

Aus dem Institut für kardiovaskuläre Physiologie und  
Pathophysiologie

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Markus Sperandio

# **In-situ und in-vitro Untersuchungen zum Einfluss des Endothels auf subendotheliale Matrixschichten.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrads der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Kai Michael Schubert**

aus

**Schwerin**

Jahr

**2022**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Pohl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sabine Steffens  
Prof. Dr. Christian Schulz

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Theres Fey  
Dr. Holger Schneider

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der  
mündlichen Prüfung: 03.02.2022

# Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	14
1.1 Gefäßwachstum und Remodeling .....	14
1.1.1 Allgemeiner Gefäßaufbau mit Schwerpunkt der Rolle der IEL in Gefäßen.....	16
1.2 Endothelzellen.....	18
1.2.1 Wandschubspannung.....	19
1.2.2 VEGF .....	20
1.3 Podosomen und Gefäße .....	25
1.3.1 Entdeckung der Podosomen und Nomenklatur .....	25
1.3.2 Aufbau und Funktion der Podosomen .....	26
1.3.3 Regulation und Aktivierung der Podosomen.....	27
1.3.4 Rolle der Podosomen in Gefäßen .....	29
1.4 AMPK, Zytoskelett und Podosomen .....	29
1.5 Fragestellungen der Doktorarbeit .....	31
<b>2. Material und Methoden</b> .....	32
2.1 Lösungen und Chemikalien.....	32
2.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	32
2.1.2 Chemikalien und Medikamente .....	33
2.1.3 Antikörper.....	33
2.1.4 Färbung .....	34
2.1.5 Leibovitz 15-Medium .....	34
2.2 Kultur, Behandlung und Färbung der HUVECs .....	34
2.2.1 Zellkultur.....	34
2.2.2 Beschichtung mit Gelatine.....	34
2.2.3 Schubspannungs -Experimente an HUVECs.....	35
2.2.4 Immunofluoreszenzfärbung der HUVECs.....	36
2.2.5 RNA Extraktion und quantitative real-time PCR .....	37
2.2.6 Western Blot an HUVEC Proben.....	38
2.2.7 Migrationsassay .....	39
2.3 Präparation, Kanülierung, Transfektion, Kultivierung, Färbung und Bildgebung der Widerstandsgefäße .....	39
2.3.1 Tiere.....	39

2.3.2 Gefäßpräparation.....	39
2.3.3 Ligatur der Arteria femoralis.....	41
2.3.4 Kanülierung der Gefäße .....	42
2.3.5 Gefäßkultur .....	43
2.3.6 Gefäßfärbung .....	45
2.3.7 Konfokalmikroskopie der Gefäße und Bildbearbeitung .....	47
2.3.8 Bildauswertung.....	48
2.4 Statische Analyse .....	55
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>56</b>
3.1 Podosomen in HUVEC.....	56
3.1.1 Bildung von Podosomenrosetten in HUVECs .....	56
3.1.2 PKC Aktivierung stimuliert Podosomen Bildung und MMP-abhängige Proteolyse in HUVECs .....	58
3.1.3 Der Einfluss von VEGF auf die basale Podosomenbildung in HUVECs.....	58
3.1.4 Shear-Stress inhibiert die Podosomenbildung in HUVECs.....	61
3.1.5 Effekte von Shear-Stress auf die VEGF und VEGF-Rezeptor-Expression .....	63
3.1.6 Effekte von TGF-beta und VEGF auf die proteolytische Aktivität von Podosomen	63
3.1.7 Migrationsbeeinflussung von HUVECs .....	65
3.2 Podosomen und die IEL in intakten Gefäßen.....	66
3.2.1 IEL-Nachweis und IEL-Löcher in Mesenterialgefäßen .....	66
3.2.2 IEL-Struktur von Muskelgefäßen vs. Mesenterialgefäße .....	67
3.2.3 Abhängigkeit der IEL-Lochanzahl von der Gefäßgröße .....	68
3.2.4 Podosomennachweis in intakten Mesenterialgefäßen .....	70
3.2.5 Podosomenbildung in ligierten Femoralgefäßen der Maus .....	71
3.2.6 Keine Lochanzahlerhöhung in ligierten Femoralgefäßen der Maus .....	75
3.2.7 Keine Lochanzahlveränderung in isolierten und für 24 h kultivierten Gefäßen durch Variation des Shear-Stresses während Kultur .....	76
3.2.8 VEGF-induzierte Stimulation von Podosomen in kultivierten Gefäßen.....	77
3.2.9 Elastase-Behandlung erhöht die Gefäßwand-Permeabilität ohne die IEL-Lochparameter zu beeinflussen .....	80
3.2.10 Lochanzahlerhöhung in deendothelialisierten Gefäßen .....	81
3.2.11 Podosomendynamik und Abgrenzung von Podosomen und myoendothelialen Junctions in Gefäßen der LifeAct-Maus .....	82
3.3 AMPK und IEL-Veränderungen .....	85
3.3.1 erhöhte Lochanzahl in AMPK1 KO-Mäusen.....	85
3.3.2 verringerte Podosomenrosettenzahl im Endothel von AMPK1 KO-Mäusen .....	87

<b>4. Diskussion</b> .....	89
4.1 Podosomendefinition und Auswertung.....	90
4.2 Dynamik und Regulation der Podosenbildung in verschiedenen Zelltypen .....	91
4.3 VEGF und VEGFR Regulation .....	92
4.4 Shear-Stress und Proteasen.....	93
4.5 Podosen und GefäÙe.....	94
4.6 Bedeutung für Migration und Remodelingvorgänge.....	95
4.7 Strukturtypen der IEL in unterschiedlichen GefäÙbetten, in Abhängigkeit der Größe der GefäÙe und des Alters der Versuchstiere.....	96
4.8 Shear-Stress und strukturelle Veränderungen der IEL.....	97
4.9 Deendothelialisierung und Erhöhung der Lochanzahl der IEL .....	99
4.10 Die AMPK als Regulator von Podosen und des IEL-Umsatzes.....	101
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	103
<b>Literatur</b> .....	104

## Abkürzungsverzeichnis:

ACC - Acetyl-CoA-Carboxylase

Akt2 - *V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 2*, auch bekannt als Protein Kinase Akt-2 oder PKB Beta

AMP, ADP, ATP – Adenosin- (mono-, di-, tri-) phosphate

AMPK – *AMP-activated protein kinase*

AP-1 - activator protein 1

ARP2/3 - actin related protein 2/3 homolog

AUC – *area under the curve* (Fläche unter der Kurve)

BL - Basallamina

BMPR - bone morphogenetic protein receptors

CAMKK – *Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase 2*

Cdc42 - *cell division control protein 42 homolog* (kleine GTPase)

CLIP170 - *CAP-Gly Domain Containing Linker Protein 1*

DAG - Diacylglycerol

EC - Endothelzellen

EDHF - *endothelium-derived hyperpolarizing factor*

EEL - *external elastic lamina*

EGFR - epidermal growth-factor receptors

eNOS - *endothelial nitric oxide synthase*

ERK1/2 - extracellular-signal-regulated kinase-1/2

FAK - focal-adhesion kinase

FGF – *fibroblast growth factor*

Fyk - FYN tyrosine kinase

Gab1 und Gab2 - Grb2-associated binder 1 und 2

GAP – *GTPase activating protein*

GPCR - G protein–coupled receptors

GRB2 - growth factor receptor-bound protein 2

HIF $\alpha$  - hypoxia-inducible factor  $\alpha$

HSP27 - heat-shock-potein 27

HSPG - Heparansulfat-Proteoglykane

IEL- *internal elastic lamina*

IQGAP1 - Ras GTPase-activating-like protein

IRTKS - *Insulin receptor tyrosine kinase substrate*, auch bekannt als *BAI1 Associated Protein 2 Like 1 (BAIAP2L1)*

KLF2 - Kruppel-like factor 2

KO – Knock-out

LKB - *liver kinase B1 (LKB1)*, auch bekannt als *Serine/threonine kinase 11 (STK11)* oder *renal carcinoma antigen NY-REN-19*

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*

MBS85 - *Myosin-Binding Subunit 85*, auch bekannt als PPP1R12C

MCP-1 - monocyte chemoattractant protein-1

MEJ – myoendotheliale Junction

MLCK - *Myosin Light Chain Kinase*

MMP - Matrix-Metalloproteinasen.

Mo25 – auch bekannt als CAB39: *Calcium-binding protein 39*

MYPT1 - *Myosin Phosphatase-Targeting Subunit 1*, auch bekannt als *Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 12A (PP1RA)*

NCK - *non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein*

Nck - non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1

NET1 - *Neuroepithelial Cell Transforming 1*, auch bekannt als ARHGEF8

NF-κB - nuclear factor-κB

N-WASP - neural Wiskott-Aldrich syndrome protein

PAK - p21-activated kinase

PAK2 - p21-activated kinase 2

PDGFR - platelet-derived growth-factor receptors

PDLIM5 - *PDZ And LIM Domain 5*

PECAM-1 - *platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)*

PI3K - *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PIKfyve - *Phosphoinositide Kinase, FYVE-Type Zinc Finger Containing*

PKC - Proteinkinase C

PLCγ - Phospholipase Cγ

PP2A – Proteinphosphatase 2

PR - Podosomenrosette

Proteinkinase B - AKT/PKB

PtdIns(3,4)P2 - Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate

Ras - *rat sarcoma* (kleine GTPase)

Rho – *ras homolog* (kleine GTPase)

RSV - Rous Sarcoma Virus

SH2 - Src-homology 2

Shb - SH2 and  $\beta$ -cells

Shc - *src homology 2 domain containing transforming protein 1*

Smad1/5 – Portmanteauwort aus den Proteinen MAD der Drosophila (mothers against decapentaplegic) und SMA des Caenorhabditis elegans (small body size)

SNAP 29 - *Synaptosome Associated Protein 29kDa*

SNX17 - *Sorting Nexin 17*

STRAD - *STE20-related kinase adaptor alph*, auch bekannt als LYK5

Tau- *Microtubule Associated Protein Tau*

TKS5 - *Tyrosine Kinase Substrate With Five SH3 Domains*, auch bekannt *SH3 And PX Domains 2A* (SH3PXD2A)

TRK - Tyrosin-Rezeptor-Kinase

TSAd - T-cell-specific adaptor (auch bekannt als VEGF receptor-associated protein (VRAP))

TSC2 - *Tuberous Sclerosis Complex 2* (TSC2), auch bekannt als Tuberin

TSK - testis-specific serine/threonine-protein kinase (TSSK)

ULK1 - *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase*

VASP - *Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein*

VCAM-1 - vascular cell adhesion protein 1

VE-Cadherin – *vascular epithelial cadherin*

VEGF – *vascular endothelial growth factor*

VHL - von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL)

VPR – *vascular permeability factor* (ehemaliger Name des VEGF)

VSMC – *vacular smooth muscle cells* (vaskuläre glatte Muskelzellen)

WIP - WASP-interacting protein





## **Zusammenfassung:**

### **Fragestellung:**

Die Hauptfunktion der Mikrozirkulation besteht darin, die Organe des Körpers, je nach Anforderungsprofil abgestimmt mit Sauerstoff und Substraten zu versorgen. Die Gefäße der Mikrozirkulation sind aus einer Gefäßintima (Endothel und Basalmembran) und außen liegenden Gefäßmuskelzellen aufgebaut. Zwischen ihnen liegt eine Internal Elastic Lamina (IEL), welcher bezüglich der Genese verschiedener pathologischer Gefäßveränderungen eine wichtige Rolle zugeschrieben wird. Über den Aufbau, die Funktion und den dynamischen Umbau der IEL ist allerdings noch wenig bekannt. Eine wichtige Komponente könnten hierbei aus Endothelzellen über Podosomen («füßchenartige» Zellausstülpungen) freigesetzte Proteasen sein, welche die Basalmembran und IEL-Matrix abbauen könnten. In der vorliegenden Doktorarbeit wird zum einen die Morphologie der IEL in kleinen arteriellen Gefäßen beschrieben und zum anderen Bedingungen für ihren dynamischen Umbau untersucht. Dabei wurde die Hypothese überprüft, ob aus Podosomen des Endothels freigesetzte Proteasen die IEL-Struktur, insbesondere die Fenestrierung der IEL, verändern können und welche physikochemischen Stimuli dabei eine Rolle spielen. Hierhingehend wurde auch ein knock-out Modell der AMPK untersucht, ein metabolisches Schlüsselenzym, bei welchem eine Rolle am Umsatz des Zytoskelettes, der Endothelzellmigration, der Integrität der IEL und weitergehend auch im Rahmen der Tumorentstehung beschrieben ist.

### **Methoden:**

Zur Beantwortung oben genannter Fragestellung wurden zwei Modelle genutzt: Zunächst wurden in Zellkultur an HUVECs unter verschiedenen physikochemischen Kulturbehandlungen (chemisch: Kontrollbedingungen, bekannte Podosom-Induktoren (PMA, VEGF, TGF-beta) und jeweilige Inhibitoren; physikalisch: verschiedene Shear-Stress-Raten; sowie Kombination aus diesen Behandlungen) und Färbetechniken das Auftreten und die Dynamik von Podosomen untersucht. In einem zweiten Schritt wurde dann der Zusammenhang zwischen Anzahl der Podosomen und der damit zusammenhängenden proteolytischen Aktivität analysiert. Hierzu wurde der Matrixabbau (anhand von Imprints (Abdrücken)) unter den jeweiligen Stimulationsbedingungen in Oregon Green 488 Gelatine mikroskopisch untersucht und quantifiziert.

Zum anderen wurden intakte Mesenterial- und Muskelgefäße, die aus der Maus isoliert wurden, untersucht. Zur morphologischen Charakterisierung der IEL wurden zunächst verschiedene Färbetechniken miteinander verglichen (Eosin, Alexa633) und hiernach die IEL und ihre Fenestrierung an Gefäßen unterschiedlicher Größe quantifiziert. Der Nachweis von Podosomen an oben genannten Gefäßen geschah nach Fixierung und Immunfärbung (MMP14 und Cortactin Co-Färbung). Auch wurden hier verschiedene physikochemischen Stimuli (VEGF, unterschiedliche Flussbedingungen durch Ligation an Femoralgefäßen in-vivo und anschließende Färbung in-vitro) genutzt, um das Auftreten von Podosomen zu analysieren. Durch Kombination der oben genannten Färbetechniken wurde zudem untersucht, inwiefern das Auftreten von Podosomen mit einer veränderten Durchlässigkeit und/oder Fenestrierung der IEL zusammenhängt. Dies wurde sowohl an BL6-Mäusen, als auch an Mesenterialgefäßen von AMPK knock-out Mäusen durchgeführt.

### **Ergebnisse:**

Das Auftreten von Podosomen (Podosomenrosetten) konnte in HUVECs unter statischen Kontrollbedingungen durch F-Actin und Cortactin Co-Expriemierung nachgewiesen werden. Das Auftreten von Podosomenrosetten wurde hier indirekt über den proteolytischen Abbau und Quantifizierung von dadurch ausgelösten „Imprints“ in fluorszeirender Matrix nachgewiesen. Durch PMA, einen PKC-Aktivator, konnte erhöhtes und durch Inhibitoren des VEGF-Signalkaskade ein erniedrigtes Auftreten von Podosomenrosetten gezeigt werden (basale Anzahl der Podosomrosettenabdrücke /Imprints je mm<sup>2</sup>: 158 ± 20, PMA: 341 ± 47, GÖ 6983: 160 ± 13, GÖ6983 + PMA: 203 ± 12). Shear-Stress erniedrigte das Auftreten von Imprints in der Gelatinematrix (196 ± 49 vs. niedrig 78 ± 8, mittel 43 ± 9, and hoch 41 ± 4 Podosomrosettenabdrücke/mm<sup>2</sup>). Dies ging mit einer erniedrigten VEGF-RNA-Expression einher, welche eine gleichzeitig erhöhte VEGF-Rezeptorexpression nicht kompensieren konnte (niedrig 72 ± 12, hoch 59 ± 8 % der RNA-Expression von VEGF unter statischen Bedingungen; niedrig: 193 ± 46 und 300 ± 58% der RNA-Expression von VEGFR2 unter statischen Bedingungen). Während zusätzliche VEGF-Applikation unter statischen Bedingungen keinen Einfluss auf das Auftreten von Podosomenrosetten und daraus resultierenden Imprints in der Gelatinematrix hatte, führte eine Applikation unter hohem Shear-Stress zu einer Erhöhung von Imprints

(Kontrolle:  $39 \pm 10$ , VEGF  $92 \pm 19$ ). Eine Erhöhung der Podosomenanzahl und proteolytischen Aktivität ging mit einem vermehrten Migrationsverhalten einher.

Die IEL konnte in Mesenterialgefäßen am deutlichsten mit einer Alexa633- Färbung nachgewiesen werden. Aufgrund der besseren Quantifizierbarkeit von Lochstrukturen in der IEL wurden primär grosse Muskelgefäße (Arteria femoralis,  $>300\mu\text{m}$ ) und Mesenterialgefäße mit einem Durchmesser  $\sim 150\mu\text{m}$  herangezogen. Neben Unterschieden der Lochstruktur zwischen verschiedenen Gefäßbetten (Muskel vs. Mesenterium) konnte dann gezeigt werden, dass die Lochanzahl zu kleineren Gefäßdurchmessern in Mesenterialgefäßen zunahm, während die mittlere Lochgröße abnahm und die Gesamtlochfläche unverändert blieb. In Mesenterialgefäßen konnten dann endotheliale Podosomen mit Co-Färbung aus MMP14 und Cortactin nachgewiesen werden. In einem Ligationsmodell der Arteria femoralis über 7 Tage, zeigte sich unter statischen Bedingungen ein gehäuftes Auftreten von Podosomenrosetten (sham  $9.2 \pm 4.3$ , ligiert  $23.4 \pm 6.5$  Podosomen pro  $\text{mm}^2$ ), welche allerdings nicht mit einer mikroskopisch nachweisbaren morphologischen Veränderung der IEL einherging (konstante Lochzahl und Lochdurchmesser in ligierten und sham-operierten Gefäßen). In frisch isolierten, intakten Mesenterialgefäßen löste eine nachfolgende VEGF-Stimulation ähnliche Effekte aus, Eine Elastase-Behandlung von kultivierten Gefäßen führte zu keiner morphologisch erfassbaren Strukturveränderung der IEL, erhöhte aber Durchlässigkeit der IEL für intraluminal gegebene große Moleküle (Antikörper). Einzig eine Deendothelialisierung der Gefäße konnte die Lochanzahl in 24-Stunden kultivierten Gefäßen erhöhen, was durch Hinzugabe von Proteaseinhibitoren unterbunden werden konnte.

An Gefäßen von AMPK-knock-out Mäusen zeigte sich eine erhöhte Lochanzahl in AMPK1 KO-Mäusen im Vergleich zu Gefäßen aus BL-6-Kontrolltieren. Dies ging überraschenderweise sogar mit einem reduzierten Auftreten von Podosomenrosetten einher ( $3.3 \pm 1.8$  AMPK $\alpha$ 1-KO vs.  $12 \pm 4.9$  CLB57/BL6 Kontrolle), was eine Rolle von Podosomen für dynamische Veränderungen der IEL Struktur unwahrscheinlich macht.

### **Fazit:**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine wichtige Rolle von kontinuierlichen physiologischen Shear-Stress bei der Kontrolle der Podosomendynamik in Endothelzellen auf: statische Bedingungen führen VEGF-moduliert zu einer erhöhten proteolytischen Aktivität von kultivierten Endothelzellen. Dieser Befund lässt sich auch

in intakten Gefäßen ex-vivo bestätigen, führt allerdings im untersuchten Zeitraum (bis zu 7 Tagen) nicht zu konfokalmikroskopisch auflösbaren Veränderungen an der IEL. Allerdings führt eine vermehrte Anzahl von Podosomenrosetten funktionell zu einer erhöhten Permeabilität der IEL. Zum anderen geht ein Gefäßmodell (AMPK $\alpha$ 1 KO), in welchem die Lochanzahl und Gesamtlochfläche in der IEL erhöht ist, nicht mit einer erhöhten Podosomenrosettenanzahl einher.

Diese Befunde unterstreichen die wichtige Rolle von Shear-Stress in der Stabilisierung des Endothels vor Umbauvorgängen, während es unter akuter Reduktion des Shear-Stresses (Stase) zur proteolytischen Aktivierung (Remodelingvorgängen) kommen kann, welche in der vorliegenden Arbeit im konfokalmikroskopischen Bereich jedoch nicht zu nachweisbaren Strukturveränderungen der IEL, wohl aber zu einer Permeabilitätssteigerung führte. In diesem Sinne zeigt die vorliegende Arbeit, dass die endotheliale Podosomenregulation durch physikochemische Stimuli ein interessantes Ziel für therapeutische Modulationen von endothelialen Remodelingvorgängen sein kann.

# 1. Einleitung

## 1.1 Gefäßwachstum und Remodeling

Eine zentrale Aufgabe der Mikrozirkulation ist es, die Gewebe des Körpers entsprechend der jeweiligen Anforderungen ausreichend mit Sauerstoff und Substraten zu versorgen und den dafür notwendigen Blutfluss zu gewährleisten. Ein exakt auf diese Aufgabe abgestimmtes Netzwerk von zuführenden Arterien, Arteriolen, Kapillaren und abführenden Venolen und Venen mit angepasster Länge und variablen Durchmessern steht dem Körper dazu zur Verfügung. Dynamische Änderungen der Gefäßdurchmesser sowie langfristig auch Vaskulogenese, Angiogenese und Gefäßremodeling sind dabei zentrale Vorgänge, sowohl unter physiologischen, als auch unter pathophysiologischen Bedingungen und erfordern eine genau abgestimmte Regulation und Kontrolle. Während die Vaskulogenese die in-situ Differenzierung von Vorläuferzellen zu Endothelzellen in einem primitiven vaskulären Netzwerk ist, beschreibt die Angiogenese das Sprouting von neuen Kapillaren aus einem bereits bestehenden Gefäßnetzwerk und das Remodeling den Umbau von Gefäßen, je nach existierenden Stimuli, in Anpassung oder Kompensation an mittelfristig veränderte Anforderungen des jeweiligen Organs und auch des Gesamtorganismus (Luttun & Carmeliet, 2003; Schaper & Ito, 1996; Zakrzewicz, Secomb, & Pries, 2002). Mechanismen, die die jeweils genannten Prozesse beeinflussen, sind mannigfaltig und variieren je nach Entwicklungszustand und Gefäßgebiet. Angiogenese, Remodeling und Pruning (die Rückbildung nicht mehr benötigter Blutgefäße) werden zusammengefasst als Angioadaptation bezeichnet. Sie wird vor allem über Feedback-Mechanismen reguliert, die den funktionellen Status des Organes widerspiegeln. Hierbei sind vor allem physikalische Stimuli, wie die Schubspannung (*Shear-Stress*) oder metabolische Stimuli, die durch einen veränderten Aktivitätszustand oder Sauerstoffbedarf des Gewebes ausgelöst werden, zu nennen.

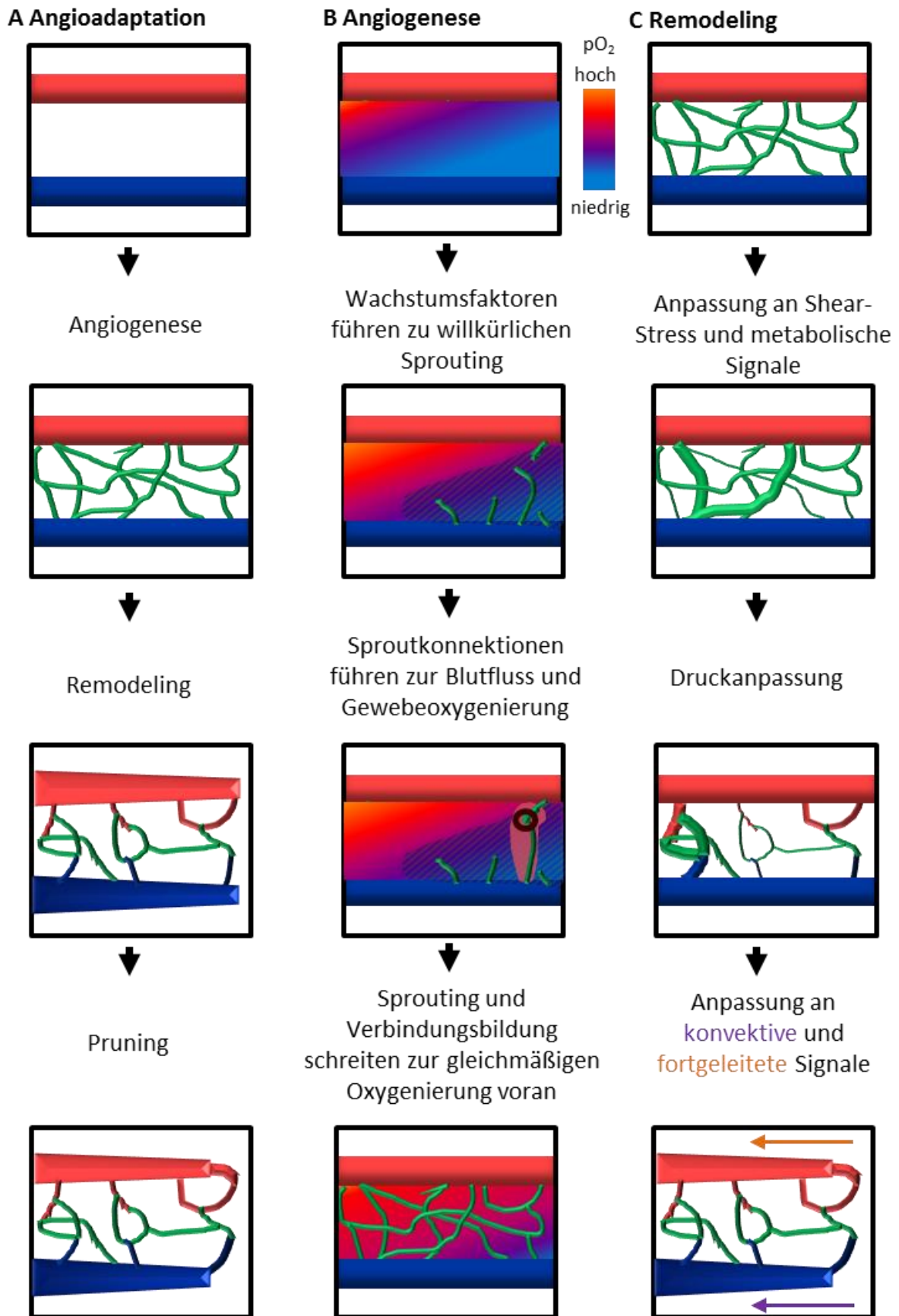


Abb. 1.1: Gefäßausbildung und Remodeling.

**A** Überblick über die zentralen Prozesse von Angiogenese und Remodeling im Rahmen der Angioadaptation. **B** Grundzüge der Prozesse bei der Angiogenese: Wachstumsfaktorgradienten führen zum Gefäßsprouting, vor allem in hypoxischen Arealen. An Konnektionsstellen der Gefäßsprouts entstehen Kapillaren, die eine Gewebsoxygenierung ermöglichen, und so die Gewebshypoxie beseitigen und ein neues Versorgungsgleichgewicht in den zu perfundieren Organ herstellen, so dass letztendlich ein effektiv adaptiertes Gefäßnetzwerk entsteht. **C** Remodelingstimuli und -vorgänge: in fein konzertierter Aktion werden Stimuli, wie veränderter Shear-Stress und humorale Gewebssignale (z.B. Metabolite) integriert und führen zur angepasster Gefäßproliferation oder -abbau. Lokal entstandene Stimuli entfalten durch die Ausbildung von Gradienten und Signalfortleitung über interzelluläre Kommunikation Wirkungen über längere Distanzen (modifiziert nach Pries/Secomb 2014).

### **1.1.1 Allgemeiner Gefäßaufbau mit Schwerpunkt der Rolle der IEL in Gefäßen**

Die Gefäßwand besteht im Wesentlichen aus einer inneren Endothelschicht, außen liegenden glatten Muskelzellen, und einer extrazellulären Matrix u.a. mit elastischen und kollagenen Fasern. Der relative Anteil der genannten Komponenten variiert zwischen den Gefäßbetten je nach Größe, Lokalisation und Funktion.

Die Internal Elastic Lamina (IEL) grenzt die Gefäßintima (Endothel und Basalmembran) von den weiter außen liegenden Gefäßmuskelzellen ab. MB Dees gibt bereits 1926 einen guten Abriss über die Beschreibung der IEL in histologischen Schnitten und erwähnt dabei CJ Eberth, der 1872 die IEL zum ersten Mal als „fenestrierte Membran“ in großen Gefäßen (MB Dees 1926) bezeichnet. Sie wurde seitdem speziessübergreifend in Arterien und Venen unterschiedlicher Lokalisation und Größe nachgewiesen (Campbell & Roach, 1981; Capdeville, Coutard, & Osborne-Pellegrin, 1989; Dunmore, Song, & Roach, 1990; Osborne-Pellegrin, 1978, 1979). Als heterogene Barriere zwischen Endothelzellschicht und der inneren glatten Muskelzellschicht (Sandow, 2009) besteht sie aus Elastin und Nicht-Elastin-Komponenten, die spät-fetal und früh postnatal angelegt werden und unter physiologischen Bedingungen nur einen geringen Umsatz unterliegen (Raghow, Seyer, & Kang, 2006). Die Funktion der IEL und vor allem ihre regionalen strukturellen Unterschiede sind immer noch unzureichend beschrieben (Sandow, Gzik, & Lee, 2009). Diese Unterschiede äußern sich vor allem in der Zahl und Gesamtfläche der Fenestrierungen („Löcher“) und der IEL-Dicke und umfasst ein Spektrum von einer kontinuierlichen IEL-Membran ohne Löcher über netzartige Strukturen bis hin zu nur noch einzelnen lamellartig angeordneten Fibrillen. Während die Literatur zur IEL in der Aorta und Arteriosklerose in großen Gefäßen sehr umfassend ist, ist die Funktion der

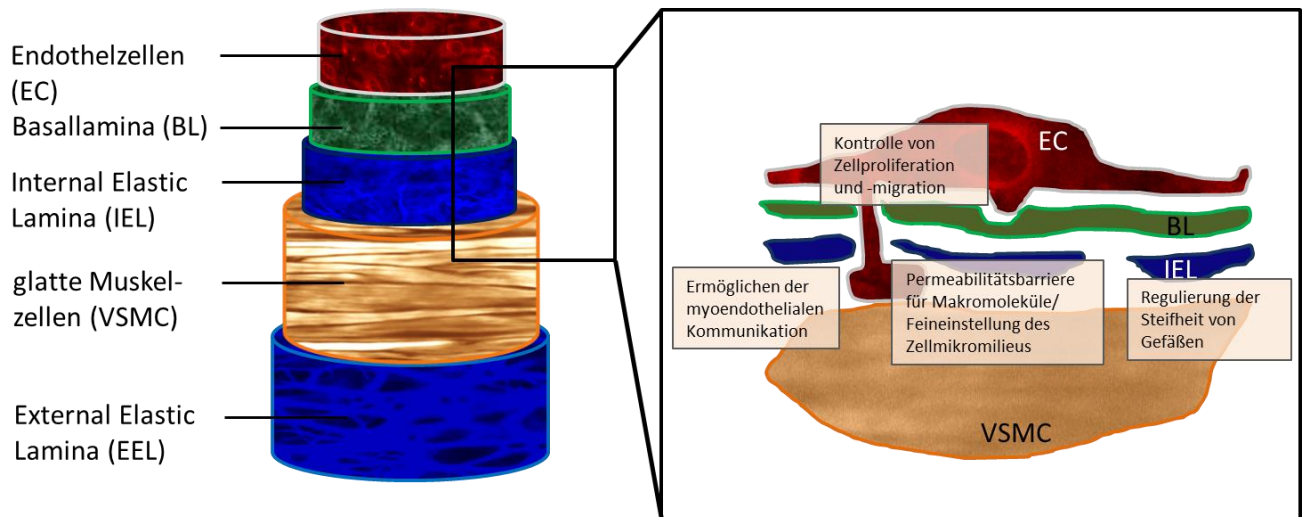


IEL in kleinen Gefäßen noch wenig bekannt und uneinheitlich. Trotz der abnehmenden Masse und des prozentualen Anteils der IEL am Gesamtwanddurchmesser zu kleineren Gefäßen hin, scheint die IEL eine komplexe biomechanische Struktur zu sein, die in unterschiedlichen Gefäßbetten unterschiedliche organspezifische Funktionen zu erfüllen hat. Hierzu zählt die Begrenzung der myoendothelialen Kommunikation auf spezifische Kontaktflächen (Membranlöcher) (de Wit, Hoepfl, & Wölfle, 2006; Sandow, Tare, Coleman, Hill, & Parkington, 2002; Sandow & Tare, 2007; Sandow, 2004). - wobei festzuhalten bleibt, dass nicht jedes IEL-Loch eine myoendotheliale Junction darstellt. Myoendotheliale Junctions sind jedoch in Abhängigkeit von der elektrischen Kopplung der Endothelzellen und glatten Muskelzellen untereinander bereits in geringeren Mengen funktionell suffizient (Hald, Jacobsen, Sandow, Holstein-Rathlou, & Welsh, 2014)-. Weiterhin stellt die IEL eine Permeabilitätsbarriere für Makromoleküle dar, welche für die Feineinstellung des Mikromilieus der beiden anliegenden Zellpopulationen der Gefäßwand von enormer Wichtigkeit ist (Hassler, 1962; Smith & Staples, 1980; Tada & Tarbell, 2004). Schließlich ist die IEL an der Regulierung der Steifheit von Gefäßen und der Anpassung ihrer Elastizität beteiligt, die sich u.a. bei Gefäßremodelingvorgängen verändern kann (Lemarie, Tharaux, & Lehoux, 2010; Schiffrin, 2012). Damit im Zusammenhang steht ein Einfluss auf die Kontrolle von Zellproliferation und Zellmigration (M. Sho et al., 2002a; Sims, 1985).

In einer eleganten Veröffentlichung beschreiben Clifford et. al 2011 an Hand von Druck-Durchmesser-Kurven von unterschiedlichen Gefäßen wie ein unterschiedlicher Anteil der IEL/EEL radial und tangential wirksame Kräfte passiv aufzunehmen und glatte Muskelzellen entlasten kann und stellen dabei fest, dass dieser Mechanismus vor allem in kleinen Muskelgefäßen, in denen die IEL netzartig angelegt ist, gegenüber Gehirnarterien, in denen die IEL mehr plattenförmig vorkommt, funktionell von Bedeutung für die Aufnahme von longitudinal einwirkenden Kräften ist (Clifford et al., 2011).

Kirby et al. Beschreiben, dass die IEL-Lochanzahl in arteriellen Gefäßen hin zu kleineren Gefäßsegmenten von proximal nach distal zunimmt und sich daraus funktionelle Unterschiede vor allem in der Kanalexpression und Rezeptorenbesatz ergeben, da die Kontaktfläche von Kanälen, die in die EDHF-Kaskade involviert sind, so zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen erhöht wird. (Kirby et al., 2013).

In einer Publikation von Boerman et al. wird die Rolle des Lebensalters auf die Lochanzahl in mesenterialen Gefäßen untersucht (Boerman, Everhart, & Segal, 2016). In älteren Mäusen scheint durch eine verminderte Lochanzahl das myoendotheliale Calcium-Signaling reduziert zu sein und damit zur Gefäßpathologie im Alter beizutragen.



**Abb. 1.2.: Gefäßaufbau und Aufgaben der IEL:**

**A** Grundaufbau des Gefäßes von luminal nach abluminal vorgehend aus Endothelzellen (EC), Basallamina (BL), Internal Elastic Lamina (IEL), glatter Muskelschicht und die mit vereinzelt Zellen durchsetzte External Elastic Lamina (EEL). **B** Die derzeit beschriebenen Funktionen der IEL aus der Literatur: Die IEL als Regulator der Elastizität und Dehnbarkeit von Gefäßen, als Regulator der Zellproliferation und -migration, als Moderator der myoendothelialen Kommunikation und als Permeabilitätsbarriere und Mikrofilter für große Moleküle zur Einstellung eines Zellmikromilieus, sowie humorale Informationsübermittlung durch peptidische Abbaustoffe der rMatrix, sogenannte Matrikine.

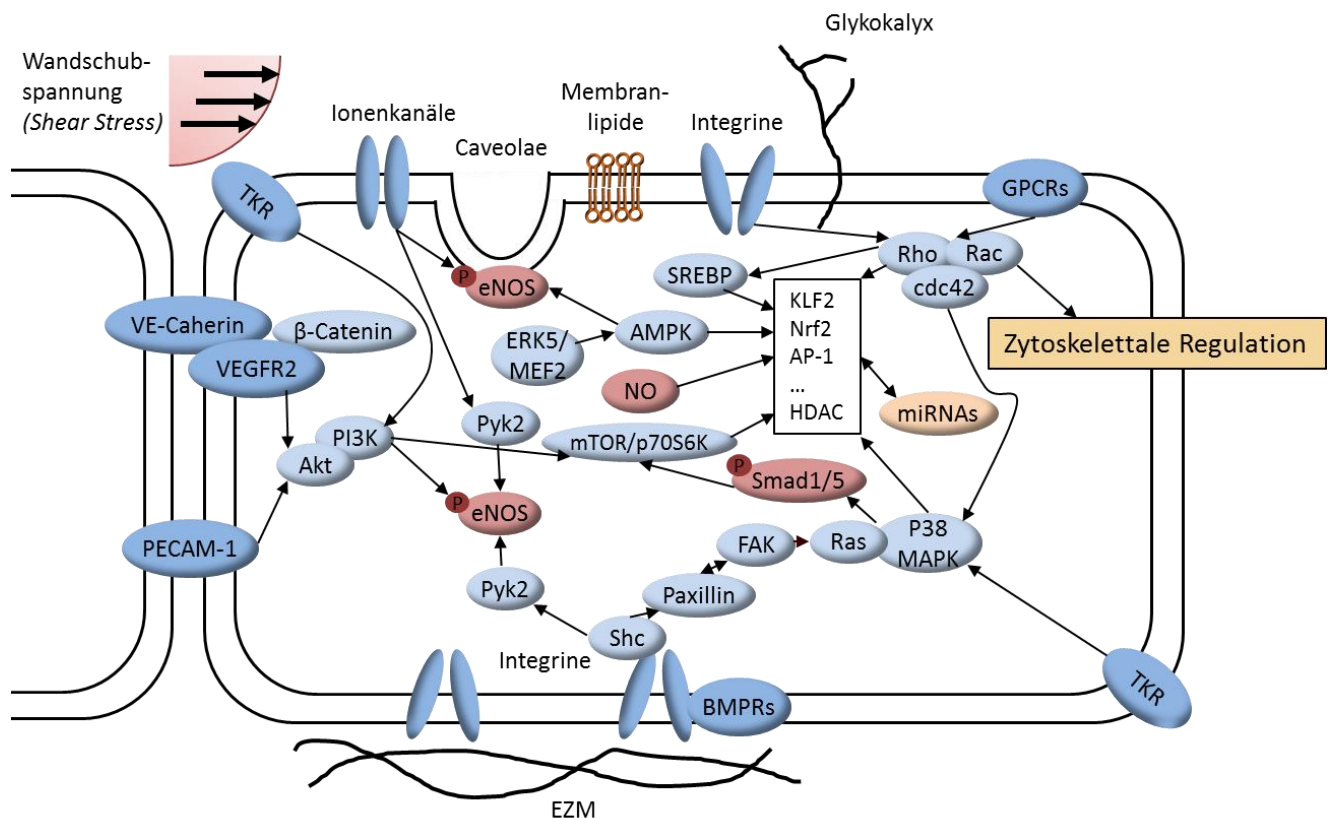
## 1.2 Endothelzellen

Ein gesundes Endothel ist zentral für die funktionelle Integrität von Gefäßen. Es ist u.a. Syntheseort für zahlreiche Mediatoren die den Gefäßtonus beeinflussen. Diese Synthese wird durch zahlreiche Signalkaskaden kontrolliert und reguliert. Die Auslösung dieser Signalkaskaden kann sowohl durch hämodynamische Kräfte- als auch durch humorale Substanzen erfolgen (Chiu & Chien, 2011). Zwei für die vorliegende Arbeit wichtige Vorgänge, die Entstehung der endothelialen

Wandschubspannung und dessen Wirkung auf die Endothelzellen, als auch die VEGF-Signaltransduktionskaskade seien hier als wichtige funktionelle, das Endothel-involvierende Prozesse herausgegriffen und näher erläutert.

### **1.2.1 Wandschubspannung**

Als Wandschubspannung (*Wall Shear-Stress*) wird die tangential einwirkende Kraft bezeichnet, welche die Blutströmung auf die Endotheloberfläche ausübt. Wo auch immer Blut strömt, entsteht also an der Gefäßwand auch ein Shear-Stress. Die Wandschubspannung kann so unter physiologischen, als auch unter pathophysiologischen Bedingungen den Gefäßtonus und die Gefäßstruktur beeinflussen und regulieren. Diese Regulation geschieht hauptsächlich über die mechanisch stimulierte Freisetzung von Stickoxid, Prostaglandinen, Lipoxxygenasen, hyperpolarisierenden Faktoren (wie dem Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)), Wachstumsfaktoren (wie z.B. FGF, VEGF) und viele weitere verwandte Moleküle (Chistiakov, Orekhov, & Bobryshev, 2016; Corson et al., 1996; Davies, 1995; Griffith, 2002; Moncada, 2006; Pohl, Holtz, Busse, & Bassenge, 1986). Dazu kommt die Steuerung von Gen- und Proteinexpression durch langfristige chronische Veränderungen der Hämodynamik in den jeweils betrachteten Gefäßabschnitt (Langille & O'Donnell, 1986; Schiffrin, 2012; Zhang et al., 2008). Wandschubspannung kann über diese endothelialen Mediatoren die Koagulationsaffinität, den Gefäßtonus, die Gefäßpermeabilität, die inflammatorische Kapazität und den Proliferationsumsatz beeinflussen, um so die Gefäßintegrität an die Anforderungen der Durchblutung anzupassen. In diesem Sinne können Störungen dieses hämodynamischen Parameters auch zu Gefäßpathologien und –dysregulation des Gefäßaufbaus beitragen (Davies, Civelek, Fang, & Fleming, 2013). Die Detektion des Shear-Stresses geschieht dabei über ein komplexes Netzwerk an den zahlreiche mechanosensitive Strukturen involviert sind: zu diesen gehören die junctionalen Proteine (VE-Cadherin und Occludin), Rezeptortyrosinkinasen (VEGFR2, FGFR), fokale Adhäsionskontakte (Gloe & Pohl, 2020), G-Proteine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Ionenkanäle (z.B.  $K_{IR2.1}$ ,  $K_{ATP}$ , TRPV4) und die Glykokalyx ((Gulino-Debrac, 2013; Zhou, Li, & Chien, 2014; Pohl et al. , 1991)



**Abb. 1.3.: Endotheliale Signaltransduktionskaskade als Reaktion auf Wandspannungsänderungen**

Mechanosensitive Strukturen zur Detektion der Wand Schubspannung in dunkelblau: TKR, VE-Cadherin, PECAM-1, VEGFR2, Ionenkanäle, Membranlipide, Integrine, GPCRs, BMPRs, Glykokalyx. Über Adaptorproteine, wie z.B. Shc (Src homology 2 domain containing transforming protein 1) werden Signalkaskaden aktiviert, die zur Aktivierung von den kleinen GTPasen (Ras, Rho, Cdc42), PI3K und MAPKs, welche dann die endotheliale NO<sub>2</sub>-Synthase (eNOS), Smad1/5, und Transkriptionsfaktoren mit ihren Co-Faktoren (z.B. Kruppel-like factor 2 (KLF2), and activator protein 1 (AP-1)) aktivieren um zahlreiche an Genprodukte (z.B. vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), als auch microRNAs (miRNAs)) zu regulieren und den hämodynamischen Parametern anpassen (hellblau). Dieses Diagramm illustriert die Komplexität der endothelialen Regulation als Antwort auf Shear-Stress Veränderungen (modifiziert nach Zhou, Li, and Chien 2014).

### 1.2.2 VEGF

Die Familie der vascular endothelial growth factors (VEGF) umfasst zentrale Regulatoren der Vaskulogenese in der Embryonalzeit und der Angiogenese im Erwachsenenalter. In Säugern wurden bis dato fünf VEGF-Liganden mit ihren jeweiligen Splicevarianten nachgewiesen. Die jeweiligen Liganden binden in einem überlappenden Verhalten an Rezeptortyrosinkinasen (RTK), die als VEGF-Rezeptoren (VEGFR1-3) bekannt sind. Des Weiteren gibt es noch Co-Rezeptoren (Moleküle denen die katalytische Untereinheit der VEGF-Liganden fehlt) wie Heparansulfat-

Proteoglykane (HSPG) und Neuropiline (Ferrara, Gerber, & LeCouter, 2003). Während die VEGFRs als RTKs viele Gemeinsamkeiten mit anderen Wachstumsrezeptoren (z.B. platelet-derived growth-factor receptors (PDGFRs) and the epidermal growth-factor receptors (EGFRs)) teilen, wird ihre Synthese und Expression durch physikalische Stimuli mitreguliert. Während der VEGFR1 (Flt1) an Makrophagen und Monozyten als positiver Regulator bekannt ist, ist seine Rolle im Gefäßsystem zwiespältig. Hier kann er sowohl als positiver, wie auch als negativer Regulator agieren, indem er VEGF bindet und damit die Bindung an den VEGFR2 kompetitiv hemmt. Der VEGFR2 ist der zentrale Rezeptor im Gefäßsystem, der in vielen Aspekten der normalen, wie auch der pathophysiologischen Endothelzellbiologie eine wichtige Rolle spielt (Claesson-Welsh & Welsh, 2013; Olsson, Dimberg, Kreuger, & Claesson-Welsh, 2006). Der VEGFR3 spielt dagegen vermutlich nur embryonal bei der Anlage des Lymph- und Venensystems eine Rolle.

Obwohl der knock-out des VEGFR1 in 50% der untersuchten Mäuse durch vaskuläre Fehlbildungen embryonal letal (E8,5/9) ist (interessanterweise überleben und entwickeln sich die anderen 50% normal), hat seine Deletion im erwachsenen Tier keinen pathologischen vaskulären Phänotyp (Hiratsuka et al., 2005; Hiratsuka, Minowa, Kuno, Noda, & Shibuya, 1998). Er scheint dennoch für die Rekrutierung von hämatopoetischen Stammzellen (HPC) eine wichtige Rolle zu spielen (Luttun et al., 2002; Lyden et al., 2001). Speziell in Endothelzellen scheint der VEGFR1 überdies eine wechselseitige Beziehung mit dem VEGFR2 zu haben. So zeigen einige Studien, dass VEGFR1 Stimulation die durch VEGFR2 induzierte Proliferation von EC hemmen kann, während andere Arbeitsgruppen zeigten, dass, vor allem unter pathophysiologischen Bedingungen, die Aktivierung von VEGFR1 auch zu einer vermehrten Aktivität von VEGFR2 mit den damit verbundenen vaskulären Effekten führen kann (Carmeliet et al., 2001; Rahimi, Dayanir, & Lashkari, 2000; Zeng, Dvorak, & Mukhopadhyay, 2001).

Der bedeutendste Vertreter der VEGFR-Familie ist sicherlich der VEGFR2. Seine Regulation und Funktionen sind mannigfaltig. Direkt mit dem VEGFR2 interagieren allerdings nur wenige Proteine, die eine Src-homology 2 (SH2) -Domäne aufweisen. Zu diesen gehören die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) und die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K). Die von diesen beiden Proteinen eingeleiteten Hauptsignalkaskaden der VEGFR-Aktivierung umfassen letztendlich auch alle Funktionen, die die VEGF-

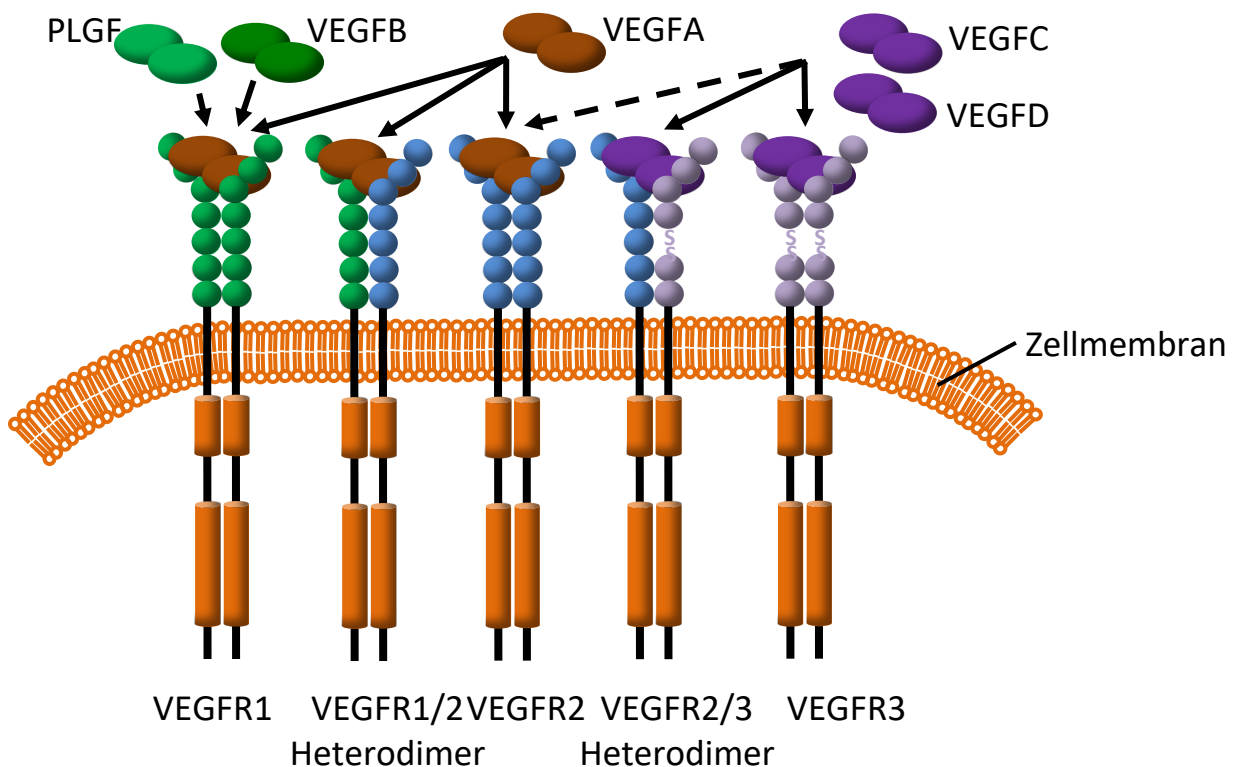
Aktivierung aufweist: Zellüberleben und -proliferation, Permeabilitätssteigerung, Migrationsinduktion durch Auflösung der Zell-Zellkontakte und die all diesen Prozessen zugrundeliegende dynamische Regulation des Zellzytoskeletts mit seinen Komponenten. Nach Aktivierung und Autophosphorylierung des dimerisierten VEGFR2 führt PLC $\gamma$ -Bindung an Tyrosin-1175 zur Aktivierung der mitogen-activated protein kinase (MAPK) und der extracellular-signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2) Kaskade und damit zur Proliferation von Endothelzellen (Takahashi, Yamaguchi, Chida, & Shibuya, 2001). PLC $\gamma$ -Aktivierung führt zur Bereitstellung von Diacylglycerol (DAG) welches die Phospholipase C (PLC) aktiviert und zum Calciumanstieg in der Endothelzelle führen kann. Die Bedeutung dieser Tyrosin-Phosphorylierungsstelle kommt dadurch zum Ausdruck, dass eine Deletion, ähnlich wie der VEGFR2-KO-Maus, embryonal letal ist (Sakurai, Ohgimoto, Kataoka, Yoshida, & Shibuya, 2005). Über das adaptor protein SH2 and  $\beta$ -cells (Shb) an Tyrosin-1175 kann zudem die PI3K aktiviert werden, welche über Proteinkinase B (AKT/PKB) wichtig für das Überleben von Endothelzellen ist (Dayanir, Meyer, Lashkari, & Rahimi, 2001; Fujio & Walsh, 1999). Wichtige über VEGFR2 aktivierte Faktoren für die Zellmigration in Endothelzellen sind der T-cell-specific adaptor (TSA; auch bekannt als VEGF receptor-associated protein (VRAP)), die kleinen Rho-GTPasen cell division control protein 42 homolog (CDC42), Rho und Rac1, sowie die p38 MAP-Kinase (MAPK), die focal-adhesion kinase (FAK) und das Ras GTPase-activating-like protein (IQGAP1). TSA interagiert mit dem Tyrosin-951 des VEGFR2. TSA-KO-Mäuse zeigen eine reduzierte endotheliale Zellmigration und weniger Vaskularisation und Tumorwachstum. TSA interagiert mit Src und scheint dessen Aktivität und damit auch die Permeabilität von Endothelzellen zu kontrollieren (Matsumoto et al., 2005). Phosphorylierung an Tyrosin 1212/14 über CDC42- und p38 MAPK-Aktivierung ist für die zytoskelettale Aktindynamik in Endothelzellen wichtig. Eine zentrale Rolle wird nachgeschaltet in dieser Kaskade dem heat-shock-protein 27 (HSP27) zugeschrieben (Issbrucker, 2002; Lamalice, Houle, Jourdan, & Huot, 2004; Matsumoto, Turesson, Book, Gerwins, & Claesson-Welsh, 2002; McMullen, Bryant, Glembotski, Vincent, & Pumiglia, 2005; Rousseau, Houle, Landry, & Huot, 1997). FAK und seine Substrate paxillin und vinculin sind wichtige fokale Zelladhäsionsproteine, deren Umsatz und Phosphorylierungsstatus ebenfalls durch VEGFR2-Aktivierung beeinflusst werden kann (Abedi & Zachary, 1997; Le Boeuf, Houle, & Huot, 2004). Das GTP-Austauschprotein (IQGAP) co-lokalisiert mit dem VEGFR2 an der Migrationsfront in

isolierten Endothelzellen und beeinflusst über die Rac1 Kaskade das Migrationsverhalten von diesen (Hart, Callow, Souza, & Polakis, 1996; Yamaoka-Tojo et al., 2004). Zudem ist IQGAP auch in die Aktivierung von ERK und PI3K involviert (Meyer, Sacks, & Rahimi, 2008). Zwei weitere interessante Zielproteine der VEGFR-Aktivierung sind die Gerüstproteine Grb2-associated binder 1 und 2 (Gab1 und Gab2), die ebenfalls zur ERK- und PI3K-Aktivierung führen und die Adapterproteine FYN tyrosine kinase (Fyk) und non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 (Nck), die in die Regulation des Aktin-Zytoskeletts und der Zell-Zellkontakte über Aktivierung von p21-activated kinase 2 (PAK2) und p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) eingreifen (Caron et al., 2009; Stoletov, Ratcliffe, Spring, & Terman, 2001). Zuletzt gilt es noch die nonreceptor tyrosine kinase focal adhesion kinase (FAK) zu nennen, die ein wichtiger Regulator der Endothelzellform und -migration, der Integrität von Zelladhäsionskontakten und Endothelzellproliferation ist (Lechertier & Hodivala-Dilke, 2012). Insbesondere die wechselseitige Interaktion von FAK mit Integrinen ist hier zudem noch erwähnenswert (Masson-Gadais, Houle, Laferrière, & Huot, 2003).

Die Regulation der VEGF-Expression wird vor allem über den Sauerstoffpartialdruck im Blut und durch den hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) geregelt (Dor, Porat, & Keshet, 2001). Des Weiteren spielen Wachstumshormone und Zytokine eine entscheidende Rolle, die vor allem unter pathophysiologischen Bedingungen im tumorösen Gewebe zum Tragen kommen. HIF1 $\alpha$  ist unter physiologischen Bedingungen ein konstant gebildeter und durch Ubiquitinierung rasch proteasomal-abgebauter Transkriptionsfaktor. Unter hypoxischen Bedingungen wird der durch Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung vermittelte Abbau von HIF1 $\alpha$  verhindert, indem das von Hippel-Lindau tumor suppressor protein (VHL) nicht mehr an HIF1 $\alpha$  binden kann (Semenza, 2002).

Eine wichtige modulatorische Funktion der VEGF-Rezeptoren und des VEGF-Signalweges besteht in der Interaktion, vor allem des VEGFR2, mit Co-Rezeptoren. Neben den bereits angesprochen HSPG und Neuropilinen, die die Lokalisation, Stabilisierung der membranären Expressionsdauer und Sensitivität der VEGFR beeinflussen können, können VEGFR mit platelet-endothelial-cell adhesion molecule-1 (PECAM1), vascular endothelial (VE)-cadherin und Integrinen (v.a.  $\alpha\beta$ 3 Integrin) mechanosensitive Signalkomplexe („Mechanosome“) bilden, die den durch die

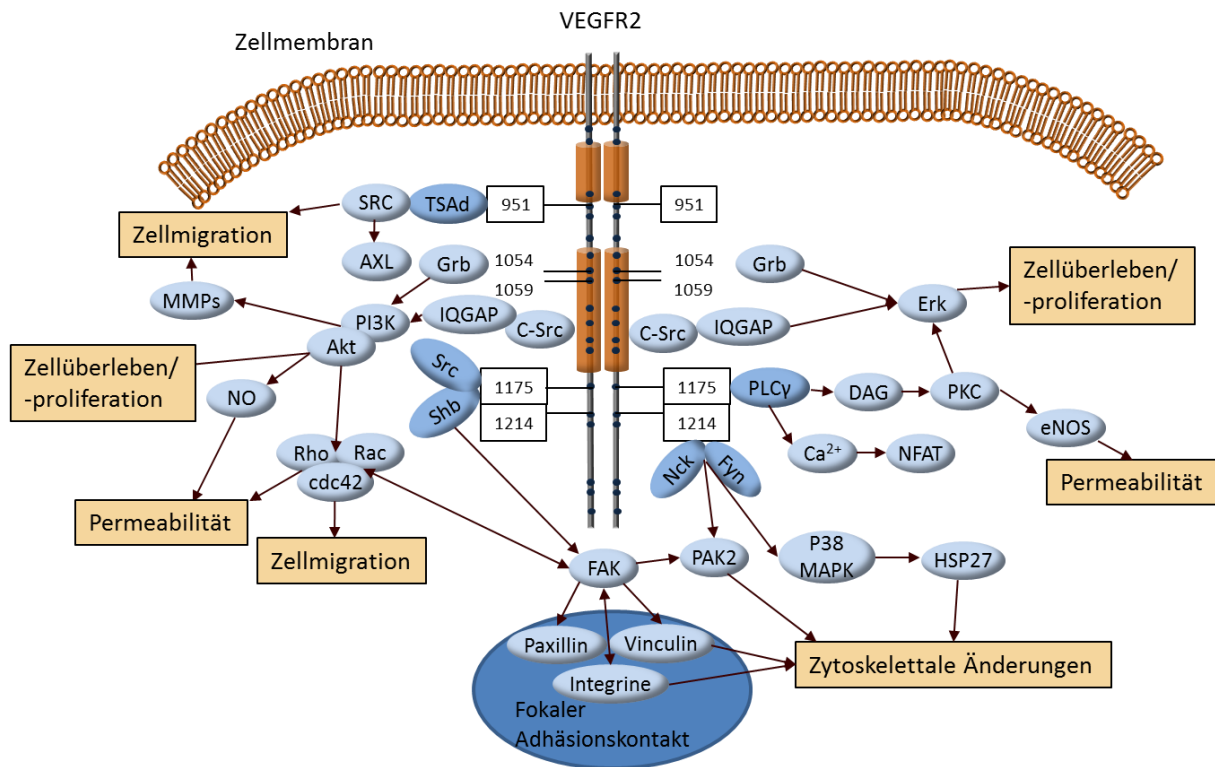
Blutströmung verursachten Shear-Stress detektieren und die VEGFR-Funktion daran adaptieren können (Tzima et al., 2005). Der VEGFR kann über zahlreiche zytoskelettale Modulationsvorgänge den Integrinbesatz der Zellmembran beeinflussen, während Integriene wiederum Einfluss auf die VEGFR Expression haben. In diesem Sinne besteht eine wechselseitige Beziehung und Beeinflussung zwischen dem Angiopoetin- und Integrin-vermittelten Signalwegen (Reynolds et al., 2004; Serini, Valdembri, & Bussolino, 2006).



**Abb. 1.4: VEGF Rezeptoren und ihre Bindungsaffinität:**

Homo- und Heterodimerkombinationen der autophosphorylierenden VEGF Rezeptortyrosinkinasen mit ihren Hauptsubstraten. Zentral ist dabei die Funktion des VEGFR2-Homodimers (modifiziert nach Olsson 2006).





**Abb. 1.5: VEGFR2 Phosphorylierungsseiten und Signaltransduktion:**

Der homodimerisierte VEGFR2 hat zahlreiche Phosphorylierungsseiten (dunkelblau), von denen nur wenige zur direkten Interaktion (umrahmte Phosphorylierungsstellen) mit Adapterproteinen (dunkelblaue Ellipsen) führen, welche wiederum Signalkaskaden einleiten. Die zentralen führen über den PI3K-Weg zur Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen und MMP-Ausschüttung und über PLC $\gamma$ -Aktivierung zur PKC-Stimulation und zur Kalzium-Freisetzung (modifiziert nach Olsson 2006). Weitere wichtige Kaskaden sind die Aktivierung von TSAd, IQGAP, Grb und FAK, welche die Funktionen der VEGFR2-Stimulation (ockergelb hinterlegte Kästchen) modifizieren und feinabstimmen (modifiziert nach Olsson 2006).

## 1.3 Podosomen und Gefäße

### 1.3.1 Entdeckung der Podosomen und Nomenklatur

T. David-Pfeuty und S.J. Singer zeigten in einer Publikation von 1980 zum ersten Mal dass eine Transformation von embryonalen Fibroblasten des Hühnchens mit dem Rous Sarcoma Virus (RSV), welches das Onkogen v-src enthielt, zur Relokalisierung zytoskeletaler fokaler Adhäsionsproteine führen kann (Vinculin, alpha-Aktin), welche dann zirkuläre Cluster formen können. Diese bezeichneten die beiden Forscher als Rosetten (David-Pfeuty & Singer, 1980). Tarone und Marchisio prägten 1985 zum ersten Mal den Begriff Podosom, als eine Anreicherung zytoskeletaler Proteine in namensgebenden „füßchenartigen“ Protrusionen von Fibroblasten (Tarone, Cirillo,

Giancotti, Comoglio, & Marchisio, 1985). Um den invasiven, die Extrazellulärmatrix verdauenden Charakter dieser Zellausstülpungen zu betonen, prägte Chen später den Begriff Invadopodien (Chen, 1989), der zur Verwirrung in der Nomenklatur führte. In den nun fast 40 Jahren nach der Erstbeschreibung von Podosomen hat sich Literatur zu diesem Thema vor allem im letzten Jahrzehnt rasch vervielfältigt. Podosomen bezeichnen dabei nun aktinreiche Protrusionen der Plasmamembran in „normalen“ Zellen, während man in Krebszellen bei diesen verwandten Strukturen von Invadopodien spricht (D. a Murphy & Courtneidge, 2011).

### 1.3.2 Aufbau und Funktion der Podosomen

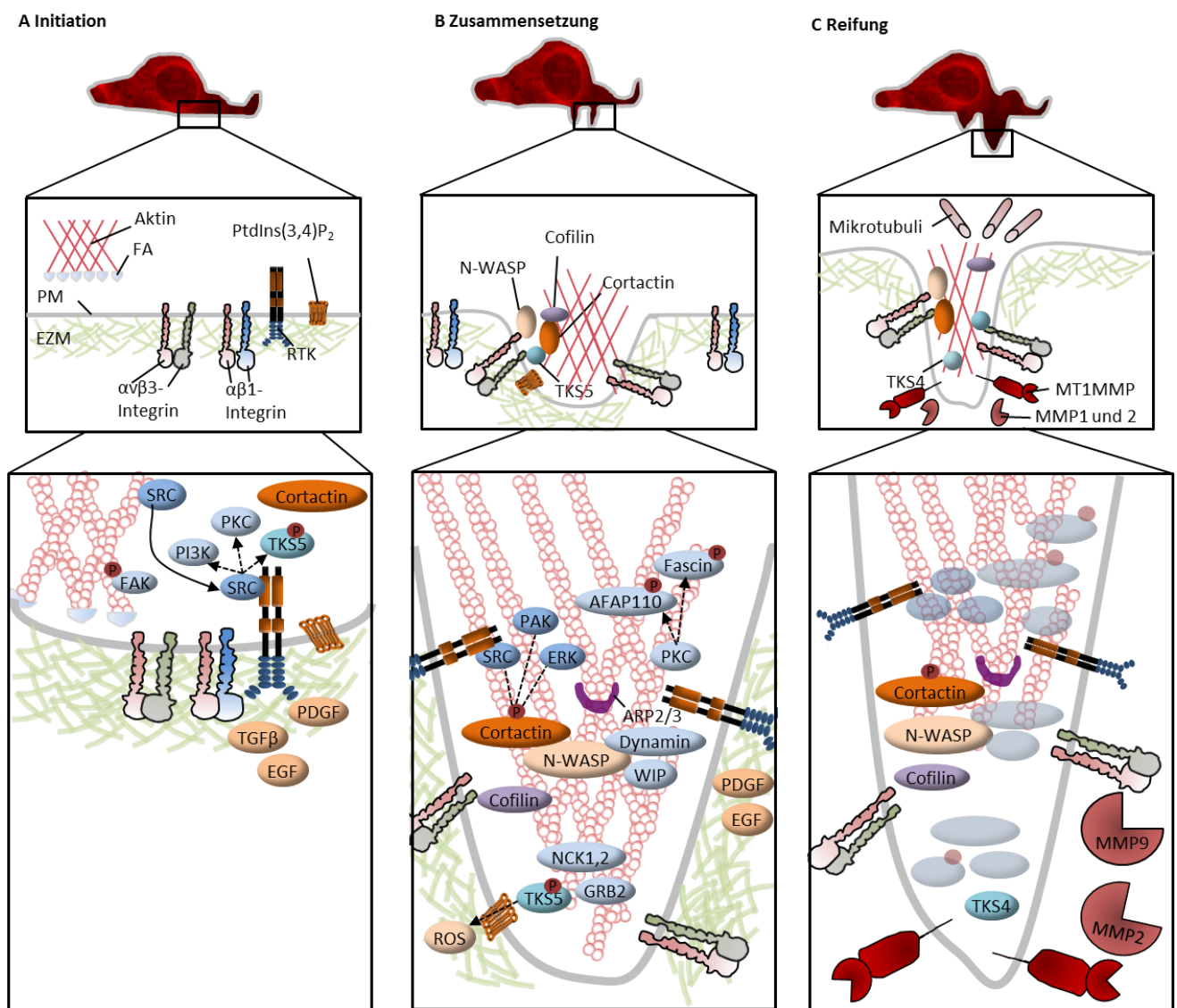
Podosomen sind durch bestimmte molekulare und morphologische Eigenschaften geprägt, die sie von anderen aktinreichen zytoskeletalen Adhäsionsstrukturen, wie fokalen Adhäsionskontakten, Lamellipodien und Filopodien unterscheiden (D. a Murphy & Courtneidge, 2011). Podosomen werden dabei als aktinreiche Kernstrukturen mit umgebenden Ring aus aktin-assoziierten Proteinen an der ventralen Oberflächenseite, oft in Gruppen angehäuft, nahe der Migrationsfront (*leading edge*) der Zelle definiert. Ihr Durchmesser liegt bei 0.5-2µm. Eine Vielzahl von Aktin-Nukleations-, Polymerisierungs-, Aktin-bindenden und Aktin-Verbindungsproteinen im Zusammenspiel mit verschiedenen Kinasen, kleinen GTPasen und weiteren Gerüstproteinen bilden die dynamische Maschinerie der Podosomen. Neben den unvernetzten, wie auch vernetzten Aktinpolymeren sind die Matrix-Metalloproteinasen (v.a. MT-MMP1, MMP2 und MMP9), der Polymerisierungsaktivator Cortactin, die Adhäsionsmoleküle Vinculin und Talin, Integrine, als auch die Tyrosinkinase Src, *testis-specific serine/threonine-protein kinase* (TSK4 und TSK5) zentrale Bestandteile von Podosomen (Gimona, Buccione, Courtneidge, & Linder, 2008). Podosomen helfen die Degradation der Extrazellulärmatrix mit der Zellmotilität abzustimmen. Ihr quantitativer Einbau in die Membran ist damit Ausdruck der Migrationsbereitschaft einer Zelle und kann sowohl unter physiologischen (Embryonalentwicklung (Cejudo-Martin & Courtneidge, 2011), Resorptionseigenschaften der Osteoklasten (Zambonin-Zallone, Teti, Carano, & Marchisio, 1988), Lymphozytenextravasation (Carman et al., 2007), Gefäßremodeling (Schachtner, Calaminus, Thomas, & Machesky, 2013)) als auch unter pathophysiologischen Bedingungen auftreten (Metastasierung von Tumorzellen

(Monsky et al., 1994)). In dieser Hinsicht wird Invadopodien ein stärkeres Potenzial zum Abbau der Matrix zugesprochen als Podosomen (Ayala, Baldassarre, Caldieri, & Buccione, 2006), denen zudem auch eine Rolle als physikochemischer Mechanosensor zur Orientierungshilfe einer Zelle als Matrixabbau-unabhängigen Prozess angerechnet wird (Albiges-Rizo, Destaing, Fourcade, Planus, & Block, 2009; Linder & Wiesner, 2016).

### 1.3.3 Regulation und Aktivierung der Podosomen

Die Neubildung von Podosomen ist eng mit dem Abbau und der Regulation von fokalen Adhäsionskontakten verknüpft, mit denen die Podosomen folglich viele Bausteine teilen (Block et al., 2008). Wichtiger Initiator der Podosomen-/Invadopodienbildung scheint die gegenläufige Phosphorylierung von FAK und SRC zu sein, die die Transformation jeweils eher zum Podosom oder zum fokalen Adhäsionskontakt unterstützen (Chan, Cortesio, & Huttenlocher, 2009). Eine wichtige Stufe bei der Formierung von Podosomen ist weiterhin die fokale Anreicherung von Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>), welche TKS5 rekrutieren können, das als Gerüst für die Cortactinanreicherung in Podosomenvorläufern dient (Artym, Zhang, Seillier-Moiseiwitsch, Yamada, & Mueller, 2006; Oikawa, Itoh, & Takenawa, 2008; Oser et al., 2009). Ausgehend von diesen Proteinen rekrutiert und umfasst die Assemblierung von Podosomen eine breite Maschinerie an aktinbindenden und -regulierenden Proteinen. TSK5 interagiert direkt oder indirekt mit *non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 and 2* (NCK1 und NCK2), neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) und GRB2, während Cortactin mit N-WASP und *actin related protein 2/3 homolog* (ARP2/3) assoziiert, die dann wiederum mit der kleinen GTPase CDC42, WASP-interacting protein (WIP) und Dynamin Komplexe bilden können (Gimona et al., 2008; Yamaguchi et al., 2005). In der Regulierung der Cortactin Aktivität sind vor allem die Kinasen SRC, p21-activated kinase (PAK) und Kinasen aus extracellular signal-regulated kinase (ERK) Familie beteiligt (D. A. Murphy & Courtneidge, 2011). Eine gut beschriebene Interaktion für die Podosomenbildung und -aufrechterhaltung besteht beispielsweise in der Regulation der Aktin-stabilisierenden Aktivität von Cofilin durch Dissoziation oder Assoziation mit Cortactin, je nach dessen Phosphorylierungszustand (Oser et al., 2009). Für die Matrix-auflösende Funktion der Podosomen ist die durch die koordinierte

Zusammensetzung der Podosomen erreichte gezielte Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen der ausschlaggebende Schritt, welcher auch als Reifung von Podosomen bezeichnet wird (D. A. Murphy and Courtneidge 2011, siehe auch Abb 1.6). Dabei spielt der zwischen Aktin-Zytoskelett und Mikrotubuli genau abgestimmte Transport von Proteasen - insbesondere der MT1-MMP, als zentrale Matrix-Metalloprotease-, zu den Podosomenspitzen in ausbalancierten Gleichgewicht zwischen Endo- und Exozytose zur lokalen Anreicherung der Proteasen, eine tragende Rolle.



**Abb. 1.6: Aufbau und Lebenszyklus der Podosomen:**

Die drei wesentlichen Entwicklungsschritte der Initiation, Zusammensetzung und Reifung eines Podosoms sind in dieser Abbildung jeweils in drei Vergrößerungsschritten von einem Überblick des Podosoms in Relation zur Endothelzelle hin zu den molekularen Grundlagen

dargestellt: **A** Wie im Text beschrieben wird die Initiation des Podosomes über extrazelluläre Stimulation mit Wachstumshormonen eingeleitet und in Abstimmung der Proteine SRC und FAK mit der Bildung anderer fokaler Adhäsionskontakte kommuniziert. **B** Eine aktinreiche Ausstülpung dient vielen aktin-assoziierten Proteinen als Anker um die Zusammensetzung des Podosomes einzuleiten. Wesentliche Bestandteile sind Signalkaskaden die die Proteine Cortactin, TSK5, N-WASP und Cofilin umfassen. **C** Die Assoziation der aktinreichen Podosomenvorwölbung mit Mikrotubuli dirigiert MMPs zu diesen und führt zur lokalen Ausschüttung und Anreicherung derselbigen um die proteolytische Funktion der Podosomen zu erfüllen. Dieser Schritt wird als Podosomenreifung bezeichnet. (modifiziert nach D. A. Murphy and Courtneidge 2011).

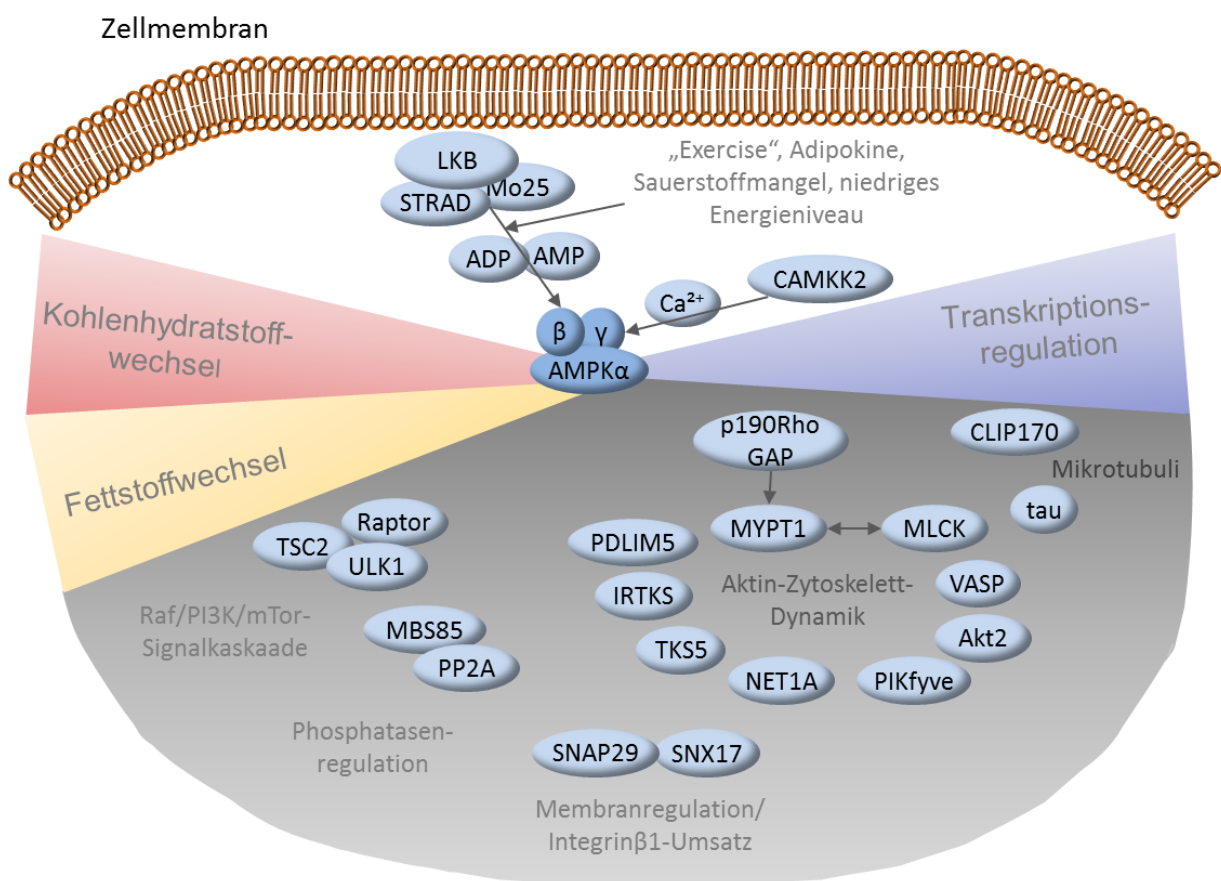
### 1.3.4 Rolle der Podosomen in Gefäßen

Wie bereits erwähnt, gehören Podosomen zu den actinreichen Strukturen, die beim Umsatz des extrazellulären Gewebes eine zentrale Rolle spielen (Linder, 2007). Sie wurden als erstes an Zellen der myeloiden Reihe beschrieben, wurden zudem aber auch an Endothel- als auch an glatten Muskelzellen nachgewiesen (Kaverina, Stradal, & Gimona, 2003; Moreau, Tatin, Varon, & Génot, 2003). Die Expression von vaskulären Podosomen scheint dabei vor allem durch angiogene Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert zu werden. In diesem Sinne scheinen Podosomen ein wichtiges Stellglied bei der Regulation der extrazellulären Gefäßmatrix zu spielen und so physiologische und pathophysiologische Zellmigration auch in Gefäßen zu kontrollieren. Denn auch im vaskulären System ist die Kontrolle der Matrixdegradation durch das Zusammenspiel von Endothel- und glatten Muskelzellen, deren Migration und Zellinvasion ein zentraler Prozess für das Remodeling von Gefäßen ist, ein genauestens abgestimmter Vorgang (Van Hinsbergh, Engelse, & Quax, 2006). Beispielsweise können an der Angiogenese beteiligte Endothelzellen Podosomen bilden, die die Basallamina vor allem an vaskulären Verzweigungspunkten (*branching points*) abbauen können (Seano & Primo, 2015; Seano et al., 2014). Vor allem in Endothelzellen organisieren sich Podosomen in zirkulären Strukturen, sogenannten Podosomenrosetten, mit einem Durchmesser von 3-4µm, die sich an der Basalseite von Endothelzellen bilden und durch VEGF und TGFβ induziert werden können (Rottiers et al., 2009).

## 1.4 AMPK, Zytoskelett und Podosomen

Die ubiquitär exprimierte heterotrimere AMPK ist ein Schlüsselenzym des zellulären Metabolismus, welches zunehmend aber auch in nicht-klassisch mit metabolischen

Signalkaskaden assoziierten Prozessen (Migration, Zellpolarität, Embryonalentwicklung) Erwähnung und Bedeutung findet (Bettencourt-Dias et al., 2004; Giet et al., n.d.; Vazquez-Martin, Oliveras-Ferraro, & Menendez, 2009; Zheng & Cantley, 2007). In Hochdurchsatzverfahren wurde die AMPK dabei als ein zentraler Faktor beim Umsatz des Zytoskelettes und der Membranintegrität detektiert und beschrieben (Marin et al., 2015; Moon et al., 2014; Ross et al., 2015; Schaffer et al., 2015). Einige Publikationen zeigen zudem, dass die AMPK auch wichtig für die Endothelzellmigration und die Integrität der IEL ist (Miranda et al., 2010; S. Wang et al., 2012). Die Funktion von Kinasen in der Regulation des Lebenszyklus der Invado-Podosomen ist noch unzureichend beleuchtet und verstanden (Foxall, Pipili, Jones, & Wells, 2016). Obwohl die zwiespältige Rolle der AMPK als Energiesensor der Zelle im Rahmen der Tumorentstehung und Aufrechterhaltung mannigfaltig beschrieben ist, ist ihr Einfluss auf die Regulierung von Invado-Podosom noch weitestgehend unbekannt (Liang & Mills, 2013; Scott et al., 2012).



**Abb. 1.7: Signalkaskade der AMPK mit Schwerpunkt auf Zellmigration und zytoskelettale Regulierungsvorgänge:**

Die AMPK wird durch verschiedenste physiologische als auch pharmakologische (nicht dargestellt) Stimuli aktiviert, welche die AMPK direkt stimulieren oder die AMP/ADP-Konzentration in der Zelle erhöhen. Der LKB- und CAMKK2-Komplex sind hierbei die wichtigsten übergeordneten Kinasen. Die aktivierte AMPK phosphoryliert zahlreiche Proteine mit Funktionen im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel und übt längerfristige Effekte über die Regulation zahlreicher Transkriptionsfaktoren aus. Detailliert sind hier die bereits identifizierte direkte Zielproteine der AMPK dargestellt, die eine Rolle bei der Zellmigration und Regulation der Zytoskeletts spielen und somit einen Einfluss auf die Podosomendynamik haben oder potenziell haben können (Zusammengestellt aus folgenden Publikationen: Kim et al., 2009; Liu et al., 2013; Mihaylova & Shaw, 2011; Nakano et al., 2010; Ross et al., 2015; Schaffer et al., 2015; Thomson, Ascione, Grange, Nelson, & Hansen, 2011; Thornton, Bright, Sastre, Muckett, & Carling, 2011; S. Wang, Liang, Viollet, & Zou, 2011; Yan et al., 2015)

## **1.5 Fragestellungen der Doktorarbeit**

Die meisten Gefäße haben eine IEL, deren Funktion, Aufbau und dynamischer Umbau aber noch im Dunklen liegen. Änderungen der Fluid- und Hämodynamik in Gefäßen können diese durch Freisetzung von Proteasen verändern. Man weiß, dass die das Gefäß auskleidenden Endothelzellen, Proteasen freisetzen können (Hennig, Mogensen, Kirsch, Pohl, & Gloe, 2011; Platt & Shockey, 2016). Dabei scheinen Podosomen eine wichtige Rolle zu spielen. Über den Einfluss von Endothelzellen auf den Protease-abhängigen Umbau der Basallamina und der IEL-Matrix ist allerdings noch wenig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die IEL in kleinen arteriellen Gefäßen bezüglich ihrer Morphologie zu untersuchen. Des Weiteren wurde die Hypothese untersucht, dass die IEL dynamisch verändert wird. In diesem Kontext wurde geprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der Podosomendichte von Endothelzellen und der IEL Struktur – vor allem im Hinblick auf die Fenestrierungen gibt. Dieser Untersuchung lag die Hypothese zugrunde, dass eine lokale Ausschüttung von Proteasen aus Podosomen zu einem Umbau der typischen IEL-Struktur in kleinen Gefäßen führen könnte. Da die Protease-Ausschüttung in Endothelzellen eng mit der dynamischen Bildung und Regulation von Podosomen verknüpft ist, wurde dabei auch gezielt untersucht, inwiefern die Podosomenfunktion in Endothelzellen durch physikochemische Stimuli verändert und beeinflusst werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Lösungen und Chemikalien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Aqua dest (ad injectabilia)	Braun
Bovines Serumalbumin BSA	Boehringer
Bromophenol blau	Sigma-Aldrich
CaCl <sub>2</sub>	AppliChem
Chemilumineszenz Kit für HRP (horse radish peroxidase)	AppliChem
DMSO (wasserfrei)	AppliChem
EDTA	AppliChem
endothelial cell growth medium	Promocell
Ethanol	Merck
Glutamax	Sigma-Aldrich
Kälberserum (fetales)	Biochrom
KCl	AppliChem
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	AppliChem
Leibovitz L-15	Sigma-Aldrich
Leupeptin	AppliChem
Methanol	AppliChem
MgSO <sub>4</sub>	AppliChem
MOPS	AppliChem
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Alexis Corporation
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	AppliChem
NaCl	AppliChem
NaF	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	AppliChem
NaOH	Merck
NaPyruvat:	Sigma-Aldrich
Penicillin	Sigma-Aldrich



Poly-L-lysin	Biochrom
Sodium dodecylsulfat SDS	AppliChem
Streptomycin	Sigma-Aldrich
TRIS	AppliChem
Amphotericin B	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich
Oregon Green 488 Gelatine oder DQ Gelatine	Life Technologies

### 2.1.2 Chemikalien und Medikamente

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
GM6001	Calbiochem
SB203580	Calbiochem
U0126	Calbiochem
SP600125	Calbiochem
SU6656	Santa Cruz Biotechnology
GÖ6983	Santa Cruz Biotechnology
SU5416	Sigma-Aldrich
recombinant human TGF $\beta$	R&D Systems
VEGF (165)	PeptoTech
phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich
PT-1	Tocris

### 2.1.3 Antikörper

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
MMP 14 (MT1-MMP)	Abcam
MMP 2	Abcam
MMP 9	Abcam
Cortactin	Merck Millipore
Kollagen IV	Abcam
	Invitrogen

Sekundärantikörper anti-Mouse oder anti-Rabbit (488 und 543)

#### **2.1.4 Färbung**

#### **2.1.5 Leibovitz 15-Medium**

Das Medium wurde als Pulver geliefert, in bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. An den Versuchstagen wurde diesem Stammmedium 15% hitzeinaktiviertes (50min bei 56-58°C) Kälberserum, 20000 U/l Penicillin, 20 mg/l Streptomycin und 0,4 µM/l Glutamax zugesetzt, der pH-Wert durch Zugabe von HCl auf 7,4 eingestellt und das auf diese Weise hergestellte Kulturmedium erneut sterilfiltriert.

### **2.2 Kultur, Behandlung und Färbung der HUVECs**

#### **2.2.1 Zellkultur**

HUVECs wurden von Nabelschnüren, wie im folgenden Paper beschrieben, isoliert und kultiviert (Gloe, Sohn, Meininger, & Pohl, 2002) . Nabelschnüre wurden im Einklang mit den Erklärungen von Helsinki anonymisierten Spendern entnommen, die eine Kaiserschnittentbindung in der gynäkologischen Klinik des Uniklinikums der LMU hatten. Die Erlaubnis dafür liegt vom Ethikrat der Universität unter folgender Referenznummer vor: ref. no. 07014. Isolierte Zellen wurden 1:1 in einem Medium bestehend aus Medium 199 versetzt mit 20% FCS (FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland), Amphotericin B, Penicillin, Streptomycin (Sigma-Aldrich) und einem endothelial cell growth medium (Promocell, Heidelberg, Deutschland), welches endothelial cell growth supplement (Promocell) beinhaltet, kultiviert. Mit Hilfe von Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich) wurden die HUVECs gesplittet und subkultiviert. Die 1-3 Zellpassage der kultivierten HUVECs wurde genutzt, zu 90% Konfluenz (240 Zellen/mm<sup>2</sup>) ausgesät, abgewartet und dann für die Experimente genutzt.

#### **2.2.2 Beschichtung mit Gelatine**

Die Gelatine Beschichtung wurde in Anlehnung an ein Protokoll von Artym et al. (Artym, Yamada, & Mueller, 2009) durchgeführt. Zur Beschichtung wurde zunächst die Wachstumsfläche bei Raumtemperatur für 20 Minuten mit Poly-L-lysin (50 µg/ml, Biochrom) und für 20 Minuten mit Glutaraldehyd (0.5%, Sigma-Aldrich) inkubiert. Daraufhin wurde die Fläche für 10 Minuten mit einer 1:20 Mischung aus 0.2% Gelatine und Oregon Green 488 Gelatine oder DQ Gelatine (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) fortbehandelt. Die Beschichtung wurde zwischen jeden Schritt dreimal mit PBS+-Lösung gründlich gespült. Die fertigen Präparationen wurden nun mit 10% FCS beinhaltenes Medium versetzt und unmittelbar für folgende Versuche hergenommen oder im Kühlschrank für bis zu 6 Tagen aufbewahrt.

### **2.2.3 Schubspannungs -Experimente an HUVECs**

Endothelzellen wurden in Flusskammern ausgesät ( $\mu$ -slides I 0.4 Luer oder I 0.8 Luer, Ibidi, Planegg/Martinsried, Deutschland), die zuvor mit Gelatine beschichtet wurden. Den Zellen wurde für drei Stunden Zeit gegeben zu adhären, ehe die Flusskammer mit einer Ibidi-Pumpe konnektiert wurde. Die Endothelzellen wurden dann über 48h verschiedener konstanter Schubspannung ausgeliefert. Eine Kontrollgruppe wurde in vorbeschichteten 8-well Ibidi-slides ausgesät. An den Ibidi-Flusskammern konnte sowohl eine Mikroskopie als auch PCR-Untersuchungen durchgeführt werden, während eine cone-and-plate system für Western-Blot Analysen hergenommen wurde, da hier der Zellumsatz und damit die Proteinausbeute höher war. Dazu wurden Endothelzellen in einer Standard-10cm-Petrischale ausgesät, an dem ein System angeschlossen wurde, dass eine kontinuierliche Schubspannung von 10 dyn/cm<sup>2</sup> generieren konnte indem die Rotationsgeschwindigkeit des Konus dieses Systems auf 250/min gesetzt wurde.



**Abb. 2.1: Ibidi-Flusskammer Aufbau**

$\mu$ -Ibidi-Flusskammern konnektiert mit Rollerpumpen zur konstanten Applikation von Shear-Stress an den HUVECs.

#### **2.2.4 Immunofluoreszenzfärbung der HUVECs**

Für die Konfokalmikroskopie wurden die Zellen zunächst mit 3,7 % Formaldehyd für 10 Minuten fixiert und anschließend mit 0.3% Triton X-100 permeabilisiert. Für die darauffolgende Färbung wurden die Zellen mit 1% bovinen Serumalbumin (BSA) gewaschen, um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Den Zellen wurde dann der primäre Antikörper hinzugefügt und die Inkubation bei 4°C über Nacht durchgeführt. Am darauffolgenden Tag folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper im Dunkeln für 30 Minuten.

Gefärbt wurde jeweils mit Antikörpern gegen MMP2 (ab86607), MMP9 (ab38898) und MT1-MMP (ab38971, Cambridge, UK), Cortactin (Millipore; Darmstadt, Deutschland). Sekundärantikörper waren entweder Alexa 488, Alexa 546-gelabelte anti-Maus oder anti-Kaninchen IgG-Antikörper von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland). Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate von Sigma-Aldrich.

Die Zellen als auch die fluoreszierende Gelatinematrix wurden mit einem Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) dargestellt.

Als Podosomenrosetten wurde alle ringförmigen Strukturen mit einem Radius zwischen 3-15µm gezählt, die co-lokalisierend doppelt-positiv für Cortactin und F-Aktin gefärbt waren. Die Quantifizierung des Gelatinematrix-Verdaus wurde aus Bildern mit hoher Auflösung (4096x4096 pixel, 16 bit resolution, pixel size 0.38x0.38 µm) ermittelt. Fünf zufällig ausgewählte Bilder wurden für jedes Experiment per Gruppe zur Auswertung der Podosomenabdruck (*Imprints*) herangezogen. Auch hier wurden nur Abdrücke gezählt, die durch eine kreisrunde 3-15µm Radius umfassende Erscheinung charakterisiert wurden. Für die morphologische Auswertung wurde das Softwareprogramm ImageJ genutzt. Während die Gelatineabdrücke, den Gesamtverdaus der ausgesäten Zellen über die Zeit darstellen, dient die Immunofluoreszenzfärbung der Zellen des Nachweises und der Analyse von Podosomen zum Zeitpunkt der Fixation.

### **2.2.5 RNA Extraktion und quantitative real-time PCR**

Die gesamte RNA von kultivierten HUVECs wurde mit einem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert und cDNA mit einem 1st Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR (Roche, Mannheim, Deutschland) synthetisiert. Folgende Primer wurden für die RNA-Analyse genutzt:

#### VEGF:

TCTACCTCCACCATGCCAAG,

ACCAGGGTCTCGATTGGATG;

#### VEGFR1:

TCCCAATCAATGCCATACTGACAGG,

GCCCCGACTCCTTACTTTTACTGGTTAC;

#### VEGFR2:

CCTGTATGGAGGAGGAGGAAGTATGTGAC,

GGTAGCCGCTTGTCTGGTTTGAGC;

GAPDH:

GAAGGTGAAGGTCGGAGT;

GAAGATGGTGATGGGATTTC.

Die Quantitative real-time PCR wurde mit einem Light Cycler 1.5 und einem SYBR Green I Kit von Roche durchgeführt. Pro Probe wurden zwei unabhängige Reaktionsansätze mit folgendem Protokoll durchgeführt: initiale Denaturierung bei 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen in kontinuierlicher Abfolge von Denaturierung (95°C, 10 s), Annealing (VEGF/GAPDH 60°C; VEGFR1/VEGFR2 62°C, 5 s) und Verlängerung (72°C, 15 s). Die Ergebnisse wurden gegen einen internen GAPDH Standard normalisiert.

### **2.2.6 Western Blot an HUVEC Proben**

Zellysepufferzusammensetzung: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8.0), 10% Glycerol and 0.1% sodium deoxycholate. Die Protease- und Phosphatase Inhibitors Aprotinin (10 µg/ml), Leupeptin (10 µg/ml), Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM), Natriumfluorid (0.5 mM) and Natriumorthovanadat (0.5 mM) wurden frisch zubereitet vor jedem Experiment dem Lysepuffer zugegeben. Der Proteingehalt wurde mit einem bicinchoninic acid assay (Perbio) festgestellt. Gleich Proteinmengen wurden SDS- PAGE separiert und nach Standardtechniken auf eine Nitrozellulosemembran übertrage. Die Membranen wurde über Nacht mit einem Antikörper gegen anti-VEGF antibody (ab46154) oder GAPDH (MAB374, Chemicon) bei 4 ° C inkubiert. Die folgende Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde für 1.5 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Proteinbanden wurden mit horseradish peroxide chemiluminescence detection kit detektiert und mit ImageJ quantitativ analysiert.

## **2.2.7 Migrationsassay**

In 8-well slides (Ibidi) ausgebrachte HUVECs wurden mit einem invertierten mit einem Live Cell Imaging System ausgestatteten Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) auf ihr Migrationsverhalten untersucht. Alle 5 Minuten wurden mit einer Axiom Kamera (Zeiss) angefertigt. Die Analyse von HUVECs unter Shear-Stress wurde mit einem VisiScope Cell Explorer (Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) basierend auf einer Zeiss Axiovert 200 und Spot TR-SE6 CCD Kamera mit einem Sony ICX285 Chip, kontrolliert von einer Metamorph Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) durchgeführt. Auch hier wurden alle 5 Minuten ein Bild angefertigt. So wurden 40 Zellen pro Gruppe und Experiment über 24h mit einem ImageJ manual tracking plugin verfolgt und analysiert. Die Migrationswege wurden mit einem ImageJ Chemotaxis and Migration Tool (Ibidi) aufgezeichnet und daraus die Migrationsgeschwindigkeiten errechnet.

## **2.3 Präparation, Kanülierung, Transfektion, Kultivierung, Färbung und Bildgebung der Widerstandsgefäße**

### **2.3.1 Tiere**

Für die Experimente wurden männliche Bl6/J- Mäuse herangezogen, um den zyklischen Hormonschwankungen weiblicher Mäuse und deren Effekt auf die Gefäße zu vermeiden. Die Tiere waren rund 20-25g schwer und ihr Alter lag zwischen 2-6 Monaten. LifeAct-Mäuse wurden freundlicherweise von Reinhard Fässler zur Verfügung gestellt. Bei den AMPK $\alpha$ 1-KO-Tieren handelt es sich um Tiere aus folgender Linie: Prkaa1<sup>tm1Sbj</sup> (Jorgensen et al., 2004).

### **2.3.2 Gefäßpräparation**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation mit anschließender Abtrennung des Kopfes zur vollständigen Anästhesie getötet. Das Abdomen wurde mit Bacillol desinfiziert und die Maus auf einem Styroporbrett mit kleinen Kanülen (Sterican® Standardkanüle Gr. 20 G27 x 3/4 Zoll 0,40 x 20 mm grau) an den Extremitäten befestigt. Für die Versuche wurden vor allem Gefäße aus den Mesenterialbett und aus den Abgängen der Muskelgefäße der Arteria femoralis verwendet. Das Präparationsbesteck wurde zuvor bei 120Grad im Vakuumsterilisator für 2h sterilisiert. Mit einer großen Schere wurde die Bauchhaut über der Blase nun eröffnet und der Schnitt C-förmig bis unter den Rippenbogen erweitert. Die Bauchhaut als auch das darunter liegende Peritoneum wurden dann an der rechten Mausflanke festgepinnt, die Ductus deferentes aufgesucht und zurückgeklappt, so dass das Rektum hinter der Blase dargestellt und durchtrennt werden konnte. Nun wurde schrittweise mit einer groben Pinzette das Mesenterium zur Seite gezogen und entlang des Darmes mit einer Schere abgetrennt. Dies wurde bis zur großen Magenkurvatur und den Angang der Arteria mesentrica superior fortgeführt. Während dieser Präparation wurde das Mesenterium kontinuierlich mit kalter MOPS-Lösung superfundiert. Nach Abtrennung des Mesenteriums von der aortennahe Arteria mesenterica superior wurde das Mesenterium in eine schwarz-lackierte silikonbeschichtete Petrischale überführt. Hier wurde das Mesenterium nun mit Kanülenspitzen (grau) zum einen an der Arteria mesentrica superior als auch an den Mesenterialbögen festgepinnt. Die Fett- und Bindegewebe wurden nun vorsichtig und sorgfältig abpräpariert und die zusammen verlaufenden Arterien und Venen des Mesenterialbaumes dargestellt. Die Venen konnten durch ihren elastisch-kurvigen Verlauf, ihren im Durchschnitt größeren Durchmesser, ihrer dünneren durchschimmernden Gefäßwand, als auch durch das dunkelrote sauerstoffgesättigte Blut nachgewiesen werden und wurden durchschnitten und von den Arterien abgetrennt. Dabei wurde darauf geachtet, dass es nicht zu größeren Blutungen in der mit MOPS gefüllten Präparationsschale kam. Die arteriellen Gefäße wurden so nun freipräpariert und je nach Aufzweigung zu Arterien 1., 2. und 3. Ordnung zugeordnet. Des Weiteren wurde darauf geachtet das möglichst lange, zumindest 1mm lange, arterielle Stücke ohne Abgang und durch die Präparation nicht beeinflusste (kontrahierte) Abschnitte gewählt wurden. Der arterielle Gefäßbaum wurde dann abgetrennt und in ein metallenes Organbad transferiert.

Für die Kultivierung von arteriellen Gefäßabschnitten unter verschiedenen Flow-Bedingungen wurden Gefäße ausgewählt die möglichst lang waren, um aus diesen



Gefäßsegment zwei Stücke zu kanülieren und um dann die Kulturbedingungen zwischen diesen beiden anatomisch benachbarten Gefäßanteilen zu variieren.

Bei der Präparation von Muskelgefäßen wurde ähnlich vorgegangen. Die Haut wurde vom Abdomen zum festgepinnten Mausbein aufgeschnitten. Das Mausbein wurde dann mit einem Skalpell abdomennah etwa 5mm oberhalb des Abganges der Arteria gracilis abgetrennt und das Bein der Maus in der bereits für die Mesenterialpräparation angesprochene silikonbeschichtete Petrischale mit kleinen Kanülenspitzen fixiert. Nun wurde der dünne Musculus gracilis entlang der Arteria gracilis aufgeschnitten und vorsichtig wegpräpariert. Bindegewebe, Venen und Muskelgefäße wurden nun um die Arteria femoralis und gracilis - je nach entsprechenden Versuch-, vorsichtig und unter Schonung der arteriellen Gefäße entfernt und die freipräparierten arteriellen Gefäße dann in ein Organbad transferiert.

### **2.3.3 Ligatur der Arteria femoralis**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Elisabeth Deindl wurden die Gefäße von knapp unterhalb der A. gracilis ligierten Femoralgefäßen aus C57BL/6N verwendet. Diese Ligationsversuche wurden im Einklang mit den Richtlinien über die Haltung von Versuchstieren (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition, 2011, National Research Council) und deutschen Tierschutzrichtlinien durchgeführt (no. 2532-73-12). Die Mäuse wurden dazu mit einer subkutanen Injektion mit Midazolam (5 mg/kg; B. Braun, Melsungen, Deutschland), Medetomidin (0.5 mg/kg; Pfizer, New York, NY, USA) und Fentanyl (0.05 mg/kg; CuraMed Pharma, Karlsruhe, Deutschland) anästhesiert. Jede Maus wurde nun auf einer Seite (der rechten) ligiert, während das andere Bein als Kontrollgefäß und –bein diente.

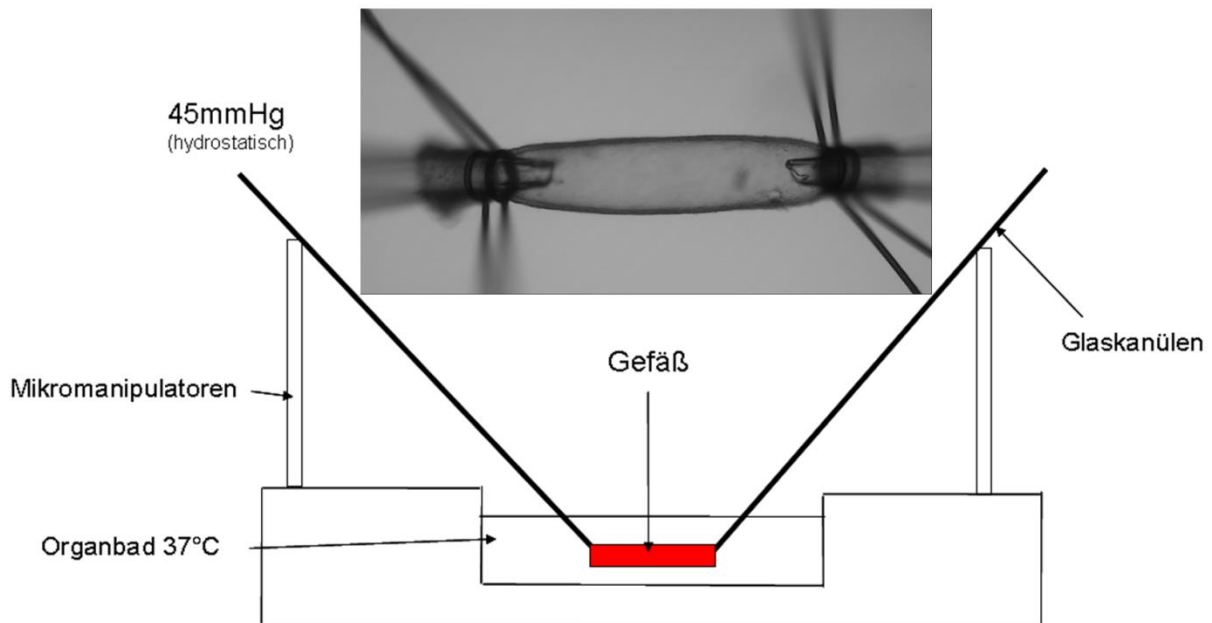
Postoperativer Schmerz wurde mit Buprenorphine (0.05 mg/kg, Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA) alle 6 Stunden für 3 Tage behandelt. Sieben Tage nach Ligation wurden die Mäuse nun erneut anästhesiert und durch aortale Ausblutung getötet. Danach wurden die Femoralgefäße, wie im Abschnitt „Gefäßpräparation“ beschrieben isoliert und für die Kanülierung vorbereitet.

### 2.3.4 Kanülierung der Gefäße

Borsilikatglaskanülen wurden mit einem Puller mit verschlossenen Ende ausgezogen und manuell mit Hilfe von Pinzetten im Organbad mit einem Öffnungsdurchmesser aufgebrochen. Jeweils zwei Knoten pro Glasmikropipette wurden für die Befestigung der Gefäße an diesen Glaskanülen aus 11-Ethilonfaden vorgelegt.

In Vorbereitung auf die Gefäßkanülierung wurde ein Set-Up mit Glaskanülen, Verbindungsschläuchen und Dreiwegehähnen aufgebaut und beidseitig luftblasenfrei freigespült. Am vorderen Dreiwegehahn wurde ein Druck von 45mmHg angeschlossen und retrograd mit Mops befüllt. Ein Organbad wurde zentral im Set-Up eingesetzt und mit 3-5ml Mops gefüllt, das Gefäß anschließend überführt, die Glaskanülen grob justiert und mit einem vorderen einachsigen und einen hinteren dreiachsigen Mikromanipulator fein eingestellt. Die Glaskanülen wurde für die folgenden Mikroskopiertechniken etwa eine Pinzettenbreite über den Glasboden (UV-durchgängiges Glas) auf selber Ebene eingestellt. Die vorgelegten Knoten wurden dann auf die Glaskanülen aufgebracht, das Gefäß am vorderen Ende bei geschlossene Dreiwegehahn zuerst kanüliert und mit Hilfe der vorderen Knoten fixiert bevor unter Druck mit geöffneten Dreiwegehähnen das hintere Ende des Gefäßes nun über die hintere Glaskanüle aufgezogen wurde. Nach Abstellen des Druckes am vorderen Dreiwegehahn wurde nun auch das hintere Ende des Gefäßes auf der hinteren Glaskanüle fixiert und ein hydrostatischer Druck von 60mmHg durch Öffnung des vorderen und Schließung des hinteren Dreiwegehahnes über dem Gefäß appliziert. Das kanülierte Gefäßstück wurde dann durch die Mikromanipulatoren in der Länge adaptiert und von fett- und bindegewebigen Überresten freipräpariert.

Für das Aufziehen und Freispülen eines Mesenterialbaumes wurde dieser nur am größten Gefäß über vordere Kanüle aufgezogen. Durch Öffnung des vorderen Dreiwegehahnes würden Blutreste herausgespült und die Endäste mit vorgelegten Knoten abgebunden und ligiert.



**Abb. 2.2: Aufbau eines Set-Ups für unter Druck gesetzte Gefäße**

Freipräparierte murine Gefäße wurden an Glaskanülen aufgezogen und mit Ethilon-11-0-Fäden an diesen fixiert. Je nach Versuchsanordnung oder Färbung wurde das Gefäß mit Mops bei Raumtemperatur oder bei 37°C inkubiert und stand für weitergehende Versuche zur Verfügung.

### 2.3.5 Gefäßkultur

Für die Gefäßkultur wurden kanülierte Gefäße zunächst funktionell untersucht. Gefäße wurden nur in Kultur genommen, wenn sie nach einer 30minütigen Äquilibration unter 60mmHg mit NE 3µM oder U46 1µM auf 70% ihres Anfangsdurchmessers kontrahierten und unter Acetylcholin 10µM auf 90% dilatierten. Gefäße die ohne Endothel kultiviert wurden, wurden mit 1ml Luft deendothelialisiert und ein erneuter Funktionstest durchgeführt, bei dem nun die Antwort auf Acetylcholin verschwunden sein sollte. Unter der Sterilbank wurden 50ml-Perfusor-spritzen mit Leibovitz-Medium luftblasenfrei aufgefüllt und über eine Perfusorleitung an den vorderen Dreiwegehahn des Set-Ups angeschlossen und auf einem sterilisierten Blech in einen auf 37°C vorgeheizten Binder-Wärmeschrank transferiert. Der hintere Perfusorschlauch wurde mit Mops gefüllt, um einen hydrostatischen Druck von rund 30mmHg zu ermöglichen. Die Flussraten wurden nach dem Innendurchmesser der Gefäße nachfolgender Formel eingestellt:

$$\tau = 4 \cdot v \cdot \eta / \pi \cdot r^3$$

Wobei:

- $\tau$  = Shear-Stress (N/m<sup>2</sup>)
- $\eta$  = Medium viscosity (N\*s/m<sup>2</sup>)
- V = velocity (flow rate) (m<sup>3</sup>/s)
- R = radius (m)

ist und in jeweils 2 Gruppen mit einer Schubspannung zu 1dyn (niedrige Schubspannung) vs. 25dyn (hohe Schubspannung) eingeteilt. Für die hohen Shearraten wurde eine Doppelperfusion mit zwei Perfusoren, die am vorderen Dreiwegehahn konnektiert wurden, durchgeführt. Das durchströmte Leibovitz-Medium wurde in 50ml Falcons am hinteren Perfusionsschenkel aufgefangen. Das Gefäß wurde zudem mit etwa 5,5ml Leibovitz-Medium im Organbad auch superfundiert. Diese Flüssigkeitsmenge bildete durch das Ansaugen eines Deckels mit Durchlass für die Glaskanülen zudem einen Verdunstungsschutz für das Medium das täglich gewechselt und erneuert wurde. So wurde die Kultur über 24-72h durchgeführt.

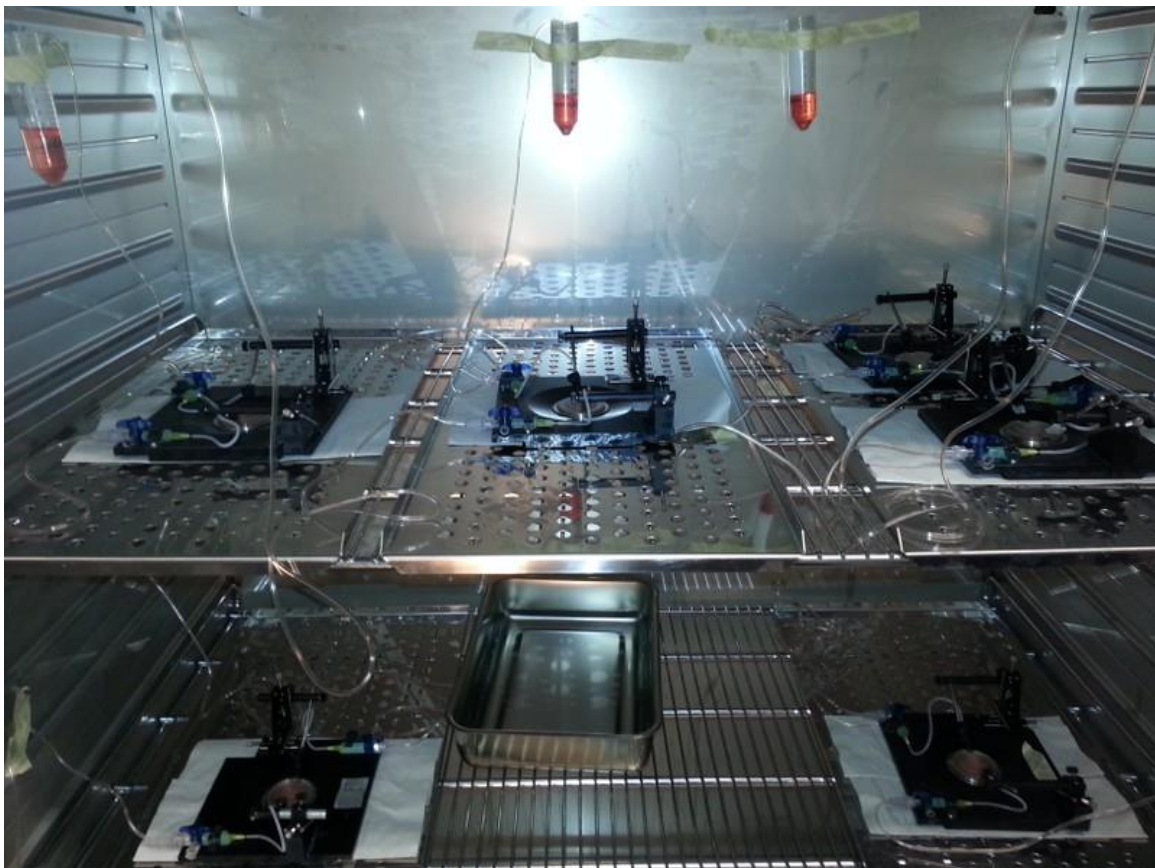
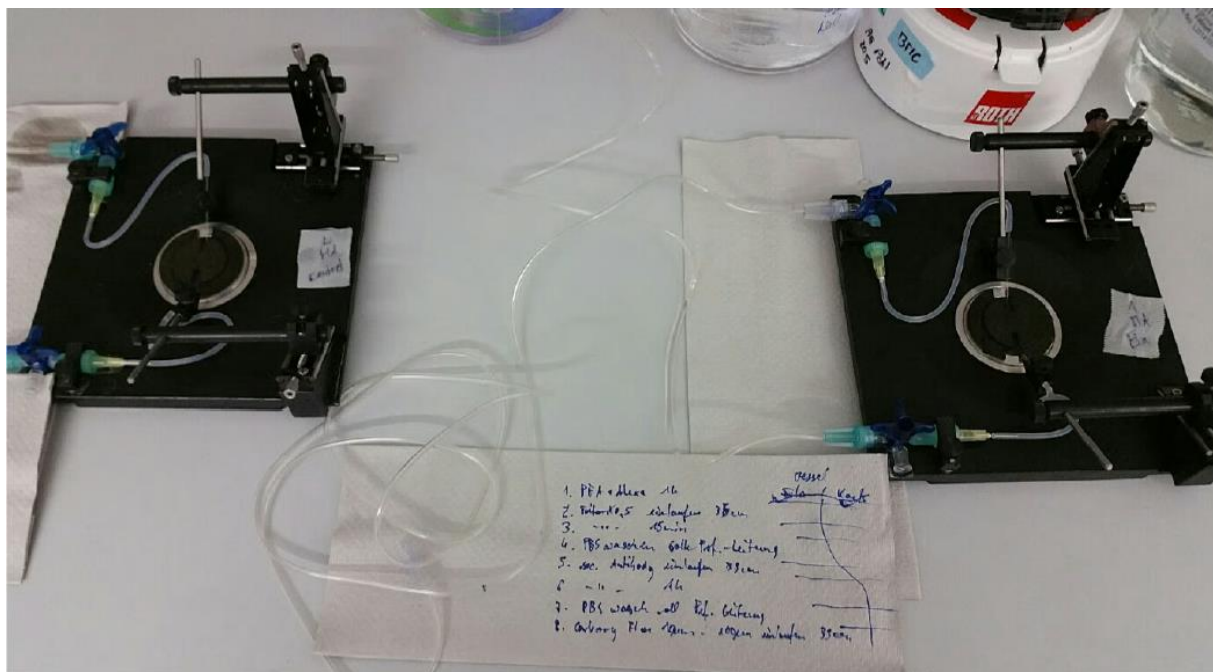


Abb. 2.3: Gefäßkultur

In einem Inkubationsschrank (Binder, Tuttlingen, Deutschland) wurden die kanülierten Gefäße 24-72h mit Leibovitz Medium und je nach errechneter oder vorgegebener Flussrate bei 37°C perfundiert. Zudem war das Gefäß von Leibovitz-Medium im Organbad umgeben, welches alle 12Stunden gewechselt wurde.

### 2.3.6 Gefäßfärbung

Kanülierte Gefäße mit oder ohne Kultur wurden 60 Minuten mit 2% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und gleichzeitig mit Alexa633 oder Eosin (Alexa-Gabe erfolgte auch von Innen, dazu Perfusorleitung mit am vorderen Ende mit Alexa-Mops gefüllt und Perfusionsabfluss über den hinteren Dreiwegehahn unter Abschätzung des das Gefäß durchströmenden Volumens anhand einer zuvor ausgerechneten standardisierten Strecke (35cm) über eine Perfusorleitung. Dann Perfusionsstopp durch Zudrehen des hinteren Abflusses über den Dreiwegehahn und 60-minütige Inkubation), bei 60mmHg inkubiert. Für Immunfluoreszenz-Versuche gleichartiger Perfusions-Inkubations-Schritt zur Endothelpermeabilisierung mit 0.3% Triton X-100 für 10-15min mit anschließender Spülung. Darauf Inkubation mit den jeweiligen Erstantikörper über Nacht und Zweitantikörper für zwei bis vier Stunden.

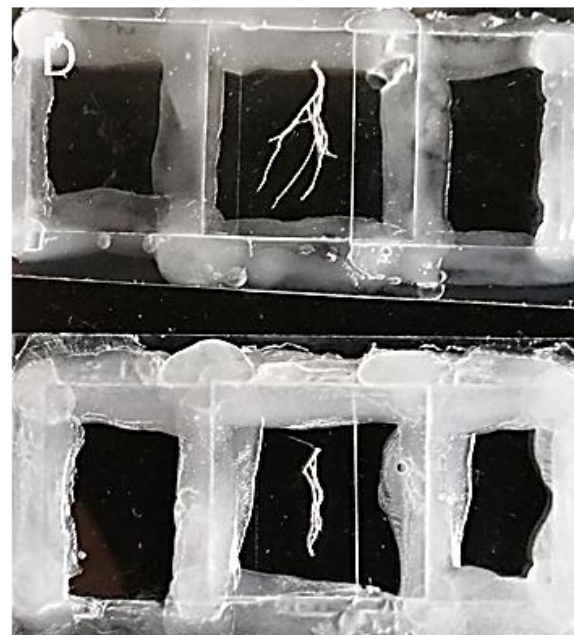
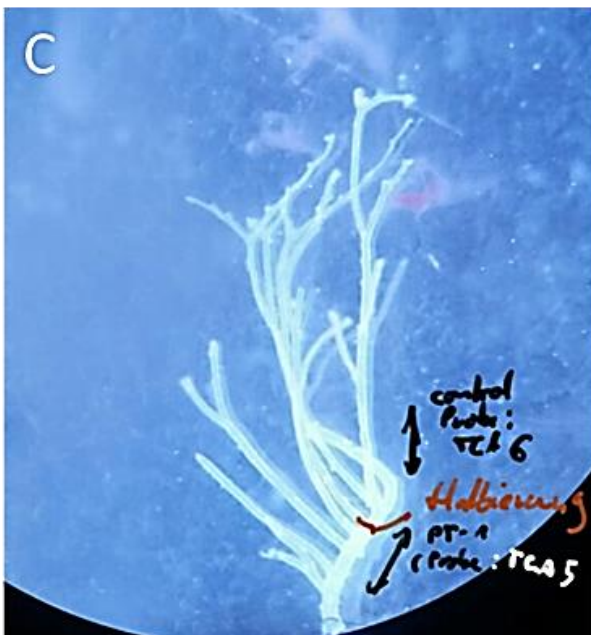
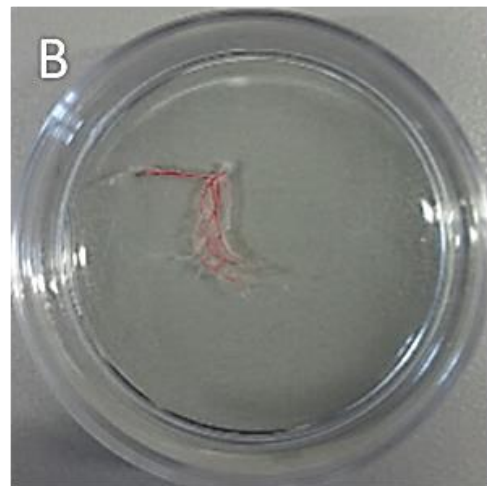
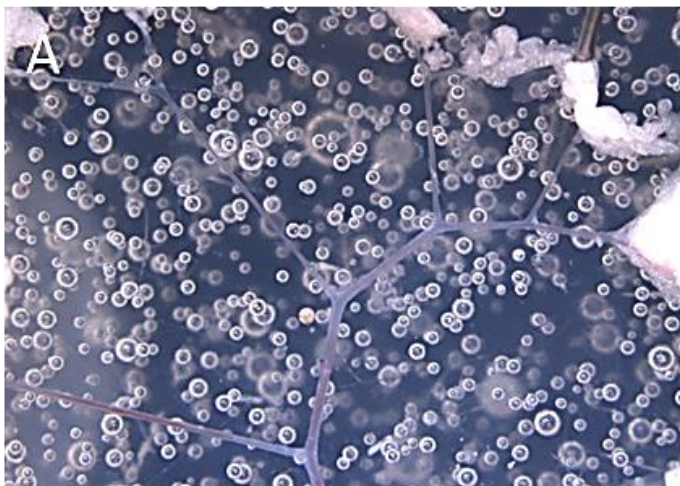


**Abb. 2.4: Anordnung zur Gefäßfärbung**

Die auf den Glaskanülen aufgezogenen Gefäße wurden je nach Versuch von innen oder außen fixiert, permeabilisiert und mit den jeweiligen Antikörpern oder Farbstoffmolekülen inkubiert. Zu sehen sind der Zufluss über den vorderen Dreiwegehahn (hier offen, damit das Gefäß unter Druck gehalten wird) und der Abfluss über den hinteren Dreiwegehahn (Pfeil) in

einer Perfusorleitung, um genau errechnete Mengen zur Gefäßfärbung in das Gefäßlumen laufen zu lassen.

Aus der A. mesenterica superior stammende Gefäßkonvolute, im Folgenden „Mesenterialbäume“ genannt, wurden an der Arteria mesenterica superior aufgezogen und einseitig durchspült. Anschließend wurden die großen Abgangsarme mit vorgelegten Knoten abgebunden und der Mesenterialbaum unter Druck für 1-2h mit 2% PFA fixiert und gleichzeitig mit Alexa 633 gefärbt. Anschließend wurde der Mesenterialbaum auf einem Objektträger, der mit einem Tropfen Mops zwischen zwei Deckgläsern beschichtet war vorsichtig und ohne Faltenbildung aufgetragen, ein weiteres Deckglas quer über die anderen beiden zur leichten gleichmäßigen Kompression des Gefäßbaumes aufgebracht. Diese Konstruktion wurde dann mit Wachs an den Rändern der Deckgläser versiegelt und stand zur Mikroskopie zur Verfügung.



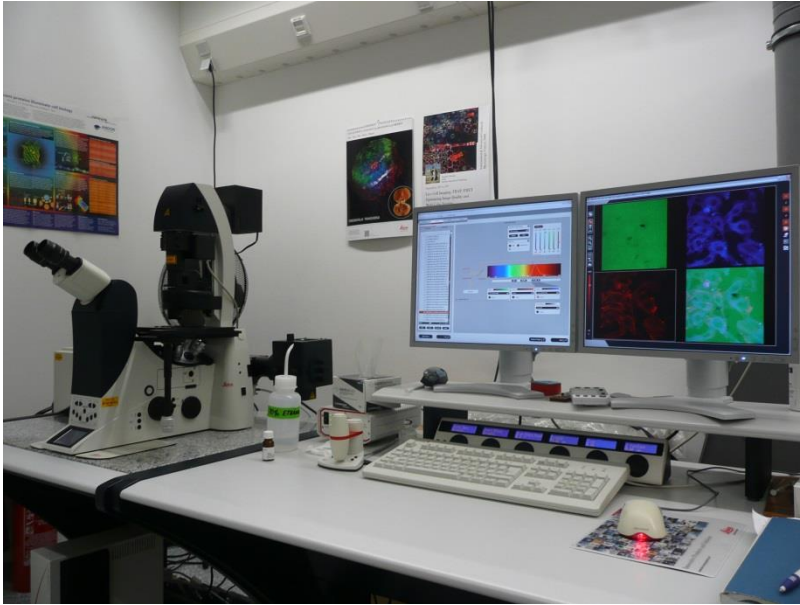
## **Abb. 2.5: Präparation, Freispülung, Fixation Färbung und Einbettung von Mesenterialbäumen**

**A**, Von Bindegewebe und Fett befreites Mesenterium mit den Abgängen unterschiedlicher Ordnung („Mesenterialbaum“). **B**, Dieses noch blutgefüllte Gefäßkonvolut wird in MOPS-Puffer gewaschen und dann einseitig an der Arteria mesenterica superior aufgezogen (**C**) und vom Blute freigespült. Die nun offenen Gefäßabgänge wurden ligiert und unter Druck fixiert und gefärbt. **D**, Einbettung der Gefäßbäume auf Objektträger und Kompression unter einem Deckgläschen, um die IEL breitflächig in einer Ebene darstellen zu können.

### **2.3.7 Konfokalmikroskopie der Gefäße und Bildbearbeitung**

Unter Verwendung von speziell für die Konfokalmikroskopie hergestellten Set-Ups (Glaskanülenarme auf derselben Seite) und entsprechender Kanülierung der Gefäße zur Mikroskopie (Aufziehen der Gefäße rund 50-100µm über den Glasboden, dicke der Pinzettenspitze) wurde das Gefäß unter 45mmHg Druck mit einem 10ner Objektiv eingestellt, ehe sich der Konfokalscan mit einem 60er Wasserobjektiv, 0,333µm-Schnittabstand zwischen den Ebenen über die gesamte IEL-Dicke (2-10µm) anschloss. Der Beginn der Schnittaufnahme in z-Richtung begann mit der Detektion der ersten Löcher in der Elastica und wurde bei Vorliegen des Lumens über die gesamte Bildschirmfläche abgeschlossen. Für die weitere Analyse und Auswertung wurden die Maximalprojektionen der Ebenen zusammenaddiert um ein homogenes IEL-Bild zu erhalten.

Für die Erfassung der Podosomendynamik wurden Mesenterialgefäße aus LifeACt-Mäusen (zur Verfügung gestellt von Reinhard Fässler) verwendet, präpariert, kanüliert und mit den jeweils angegebenen Substanzen behandelt. Am Konfokalmikroskop wurden Aufnahmen alle 5-10 Minuten je nach Behandlungssubstanz auf der gleichen Ebene durchgeführt. In fixierten Gefäßen wurde durch eine Doppelfärbung mit Cortactin überprüft, ob es sich bei den dargestellten runden Strukturen tatsächlich um Podosomen hielt. Für die 3D-Konstruktion wurde das Softwareprogramm Imaris von Bitplane, Zürich, Schweiz genutzt.



**Abb. 2.6: Aufbau des Konfokalmikroskopes**

Mit einem SP5-Mikroskop von Leica (Leica Microsystems, Wetzlar) wurden die Immunfluoreszenzaufnahmen gemacht.

### 2.3.8 Bildauswertung

Für die Analyse des Gefäßdurchmessers auf die Lochgröße und Lochanzahl wurden zwei Gefäßgruppen gebildet: 1. 225-235 $\mu$ m und 2. 175 bis 185 $\mu$ m.

Für die Bildanalyse wurde die Bildbearbeitungssoftware ImageJ genutzt (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). Ausgewählte Regionen mit einer Kantenlänge von 82x82 $\mu$ m wurden dupliziert, herausgeschnitten und analysiert, um Überlagerungs- und Helligkeitseffekte an den Rändern der Gefäße zu minimieren.

Der Algorithmus für die Lochauswertung an den Gefäßen war folgender:

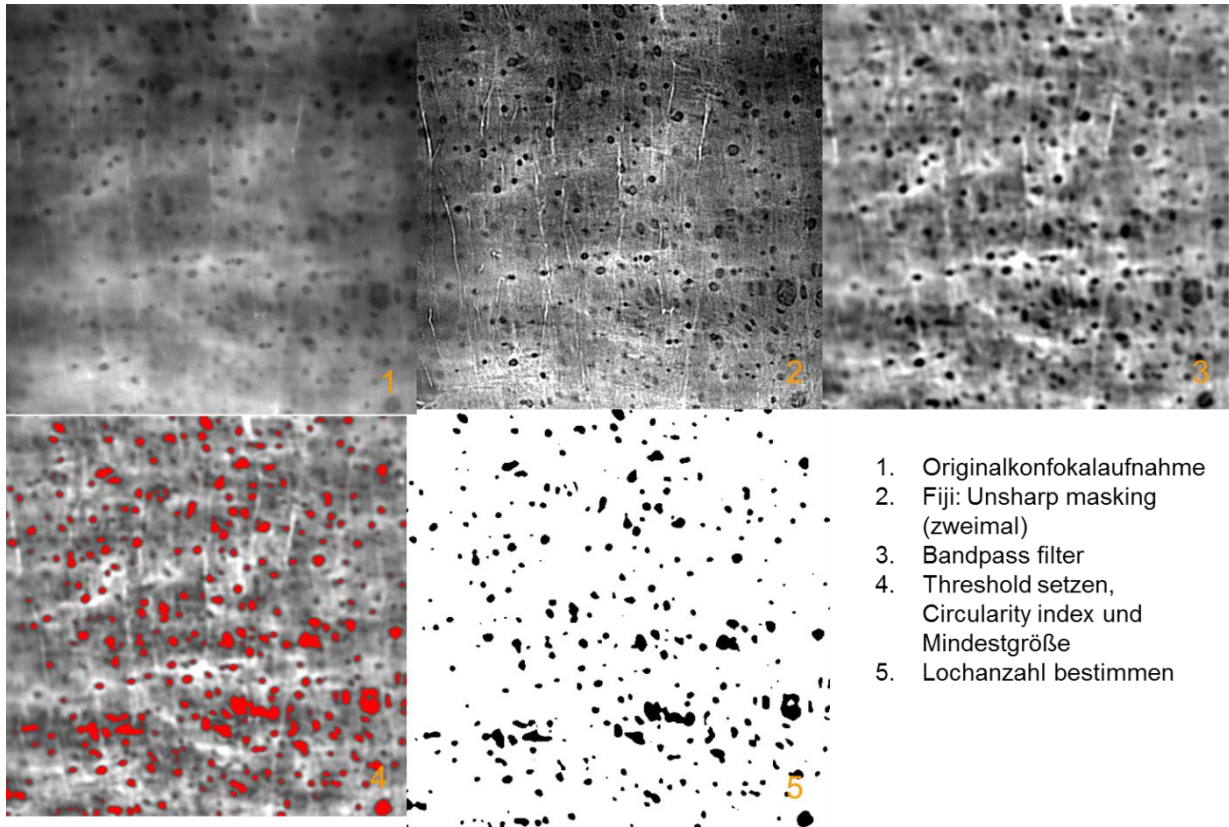
```
run("Grays");
run("Unsharp Mask...", "radius=2 mask=0.60");
run("Unsharp Mask...", "radius=2 mask=0.60");
run("Bandpass Filter...", "filter_large=60 filter_small=5 suppress=Vertical tolerance=5
autoscale saturate");
getRawStatistics(nPixels, mean, min, max);
t1 = min;
```



```
t2 = 0.5*mean;
```

```
setThreshold(t1, t2);
```

```
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.60-1.00 show=Nothing display  
exclude clear summarize add");
```



**Abb. 2.7: Veranschaulichung des Bildbearbeitungsalgorithmus mit Fiji (ImageJ) zur quantitative Lochanalyse der IEL**

Ausgehend vom Originalbild (1) wurde zur besseren Kantendetektion zweimalig der „Unsharp mask“-Filter genutzt (2). Anschließend wurde zur Korrektur von Ausleuchtungsartefakten vor allem an den Rändern der Aufnahmen oder durch leichte Schiefelage des Gefäßes ein Bandpassfilter durchgeführt und die Graustufenverteilung homogenisiert (3). Mit Hilfe eines Schwellenwertes, der bei der Hälfte des Mittelwertes lag wurden die dunkle Areale selektiert (4) und Löcher mit einem Zirkularitätsindex über 0,6 in die Analyse aufgenommen (5).

Auch die Analyse der Zellkulturbilder wurde mit ImageJ nach von Prof. Dendorfer entwickelten Algorithmen (siehe unten und Fey et al, Faseb J, 2016) durchgeführt. Die Rohdateien wurden mit zwei Kalkulation vorprozessiert: Ein high-pass Filter wurde angelegt um für ungleichförmige Ausleuchtung, vor allem an den Bildrändern der Präperataufnahmen zu korrigieren.

```
run("Bandpass Filter...", "filter_large=600 filter_small=2 suppress=None tolerance=0");
```

Anschließend wurden die hellsten 10% der aufgenommenen Pixel genommen und als 90% Perzentile der Gesamtpixelintensität festgelegt, um Überstrahlungsartefakte, die bisweilen durch Reflektionen oder helle Gelatineaggregate auftraten, zu minimieren.

```
getHistogram(values, counts, 65536, 0, 65535);  
for (i=0; i<65536; i++) {  
    if (counts10 < 15099494) {  
        counts10 = counts10 + counts[i];  
        thresh10 = i + 1;  
    }  
}  
run("Max...", "value="+thresh10);
```

Die statistische Analyse zur Bestimmung von Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts wurden nach Anwendung eines Median-Filters als integrierte Applikationsmöglichkeiten mit der ImageJ-Software durchgeführt:

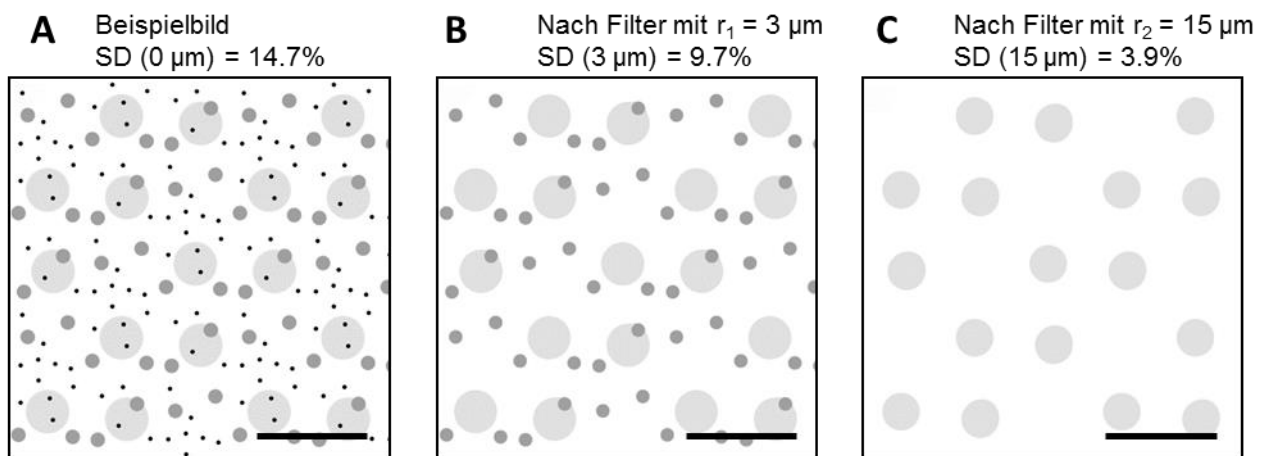
```
run("Duplicate...", "title=Buffer");  
run("Median...", "radius=8");  
run("Measure");  
close();  
run("Duplicate...", "title=Buffer");  
run("Median...", "radius=40");  
run("Measure");  
close();
```

Um die Gelatinedefekte zu quantifizieren wurde eine automatische Analyse mit ImageJ durchgeführt. Dunkle Abdrücke in der Größenordnung von Podosomerosetten in der fluoreszierenden Gelatinematrix wurden dazu untersucht. Der Filter zur Bestimmung dieser Defekte war wie folgt konstruiert: Die Intensität jedes einzelnen Pixels wurde durch die Intensität des Mittelwerts um einen Pixel in einem vorher festgelegten Radius ersetzt. Dadurch wurden Strukturen, die weniger als halbkreisförmige oder andersförmige Abdrücke hinterließen sowohl als auch Intensitätsunterschiede in der Gelatinematrix eliminiert. Die Standardabweichungen der Radii im Größenrahmen von Podosomenrosetten (3-15µm) wurden gemäß folgender Formel voneinander

subtrahiert, um den Anteil der durch Podosomenrosetten hinterlassenen Strukturen zu analysieren:

$$\Delta SD(3-15 \mu m) = relSD(8 \text{ pix}) - relSD(40 \text{ pix})$$

Wobei: "relSD(r)" die relative Standardabweichung der Mittelwerte aller Pixel um diesen Pixel mit dem Radius "r" im Verhältnis zur Mittelwertintensität aller Pixel dieses Bildes ist.



**Abb. 2.8: Simulation der automatisierten Auswertung der Gelatinedefekte mit einem ImageJ-Algorithmus**

A Beispielbild mit Kreisen unterschiedlichen Radius (2  $\mu m$ , 6  $\mu m$ , 20  $\mu m$ ) und unter derselben Auflösung wie in den Gelatine-Degradationsexperimenten in HUVECS (4096x4096, 16 bit resolution, 2.4 mm<sup>2</sup>). Längenbalken: 100  $\mu m$ . B, C: Der im Text näher beschriebene Mittelwertfilter wurde eingesetzt um Podosomenrosettenabdrücke der richtigen Größenordnung zu detektieren und die Standardabweichung der Intensitätsverteilung zu reduzieren. Die Differenz der Standardabweichung nach Mittelwertkalkulation mit 3 $\mu m$  und 15 $\mu m$  Radius (deltaSD (3  $\mu m$ , 15 $\mu m$ ) = 5.8%) repräsentiert das Vorhandensein der Kreisabdrücke im Podosomenrosettenbereich (hier 6  $\mu m$  Radius).

Zur Bestimmung der Podosomenanzahl in kultivierten Gefäßen wurde ein weiterer eigens entwickelter Algorithmus verwendet, der aus den Rohdateien der Leica-Aufnahmen (Stapelaufnahmen über die Endothelzellen bis zum Verschwinden der IEL) die Podosomenrosettenanzahl, IEL-Lochanzahl und Überschneidungsanzahl der Podosomen mit den IEL-Löchern ermittelte. Zusammengefasst errechnete der Algorithmus über Pre-Prozessierung (Unschärfemaskierung, Bandpassfilter, Kontrastverschärfung) und Hintergrundsubtraktion über einen Schwellenwert

abhängig vom Mittelwert der Grau-/Farbstufen des Bildes Masken für die jeweils aufgenommenen Kanäle (Cortactin, MMP14, IEL (mit Alexa 633 Färbung)). Für die Podosomenrosettenermittlung wurden Kriterien der Doppelfärbung mit MMP14 und Cortactin als auch eine Minimalgröße ( $>2\mu\text{m}$ ) und eine Mindestzirkularität ( $>0.15$ ) eingefordert:

```
rename("podosom");
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");
run("Split Channels");
close();
run("Unsharp Mask...", "radius=5 mask=0.60");
run("Bandpass Filter...", "filter_large=40 filter_small=3 suppress=None tolerance=5
autoscale saturate");
run("Enhance Contrast...", "saturated=5");
getRawStatistics(nPixels, mean, min, max);
t2 = max;
t1 = 1.7*mean;
setThreshold(t1, t2);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0.20-infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks
display clear summarize");
run("Red");
selectWindow("C1-MAX_podosom");
run("Unsharp Mask...", "radius=5 mask=0.60");
run("Bandpass Filter...", "filter_large=40 filter_small=3 suppress=None tolerance=5
autoscale saturate");
run("Enhance Contrast...", "saturated=5");
t2 = max;
t1 = 1.7*mean;
setThreshold(t1, t2);
setOption("BlackBackground", false);
```

```

run("Convert to Mask");

run("Analyze Particles...", "size=0.20-infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks
display clear summarize");

run("Green");

run("Merge Channels...", "c1=[Mask of C3-MAX_podosom] c2=[Mask of C1-
MAX_podosom] create keep");

run("RGB Color");

run("16-bit");

setAutoThreshold("Default");

//run("Threshold...");

setOption("BlackBackground", false);

run("Convert to Mask");

run("Invert");

run("Analyze Particles...", "size=5-Infinity circularity=0.15-1.00 show=Masks display
clear summarize");

selectWindow("C2-MAX_podosom");

run("Grays");

selectWindow("Mask of Composite (RGB)");

run("Yellow");

run("Merge Channels...", "c1=[Mask of Composite (RGB)] c2=C2-MAX_podosom
create keep");

selectWindow("C2-MAX_podosom");

run("Unsharp Mask...", "radius=5 mask=0.60");

run("Bandpass Filter...", "filter_large=40 filter_small=3 suppress=None tolerance=5
autoscale saturate");

run("Enhance Contrast...", "saturated=5");

getRawStatistics(nPixels, mean, min, max);

t2 = 0.35*mean;

t1 = min;

setThreshold(t1, t2);

setOption("BlackBackground", false);

run("Convert to Mask");

```

```

run("Cyan");
selectWindow("Mask of Composite (RGB)");
run("Magenta");
run("Merge Channels...", "c1=[Mask of Composite (RGB)] c2=C2-MAX_podosom
create keep");
run("RGB Color");
run("16-bit");
getRawStatistics(nPixels, mean, min, max);
t2 = max;
t1 = 0.99*max;
setThreshold(t1, t2);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.2-1.00 show=Masks display
clear summarize");
close();
rename("coloc podo holes mask");
selectWindow("Mask of Composite (RGB)");
rename("coloc mmp14 cortactin mask");
selectWindow("Composite");
rename("coloc podo holes");
rename("coloc mmp 14 cortactin")
close("C1-MAX_podosom");
close("C3-MAX_podosom");
selectWindow("podosome");
run("Z Project...", "projection=[Max Intensity]");

```

Ein Teil der ermittelten Bilder sind als repräsentative Aufnahmen in Abb. 3.18 A zu sehen.

Zur Permeabilitätsmessung über die IEL an kultivierten Gefäßen wurde das Signal aus dem Cortactinkanal verwendet. Eine Schichtaufnahme wurde unter gleichen Aufnahmebedingungen vom Beginn des Verschwindens der IEL über 1,5µm in die

glatte Muskelzellschicht hinein fortgesetzt und Graustufenhistogramme für die jeweiligen Gefäßabschnitte berechnet. Nach Abzug der Hintergrundfluoreszenz (bis grey value 10) wurden die AUC der jeweiligen Histogrammkurven bis zum Graustufenwert von 50 berechnet (an dem die Fluoreszenz auf ein Minimum zurückgekehrt war und nur unspezifische Signal zeigte). Mittelwert und SEM wurden für die Behandlungsgruppen mit ohne VEGF berechnet und statistisch ausgewertet.

## **2.4 Statische Analyse**

Für alle quantitativ erhobenen Daten einer jeden Gruppe wurde das arithmetische Mittel, sowie die Standardabweichung des Mittelwertes bestimmt und zur Beschreibung verwendet. Die statischen Teste wurden mit SigmaPlot Software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

Soweit nicht anders beschrieben wurde der Unterschied zwischen zwei Gruppen (sowohl in den mit unterschiedlichen physikochemischen Stimuli behandelten Zellkulturmodellen der HUVECs, als auch an den kultivierten Gefäßen) mit Hilfe eines gepaarten t-Test oder einer one-way analysis of variance (ANOVA) für wiederholte Messungen gefolgt von einer Bonferroni- oder Kruskal-Wallis post-hoc Analyse ermittelt. Die Versuchsanzahl wird in den Legenden der Figuren erwähnt. Das Signifikanzniveau war 0.05. In den Experimenten zur RNA-Expression wurden zur besseren Vergleichbarkeit relative Expressionswerte errechnet (hierbei wurden die Expressionslevel unter Kontrollbedingungen als 100% dargestellt) und miteinander verglichen. Für die Auswertung der Durchlässigkeit der IEL wurde mit dem Mann-Whitney Rangsummen Test ein nichtparametrisches Testverfahren genutzt. Das Signifikanzniveau betrug ebenfalls 0.05.

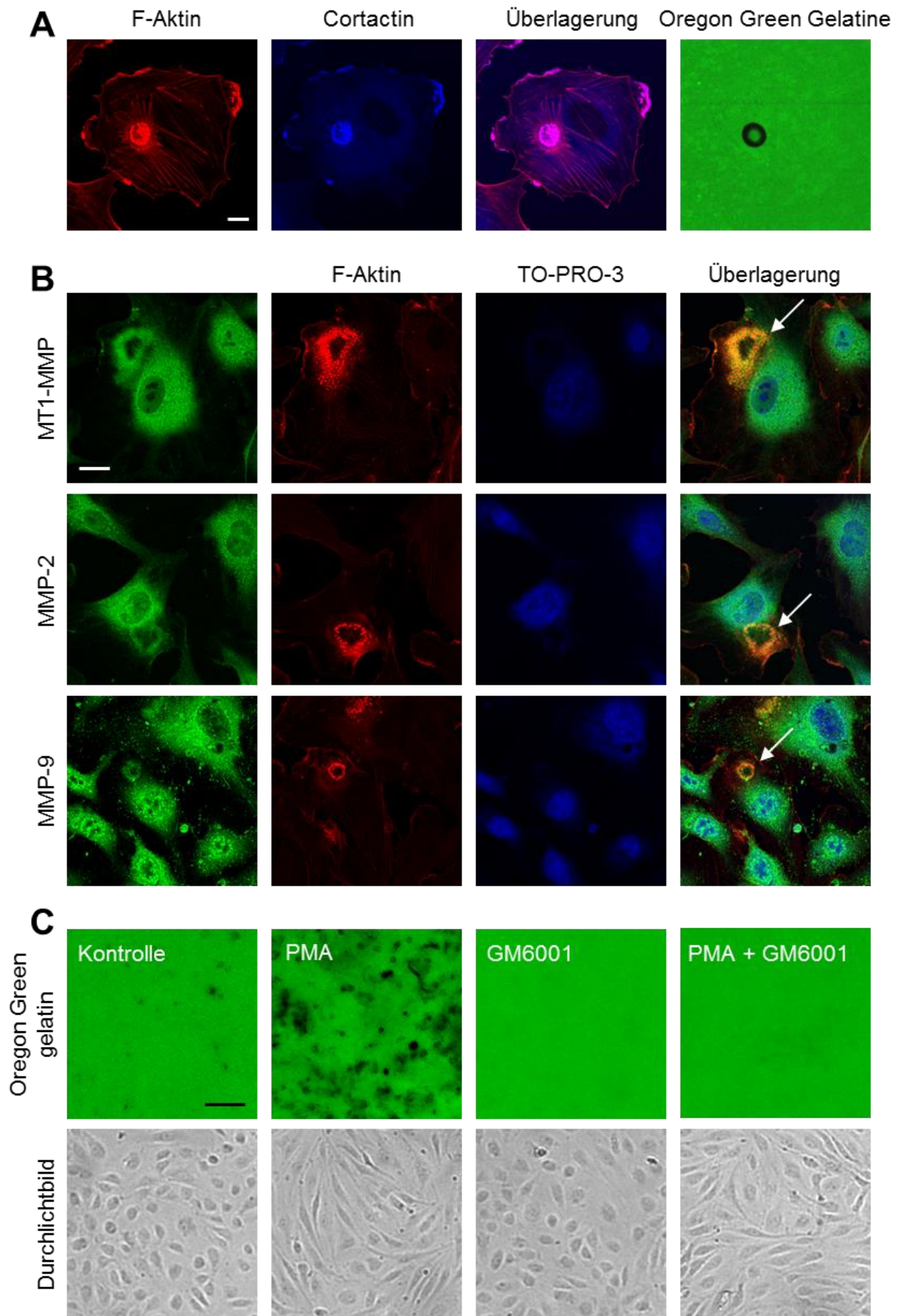
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Podosomen in HUVEC

#### 3.1.1 Bildung von Podosomenrosetten in HUVECs

Die Untersuchungen an HUVECs wurden unter Federführung von Theres Fey durchgeführt (Fey et al, Faseb J, 2016). Als Podosomenrosetten wurden ringförmige Strukturen zwischen 5-30µm Durchmesser gewertet, die F-Actin und Cortactin co-exprimierten (Abb. 3.1 A). Vor allem unter statischen Bedingungen kam es zur Ausbildung von Podosomenrosetten. Die proteolytische Aktivität von Podosomen erzeugte ringförmige „Abdrücke“ (Schwarzfärbung durch Matrix-Abbau) in Oregon-Green Gelatine-Matrix und wurde demzufolge durch Quantifizierung der Abdrücke bestimmt (Abb. 3.1 A). 48 Stunden lang kultivierte HUVECs bildeten unter statischen Bedingungen zirkuläre Podosomen. (quantitative Daten, siehe Abb. 3.2 B-C und 3.3 D-F). Podosomenartige Strukturen exprimierten außerdem MMP2, MMP9 und MMP 14 (MT1-MMP). Ihre proteolytische Aktivität ließ sich mikroskopisch nachweisen, wenn die Zellen auf DQ-Gelatine als Matrix gezüchtet wurden, bei der es durch proteolytischen Abbau es zu einer Fluoreszenzzunahme kommt, die aber schnell wieder verschwindet. Weitere punktförmige Intensitätsabnahmen (lokale Proteolyse) waren auch sichtbar, wurden aber nicht in die Auswertung mit eingeschlossen. Des Weiteren kam es auch zur Ausbildung doppelt-positiv gefärbter punktförmiger Strukturen als Podosomenäquivalent, die aber nicht für die Auswertung herangezogen wurden.





### **Abb. 3.1: Darstellung von Podosomen, Stimulation und Inhibition ihrer Bildung und Aktivität.**

**A**, Podosomenrosetten wurden durch eine Co-Färbung von F-Aktin und Cortactin und ihrer proteolytischen Aktivität an der Basalseite der HUVECs charakterisiert, der durch den Fluoreszenzverlust einer Oregon Green 488 Gelatine-Matrix detektiert wurde. **B**, Nachweis von membrangebundenen MT1-MMP und löslichen MMP-2 und MMP-9 an den Podosomen. **C**, Der Oregon Green 488 Matrix-Verdau wird durch MMP-Inhibition mit GM6001 (15µM, 24h) im Vergleich zur Kontrolle inhibiert, während der PKC-Stimulator PMA zu einer Erhöhung des Verdau führt (50ng/ml, 24h). Längsbalken: 10 µm (A), 20 µm(B), 100 µm (C).

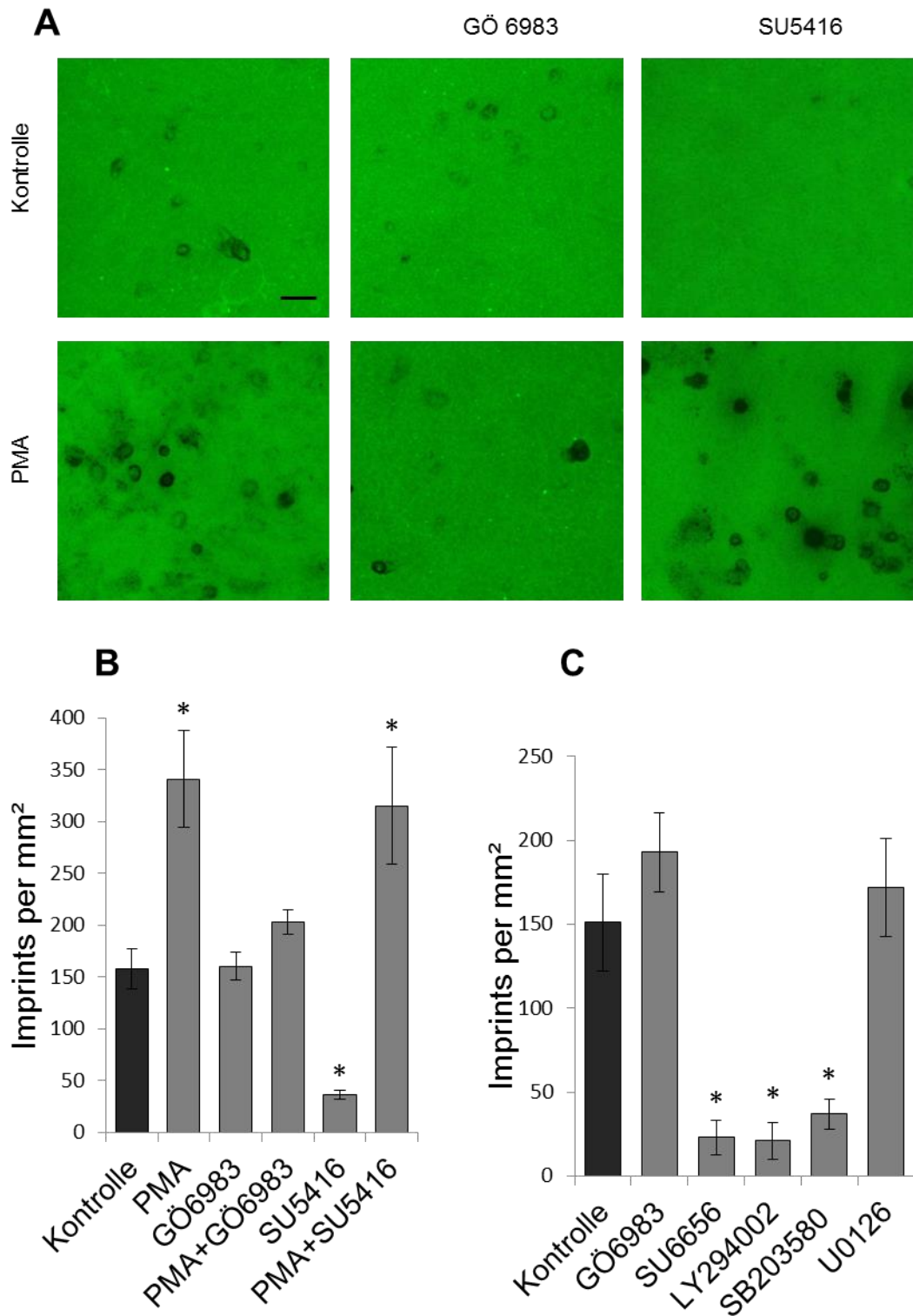
#### **3.1.2 PKC Aktivierung stimuliert Podosomen Bildung und MMP-abhängige Proteolyse in HUVECs**

In einem Beobachtungs-Zeitraum über 48h kam es zu einer kumulativen Zunahme des Matrixabbaus in der Oregon Green 488 Gelatine proportional zur Podosomenrosettenanzahl und der damit einhergehenden proteolytischen Aktivität (Abb. 3.1 C und quantitative Analyse Abb. 3.3 D-F). Behandlung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem Phorbol-ester und Aktivator der Proteinkinase C (PKC) führte zu einem Anstieg der Podosomenrosettenbildung und einen damit einhergehenden Anstieg des Gelatineverdaus (Fluoreszenzverlust), der sich durch eine Abnahme der Gesamtgelatinefluoreszenz auf  $68 \pm 8\%$  ( $n=5$ ) des Kontrollwertes nach 24h äußerte. Veranschaulicht wird dies durch die vermehrten dunklen Areale in Abb. 3.1 C unter PMA-Einfluss. Sowohl die PMA-induzierte als auch die basale Gelatineproteolyse wurden durch MMPs vermittelt, da in diesen beiden Behandlungsgruppen der Gelatinverdaus komplett durch GM6001, ein Breitspektrum-MMP-Inhibitor gehemmt werden konnte (Abb. 3.1 C).

#### **3.1.3 Der Einfluss von VEGF auf die basale Podosomenbildung in HUVECs**

Der PKC-Inhibitor GÖ6983 konnte die PMA-induzierte, nicht aber die basale Podosomenrosettenbildung verhindern (basale Anzahl der Imprints je  $\text{mm}^2$ :  $158 \pm 20$ , PMA:  $341 \pm 47$ , GÖ 6983:  $160 \pm 13$ , GÖ6983 + PMA:  $203 \pm 12$ ). Dagegen führte der VEGFR2-Inhibitor SU5416 zu einer Verringerung der Anzahl der im Beobachtungszeitraum Podosomenimprints unter statischen nicht aber unter PMA-stimulierten Bedingungen (Abb. 3.2 A, B). Diese Ergebnisse wurden durch weitere

Inhibitoren des VEGFR2-Signaltransduktionsweges, die vor allem für die Zellmigration und zytoskelettale Änderungen von Endothelzellen wichtig sind, bestätigt: p38MAPK-, Phosphoinositol-3-kinase- (PI3K) und Src-Inhibition durch verschiedene Pharmaka führte zu Reduzierung der Podosmenrosettenanzahl ähnlich derer, die durch den VEGFR2-Inhibitor erzielt wurde. Ein Inhibitor der ERK, einer für die Endothelzellproliferation wichtigen MAP-Kinase hatte dagegen kein Effekt auf die Imprintanzahl (Abb. 3.2 B).



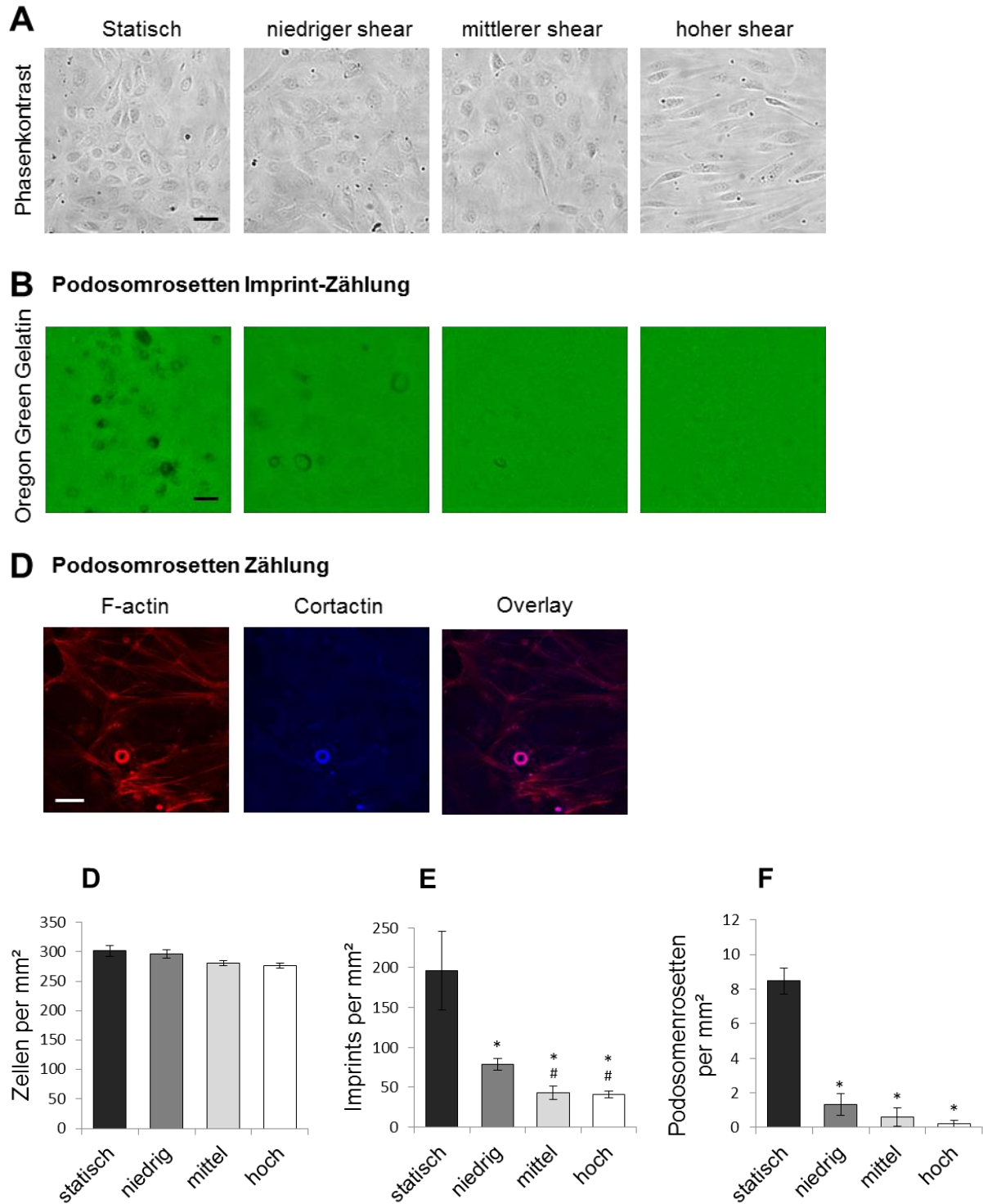
**Abb. 3.2: Die Formation der Podosomen-Imprints wird durch Inhibitoren des VEGFR2 unter statischen Bedingungen reduziert.**

**A**, obere Reihe: die Formation von Podosomen-Imprints unter Kontrollbedingungen wurde durch einen VEGFR2-Antagonisten (SU5416; 20  $\mu$ M) reduziert, während sie durch einen PKC-

Inhibitor (GÖ6983; 1  $\mu$ M) unbeeinflusst blieb. Untere Reihe: PKC-Stimulation durch PMA (PMA; 50 ng/ml) erhöhte die Podosomen-Imprint-Anzahl. Dieser Effekt konnte durch den PKC-Inhibitor blockiert werden, während VEGFR2-Inhibition keinen Effekt zeitigte. **B**, Quantitative Analyse der beobachteten Daten aus den Bildern aus Abbildung A ( $n = 3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM). **C**, Src (SU6656; 5  $\mu$ M), PI3K (LY294002; 1  $\mu$ M), und p38 (SB203580; 10  $\mu$ M) reduzierten die Anzahl der Podosomenimprints nach 48 h unter statischen Bedingungen, während PKC- und ERK- Inhibition (U0126; 10  $\mu$ M) keine Effekte zeitigten ( $n = 3$ , Mittelwert  $\pm$  SEM). \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

### 3.1.4 Shear-Stress inhibiert die Podosomenbildung in HUVECs

Endothelzellen wurden nicht nur unter statischen Bedingungen untersucht, sondern auch unter Exposition für Shear-Stress unterschiedlicher Höhe, nämlich 0.3 dyn/cm<sup>2</sup> (niedrig), 2.5 dyn/cm<sup>2</sup> (mittel) und 10 dyn/cm<sup>2</sup> (hoch). für 48 Stunden. Unter Shear-Stress zeigten die Zellen keine Zeichen von mechanischer Schädigung oder veränderter Zelldichte. Die typische Ausrichtung der Endothelzellen in Richtung der Krafteinwirkung wurde nur unter hohen Shear-Stress-Bedingungen gefunden. Unter statischen Bedingungen erzeugten die Zellen deutlich mehr Podosomen-Abdrücke als unter Shear-Stress-Bedingungen (196  $\pm$  49 vs. niedrig 78  $\pm$  8, mittel 43  $\pm$  9, and hoch 41  $\pm$  4 Podosomrosettenabdrücke/mm<sup>2</sup>, Mittelwert  $\pm$  SEM). Der Vergleich der Imprintanzahl unter den verschiedenen Shear-Stress Stufen zeigte dabei eine Abnahme hin zu höheren Shear-Stress Werten. Die Podosomen-Abdrücke reflektieren alle Podosomen, welche sich im Beobachtungszeitraum bildeten und auch wieder abgebaut wurden, also nicht die Zahl der zu jedem Zeitpunkt aktuell vorhandenen Podosomen. Um zu einem Beobachtungszeitpunkt aktuelle Anzahl von Podosomen zu ermitteln, wurde daher jeweils eine Immunfluoreszenzfärbung auf F-Actin und Cortactin durchgeführt. Auch dabei war unter Shear-Bedingungen eine Abnahme der Podosomenrosettenzahl (statisch 8.5  $\pm$  0.7 vs. niedrig 1.3  $\pm$  0.6, mittel 0.6  $\pm$  0.5 und hoch 0.2  $\pm$  0.2 Podosomrosetten/mm<sup>2</sup>, Mittelwert  $\pm$  SEM) zu beobachten, Diese niedrige absolute Anzahl an Podosomen unter Shear Stress Bedingungen zum Zeitpunkt der jeweiligen Fixierung reichte nicht aus, um bei der gewählten Gruppengröße statistisch signifikante Unterschiede unter den verschiedenen Shear-Stress Bedingungen zu detektieren.



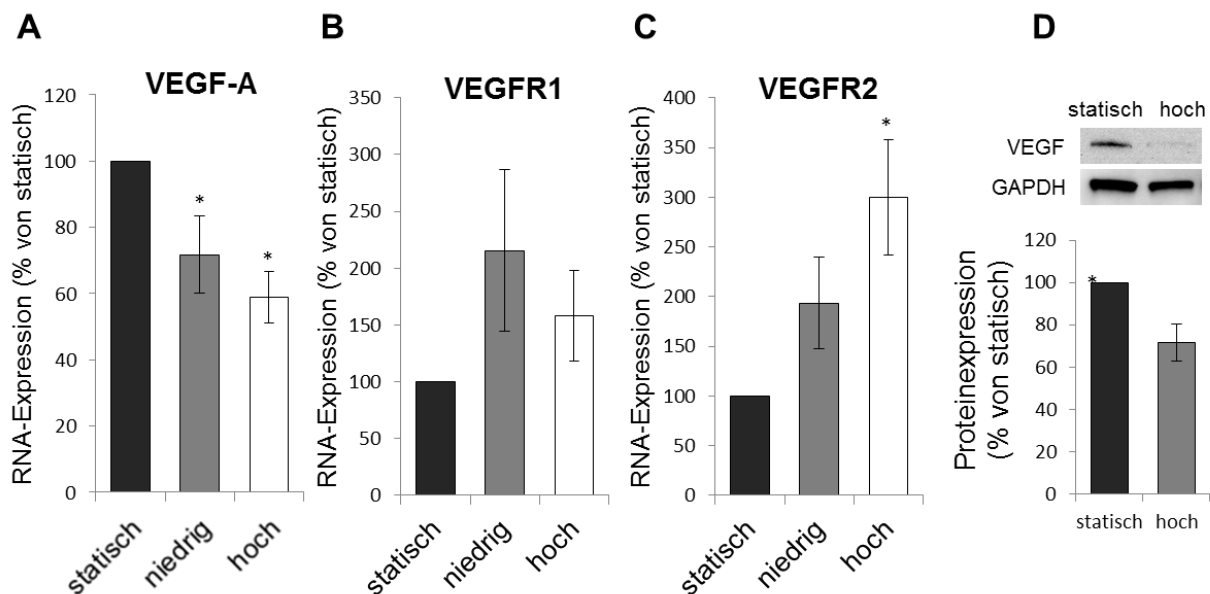
**Abb. 3.3: Effekte von Shear-Stress auf die Podosomenzahl in HUVECs**

HUVECs, die auf eine Oregon Green 488 Gelatinematrix ausgesät wurden, wurden für Shear-Stress unterschiedlicher Höhe exponiert oder unter statischen Bedingungen untersucht. **A** Durchlichtbilder der HUVECs und Bilder der darunterliegenden Oregon Green 488 Gelatinematrix **B** nach 48 h. **C**, Immunfluoreszenzfärbung von HUVECs unter statischen Bedingungen mit F-Aktin und Cortactin aus unabhängigen Bereichen einer Kultur. Shear-Stress beeinflusst nicht die Zelldichte **D**,  $n = 5$ ; mean  $6 \text{ SEM}$ , aber vor allem hohe ( $10 \text{ dyn/cm}^2$ ) und mittlere ( $2.5 \text{ dyn/cm}^2$ ) Shear-Stress Behandlungen führten zur einer Abnahme der

Imprintanzahl in der Gelatinematrix (**E**) verglichen mit statischen Bedingungen (n = 5; mean 6 SEM). **F** Das Auftreten von Podosomenrosetten war signifikant höher in Zellen die unter statischen Bedingungen gehalten wurden verglichen mit den Zellen unter Shear-Stress Bedingungen.

(n = 5; Mittelwert±SEM). \*P<0.05 vs. statisch; #P<0.05 vs. niedriger Shear. Längenbalken: 25 mm.

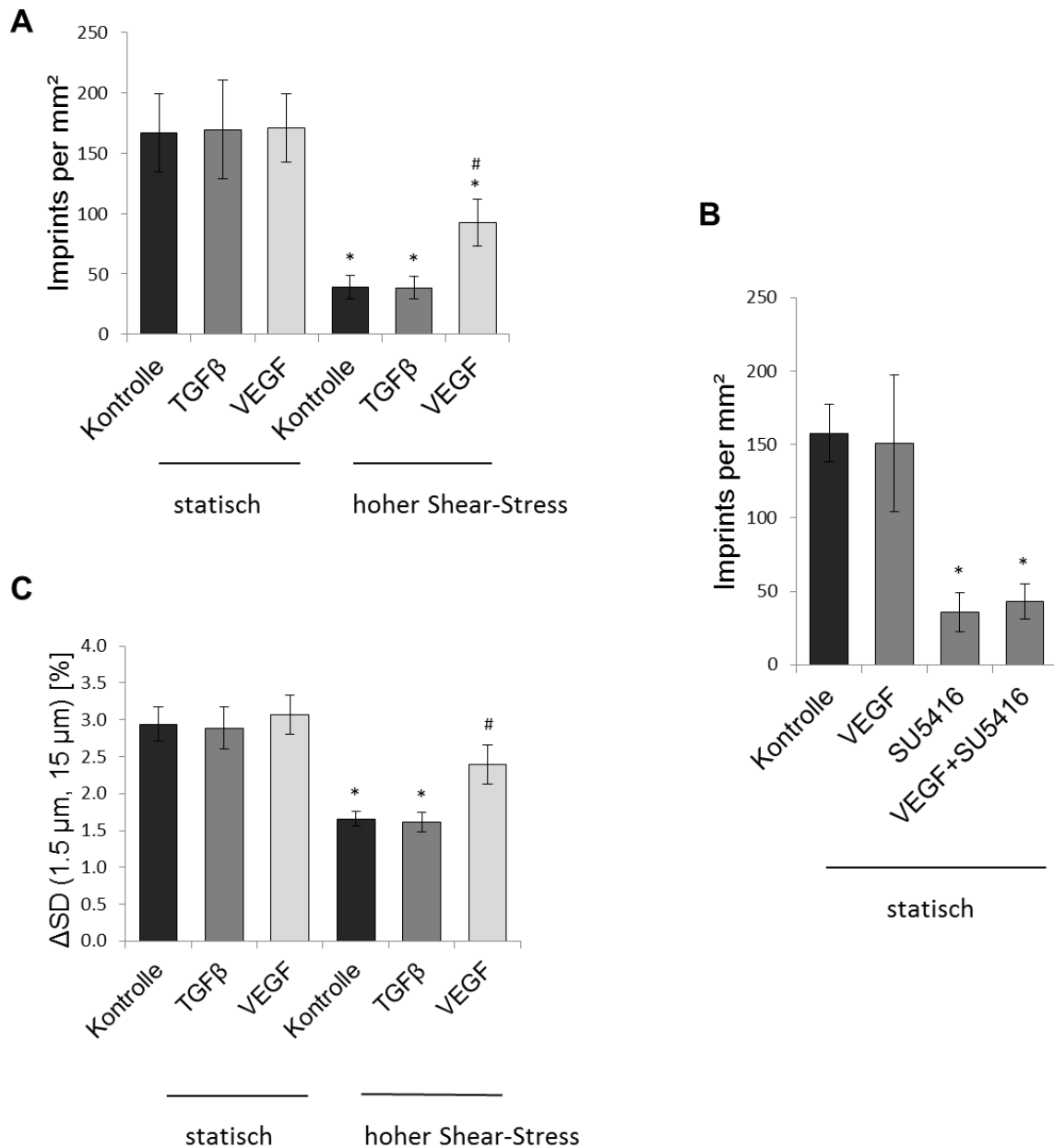
### 3.1.5 Effekte von Shear-Stress auf die VEGF und VEGF-Rezeptor-Expression



**Abb. 3.4: Shear-Stress Effekte auf die VEGF und VEGFR-Expression.**

HUVECS wurden jeweils unter statischen Bedingungen, mit niedrigem (0.3 dyn/cm<sup>2</sup>) oder hohem Shear (10 dyn/cm<sup>2</sup>) für 48h behandelt: Die Zelllysate der jeweiligen Behandlungsansätze wurden dann mit PCR analysiert. Verglichen mit statischen Bedingungen führte höherer Shear-Stress zur Erniedrigung der VEGF-A mRNA Expression (**A**) und zu einer Erhöhung der mRNA Expression des VEGF2-Rezeptors (**C**). Die VEGFR1 Expression bliebe weitestgehend unbeeinflusst (**B**) n=6, Mittelwert ± SEM, \*p<0.05 vs. statisch. **D**, VEGF Proteinmenge in HUVECs wurde mit Western Blot untersucht und zeigte ebenfalls ein Abfall des VEGF-Proteins unter hohem Shear. n=5, Mittelwert ± SEM, \*p<0.05 vs. statisch.

### 3.1.6 Effekte von TGF-beta und VEGF auf die proteolytische Aktivität von Podosomen



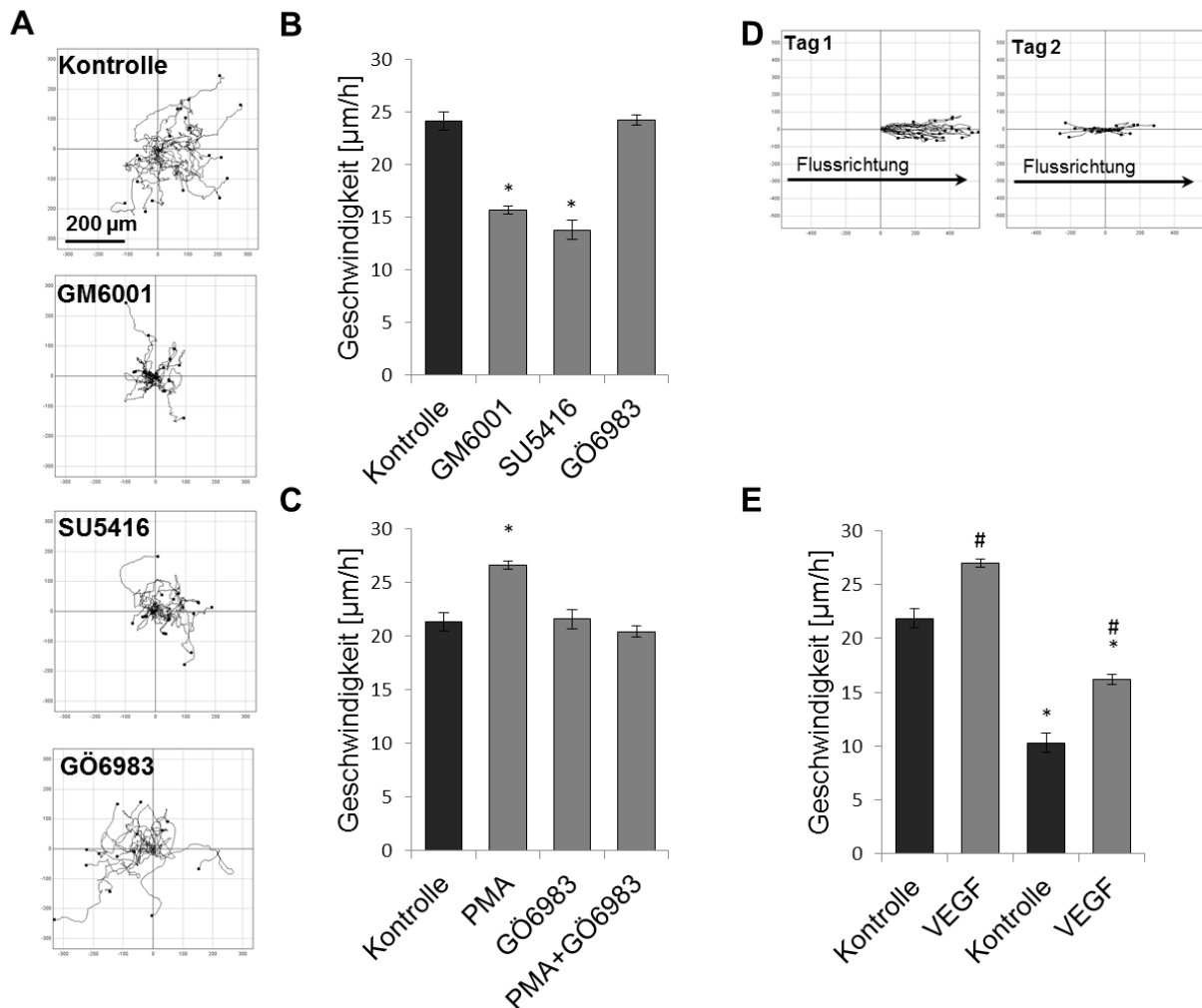
**Abb. 3.5: Effekte von TGFβ und VEGF-Behandlung auf die proteolytische Aktivität der Podosomenrosetten**

A, B: Oregon Green 488 Gelatine-Verdau unter statischen Bedingungen und unter hohem Shear (10 dyn/cm<sup>2</sup>). HUVECs wurden mit (5 ng/ml) oder VEGF (20 ng/ml) für 48 h behandelt. VEGF Behandlung erhöhte die Imprint-Anzahl von Podosomenrosetten signifikant unter hohem Shear-Stress, jedoch nicht unter statischen Bedingungen. TGFβ hatte in beiden Gruppen kein Einfluss auf die Imprintanzahl (n=5, statisch: Kontrolle: 167 ± 32, VEGF 171 ± 28, TGFβ 170 ± 41; hoher Shear-Stress: Kontrolle: 39 ± 10, VEGF 92 ± 19, TGFβ 39 ± 9; mean±SEM, \*p<0.05 vs. statisch, #p<0.05 vs. Kontrolle/hoher Shear-Stress). C: Eine mit dem



Softwareprogramm ImageJ computerisierte Analyse die den Gelatineverdau quantitative erfasste, bestätigte die manuelle Auszählung der Podosomen-Imprints, (3-15  $\mu\text{m}$ ), (n=5: statisch: Kontrolle:  $2.9 \pm 0.2$ , VEGF  $3.1 \pm 0.3$ , TGF $\beta$   $2.9 \pm 0.3$ ; hoher Shear-Stress: Kontrolle:  $1.7 \pm 0.1$ , VEGF  $2.4 \pm 0.3$ , TGF $\beta$   $1.6 \pm 0.1$ ; mean $\pm$ SEM, \*p<0.05.

### 3.1.7 Migrationsbeeinflussung von HUVECs



**Abb. 3.6: Das Migrationsverhalten von HUVECs unter Modulation der proteolytischen Aktivität oder der Anzahl von Podosomenrosetten**

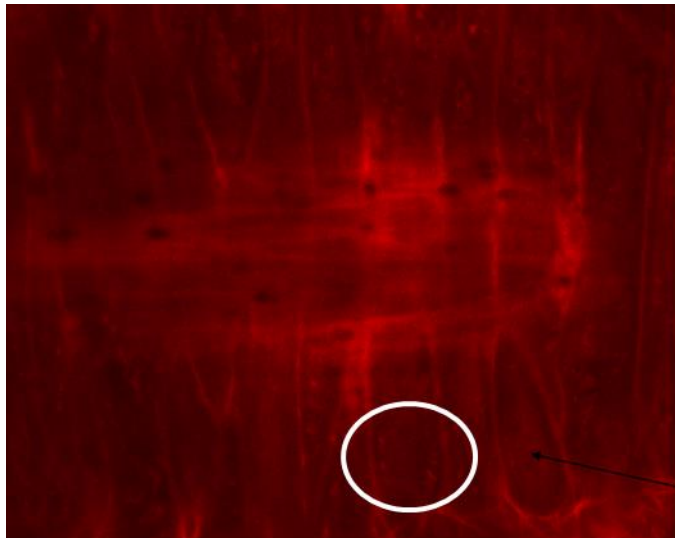
HUVEC Migrationsmuster (A) und Fortbewegungsgeschwindigkeit (B) unter dem Einfluss von MMP-Inhibitor GM6001 (15  $\mu\text{M}$ ), VEGFR2-Inhibitor SU5416 (20  $\mu\text{M}$ ) oder dem PKC-Inhibitor GÖ6983 (1  $\mu\text{M}$ ). MMP- und VEGFR2 Inhibition reduzierte die HUVEC-Migrationsgeschwindigkeit (n=3, Mittelwert $\pm$ SEM, \*p<0.05 vs. control und GÖ6983), während PKC-Inhibition diese nicht änderte. Shear-Stress Applikation führte zur Vereinheitlichung der Migrationsrichtung (C) und reduzierte signifikant die Migrationsgeschwindigkeit von HUVECs

(D) am zweiten Tag nach Kulturbeginn unter Flowbedingungen (n=3, Mittelwert±SEM, \*p<0.05 vs. Tag 1).

## **3.2 Podosomen und die IEL in intakten Gefäßen**

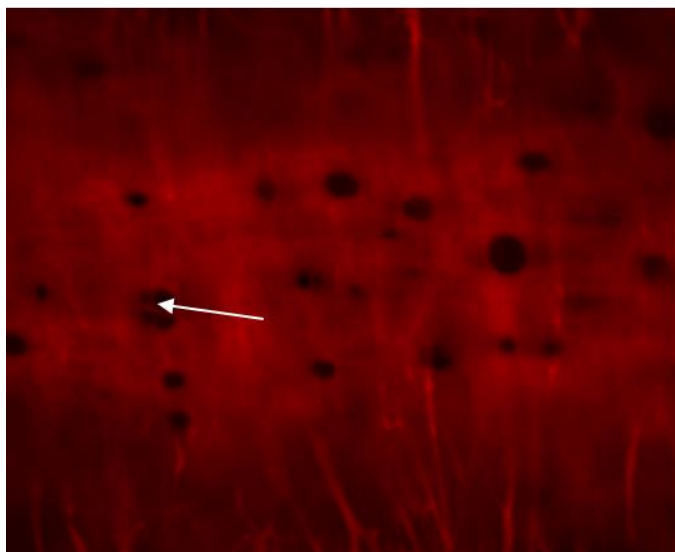
### **3.2.1 IEL-Nachweis und IEL-Löcher in Mesenterialgefäßen**

Nach Literaturrecherche wurden verschiedene Farbstoffe zur Darstellung der IEL erprobt. Dabei stellten sich Eosin und Alexa633 als die geeignetsten Farbstoffe heraus. Die höhere Selektivität für die IEL gab letztlich den Ausschlag dafür, Alexa633 für die alle kommenden Versuche als IEL-Marker zu verwenden.



- Eosin-Färbung, A.profunda (488nm Anregung, 505-560nm Emission)

Starke Muskeldarstellung



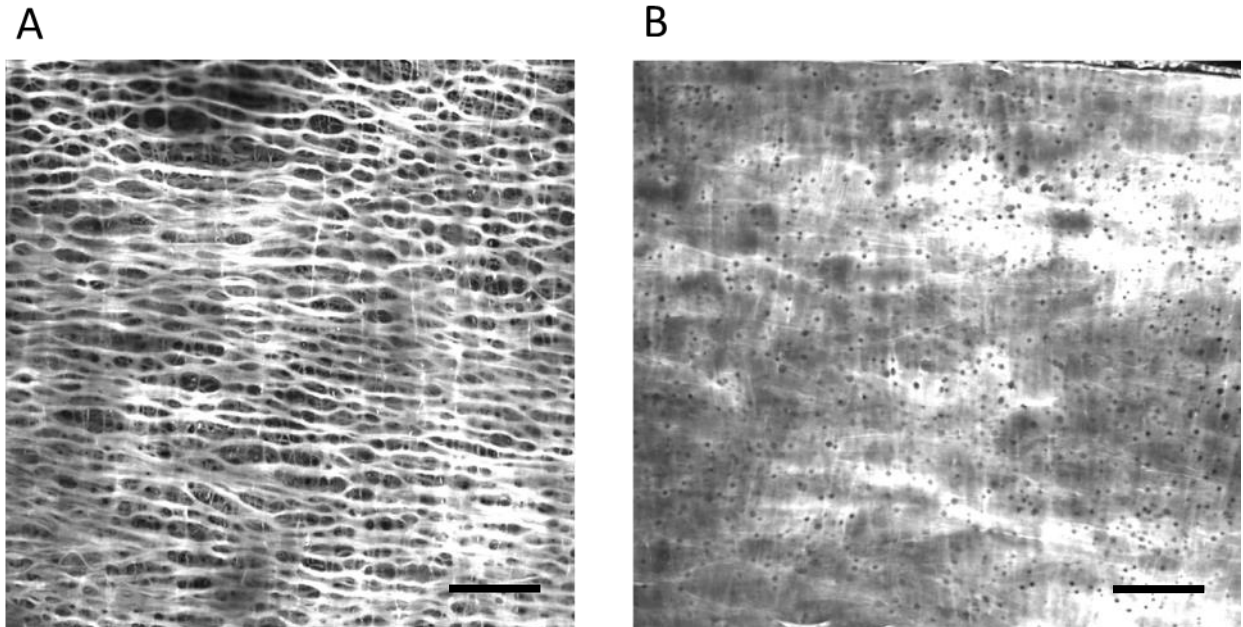
- Alexa633-Färbung, A. profunda (633nm Anregung, 640-670nm Emission)

**Abb. 3.7: Vergleich der IEL Färbung mit Eosin und Alexa 633:** Gefäße vom Abgang der Arteria femoralis der Maus (Arteria profunda) gleicher Größenordnung wurden mit Eosin oder Alexa633 gefärbt. **A**, Die Färbung der IEL mit Eosin war uneinheitlicher und färbte mehr unspezifische Strukturen (wie die glatte Muskelzellschicht und führte zur aggregatförmigen überlagernden Ablagerungen in diesen (weißer Kreis). **B**, Die Färbung der IEL mit Alexa633 war dagegen kräftiger und spezifischer. Selbst feine bindegewebige Strukturen in den IEL-Löchern waren darstellbar (weißer Pfeil) und die IEL einheitlicher gefärbt, was es erlaubte, die Lochstrukturen besser abzugrenzen.

### 3.2.2 IEL-Struktur von Muskelgefäßen vs. Mesenterialgefäße

Verschiedene Gefäßbetten in der Maus wurden untersucht, um ein gut reproduzierbares und analysierbares Modell zur Analyse der IEL und ihrer Veränderungen zu finden. Dabei stellte sich heraus, dass Gefäßgebiete mit

Lochstrukturen in verschiedenen Bildanalyseverfahren einfacher zu quantifizieren waren. Diese fanden sich in größeren Muskelgefäßen (>300µm Durchmesser) und in Mesenterialgefäßen bis zu einem Durchmesser von ~150µm.

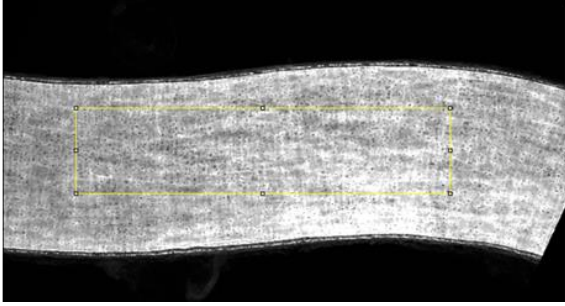
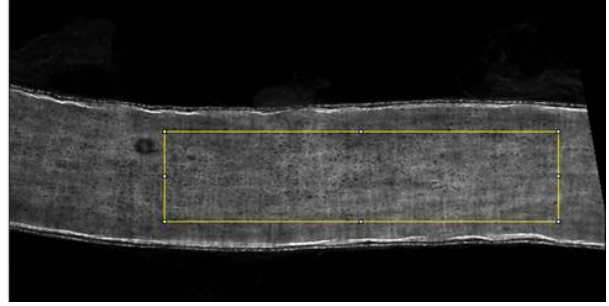


**Abb. 3.8: Unterschiede zwischen der IEL in verschiedenen Organabschnitten**

Maus Muskelgefäß **A** oder Mesenterialgefäß **B** unter 45 mmHg fixiert und gefärbt und anschließend zur homogenen Aufnahme mit Deckplättchen zusammengedrückt (z-Stacks über 2µm unter IEL-Färbung mit Alexa 633). Beide Gefäße hatten einen Durchmesser von rund 235µm. Es kommt deutlich der unterschiedliche Aufbau der IEL zum Vorschein. Längsbalken 20µm.

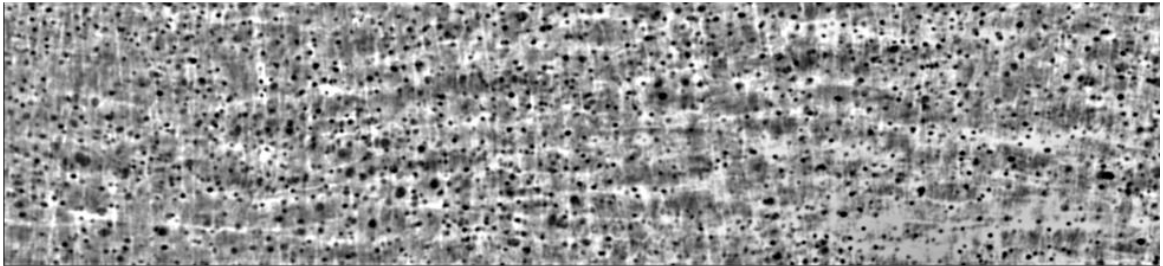
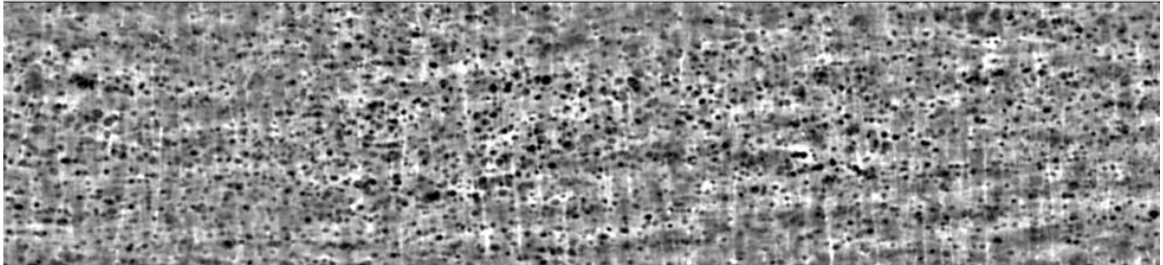
### 3.2.3 Abhängigkeit der IEL-Lochanzahl von der Gefäßgröße

In Mesenterialgefäßen der Maus zeigte sich, dass die IEL kleinerer Gefäße eine signifikant höhere Lochanzahl aufwies als in größeren Gefäßen (175-185µm Durchmesser vs. 225-235µm Durchmesser). Mit zunehmender Anzahl nahm gleichzeitig der mittlere Lochdurchmesser signifikant ab, so dass sich in den verglichenen kanülierten und unter Druck gesetzten Gefäßen die prozentuale Gesamtlochfläche nicht signifikant veränderte.

**A****B**

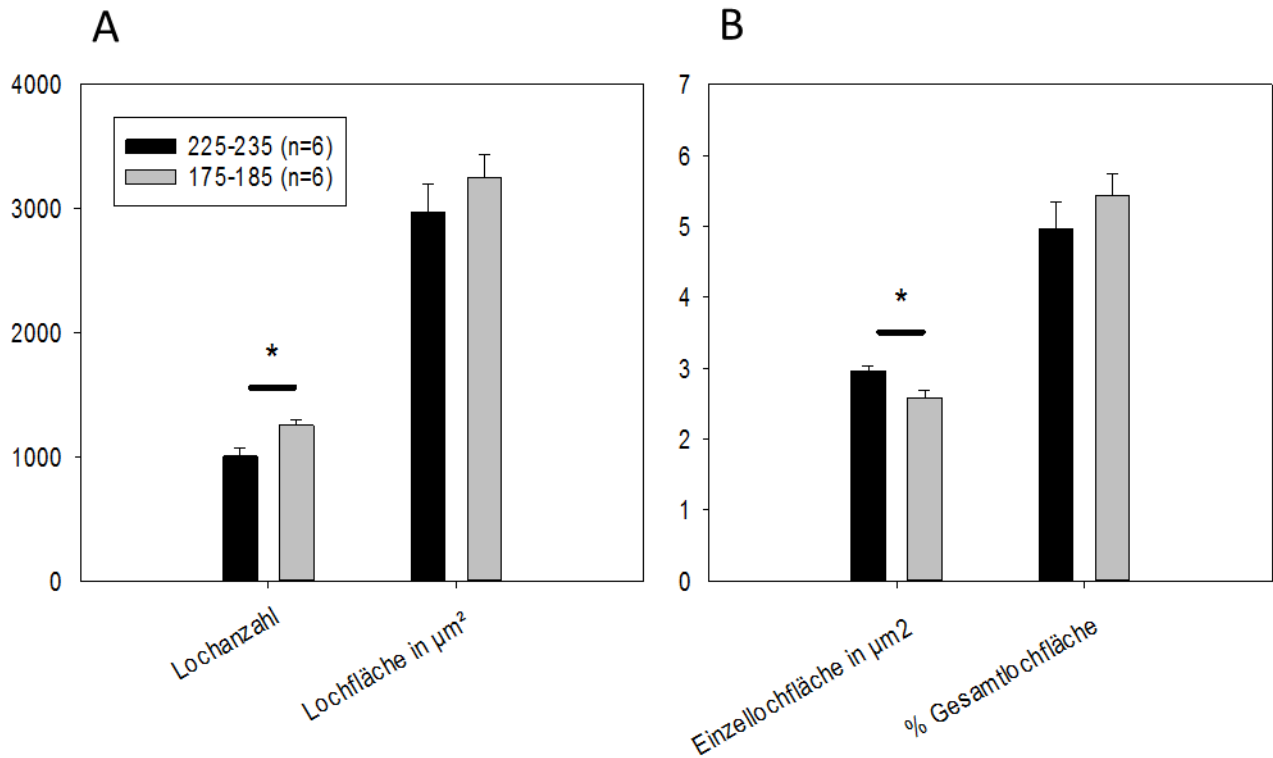
**Abb. 3.9: Zunahme der Lochanzahl in kleineren Abschnitten des Mesenterialbaumes**

Die Abbildung zeigt in **A** ein Gefäß der Kategorie 1 (225-235 $\mu$ m). Die IEL ist bei gleichen Aufnahmeeinstellungen stärker gefärbt als ein kleineres Gefäß der Kategorie 2 (**B**, 175-185 $\mu$ m). Die gelben Umrandungen markieren die Ausschnitte die zur standardisierten Auswertung herangezogen wurden.

**A****B**

**Abb. 3.10: Bildbearbeitung und Auswertungen von Gefäßabschnitten**

Gefäßabschnitte nach Bearbeitung im ImageJ-Algorithmus (**A**, Kategorie 1; **B**, Kategorie 2). Nach Zuordnung in zwei Kategorien (1: 225-235 $\mu$ m, 2: 175-185 $\mu$ m) zeigte sich eine Zunahme der Lochanzahl zu kleineren Gefäßen. Da allerdings deren Durchschnittsfläche kleiner als die in größeren Gefäßen war, ergab sich keine signifikante Zunahme der Gesamtquerschnittsfläche in diesen Gefäßbereich.

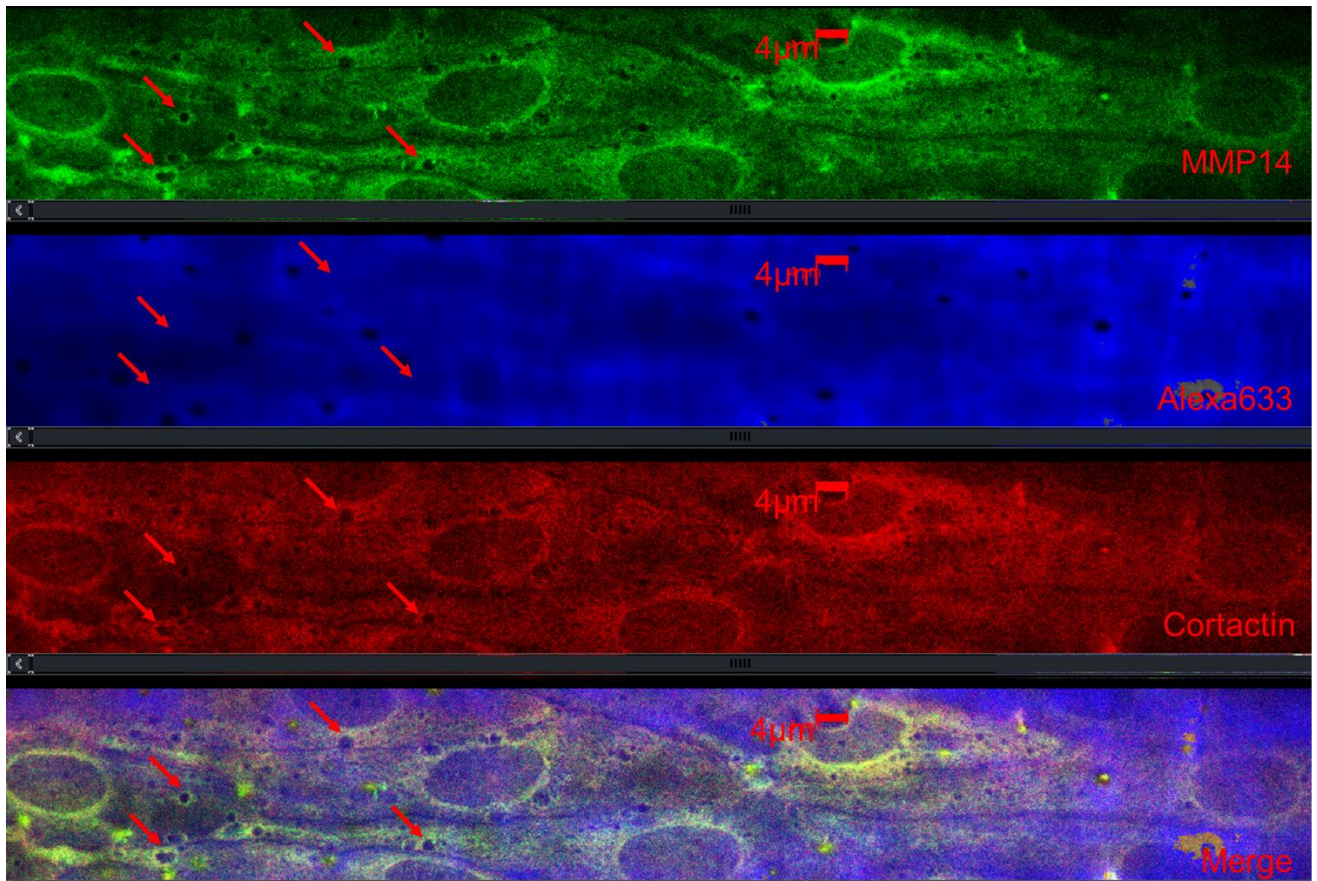


**Abb. 3.11: Quantitative Zusammenfassung der Abhängigkeit der Lochanzahl und -fläche von der Gefäßgröße.**

Die Lochanzahl nimmt von proximal nach distal zu kleineren Gefäßdurchmessern hin zu  $*p < 0.05$  vs. 225-235  $\mu\text{m}$  Durchmesser. Da die Einzellochfläche aber in kleineren Gefäßen auch signifikant kleiner ist ( $*p < 0.05$  vs. 175-185  $\mu\text{m}$ ) bleibt die Gesamtochfläche und der prozentuale Anteil der Lochfläche an der Gesamtfläche IEL unverändert.

### 3.2.4 Podosomennachweis in intakten Mesenterialgefäßen

Frisch präparierte Mesenterialgefäße ( $n = ??$ ) wurden kanüliert und unter Druck fixiert, spezifisch mit Antikörpern für MMP und Cortactin gefärbt und auf Co-Lokalisation überprüft. Wenige, wenn auch kleinere Rosetten, wurden in den Gefäßen nachgewiesen ( $9.2 \pm 4.3$  Podosomen pro  $\text{mm}^2$ ). Darüber hinaus fanden sich in der mit hoher Autofluoreszenz zu erkennenden IEL große Mengen an Cortactin und F-Aktin. Abb. 3.12 zeigt ein repräsentatives Beispiel.



**Abb. 3.12: Podosomen in intakten Gefäßen.**

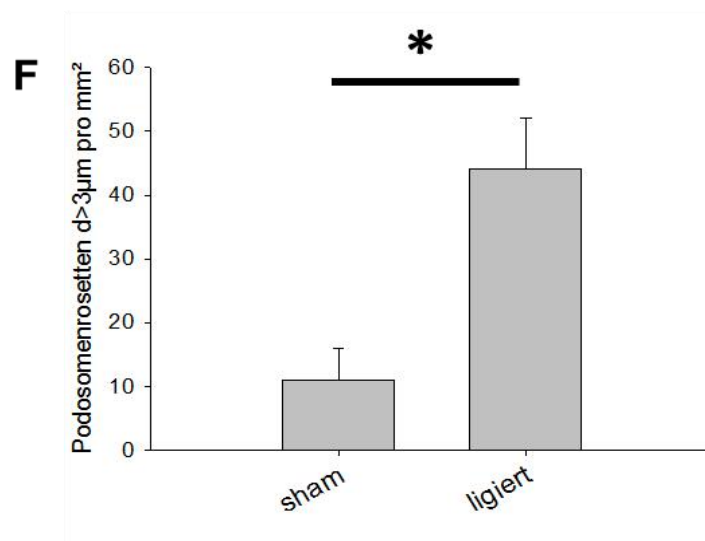
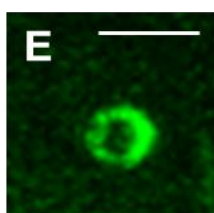
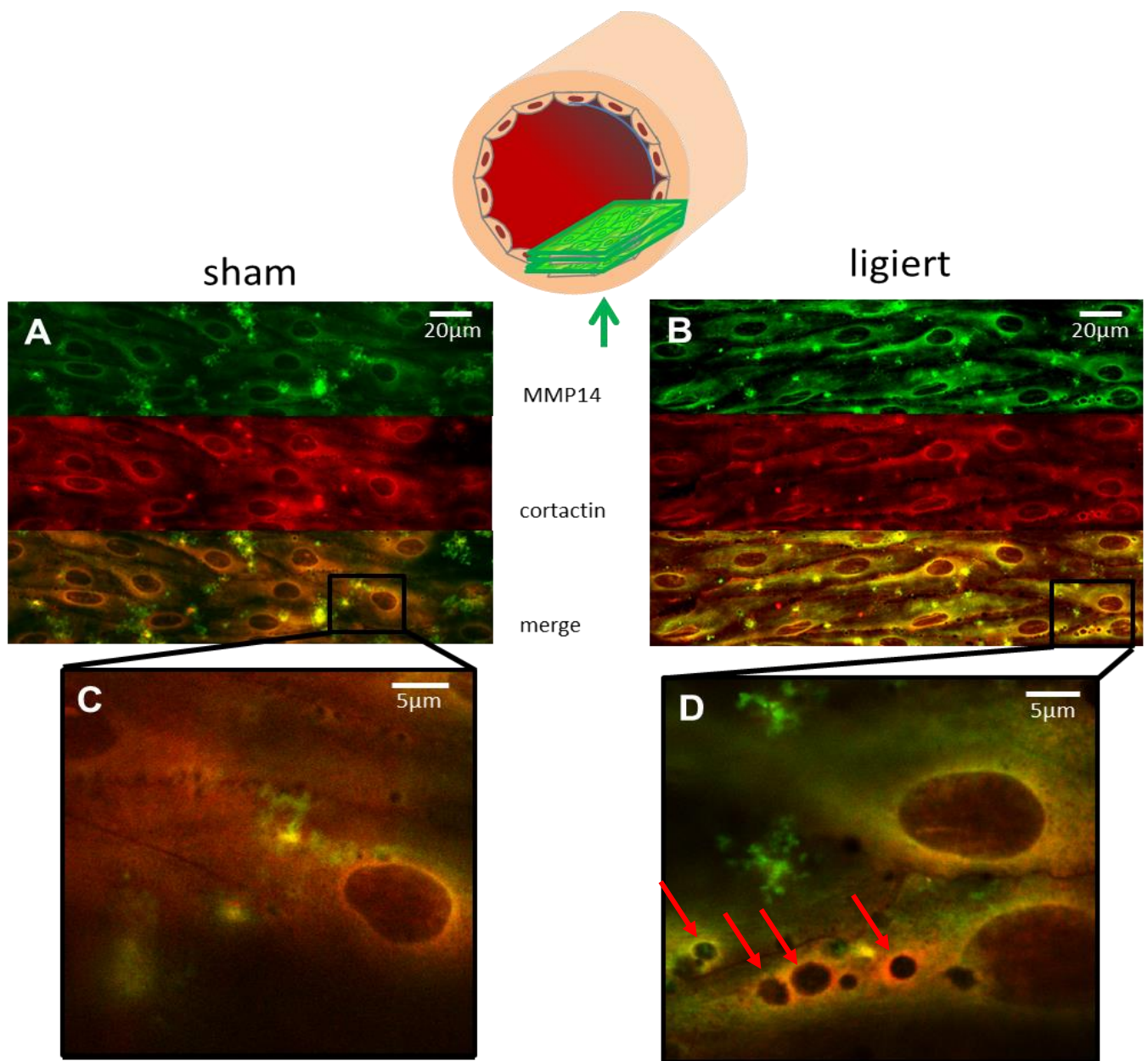
Kanülierte, und unter Druck fixierte Mesenterialgefäße zeigen in einer Dreifachfärbung mit MMP14 (MT1-MMP), Alexa 633 (als IEL-Marker) und Cortactin einzelne Podosomenrosetten im Endothel. Die kreisrunden Podosomenrosetten befinden sich nicht in der Nähe von IEL-Löchern. Stattdessen reichert sich hier MMP14 - und Cortactinantikörper aggregatförmig an. Letzteres ist vermutlich ein durch die luminale Antikörperapplikation bedingtes Artefakt

### 3.2.5 Podosomenbildung in ligierten Femoralgefäßen der Maus

Um eine mögliche Flussabhängigkeit (Shear-Stress-Abhängigkeit) der Podosomengenesse in Gefäßen in vivo zu untersuchen wurde jeweils ein Femoralgefäß von Mäusen ligiert (und damit der Fluss unterbrochen), während das kontralaterale Gefäß nur sham operiert wurde. Nach sieben Tagen wurden die unmittelbar distal der Ligationsstelle liegenden Gefäßabschnitte entnommen, fixiert, und nach Zellpermeabilisierung auf MMP14, Cortactin und die IEL gefärbt. In 5 sham behandelten Gefäßen, die physiologischen Shear-Stress über sieben Tage erfuhren, wurden im Mittel 10 Podosomenrosetten pro mm<sup>2</sup> nach den in den Methoden beschriebenen Kriterien gezählt. Dieser Wert stimmt gut mit dem überein, welchen wir

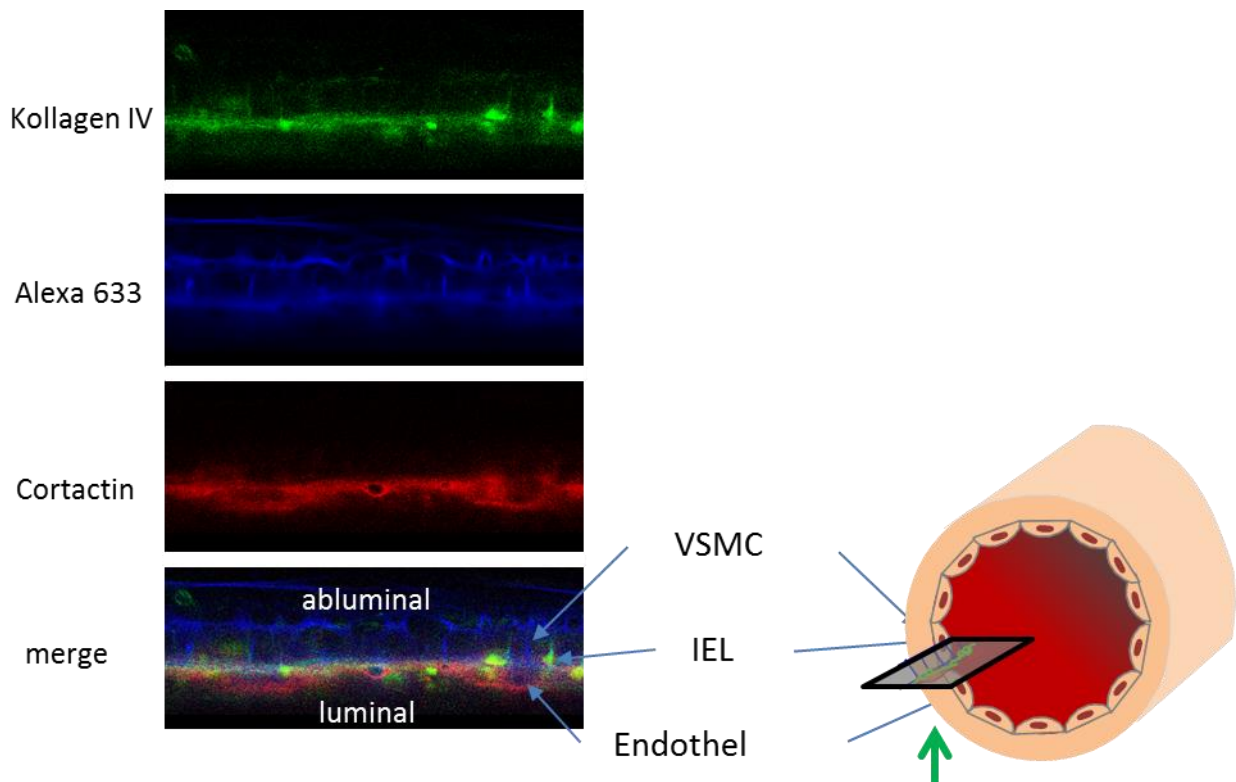
mit einem alternativen Podosome nachweis mit Hilfe von endogen exprimierten LifeAct ermittelten. Zudem entspricht der Wert dieser in Endothelzellen in situ ermittelte Wert demjenigen Wert, den wir zuvor in kultivierten Endothelzellen (HUVECs) unter Shear-Stress ermittelten (Vgl. Abb. 3.3 F  $8.4 \pm 0.75$  in kultivierten Endothelzellen (HUVECs) vs.  $9.2 \pm 4.35$  (siehe Abb. 3.13 F)). In den ligierten Gefäßsegmenten, die nur niedrigen bis gar kein Shear-Stress erfuhren, war der Podosome rosettenanteil signifikant höher (Abb. 3.13). Zur Darstellung der endothelseitigen Lokalisation der Podosome rosetten wurde die Basallamina mit Kollagen IV und die IEL mit Alexa633 gefärbt. Die Cortactinfärbung trat dabei nur luminal auf, was für die Darstellung von Endothelzelle podosome in den Cortactinfärbungen und eine weitgehende Undurchlässigkeit der IEL für luminal gegebene Antikörper spricht (Abb. 3.14).





**Abb. 3.13: Podosomformation des Endothels in normalen und ligierten Femoralgefäßen der Maus.**

Die Abbildung veranschaulicht die Aufnahmetechnik in isolierten, kanülierten Arterien unter Druck. Es wurden Schichtaufnahmen über 3µm parallel zum Endothel an der unteren Gefäßseite durchgeführt. A-B repräsentieren typische Aufnahmen aus fixierten Gefäßen, in denen Cortactin und MT1-MMP mit fluoreszierenden Antikörpern markiert wurden. Podosome können von interzellulären Lücken durch ihre Größe, ihre Kreisform, sowie durch die Co-Lokalisation von MT1-MMP und Cortactin abgegrenzt und dann ausgezählt werden. C-D stellen Vergrößerungen aus den Übersichtsaufnahmen A-B dar (Podosome sind mit einem roten Pfeil markiert). E detektiert die extrazelluläre Lokalisation von MT1-MMP an einer nicht permeabilisierten Endothelzelle in situ. Längsbalken: 5µm. F stellt die Auswertung nach den festgelegten Kriterien zur Podosome-Rosettenzählung dar. In ligierten, okkludierten Femoralarterien ohne Fluss finden sich signifikant mehr Podosome. n=5, Mittelwert±SEM, \*p<0.05.



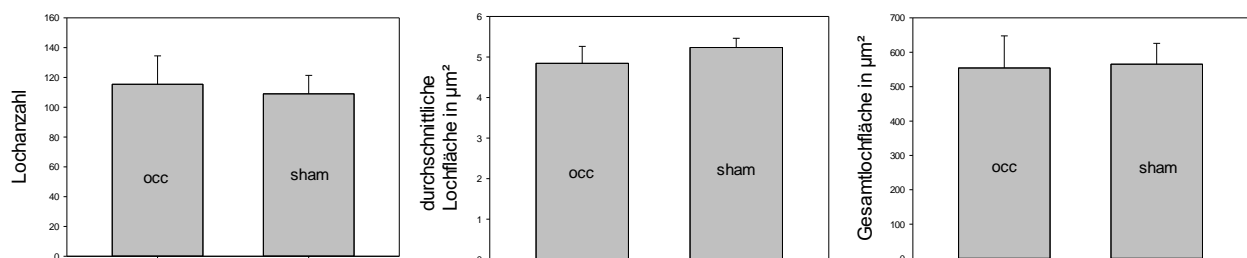
**Abb. 3.14: Nachweis der endothelialen Lokalisation der Podosome in Maus-Mesenterialarterien.**

Die Grafik zeigt die Wandaufnahmetechnik, um die endotheliale Lokalisation der Podosome festzustellen. Die Arterien wurden dreifach für Kollagen IV, Alexa633 und Cortactin gefärbt. Die zusammengefügte Aufnahme zeigt die Lokalisation der Cortactin-positiven Färbung mit einer Podosome-rosette auf der endothelialen Seite von der Kollagen IV-Färbung, welche die Basalmembran anfärbt. Zudem befindet sie sich auch luminal von der kräftigen Alexa 633-

Färbung, welche die IEL markiert. Da die Cortactinfärbung von intraluminal durchgeführt wurde, ist die Färbung auf die Endothelzellen beschränkt und es befinden sich keine Cortactin-positiven Strukturen in der Media, wo sich die glatten Muskelzellen befinden.

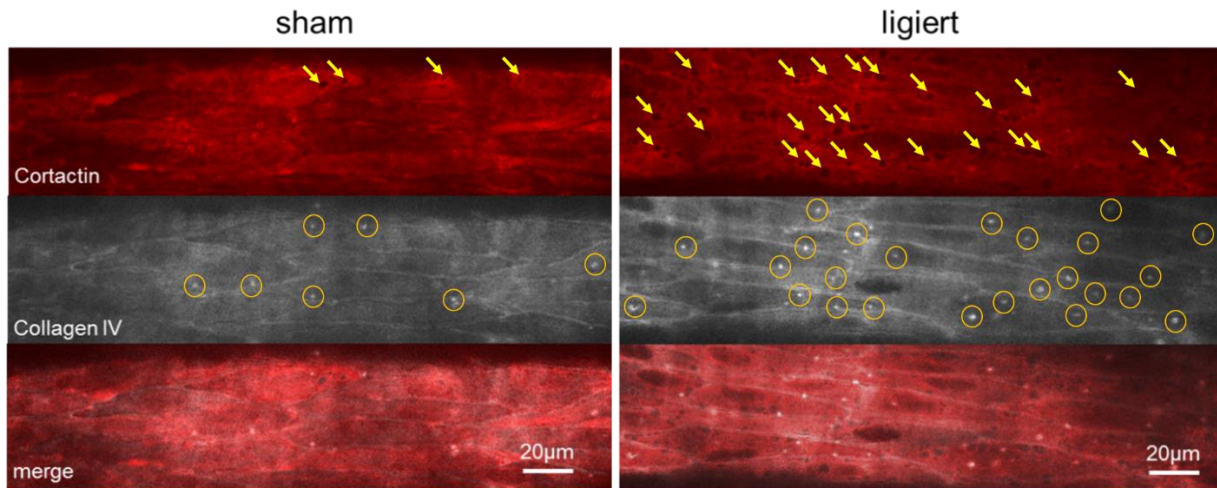
### 3.2.6 Keine Lochanzahlerhöhung in ligierten Femoralgefäßen der Maus

Trotz Erhöhung der Podosomenanzahl in den ligierten Gefäßabschnitten fanden sich in diesen keine signifikanten Änderungen der analysierten Lochparameter (Abb. 3.14). Tendenziell wurde jedoch erkennbar, dass die Ligatur und der verringerte Shear-Stress mit einer leicht höheren Lochanzahl bei kleinerer Lochgröße einher zu gehen schien, ähnlich den Befunden bei hohem Shear-Stress in der eintägigen Kultur von isolierten Gefäßen (Abb. 3.17). Auch die Basallamina, hier dargestellt mit Collagen-IV-Färbung, scheint trotz deutlich sichtbarer vermehrter Podosomenexpression unverändert zu sein (Abb. 3.16). Es finden sich keine Signalabschwächungen in der Kollagen IV-Färbung, auch nicht an Stellen an denen Podosomen auftreten. In dem dargestellten Bild scheint allerdings ein vermehrtes Auftreten des Antikörpers in IEL-Löchern vorzuliegen, was man mit Vorsicht als Anzeichen für eine erhöhte Durchlässigkeit der Basallamina bei erhöhter Podosomenexpression interpretieren könnte.



**Abb. 3.15: Kein Einfluss der Unterbrechung der Durchblutung auf die Lochanzahl in Femoralgefäßen der Maus in vivo**

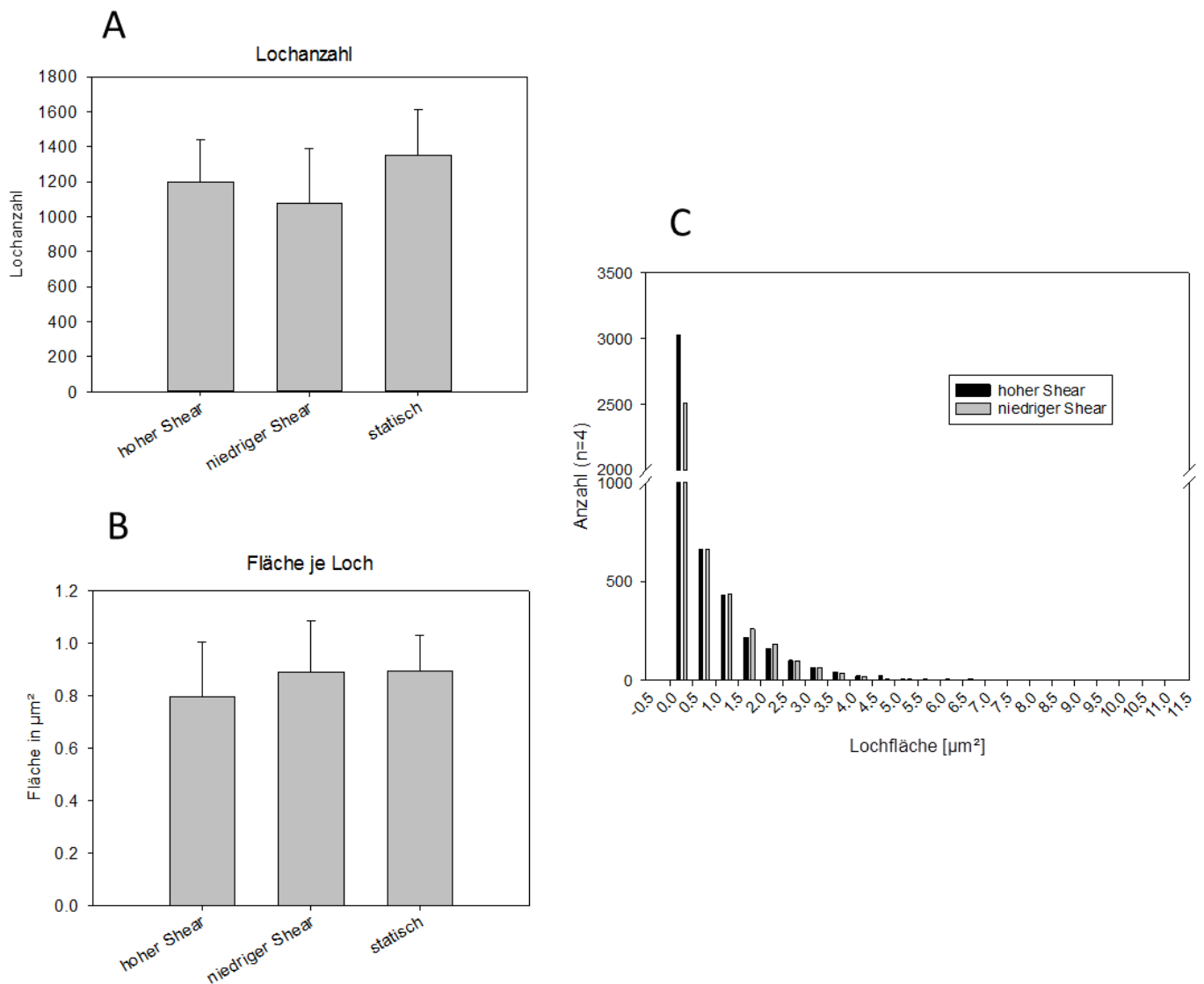
Alle drei Parameter zur Veränderung der IEL (Lochanzahl, durchschnittliche Lochfläche und Gesamtlochfläche) blieben nach Ligatur verglichen zur Sham-Operation unverändert. Wie aus der Abb. 3.12 F hervorgeht, war die Podosomenanzahl in diesen Gefäßen signifikant verändert. Mit den angewendeten Darstellungs- und Mikroskoptechniken konnte somit kein Einfluss der Podosomenbildung auf die IEL-Dynamik und insbesondere deren Lochanzahl festgestellt werden. Occ = ligierte Gefäße (n=6); sham = sham-operierte Gefäße aus derselben Maus (n=6). Schön ist diese Bild ja nicht (Beschriftung) Man könnte eher –und problemlos - eine Tabelle draus machen



**Abb. 3.16: Unveränderte Färbung der Basallamina mit Kollagen IV-Färbung trotz erhöhter Podosomenexpression in ligierten Femoralgefäßen der Maus**

Sieben Tage nach Ligatur kommt es zu einer sichtbaren Erhöhung der Podosomenrosettenexpression (gelbe Pfeile) in ligierten Femoralgefäßen (roter Kanal: Cortactin). Morphologisch sind allerdings keine Abdrücke oder Löcher in der Basallamina (grauer Kanal: Collagen IV) an den Stellen der Podosomenexpression nachweisbar. Nur in Kernarealen der Endothelzellen scheint es zu einer Signalabnahme im Collagen-IV-Kanal zu kommen. Es fällt zudem eine stärkere punktförmige Anreicherung von Antikörper in den IEL-Löchern in den ligierten Gefäßen auf (orange Kreise).

### **3.2.7 Keine Lochanzahlveränderung in isolierten und für 24 h kultivierten Gefäßen durch Variation des Shear-Stresses während Kultur**

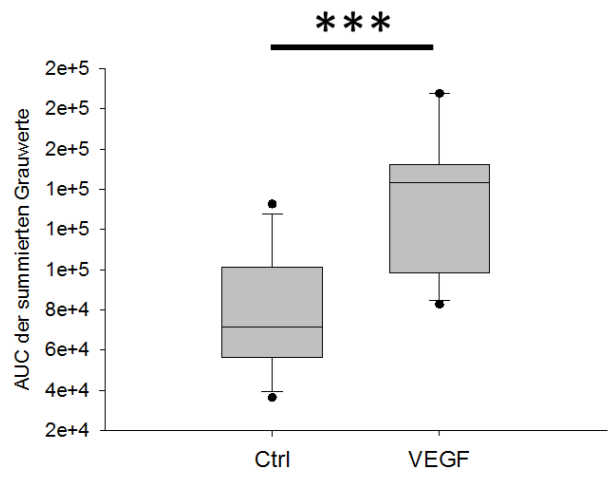
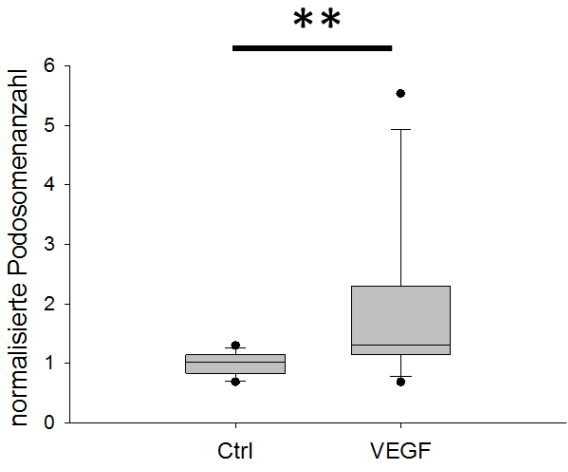
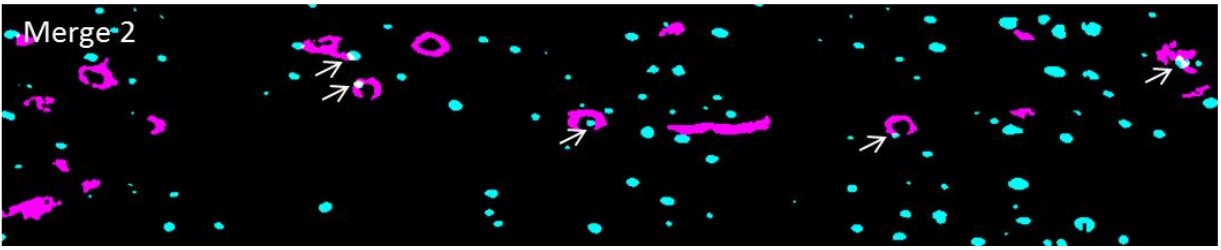
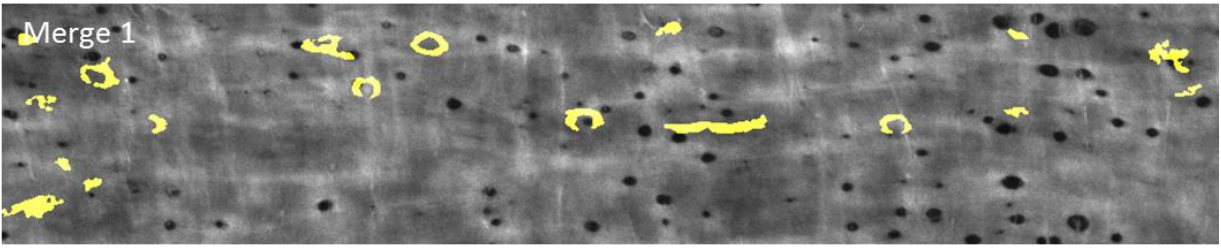
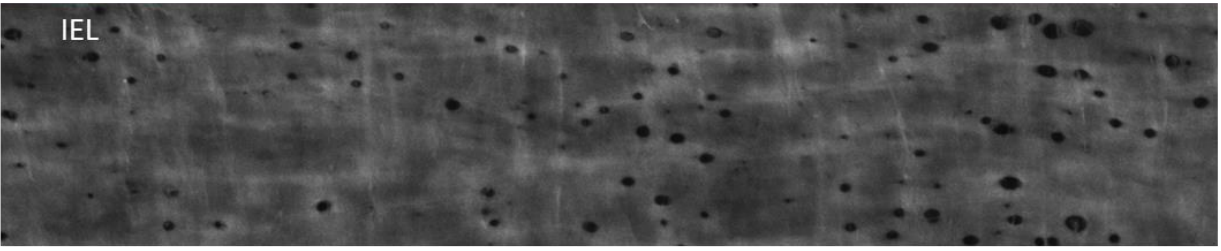
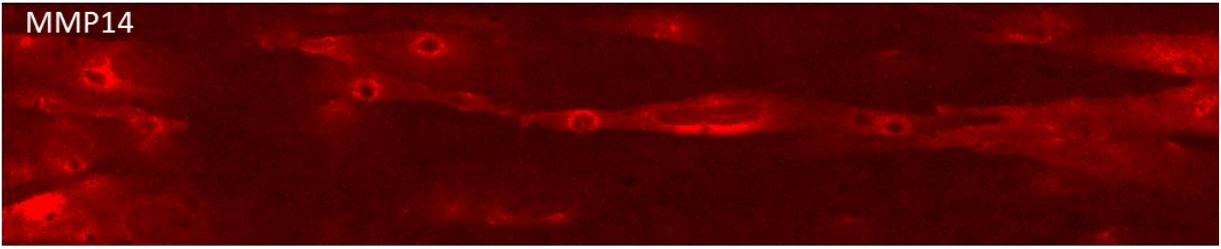
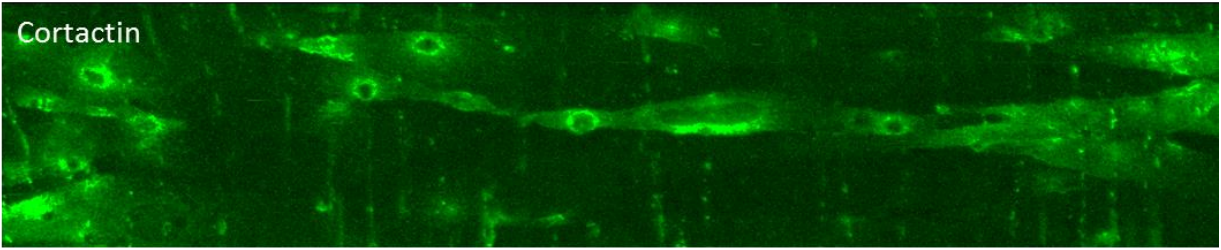


**Abb. 3.17: Erhöhter Shear-Stress führt nach 24h Kultur nicht zu einer Veränderung der Lochanzahl**

In Gefäßen, die für 24h kultiviert wurden und mit hohem oder niedrigem Shear (0,5dyn vs. 10dyn) behandelt wurden, zeigten sich nach Auswertung mit ImageJ keine Unterschiede in der Lochanzahl **(A)** und Gesamtlochfläche **(B)**. **C**, es fällt allerdings auf, dass die kumulative Anzahl (aus 4 Gefäßen) der kleinen Löcher von (0,0-0,5 $\mu\text{m}^2$ ) in der Gruppe mit hohem Shear-Stress tendenziell erhöht war (nicht signifikant), während größere Löcher (>0,5 $\mu\text{m}^2$ ) in beiden Gruppen etwa gleichhäufig vorkamen.

### 3.2.8 VEGF-induzierte Stimulation von Podosomen in kultivierten Gefäßen

Um zu überprüfen ob auch in intakten Gefäßen eine VEGF-Stimulation ähnlich wie in HUVECs zu einer Induktion der Podosomenrosettenbildung führen kann, wurden isolierte Gefäße für einen Tag mit VEGF von luminal exponiert während sie mit einer Flussrate von 1ml/h perfundiert wurden. Nach 24h zeigte sich eine Erhöhung der Podosomenrosetten um 30% in den VEGF behandelten Gefäßen (Abb. 3.18 B). Im Einklang mit den Daten aus dem Ligationsmodell an Femoralgefäßen ging diese Erhöhung allerdings nicht mit Veränderungen an den IEL-Lochparametern einher (Lochanzahl: 173 $\pm$ 11 vs. 155 $\pm$ 26 je 0,015mm<sup>2</sup>; mittlerer Lochdurchmesser: 2,14 $\pm$ 0,08 $\mu$ m vs. 2,42 $\pm$ 0,14 $\mu$ m; Gesamtlochfläche: 371 $\pm$ 41 $\mu$ m<sup>2</sup> vs. 375 $\pm$ 61 $\mu$ m<sup>2</sup> je 0,015mm<sup>2</sup>). Überraschenderweise überschneidet sich in diesem Modell aber bei 36% der Podosomen das Doppelfärbesignal aus Cortactin- und MMP14-Färbung mit einem IEL-Loch (weiße Pfeile im Merge2 Bild der Abb. 3.18 A).



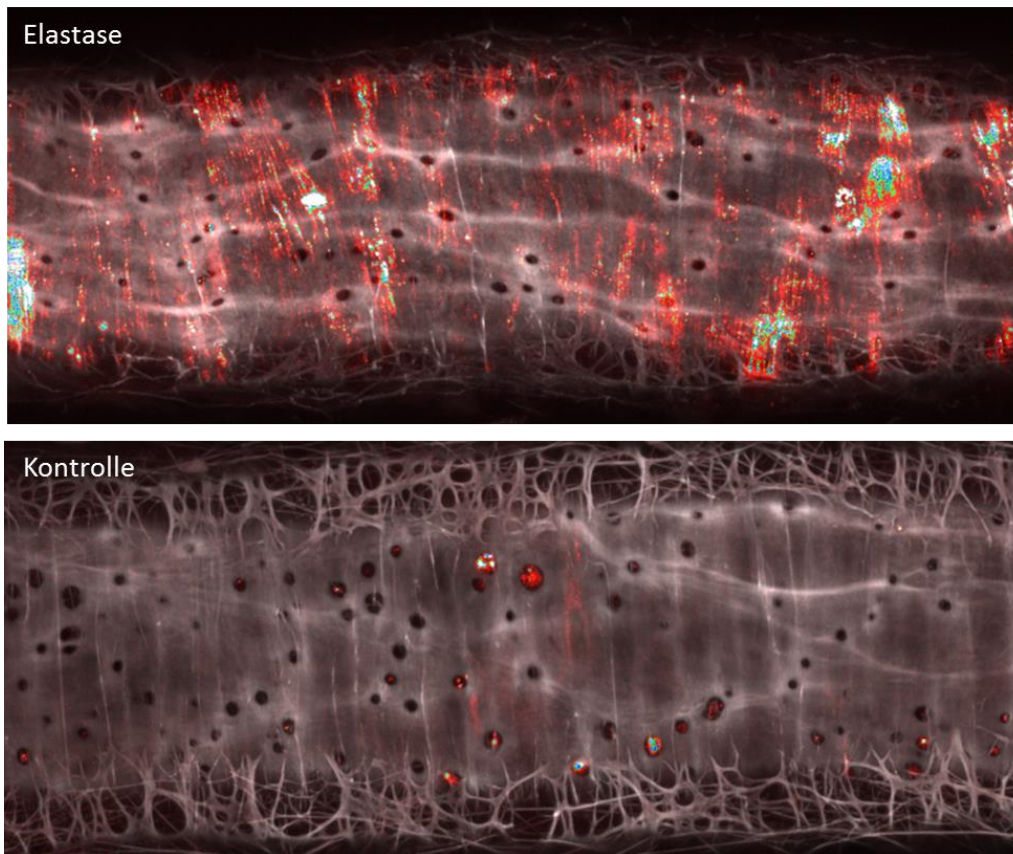
### **Abb. 3.18: VEGF-abhängige Podosomenbildung führt nicht zur Veränderung der IEL-Lochparameter in kultivierten Gefäßen:**

Mesenterialgefäße (~250µm) wurden mittig geteilt, und diese Gefäßpaare jeweils über 24h mit L-15-Medium und mit oder ohne 20ng/ml VEGF perfundiert, Podosomen wurden in einer Doppelfärbung mit Cortactin und MMP14 dargestellt **(A)**. Des Weiteren wurde die IEL gefärbt. Mit einem Algorithmus basierend auf der Fiji (ImageJ)-Software wurden die Podosomen, IEL-Löcher und ihre Überschneidungen mit Lochlokalisationen ermittelt, gezählt und ausgewertet. VEGF-Inkubation führt zu einer Erhöhung der Podosomenrosettenanzahl um 30% **(B)** ohne die Lochparameter der IEL zu beeinflussen. Dagegen nahm die Permeabilität der IEL, gemessen am Antikörperdurchtritt in die VSMC-Schicht, signifikant zu **(C)**. n=12/11 Areale (Ctrl/VEGF), vier Gefäße, 2 Mäuse; \*\*p<0,001, Mann-Whitney Rank Sum Test; p<0.0001, t-test.

### **3.2.9 Elastase-Behandlung erhöht die Gefäßwand-Permeabilität ohne die IEL-Lochparameter zu beeinflussen**

Intraluminale Elastasebehandlung an Mesenterialgefäßen führte bereits nach 15 Minuten zur sichtbaren Elongation der Gefäße. Bei diesen Gefäßen wurde in das Gefäßlumen ein unspezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper appliziert um Änderungen der Gefäßwandpermeabilität für Proteine nach Elastasebehandlung zu untersuchen. Nach Elastasebehandlung sah man eine deutliche Anreicherung des Antikörpers in der glattmuskulären Schicht verglichen mit Kontrollbedingungen (Abb. 3.18). Diese vermehrte Anreicherung ging jedoch weder in frisch isolierten Gefäßen noch nach eintägiger Kultur mit einer signifikanten Änderung der IEL-Lochparameter einher. Austritt von Antikörper durch traumatische, durch die Präparation der Gefäße verursachte Gefäßläsionen konnte ausgeschlossen werden da dies zu einer passiven Reduktion des Durchmessers als auch einer Erhöhung des Flüssigkeitspiegels im Organbad geführt hätte.



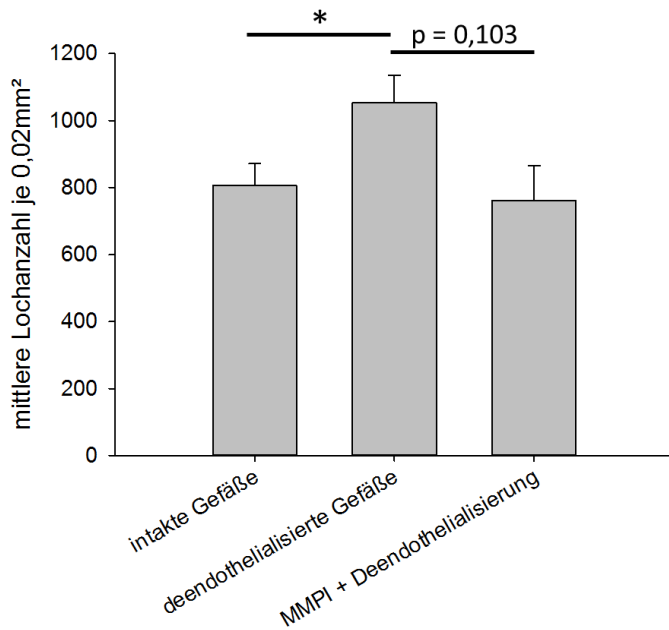


**Abb. 3.19: Elastasebehandlung an Mesenterialgefäßen führt zur vermehrten Durchlässigkeit der IEL ohne die IEL-Lochanzahl zu verändern**

Mesenterialgefäße wurden luminal für 15 Minuten mit oder ohne 5U/ml Elastase behandelt. Feuerfarben ist der sekundäre Antikörper (goat anti-mouse 546nm) in den elastase-behandelten Gefäßen in der glattmuskulären Schicht zu sehen, während dieser in Kontrollgefäßen die IEL-Membran nicht passiert.

### **3.2.10 Lochanzahlerhöhung in deendothelialisierten Gefäßen**

Während Änderung des Shear-Stresses, VEGF- oder Elastasegabe die IEL morphologisch nicht sichtbar beeinflussten, führte eine Deendothelialisierung der Gefäße nach 30 Minuten zu einer signifikanten Erhöhung der Lochanzahl in der IEL (der mittlere Lochdurchmesser und die Gesamtlochfläche waren nicht signifikant verändert (nicht dargestellt)). Dieser Effekt konnte durch vorherige Gabe eines MMP-Inhibitors verhindert werden (Abb. 3.19).



**Abb. 3.20: Effekt der Deendothelialisierung auf die IEL-Lochanzahl**

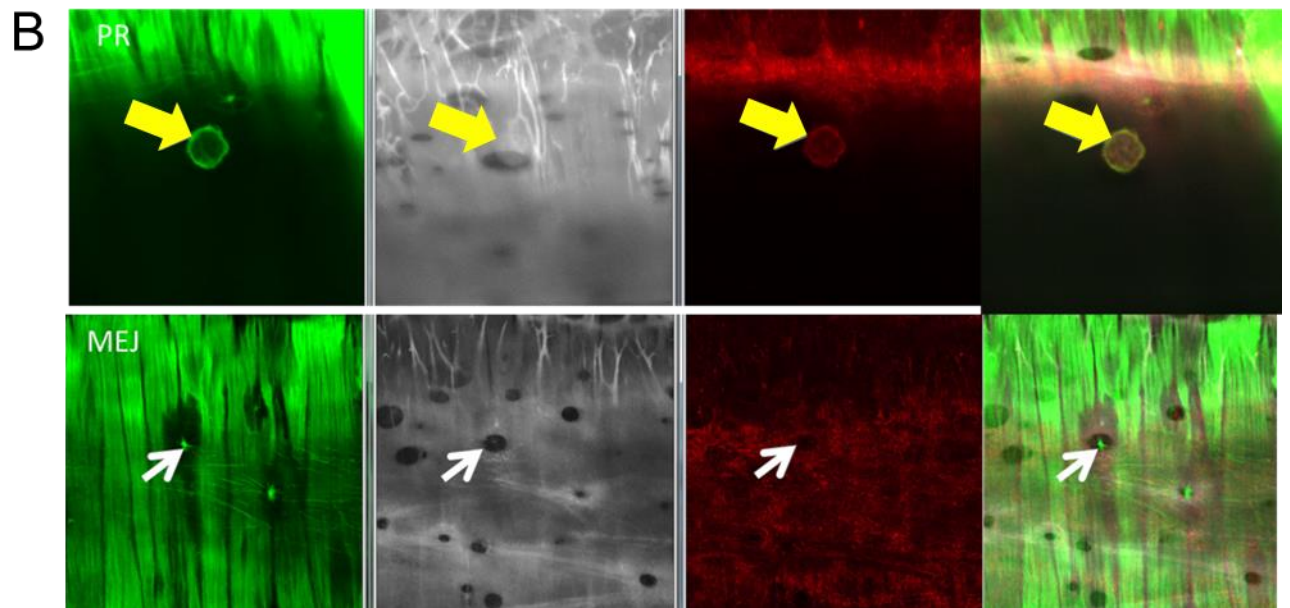
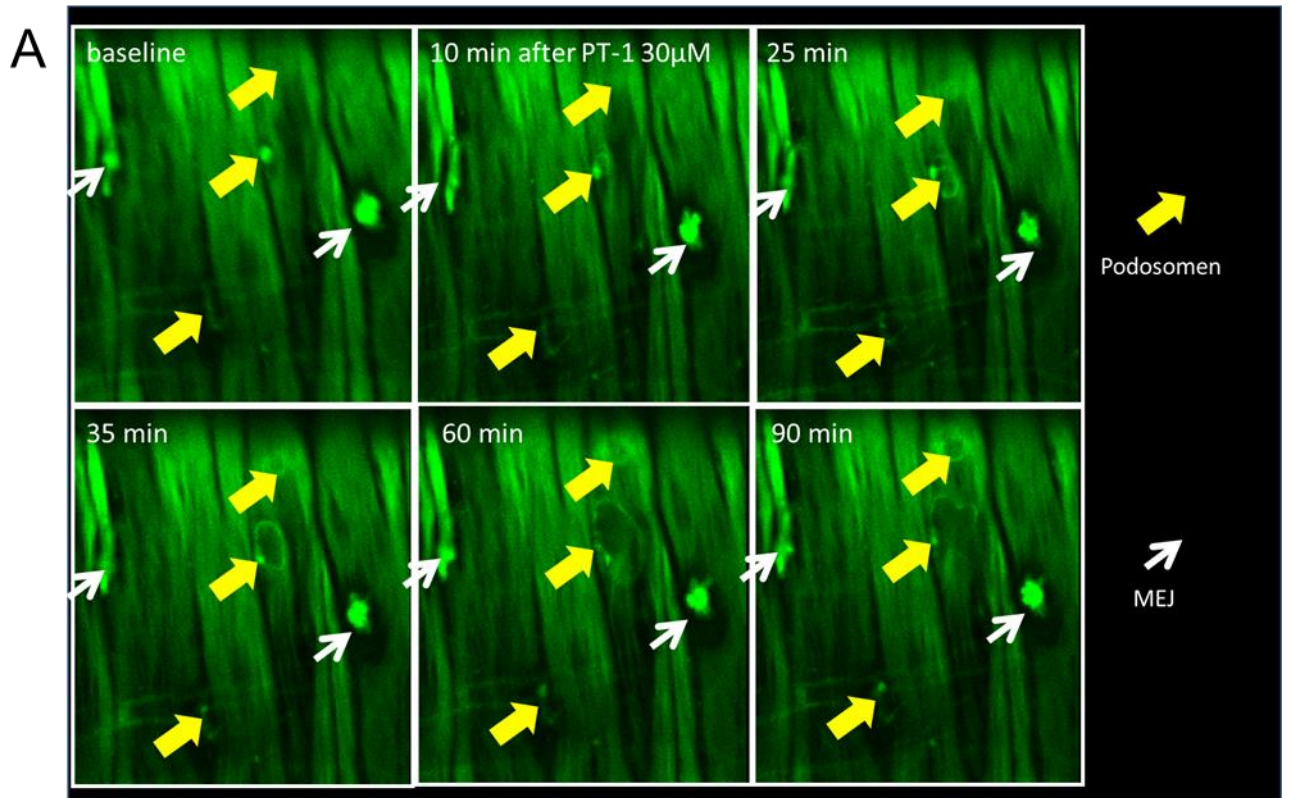
Deendothelialisierte Gefäße haben nach 24h Kultur eine höhere Lochanzahl als Gefäße mit intaktem Endothel. MMP-Inhibitor Gabe (GM 6001 15µM) hebt diesen Effekt auf. n=16 [intakt], n=7 [deendothelialisiert], n=4 [deendothelialisiert + MMPI]; \*p<0.05 One Way ANOVA, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks.

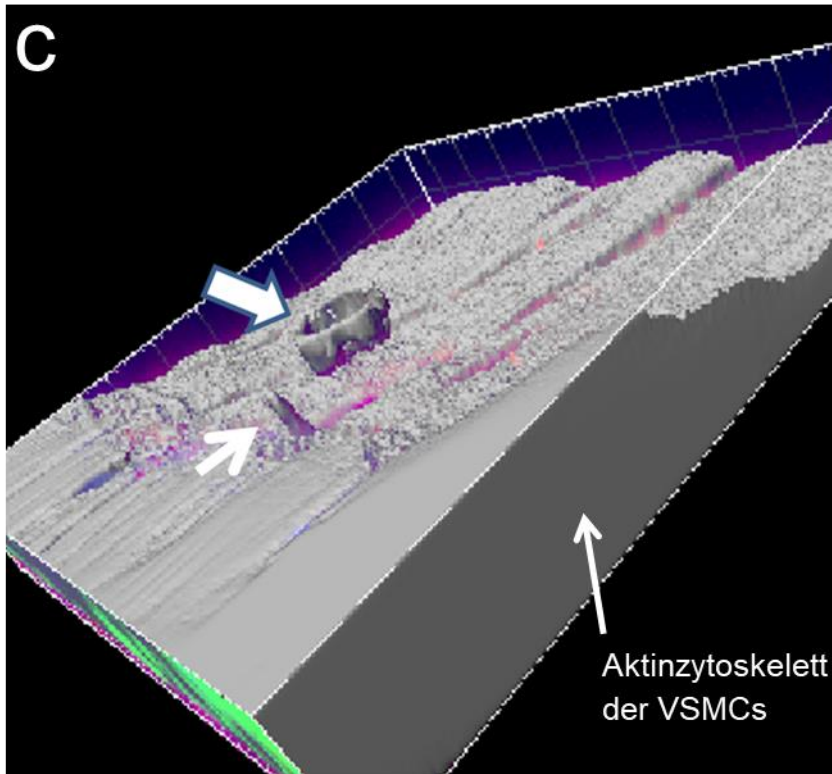
### 3.2.11 Podosomendynamik und Abgrenzung von Podosomen und myoendothelialen Junctions in Gefäßen der LifeAct-Maus

Wie in Abbildung 1.6. ersichtlich ist F-Aktin ein integraler Bestandteil bei der Formation von Podosomenrosetten. Wir untersuchten daher LifeAct-Gefäße, in welchen F-Aktin-Veränderungen in-vivo dargestellt werden können. Wir definierten kreisrunde Strukturen geeigneter Größe (3-15 µm) in diesen Gefäßen als Podosomen. Interessanterweise zeigten sich bei Zeitrafferaufnahmen an isolierten Mesenterialgefäßen von LifeAct-Mäusen die dynamische Entstehung bzw. das nachfolgende Verschwinden von Podosomenrosetten. In etwa jedem zweiten 2mm-langen Abschnitt eines kanülierten Gefäßes unter physiologischem Innendruck waren auf eine Gesamtfläche von ~50000µm<sup>2</sup>, 10 Podosomen pro mm<sup>2</sup> simultan zu beobachten). Durch den höheren Aktin Gehalt der die Endothelzellen überlagernden glatten Muskelzellen und aufgrund der veränderten Technik ohne Notwendigkeit von Antikörpern zeigten sich die rosettenähnlichen Strukturen (Podosomenrosetten)

häufiger und deutlicher an der vermutlich glattemuskulären Seite (keine Alexa633-Färbung und damit IEL-Darstellung in in-vitro unfixierten Gefäßen durchgeführt).

Die untersuchten Rosetten zeigten bei Raumtemperatur eine hohe Dynamik: Einzelne untersuchte Rosetten gewannen über 60min an bis zu 5µm an Größe und andere Rosetten konnten ebenso schnell wieder verschwinden. Bei der Darstellung von Podosomenrosetten in Gefäßen von LifeAct-Tieren fielen weiterhin oftmals punktförmige Strukturen in der IEL Ebene auf. Zur endothelialen Seite hin setzte sich diese punktförmige Struktur in eine sternförmige Aktinanordnung fort. Solche Strukturen konnten etwa jedem 5-10 IEL-Loch zugeordnet werden. Dabei handelte es sich sehr wahrscheinlich um endotheliale Protrusionen, welche durch die IEL Löcher einen Kontakt zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen herstellen, die inzwischen in einer separaten Promotionsarbeit weiter untersucht wurden. Durch zusätzliche Färbung mit Alexa633 und Cortactin ließen sich Podosomen von diesen myoendothelialen Junctions eindeutig abgrenzen (Abb. 3.21 B), da Podosomenrosetten immer kreisförmig waren und exklusiv Cortactinstruktur aufwiesen und normalerweise überwiegend nicht im Bereich von Lochstrukturen auftraten.





**Abb. 3.21: Podosomendynamik und Abgrenzung zu myoendothelialen Junctions (MEJ).**

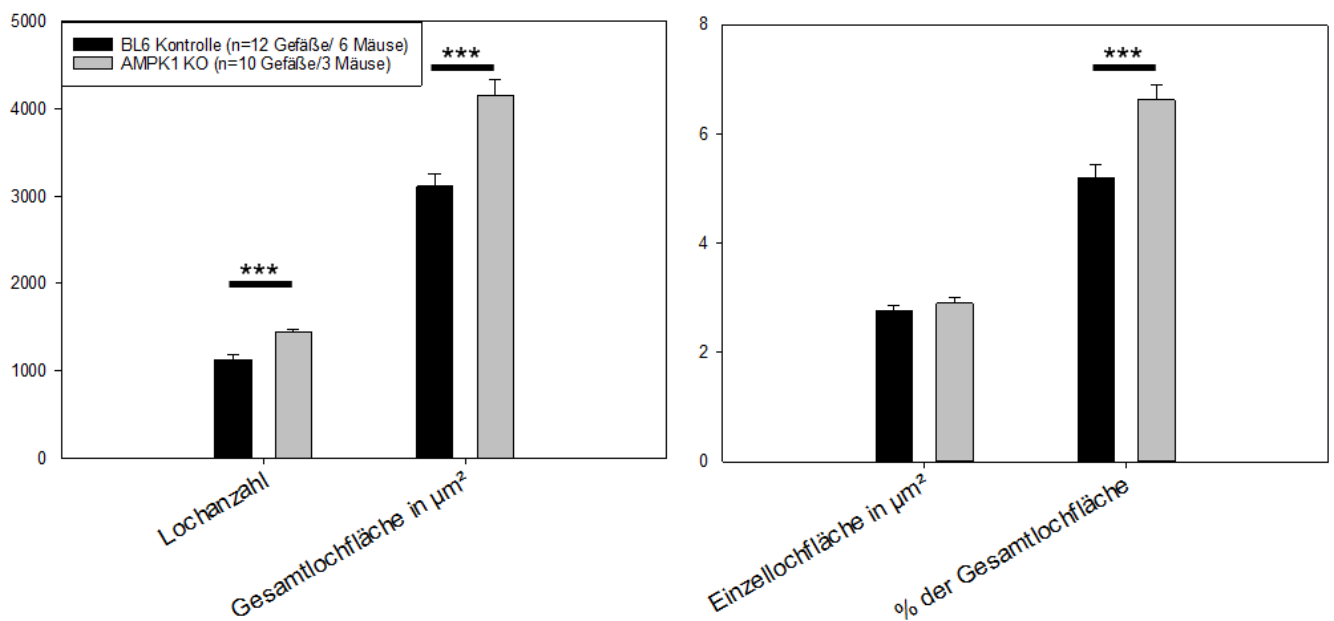
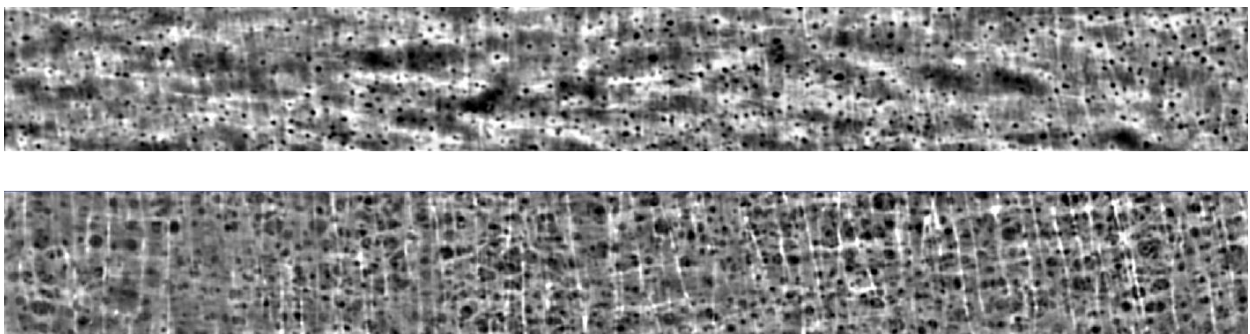
**A**, Darstellung von Auf- und Abbau von Podosomenrosetten in kanülierten LifeAct Gefäßen über 90 Minuten bei Raumtemperatur. Die MEJ veränderten sich dagegen im Beobachtungszeitraum weniger dynamisch. **B**, Nachweis der Doppelfärbbarkeit von Podosomenstrukturen (untere Reihe) mit Cortactin (roter Kanal) während MEJ (obere Reihe) keine Co-Färbung mit Cortactin zeigen. **C**, dreidimensionale Rekonstruktion einer Podosomenrosette (grau: Aktin) die einen deutlichen Abstand zum ebenfalls grau gefärbten Aktin-zytoskelett der darunterliegenden glatten Muskelzellen aufweist. Der ebenfalls rekonstruierte stielartige zentrale Anteil einer endothelialen Protrusion reicht dagegen scheinbar bis in die Schicht der glatten Muskulatur hinab (Aktin der glatten Muskelzellen in grau).

### 3.3 AMPK und IEL-Veränderungen

#### 3.3.1 erhöhte Lochanzahl in AMPK1 KO-Mäusen

In einer Arbeit von 2012 zeigten Wang et al., dass der Knockout der AMPK $\alpha$ 1 Untereinheit in Kombination mit einem Knockout von ApoE in Mäusen zu einer

erhöhten Inzidenz von abdominalen Aneurysma nach Nikotin oder Angiotensin II-Infusion führte (Wang et al., 2012). In diesem Kontext überprüften wir, ob die IEL in AMPK $\alpha$ 1-KO-Tieren möglicherweise generell verändert ist und ob dabei ein Zusammenhang mit der endothelialen Podosomenrosettenexpression besteht. In der Tat zeigte sich in AMPK $\alpha$ 1-KO-Mäusen eine IEL mit erhöhter Lochanzahl als auch erhöhter Gesamtlochfläche im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkontrollen (Abb. 3.22 B). Überraschenderweise ging dies aber nicht mit einer Erhöhung der Podosomenzahl einher, die erstaunlicherweise sogar erniedrigt war (Abb. 3.23 C:  $3.3 \pm 1.8$  AMPK $\alpha$ 1-KO vs.  $12 \pm 4.9$  CLB57/BL6 Kontrolle).

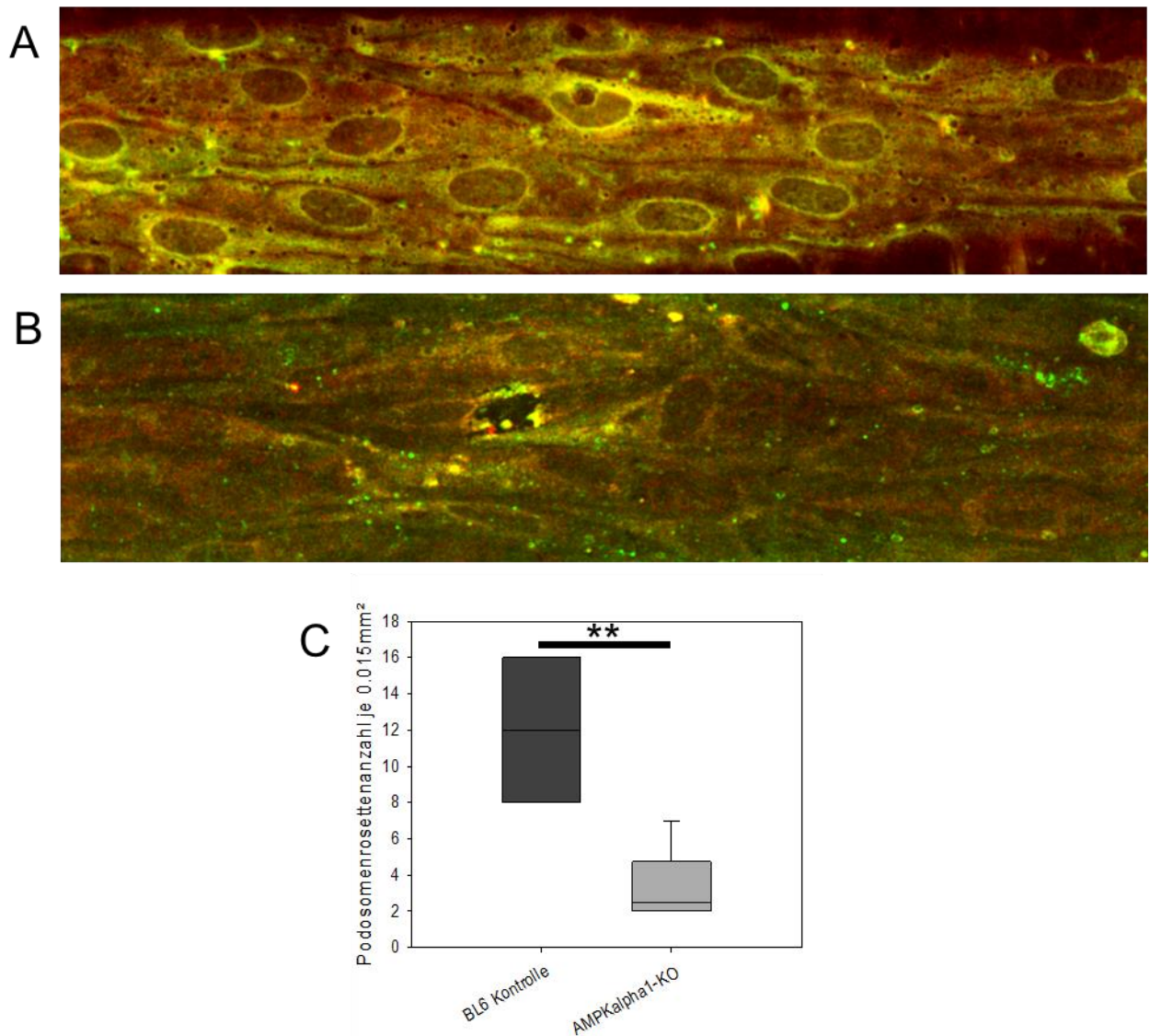


**Abb. 3.22: AMPK $\alpha$ 1-KO hat eine „löcherigere“ IEL**

Vergleich von Repräsentative Abbildungen von Additionsberechnungen der Maximalprojektionen von Schnittaufnahmen (Ebenen) ( $3\mu\text{m}/5\text{Schichten}$  Abstand  $500\mu\text{m}$ ) von Gefäßen ( $225\text{-}235\mu\text{m}$  Durchmesser) aus je einer CLB57/BL6 Maus (**A**) und einer AMPK $\alpha$ 1-KO-Maus (**B**). Statistische Auswertung der IEL-Lochparameter: Lochanzahl,

Gesamtlochfläche und der prozentuale Anteil der Lochfläche sind in den AMPK1-KO signifikant erhöht während die Einzellochfläche nicht verändert ist. \*\*\* $p < 0.001$  T-Test.

### 3.3.2 verringerte Podosomenrosettenzahl im Endothel von AMPK1 KO-Mäusen



**Abb. 3.23: AMPK $\alpha$ 1-KO haben weniger Podosomenrosetten in Mesenterialgefäßen**

Repräsentative Abbildungen von Additionsberechnungen der Maximalprojektionen von Schnittaufnahmen (Ebenen; 3 $\mu$ m/ 6Schichten Abstand 500 $\mu$ m) von kanülierten, unter Druck gesetzten und gefärbten Mesenterialgefäßen aus einer CLB57/BL6- **(A)** bzw. einer AMPK $\alpha$ 1-KO-Maus (grün: Cortactin, rot: MMP 14) **(B)**. Statistische Auswertung der Podosomenanzahl: AMPK $\alpha$ 1-KO exprimiert signifikant weniger Podosomenrosetten. \*\* $p < 0.01$  T-Test (n=3 Gefäße aus 3 Mäusen für CLB57/BL6-Mäuse und n=6 Gefäße aus 3 Mäusen für AMPK $\alpha$ 1-KO-Mäuse)





## 4. Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde gezeigt, dass kultivierte Endothelzellen und Gefäßendothel in situ Podosomen formen können, Strukturen, die dafür bekannt sind, dass sie Enzyme, wie Matrix-Metalloproteinasen ausschütten, die wichtig für den Abbau der extrazellulären Matrix um diese Endothelzellen herum sind. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Bildung von Podosomen Shear-Stress abhängig ist, wobei das Fehlen von Shear-Stress mit der stärksten Podosomenbildung einherging. Damit assoziiert war ein angiogener Phänotyp mit höherer Ausschüttung an Matrix-Metalloproteinasen, höherem Umsatz von extrazellulären Matrixkomponenten und einer erhöhten Migrationsaktivität der Endothelzellen. Hoher Shear-Stress inhibierte dagegen die Podosomenbildung mit deren funktionellen Auswirkungen, d.h. die Gefäßstruktur wurde stabilisiert.

Bei der Analyse der molekularen Grundlagen der Regulation der Podosomendynamik scheinen die VEGF-Ausschüttung, und in zweiter Linie auch die Expression der VEGFR2-Rezeptoren eine Schlüsselrolle zu spielen. Shear-Stress führte dabei zu einer Herunterregulation der VEGF-Freisetzung. Dieser Effekt wurde teilweise durch eine Erhöhung des VEGF-Rezeptorbesatzes kompensiert. In Gefäßen und Situationen mit hohem Shear-Stress ist daher eine Erhöhung von VEGF als Stimulator der Podosomenbildung wirksam, während unter statischen Bedingungen (bzw. Ausfall der Durchblutung) die Endothelzellen bereits eine „Sättigung“ mit parakrin freigesetzten mit endogenem VEGF vollriegt, diese also bereits maximal stimuliert sind und zusätzliche VEGF-Gabe keinen weiteren Effekt auf die Podosomenbildung hat. Auch in kultivierten Gefäßen traten endothelseitig Podosomen auf und wurden vermehrt unter no-flow Bedingungen (FAL-Modell) und nach VEGF-Stimulation in Gefäßen unter niedrigem Shear-Stress exprimiert. Auf die IEL-Morphologie und speziell auf ihre Lochstruktur scheinen Änderungen der Podosomenzahl jedoch – zumindest in den untersuchten kurzen Zeiträumen (bis zu sieben Tagen) - jedoch keinen Einfluss zu haben. Allerdings ist die Durchlässigkeit der IEL nach VEGF-Stimulation für Proteine höher. Dies ist ebenso in Elastase-behandelten Gefäßen der Fall. Da die Durchlässigkeit der IEL an fixierten Gefäßen untersucht und beobachtet wurde, scheinen Veränderungen der IEL (oder der IEL-Löcher), und nicht eine erhöhte Endothelpermeabilität für diesen Effekt verantwortlich zu sein.

## 4.1 Podosomendefinition und Auswertung

Podosomenrosetten sind kreisrunde hochspezialisierte Membranstrukturen, die unter anderem eine wichtige Rolle in der Angiogenese und bei der Aufzweigung von Gefäßen (*vascular branching*) spielen sollen (Seano & Primo, 2015; Seano et al., 2014). Sie kommen gehäuft in Endothelzellen vor und hinterlassen durch ihre intrinsische proteolytische Aktivität durch Proteinverdau Abdrücke in Matrixflächen. Vor allem HUVECs wurden vielfach als Träger von Podosomenrosetten beschrieben (Daubon, Spuul, Alonso, Fremaux, & Génot, 2016; Osiak, Zenner, & Linder, 2005; J. Wang et al., 2009).

In 2D-Kulturen werden Podosomen üblicherweise durch Kolokalisation von F-Actin (in der Regel durch Phalloidin-färbung) mit einem Aktin-bindenden Protein, wie zum Beispiel Cortactin oder TKS5 und ihre Lokalisation an der luminalen ventralen Seite von Endothelzellen charakterisiert. Des Weiteren dient der Nachweis einer lokalen proteolytischen Aktivität als Definitions- und Darstellungskriterium für Podosomen (D. A. Murphy & Courtneidge, 2011). Podosomen sind hochdynamische Strukturen, die durch ständigen Auf- und Abbau eine sehr kurze Umsatzzeit von 2-20 Minuten haben (D. A. Murphy & Courtneidge, 2011), Unsere Daten an kanülierten Gefäßen der LifeAct-Maus zeigen das Auftreten und Verschwinden von Podosomenrosetten in Gefäßen über 60 Minuten bei Raumtemperatur und bestätigen die hohe Dynamik dieser Strukturen. Daher ist die Zahl der nach Fixation und Immunfluoreszenzfärbung vorliegenden Podosomen weit unter der Zahl der Extrazellulärmatrixdefekte, die das Korrelat der proteolytischen Aktivität aller Podosomen die in einem längeren Zeitraum gebildet wurden, liegt (Gimona et al., 2008). Um diesen Umsatz untersucherunabhängig automatisch auszuwerten, wurde ein computerisierter Algorithmus verwendet, der dunkle, d.h. proteolytisch abgebaute Areale in der ansonsten grünlich fluoreszierenden Gelatinematrix erfassen und quantifizieren konnte. Durch die Auswertung der Intensitätsunterschiede des Gesamtbildes wurden herkömmliche Bildanalyseprozeduren zur Darstellung von einzelnen Partikeln mit Schwellenwertbildung, Partikelabgrenzung und Randerkennung vermieden. Als Resultat korrelierten die so ausgewerteten Matrixstrukturen gut mit den gezählten,

typischen, kreisrunden und 3-15µm großen proteolytischen Podosomenabdrücken in der Gelatinematrix.

## **4.2 Dynamik und Regulation der Podosomenbildung in verschiedenen Zelltypen**

Während es in HUVECs unter statischen, mechanisch unstimulierten Bedingungen zur Ausbildung von Podosomenrosetten kam, konnte dies so in arteriellen Endothelzelltypen, wie kultivierten Aortenendothelzellen vom Schwein oder Rind nicht beobachtet werden (Tatin, Varon, Génot, & Moreau, 2006; Varon et al., 2006). In diesen Zellen wurden Podosomen zudem nicht nur durch PMA-Stimulation, sondern auch durch TGFβ-Applikation gebildet, ein Prozess der eine Phosphorylierung von Smad1 bedingt, eine Proteinphosphorylierung, die in HUVECs nicht auftritt (Billottet et al., 2008). In Übereinstimmung mit diesen Literaturbefunden führte in den vorliegenden Experimenten TGFβ-Stimulation nicht zu einer erhöhten Podosomenbildung und -aktivität in HUVECs. Dagegen löste PMA, als bekannt stärkerer Stimulus der Podosomeninduktion welcher nicht Smad1, sondern PKC-abhängig reguliert wird, eine Podosomenbildung in HUVECs aus. Diese Regulationsunterschiede lassen einen Unterschied in der Podosomenbildung zwischen arteriellen und venösen Endothelzellen möglich erscheinen, der im Rahmen dieser Doktorarbeit allerdings nicht genauer beleuchtet werden konnte.

Kurzzeitige Behandlung von endothelialen Zellen mit VEGF stimuliert umgehend die Bildung von Podosomen innerhalb von 5-15 Minuten (Osiak et al., 2005; J. Wang et al., 2009). Dieser Effekt nimmt allerdings mit prolongierter Applikation von VEGF sukzessive ab und sinkt nach 60 Minuten wieder auf basale Werte. In der Tat führte auch in unseren Versuchen eine prolongierte, 48stündige VEGF-Inkubation unter statischen Bedingungen nicht (mehr) zu einer Podosomenzahlerhöhung. Eine VEGFR2-Blockade in den Versuchen (in mechanisch unstimulierten Zellen) zeigt allerdings eine starke Reduktion der Podosomenaktivität. Dieser Befund legt nahe, dass unter statischen Bedingungen bereits die basale VEGF-Bildung so hoch ist, dass der VEGF Effekt durch exogen zugefügtes VEGF nicht weiter gesteigert werden kann. Die Bedeutung des VEGF Signalwegs konnte auch dadurch belegt werden, dass Inhibitoren VEGF-Signalweges (PI3-K, p38 MAPK und Src (Claesson-Welsh & Welsh,

2013)) ebenfalls zu einer signifikanten Senkung der Imprintzahl in der Matrix und zu einer Hemmung der Migrationsfähigkeit HUVECs der HUVECs führten. Dies ist in Übereinstimmung mit der vorliegenden Literatur (Moreau et al., 2003; Osiak et al., 2005; J. Wang et al., 2009).

Die Regulation der ERK durch den VEGF-Signalweg scheint dagegen wichtiger für die Endothelzellproliferation zu sein (Olsson et al., 2006; Xiao et al., 2013), was durch das Ausbleiben von Effekten auf die Podosomenbildung und -aktivität nach ERK-Inhibition in dieser Arbeit bestätigt wird. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass in HUVECs, die gleichzeitig mit VEGF und PMA behandelt wurden, die Podosomenbildung gefördert wird (Seano et al., 2014). Diesem Effekt soll eine transkriptionelle Induktion von  $\alpha 6\beta 1$ -Integrin durch VEGF-A zugrunde liegen. Ob eine unterschiedlich stark ausgeprägte Stimulierung dieses VEGF-Zielproteins unter verschiedenen (patho-)physiologischen Shear-Stress-Bedingungen und unterschiedlichen Gefäßregionen eine Rolle spielt, ist ein interessantes Thema künftiger Forschung in diesem Bereich.

### **4.3 VEGF und VEGFR Regulation**

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen legen nahe, dass die Shear-Stress-abhängige Ausbildung von Podosomen ebenfalls durch VEGF und VEGFR2 mediiert wird. Dass die VEGF mRNA- und Proteinexpression unter höheren Shear-Stress-Bedingungen reduziert ist, ist bereits bekannt (Conklin, Zhong, Zhao, Lin, & Chen, 2002; Gan, Miodic, Doroudi, Selin-Sjogren, & Jern, 2000). Der hemmende Effekt von Shear-Stress auf die VEGF-Ausschüttung mag die sehr niedrigen VEGF-Werte in normalen Arterien erklären (Maharaj, Saint-Geniez, Maldonado, & D'Amore, 2006). Die typische Antwort darauf ist die auch in dieser Doktorarbeit gezeigte, reaktive, Heraufregulation des VEGFR2 in Endothelzellen (Abumiya, Sasaguri, Taba, Miwa, & Miyagi, 2002). Diese Gegenregulation kann die niedrige VEGF-Ausschüttung dennoch nicht vollkommen kompensieren. Sie macht die Endothelzellen allerdings für exogen zugefügtes VEGF sensitiver, was in pathologischen Situationen, wie Atherosklerose und/oder Ischämie, Prozesse bei denen die VEGF-Expression erhöht ist, wichtig sein kann (Inoue et al., 1998). Darüber hinaus wurde schon mehrfach erwähnt, dass VEGF und Podosomenbildung wichtig für die vom Endothel ausgehenden angiogenetischen Prozesse sind (Seano et al., 2014). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit bringen diese

Befunde zusammen und zeigen die Wichtigkeit des Shear-Stresses auf die VEGF- und VEGFR-Expressionsmuster ohne allerdings die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären.

#### **4.4 Shear-Stress und Proteasen**

Shear-Stress-Level variieren im Gefäßsystem je nach Gefäßtyp, Gefäßaufbau und Lokalisation im Kreislauf. Die mittleren Werte in menschlichen Gefäßen liegen bei 10 dyn/cm<sup>2</sup> und höher (De Wit, Schäfer, Von Bismarck, Bolz, & Pohl, 1997; Tangelder, Slaaf, Arts, & Reneman, 1988). Durch ihren im Mittel größeren Durchmesser sind die Shear-Stress-Werte in Venen mit 1-6 dyn/cm<sup>2</sup> mit einer geringeren Variationsbreite niedriger (Papaioannou & Stefanadis, 2005). Die gewählten mittleren (2.5 dyn/cm<sup>2</sup>) und hohen (10 dyn/cm<sup>2</sup>) Shear-Stress-Werte dieser Doktorarbeit können für Zellen venösen Ursprungs damit als physiologisch gelten. Shear-Stress hatte in den Versuchen einen deutlichen Effekt auf die Podosomenbildung und kann damit als Stabilisator der Gefäßintegrität angesehen werden. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit Publikationen, die zeigen, dass Shear-Stress endotheliales Sprouting in Mikrofluidsystemen stoppen kann (Song & Munn, 2011), zu Proliferationsstopp in bovinen Endothelzellen der Aorta führt (Akimoto, Mitsumata, Sasaguri, & Yoshida, 2000; Lin et al., 2000) und zur Abnahme der Migrationsgeschwindigkeit in Endothelzellen führt (Yao, Rabodzey, & Dewey, 2007). Eine Zwischenposition nehmen Zellen ein, die mit pathologisch niedrigen Shear-Stress-Leveln behandelt wurden. Sie zeigen weniger Podosomenrosettenabdrücke als Zellen unter statischen Bedingungen, aber mehr als Zellen mit hohen Shear-Stress-Werten. Diese Daten wurden in der vorliegenden Arbeit durch Versuche an für sieben Tage ligierten und daraufhin kanülierten Arteriensegmenten der Arteria femoralis der Maus untermauert. Diese Gefäßabschnitte zeigten signifikant mehr endotheliale Podosomen an zuvor ligierten und damit weniger Shear-Stress erfahrenden Anteilen verglichen mit der jeweiligen nicht-ligierten Gegenseite der Versuchstiere. Dieser Befund wird durch eine interessante Studie bestätigt, in der gezeigt wurde, dass sich dünnkappige Plaques in Arterien von diabetischen Schweinen mit Hypercholesterinämie bevorzugt an Orten mit niedrigen Shear-Stress entwickeln, erhöhte MMP-Expressionslevel und einen erniedrigten Kollagengehalt an diesen zeigen (Koskinas et al., 2013). Auch wenn in

dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch die Ligation der Arterien Hypoxie oder inflammatorische Prozesse eine Rolle bei der Bildung von Podosomen spielen, so legen die Experimente aus den HUVECs nahe, dass Shear-Stress auch in in-vivo Gefäßen ein wichtiger Faktor für die Regulation der Podosomenbildung ist. Die erhöhte podosomale Aktivität, die mit einer vermehrten MMP-Ausschüttung einhergeht mag zum inward Remodeling beitragen, dass in Gefäßen unter niedrigen Flussbedingungen beobachtet wird (Godin, Ivan, Johnson, Magid, & Galis, 2000; Bassouny et al., 1998). Zahlreiche Studien haben zudem gezeigt, dass Shear-Stress die MMP-Ausschüttung vermindern kann (Platt & Shockey, 2016). So ist beispielsweise die Expression von mechanosensitiven Cathepsinen in Aortenklappen und Endothelzellen in der Abwesenheit von Shear-Stress erhöht (Platt, Ankeny, & Jo, 2006; Platt, Xing, Jo, & Yoganathan, 2006). Andererseits können unphysiologisch hohe Shear-Stress-Werte ebenfalls proteolytische Prozesse induzieren. Shear über 16 dyn/cm<sup>2</sup> führt an Aortenendothelzellen des Schweines zum Beispiel zu einer Freisetzung von Elastase (Hennig et al., 2011). Darüber hinaus führt laminarer Shear-Stress an Schweineaortenklappen zur Ausschüttung von MMP-2 und MMP-9 und kann überdies zum Outward-Remodeling von Gefäßen führen (Haas et al., 2007; Platt, Xing, et al., 2006). Es ist daher wahrscheinlich, dass sowohl pathologisch niedrige als auch erhöhte Shear-Stress-Werte zur unkontrollierten Freisetzung von MMPs und weiteren Proteasen führen können, wobei die zu Grunde liegenden Mechanismen dabei wohl verschieden sind.

#### **4.5 Podosomen und Gefäße**

Nach dem erfolgreichen Nachweis von Podosomen in HUVECs und ihrer Expressionsmodulation unter PMA und VEGF-Einfluss lag es nahe, diese Strukturen auch in intakten Blutgefäßen (Mesenterialgefäßen) nachweisen zu wollen. In der Tat fanden wir zahlreiche für Cortactin und MT1-MMP doppelt positiv gefärbte Strukturen in kleinen Mesenterialgefäßen. Einhergehend mit dem kleineren Durchmesser der Endothelzellen von Mesenterialgefäßen der Maus verglichen mit humanen Endothelzellen war hier auch der Durchmesser der Podosomrosetten kleiner (1-10µm vs. 3-15µm). Zu dem hier geführten Nachweis von Podosomen kommt nun auch eine beständig wachsende Literatur, dass Podosomen/Invadopodien unter physiologischen

und pathophysiologischen Bedingungen auch in Gefäßen ausgebildet und reguliert werden (Leong et al., 2014; Rottiers et al., 2009; Seano & Primo, 2015). Eine Rolle der Podosomen/Invadopodien beim laminin- und integrinabhängigen Verdau der Basalmembran konnte bei der Angiogenese von Tumorendothelzellen aus der Lunge bereits nachgewiesen werden (Seano et al., 2014). Im Einklang mit der Literatur zeigten unsere Versuche, dass exogen zugeführter VEGF, der ehemals auch *vascular permeability factor* (VPR) benannt wurde (Roberts & Palade, 1995; Senger et al., 1993), zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität selbst für große Moleküle wie Antikörper (~150kDa) in kultivierten Mesenterialgefäßen (~250µm Durchmesser) führt. Diese Gefäßpermeabilitäts-erhöhung ging einher mit einer verstärkten Podosomenexpression. In den angesprochenen Versuchen, die namensgebend für den VPR (??) waren, führte VEGF-Gabe am Cremaster zum verstärkten Austritt von Kienruß (Carbon Black), die auf eine erhöhte endotheliale Fenestrierung zurückgeführt und elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurde. Unsere Daten deuten durch das Ausschalten des Endothels durch Permeabilisierung mit TritonX auf eine zusätzliche wichtige Rolle der IEL als Penetrationsbarriere hin, dessen Durchlässigkeit in Abhängigkeit von der Podosomenexpression dynamisch reguliert werden kann.

#### **4.6 Bedeutung für Migration und Remodelingvorgänge**

Podosomen erfüllen essentielle Funktionen im Rahmen der Zellmigration und Zellinvasion in umliegende Gewebe (Linder, Wiesner, & Himmel, 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Podosomen auch für die Migration von Endothelzellen wichtig sind und diese durch konstitutive Stimulation des VEGFR erhöht werden kann. PKC-Aktivierung führt dagegen nicht zu einer erhöhten Migrationsaktivität in HUVECs. In diesen Rahmen führte auch die Erhöhung des Shear-Stresses mit verminderter Podosomenanzahl und -aktivität zu einem verminderten Migrationsmuster von Endothelzellen, welches allerdings erst am zweiten Tag sichtbar wurde und damit auch die gegenläufigen Befunde erklären kann, die in der Literatur bis dato beschrieben sind: In in vitro Wundheilassays wurde gezeigt, dass Shear-Stress die directionale Migration von Endothelzellen durch Zellpolarisierung und die Formation von Lamellipodien beeinflussen kann (Hsu et al., 2001; Y. L. Hu et al., 2002). Andere Arbeiten zeigen dagegen das Shear-Stress in

solchen Assays die Migration von Endothelzellen inhibiert und vom Wundrand wegdirektioniert (Glen et al., 2012; Tressel, Huang, Tomsen, & Jo, 2007). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass HUVECs am ersten Tag des Migrationsassays exklusiv in Flussrichtung wandern, was durch inkomplette Adhäsion der Zellen und ihrer Ausrichtung zu erklären ist. Am zweiten Tag migrieren dagegen die Zellen nicht nur in Flussrichtung, sondern auch gegen sie. Dazu kommt, dass ebenso am zweiten Tag, einhergehend mit einer verminderten Podosomenbildung, die Endothelzellen mit verringerter Geschwindigkeit migrieren. Auch dies lässt einen stabilisierenden Effekt des Shear-Stresses auf das Migrationsverhalten durch abnehmende Podosomenrosettenbildung vermuten.

Die HUVEC-Mobilität war von der MMP-Aktivität abhängig, was sich in den Resultaten um den MMP-Inhibitor GM6001 zeigte. Auch wenn von Podosomen bekannt ist, dass sie ähnlich den fokalen Adhäsionkontakten als lokale Verankerungspunkte auf zweidimensionalen Flächen dienen können, so ist die Rolle der MMPs doch vor allem bei der Migration durch dreidimensionale Matrixkörper bekannt und beschrieben (Guiet et al., 2012). Interessant wäre es daher zu untersuchen, ob die Freisetzung von MMPs und die Proteolyse in der extrazellulären Matrix Verankerungspunkte in dieser freilegt, die die Zelle zur Migrationsbeschleunigung nutzen könnte. Von Osteoklasten ist bekannt, dass MMPs den Umsatz von Podosomen beschleunigen können, was eine weitere Erklärung für dieses Phänomen wäre (Goto, Maeda, & Tanaka, 2002). Ob solch ein Mechanismus auch in HUVECs vorliegt, gilt es noch zu untersuchen.

#### **4.7 Strukturtypen der IEL in unterschiedlichen Gefäßbetten, in Abhängigkeit der Größe der Gefäße und des Alters der Versuchstiere**

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen grundsätzlich unterschiedlichen Aufbau der IEL in unterschiedlichen Organgebieten. In den Muskelgefäßen der Abgänge aus der Arteria femoralis ist die IEL eine netzartige Struktur während in den Mesenterialgefäßen bis zu einem Durchmesser  $< 100\mu\text{m}$  die IEL aus einer kontinuierlichen Membran mit klar abgrenzbaren Löchern besteht. Diese Unterschiede der IEL-Lochstruktur in Abhängigkeit vom Gefäßdurchmesser sind vor allem an großen Gefäßen zahlreich bestätigt worden (Bloksgaard et al., 2015; Capdeville et al., 1989; Osborne-Pellegrin, 1985; Sandow et al., 2009) und finden sich noch



ausgeprägter an kleinen Gefäßen (Clifford et al., 2011b; Kirby et al., 2013b). Die IEL-Lochanzahl scheint in den meisten Gefäßen weiterhin vor allem im Verlauf von proximal nach distal hin zu den Widerstandsgefäßen zuzunehmen, während die Gesamtlochfläche durch den kleineren mittleren Durchmesser des Einzelloches in etwa konstant bleibt. Auch diese Befunde sind im Einklang mit der Literatur (Kirby et al., 2013b). Ob diesen Strukturunterschieden funktionellen Einflüsse, wie z.B. eine unterschiedliche mechanische Beanspruchung, zu Grunde liegen, ist bisher noch nicht untersucht worden. In größeren Gefäßen der spontan hypertensiven Ratte (SHR) ist dagegen die Lochanzahl in größeren Gefäßen der Arteria mesenterica superior höher als in kleineren Mesenterialarterien (Sandow et al., 2009). Die Abhängigkeit der Lochanzahl und Lochfläche vom Gefäßdurchmesser und der Ordnung des Gefäßes ist daher essenziell bei Auswertungen der IEL-Lochfläche und ist eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Befunde der Bedeutung und Lochanzahl im Alter. Während eine umfassende Übersicht von Sandow in verschiedenen Spezies und Organbetten keine Abhängigkeit der IEL-Lochanzahl vom Alter fand (Sandow et al., 2009), publizierte Boerman vor Kurzem, dass die IEL-Lochanzahl in Widerstandsgefäßen (Mesenterialgefäßen der Maus) im Alter abnimmt (Boerman et al., 2016). Des Weiteren scheint es große Unterschiede der Lochanzahl und -fläche zwischen verschiedenen Spezies und sogar zwischen verschiedenen Stämmen einer Spezies zu geben (Sandow et al., 2009). Die genetische Anlage scheint daher beim Aufbau der IEL eine wesentliche und wichtigere Rolle zu spielen, als das Alter oder kurzfristige Behandlungsoptionen (hoch-fetthaltige Diät, erhöhte Schubspannung). In den von uns untersuchten Gefäßregionen wiesen vor allem kleine Mesenterialgefäße eine IEL mit Lochstruktur auf. Wegen der einfacheren Auswertbarkeit der IEL-Löcher wurden diese Gefäße für die Analyse eines möglichen Podosomeinflusses auf die IEL Struktur herangezogen.

#### **4.8 Shear-Stress und strukturelle Veränderungen der IEL**

Bei der Kultur von Gefäßen mit unterschiedlichen Shear-Stress-Bedingungen (0,5dyn vs. 10dyn vs. statisch) traten nach 24h keine signifikanten Unterschiede in der IEL Struktur bzw. Lochstruktur auf. Mehrere Publikationen mit unterschiedlichen Modellsystemen in verschiedenen Spezies zeigen allerdings Unterschiede bei

extremen Änderungen des Shear-Stresses: Durch Anlage einer arteriovenösen Fistel zwischen der Arteria carotis communis und der externen Jugularvene zeigten Masuda et al. 1999 eine Zunahme der Lochfläche in der IEL von 0 (auch noch nach 3 Tagen) auf 15% bei einer Flusszunahme um den Faktor 10 nach einer Woche verglichen mit der nichtoperierten Seite (Masuda et al., 1999; M. Sho et al., 2002b); In einem Ischämie/Reperfusionmodell (90Minuten Ischämie, 24h Reperfusion) in Mesenterialgefäßen von Wistar-Kyoto Ratten (WKY) zeigte sich im abgeklemmten Gefäßarm eine Zunahme der Lochanzahl ohne eine Abnahme der Gesamtlochfläche oder der IEL-Dicke verglichen mit Kontrollgefäßen aus demselben Tier (Caracuel et al., 2012). Interessanterweise wurde in einem ähnlichen Modell in WKY ohne Reperfusion im ligierten Arm zymographisch ein Anstieg von MT1-MMP und MMP2 nachgewiesen (Haas et al., 2007). Zhu et al. zeigten in einem Modell an Carotiden des Hundes, die zuvor so moduliert wurden, dass die Flussbedingungen denen von humanen Carotisgefäßen entsprachen, dass hoher Shear-Stress in Verbindung mit hoher Flussgeschwindigkeit, niedrigem Druck, turbulenten Fluss und wechselnden Shear-Stress-Gradienten zum Abbau der IEL in diesen Gefäßen mit damit einhergehender Aneurysmabildung führt (Zhu, Li, Yan, Tan, & Cheng, 2014). Zu der Literatur über die intrakraniellen Aneurysmaentstehung in Zusammenhang mit der Wandschubspannung gehört auch eine Publikation von Kolega et al., in welcher durch bilaterale Ligation der Arteria carotis communis der Fluss in der Basilararterie erhöht wurde und dies in den untersuchten Kaninchen zur Auflösung der IEL an der Bifurkation der Arteriae cerebri posteriores und nachfolgender Aneurysmainduktion nach 2 Tagen führte (Kolega et al., 2011). So führt höchstwahrscheinlich die zeitliche (Kontamination der Gefäße die die geplante Kulturdauer einschränkte, langsamer Umsatz und Abbau der IEL) und methodische Limitierung (FCS-Applikation/Remodeling, uneinheitlicher lokaler Shear-Stress und Druck in den kultivierten Gefäßen durch die Glaskanülen, begrenzte Möglichkeit, einen Shear-Stress  $> 10 \text{ dyn/cm}^2$  zu induzieren) der Gefäßkultur zu den fehlenden Effekten auf den IEL-Umbau in der vorliegenden Doktorarbeit. Einzig Deendothelialisierung führte zu einem Anstieg der Lochanzahl mit Permeabilitätssteigerung

Die durch Konfokalmikroskopie auflösbaren Strukturparameter der IEL blieben auch sowohl nach Elastase- und VEGF-Gabe, als auch bei unterschiedlichen Shear-Stress-Bedingungen unverändert in den von uns untersuchten Zeiträumen (bis zu sieben Tage im femoralen Ligationsmodell). Allerdings änderte sich die Durchlässigkeit der

IEL für Proteinen nach Elastase- und VEGF-Gabe. Diese Befunde bestätigen Daten an großen Gefäßen und Computermodellen, die der IEL eine wichtige Rolle als Penetrationsbarriere abhängig von der Molekülgröße einräumen (Smith & Staples, 1980; Tada & Tarbell, 2004). Des Weiteren deutet beispielsweise ein KO-Modell (TSAd<sup>-/-</sup>), das eng mit dem VEGFR2-Src-Signalweg verknüpft ist und auch bei der Entstehung von Podosomen eine wichtige Rolle zu spielen scheint auf eine wichtige, die Endothelzellpermeabilität ergänzende Rolle der IEL als Permeabilitätsregulator für Makromoleküle hin (Sun et al., 2012). In diesem Modell ist die durch VEGF induzierte Extravasation von Evans-Blue und FITC-Dextran in einem Rückenkammermodell der Maus erniedrigt.

#### **4.9 Deendothelialisierung und Erhöhung der Lochanzahl der IEL**

Die bisherigen Befunde zeigen, dass die IEL unter physiologischen Bedingungen eine sehr stabile Struktur aufweist. Dazu passt, dass der anhand der Desmosinausscheidung im Urin abgeschätzte Umsatz der IEL nur etwa 1% des Gesamtkörperelastins pro Jahr unter physiologischen Bedingungen beträgt (J.-J. Hu et al., 2008; Raghov et al., 2006).

Allerdings kann sich diese Struktur dennoch rasch verändern, wenn das Endothel fehlt. Den deutlichsten Effekt auf die Lochanzahl und die Gesamtlochfläche zeitigten nämlich Gefäße, die zuvor deendothelialisiert wurden. Dieser Effekt wurde durch die Gabe eines MMP-Inhibitors (GM6001) gehemmt. Es ist bekannt, dass Deendothelialisierung nach Ballondilatation, Anpassungsvorgängen nach Fistelanlage (Flusserhöhung), Stent-Implantation oder der Formation von arteriosklerotischen Plaques an größeren Gefäßen zu Intima-Hyperplasie und damit einhergehender Auflösung der IEL führen kann (Masuda et al., 1999; Newby & Zaltsman, 2000; E. Sho et al., 2002). Modelle für die Deendothelialisierung von Gefäßen beeinflussen allerdings unterschiedlich stark das Remodeling mit Komponenten, wie der Reendothelialisierung, Intimahyperplasie und glatte Muskelzellproliferation (Madri et al., 1992). Bendeck et al. berichteten 1994 in einem Paper von einer Erhöhung einer Gelatinaseproduktion mit einem Molekulargewicht von 88kDa, welche sich nach Ballondilatation und Denudation in Carotiden der Ratte fand (Bendeck, Zempo, Clowes, Galardy, & Reidy, 1994). Gelatinase ist aber die aktivierte MMP9 (auch

aktivierte Gelatinase B genannt). Diese Befunde bestätigte dieselbe Arbeitsgruppe 2002 anhand eines MMP9-KO-Modells, welches eine verringerte intimale Zellreplikation der VSMC im KO-Tier zeigte (Cho & Reidy, 2002). In ähnlichen Modellen wurden allerdings auch weitere MMPs, Cathepsine, Serinproteasen, Aminopeptidasen und Transglutaminasen als wichtige Proteasen für das Remodeling von Gefäßen gefunden (Bakker et al., 2005; Kuzuya et al., 2003; Platt & Shockey, 2016; Schiffrin, 2012; Van Hinsbergh et al., 2006; L. Wang et al., 2009). Auch bei der Ausbildung von Kollateralen scheint es ein Überwiegen von Proteasen mit reduzierter IEL und Basalmembranbildung zu geben (Cai et al., 2004). Die Basalausschüttung von MMPs beispielsweise ist im Grundzustand auf ein Minimum reduziert und wird erst durch Stimulierung mit Wachstumsfaktoren, Inflammationsmolekülen oder Shear-Stress heraufreguliert (Haas et al., 2007; Hanemaaijer, Koolwijk, le Clercq, de Vree, & van Hinsbergh, 1993; Platt, Xing, et al., 2006; Rajavashisth et al., 1999). All diese Ergebnisse zeigen, dass es ein fein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen Proteaseaktivierung und -Inhibierung in Gefäßen gibt, welches durch Deendothelialisierung zum Überwiegen der proteolytischen Funktion führt. Dies kann durch Überaktivierung der Proteasen, Freisetzung von Proteasen aus dem geschädigten Endothel und glatten Muskelzellen oder durch eine reduzierte Ausschüttung von MMP-Inhibitoren aus den Endothelzellen geschehen (Van Hinsbergh et al., 2006). Auch der direkte Einfluss der Wandschubspannung auf die nach Deendothelialisierung freiliegenden glatten Muskelzellen kann bei eher niedrigen Flussraten, wie Sie in den vorliegenden Versuchen gewählt wurden, zur Freisetzung von Wachstumshormonen aus Matrixkomponenten und glatten Muskelzellen, zur Proteasefreisetzung und glatter Muskelzellproliferation führen (Duca, Floquet, Alix, Haye, & Debelle, 2004; Garanich et al., 2005; Qiu et al., 2014). Andererseits kann die Freilegung von Matrixkomponenten und erhöhte Ausschüttung von MMPs auch im Sinne einer Feedbackinhibition zur Heraufregulation von Proteaseinhibitoren verursachen (H. Wang, Moore, & Alavi, 1996), um einen überschießenden und weniger effizienten proteolytischen Abbau und eine gerichtete adaptive Zellmigration zu verhindern (Van Hinsbergh et al., 2006). Ob die oben erörterte mögliche MMP-Freisetzung aus glatten Muskelzellen ebenfalls lokal über die Bildung von Podosomen gesteuert wird, ist eine interessante, noch offene Frage.

#### 4.10 Die AMPK als Regulator von Podosomen und des IEL-Umsatzes

Der AMPK wird eine wichtige Rolle in der Regulation von zytoskelettalen Proteinen (Phosphorylierungen, Protein-Protein-Interaktion, Membrantranslokation) zugeschrieben (Marin et al., 2015; Moon et al., 2014; Ross et al., 2015; Schaffer et al., 2015), so dass es nahe liegt, dass sie die Dynamik von Podosomen beeinflussen könnte. Trotz dieser Implikationen ist die Datenlage über die Rolle der AMPK bei der Regulation von Invadopodosomen sehr begrenzt und vor allem deskriptiver Natur. Scott et al. beschreiben, dass die AMPK mittels Acetyl-CoA-Carboxylase-Phosphorylierung (ACC) über die Phosphatidylcholinzusammensetzung der Membran das Auftreten von Invadopodien herunterregulieren und darüber hinaus die Invasion von Src-transformed 3T3-Zellen in eine Matrigelmatrix negativ beeinflussen kann (Scott et al., 2012). Stimulierung der AMPK mit dem unspezifischen AMPK-Aktivator AICAR führte zur sowohl zur Abnahme des Gelatineverdaus, als auch der Anzahl von Podosomenrosetten und zum verringerten Einbau von radioaktiv markierten C-Acetat in die Membran. In den Endothelzellen ist vor allem die  $\alpha 1$ -Untereinheit des heterotrimeren Enzyms AMPK exprimiert (Zou et al., 2004). Dagegen zeigte eine interessante Studie von Wang et al., dass vor allem die AMPK $\alpha 2$ -Untereinheit für die Angiotensin-abhängige und MMP2-vermittelte Induktion von abdominalen Aortenaneuysma mit einer einhergehenden Degradierung der IEL verantwortlich ist (S. Wang et al., 2012). Aufgrund dieser Daten erwarteten wir im AMPK $\alpha 1$  KO eine Erhöhung der Podosomenzahl und des IEL-Verdaus. Es zeigte sich aber, dass die Podosomenrosettenzahl in AMPK $\alpha 1$  KO reduziert war während die IEL eine größere Lochanzahl und Gesamtlochfläche aufwies. Aussagen über die Gesamtpodosomenaktivität und die genaue Rolle der AMPK auf Induktion und Aufrechterhaltung der Podosomen und speziell der Podosomenrosetten konnten durch die begrenzte mikroskopische Auflösung und die Schwierigkeit enzymatischer MMP-Aktivität an intakten Gefäßen quantitativ nachzuweisen nicht getroffen werden und sind ein interessantes Thema für künftige Forschungsprojekte. Neben den bereits erwähnten Einfluss der AMPK auf die ACC und die Entstehung von Invadopodien wurde die AMPK mit weiteren Proteinen in Verbindung gebracht, die wichtig für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Podosomen sein sollen (siehe Kapitel 1.4 und Abb. 1.7). Ein mögliches Target für diesen AMPK Effekt ist TKS5 (SH3PXD2A), das regulatorisch an Ser1002 phosphoryliert werden kann (Schaffer et al., 2015), einem

Adapterprotein, welches eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Podosomen spielt (siehe Kapitel 1.3.3).

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Befunde unterstreichen eine wichtige Rolle von kontinuierlichen physiologischen Shear-Stress bei der Kontrolle Podosomendynamik in Endothelzellen und damit einhergehend der Kontrolle der Endothelzellmigration und Angiogenese. Akute Reduktion des Shear-Stresses (Stase) führt zur erhöhten VEGF- und Podosombildung und nachfolgend zu einer erhöhten lokalen proteolytischen Aktivität von kultivierten Endothelzellen. Podosomenrosetten lassen sich auch ex-vivo in Gefäßen durch Herabsetzung des Shears und durch VEGF-Stimulation induzieren. Diese Änderungen der Podosomendynamik führen allerdings kurzfristig (bis zu sieben Tagen) nicht zu konfokalmikroskopisch auflösbaren Umbauvorgängen an der IEL von kleinen Blutgefäßen. Funktionell führt eine Erhöhung der Podosomenrosettenzahl aber zur Permeabilitätssteigerung der IEL. Umgekehrt geht ein Gefäßmodell (AMPK $\alpha$ 1 KO), in dem die Lochanzahl und Gesamtlochfläche in der IEL erhöht ist, nicht mit einer erhöhten Podosomenrosettenanzahl einher.

Diese Resultate bestätigen, dass eine wichtige Funktion von Shear-Stress darin liegt, das Gefäß und speziell das Endothel vor Umbauvorgängen zu schützen, während es unter pathophysiologischen Bedingungen wie Minderperfusion und mangelnder Stabilisierung des Gefäßes durch Shear-Stress zur Aktivierung des Endothels und Remodelingvorgängen kommt. Die ex-vivo Daten zeigen dabei, dass ein erhöhter Podosomenrosettenbesatz des Endothels mit einer funktionellen Permeabilitätssteigerung u.a., wie hier gezeigt für große Moleküle wie Antikörper einhergeht, während der Wandungsaufbau des Gefäßes im konfokalmikroskopisch auflösbaren Bereich unverändert bleibt. In diesem Sinne ist die Podosomenregulation in Gefäßen ein interessantes Target für therapeutische Interventionen im Hinblick auf endotheliale Migrations- und vaskuläre Remodelingvorgänge.

## Literatur

- Abedi, H., & Zachary, I. (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15442–15451. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15442>
- Abumiya, T., Sasaguri, T., Taba, Y., Miwa, Y., & Miyagi, M. (2002). Shear stress induces expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1/KDR through the CT-rich Sp1 binding site. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(6), 907–913. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000018300.43492.83>
- Akimoto, S., Mitsumata, M., Sasaguri, T., & Yoshida, Y. (2000). Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1). *Circulation Research*, 86(2), 185–90. doi: 10.1161/01.res.86.2.185. PMID: 10666414.
- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., & Block, M. R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 17), 3037–49. <http://doi.org/10.1242/jcs.052704>
- Artym, V. V., Zhang, Y., Seillier-Moisewitsch, F., Yamada, K. M., & Mueller, S. C. (2006). Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: Defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Research*, 66(6), 3034–3043. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2177>
- Artym, V. V., Yamada, K. M., & Mueller, S. C. (2009). ECM degradation assays for analyzing local cell invasion. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 522, 211–9. [http://doi.org/10.1007/978-1-59745-413-1\\_15](http://doi.org/10.1007/978-1-59745-413-1_15)
- Ayala, I., Baldassarre, M., Caldieri, G., & Buccione, R. (2006). Invadopodia: a guided tour. *European Journal of Cell Biology*, 85(3-4), 159–64. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.09.005>
- Bakker, E. N. T. P., Buus, C. L., Spaan, J. a E., Perree, J., Ganga, A., Rolf, T. M., ... VanBavel, E. (2005). Small artery remodeling depends on tissue-type transglutaminase. *Circulation Research*, 96(1), 119–126. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000151333.56089.66>
- Bassiouny HS, Song RH, Kocharyan H, Kins E, Glagov S. Low flow enhances platelet activation after acute experimental arterial injury. *J Vasc Surg*. 1998 May;27(5):910-8.



doi: 10.1016/s0741-5214(98)70272-1. PMID: 9620144.

- Bendeck, M. P., Zempo, N., Clowes, a W., Galardy, R. E., & Reidy, M. a. (1994). Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circulation Research*, 75(3), 539–545. <http://doi.org/10.1161/01.RES.75.3.539>
- Bettencourt-Dias, M., Giet, R., Sinka, R., Mazumdar, A., Lock, W. G., Balloux, F., ... Glover, D. M. (2004). Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature*, 432(7020), 980–987. <http://doi.org/10.1038/nature03160>
- Billottet, C., Rottiers, P., Tatin, F., Varon, C., Reuzeau, E., Maître, J. L., ... Génot, E. (2008). Regulatory signals for endothelial podosome formation. *European Journal of Cell Biology*, 87(8-9), 543–554. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.02.006>
- Block, M. R., Badowski, C., Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Bouin, A. P., Faurobert, E., ... Albiges-Rizo, C. (2008). Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different. *European Journal of Cell Biology*, 87(8-9), 491–506. <http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.02.012>
- Bloksgaard, M., Leurgans, T. M., Nissen, I., Jensen, P. S., Hansen, M. L., Brewer, J. R., ... De Mey, J. G. R. (2015). Elastin Organization in Pig and Cardiovascular Disease Patients' Pericardial Resistance Arteries. *Journal of Vascular Research*, 52(1), 1–11. <http://doi.org/10.1159/000376548>
- Boerman, E. M., Everhart, J. E., & Segal, S. S. (2016). Advanced age decreases local calcium signaling in endothelium of mouse mesenteric arteries in vivo. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 310(9), H1091–H1096. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00038.2016>
- Cai, W.-J., Kocsis, E., Wu, X., Rodríguez, M., Luo, X., Schaper, W., & Schaper, J. (2004). Remodeling of the vascular tunica media is essential for development of collateral vessels in the canine heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 264(1-2), 201–10. doi: 10.1023/b:mcbi.0000044389.65590.57. PMID: 15544049.
- Campbell, G. J., & Roach, M. R. (n.d.). Fenestrations in the internal elastic lamina at bifurcations of human cerebral arteries. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 12(4), 489–496. <http://doi.org/10.1161/01.STR.12.4.489>
- Capdeville, M., Coutard, M., & Osborne-Pellegrin, M. J. (1989). Spontaneous rupture of the internal elastic lamina in the rat: the manifestation of a genetically determined factor which may be linked to vascular fragility. *Blood Vessels*, 26(4), 197–212. doi:

10.1159/000158768. PMID: 2575918.

- Caracuel, L., Jiménez-Altayó, F., Romo, M., Márquez-Martín, A., Dantas, A. P., & Vila, E. (2012). Transient mesenteric ischemia leads to remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Frontiers in Physiology*, 2 JAN(January), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fphys.2011.00118>
- Carman, C. V., Sage, P. T., Sciuto, T. E., de la Fuente, M. A., Geha, R. S., Ochs, H. D., ... Springer, T. A. (2007). Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity*, 26(6), 784–97. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.015>
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, a, Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., ... Persico, M. G. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine*, 7(5), 575–83. <http://doi.org/10.1038/87904>
- Caron, C., Spring, K., Laram??e, M., Chabot, C., Cloutier, M., Gu, H., & Royal, I. (2009). Non-redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells. *Cellular Signalling*, 21(6), 943–953. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.02.004>
- Cejudo-Martin, P., & Courtneidge, S. a. (2011). Podosomal proteins as causes of human syndromes: A role in craniofacial development? *Genesis*, 49(4), 209–221. <http://doi.org/10.1002/dvg.20732>
- Chan, K. T., Cortesio, C. L., & Huttenlocher, A. (2009). Fak alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *Journal of Cell Biology*, 185(2), 357–370. <http://doi.org/10.1083/jcb.200809110>
- Chen, W. T. (1989). Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *The Journal of Experimental Zoology*, 251(2), 167–85. <http://doi.org/10.1002/jez.1402510206>
- Chistiakov, D. a., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiologica*. <http://doi.org/10.1111/apha.12725>
- Chiu, J.-J., & Chien, S. (2011). Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological Reviews*, 91(1), 327–87. <http://doi.org/10.1152/physrev.00047.2009>
- Cho, A., & Reidy, M. a. (2002). Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circulation Research*,

91(9), 845–851. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000040420.17366.2E>

Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., ... Stern, D. M. (1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, *91*(10), 3527–61. PMID: 9572988.

Claesson-Welsh, L., & Welsh, M. (2013). VEGFA and tumour angiogenesis. *Journal of Internal Medicine*, *273*(2), 114–127. <http://doi.org/10.1111/joim.12019>

Clifford, P. S., Ella, S. R., Stupica, A. J., Nourian, Z., Li, M., Martinez-Lemus, L. a, ... Hill, M. a. (2011a). Spatial distribution and mechanical function of elastin in resistance arteries: a role in bearing longitudinal stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *31*(12), 2889–96. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.236570>

Clifford, P. S., Ella, S. R., Stupica, A. J., Nourian, Z., Li, M., Martinez-Lemus, L. a, ... Hill, M. a. (2011b). Spatial Distribution and Mechanical Function of Elastin in Resistance Arteries: A Role in Bearing Longitudinal Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.236570>

Conklin, B., Zhong, D., Zhao, W., Lin, P., & Chen, C. (2002). Shear stress regulates occludin and VEGF expression in porcine arterial endothelial cells. *J Surg Res.*, *102*(1), 13–21. doi: 10.1006/jsre.2001.6295. PMID: 11792146.

Corson, M. A., James, N. L., Latta, S. E., Nerem, R. M., Berk, B. C., & Harrison, D. G. (1996). Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circulation Research*, *79*(5), 984–91. doi: 10.1161/01.res.79.5.984. PMID: 8888690.

Daubon, T., Spuul, P., Alonso, F., Fremaux, I., & Génot, E. (2016). VEGF-A stimulates podosome-mediated collagen-IV proteolysis in microvascular endothelial cells. *Journal of Cell Science*, *129*(13), 2586–2598. <http://doi.org/10.1242/jcs.186585>

David-Pfeuty, T., & Singer, S. J. (1980). Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(11), 6687–91. <http://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6687>

Davies, P. F. (1995). Flow-Mediated Mechanotransduction. *Physiological Reviews*, *75*(3), 519–560. doi: 10.1152/physrev.1995.75.3.519. PMID: 7624393; PMCID: PMC3053532.

Davies, P. F. (2009). Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular

- pathophysiology. *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine*, 6(1), 16–26.  
<http://doi.org/10.1038/ncpcardio1397>
- Davies, P. F., Civelek, M., Fang, Y., & Fleming, I. (2013). The atherosusceptible endothelium: Endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo. *Cardiovascular Research*, 99(2), 315–327. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvt101>
- Dayanir, V., Meyer, R. D., Lashkari, K., & Rahimi, N. (2001). Identification of Tyrosine Residues in Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 / FLK-1 Involved in Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Cell Proliferation \*. *Biochemistry*, 276(21), 17686 –17692. <http://doi.org/10.1074/jbc.M009128200>
- de Wit, C., Hoepfl, B., & Wölfle, S. E. (2006). Endothelial mediators and communication through vascular gap junctions. *Biological Chemistry*, 387(1), 3–9.  
<http://doi.org/10.1515/BC.2006.002>
- De Wit, C., Schäfer, C., Von Bismarck, P., Bolz, S. S., & Pohl, U. (1997). Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 434(4), 354–361. <http://doi.org/10.1007/s004240050408>
- Dor, Y., Porat, R., & Keshet, E. (2001). Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 280(6), C1367–74. doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.6.C1367. PMID: 11350731.
- Duca, L., Floquet, N., Alix, A. J. P., Haye, B., & Debelle, L. (2004). Elastin as a matrikine. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 49(3), 235–44.  
<http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.007>
- Dunmore, P. J., Song, S. H., & Roach, M. R. (1990). A comparison of the size of fenestrations in the internal elastic lamina of young and old porcine aortas as seen with the scanning electron microscope. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(2), 139–43. doi: 10.1139/y90-022. PMID: 1690073.
- Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9(6), 669–676. <http://doi.org/10.1038/nm0603-669>
- Fey T, Schubert KM, Schneider H, Fein E, Kleinert E, Pohl U, Dendorfer A: Impaired endothelial shear stress induces podosome assembly via VEGF up-regulation; FASEB J. 2016 Apr 21. doi: 10.1096/fj.201500091R. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27103579.

- Foxall, E., Pipili, A., Jones, G. E., & Wells, C. M. (2016). Significance of kinase activity in the dynamic invadosome. *European Journal of Cell Biology*.  
<http://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.07.002>
- Fujio, Y., & Walsh, K. (1999). Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 16349–54. doi: 10.1074/jbc.274.23.16349. PMID: 10347193; PMCID: PMC3624707.
- Gan, L., Miocic, M., Doroudi, R., Selin-Sjogren, L., & Jern, S. (2000). Distinct regulation of vascular endothelial growth factor in intact human conduit vessels exposed to laminar fluid shear stress and pressure. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 272(2), 490–496.  
<http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2663>
- Garanich, J. S., Pahakis, M., Tarbell, J. M., Jeffrey, S., Pahakis, M., & Tarbell, J. M. (2005). Shear stress inhibits smooth muscle cell migration via nitric oxide-mediated downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity, 10031, 2244–2252.  
<http://doi.org/10.1152/ajpheart.00428.2003>.
- Giet, R., Sinka, R., Mazumdar, A., Lock, W. G., Balloux, F., Zafiroopoulos, P. J., ... Winter, S. (n.d.). Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression, (cdc).  
<http://doi.org/10.1038/nature03160>
- Gimona, M., Buccione, R., Courtneidge, S. A., & Linder, S. (2008). Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(2), 235–41.  
<http://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.005>
- Glen, K., Luu, N. T., Ross, E., Buckley, C. D., Rainger, G. E., Egginton, S., & Nash, G. B. (2012). Modulation of functional responses of endothelial cells linked to angiogenesis and inflammation by shear stress: Differential effects of the mechanotransducer CD31. *Journal of Cellular Physiology*, 227(6), 2710–2721. <http://doi.org/10.1002/jcp.23015>
- Gloe T, Sohn HY, Meininger GA, Pohl U. Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin alpha(v)beta3. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23453-23458 *Circulation*, 102(23), 2861–2866. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.102.23.2861>
- Goto, T., Maeda, H., & Tanaka, T. (2002). A selective inhibitor of matrix metalloproteinases inhibits the migration of isolated osteoclasts by increasing the life span of podosomes. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 20(2), 98–105.  
<http://doi.org/10.1007/s007740200013>

- Griffith, T. M. (2002). Endothelial control of vascular tone by nitric oxide and gap junctions: a haemodynamic perspective. *Biorheology*, 39(3-4), 307–18. PMID: 12122246.
- Guiet, R., Ve??ollets, C., Lamsoul, I., Cougoule, C., Poincloux, R., Labrousse, A., ... Maridonneau-Parini, I. (2012). Macrophage mesenchymal migration requires podosome stabilization by filamin A. *Journal of Biological Chemistry*, 287(16), 13051–13062. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.307124>
- Gulino-Debrac, D. (2013). Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function. *Tissue Barriers*, 1(2), e24180. <http://doi.org/10.4161/tisb.24180>
- Haas, T. L., Doyle, J. L., Distasi, M. R., Norton, L. E., Sheridan, K. M., & Unthank, J. L. (2007). Involvement of MMPs in the outward remodeling of collateral mesenteric arteries. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(4), H2429–H2437. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00100.2007>
- Hald, B. O., Jacobsen, J. C. B., Sandow, S. L., Holstein-Rathlou, N.-H., & Welsh, D. G. (2014). Less is more: minimal expression of myoendothelial gap junctions optimizes cell-cell communication in virtual arterioles. *The Journal of Physiology*, 592(15), 3243–55. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272815>
- Hanemaaijer, R., Koolwijk, P., le Clercq, L., de Vree, W. J., & van Hinsbergh, V. W. (1993). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *The Biochemical Journal*, 296, 803–9. <https://doi.org/10.1042/bj2960803>
- Hart, M. J., Callow, M. G., Souza, B., & Polakis, P. (1996). IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *EMBO Journal*, 15(12), 2997–3005. PMID: 8670801; PMCID: PMC450241.
- Hassler, O. (1962). The windows of the internal elastic lamella of the cerebral arteries. *Virchows Archiv Für Pathologische Anatomie Und Physiologie Und Für Klinische Medizin*, 335, 127–32. doi: 10.1007/BF02438699. PMID: 13905283.
- Hennig, T., Mogensen, C., Kirsch, J., Pohl, U., & Gloe, T. (2011). Shear Stress Induces the Release of an Endothelial Elastase: Role in Integrin  $\alpha(v)\beta(3)$ -Mediated FGF-2 Release. *Journal of Vascular Research*, 48(6), 453–464. <http://doi.org/10.1159/000327009>
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., & Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

95(16), 9349–54. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9349>

- Hiratsuka, S., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Maru, Y., & Shibuya, M. (2005). Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 25(1), 346–54. <http://doi.org/10.1128/MCB.25.1.346-354.2005>
- Hsu, P.-P., Li, S., Li, Y.-S., Usami, S., Ratcliffe, A., Wang, X., & Chien, S. (2001). Effects of Flow Patterns on Endothelial Cell Migration into a Zone of Mechanical Denudation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(3), 751–759. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5221>
- Hu, J.-J., Ambrus, A., Fossum, T. W., Miller, M. W., Humphrey, J. D., & Wilson, E. (2008). Time courses of growth and remodeling of porcine aortic media during hypertension: a quantitative immunohistochemical examination. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 56(4), 359–70. <http://doi.org/10.1369/jhc.7A7324.2007>
- Hu, Y. L., Li, S., Miao, H., Tsou, T. C., Del Pozo, M. A., & Chien, S. (2002). Roles of microtubule dynamics and small GTPase Rac in endothelial cell migration and lamellipodium formation under flow. *Journal of Vascular Research*, 39(6), 465–476. <http://doi.org/10.1159/000067202>
- Inoue, M., Itoh, H., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., Komatsu, R., ... Nakao, K. (1998). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*, 98(20), 2108–16. doi: 10.1161/01.cir.98.20.2108. PMID: 9815864.
- Issbrucker, K. (2002). p38 MAP Kinase - a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *The FASEB Journal*, 17(2), 262–264. <http://doi.org/10.1096/fj.02-0329fje>
- Jorgensen, S. B., Viollet, B., Andreelli, F., Frosig, C., Birk, J. B., Schjerling, P., ... Wojtaszewski, J. F. P. (2004). Knockout of the  $\beta$ 2 but Not  $\beta$ 1 5'-AMP-activated Protein Kinase Isoform Abolishes 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside but Not Contraction-induced Glucose Uptake in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1070–1079. <http://doi.org/10.1074/jbc.M306205200>
- Kaverina, I., Stradal, T. E. B., & Gimona, M. (2003). Podosome formation in cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization

- at discrete microdomains. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 24), 4915–4924.  
<http://doi.org/10.1242/jcs.00818>
- Kim, K. Y., Baek, A., Hwang, J. E., Choi, Y. a., Jeong, J., Lee, M. S., ... Yang, Y. (2009). Adiponectin-activated AMPK stimulates dephosphorylation of AKT through protein phosphatase 2A activation. *Cancer Research*, 69(9), 4018–4026.  
<http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2641>
- Kirby, B. S., Bruhl, A., Sullivan, M. N., Francis, M., Dinunno, F. a, & Earley, S. (2013a). Robust internal elastic lamina fenestration in skeletal muscle arteries. *PloS One*, 8(1), e54849. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054849>
- Kirby, B. S., Bruhl, A., Sullivan, M. N., Francis, M., Dinunno, F. a., & Earley, S. (2013b). Robust Internal Elastic Lamina Fenestration in Skeletal Muscle Arteries. *PLoS ONE*, 8(1), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054849>
- Kolega, J., Gao, L., Mandelbaum, M., Mocco, J., Siddiqui, A. H., Natarajan, S. K., & Meng, H. (2011). Cellular and molecular responses of the basilar terminus to hemodynamics during intracranial aneurysm initiation in a rabbit model. *Journal of Vascular Research*, 48(5), 429–42. <http://doi.org/10.1159/000324840>
- Koskinas, K. C., Sukhova, G. K., Baker, A. B., Papafaklis, M. I., Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., ... Stone, P. H. (2013). Thin-capped atheromata with reduced collagen content in pigs develop in coronary arterial regions exposed to persistently low endothelial shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), 1494–1504.  
<http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300827>
- Kuzuya, M., Kanda, S., Sasaki, T., Tamaya-Mori, N., Cheng, X. W., Itoh, T., ... Iguchi, A. (2003). Deficiency of gelatinase a suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia. *Circulation*, 108(11), 1375–1381.  
<http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000086463.15540.3C>
- Lamallice, L., Houle, F., Jourdan, G., & Huot, J. (2004). Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*, 23, 434–445. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207034>
- Langille, B. L., & O'Donnell, F. (1986). Reductions in Arterial Diameter Produced by Chronic Decreases in Blood Flow are Endothelium-dependent. *Science*, 231(4736), 405–407.  
<http://doi.org/10.1126/science.3941904>
- Le Boeuf, F., Houle, F., & Huot, J. (2004). Regulation of vascular endothelial growth factor



- receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 39175–39185. <http://doi.org/10.1074/jbc.M405493200>
- Lechertier, T., & Hodivala-Dilke, K. (2012). Focal adhesion kinase and tumour angiogenesis. *The Journal of Pathology*, 226(2005), 404–12. <http://doi.org/10.1002/path.3018>
- Lemarie, C. A., Tharaux, P. L., & Lehoux, S. (2010). Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(3), 433–439. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.09.018>
- Leong, H. S., Robertson, A. E., Stoletov, K., Leith, S. J., Chin, C. a., Chien, A. E., ... Lewis, J. D. (2014). Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell Reports*, 8(5), 1558–1570. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.050>
- Liang, J., & Mills, G. B. (2013). AMPK: A contextual oncogene or tumor suppressor? *Cancer Research*, 73(10), 2929–2935. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3876>
- Lin, K., Hsu, P. P., Chen, B. P., Yuan, S., Usami, S., Shyy, J. Y., ... Chien, S. (2000). Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9385–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.170282597>
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in Cell Biology*, 17(3), 107–117. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.01.002>
- Linder, S., & Wiesner, C. (2016). Feel the force: Podosomes in mechanosensing. *Experimental Cell Research*, 343(1), 67–72. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.11.026>
- Linder, S., Wiesner, C., & Himmel, M. (2011). Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 185–211. <http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154216>
- Liu, Y., Lai, Y.-C., Hill, E. V, Tyteca, D., Carpentier, S., Ingvaldsen, A., ... Rider, M. H. (2013). Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) is an AMPK target participating in contraction-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *The Biochemical Journal*, 455(2), 195–206. <http://doi.org/10.1042/BJ20130644>
- Luttun, A., & Carmeliet, P. (2003). De novo vasculogenesis in the heart. *Cardiovascular Research*, 58(2), 378–389. [http://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00258-X](http://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00258-X)

- Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., ... Carmeliet, P. (2002). Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature Medicine*, 8(8), 831–40. <http://doi.org/10.1038/nm731>
- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., ... Rafii, S. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Medicine*, 7(11), 1194–1201. <http://doi.org/10.1038/nm1101-1194>
- Madri J.A. et al. (1992) Interactions of Matrix Components and Soluble Factors in Vascular Responses to Injury. In: Simionescu N., Simionescu M. (eds) *Endothelial Cell Dysfunctions*. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0721-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0721-9_2).
- Maharaj, A. S. R., Saint-Geniez, M., Maldonado, A. E., & D'Amore, P. A. (2006). Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol*, 168(2), 639–648. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050834>
- Marin, T. L., Gongol, B., Martin, M., King, S. J., Smith, L., Johnson, D. A., ... Shyy, J. Y.-J. (2015). Identification of AMP-activated protein kinase targets by a consensus sequence search of the proteome. *BMC Systems Biology*, 9, 13. <http://doi.org/10.1186/s12918-015-0156-0>
- Masson-Gadais, B., Houle, F., Laferrière, J., & Huot, J. (2003). Integrin alphavbeta3, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress & Chaperones*, 8(1), 37–52. [http://doi.org/10.1379/1466-1268\(2003\)8<37:IVRFVA>2.0.CO;2](http://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)8<37:IVRFVA>2.0.CO;2)
- Masuda, H., Zhuang, Y.-J., Singh, T. M., Kawamura, K., Murakami, M., Zarins, C. K., & Glagov, S. (1999). Adaptive Remodeling of Internal Elastic Lamina and Endothelial Lining During Flow-Induced Arterial Enlargement. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(10), 2298–2307. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.19.10.2298>
- Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., ... Claesson-Welsh, L. (2005). VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *The EMBO Journal*, 24(13), 2342–2353. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600709>
- Matsumoto, T., Turesson, I., Book, M., Gerwins, P., & Claesson-Welsh, L. (2002). p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in

- FGF-2–stimulated angiogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 156(1), 149–160.  
<http://doi.org/10.1083/jcb.200103096>
- McMullen, M. E., Bryant, P. W., Glembotski, C. C., Vincent, P. a., & Pumiglia, K. M. (2005). Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 20995–21003.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M407060200>
- Meyer, R. D., Sacks, D. B., & Rahimi, N. (2008). IQGAP1-dependent signaling pathway regulates endothelial cell proliferation and angiogenesis. *PLoS ONE*, 3(12). doi: 10.1371/journal.pone.0003848. Epub 2008 Dec 3. PMID: 19050761; PMCID: PMC2585478.
- Mihaylova, M. M., & Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biology*, 13(9), 1016–23.  
<http://doi.org/10.1038/ncb2329>
- Miranda, L., Carpentier, S., Platek, A., Hussain, N., Gueuning, M. A., Vertommen, D., ... Horman, S. (2010). AMP-activated protein kinase induces actin cytoskeleton reorganization in epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(3), 656–661. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.151>
- Moncada, S. (2006). Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1469), 735–59. <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1775>
- Monsky, W. L., Lin, C. Y., Aoyama, A., Kelly, T., Akiyama, S. K., Mueller, S. C., & Chen, W. T. (1994). A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells. *Cancer Research*, 54(21), 5702–10. PMID: 7923219.
- Moon, S., Han, D., Kim, Y., Jin, J., Ho, W.-K., & Kim, Y. (2014). Interactome analysis of AMP-activated protein kinase (AMPK)- $\alpha$ 1 and - $\beta$ 1 in INS-1 pancreatic beta-cells by affinity purification-mass spectrometry. *Scientific Reports*, 4, 4376.  
<http://doi.org/10.1038/srep04376>
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C., & Génot, E. (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Molecular and Cellular Biology*, 23(19), 6809–22. <http://doi.org/10.1128/MCB.23.19.6809-6822.2003>
- Murphy, D. a, & Courtneidge, S. a. (2011). The “ins” and “outs” of podosomes and

- invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(7), 413–26. <http://doi.org/10.1038/nrm3141>
- Murphy, D. A., & Courtneidge, S. A. (2011). The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *NATURE REVIEWS | MOLECULAR CELL BIOLOGY*, 12(7), 413–426. <http://doi.org/10.1038/nrm3141>
- Nakano, A., Kato, H., Watanabe, T., Min, K.-D., Yamazaki, S., Asano, Y., ... Takashima, S. (2010). AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nature Cell Biology*, 12(6), 583–590. <http://doi.org/10.1038/ncb2060>
- Newby, a C., & Zaltsman, a B. (2000). Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *The Journal of Pathology*, 190, 300–309. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200002\)190:3<300::AID-PATH596>3.0.CO;2-I](http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<300::AID-PATH596>3.0.CO;2-I)
- Oikawa, T., Itoh, T., & Takenawa, T. (2008). Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *Journal of Cell Biology*, 182(1), 157–169. <http://doi.org/10.1083/jcb.200801042>
- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(5), 359–71. <http://doi.org/10.1038/nrm1911>
- Osborne-Pellegrin, M. J. (1978). Some ultrastructural characteristics of the renal artery and abdominal aorta in the rat. *Journal of Anatomy*, 125(Pt 3), 641–652. PMID: 640965; PMCID: PMC1235630
- Osborne-Pellegrin, M. J. (1979). “Spontaneous” lesions of the intima in the rat caudal artery. Principal morphologic characteristic and occurrence as a function of age and sex. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 40(6), 668–77. PMID: 449275.
- Osborne-Pellegrin, M. J. (1985). Natural incidence of interruptions in the internal elastic lamina of caudal and renal arteries of the rat. *Acta Anatomica*, 124(3-4), 188–96. doi: 10.1159/000146117. PMID: 4082890.
- Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C. C., Bravo-Cordero, J. J., Arias, M., Chen, X., ... Condeelis, J. (2009). Cortactin regulates cofilin and N-WASp activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *Journal of Cell Biology*, 186(4), 571–587. <http://doi.org/10.1083/jcb.200812176>

- Osiak, A. E., Zenner, G., & Linder, S. (2005). Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Experimental Cell Research*, 307(2), 342–353. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.03.035>
- Papaioannou, T. G., & Stefanadis, C. (2005). Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic Journal of Cardiology*, 46(1), 9–15. <http://doi.org/15807389>
- Platt, M. O., Ankeny, R. F., & Jo, H. (2006). Laminar shear stress inhibits cathepsin L activity in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(8), 1784–1790. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000227470.72109.2b>
- Platt, M. O., & Shockey, W. A. (2016). Endothelial cells and cathepsins: Biochemical and biomechanical regulation. *Biochimie*, 122, 314–323. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.010>
- Platt, M. O., Xing, Y., Jo, H., & Yoganathan, A. P. (2006). Cyclic pressure and shear stress regulate matrix metalloproteinases and cathepsin activity in porcine aortic valves. *The Journal of Heart Valve Disease*, 15(5), 622–9. PMID: 17044366.
- Pohl, U., Holtz, J., Busse, R., & Bassenge, E. (1986). Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*, 8(1), 37–44. doi: 10.1161/01.hyp.8.1.37. PMID: 3080370.
- Pohl und Herlan Pohl U, Herlan K, Huang A, Bassenge E. EDRF-mediated shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol*. 1991;261(6 Pt 2):H2016-H2023. doi: 10.1152/ajpheart.1991.261.6.H2016. PMID: 1721502.
- Pries, a R., & Secomb, T. W. (2014). Making microvascular networks work: angiogenesis, remodeling, and pruning. *Physiology (Bethesda)*, 29(6), 446–455. <http://doi.org/10.1152/physiol.00012.2014> 29/6/446 [pii]
- Qiu, J., Zheng, Y., Hu, J., Liao, D., Gregersen, H., Deng, X., ... Wang, G. (2014). Biomechanical regulation of vascular smooth muscle cell functions: from in vitro to in vivo understanding. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 11, 20130852. <http://doi.org/10.1098/rsif.2013.0852>
- Raghow, R., Seyer, J., & Kang, A. (2006). Connective Tissues of the Subendothelium. In J. Creager, M.A., Dzau, V.J., Loscalzo (Ed.), *Vascular Medicine. A Companion to Braunwald's Heart Disease* (7th ed., pp. 31–60).

- Rahimi, N., Dayanir, V., & Lashkari, K. (2000). Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16986–16992. <http://doi.org/10.1074/jbc.M000528200>
- Rajavashisth, T. B., Liao, J. K., Galis, Z. S., Tripathi, S., Laufs, U., Tripathi, J., ... Libby, P. (1999). Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11924–9. doi: 10.1074/jbc.274.17.11924. PMID: 10207013.
- Reynolds, A. R., Reynolds, L. E., Nagel, T. E., Lively, J. C., Robinson, S. D., Hicklin, D. J., ... Hodivala-Dilke, K. M. (2004). Elevated Flk1 (vascular endothelial growth factor receptor 2) signaling mediates enhanced angiogenesis in beta3-integrin-deficient mice. *Cancer Research*, 64(day 0), 8643–8650. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2760>
- Roberts, W. G., & Palade, G. E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*, 108 ( Pt 6, 2369–79. doi: 10.1242/jcs.108.6.2369. PMID: 7673356.
- Ross, E., Ata, R., Thavarajah, T., Medvedev, S., Bowden, P., Marshall, J. G., & Antonescu, C. N. (2015). AMP-Activated Protein Kinase Regulates the Cell Surface Proteome and Integrin Membrane Traffic. *PloS One*, 10(5), e0128013. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0128013>
- Rottiers, P., Saltel, F., Daubon, T., Chaigne-Delalande, B., Tridon, V., Billottet, C., ... Génot, E. (2009). TGFbeta-induced endothelial podosomes mediate basement membrane collagen degradation in arterial vessels. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 23), 4311–8. <http://doi.org/10.1242/jcs.057448>
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., & Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, 15(18), 2169–2177. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1201380>
- Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., & Shibuya, M. (2005). Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1076–81. <http://doi.org/10.1073/pnas.0404984102>
- Sandow, S. L. (2004). Factors, fiction and endothelium-derived hyperpolarizing factor.

- Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31(9), 563–570.  
<http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04048.x>
- Sadow, S. L., Gzik, D. J., & Lee, R. M. K. W. (2009). Arterial internal elastic lamina holes: Relationship to function? *Journal of Anatomy*, 214(2), 258–266.  
<http://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01020.x>
- Sadow, S. L., & Tare, M. (2007). C-type natriuretic peptide: a new endothelium-derived hyperpolarizing factor? *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(2), 61–7.  
<http://doi.org/10.1016/j.tips.2006.12.007>
- Sadow, S. L., Tare, M., Coleman, H. a., Hill, C. E., & Parkington, H. C. (2002). Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation Research*, 90(10), 1108–1113.  
<http://doi.org/10.1161/01.RES.0000019756.88731.83>
- Schachtner, H., Calaminus, S. D. J., Thomas, S. G., & Machesky, L. M. (2013). Podosomes in adhesion, migration, mechanosensing and matrix remodeling. *Cytoskeleton*, 70(10), 572–589. <http://doi.org/10.1002/cm.21119>
- Schaffer, B. E., Levin, R. S., Hertz, N. T., Maures, T. J., Schoof, M. L., Hollstein, P. E., ... Brunet, A. (2015). Identification of AMPK Phosphorylation Sites Reveals a Network of Proteins Involved in Cell Invasion and Facilitates Large-Scale Substrate Prediction. *Cell Metabolism*, 22(5), 907–921. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.009>
- Schaper, W., & Ito, W. D. (1996). Molecular Mechanisms of Coronary Collateral Vessel Growth. *Circulation Research*, 79(5), 911–919. <http://doi.org/10.1161/01.RES.79.5.911>
- Schiffrin, E. L. (2012). Vascular remodeling in hypertension: Mechanisms and treatment. *Hypertension*, 59(2 SUPPL. 1), 367–374.  
<http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187021>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–5. doi: 10.1038/nmeth.2089. PMID: 22930834; PMCID: PMC5554542.
- Scott, K. E. N., Wheeler, F. B., Davis, A. L., Thomas, M. J., Ntambi, J. M., Seals, D. F., & Kridel, S. J. (2012). Metabolic regulation of invadopodia and invasion by acetyl-CoA carboxylase 1 and de novo lipogenesis. *PLoS ONE*, 7(1).  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0029761>
- Seano, G., Chiaverina, G., Gagliardi, P. A., di Blasio, L., Puliafito, A., Bouvard, C., ... Primo,

- L. (2014). Endothelial podosome rosettes regulate vascular branching in tumour angiogenesis. *Nature Cell Biology*, 16(10). <http://doi.org/10.1038/ncb3036>
- Seano, G., & Primo, L. (2015). Podosomes and invadopodia: tools to breach vascular basement membrane. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 14(9), 1370–4. <http://doi.org/10.1080/15384101.2015.1026523>
- Semenza, G. L. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 993–998. [http://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01168-1](http://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01168-1)
- Senger, D. R., Van de Water, L., Brown, L. F., Nagy, J. A., Yeo, K. T., Yeo, T. K., ... Dvorak, H. F. (1993). Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Reviews*, 12(3-4), 303–24. doi: 10.1007/BF00665960. PMID: 8281615.
- Serini, G., Valdembri, D., & Bussolino, F. (2006). Integrins and angiogenesis: A sticky business. *Experimental Cell Research*, 312(5), 651–658. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.10.020>
- Sho, E., Sho, M., Singh, T. M., Nanjo, H., Komatsu, M., Xu, C., ... Zarins, C. K. (2002). Arterial Enlargement in Response to High Flow Requires Early Expression of Matrix Metalloproteinases to Degrade Extracellular Matrix. *Experimental and Molecular Pathology*, 73(2), 142–153. <http://doi.org/10.1006/exmp.2002.2457>
- Sho, M., Sho, E., Singh, T. M., Komatsu, M., Sugita, A., Xu, C., ... Masuda, H. (2002a). Subnormal shear stress-induced intimal thickening requires medial smooth muscle cell proliferation and migration. *Experimental and Molecular Pathology*, 72(2), 150–160. <http://doi.org/10.1006/exmp.2002.2426>
- Sho, M., Sho, E., Singh, T. M., Komatsu, M., Sugita, A., Xu, C., ... Masuda, H. (2002b). Subnormal shear stress-induced intimal thickening requires medial smooth muscle cell proliferation and migration. *Experimental and Molecular Pathology*, 72(2), 150–60. <http://doi.org/10.1006/exmp.2002.2426>
- Sims, F. H. (1985). Discontinuities in the internal elastic lamina: a comparison of coronary and internal mammary arteries. *Artery*, 13(3), 127–43. PMID: 4096648.
- Smith, E. B., & Staples, E. M. (1980). Distribution of plasma proteins across the human aortic wall--barrier functions of endothelium and internal elastic lamina. *Atherosclerosis*, 37(4), 579–590. doi: 10.1016/0021-9150(80)90065-9. PMID: 6161619.
- Song, J. W., & Munn, L. L. (2011). Fluid forces control endothelial sprouting. *Proceedings of*



*the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37), 15342–15347. <http://doi.org/10.1073/pnas.1105316108>

- Stoletov, K. V., Ratcliffe, K. E., Spring, S. C., & Terman, B. I. (2001). NCK and PAK Participate in the Signaling Pathway by which Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates the Assembly of Focal Adhesions. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22748–22755. <http://doi.org/10.1074/jbc.M009720200>
- Sun, Z., Li, X., Massena, S., Kutschera, S., Padhan, N., Gualandi, L., ... Claesson-Welsh, L. (2012). VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSAAd. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(7), 1363–1377. <http://doi.org/10.1084/jem.20111343>
- Tada, S., & Tarbell, J. M. (2004). Internal elastic lamina affects the distribution of macromolecules in the arterial wall: a computational study. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 287(2), H905–H913. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00647.2003>
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., & Shibuya, M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-?? and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO Journal*, 20(11), 2768–2778. <http://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2768>
- Tangelder, G. J., Slaaf, D. W., Arts, T., & Reneman, R. S. (1988). Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *The American Journal of Physiology*, 254(6), H1059–64. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1988.254.6.H1059>
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F. G., Comoglio, P. M., & Marchisio, P. C. (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Experimental Cell Research*, 159(1), 141–157. [http://doi.org/10.1016/S0014-4827\(85\)80044-6](http://doi.org/10.1016/S0014-4827(85)80044-6)
- Tatin, F., Varon, C., Génot, E., & Moreau, V. (2006). A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 4), 769–781. <http://doi.org/10.1242/jcs.02787>
- Thomson, D. M., Ascione, M. P. a, Grange, J., Nelson, C., & Hansen, M. D. H. (2011). Phosphorylation of VASP by AMPK alters actin binding and occurs at a novel site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(1), 215–9. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.059>

- Thornton, C., Bright, N. J., Sastre, M., Muckett, P. J., & Carling, D. (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid  $\beta$ -peptide exposure. *The Biochemical Journal*, *434*(3), 503–12. <http://doi.org/10.1042/BJ20101485>
- Tressel, S. L., Huang, R. P., Tomsen, N., & Jo, H. (2007). Laminar shear inhibits tubule formation and migration of endothelial cells by an angiopoietin-2-dependent mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(10), 2150–2156. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.150920>
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., DeJana, E., Schultz, D. a, Engelhardt, B., ... Schwartz, M. a. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, *437*(7057), 426–431. <http://doi.org/Doi10.1038/Nature03952>
- Van Hinsbergh, V. W. M., Engelse, M. a., & Quax, P. H. a. (2006). Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *26*(4), 716–728. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000209518.58252.17>
- Varon, C., Tatin, F., Moreau, V., Obberghen-schilling, E. Van, Fernandez-sauze, S., Reuzeau, E., ... Génot, E. (2006). Transforming Growth Factor  $\beta$  Induces Rosettes of Podosomes in Primary Aortic Endothelial Cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *26*(9), 3582–3594. <http://doi.org/10.1128/MCB.26.9.3582>
- Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., & Menendez, J. A. (2009). The active form of the metabolic sensor: AMP-activated protein kinase (AMPK) directly binds the mitotic apparatus and travels from centrosomes to the spindle midzone during mitosis and cytokinesis. *Cell Cycle*, *8*(15), 2385–2398. <http://doi.org/10.4161/cc.8.15.9082>
- Wang, H., Moore, S., & Alavi, M. Z. (1996). Synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in rabbit aortic neointima after selective de-endothelialization, *126*, 95–104. doi: 10.1016/0021-9150(96)05898-4. PMID: 8879438.
- Wang, J., Taba, Y., Pang, J., Yin, G., Yan, C., & Berk, B. C. (2009). GIT1 mediates VEGF-induced podosome formation in endothelial cells: critical role for PLCgamma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(2), 202–8. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.174391>
- Wang, L., Zheng, J., Bai, X., Liu, B., Liu, C. J., Xu, Q., ... Wang, X. (2009). ADAMTS-7 mediates vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in balloon-injured rat arteries. *Circulation Research*, *104*(5), 688–698. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.188425>

- Wang, S., Liang, B., Viollet, B., & Zou, M.-H. (2011). Inhibition of the AMP-activated protein kinase- $\alpha$ 2 accentuates agonist-induced vascular smooth muscle contraction and high blood pressure in mice. *Hypertension*, *57*(5), 1010–7. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168906>
- Wang, S., Zhang, C., Zhang, M., Liang, B., Zhu, H., Lee, J., ... Zou, M.-H. (2012). Activation of AMP-activated protein kinase  $\alpha$ 2 by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo. *Nature Medicine*, *18*(6), 902–10. <http://doi.org/10.1038/nm.2711>
- Xiao, H., Bai, X. H., Wang, Y., Kim, H., Mak, A. S., & Liu, M. (2013). MEK/ERK pathway mediates PKC activation-induced recruitment of PKC?? and MMP-9 to podosomes. *Journal of Cellular Physiology*, *228*(2), 416–427. <http://doi.org/10.1002/jcp.24146>
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., ... Condeelis, J. (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation: The role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin. *Journal of Cell Biology*, *168*(3), 441–452. <http://doi.org/10.1083/jcb.200407076>
- Yamaoka-Tojo, M., Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Dikalov, S. I., Chen, Y. E., Tojo, T., ... Alexander, R. W. (2004). IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species-dependent endothelial migration and proliferation. *Circulation Research*, *95*(3), 276–283. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000136522.58649.60>
- Yan, Y., Tsukamoto, O., Nakano, a, Kato, H., Kioka, H., Ito, N., ... Takashima, S. (2015). Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5. *Nat Commun*, *6*, 6137. <http://doi.org/ncomms7137> [pii]r10.1038/ncomms7137
- Yao, Y., Rabodzey, A., & Dewey, C. F. (2007). Glycocalyx modulates the motility and proliferative response of vascular endothelium to fluid shear stress. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *293*(2), H1023–H1030. <http://doi.org/10.1152/ajpheart.00162.2007>
- Zakrzewicz, A., Secomb, T. W., & Pries, A. R. (2002). Angioadaptation: keeping the vascular system in shape. *News in Physiological Sciences : An International Journal of Physiology Produced Jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, *17*, 197–201. <http://doi.org/10.1152/nips.01395.2001>
- Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Carano, A., & Marchisio, P. C. (1988). The distribution of

- podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 3(5), 517–23. <http://doi.org/10.1002/jbmr.5650030507>
- Zeng, H., Dvorak, H. F., & Mukhopadhyay, D. (2001). Vascular Permeability Factor (VPF)/Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-1 Down-modulates VPF/VEGF Receptor-2-mediated Endothelial Cell Proliferation, but Not Migration, through Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29), 26969–26979. <http://doi.org/10.1074/jbc.M103213200>
- Zhang, H., Sunnarborg, S. W., Mcnaughton, K. K., Johns, T. G., David, C., Faber, J. E., & Lee, D. C. (2008). Heparin-Binding Epidermal Growth Factor – Like Growth Factor Signaling in Flow-Induced Arterial Remodeling. *Circulation Research*, (102), 1275–1285. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.171728>
- Zheng, B., & Cantley, L. C. (2007). Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 819–22. <http://doi.org/10.1073/pnas.0610157104>
- Zhou, J., Li, Y.-S., & Chien, S. (2014). Shear Stress-Initiated Signaling and Its Regulation of Endothelial Function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2191–2198. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303422>
- Zhu, Y.-Q., Li, M.-H., Yan, L., Tan, H.-Q., & Cheng, Y.-S. (2014). Arterial wall degeneration plus hemodynamic insult cause arterial wall remodeling and nascent aneurysm formation at specific sites in dogs. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 73(9), 808–19. <http://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000100>
- Zou, M., Kirkpatrick, S. S., Davis, B. J., Nelson, J. S., Iv, W. G. W., Schlattner, U., ... Goldman, M. H. (2004). Activation of the AMP-activated Protein Kinase by the Anti-diabetic Drug Metformin in Vivo. *October*, 279(42), 43940–43951. <http://doi.org/10.1074/jbc.M404421200>



## Eidesstattliche Versicherung

**Schubert, Kai Michael**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel  
In-situ und in-vitro Untersuchungen zum Einfluss des Endothels auf subendotheliale Matrixschichten.

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**Zürich, 19.01.2021**

Ort, Datum

**Kai Michael Schubert**

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand