* durchgeführt. Hierbei wurde eine geschlossene Zelldecke mit einer Pipettenspitze in einer definierten Breite „verletzt“, um anschließend die Migration der Zellen in die so entstandene Schneise unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen sowie nach Exposition gegenüber ansteigenden Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat zu untersuchen.

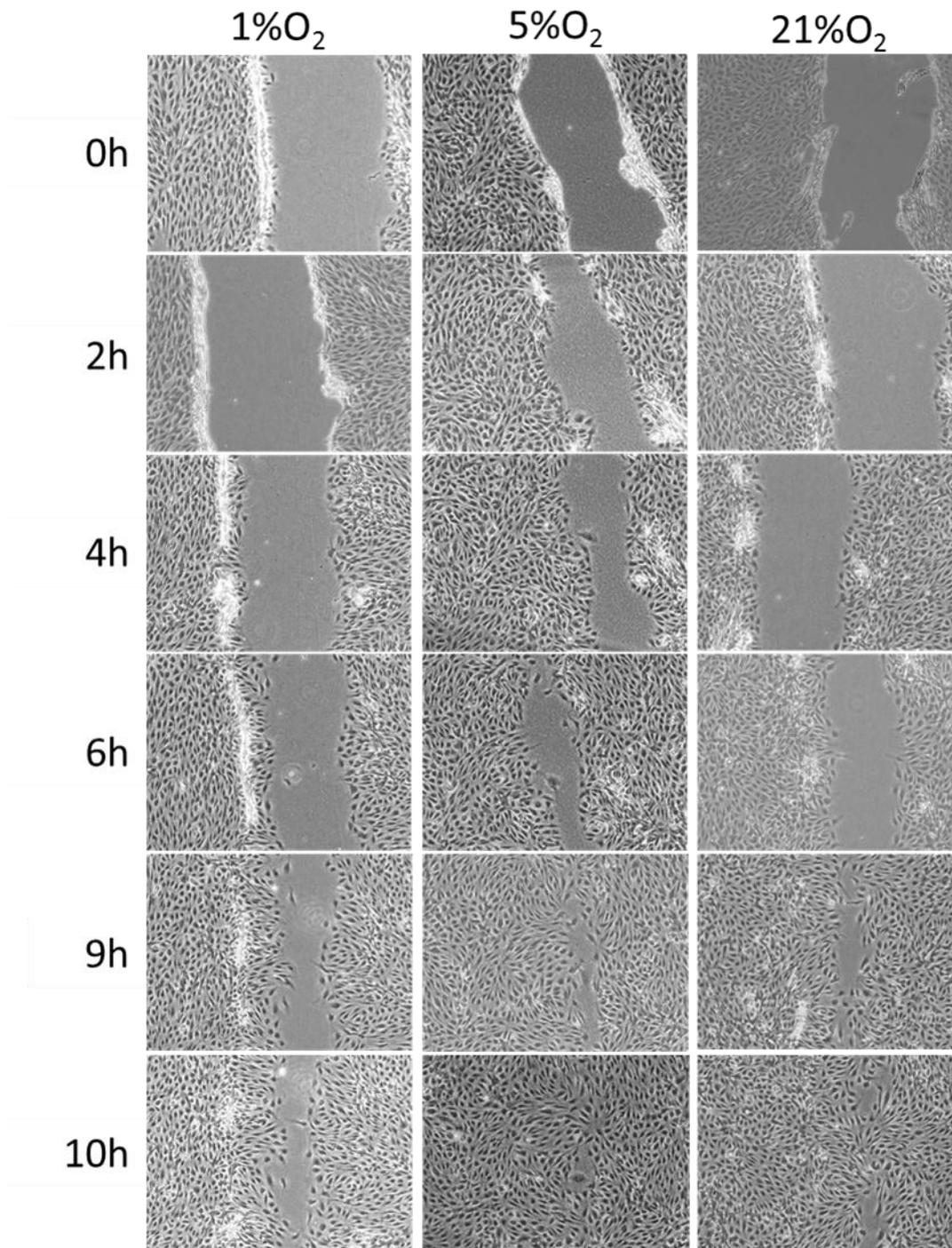


Abbildung 12: Scratch assay (0-10h) von HUVECs unter 1 %, 5 % und 21 % Sauerstoff

Die statistische Auswertung zeigte, dass die HUVECs unter Normalbedingungen (5% O₂) am schnellsten migrierten. Unter Hypoxiebedingungen (1% Sauerstoff) ergab sich eine signifikante Verlangsamung der Migration zu allen untersuchten Zeitpunkten ($p < 0,001$); unter Hyperoxie (21% Sauerstoff) war die Migration

zwischen 2 h und 6 h ebenfalls signifikant reduziert (jeweils $p < 0,001$), holte dann aber deutlich auf und unterschied sich zu den Zeitpunkten 9 h und 10 h nicht mehr von den Normalbedingungen ($p > 0,05$; Abbildung 13).

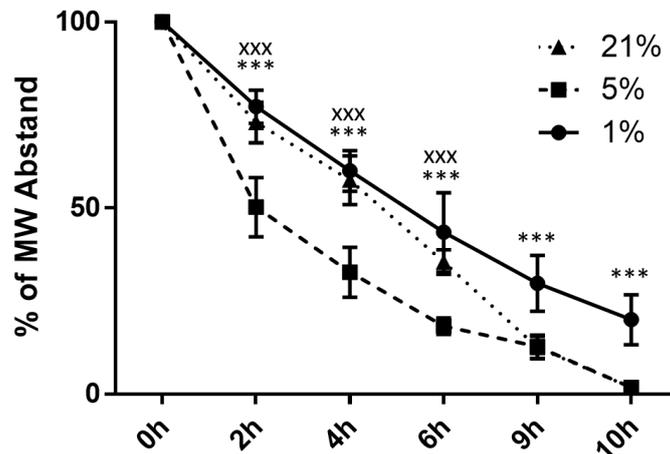


Abbildung 13: Auswertung des *scratch* assay für unterschiedliche O₂-Konzentrationen. 5% vs. 1% (*) ; 5% vs. 21% (xxx; jeweils $p < 0,001$)**

Anschließend wurde untersucht, wie sich die Exposition gegenüber Ketonkörpern auf das Migrationsverhalten der HUVECs auswirkte. Hierfür wurde der *scratch* assay unter verschiedenen Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat (0,75 mM, 1,5 mM, 3 mM und 6 mM), nun bei normalem Sauerstoffanteil von 5% wiederholt. Abbildung 14 zeigt repräsentative Mikrofotografien der *scratch* assays, die statistische Auswertung ist in Abbildung 15 zusammengefasst.

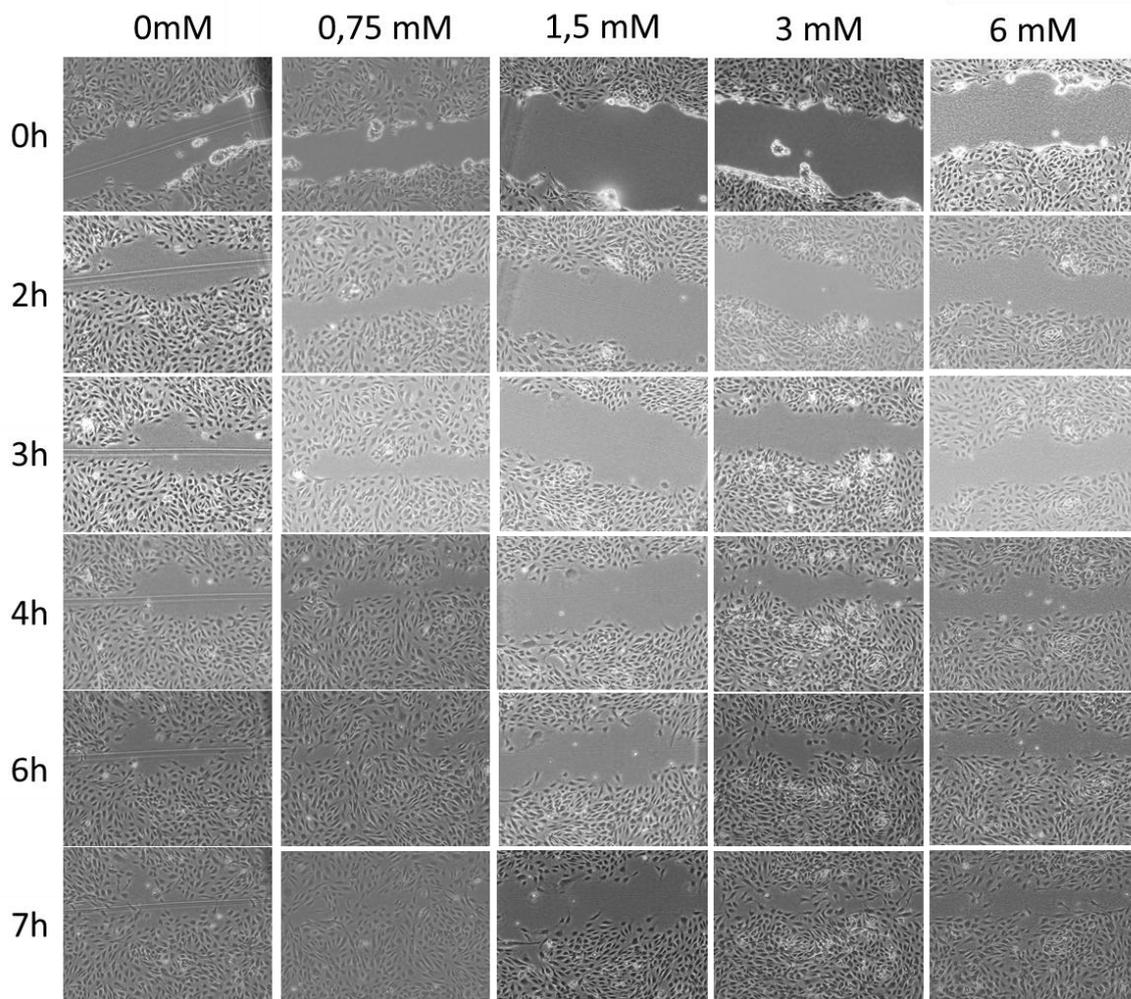


Abbildung 14: Scratch assay (0-7h) von HUVECs unter 0–6 mM β -Hydroxybutyrat

Die statistische Auswertung zeigte, dass alle eingesetzten Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat die initiale Migrationsgeschwindigkeit der HUVECs signifikant reduzierten. Nach 7 h zeigte sich allerdings lediglich unter 1,5 mM β -Hydroxybutyrat noch ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

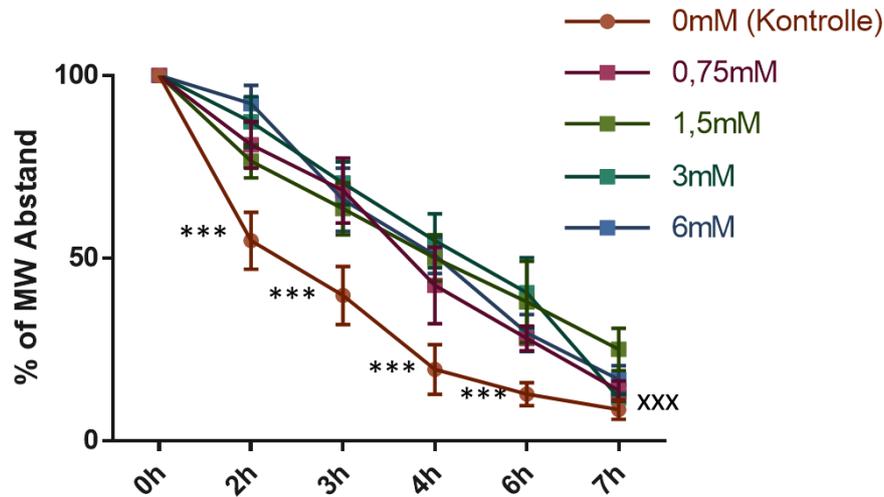


Abbildung 15: Auswertung des *scratch assay* für unterschiedliche Konzentrationen β -Hydroxybutyrat. *, 0 mM vs. alle weiteren Konzentrationen; xxx, 0 mM vs. 1,5 mM (jeweils $p < 0,001$)**

Schließlich wurde in einem Matrigel-basierten Angiogeneseassay die Fähigkeit der HUVEC-Zellen zur Bildung primitiver Gefäßrohre unter Exposition gegenüber ansteigenden Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat bei 5% Sauerstoff untersucht. Die Mikrofotografien wurden im Hinblick auf die Gefäßdichte, die Länge der Gefäße und die Anzahl der Verzweigungspunkte softwaregestützt ausgewertet (AngioTool v.06.a für Windows; Abbildung 16). Hierbei ergab sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Gefäßdichte und der Anzahl der Verzweigungspunkte ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,7863$; Abb. 17).

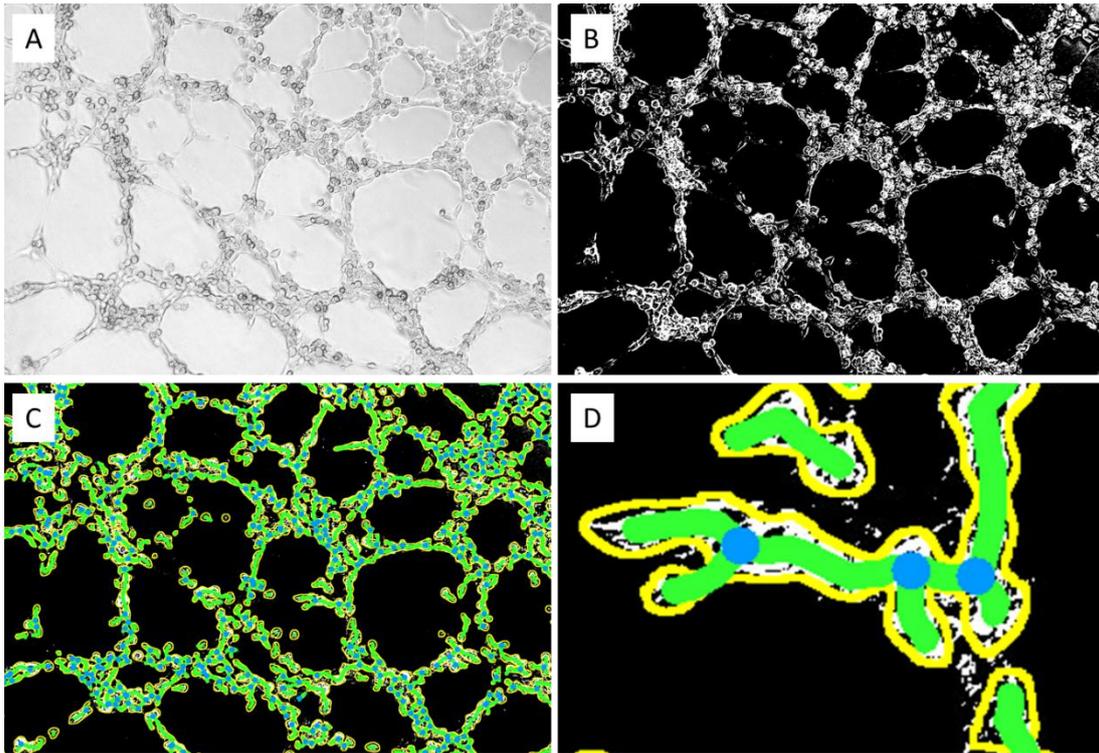


Abbildung 16: Vorgehen bei der softwaregestützten Auswertung des Matrigel-basierten Angiogeneseassays. A, das primitive Gefäßnetz wird mikrofotografiert. **B,** das Graustufenbild wird invertiert und die Gefäßschläuche werden mittels Kontrastierung hervorgehoben. **C,** es finden eine softwaregestützte Erkennung und Auszählung der Gefäße statt (AngioTool v.06.a für Windows). **D,** Darstellung der Gefäßbegrenzungen in Gelb, des Gefäßlumens in Grün und der Verzweigungspunkte in Blau.

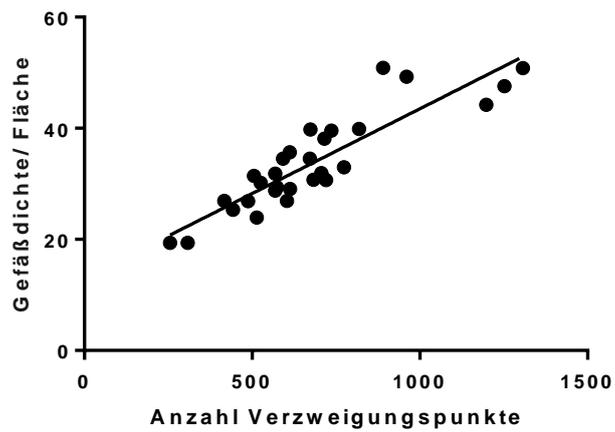


Abbildung 17: Korrelation zwischen der Gefäßdichte und der Anzahl der Verzweigungspunkte ($p < 0,0001$; $r^2 = 0,7863$)

Die weiterführende statistische Auswertung der Ergebnisse zeigt Abbildung 18. Es ergab sich eine signifikante Zunahme der Gefäßdichte und der Anzahl der Gefäßverzweigungen unter $\geq 1,5$ mM β -Hydroxybutyrat; bereits unter 0,75 mM war zudem die mittlere Länge der Gefäße signifikant erhöht.

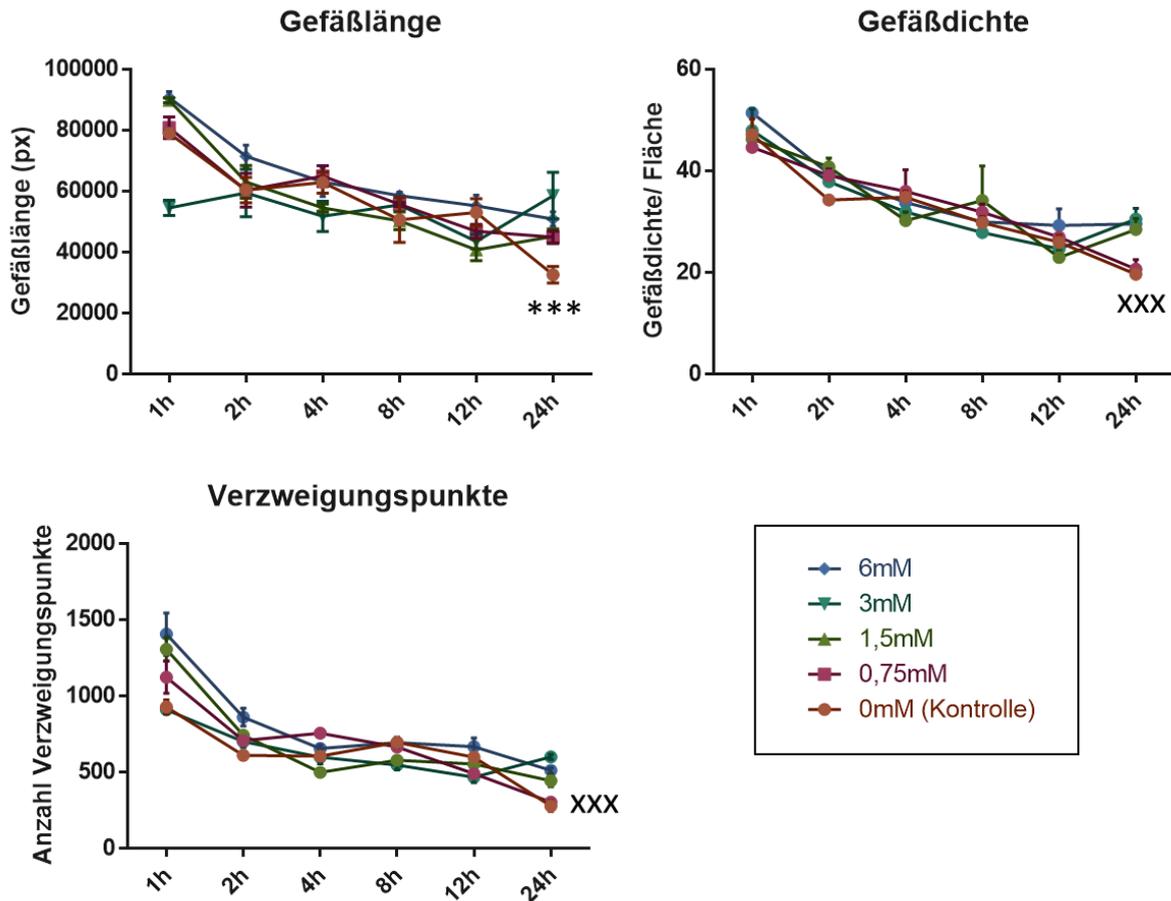


Abbildung 18: Statistische Auswertung der softwaregestützten Analyse des Matrigel-basierten Angiogeneseassays. Nach 24 h war die mittlere Gefäßlänge unter allen Konzentrationen β -Hydroxybutyrat gegenüber der Kontrolle (0 mM) signifikant erhöht. Unter den Konzentrationen $\geq 1,5$ mM, nicht aber unter 0,75 mM β -Hydroxybutyrat waren zudem die Gefäßdichte und die Anzahl der Verzweigungspunkte signifikant erhöht. ***, 0 mM vs. alle weiteren Konzentrationen; xxx, 0 mM und 1,5 mM vs. alle weiteren Konzentrationen (jeweils $p < 0,001$).

Die Endothelzellen/primitiven Sprouts nehmen initial eine größere Fläche ein. Wenn sie sich zu funktionellen Gefäßstrukturen zusammenfügen reduziert sich die eingenommene Fläche auch wenn gleichzeitig die Anzahl an echten Gefäßen und Verzweigungspunkten zunimmt.

Schließlich wurde untersucht, wie sich die Exposition gegenüber 3 mM β -Hydroxybutyrat auf die Expression von Angiogenesemarkern durch die HUVEC-Zellen auswirkte. Hierzu wurde der semiquantitative RayBio® C-Series Human

Angiogenesis Antibody Array C2 der Fa. RayBiotech (Norcross, USA) verwendet. Die Resultate zeigt Abb. 19.

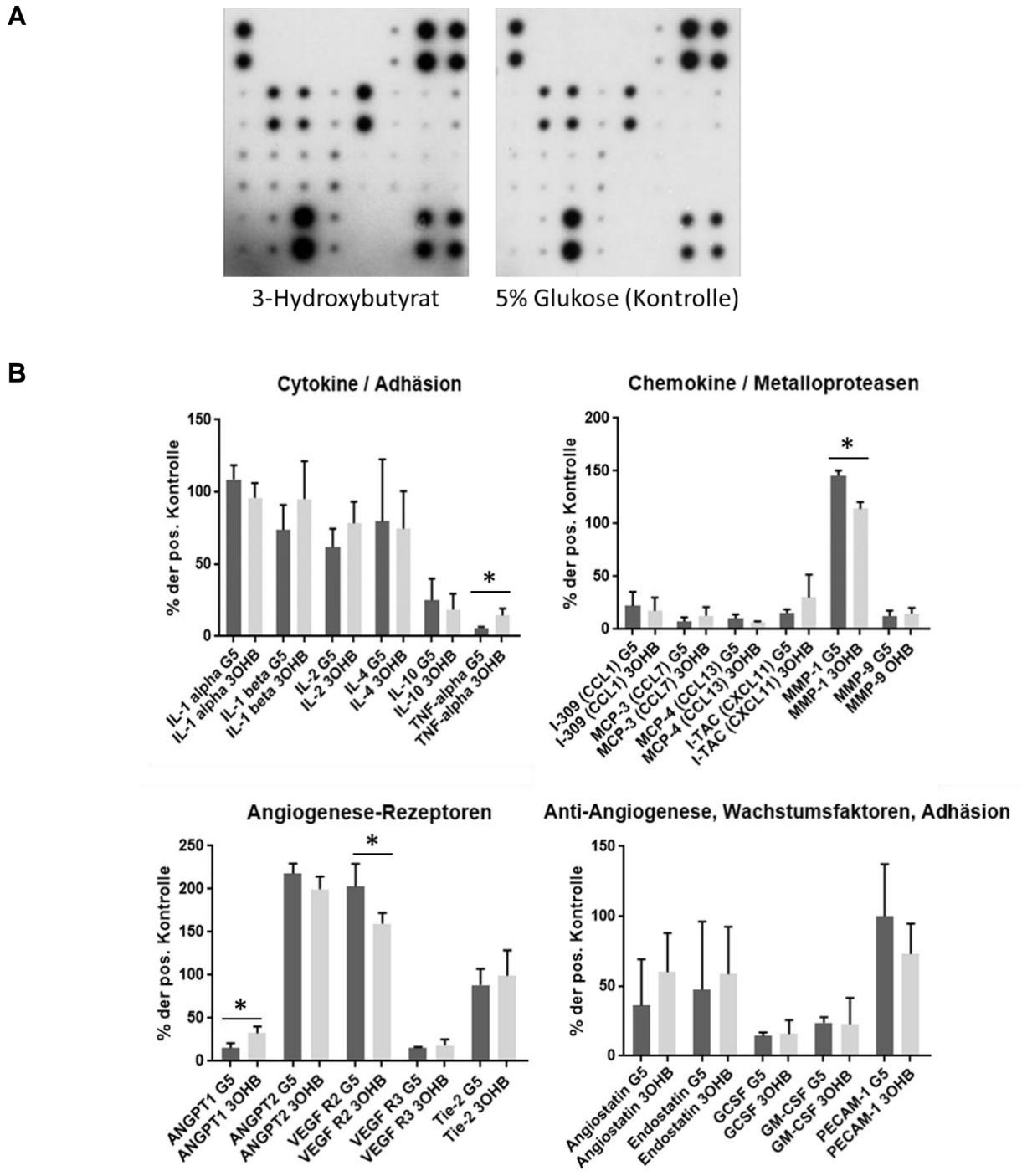


Abbildung 19: Angiogenese-Antikörperarray. A, repräsentative Abbildungen der Arrays nach Exposition gegenüber 3 mM β -Hydroxybutyrat sowie gegenüber 5% Glukose (Kontrolle). B, Signifikante Überexpression von TNF- α und Angiopoietin-1 und verminderte

Expression von MMP-1 und VEGFR-2 nach Exposition gegenüber β -Hydroxybutyrat im Vergleich zur Kontrolle. *, $p < 0,05$

Die statistische Auswertung des Angiogenesis Antibody Arrays zeigte eine Überexpression von TNF- α und Angiopoietin-1 und eine verminderte Expression von MMP-1 und VEGFR-2 nach Exposition gegenüber 3 mM β -Hydroxybutyrat.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern sich die Exposition gegenüber unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen und gegenüber dem Ketonkörper beta-Hydroxybutyrat im Hinblick auf den zellulären Energiestoffwechsel, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren sowie die Angiogenese in menschlichen Endothelzellen auswirkt.

4.1 Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke auf den endothelialen Energiestoffwechsel

In einem ersten Schritt wurde die Expression von Schlüsseltransportermolekülen des Energiestoffwechsels (die Monocarboxylattransporter MCT 1 und 4, Glukosetransporter Glut1) sowie von Enzymen der Immunmodulation, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase iNOS und Arginase) untersucht.

Für iNOS und Arginase waren die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen in beiden HUVEC-Chargen uneindeutig. Für iNOS ist unter Hypoxie eine Heraufregulation beschrieben, was nach unseren Ergebnissen nicht eindeutig bestätigt werden kann (Le Cras *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 2002). Dies gilt auch für die mRNA-Expressionslevel von Arginase (Chen *et al.*, 2009; Krotova *et al.*, 2010). Mögliche Ursachen könnten unterschiedliche Kultivierungsbedingungen oder ein abweichendes Primerdesign sein; nicht zuletzt hat auch die Konfluenz der kultivierten Zellen zum Zeitpunkt der mRNA-Isolation Einfluss auf den Expressionslevel einiger Ziel-mRNAs (Huguet *et al.*, 1995).

MCT1, MCT4 und Glut1 wurden auf mRNA-Ebene in allen untersuchten Linien sowie unter allen Sauerstoffpartialdrücken exprimiert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen (Miele *et al.*, 2000; Sonveaux *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015).

Um die Expressionsmuster der genannten Rezeptoren und Enzyme genauer zu untersuchen, wurden deren Proteine mittels Western-Immunoblot nachgewiesen.

Hierbei zeigte sich eine etwas schwächere Proteinexpression von iNOS, GLUT, MCT1 und Arginase unter Hypoxie. Dies überrascht vor dem Hintergrund, dass im Allgemeinen eine endotheliale Heraufregulation von iNOS, GLUT, MCT1 und Arginase bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken zu erwarten wäre (Ferreiro et al., 2001; Jiang et al., 2002; Chen et al., 2009; Krotova et al., 2010). Eine mögliche Erklärung wäre, dass diese Expressionsänderungen vor allem als ein Adaptationsmechanismus auf chronische Hypoxie beschrieben sind und die Dauer der Exposition gegenüber niedrigen Sauerstoffpartialdrücken in unserem Modell hierfür nicht ausreichend war. Zudem stammen einige der experimentellen Daten, die der Literatur zugrunde liegen, aus Tumorzellen mit dysreguliertem Glukosestoffwechsel (Denko, 2008).

Zusammenfassend ergeben sich für die mRNA- und Proteinexpressionsmuster von am Energiestoffwechsel beteiligten Substrattransportern und regulatorischen Enzymen nach Exposition gegenüber unterschiedlichen Sauerstoffpartialdrücken keine eindeutigen Änderungen.

4.2 Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke auf die Freisetzung endothelialer Zytokine

Unter Verwendung eines antikörperbasierten Zytokinarrays wurden Änderungen in der Freisetzung endothelialer Zytokine nach Exposition gegenüber verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen untersucht.

Unter Hypoxie (1 % Sauerstoff) zeigte sich im Vergleich zu physiologischem Sauerstoffpartialdruck eine leichte Abnahme der Freisetzung von ENA-78, GCSF und GM-CSF, was im Widerspruch zu publizierten Arbeiten steht (El-Asrar *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2011). Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass die zitierten Untersuchungen nicht in Endothelzellen, sondern in anderen Modellen (u. a. hypoxischem neuronalem Gewebe) stattfanden. Für humane Endothelzellen gibt es bisher keine publizierten Daten zum Vergleich. Einige Autoren wiesen auf eine mögliche pharmakologische Wirksamkeit von rekombinantem CSF hin, um das Ausmaß der hypoxischen Gewebeschädigung zu begrenzen (Li *et al.*, 2015),

inwiefern diese auf die hier untersuchten koloniestimulierenden Faktoren übertragbar ist, kann jedoch aufgrund der Daten- und Literaturlage nicht beurteilt werden.

Unter Hypoxie zeigte sich eine Zunahme der Konzentration der sezernierten Cytokine IL-1 a/b, 10, 12, 13, IF-G, IGF-1, Angiogenin, PDGF-BB und Leptin. Dies deckt sich weithin mit publizierten Daten (Shreeniwas *et al.*, 1992; Guan *et al.*, 1996; Gee *et al.*, 1999; Hartmann *et al.*, 1999; Grosfeld *et al.*, 2002); für eine supplementierende Gabe von rekombinantem Interleukin-10 wurde zudem eine mögliche protektive Wirkung bei der nekrotisierenden Enterokolitis postuliert (Öztürk *et al.*, 2002). Insbesondere die Heraufregulation von Angiogenin, einem potenten Angiogenesefaktor, ist im Hinblick auf ein mögliches Remodeling der bestehenden Gefäße und einer Neubildung primitiver Gefäße von besonderem Interesse (Fett *et al.*, 1985).

Unter Hyperoxie (Kultivierung unter 21 % Sauerstoff) war keine Abnahme der Freisetzung einzelner Zytokine im Vergleich zu Normalbedingungen (5% Sauerstoff) zu beobachten. Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine Zunahme der Expression von IL-1 a/b, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, IF-G, MCP-3, M-CSF, MDC, MIP-1, SCF, IGF-1, Angiogenin, PDGF-BB und Leptin. Interessanterweise sind hierunter einige Proteine, die auch unter Hypoxie eine Zunahme der Expression zeigten (IL-1 a/b, 10, 12, 13, IF-G, IGF-1 und Angiogenin), was darauf hindeutet, dass sowohl unphysiologisch niedrige als auch unphysiologisch hohe Sauerstoffpartialdrücke die Aktivierung ähnlicher pathophysiologischer Signalwege bedingen können. Einzig die Freisetzung von M-CSF (unter Hypoxie vermindert) scheint direkt proportional mit dem Sauerstoffpartialdruck zu korrelieren.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass eine ältere Arbeit zeigen konnte, dass M-CSF die Fähigkeit von Makrophagen stimuliert, Sauerstoffradikale (Wasserstoffperoxid) freizusetzen (Wing *et al.*, 1985). Es wäre somit denkbar, dass die Endothelzellen durch die Freisetzung von M-CSF parakrin die Produktion von Sauerstoffradikalen zu stimulieren vermögen; dieser Hypothese sollte in weiteren Arbeiten (möglicherweise unter Verwendung von Co-Kulturen) nachgegangen werden. Zudem konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass die Präsenz von M-CSF essenziell für die Neoangiogenese in Tumoren sowie die okuläre Neovaskularisation im Rahmen der Retinopathie ist und eine M-CSF-Blockade diese

verhindern kann (Kubota *et al.*, 2009). Im Hinblick auf eine mögliche Angiogenese fördernde Rolle von M-CSF stellt sich allerdings die Frage, warum die Freisetzung dieses Faktors in unserem Modell mit ansteigenden Sauerstoffpartialdrücken zunahm; möglicherweise handelt es sich hierbei um eine autokrine Feedbackschleife.

4.3 Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffpartialdrücke sowie der Exposition gegenüber Ketonkörpern auf die endotheliale Zellmigration

Nachdem die Proteinexpression sowie die Freisetzung von Zytokinen durch die Endothelzellen analysiert wurden, wurde in einem nächsten Schritt die Migrationsfähigkeit der Endothelzellen unter verschiedenen Umgebungsbedingungen untersucht. Hierzu wurde ein *scratch assay* eingesetzt.

Bei Exposition gegenüber verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken zeigte sich, dass die schnellste Migration unter Normalbedingungen stattfand (5% Sauerstoff). Hypoxie (1% Sauerstoff) reduzierte die Migration signifikant. Unter Hyperoxie (21% Sauerstoff) war eine initiale Verlangsamung zu beobachten, woraufhin eine rasche Normalisierung der Migrationsgeschwindigkeit entsprechend den Normalbedingungen eintrat.

Diese Ergebnisse stehen teilweise im Widerspruch zu publizierten Daten, wonach eine Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit unter Hypoxiebedingungen zu erwarten wäre (Meininger *et al.*, 1988; Michaelis *et al.*, 2005; Lamalice *et al.*, 2007). Der Grund hierfür ist nicht eindeutig klar; möglicherweise sind für die unterschiedlichen Resultate erneut abweichende Kultivierungsbedingungen (Zelldichte, Zusammensetzung des Kulturmediums, Zugabe von Angiogenesefaktoren) oder die Verwendung von frisch isolierten humanen HUVEC-Zellen versus z.B. bovinen Zellen (Meininger *et al.*, 1988) oder kommerziell erworbenen Zellen (Michaelis *et al.*, 2005) verantwortlich; auf die möglichen Unterschiede der erzielten experimentellen Ergebnisse in differenten Zellsystemen wurde in der Literatur bereits eingegangen (Lamalice *et al.*, 2007). Eine initiale Verlangsamung der Migration unter Hyperoxie hingegen entspricht dem erwartbaren Verhalten der Zellen nach Literaturangaben, wonach Hyperoxie die

Stickstoffmonoxid-induzierte Migration endothelialer Vorläuferzellen signifikant zu hemmen vermag (Gallagher *et al.*, 2007).

Anschließend wurde untersucht, wie sich die Exposition gegenüber dem physiologischen Ketonkörper β -Hydroxybutyrat auf die endotheliale Zellmigration auswirkt. Alle untersuchten Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat verlangsamten hierbei die Migration, wobei dieser hemmende Effekt nach 7 h nur noch unter 1,5 mM β -Hydroxybutyrat signifikant war. Dies deutet darauf hin, dass eine ketotische Stoffwechsellage die (Neo-) Angiogenese zumindest initial negativ beeinflussen kann. Damit übereinstimmend beschrieben Jain *et al.* bereits 1998 eine Hemmung der endothelialen Zellproliferation durch Acetacetat (Jain *et al.*, 1998). In diesem Zusammenhang muss als methodische Einschränkung des verwendeten scratch assay gesehen werden, dass insbesondere auf längere Beobachtungszeiträume eine Beeinflussung der gemessenen Zellmigration durch Proliferationseffekte nicht ausgeschlossen werden kann (Liang *et al.*, 2007).

4.4 Einfluss der Exposition von Endothelzellen gegenüber Ketonkörpern auf die Angiogenese

Schließlich wurde untersucht, inwiefern sich die Exposition von Endothelzellen gegenüber unterschiedlichen Ketonkörperkonzentrationen auf die Neubildung primitiver Gefäßstrukturen sowie auf die Freisetzung von Angiogenesefaktoren auswirkt. Hierzu wurden Matrigel-basierte Angiogenesearrays mit softwaregestützter Bildauswertung sowie erneut Antikörperarrays verwendet.

Die Exposition gegenüber allen Konzentrationen von β -Hydroxybutyrat führte zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßlänge; weiterhin führten die Konzentrationen $\geq 1,5$ mM zu einer signifikanten Zunahme der Gefäßdichte und der vaskulären Verzweigungspunkte. Die interne Validität des benutzten Assays und der Auswertung zeigte sich in einer hochsignifikanten Korrelation zwischen der digital bestimmten Gefäßdichten und der Anzahl der Verzweigungspunkte, wie sie in publizierten Arbeiten bereits beschrieben wurde (Ruhrberg *et al.*, 2002; Tammela *et al.*, 2008).

Unsere Ergebnisse unterstützen bereits publizierte Daten, wonach eine anhaltende Ketose zu einer gesteigerten Gefäßdichte im Rattenhirn führt (Puchowicz *et al.*, 2007).

Die Auswertung des Angiogenese-Antikörperarrays ergab eine statistisch signifikante Steigerung der Freisetzung von TNF- α und Angiopoietin-1 unter β -Hydroxybutyrat. Dies widerspricht Daten, wonach eine längere ketogene Diät die Freisetzung von TNF- α (in hippocampalen Neuronen sowie im Serum von Testpersonen) unterdrückt (Jeong *et al.*, 2011; Rhyu und Cho, 2014). *In vitro* wurde eine Steigerung der TNF- α -Sekretion durch β -Hydroxybutyrat in kultivierten Monozyten bereits beschrieben; dieses Modell ähnelt dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten und unterstützt daher die hier vorgestellten Ergebnisse (Jain *et al.*, 2002). Die gesteigerte TNF- α -Sekretion gründet in diesem Modell auf einer Aktivierung der Proteinkinasen MAPK-p38 und JNK-1. Ein fördernder Effekt von TNF- α auf das Gefäßwachstum wurde bereits beschrieben, was unsere Beobachtung einer gesteigerten Angiogenese nach Exposition gegenüber Ketonkörpern unterstützt (Leibovich *et al.*, 1987).

In Bezug auf die erhöhte Sekretion von Angiopoietin-1, einem weiteren potenten Induktor der Angiogenese, liegen bislang nur wenige experimentelle Daten vor. Die gesteigerte Ausschüttung ist jedoch gut mit der bereits beschriebenen erhöhten Kapillarisierung unter ketotischen Stoffwechselbedingungen zu vereinbaren (Puchowicz *et al.*, 2007). Eine vermehrte Kapillarisierung in Abhängigkeit von Angiopoietin-1 wurde auch bereits im Tiermodell beobachtet (Suri *et al.*, 1998). Eine veränderte endotheliale Expression von MMP-1 und VEGFR-2 unter diversen Stoffwechsellagen wurde hingegen bislang vor allem in (zentral hypoxischen) Tumoren untersucht (Multhoff *et al.*, 2014).

Zusammenfassend zeigen die Angiogenesearrays eine Förderung des Gefäßwachstums unter ketotischen Stoffwechsellagen, die durch eine vermehrte Freisetzung von Angiopoietin und TNF- α bedingt sein könnte. Diesem Effekt könnte eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (MAPK-p38 und JNK-1) vorausgehen (Liang *et al.*, 2014). Interessanterweise scheint die vermehrte Kapillarisierung vor allem auf einer gesteigerten Proliferation der Endothelzellen zu beruhen, da sich im Migrationsassay kein oder sogar ein hemmender Effekt der Ketose auf die

endotheliale Zellmigration zeigte. Zudem ist der Effekt der Ketose weit stärker als die durch Hypoxie verursachten Änderungen der Zellmigration.

In Bezug auf unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen zeigten sich in der hier vorliegenden Arbeit keine wesentlichen Effekte auf die mRNA/Protein-Expressionslevels von Stoffwechsellagen; in Bezug auf die Zytokinfreisetzung waren die Daten teilweise widersprüchlich, eine eindeutig Angiogenese fördernde Zytokinsignatur war hier nicht festzustellen.

Beatmete Intensivpatienten zeigen oftmals eine endotheliale Dysfunktion mit Flüssigkeitsaustritten durch die Gefäßwand und Bildung von Ödemen. Die Ergebnisse dieser Arbeit am Zellkulturmodell zeigen, dass eine ketogene Stoffwechsellage bei diesen Patienten über eine Förderung der Angiogenese die endotheliale Dysfunktion, die Entwicklung eines *Capillary-leak*-Syndroms und die Ausbildung lebensbedrohlicher Ödeme verhindern oder zumindest verlangsamen könnte. Dies steht im Gegensatz zu einer Erhöhung der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration, die im untersuchten Modell keinen positiven Effekt auf die untersuchten Merkmale hatte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die endotheliale Dysfunktion beatmeter Intensivpatienten stellt ein signifikantes klinisches Problem dar. Flüssigkeitsaustritte durch die Gefäßwand können zur Bildung von lebensbedrohlichen Ödemen führen. Forschungsergebnisse zeigen einen Einfluss der lokalen Sauerstoffkonzentration sowie der Stoffwechsellage auf die endotheliale Zellhomöostase sowie die Angiogenesekapazität.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen sowie der Exposition gegenüber Ketonkörpern auf die Expression zentraler Stoffwechsellzyme, die Freisetzung von Zytokinen, die endotheliale Migrations- und Angiogenesekapazität sowie die Freisetzung von Angiogenesefaktoren an kultivierten humanen Nabelschnurendothelien (HUVEC) untersucht.

Unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen führten zu keiner wesentlichen Änderung der mRNA- oder Proteinexpression von Stoffwechsellzymen. Im Hinblick auf die Zytokinfreisetzung zeigten sich hingegen deutliche Expressionsänderungen unter Hypoxie bzw. Hyperoxie, welche jedoch in der Zusammenschau kein eindeutig proangiogenetisches Profil zeigten. Hypoxie und Hyperoxie sowie die Exposition gegenüber Ketonkörpern (β -Hydroxybutyrat) verlangsamten die endotheliale Zellmigration; im Gegensatz hierzu führte die Ketose im Angiogeneseassay zu einer signifikant erhöhten Gefäßdichte und Anzahl an Verzweigungspunkten, einhergehend mit erhöhter Freisetzung des potenten Angiogenesefaktors Angiopoietin-1.

Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine ketogene Stoffwechsellage – mutmaßlich über eine gesteigerte endotheliale Zellproliferation – zu einer gesteigerten Angiogenese führt, wogegen eine Änderung der Sauerstoffkonzentration im Modell keine eindeutig positiven Effekte zeigte. Eine physiologische Ketose könnte somit bei Intensivpatienten der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion mit Entwicklung eines *Capillary-leak*-Syndroms entgegenwirken.

Weitere Untersuchungen, eventuell unter Entwicklung eines Tiermodells, sollten diesen auch aus klinischer Sicht vielversprechenden Ansatz weitergehend untersuchen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Auerbach, L. (1864). **Über Lymph-und Blutgefäße**. Virchows Arch. path. Anat 33, 340-394.
- Bai, H. und Wang, Z. (2008). **Directing human embryonic stem cells to generate vascular progenitor cells**. Gene therapy 15, 89-95.
- Bannerman, D. D., Sathyamoorthy, M. und Goldblum, S. E. (1998). **Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins**. Journal of Biological Chemistry 273, 35371-35380.
- Benninghoff, A., Hartmann, A. und Hellman, T. (1930). **Die Arterien**. In: Blutgefäß- und Lymphgefäßapparat Atmungsapparat und Innersekretorische Drüsen, Springer, S. 49-131.
- Berkowitz, D. E., White, R., Li, D., Minhas, K. M., Cernetich, A., Kim, S., Burke, S., Shoukas, A. A., Nyhan, D. und Champion, H. C. (2003). **Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels**. Circulation 108, 2000-2006.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. und Sibbald, W. J. (1992). **Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis**. Chest 101, 1644-1655.
- Cai, H. und Harrison, D. G. (2000). **Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress**. Circulation research 87, 840-844.
- Chen, B., Calvert, A. E., Cui, H. und Nelin, L. D. (2009). **Hypoxia promotes human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through induction of arginase**. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 297, L1151-L1159.
- Colasanti, M. und Suzuki, H. (2000). **The dual personality of NO**. Trends in pharmacological sciences 21, 249-252.
- Culic, O., Gruwel, M. und Schrader, J. (1997). **Energy turnover of vascular endothelial cells**. The American journal of physiology 273, C205-213.

- Davignon, J. und Ganz, P. (2004). **Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis**. *Circulation* 109, III-27-III-32.
- Denko, N. C. (2008). **Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour**. *Nature Reviews Cancer* 8, 705-713.
- Dvorak, H. F. (2002). **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy**. *J Clin Oncol* 20, 4368-4380.
- El-Asrar, A. M. A., Struyf, S., Kangave, D., Geboes, K. und Van Damme, J. (2006). **Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy**. *European cytokine network* 17, 155-165.
- Ferreiro, C. R., Chagas, A. C. P., Carvalho, M. H. C., Dantas, A. P., Jatene, M. B., de Souza, L. C. B. und da Luz, P. L. (2001). **Influence of Hypoxia on Nitric Oxide Synthase Activity and Gene Expression in Children With Congenital Heart Disease A Novel Pathophysiological Adaptive Mechanism**. *Circulation* 103, 2272-2276.
- Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. und Vallee, B. L. (1985). **Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells**. *Biochemistry* 24, 5480-5486.
- Frey, E. A. und Finlay, B. B. (1998). **Lipopolysaccharide induces apoptosis in a bovine endothelial cell line via a soluble CD14 dependent pathway**. *Microbial pathogenesis* 24, 101-109.
- Fu, W.-L., Jia, Z.-Q., Wang, W.-P., Zhang, J.-Y., Fu, X., Duan, X.-N., Leung, K., Zhou, C. und Yu, J. (2011). **Proliferation and apoptosis property of mesenchymal stem cells derived from peripheral blood under the culture conditions of hypoxia and serum deprivation**. *Chinese medical journal* 124, 3959-3967.
- Gallagher, K. A., Liu, Z.-J., Xiao, M., Chen, H., Goldstein, L. J., Buerk, D. G., Nedeau, A., Thom, S. R. und Velazquez, O. C. (2007). **Diabetic impairments in NO-mediated endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 α** . *The Journal of clinical investigation* 117, 1249-1259.
- Gee, M. S., Koch, C. J., Evans, S. M., Jenkins, W. T., Pletcher, C. H., Moore, J. S., Koblisch, H. K., Lee, J., Lord, E. M. und Trinchieri, G. (1999). **Hypoxia-mediated apoptosis from angiogenesis inhibition underlies tumor control by recombinant interleukin 12**. *Cancer research* 59, 4882-4889.

- Gould, S. T., Matherly, E. E., Smith, J. N., Heistad, D. D. und Anseth, K. S. (2014). **The role of valvular endothelial cell paracrine signaling and matrix elasticity on valvular interstitial cell activation.** *Biomaterials* 35, 3596-3606.
- Grosfeld, A., André, J., Hauguel-de Mouzon, S., Berra, E., Pouysségur, J. und Guerre-Millo, M. (2002). **Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter.** *Journal of Biological Chemistry* 277, 42953-42957.
- Guan, J., Williams, C. E., Skinner, S., Mallard, E. C. und Gluckman, P. D. (1996). **The effects of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-2, and des-IGF-1 on neuronal loss after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats: evidence for a role for IGF binding proteins.** *Endocrinology* 137, 893-898.
- Hahn, W., Price, B., Harju-Baker, S., Katz, R., Liles, W., Wurfel, M. M. und Mikacenic, C. (2015). **Biomarkers Of Endothelial Activation And Apoptosis Are Associated With Poor Outcomes In Critical Illness.** In: B24. MECHANISMS OF INJURY IN SEPSIS: INFLAMMATION, OXIDATION, AND ENDOTHELIAL DAMAGE, *Am Thoracic Soc*, S. A2558-A2558.
- Hartmann, A., Kunz, M., Köstlin, S., Gillitzer, R., Toksoy, A., Bröcker, E.-B. und Klein, C. E. (1999). **Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma.** *Cancer research* 59, 1578-1583.
- Hauptmann, S., Klosterhalfen, B., Weis, J., Mittermayer, C. und Kirkpatrick, C. J. (1994). **Skeletal muscle oedema and muscle fibre necrosis during septic shock. Observations with a porcine septic shock model.** *Virchows Archiv* 424, 653-659.
- Heinrich, R., Holzhu, H.-G. und Schuster, S. (1987). **A theoretical approach to the evolution and structural design of enzymatic networks; linear enzymatic chains, branched pathways and glycolysis of erythrocytes.** *Bulletin of mathematical biology* 49, 539-595.
- Hinshaw, D. B., Burger, J. M., Armstrong, B. C. und Hyslop, P. A. (1989). **Mechanism of endothelial cell shape change in oxidant injury.** *Journal of Surgical Research* 46, 339-349.
- Hinshaw, D. B., Burger, J. M., Miller, M. T., Adams, J. A., Beals, T. F. und Omann, G. M. (1993). **ATP depletion induces an increase in the assembly of a labile pool of polymerized actin in endothelial cells.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 264, C1171-C1179.

- Ho, C.-F., Chan, K.-W., Yeh, H.-I., Kuo, J., Liu, H.-J. und Wang, C.-Y. (2013). **Ketone bodies upregulate endothelial connexin 43 (Cx43) gap junctions.** *The Veterinary Journal* 198, 696-701.
- Hu, R., Dai, A. und Tan, S. (2002). **Hypoxia-inducible factor 1 alpha upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase gene in pulmonary arteries of hyposic rat.** *Chinese medical journal* 115, 1833-1837.
- Huguet, E. L., Smith, K., Bicknell, R. und Harris, A. L. (1995). **Regulation of Wnt5a mRNA expression in human mammary epithelial cells by cell shape, confluence, and hepatocyte growth factor.** *Journal of Biological Chemistry* 270, 12851-12856.
- Irani, K. (2000). **Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling.** *Circulation research* 87, 179-183.
- Isales, C. M., Min, L. und Hoffman, W. H. (1999). **Acetoacetate and β -hydroxybutyrate differentially regulate endothelin-1 and vascular endothelial growth factor in mouse brain microvascular endothelial cells.** *Journal of Diabetes and its Complications* 13, 91-97.
- Jain, S. K., Kannan, K. und Lim, G. (1998). **Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells.** *Free Radical Biology and Medicine* 25, 1083-1088.
- Jain, S. K., Kannan, K., Lim, G., McVie, R. und Bocchini, J. A. (2002). **Hyperketonemia increases tumor necrosis factor- α secretion in cultured U937 monocytes and type 1 diabetic patients and is apparently mediated by oxidative stress and cAMP deficiency.** *Diabetes* 51, 2287-2293.
- Jeong, E. A., Jeon, B. T., Shin, H. J., Kim, N., Lee, D. H., Kim, H. J., Kang, S. S., Cho, G. J., Choi, W. S. und Roh, G. S. (2011). **Ketogenic diet-induced peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation decreases neuroinflammation in the mouse hippocampus after kainic acid-induced seizures.** *Experimental neurology* 232, 195-202.
- Jiang, C., Lu, H., Vincent, K. A., Shankara, S., Belanger, A. J., Cheng, S. H., Akita, G. Y., Kelly, R. A., Goldberg, M. A. und Gregory, R. J. (2002). **Gene expression profiles in human cardiac cells subjected to hypoxia or expressing a hybrid form of HIF-1 α .** *Physiological genomics* 8, 23-32.
- Kanikarla-Marie, P. und Jain, S. K. (2015). **Hyperketonemia (acetoacetate) upregulates NADPH oxidase 4 and elevates oxidative stress, ICAM-1, and**

- monocyte adhesivity in endothelial cells.** Cellular Physiology and Biochemistry 35, 364-373.
- Keel, M. und Trentz, O. (2005). **Pathophysiology of polytrauma.** Injury 36, 691-709.
- Krotova, K., Patel, J. M., Block, E. R. und Zharikov, S. (2010). **Hypoxic upregulation of arginase II in human lung endothelial cells.** American Journal of Physiology-Cell Physiology 299, C1541-C1548.
- Kubota, Y., Takubo, K., Shimizu, T., Ohno, H., Kishi, K., Shibuya, M., Saya, H. und Suda, T. (2009). **M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis.** The Journal of experimental medicine 206, 1089-1102.
- Lamallice, L., Le Boeuf, F. und Huot, J. (2007). **Endothelial cell migration during angiogenesis.** Circulation research 100, 782-794.
- Le Cras, T. D., Xue, C., Rengasamy, A. und Johns, R. A. (1996). **Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung.** American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 270, L164-L170.
- Lee, Y. J., Park, C. H., Yun, J. W. und Lee, Y. S. (2004). **Predictive comparisons of procalcitonin (PCT) level, arterial ketone body ratio (AKBR), APACHE III score and multiple organ dysfunction score (MODS) in systemic inflammatory response syndrome (SIRS).** Yonsei medical journal 45, 29-37.
- Leibovich, S. J., Polverini, P. J., Shepard, H. M., Wiseman, D. M., Shively, V. und Nuseir, N. (1987). **Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- α .** Nature 329, 630-632.
- Lenzen, S. (2014). **A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status.** Journal of Biological Chemistry 289, 12189-12194.
- Li, L., Klebe, D., Doycheva, D., McBride, D. W., Krafft, P. R., Flores, J., Zhou, C., Zhang, J. H. und Tang, J. (2015). **G-CSF ameliorates neuronal apoptosis through GSK-3 β inhibition in neonatal hypoxia-ischemia in rats.** Experimental neurology 263, 141-149.
- Liang, C.-C., Park, A. Y. und Guan, J.-L. (2007). **In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.** Nature protocols 2, 329-333.

- Liang, Y., Li, X., Zhang, X., Li, Z., Wang, L., Sun, Y., Liu, Z. und Ma, X. (2014). **Elevated levels of plasma TNF- α are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells.** *Shock* 41, 275-281.
- Luttun, A. und Carmeliet, P. (2014). **Two Faces of Adult Blood Vessel Formation: Vasculogenesis and Angiogenesis.** *Stem Cells: From Basic Research to Therapy, Volume Two: Tissue Homeostasis and Regeneration during Adulthood, Applications, Legislation and Ethics* 2, 104.
- Marie, P. K. und Jain, S. (2015). **Vitamin D Inhibits ROS, ICAM-1, and Monocyte Adhesion in High Glucose and Acetoacetate Treated Endothelial Cells by Upregulating GSH.** *The FASEB Journal* 29, 253.258.
- McGill, S. N., Ahmed, N. A. und Christou, N. V. (1998). **Increased plasma von Willebrand factor in the systemic inflammatory response syndrome is derived from generalized endothelial cell activation.** *Critical care medicine* 26, 296-300.
- Meininger, C. J., Schelling, M. und Granger, H. J. (1988). **Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells.** *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 255, H554-H562.
- Mescher, A. L. (2010). **Junqueira's basic histology: text & atlas**, Bd. 12, McGraw-Hill Medical New York.
- Michaelis, U. R., Fisslthaler, B., Barbosa-Sicard, E., Falck, J. R., Fleming, I. und Busse, R. (2005). **Cytochrome P450 epoxygenases 2C8 and 2C9 are implicated in hypoxia-induced endothelial cell migration and angiogenesis.** *Journal of cell science* 118, 5489-5498.
- Miele, C., Rochford, J. J., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S. und Van Obberghen, E. (2000). **Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA expression via different signaling pathways.** *Journal of Biological Chemistry* 275, 21695-21702.
- Mikacenic, C., Hahn, W. O., Price, B. L., Harju-Baker, S., Katz, R., Kain, K. C., Himmelfarb, J., Liles, W. C. und Wurfel, M. M. (2015). **Biomarkers of Endothelial Activation Are Associated with Poor Outcome in Critical Illness.** *PloS one* 10, e0141251.
- Multhoff, G., Radons, J. und Vaupel, P. (2014). **Critical role of aberrant angiogenesis in the development of tumor hypoxia and associated radioresistance.** *Cancers* 6, 813-828.

- Negelein, E. (1925). **Versuche über Glykolyse**. Biochem. Z 158, 121.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. und Poltorak, Z. (1999). **Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors**. The FASEB journal 13, 9-22.
- Otsuka, F., Finn, A. V., Yazdani, S. K., Nakano, M., Kolodgie, F. D. und Virmani, R. (2012). **The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting**. Nature Reviews Cardiology 9, 439-453.
- Öztürk, H., Dokucu, A. I. h., Ögun, C. und Büyükbayram, H. (2002). **Protective effects of recombinant human interleukin-10 on intestines of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rats**. Journal of pediatric surgery 37, 1330-1333.
- Pang, T., Chen, W., Lu, Z., Luo, T., Zhou, H., Xue, X., Bi, J. und Fang, G. (2013). **Endothelial progenitor cells are influenced by serum of patients with systemic inflammatory response syndrome or multiple organ dysfunction**. Eur Rev Med Pharmacol Sci 17, 3169-3177.
- Peters, K., Unger, R. E., Brunner, J. und Kirkpatrick, C. J. (2003). **Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis**. Cardiovascular research 60, 49-57.
- Puchowicz, M. A., Xu, K., Sun, X., Ivy, A., Emancipator, D. und LaManna, J. C. (2007). **Diet-induced ketosis increases capillary density without altered blood flow in rat brain**. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 292, E1607-E1615.
- Rhyu, H.-s. und Cho, S.-Y. (2014). **The effect of weight loss by ketogenic diet on the body composition, performance-related physical fitness factors and cytokines of Taekwondo athletes**. Journal of exercise rehabilitation 10, 326.
- Roberts, W. C. (1981). **Aortic dissection: anatomy, consequences, and causes**. American heart journal 101, 195-214.
- Rona, P. (1911). **Beiträge zur Frage der Glykolyse**, Springer.
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz, C. und Shima, D. T. (2002). **Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis**. Genes & development 16, 2684-2698.

- Salvemini, D. und Cuzzocrea, S. (2002). **Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation**. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 1173-1185.
- Satoi, S., Kamiyama, Y., Kitade, H., Kwon, A. H., Takahashi, K., Wei, T., Inoue, T. und Takahashi, H. (2000). **Nitric oxide production and hepatic dysfunction in patients with postoperative sepsis**. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27, 197-201.
- Schmidt, R., Thews, G., Lang, F. (2000). **Physiologie des Menschen** 757-758.
- Schubert, J. K., Miekisch, W., Geiger, K. und Nöldge-Schomburg, G. F. (2004). **Breath analysis in critically ill patients: potential and limitations**. *Expert review of molecular diagnostics* 4, 619-629.
- Schultz, A. (1927). **Pathologie der Blutgefäße**. In: *Ergebnisse der Allgemeinen Pathologie und Pathologischen Anatomie des Menschen und der Tiere*, Springer, S. 207-349.
- Shreeniwas, R., Koga, S., Karakurum, M., Pinsky, D., Kaiser, E., Brett, J., Wolitzky, B., Norton, C., Plocinski, J. und Benjamin, W. (1992). **Hypoxia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1 alpha. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface**. *Journal of Clinical Investigation* 90, 2333.
- Sonveaux, P., Copetti, T., De Saedeleer, C. J., Végran, F., Verrax, J., Kennedy, K. M., Moon, E. J., Dhup, S., Danhier, P. und Frérart, F. (2012). **Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis**. *PloS one* 7, e33418.
- Stanley, I. A., Ribeiro, S. M., Giménez-Cassina, A., Norberg, E. und Danial, N. N. (2014). **Changing appetites: the adaptive advantages of fuel choice**. *Trends in cell biology* 24, 118-127.
- Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D. M., Zhou, H., Oldmixon, E. H., Sato, T. N. und Yancopoulos, G. D. (1998). **Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1**. *Science* 282, 468-471.
- Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomäki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., Waltari, M., Hellström, M., Schomber, T. und Peltonen, R. (2008). **Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation**. *Nature* 454, 656-660.
- Thorens, B. und Mueckler, M. (2010). **Glucose transporters in the 21st Century**. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298, E141-E145.

- Ulmer, H.-V. (1997). **Energiehaushalt**. In: Physiologie des Menschen, Springer, S. 641-648.
- Vanhoutte, P. M. (1993). **Other endothelium-derived vasoactive factors**. Monograph-American Heart Association 87, V9-V17.
- Waelput, W., Brouckaert, P., Broekaert, D. und Tavernier, J. (2006). **A role for leptin in the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and in immune response, an update**. Current medicinal chemistry 13, 465-475.
- Wang, D., Wang, Q., Yan, G., Qiao, Y., Sun, L., Zhu, B., Tang, C. und Gu, Y. (2015). **High glucose and interleukin 1 β -induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells involves in down-regulation of monocarboxylate transporter 4**. Biochemical and biophysical research communications 466, 607-614.
- Werner, N. und Sinning, J.-M. (2016). **CD-144 positive endothelial microparticles are increased in patients with systemic inflammatory response syndrome after TAVI**. International journal of cardiology 204, 172-174.
- Wing, E. J., Ampel, N. M., Waheed, A. und Shadduck, R. K. (1985). **Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) enhances the capacity of murine macrophages to secrete oxygen reduction products**. The Journal of Immunology 135, 2052-2056.
- Zimmerman, G. A., Prescott, S. M. und McIntyre, T. M. (1992). **Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules**. Immunology today 13, 93-100.
- Zudaire, E., Gambardella, L., Kurcz, C. und Vermeren, S. (2011). **A computational tool for quantitative analysis of vascular networks**. PloS one 6, e27385.

8 DANKSAGUNG

Herzlich danken möchte ich an dieser Stelle Frau Prof. Dr. Ulrike Kämmerer für die hervorragende Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit, die respektvolle Zusammenarbeit und die stetige Förderung meines wissenschaftlichen Berufsweges. Ein besonderes Dankeschön gilt Michaela Kapp, für ihre unentbehrliche Unterstützung im Labor und ihre kompromisslose Hilfsbereitschaft, welche nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Wurmb bedanken.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima und die stets gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern welche mir das Studium ermöglicht haben und mir stets mit Rat und Tat in allen Lebenslagen zur Seite stehen.

Der größte Dank gilt meiner Frau Julia die mich stets uneingeschränkt unterstützt und fortwährend gefördert hat sowie meinem Sohn Paul und meiner Tochter Johanna, die für mich die größte Motivation gewesen sind.

Daher möchte ich ihnen diese Arbeit widmen.