

# **Über den Einfluss von Placenta Growth Factor auf die Arteriogenese**

Knochenmarktransplantation überwindet die Arteriogenesehemmung  
in Placental Growth Factor -/- Mäusen

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hanno Elsässer  
aus Königstein im Taunus

Gießen 2003

Aus dem Max-Planck-Institut  
für Physiologische und Klinische Forschung  
Kerkhoff-Institut  
Abteilung Experimentelle Kardiologie  
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. W. Schaper  
in Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Schaper  
Gutachter: PD Dr. Sandip M. Kanse

Tag der Disputation: 30.09.2003

für meine Eltern und Großeltern

---

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

	<b>Seite</b>
<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
I.1. Arteriogenese	1
I.2. Mäusehinterlaufmodell	2
I.3. (VEGF und) PLGF	3
I.4. PLGF-Syntheseorte	6
I.5. Hypothesen und Fragestellungen	6
<b>II. Materialien und Methoden</b>	<b>9</b>
II.1. Versuchstiere	9
II.1.1. Gesetzliche Bestimmungen	9
II.1.2. Versuchstiergruppen	9
II.1.2.1. Kontrollgruppe	9
II.1.2.2. PLGF -/- Gruppe	10
II.1.2.3. Knochenmarktransplantierte Tiere	10
II.1.2.4. Die VEGF Promotor $\beta$ -gal transgenen Mäuse	10
II.2. Operationstechniken	11
II.2.1. Narkose	11
II.2.2. Unterbindung der Femoralarterie	11
II.3. Auswertungsverfahren	11
II.3.1. Laser Doppler Imaging (LDI)	11
II.3.2. Hämoglobin-Sauerstoffsättigung (HbSS)	12
II.3.3. Infrarot-Thermographie (IRT)	13
II.3.4. Fixierung und Kontrastmittelinjektion	15
II.3.5. Röntgen und –Aufsichtsangiographie	16
II.3.6. Mikroskopie	17
II.3.6.1. Vorbereitung	17
II.3.6.2. Lichtmikroskopie und Morphometrie	17
II.3.6.3. Transmissionselektronenmikroskopie	18

	<b>Seite</b>
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>19</b>
III.1. Änderung der Blutflussrichtung	19
III.2. Laser-Doppler-Imaging (LDI)	20
III.2.1. Wildtyp vs. PLGF -/- Gruppe	20
III.2.2. LDI bei 25°C und bei 37°C (IRT-LDI Vergleich)	22
III.3. Hämoglobin-Sauerstoffsättigung (HBSS)	23
III.4. Infrarot-Thermographie	23
III.5. Röntgen und Aufsichtsangiographie	26
III.6. Lichtmikroskopie	29
III.6.1. Schnittbilder	29
III.6.2. Morphometrie	33
III.6.3. Monozytenrekrutierung	35
III.7. Transmissionselektronenmikroskopie	36
III.8. VEGF Promotor $\beta$ -gal transgenen Mäuse	38
<b>IV. Diskussion</b>	<b>41</b>
IV.1. Wichtigste Ergebnisse	41
IV.2. Vergleich mit Anfangshypothesen - sind die Fragestellungen beantwortet?	42
IV.3. Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext	43
IV.3.1. Natürliche Funktion der Kollateralen	43
IV.3.2. Die Rolle der Schubspannung	43
IV.3.3. Hypoxie ist nicht essentiell für Arteriogenese	46
IV.3.4. VEGF	47
IV.3.5. PLGF	48
IV.3.6. VEGF und PLGF Rezeptoren	50
IV.3.7. Monozyten	56
IV.4. Diskussion einzelner Methoden und Ergebnisse	60
IV.4.1. Modell	60
IV.4.2. Angiographien	61
IV.4.3. Morphometrie	61
IV.4.4. Die wenig invasiven Methoden im Vergleich	62
IV.5. Schlussfolgerungen und Ausblick	65
IV.5.1. PLGF	65

---

	<b>Seite</b>
IV.5.2. Zukunft des Modells	68
<b>V. Literaturangaben</b>	<b>71</b>
<b>VI. Anhang</b>	<b>83</b>
VI.1. Rezepte	83
VI.1.1. Epon (Epoxidharz)	83
VI.1.2. Wismut Gelatine Kontrastmittel	84
VI.1.3. PBS-Lösung	84
VI.2. Sonstiges	84
VI.2.1. Knochenmarktransplantation	84
VI.2.2. Stefan-Boltzmann-Gesetz	86
VI.2.3. Thermodoppelkammer	86
VI.2.4. $\beta$ -Galaktosidasenachweis	87
VI.3. Abkürzungen	88
<b>VII. Danksagung</b>	<b>91</b>
<b>VIII. Lebenslauf</b>	<b>93</b>
<b>IX. Zusammenfassung</b>	<b>95</b>





# I. Einleitung

Stenose und Okklusion einer Arterie stellen ernste, abhängig von der Lokalisation und Geschwindigkeit der Einengung sogar lebensbedrohliche, medizinische Probleme dar. Die mangelnde Nähr- und Sauerstoffversorgung kann im zugehörigen Gebiet zu ischämisch bedingten Nekrosen (Infarkten) führen. Am dramatischsten sind diese Ereignisse im Herzen und im Gehirn. Im Herzen können sie neben dem Untergang des Muskelgewebes auch Störungen im Reizleitungssystem bis hin zu Kammerflimmern und Herzstillstand verursachen. Im Gehirn führen sie von Transient Ischämischer Attacke (TIA) bis hin zum apoplektischen Insult. Im Bein, unserem Modell am nächsten, manifestiert sich dieses Problem häufig als Claudicatio intermittens: Die zunehmende Verengung der Hauptstrombahn der Beine (peripherer arterieller Verschluss) führt zu Schmerzen nach immer kürzer werdender Gehstrecke. Später kommt es, wegen der Mangelver- und Mangelentsorgung auch in Ruhe, zu Nekrosen der Akren und Amputationspflicht immer weiterer Teile der betroffenen Extremität. Ein die Stenose überbrückender Umgehungskreislauf (Kollateralkreislauf) kann die Nähr- und Sauerstoffversorgung modifizieren und teilweise kompensieren.

## I.1. Arteriogenese

Das Wachstum präexistierender Kollateralarteriolen im adulten Organismus bezeichnet man als **Arteriogenese** (Schaper and Ito, 1996; Schaper and Scholz, 1997; Herzog, 2002). Manche Autoren sprechen synonym auch von adaptiver Arteriogenese (Carmeliet, 2001). Vor allem die Bluttransportkapazität von Umgehungsfäßen bestimmt, ob im Falle der Okklusion der Hauptstrombahn Schäden verhindert werden können. Diese Kapazität hängt von der Ursprungsgröße, der Wachstumsmöglichkeit und -geschwindigkeit präexistenter Kollateralen ab: von deren arteriogener Potenz.

Die Arteriogenese ist ein zeitabhängiger Prozess (Spalteholz, 1907; Fulton, 1965; Schaper 1971). Leider kompensiert sie die Versorgungsdefizite, welche eine Thrombosierung der Hauptstrombahn verursacht, in den meisten Fällen zu langsam, als dass die Infarzierung der abhängigen Gewebe verhindert werden könnte.

Stenose und Okklusion einer Hauptstrombahn führen zu erhöhter Schubspannung in den Umgehungsfäßen. Sie initiiert Endothelaktivierung mit Zytokinproduktion, Adhäsionsmolekülaufregulation und Monozytenrekrutierung. Im Folgenden kommt es zu gesteigerter mitotischer Aktivität der Endothelzellen, der

glatten Muskelzellen und der Fibroblasten und zum eigentlichen Wachstum mit erhöhter Proteolyse- und Syntheseaktivität. Wenn die Zellen aus dem synthetischen wieder in den Ruhe- Funktionsphänotyp übergehen ist die Arteriogenese abgeschlossen (Scholz et al., 1996; Schaper and Scholz, 1997; Fleming et al., 1998; Scholz et al., 2000) (siehe auch Kapitel IV.3.2. und Abb. IV.1.).

Trotz einiger Gemeinsamkeiten sind von der Arteriogenese zwei weitere Arten der Formierung von Blutgefäßen deutlich abzugrenzen (Buschmann and Schaper, 1999; Scholz et al., 2000). Beide sind in der Vergangenheit wesentlich stärker beforscht worden als die Arteriogenese:

Verantwortlich für die Entstehung von Blutgefäßen in der Embryonalentwicklung ist die **Vasculogenese**, einhergehend mit der Bildung eines primären kapillären Plexus aus dem Mesoderm durch Differenzierung endothelialer Progenitorzellen und späterer Bildung primitiver Blutgefäße (Risau and I., 1995; Bussolino et al., 1997; Yancopoulos et al., 1998).

Die **Angiogenese** (Folkman, 1983; Risau, 1997) ist die Neusprossung von Angioblasten aus bereits entwickelten Gefäßen. Sie geschieht sowohl embryonal als auch postembryonal und im adulten Individuum. Zum Beispiel bei der Wundheilung oder der Ovulation tritt sie in Erscheinung. Ihre Mechanismen sind streng reguliert, treten aber dennoch auch pathologisch auf, beispielsweise bei der Tumorprogression und –metastasierung (Folkman, 1971), bei der diabetischen Retinopathie (Folkman, 1995) und bei rheumatoider Arthritis (Koch et al., 1994).

Die Definition der Arteriogenese ist auch deshalb nötig geworden, weil zur Unterscheidung von der Vasculogenese und von der Angiogenese unklare Abgrenzungen benutzt wurden. Wegen der Rekapitulierung der Expression von embryonalen Genen während der Arteriogenese sprachen manche Autoren statt von der Arteriogenese (vor der Etablierung dieses Terminus) von der „*Rekapitulierten Vasculogenese*“. Folkman sprach, zur Abgrenzung von der Angiogenese, von der „*Nicht-sprossenden Angiogenese*“. Heute ist die „*Nicht-sprossenden Angiogenese*“ (engl. Intussusception) der Kapillarlängsspaltung vorbehalten (Burri, 1992).

## I.2. Mäusehinterlaufmodell

In der Vergangenheit sind präexistierende, zum Wachstum befähigte Kollateralarterien in unterschiedlichen Geweben verschiedener Spezies beschrieben und in zahlreichen Modellen untersucht worden (Baroldi et al., 1956;

Litvak et al., 1957; Fulton, 1965; Schaper, 1971; Schaper et al., 1976a; Schaper and Schaper, 1993). Diese Kollateralarteriolen befinden sich (mit wenigen Ausnahmen wie Schweine-, Schafs- und Rattenherzen) in den meisten Organen unterschiedlichster Spezies. Die Arteriogenese weist in verschiedenen Organen kaum Unterschiede auf. Wir haben in unserem Institut ein Modell entwickelt, an dem man in vivo die Arteriogenese in Mäusehinterläufen nach Okklusion der Femoralarterie studieren kann. Vorteilhaft ist beim Mäusehinterlaufmodell, dass die Femoralarterie der meisten Mäuse (abhängig vom Mäusestamm (Scholz et al., 2002)) ohne folgende Gewebsinfiltration okkludiert werden kann. Der Blutfluss durch die präexistierenden Kollateralen ist für das Überleben der Pflanze ausreichend. Wegen des höheren Sauerstoffbedarfs im Myokard ist solch ein Eingriff im Herzen ohne Infarkt nicht möglich. Daher arbeitet man dort mit Ameroidkonstriktoren, welche die Koronarien nicht akut, sondern langsam, in einem bestimmten Zeitintervall, okkludieren.

Man bestimmt beim Mäusehinterlaufmodell den genauen Zeitpunkt der Okklusion, anders als zum Beispiel beim Ameroid Konstriktor Modell im Hund (Schaper et al., 1976b), und kann die Sequenz der anschließenden Ereignisse studieren.

### **I.3. (VEGF und) PLGF**

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Rolle des Placenta Growth Factor (PLGF) in der Arteriogenese. Der menschliche PLGF (Maglione et al., 1991) ist mit dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Keck et al., 1989; Conn et al., 1990) nahe verwandt. Beide haben vor allem in der cysteinreichen Domäne einen hohen Grad an Sequenzhomologie. Bisher sind 3 unterschiedlich lange Unterformen des humanen PLGF beschrieben, welche alle von einem einzigen, differentiell gespleißten Gen (beim Menschen auf dem Chromosom Nummer 14) transkribiert werden (Maglione et al., 1993; DiPalma et al., 1996; Cao et al., 1997). Das Mäuse PLGF ist auf dem Chromosom 12 kodiert und dem humanen PLGF-2 sehr ähnlich. Beide besitzen eine Heparinbindungsstelle.

Während VEGF sowohl an den VEGF-Rezeptor 1 (meist als **Flt-1**: Fms-like tyrosine kinase-1 bezeichnet) als auch an den VEGF-Rezeptor 2 (beim Tier wird er als **Flk-1**: Fetal liver kinase-1, beim Menschen als **KDR**: Kinase Insert Domain-Containing Receptor bezeichnet) bindet, geht PLGF nur mit VEGF-Rezeptor 1 eine Bindung ein. Endothelzellen besitzen sowohl Flt-1 als auch Flk-1 (KDR) Rezeptoren, Monozyten präsentieren ausschließlich Flt-1.

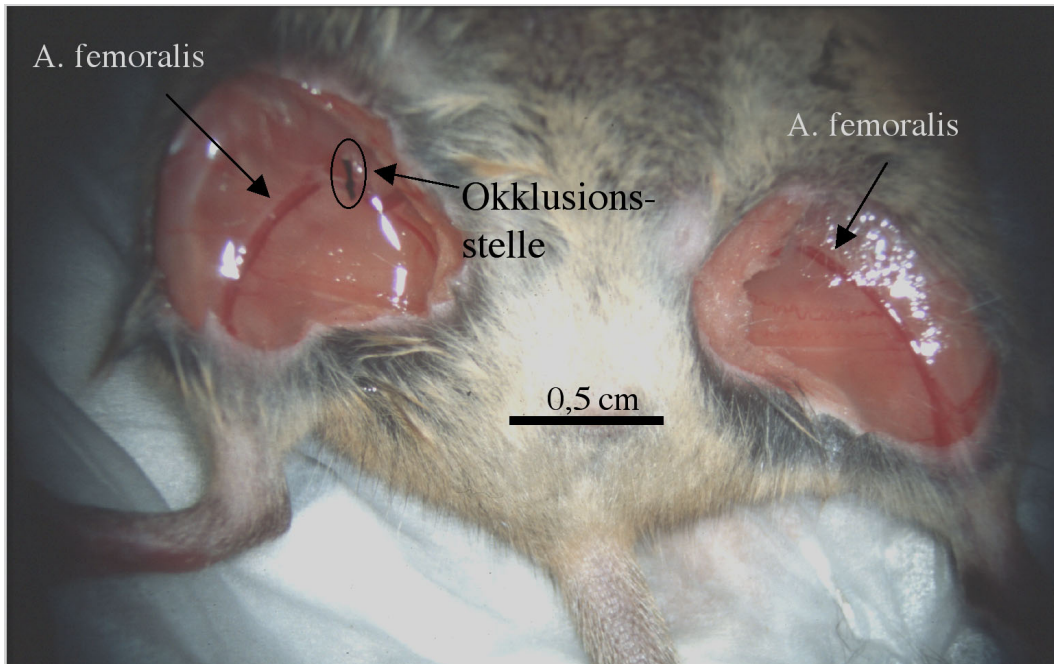


Abb.I.1.: Darstellung des Operationsgebietes

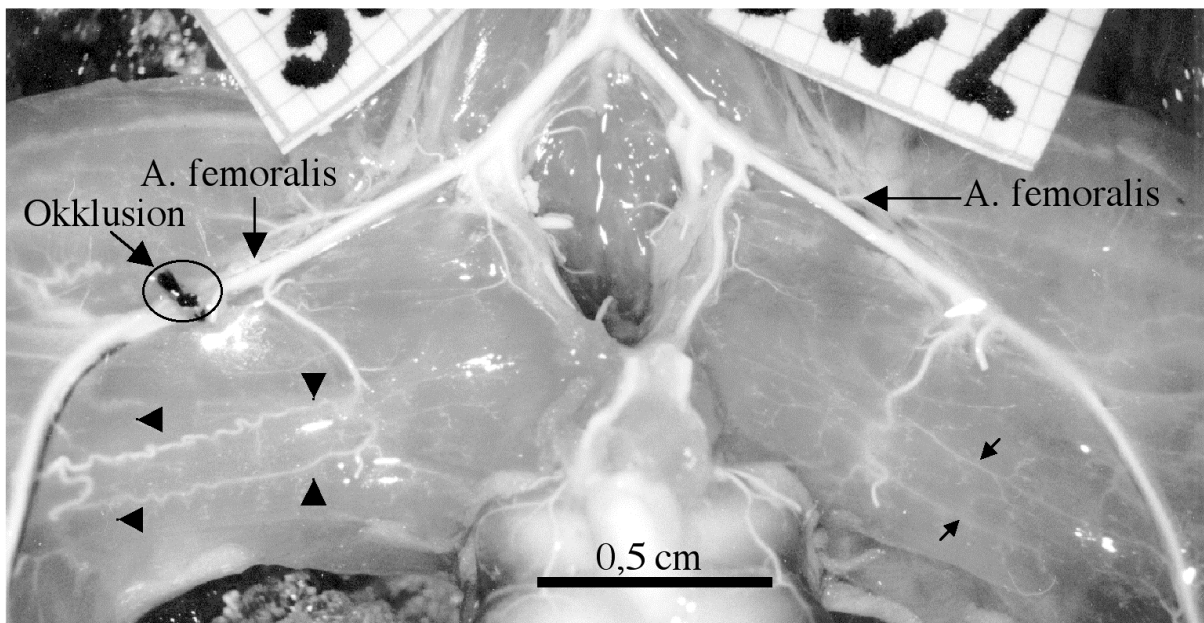


Abb.I.2.: Übersichtangiographie; dicke Pfeile: gewachsene Kollateralen, dünne Pfeile: nicht-gewachsene Kollateralen

VEGF wurde als wichtiger Regulator der physiologischen (Folkman and Shing, 1992; Risau and Flamme, 1995; Bussolino et al., 1997) und pathologischen (Folkman, 1995) Angiogenese beschrieben. Bereits das Fehlen eines einzigen VEGF-Allels verursacht Defekte in der Blutgefäßentstehung, die mit dem Überleben von Mäusembyonen nicht vereinbar sind (Carmeliet et al., 1996).

Wenn auch noch kaum mit diesem Begriff und mit dem speziellen Fokus auf Arteriogenese, so wurde dennoch schon über von VEGF beeinflusstes therapeutisches Gefäßwachstum – im Sinne der Angiogenese – berichtet: bei Hundemyokard, Kaninchenmyokard- und -hinterlaufischämie (Banai et al., 1994; Steg et al., 1994; Takeshita et al., 1996) und bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK) (Isner et al., 1996; Baumgartner et al., 1998; Folkman, 1998). Es ist daher interessant und von Bedeutung, PLGF als wichtiges Mitglied der VEGF-Familie in Bezug auf die Arteriogenese zu untersuchen.

Um den Wirkungsverlust eines einzelnen Gens zu studieren, greift man auf Knock Out Mäuse zurück. 7 Exons kodieren auf dem Chromosom 12 die definitive Aminosäuresequenz des Mäuse-PLGF. Die Inaktivierung des PLGF Gens wird durch gezielte partielle Zerstörung (targeted disruption) der Bereiche der Exons 3, 4 und 6 erreicht. Sie kann durch Southern und Northern Blot Analysen bestätigt werden. Der Nachwuchs von PLGF +/- Brutpaaren entstammte, wie nach den Mendelschen Gesetzen zu erwarten, zu ca. 25% dem PLGF -/- Genotyp (Carmeliet, 2001). Mäuse, deren PLGF Expression verhindert ist (PLGF -/-; PLGF -/-), haben gegenüber VEGF -/- Tieren den großen Vorteil, dass sie generell überlebensfähig sind. Die physiologische Gefäßentwicklung von PLGF gendefizienten Tieren scheint unauffällig zu sein (Carmeliet, 2001). Es wurde kein Einfluss von PLGF auf die Vaskulogenese oder die pränatale Angiogenese festgestellt. Dass PLGF aber generell das Wachstum von Gefäßen beeinflussen kann, ist in zahlreichen Studien der letzten 3-4 Jahre nachgewiesen worden. So beschrieben beispielsweise Ziche et al. (Ziche et al., 1997), dass PLGF-1 in vivo (in der Kanninchenkornea) Angiogenese induzieren kann. In vitro wiesen sie seine stimulierende Wirkung auf Endothelzellmigration und -proliferation nach (gleiche Quelle). Es wurde gezeigt, dass PLGF die MAP Kinase stimuliert (Landgren et al., 1998). Da PLGF also einen Einfluss auf vaskuläres Wachstum hat, ist es von Interesse, seinen Einfluß auf die Arteriogenese zu untersuchen.

#### **I.4. PLGF-Syntheseorte**

Von großer Bedeutung für das Verständnis der Rolle von PLGF in der Arteriogenese ist die Frage nach seiner natürlichen Quelle, oder präziser: nach der natürlichen Quelle von in der Arteriogenese relevantem PLGF. Die Expression von PLGF wurde schon in einigen Geweben und Organen untersucht (Persico et al., 1999): So wurde sie neben der Plazenta in Hirn, Herz und Lunge, sowie im Skelettmuskel und in der Schilddrüse festgestellt. Dagegen konnte keine PLGF Expression in Niere, Leber und Pankreas, glattem Muskel, Milz und Hoden gefunden werden. In Endothelzellen humaner Umbilikalvenen (HUVEC's), in Rinderaortenendothelzellen (BAEC's) und in Pulmonalarterienendothelzellen von Kälbern (CPA's) konnte ebenfalls PLGF Produktion nachgewiesen werden, in den (glatten) Gefäßmuskelzellen aber nicht (ebenfalls (Persico et al., 1999)).

Zirkulierende Blutzellen wurden bislang nur unzureichend auf die Produktion von Wachstumsfaktoren untersucht. Im Mäusehinterlaufmodell für die Untersuchung der Arteriogenese spielen Monozyten eine entscheidende Rolle. Der Verdacht liegt nahe, dass die verstärkt rekrutierten und aktivierten Monozyten neben Cytokinen, welche umgebende Zellen zur Wachstumsfaktorproduktion stimulieren, auch selber Wachstumsfaktoren produzieren. Speziell für PLGF wurde die generelle Möglichkeit seiner Produktion in Monozyten nachgewiesen (Carmeliet, 2001). Wenn zirkulierende Blutzellen für die PLGF-Produktion verantwortlich sind, dann könnten durch Transplantation von Knochenmark aus Wildtypmäusen (PLGF +/+) eventuelle Arteriogenesedefizite von PLGF -/- Mäusen aufgehoben werden, da genetisch intaktes Knochenmark genetisch intakte (PLGF +/+) Vorläuferzellen zirkulierender Blutzellen enthält.

#### **I.5. Hypothesen und Fragestellungen**

Auf die folgenden Fragestellungen konzentriert sich diese Arbeit :

*Hat PLGF einen Einfluss auf das Wachstum der Kollateralen?*

*Wenn ja, wie und wo beeinflusst PLGF die Arteriogenese?*

Die Tatsache, dass PLGF -/- Mäuse (im Gegensatz zu VEGF -/- Mäusen) lebensfähig sind, ermöglicht folgende überprüfbare Fragestellung :

- Ist die Arteriogenese in PLGF -/- Mäusen gestört?

Sollte dieses zutreffen, dann stellen sich zwei weitere Fragen:

*Wie ist die Arteriogenese in PLGF -/- Tieren wieder herzustellen?*

und

*Wo liegt die natürlichen Quelle des arteriogeneserelevanten PLGF's ?*

Es wäre möglich, dass die perivaskulären Monozyten für die PLGF Produktion verantwortlich sind. Neben der autokrinen PLGF Produktion von Monozyten kommen auch andere zirkulierende Zellen als PLGF Quelle in Frage.

Ein alleiniger PLGF +/+ Genotyp des Knochenmarkes müsste eine hinreichende Voraussetzung für eine normale Arteriogenese sein. Um dieser Vermutung nachzugehen, kann folgende weitere Fragestellung überprüft werden:

- Ist in PLGF -/- Mäusen durch Knochenmarkstransplantation von Wildtypmäusen die mutmaßliche Arteriogenesehemmung aufzuheben?





## II. Materialien und Methoden

### II.1. Versuchstiere

#### II.1.1. Gesetzliche Bestimmungen

Die vorliegende Studie wurde mit Genehmigung des Landes Hessen, Regierungspräsidium Darmstadt, durchgeführt (#B2/115) und entspricht §8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes (Fassung in der Bekanntmachung vom 29. Mai 1998 (BGBl. Jahrgang 1998 Teil I, Nr 30 S: 1106 ff.)). Alle Tiere wurden entsprechend dem "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" [NIH, 1985] nach internationalen Standards behandelt.

#### II.1.2. Versuchstiergruppen

Die Tiere dieser Studie hatten allesamt einen 129/Sv Hintergrund. Sie wurden von Herrn Prof. Peter Carmeliet vom Center for Transgene Technology and Gene Therapy der Universität Leuven zur Verfügung gestellt. Da frühere Untersuchungen die Vermutung zulassen, dass ältere Tiere (älter als 6 Monate) größere präexistierende Kollateralen besitzen als jüngere Tiere (nicht publiziert), wurden in dieser Studie Mäuse verwandt, die alle ungefähr gleich alt waren (12 +/- 1,5 Wochen).

##### II.1.2.1. Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe (+/+ oder wt) bestand aus 29 Tieren mit einem natürlichen PLGF +/+ Genotyp (Wildtyp). Bei 11 Tieren wurden schon eine Woche nach der Femoralokklusion die Kollateralen gewonnen um sie den verschiedenen Auswertungsmethoden zuzuführen (Details siehe II.3.4.). Weitere 18 PLGF +/+ Tiere wurden über einen längeren Zeitraum beobachtet: beide Hinterlaufspfoten (die der femoralokkludierten und die der nicht-femoralokkludierten Seite) wurden zu bestimmten Zeitpunkten (vor der Operation, sowie direkt danach, drei, sieben, vierzehn und einundzwanzig Tage später) in vivo untersucht: ihre Temperatur mit der Infrarot-Thermographie (IT), ihre Durchblutung mit dem Laser Doppler Imager (LDI) und ihre Hämoglobin-Sauerstoff-Sättigung (HbSS) mit dem Lichtabsorbtionsspektrometer. Nach vier Wochen wurden auch diese Tiere getötet, um die Kollateralen der mikroskopischen Auswertung zuzuführen.

### II.1.2.2. PLGF -/- Gruppe

Die PLGF -/- (-/-) Gruppe (Zur Entstehung s. I.3.) bestand aus 20 Tieren. 7 wurden bereits nach einer Woche getötet, um ihre Kollateralen zu gewinnen und diese den verschiedenen Auswertungsmethoden zukommen zu lassen. Mit den übrigen 13 Tieren wurde wie mit den *weiteren 18 +/+ Tieren* verfahren (siehe II.2.2.1.).

### II.1.2.3. Knochenmarktransplantierte Tiere

Um der Quelle von PLGF auf die Spur zu kommen, wurden 8 PLGF -/- Tiere mit einer für das blutbildende System letalen Dosis röntgenbestrahlt. Anschließend wurde ihnen PLGF +/+ Knochenmark injiziert, welches zuvor von PLGF +/+ Tieren gewonnen wurde (Details siehe VI.2.1). Die Mäuse (Spender und Empfänger) wurden über 6 Generationen im gleichen genetischen Hintergrund (129/Sv) gezüchtet, sodass nahezu keine Gewebsunverträglichkeiten mehr vorlagen. Den Tieren wurde die rechte Femoralarterie okkludiert. Eine Woche später wurden sie getötet, um ihre Kollateralen den verschiedenen Auswertungsmethoden zu zuführen.

### II.1.2.4. Die VEGF Promotor $\beta$ -gal transgenen Mäuse

Neben den Untersuchungen an PLGF -/- Tieren wurde – im Rahmen von VEGF Expressionsstudien unseres Institutes – an zwei weiteren Mäusen das Okklusionsmodell der Femoralarterie angewandt. Bei diesen Mäusen war die VEGF Sekretion mit einer  $\beta$ -Galaktosidaseproduktion konjugiert. Für diese Koproduktion wurde ein Vektor konstruiert, der einen Einschub für Neomycinresistenz und für das für  $\beta$ -Galactosidase kodierende lacZ Gen enthielt und der am Ende der VEGF-Promotorregion integriert wurde (Damert et al., 2002). Die histochemische Reaktion zur Detektion der  $\beta$ -Galactosidase wurde in 5  $\mu$ m dicken Gefrierschnitten so vorgenommen, wie es in Lefkovits Immunology Methods Manual beschrieben ist, nämlich mit X-Galaktopyranosidlösung und Kalium-Eisenzyanidlösung (Lefkovits, 1997, Details siehe VI.2.4.). Mit den VEGF Promotor  $\beta$ -gal transgenen Mäusen könnte ein Ort der VEGF Produktion während der Arteriogenese und die Regulation des VEGF Promoters dargestellt werden. Die Nieren der Tiere dienten als Positivkontrolle, da fenestrierte Endothelien eine permanente niedrige VEGF-Produktion aufweisen. Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere sind keine statistisch signifikanten Aussagen zu erwarten, möglicherweise ist aber eine Tendenz auszumachen.

## **II.2. Operationstechniken**

### **II.2.1. Narkose**

Die Narkotisierung der circa 25 g schweren Maus erfolgte zehn Minuten vor Beginn der Operation. Das Narkotikum war eine Mischung aus einem Teil zehnpotentigem Ketamin (Ketaminhydrochlorid, Medistar, Holzwickede) und einem Teil zweiprozentigem Xylasin (Xylasinhydrochlorid, Medistar, Holzwickede) verdünnt mit einem gleichgroßen Anteil an NaCl (0,9%ig). Die Narkose erfolgte intraperitoneal, hielt etwa vierzig Minuten an und konnte gegebenenfalls durch Nachspritzen verlängert werden.

### **II.2.2. Unterbindung der Femoralarterie**

Durch einen kleinen Hautschnitt hindurch wurde die Arteria (A.) femoralis des rechten Beines freipräpariert. Dabei musste besonders sorgfältig vorgegangen werden, um Vene und Nerv zu schonen. Distal der Abzweigung der A. femoralis profunda aber proximal der Abzweigung der A. poplitea wurde die Femoralarterie nun mit einem Ligaturfaden abgebunden. Der Blutfluß durch die A. femoralis in den distalen Teil des Hinterbeines wurde somit komplett unterbunden. Zuletzt wurde die Hautwunde mit wenigen Stichen wieder verschlossen. Um eine bessere Kontrastmittelfüllung der Kollateralen zu erreichen, wurde die A. Femoralis der "nicht okkludierten" Seite auch, aber erst unmittelbar während des terminalen Versuches, ligiert. Wegen der kleinen anatomischen Gegebenheiten erfolgte die Operation unter Beobachtung durch ein Mikroskop (OPMI 1 - FR Carl Zeiss mit CONTAX 167 MT-Fotokamera).

## **II.3. Auswertungsverfahren**

### **II.3.1. Laser Doppler Imaging (LDI)**

Das Doppler-Prinzip beruht darauf, dass die Frequenz von monochromatischem Licht sich bei Reflektion an bewegten Teilchen verändert. Die Anzahl und die Geschwindigkeit der beweglichen Teilchen bedingt neben der Frequenz die Intensität und die Richtung des reflektierten Lichtes.

Die Hinterläufe der Maus werden mit einem monochromatischen Laserstrahl (HeNe,  $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ) abgetastet. Dieser verändert seine Frequenz bei der Reflexion an Erythrozyten. Es kann aus der vom Detektor registrierten Frequenzverschiebung auf die Durchblutungsverhältnisse geschlossen werden. Die verschiedenen Frequenzen werden im Computer farbkodiert, wodurch eine bunte Blutflusskarte der Pfoten entsteht (Beispiel Abb. III.3.). Die Bestimmung des absoluten Flusswertes ist nicht möglich, da unkontrollierbare Faktoren wie die Dicke und die Pigmentierung der Haut, sowie der Hämoglobingehalt des Blutes Einfluss auf die Messung nehmen. Der relative Vergleich der Messwerte von rechter und linker (okkludierter und nicht okkludierter) Mäusepfote ist aber legitim.

Die narkotisierte Maus wurde in 20 cm Entfernung zum LDI (MLDI 5115, Moor Instruments Ltd. Devon, UK) plaziert. Zur Standardisierung auf hohem Durchblutungsniveau wurden alle Messungen in einer auf  $37^\circ\text{C}$  temperierten Messkammer durchgeführt, in welcher sich die Mäuse schon einige Minuten vorher aufhielten. Ein gerade beide Pfoten umfassender Bereich ( $2 \text{ bis } 3 \text{ cm}^2$ ) wurde mit einer Geschwindigkeit von 4 Pixeln pro Sekunde abgescannt. Die Bildschirmauflösung betrug  $256 \times 256$  Pixel. Mit Hilfe der geeigneten Software (Moor LDI V3.0) wurde für jedes einzelne Pixel ein Wert errechnet, welcher der relativen Durchblutung entsprach. In der weiteren Auswertung wurden die Mäusepfoten umkreist und die Mittelwerte der Pixel der rechten und der linken Pfote (Rechts-Links-Quotient) zu den verschiedenen Zeitpunkten des Experimentes verglichen.

### **II.3.2. Hämoglobin-Sauerstoffsättigung (HbSS)**

Mit unterschiedlicher Sauerstoffsättigung verändert sich das Absorptionsspektrum des Hämoglobins. Diesen Grundsatz macht man sich bei der transdermalen Bestimmung der Hämoglobin-Sauerstoffsättigung zu Nutze.

Die Bestimmung wurde mit einem AbTisSpec<sup>TM</sup> Spektrometer durchgeführt.

Durch eine Aufspaltung des Hämoglobinlichtwellenspektrums ( $\lambda = 500 - 620 \text{ nm}$ ) konnte der individuelle Anteil an gesättigtem und ungesättigtem Hämoglobin im Gewebe bestimmt werden. Mit Hilfe der entsprechenden Software wurden Werte für die Gewebssauerstoffsättigung und die relative Hämoglobinkonzentration berechnet.

Die Firma LEA Medizintechnik GmbH entwickelte speziell für die Mäusepfote eine scheibenförmige Sonde (Durchmesser ca. 4mm). Eine Lichtquelle befindet sich im Umkreis von einem Millimeter um den zentral gelegenen Sensor. Die Sonde wurde

im Bereich der fünften Zehe an die Pfote gehalten, das reflektierte Licht wurde von der Sonde erfasst. Ein Druck auf die Pfote musste vermieden werden, um die Durchblutung des Gewebes nicht zu beeinflussen.

Vor der Messung wurde das Tier narkotisiert (s.o.) und in einer auf 37°C temperierten Messkammer einige Minuten lang aufgewärmt. So wurde, wie bei der Thermographie und beim Laser Doppler Imaging, eine Standardisierung der die Extremitätendurchblutung stark beeinflussenden Außentemperatur erreicht.

### **II.3.3. Infrarot-Thermographie (IRT)**

Prinzip: Die Thermographie basiert auf dem physikalischen Prinzip, dass alle Körper elektromagnetische Wellen abstrahlen, wenn sie wärmer sind als der absolute Tiefpunkt von -273,15°C. Durch Detektion und Beurteilung der Spektren und der Intensität der abgestrahlten elektromagnetischen Wellen ist es möglich, die absolute Temperatur eines Körpers zu bestimmen, ohne in direktem Kontakt mit ihm zu stehen. Die über alle Wellenlängen integrierte Gesamtstrahlung  $P$  eines Körpers ist proportional zur 4. Potenz seiner absoluten Temperatur. (Stefan-Boltzmann-Gesetz; s. VI.2.2.). Die abgestrahlte Energie wird dabei aber nicht kontinuierlich abgegeben, sondern in Form von Energiequanten (Photonen). Die Energie dieser Photonen ist proportional zur Frequenz der Strahlung. Nach dem Newtonschen Abkühlungsgesetz ist die Abkühlungsgeschwindigkeit eines Körpers näherungsweise proportional zur Differenz der Temperaturen von Körper und Umgebung, solange diese Differenz relativ klein ist. Bei einer lebenden Maus findet jedoch ein Wärmeaustausch zwischen dem Körperinneren und der Peripherie, also zwischen dem Stamm und den Extremitäten, statt. Dieser erfolgt unter Ruhebedingungen zum größten Teil durch Konvektion: Das strömende Blut transportiert Wärme und wirkt so der Auskühlung entgegen. Daraus folgt, dass die Aufrechterhaltung der Temperatur in den Extremitäten abhängig von deren Durchblutung ist.

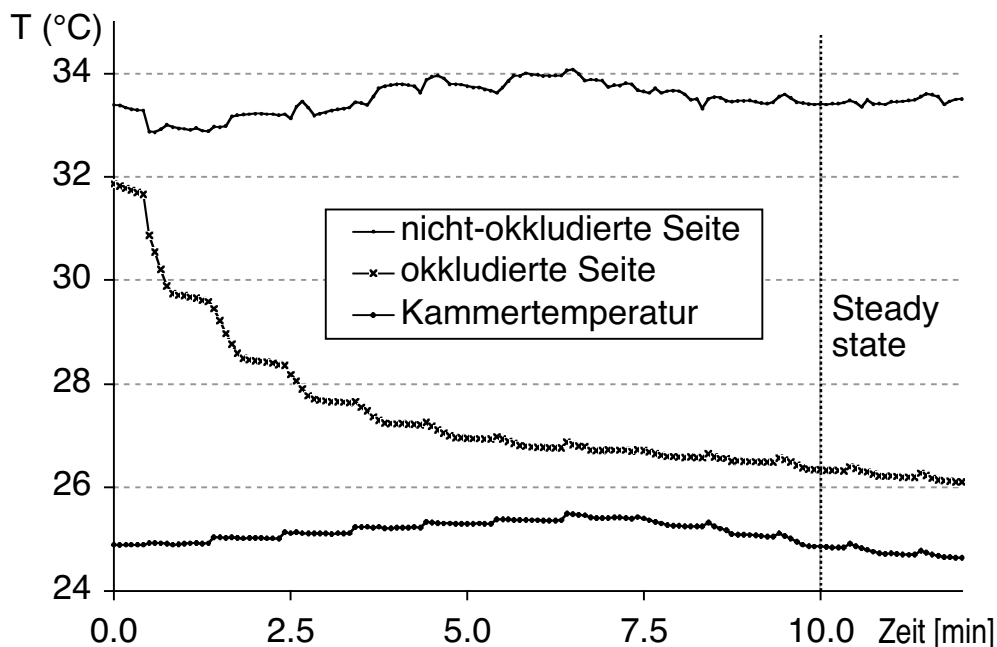
Anwendung: Die in dieser Studie benutzte digitale Infrarotkamera (Varioscan 3011, Laser-Optik-Systeme GmbH, Jena) misst in einem Bereich von 8-12  $\mu\text{m}$  Wellenlänge und bestimmt die Photonenflußdichte. Aus dieser wird dann mit Hilfe des Planckschen Strahlungsgesetzes die absolute Temperatur des Körpers berechnet. Der zu untersuchende Körper wird mit einem Horizontal- und einem Vertikalscanner abgetastet. Im angeschlossenen PC entsteht ein farbkodiertes Bild der Temperatur, ein Thermogramm, mit einer Auflösung von 300x200 Pixeln und einer maximalen Bildwiederholfrequenz von 1,25 Hz.). Mit Hilfe spezieller Software (IRBISplus V1.0, InfraTec, Dresden) wurde aus den Thermogrammen der

Mittelwert der Temperatur (in °C) in einem standardisierten, kreisförmigen Bereich der Oberseite der rechten bzw. linken Hinterpfote bestimmt und als Temperaturkurve dargestellt. Um standardisiert maximale Vasodilatation zu erreichen, wurde die Maus in Narkose (II.2.1) und unter Aufwärmung bewertet. Die Maus wurde in Kammer 1 der speziell für diese Zwecke konzipierten Thermodoppelkammer (s. VI.2.3.) aufgewärmt und das Tier wurde über 10 Minuten konstant bei 37°C rektal gemessener Körpertemperatur gehalten. Im sofortigen Anschluss dokumentierten wir 10 Minuten lang die Abkühlung der Pfoten, die aus Kammer 1 durch zwei enge Löcher der Trennwand in die auf 25°C temperierte Kammer 2 gehalten wurden. Nach dieser Zeit erreichten die beiden Pfoten stabile Temperaturen.

Der stabile Zustand, *Steady State* genannt, war die Grundlage der Auswertung.

Bewertet wurden stets 3 Temperaturdifferenzen: Die der beider Pfoten untereinander und die von jeweils einer Pfote (der rechten oder der linken) zu der Messkammer (Beurteilung in wie weit sich eine Pfote von der Umgebungstemperatur 25°C abhebt).

Die statistische Auswertung erfolgte mit One Way ANOVA und dem Bonferroni-Test (SigmaStat 2.03).



**Abb. II.1:** Temperaturverlauf der Mäusehinterpfoten während der Thermographie.

### II.3.4. Fixierung und Kontrastmittelinjektion

Sieben Tage nach der Okklusion der rechten A. femoralis wurde die Maus zunächst narkotisiert (II.2.1) und vor der Kollateralengewinnung noch einmal mit der Infrarotkamera (II.3.3) bzw. dem LDI (II.3.1) aufgenommen. Das Tier wurde auf einer Wärmeplatte fixiert. Nach intraperitonealer Gabe von Heparin-Na (4000 I.E. pro kg KG, Liquemin<sup>®</sup> N 25000, Roche) und einer Überdosis der Narkotikums-mischung wurde die Thorakalhöhle geöffnet und die Aorta thoracica proximal und distal mit zwei Fäden unterschlungen. Proximal wurde ein fester, das Gefäß okkludierender Knoten, distal ein lockerer, das Gefäß lediglich umschlingender Knoten gesetzt. Durch leichten Zug an den Fäden wurde die Aorta unter Spannung gesetzt. Zwischen den beiden Knoten wurde die Wand der Aorta vorsichtig angeschnitten, sodass ein Katheter (Portex Polythene Tubing; 0,56 mm ID; 0,96 mm OD; SIMS Portex Ltd., UK) nach kaudal in das Gefäßlumen eingeführt und unter dem distalen Knoten fixiert werden konnte. Über diesen Katheter konnten nun nach Eröffnung der V. cava caudalis folgende Substanzen mit Hilfe einer Peristaltikpumpe mit konstanten Druck von 100 mmHg injiziert werden:

Ca. 3 Minuten lang auf 37°C erwärmte **PBS** (Phosphate Buffer Saline, s. VI.1.3.) zum Auswaschen des heparinisierten Blutes aus den Gefäßen, versetzt mit 0,02% Adenosin (Sigma, St. Louis, USA), um eine maximale Vasodilatation zu erreichen

1%- **Formaldehydlösung** (Merck, Darmstadt) in PBS zur Perfusionsfixierung; auch ca. 3 Minuten. Formaldehyd bewirkt eine chemische Fixierung der Proteine. Schon nach wenigen Augenblicken bemerkt man die Versteifung der Hinterläufe der Maus, die als Erfolgskontrolle der Kanülierung und der Fixierung angesehen werden kann. Die Fixierung beginnt vom Gefäßlumen aus, wodurch zu allererst die für die Fragestellung wichtigen Teile der Maus, die Kollateralen, fixiert werden.

- Nach der Fixierung infundiert man nochmals **PBS-Lösung**, damit das Formaldehyd, welches das folgende Kontrastmittel verklumpen würde, wieder aus dem Gefäßlumen ausgewaschen wird.
- auf 40°C erwärmte **Wismut-Gelatine** (s. VI.1.2.) als Kontrastmittel zur Füllung der arteriellen Gefäße. Dieses Kontrastmittel ist röntgendicht. Außerdem erleichtert seine weiße Farbe die Orientierung bei der Freipräparation der Gefäße und hebt die Kollateralen bei der Aufsichtsangiographie (s.u.) vom übrigen Gewebe ab.

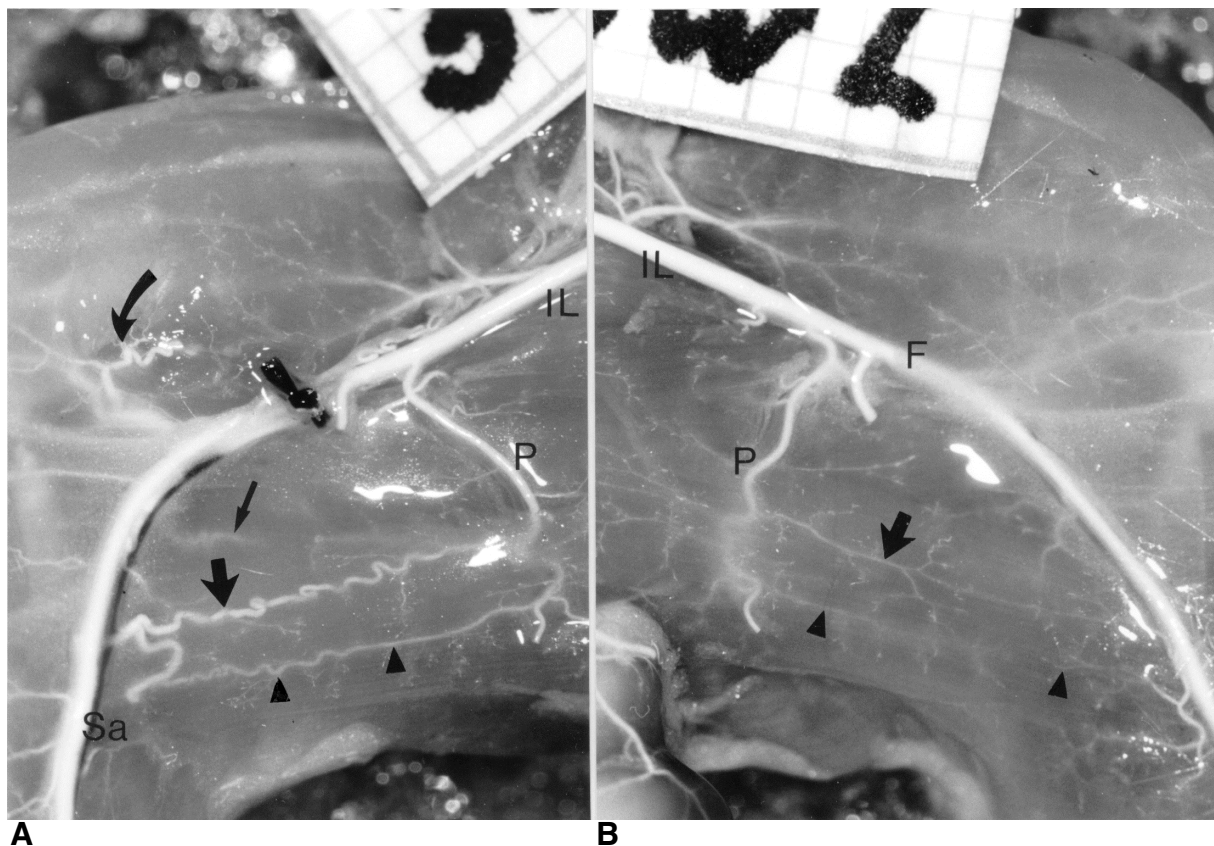
Bei Füllung des distal der Okklusion gelegenen Teils der A. femoralis wurde die Injektion beendet, um eine Füllung der venösen Seite zu vermeiden, welche die Differenzierung der Kollateralen erschwert hätte. Um ein schnelles Erstarren der

Wismut-Gelatine zu erreichen, wurde die Thermoplatte abgestellt und die Maus mit Eis bedeckt.

### II.3.5. Röntgen und -Aufsichtsangiographie

Die Maus wurde in eine mit Wasser gefüllte Petrischale gelegt und mit einem Röntgengerät (Balteau, Römatec, Bönen) mit 8 mA, 20 kV und 120 s Belichtungsdauer auf einem AGFA STRUCTURIX Film ISO 9001 Film abgebildet. Im Anschluss wurden die oberflächlich sichtbaren Gefäße (darunter regelmäßig auch 2 Kollateralen) an beiden Hinterbeinen freipräpariert und fotografiert. Die Tiere wurden dabei unter Wasser gelegt, um Lichtreflexe zu vermeiden.

Die Angiogramme dienten dem optischen Vergleich der gewachsenen Kollateralen auf der femoralokkludierten Seite mit den Kollateralgefäßen auf der nicht okkludierten Seite, die ihre Ursprungsgröße behalten hatten. Auf einen Blick hat man einen „Vorher-Nachher-Effekt“



**Abb. II.2:** *Aufsichtsangiographie*

*A: Gewachsene Kollateralarterien (3 Wochen nach Femoralisokklusion)*

*B: Präexistierende Kollateralarterien (A. Femoralis kurz vor der Aufnahme ligiert)*

*(IL: A. Iliaca, F: A. Femoralis, P: A. Femoralis Profunda, Sa: A. Saphena, dicke Pfeile, Pfeilspitzen: oberflächliche Kollateralarterien; andere Pfeile: profunde Kollateralarterien)*



## **II.3.6. Mikroskopie**

### **II.3.6.1. Vorbereitung**

#### *Kollateralenentnahme:*

Auf beiden Seiten wurde die Adduktorengruppe freipräpariert, dann wurden die in diesen Muskeln enthaltenen Kollateralen mit einem großzügigen Anteil von umgebendem Muskelgewebe entnommen. Von diesen in Muskelgewebe eingebetteten Kollateralen wurde jeweils der mittlere Teil für die Elektronenmikroskopie und die Morphometrie verwandt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben in dreiprozentiger Glutaraldehyd (Fa. Merck, Darmstadt) – Cacodylat Pufferlösung fixiert und im Kühlschrank aufbewahrt.

#### *Einbettung:*

Präparation für das Elektronenmikroskop und die Morphometrie:

Da jede Probe im Elektronenmikroskop einem Hochvakuum ausgesetzt wird, gibt es nicht die Möglichkeit, sie im wasserreichen Zustand zu beobachten. Die Gewebe werden durch Fixation geschützt – zunächst mit Formaldehyd oder mit Glutaraldehyd, das Proteinmoleküle kovalent mit seinen Nachbarn vernetzt (in ihm ist auch eine Lagerung der frischgewonnenen Probe bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C möglich), und dann mit Osmiumtetroxid, das an die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen und an Proteine bindet und sie stabilisiert.

Aufsteigende Alkoholreihen verdrängen das Wasser aus den Zellen, bevor sie mit einem monomeren Kunstharzgemisch (Epon) infiltriert werden, welches zu einem festen Kunststoffblock polymerisiert.

Vor der Einbettung wurden die Proben mehrfach in stets frischer 0,1 M Natrium-Cacodylatpufferlösung gewaschen, um frei von Formaldehyd und Glutaraldehyd eingebettet werden zu können.

### **II.3.6.2. Lichtmikroskopie und Morphometrie**

Das in Epon eingebettete Gewebe wurde für die Morphometrie in einer Dicke von 0,5  $\mu\text{m}$  quer zum Verlauf der Muskelfasern und der Kollateralgefäße geschnitten (mit dem ULTRACUT-E der Firma Reichert-Jung, Bensheim). Die Schnitte wurden auf gelatinebeschichtete Glasobjektträger gesetzt und mit einprozentigem Toluidinblau gefärbt, danach getrocknet und mit Entellan® (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die Kollateralgefäße konnten mit einem Leica DM-RB Mikroskop (Leica, Bensheim) gut betrachtet und mit einer Digitalkamera Leica DC 2000

(Leica, Wetzlar) aufgenommen werden, da sie mit Wismut-Gelatine gefüllt waren. Wird ein Blutgefäß genau senkrecht zur Längsachse angeschnitten, so zeigt sich im mikroskopischen Bild ein kreisrundes Lumen mit einem bestimmten Durchmesser. Wird das Gefäß dagegen leicht schräg getroffen, so sieht man ein elliptisches Lumen. In diesem Fall ist die kürzeste Achse der Ellipse der eigentliche Gefäßdurchmesser. Zur Auswertung wurde der Durchmesser der Kollateralgefäße im interaktiven Modus des Softwareprogramms NIH Image 1.62 (für Apple Macintosh) umfahren. Die so markierte Fläche wurde von dem Programm zu einer Ellipse idealisiert und der Diameter des Gefäßes (kürzeste Achse) gemessen. Die statistische Auswertung der Mittelwerte und Mediane der Kollateralgefäßdurchmesser erfolgte mit dem One-Way ANOVA und dem Bonferroni-Test.

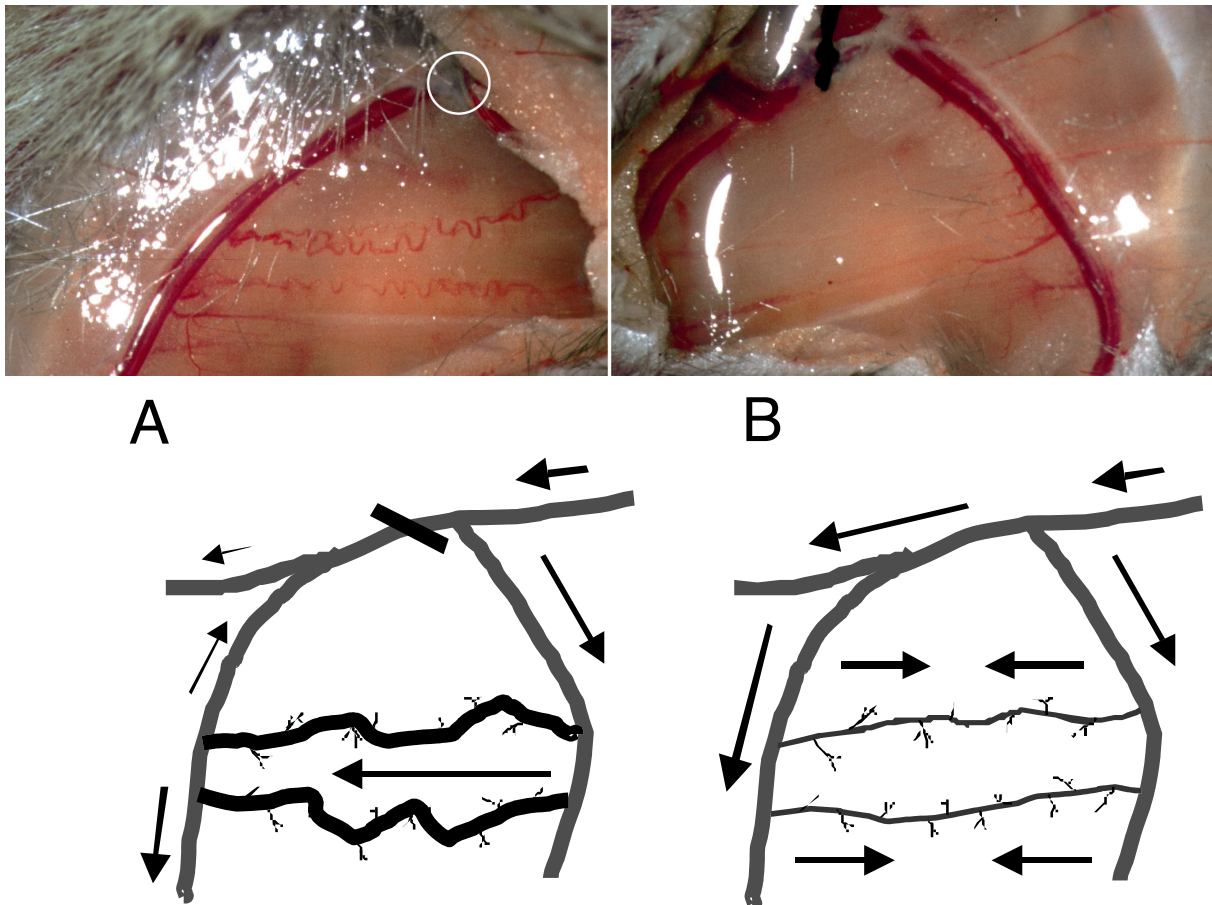
### **II.3.6.3. Transmissionselektronenmikroskopie**

Das Gewebe wurde nach Abschluss der Polymerisation mit einem ULTRACUT-E (Reichert-Jung, Bensheim) 50 nm dünn geschnitten. Die Schnitte wurden auf einem Kupfergrid aufgefangen und nach dem Trocknen mit dreiprozentigem Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert (nach Reynolds). Die Schwermetalle Uran und Blei absorbieren Elektronen und ermöglichen damit die Bildgebung im Elektronenmikroskop. Mit dem Philips CM 10 Transmissions-Elektronenmikroskop wurde die Ultrastruktur der Zellen der Gefäßwand analysiert, insbesondere der Anteil von rauhem Endoplasmatischen Retikulum (rER) in Endothelzellen (EC), glatten Muskelzellen (SMC) und Fibroblasten (Fb), der Anteil kontraktiler Strukturen in den SMC und die Kontinuität der Lamina elastica interna.

## III. Ergebnisse

### III.1. Änderung der Blutflussrichtung

Lange Muskeln werden von beiden Enden aus mit Blut eingespeist. Ein bidirektionaler, langsamer Blutfluss wird über die Arterien und weiter durch die Kapillaren in die Kollateralvenen drainiert. Der Blutfluss verändert sich nach der Okklusion in einen schnellen und unidirektionalen Blutfluss, da im Gefäßbereich distal der Ligatur ein Druckgradient entlang der prä-existierenden Kollateralen entsteht, der die Strömungsrichtung und -geschwindigkeit bestimmt.



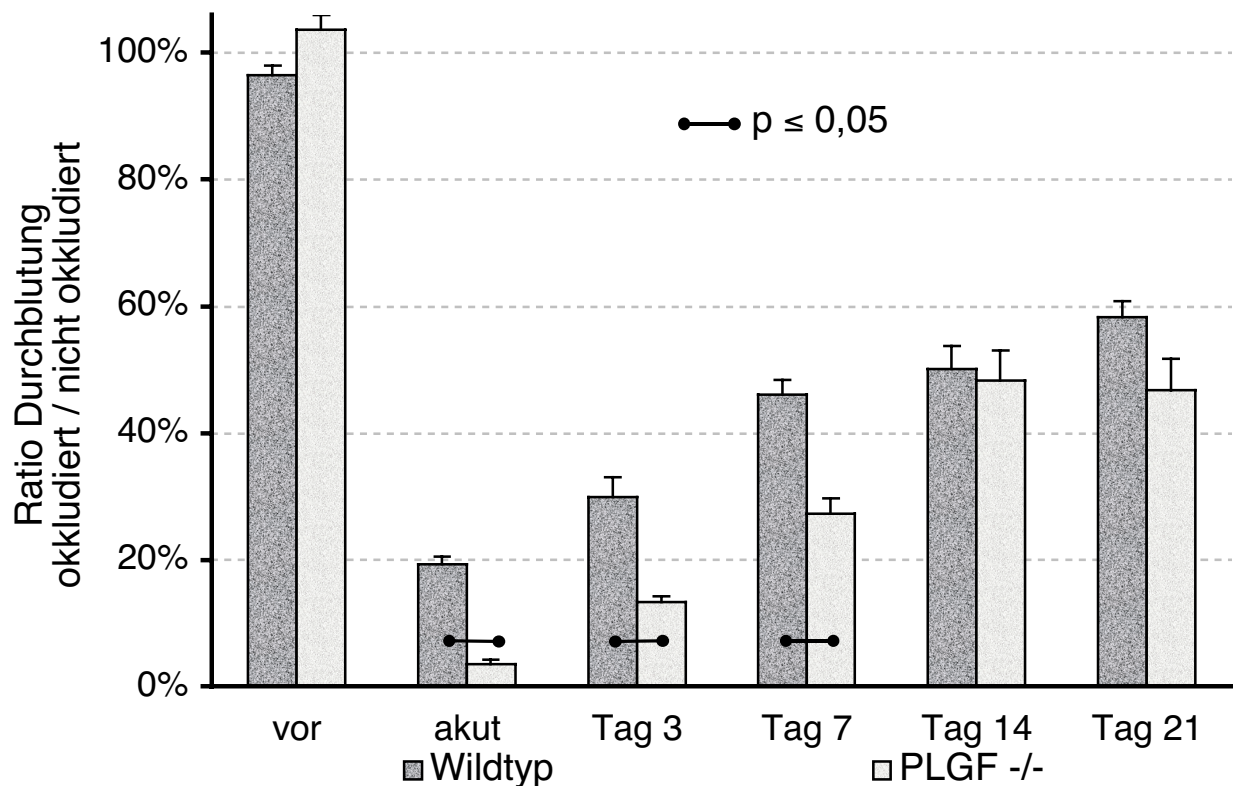
**Abb. III.1:** *In vivo* Angiographien kurz vor der terminalen Versuchsreihe  
 Links: Gewachsene Kollateralarterien (3 Wochen nach Femoralisokklusion)  
 Rechts: Präexistierende Kollateralarterien  
 A: Blutfluss in den Kollateralarteriolen nach Femoralisokklusion (unidirektional)  
 B: Blutfluss in den Kollateralarteriolen vor der Femoralisokklusion (bidirektional)

### III.2. Laser-Doppler-Imaging (LDI)

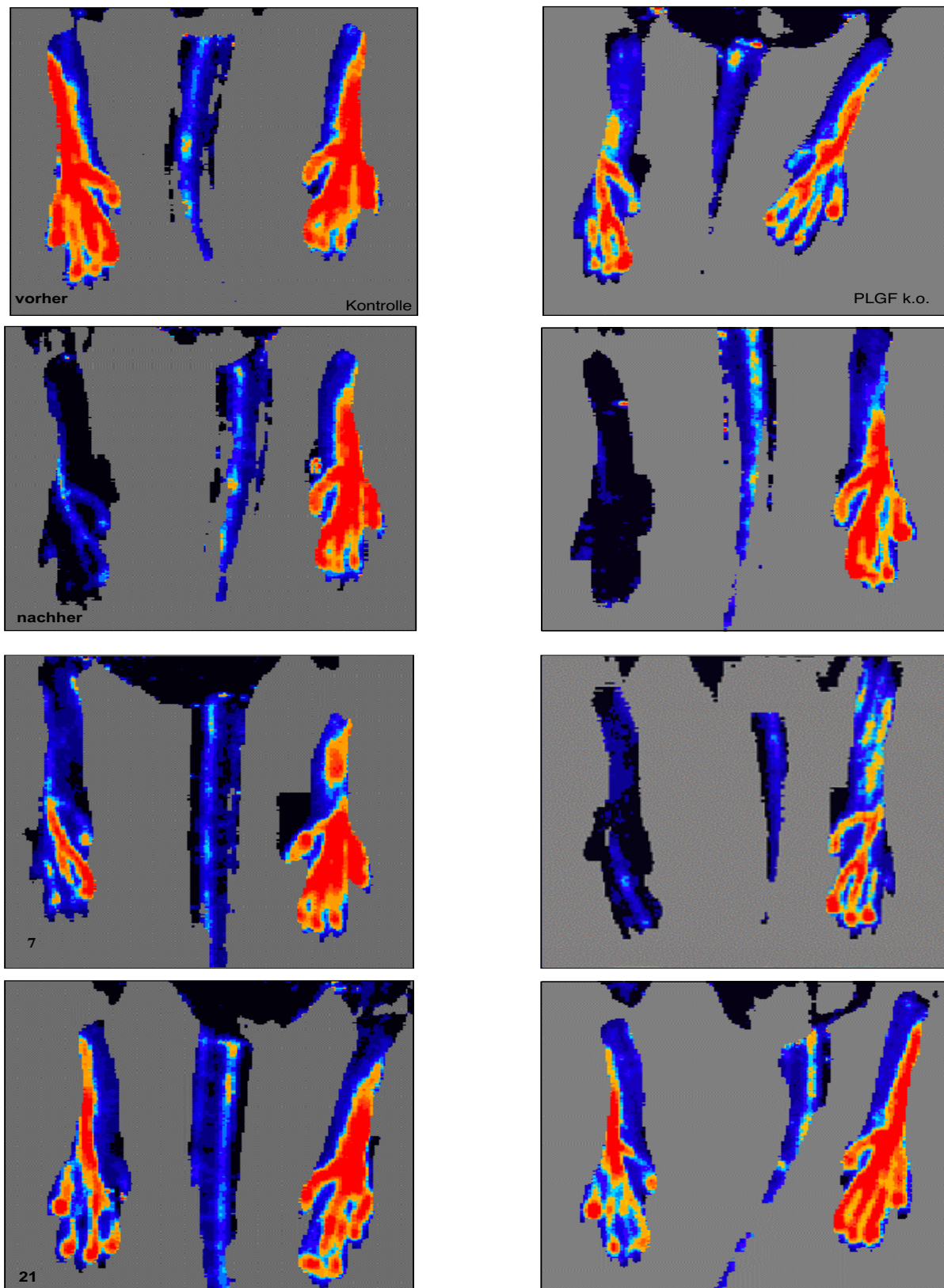
#### III.2.1. Wildtyp vs. -/- Gruppe

Mit Hilfe des Laser Doppler Imaging konnte die Durchblutung der Mäusepfoten visualisiert werden (siehe Abb. III.3.). Vor der Okklusion war zwischen der Durchblutung der rechten und der linken Pfote kein Unterschied festzustellen. Nach der Okklusion der rechten Femoralarterie war die Durchblutung in der rechten Pfote im Vergleich zu links und im Vergleich zu vor dem Eingriff deutlich reduziert. In der okkludierten Pfote erholte sich die Durchblutung zwar nach ein bis drei Wochen, erreichte aber niemals gänzlich die Werte, die mit intakter Femoralarterie erreicht wurden.

Die Wiederherstellung höherer Durchblutung geschieht im Wildtyp wesentlich schneller als in der PLGF -/- Maus. Erst nach drei Wochen, mit etwa zweiwöchiger Verspätung, steigen dort die Werte auf Wildtypmausniveau.



**Abb. III.2:** Vergleich des Rechts (okkludiert)/Links (nicht okkludiert)Verhältnisses der Pftendurchblutung zwischen Wildtyp und PLGF -/- Gruppe

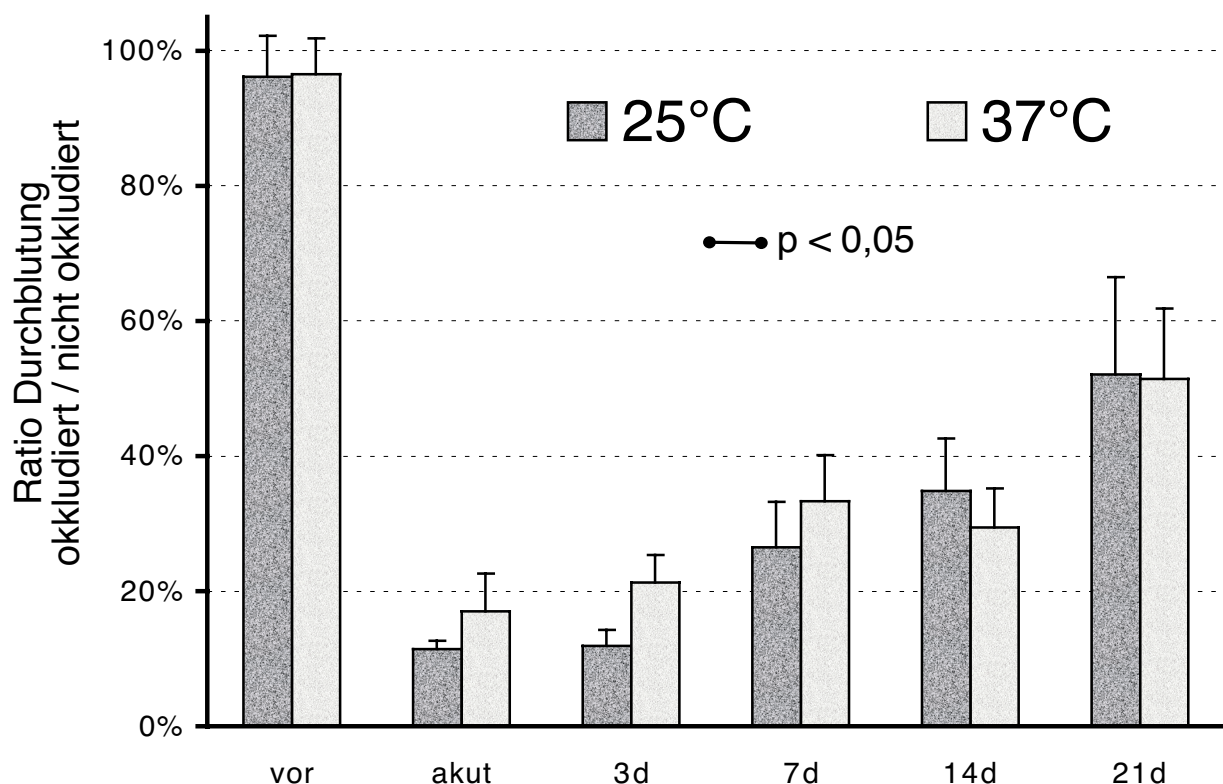


**Abb.III.3:** LDI bei *PLGF* +/+ Maus (links) und *PLGF* -/- Maus (rechts)  
 Vor, akut danach, 7 und 14 Tage nach der Okklusion (von oben nach unten)  
 Die Farbkodierung spiegelt die Anzahl der Dopplersignale wieder:  
 schwarz (keine) blau (wenige) gelb (viele) rot (sehr viele) Signale

### III.2.2. LDI bei 25°C und bei 37°C (IRT-LDI Vergleich)

Bei der Infrarot-Thermographie wurde nicht der gesamte Mäusekörper auf 37°C erwärmt. Die Pfoten wurden in eine auf 25°C temperierte Kammer gehalten. Das war im Unterschied zur LDI und HbSS Messung nötig, da sich die ganze Maus, wenn sie – und somit auch ihr Blut – auf 37°C gebracht wird, in einer 37°C Kammer mit Hilfe der Infrarotkamera nicht abbildet und auch keine Durchblutungsveränderungen festgestellt werden können

Als Beweis, dass die Durchblutung in der Pfote durch die lokale Temperatursenkung unbeeinflusst ist, wurde eine Extramesserie mit dem LDI durchgeführt und zwar unter den Bedingungen der Thermographie (37°C Körper, 25°C Pfoten). Ein signifikanter Unterschied in der Pfootendurchblutung zwischen 37°C und 25°C warmen Pfoten konnte ausgeschlossen werden. Es ergibt sich also, dass die Durchblutung in der Pfote durch die lokale Temperatursenkung von 37°C auf 25°C unbeeinflusst ist, wenn die sonstige Körpertemperatur konstant bleibt.



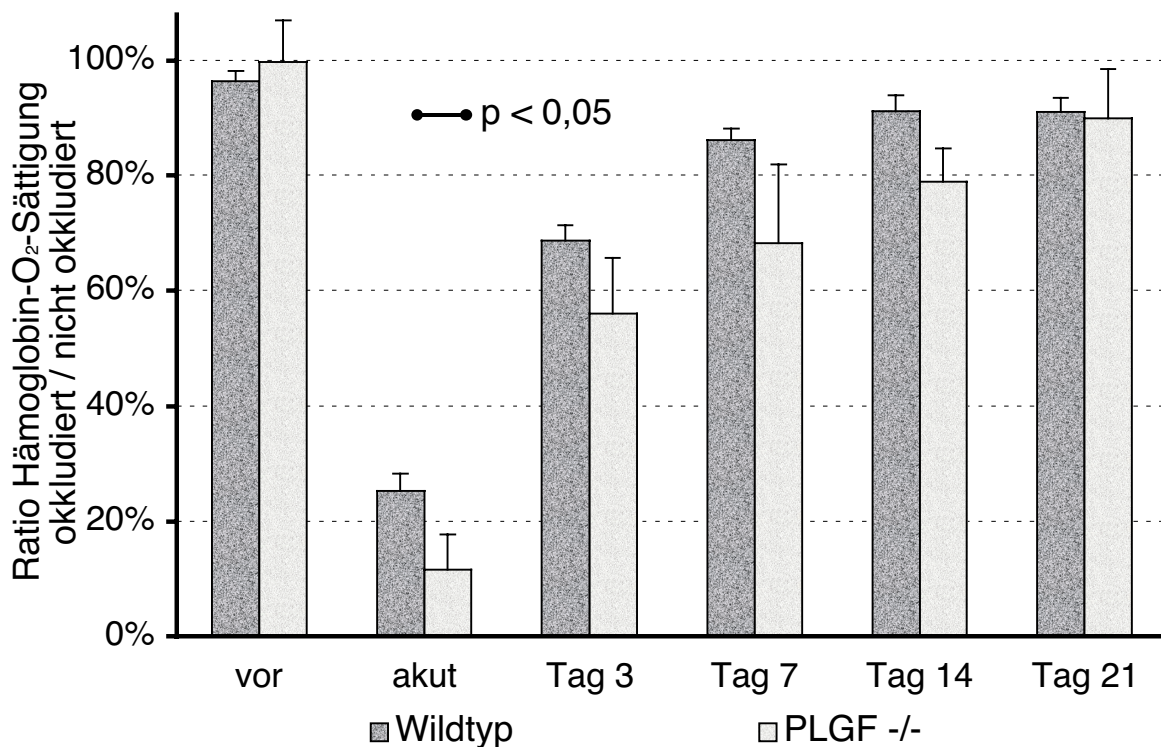
**Abb. III.4:** Rechts/Links Verhältnis der Durchblutung der Pfoten bei 25°C und bei 37°C. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (One Way Anova, Bonferroni)

### III.3. Hämoglobin-Sauerstoffsättigung (HBSS)

In der Wildtyppfote erholte sich die Hämoglobin-Sauerstoffsättigung erstaunlich schnell, vergleicht man die Erholung mit der der Durchblutung

Auch bei dieser Untersuchung ist die Entwicklung der PLGF -/- gebremst, doch ist auch dort die Tendenz eindeutig, dass die Hämoglobin-Sauerstoffsättigung sich deutlich vor dem Blutfluss erholt.

Die Hämoglobin-Sauerstoffsättigung erfährt in beiden Genotypen eine annähernd vollständige Wiederherstellung, was bei den anderen erfassten physiologischen Parametern (Durchblutung und Thermoregulation) nicht zu beobachten ist.



**Abb. III.5:** Rechts/Links Vergleich der Hämoglobin-Sauerstoffsättigung in der Pfote an definierten Zeitpunkten nach einseitiger Femoralokklusion

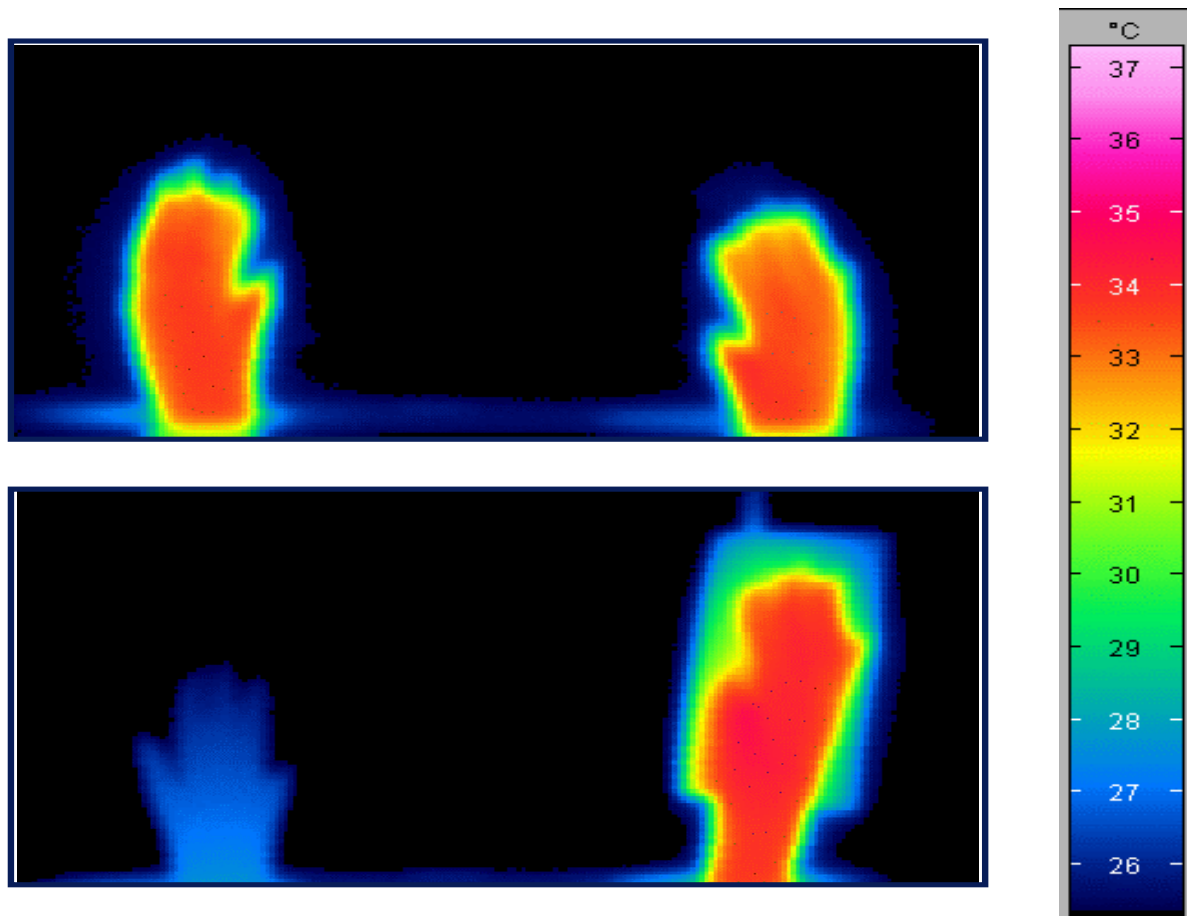
### III.4. Infrarot-Thermographie

Vor der Okklusion der rechten Femoralarterie waren die beiden Pfoten etwa gleich warm. Ihre Temperatur betrug etwa 32 - 34°C.

Nach der Okklusion der rechten Femoralarterie stellten sich erhebliche Temperaturunterschiede zwischen der Pfote der okkludierten und der nicht okkludierten Seite ein, da die Durchblutung der okkludierten Seite nicht mehr

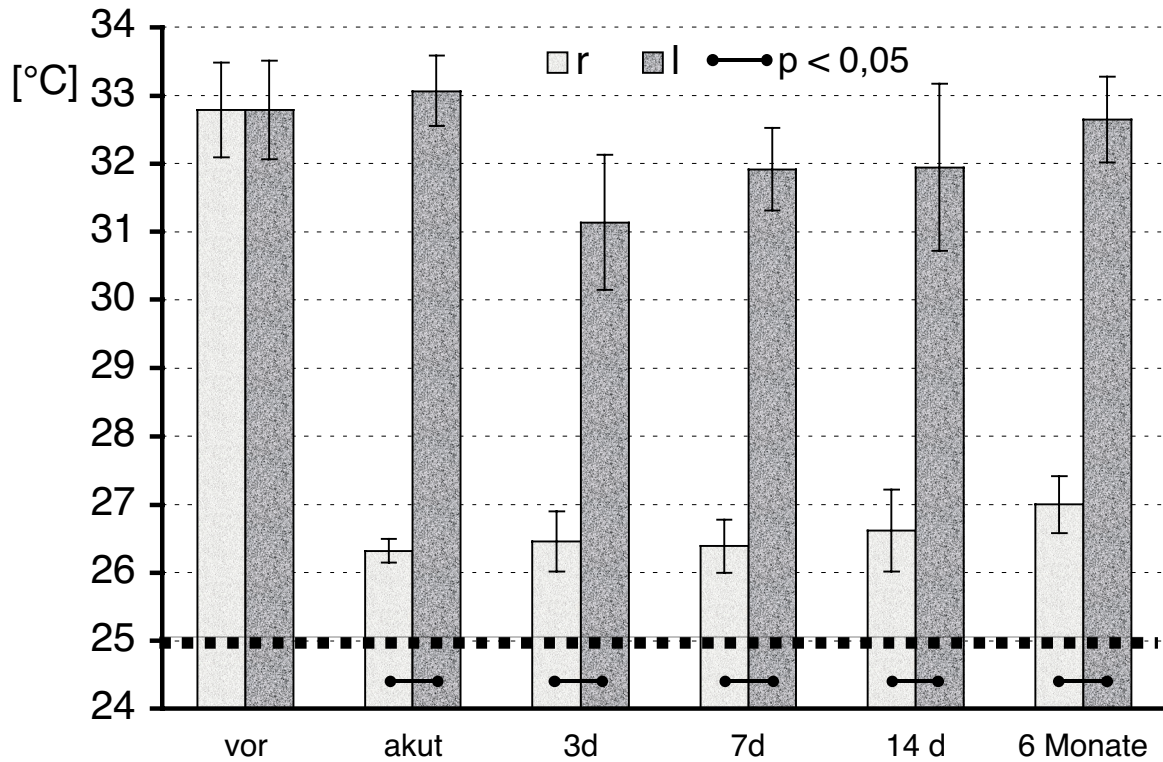
ausreichte, um die hohe Temperatur zu erreichen. Diese Unterschiede betragen im Mittel ungefähr 5 bis 6°C – die operierte Pfote konnte ihre Temperatur kaum von der Umgebungstemperatur abheben.

Dieser Temperaturunterschied blieb auch nach einer, nach zwei und nach drei Wochen bestehen. Um die generelle Relevanz dieser Methode für die nicht-invasive Messung der Durchblutung des Mäusehinterlaufs zu überprüfen, wurde eine Langzeitstudie der Wildtyp Kontrollgruppe vorgenommen. Auch nach Monaten blieben die großen Unterschiede bestehen, da sich die Temperatur der femoralisokkludierten Pfote dauerhaft nicht wesentlich von der Umgebungstemperatur abzuheben vermochte.

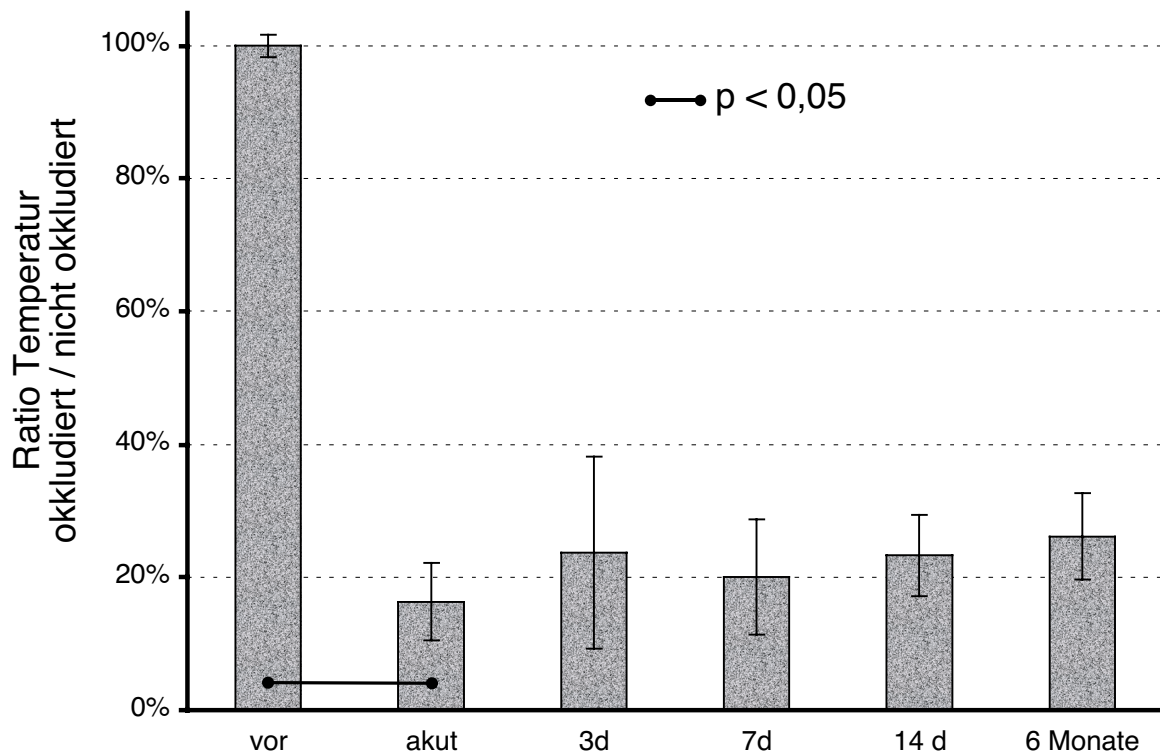


**Abb. III.6:** Thermographie der Mäusepfoten vor (oben) und nach (unten) der Okklusion





**Abb. III.7:** Temperaturen der rechten (r) und der linken (l) Pfote im Laufe von 6 Monaten bei einer Kammertemperatur von 25°C (•••••)



**Abb. III.8:** Rechts/Links Vergleich: gezeigt ist, inwieweit sich die rechte Pfote im Vergleich zur linken Pfote von der Umgebungstemperatur abzuheben vermag

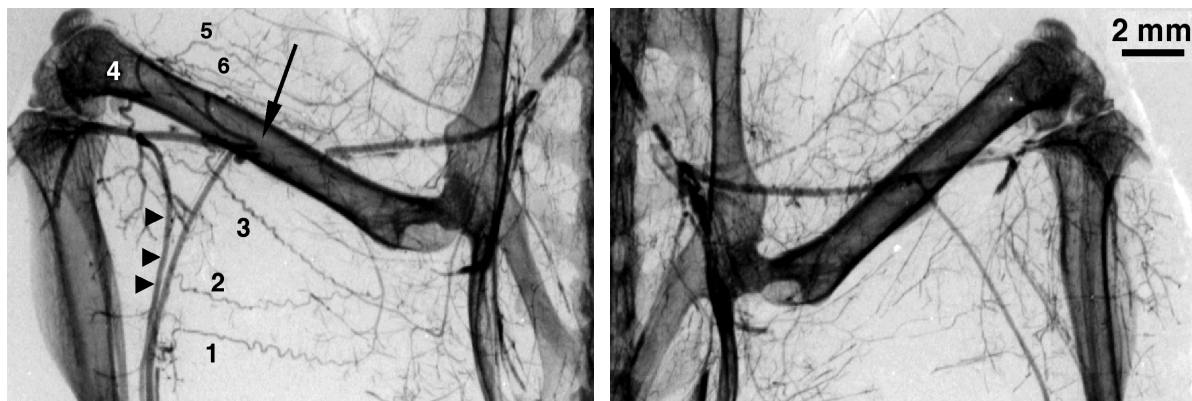
Ursprünglich war nach der Operation im PLGF -/- Tier ein langsamerer Temperaturanstieg der operierten Pfote erwartet worden als in der operierten Pfote der Wildtypmaus. Diesen langsamen Temperaturanstieg von einem schnelleren in der Wildtypmaus zu differenzieren war das Hauptziel der Thermographiemethode. Da aber schon in der Wildtypmaus keine steigende Temperatur festgestellt werden konnte, war im PLGF -/- Tier von vorne herein kein langsamerer Temperaturanstieg zu erwarten. Für die Dokumentation verschieden schneller Durchblutungserholung (in der WT und in PLGF -/- Gruppe) ist die Thermographie also ungeeignet (siehe auch VI.4.4.).

### III.5. Röntgen und Aufsichtsangiographie

Regelmäßig nach der Femoralarterienokklusion wachsen sechs Kollateralgefäße in stets gleicher Lokalisation, bei besonders proximaler Okklusion sogar eines oder zwei mehr: Vier Kollateralgefäße führen von der A. femoralis profunda zur A. saphena und zwei verlaufen weiter proximal vom obersten Teil der A. femoralis oder dem distalen Teil der externen Iliacalarterie zur A. saphena und zur A. poplitea.

Im Hinterlauf der "nicht okkludierten" Seite sind die gleichen Kollateralen zu sehen. Es handelt sich bei dem beobachteten Gefäßgrößenzuwachs also um ein Wachstum bereits existierender arterieller Gefäße, um Arteriogenese.

Um eine bessere Füllung der Kollateralen zu erreichen, wird die A. Femoralis der "nicht okkludierten" Seite auch ligiert, aber erst unmittelbar während des terminalen Versuches.



**Abb. III.9:** Röntgenaufnahmen

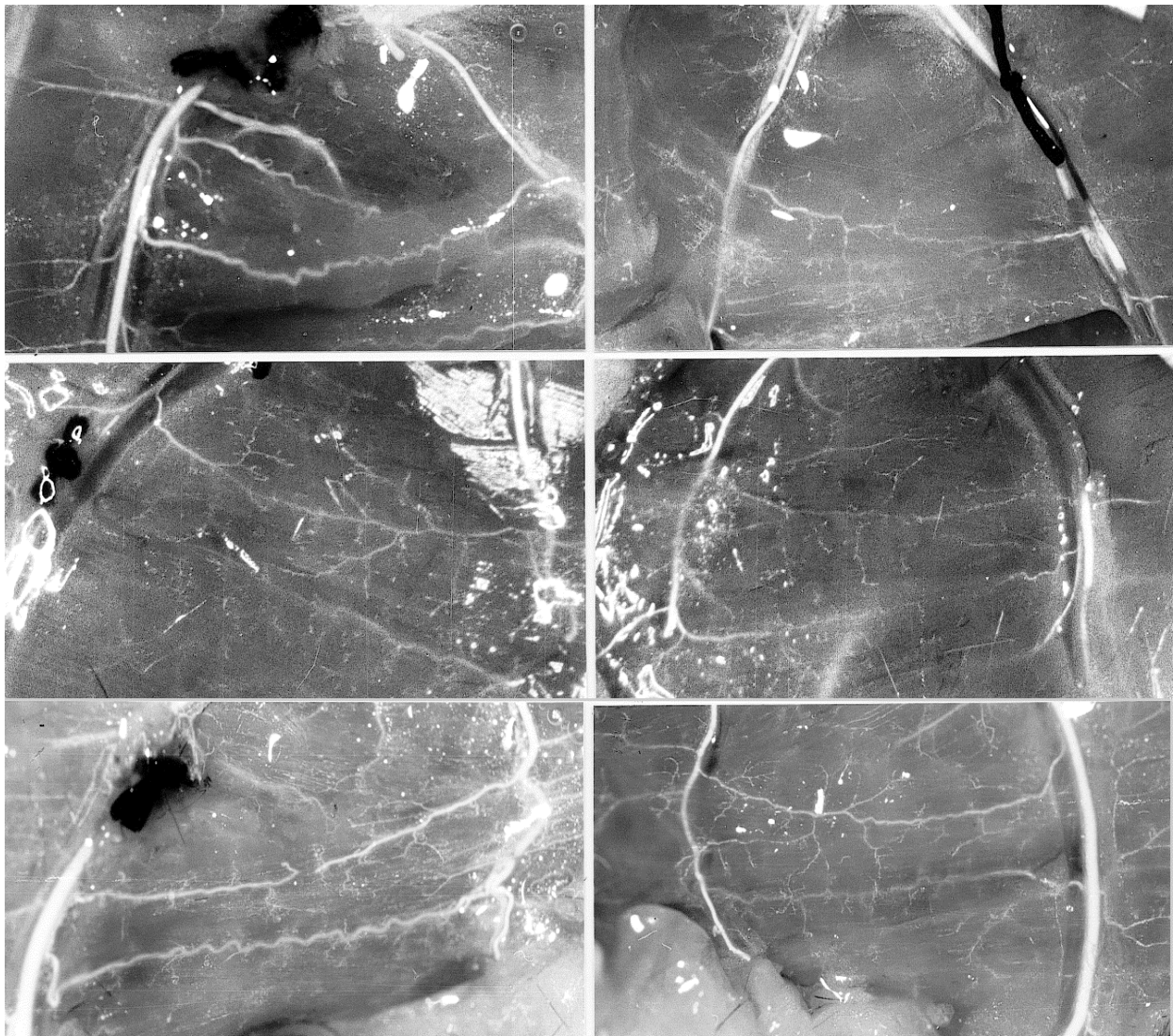
**A:** Gewachsene Kollateralen (1-6)

**B:** Präexistente Kollateralen

Pfeile: kurz A. saphena, lang: Okklusion

In der **Kontrollgruppe** ist zu erkennen, dass die Gefäße der nicht femoralokkludierten Seite sehr viel kleiner sind, als auf der okkludierten Seite. Die Okklusion der Femoralarterie hat in den präexistenten Kollateralarteriolen Arteriogenese ausgelöst: sie sind gewachsen (s. Abb. III.9).

In der **PLGF -/- Gruppe** sind die Kollateralen der okkludierten Seite zwar auch gewachsen, doch fällt dieses Wachstum wesentlich geringer aus. Sie sind kaum von den Kollateralen der nicht okkludierten Seite zu unterscheiden (siehe auch Abb.III.10 Mitte)



**Abb. III.10:** Aufsichtangiographien 7 Tage nach der Okklusion

*Oben links: PLGF +/+, okkludierte Seite*

*Oben rechts: PLGF +/+, nicht (bzw. erst in der terminalen OP) okkludierte Seite*

*Mitte links: PLGF -/-, okkludierte Seite*

*Mitte rechts: PLGF -/-, nicht okkludierte Seite*

*Unten links: PLGF -/- mit +/+ Knochenmark, okkludierte Seite*

*Unten rechts: PLGF -/- mit +/+ Knochenmark, nicht okkludierte Seite*

Bei der **PLGF -/- Gruppe**, bei der eine **PLGF +/- Knochenmarks-transplantation** stattgefunden hat, ist wiederum ein deutliches Wachstum auszumachen. Ihre Größe unterscheidet sich erheblich von den prä-existenten Kollateralen (siehe auch Abb.III.10 unten).

Deutlicher als in den Röntgenangiographien sind die interessierenden Gefäße in der Aufsichtsangiographie (Abb.III.10) zu erkennen:

Die Aufsichtsangiographie zeigt die beiden Kollateralen, die oberflächlich in der Muskulatur des M. vastus medialis, in der Adduktorengruppe und im Sartorius liegen. Sie sind, wie auch die tiefen Umgehungsgefäße, stets gleich lokalisiert. Sie sind aber im Gegensatz zu den tiefen Kollateralen schon nach der Abpräparation der Haut und des subkutanen Fettgewebes mit Hilfe des Stereomikroskopes leicht auffindbar und können fotografiert werden. Auffälliger als in den Röntgenaufnahmen wird in der Aufsichtsfotografie auch die korkenzieherartige, gewundene Form der Gefäße. Sie ist typisch für die gewachsenen Kollateralen. Auch in der PLGF -/- Gruppe ist diese Form auszumachen, allerdings weniger prominent.

## III.6. Lichtmikroskopie

### III.6.1. Schnittbilder

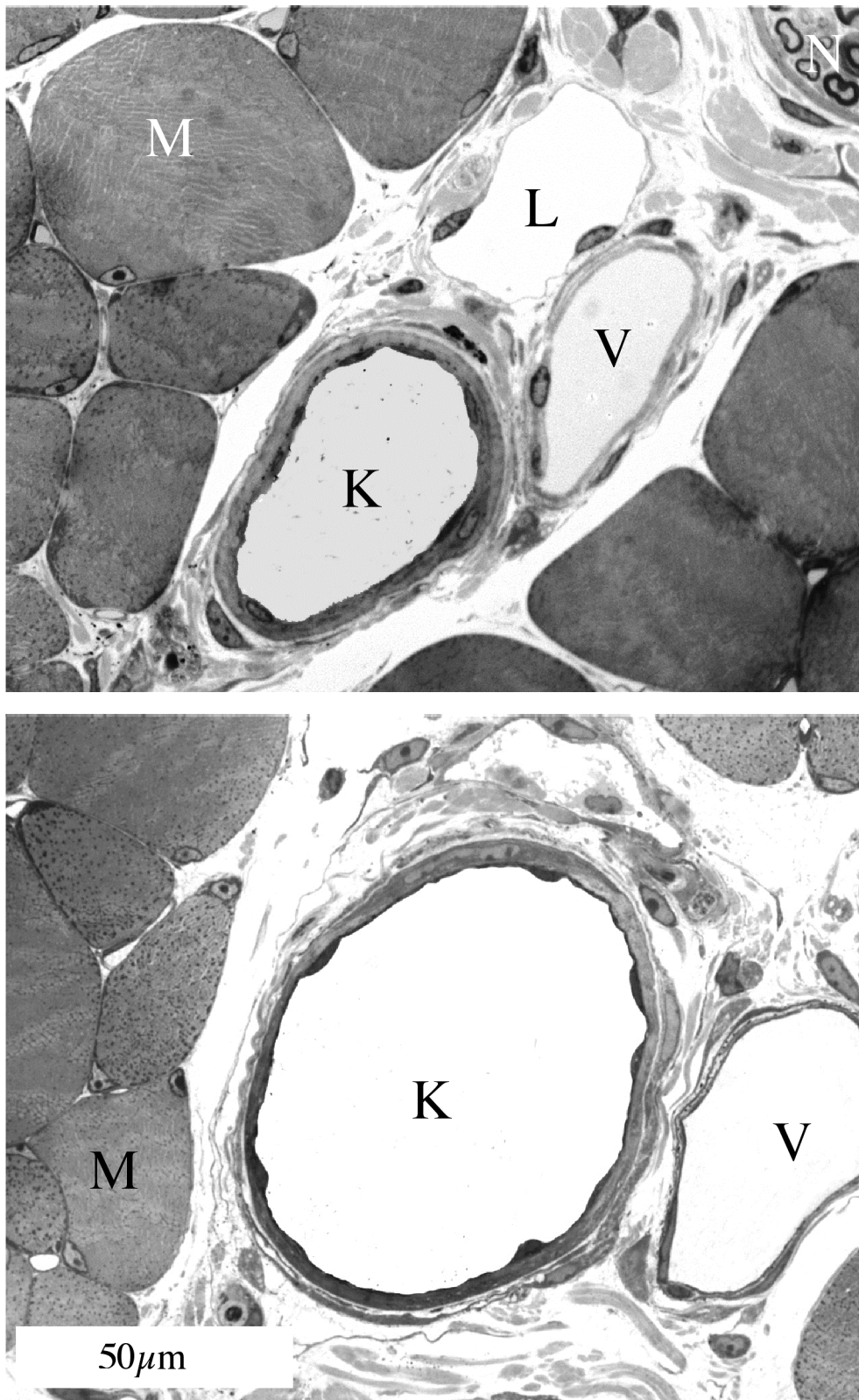
Mikroskopisch sind die Differenzen im Wandaufbau und im perivaskulären Gewebe der verschiedenen Kollateralen gut zu erkennen. Beide Kollateralen, sowohl die der okkludierten, als auch die der nicht okkludierten Seite, zeigen eine für Arteriolen gewöhnliche Dreischichtung von Endothel, einer Lage glatter Muskelzellen und der Adventitia. Die Kollaterale der okkludierten Seite ist deutlich gewachsen (signifikante Vergrößerung des inneren Diameters ( $p < 0,05$ ), Morphometrie siehe III.6.2.), dennoch ist es bei jeweils einer Schicht von Endothelzellen und glatten Muskelzellen geblieben.

Die feineren Strukturen sind besser in den transmissionselektronenmikroskopisch gewonnenen Bildern zu erkennen (siehe III.7.). Die Veränderungen der Gefäße während des Wachstums, sind dort herausgearbeitet.

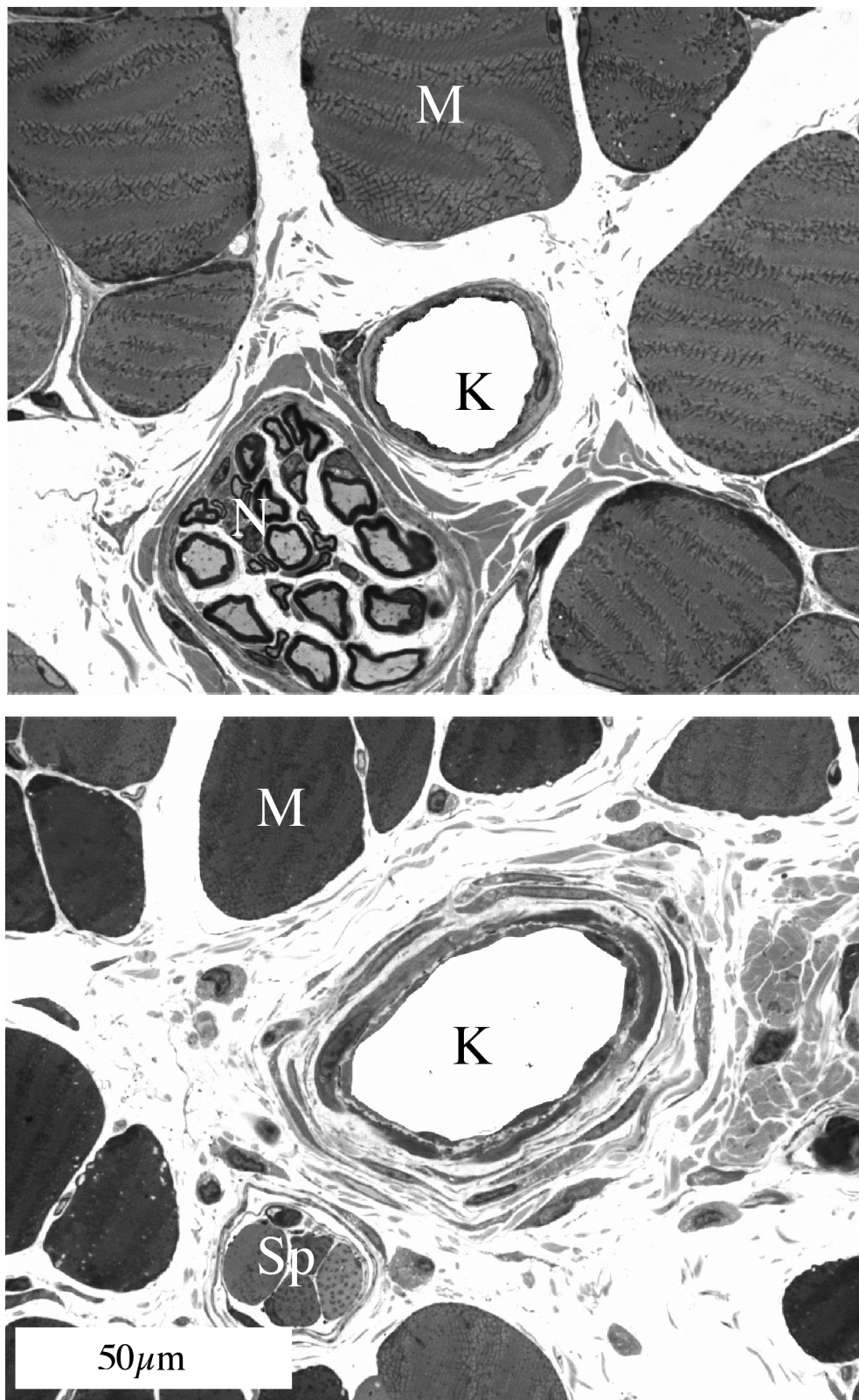
Die Kollaterale der **nicht okkludierten Seite der Wildtypmaus (PLGF+/+)** unterscheidet sich mikroskopisch nicht von der nicht okkludierten Seite aller anderen Gruppen. Die Kollaterale der **okkludierten Seite der Wildtypmaus** ist deutlich und signifikant gewachsen, während die Kollaterale der **okkludierten Seite der PLGF (-/-) Maus** im Vergleich mit der der PLGF (+/+) Maus nach einer Woche im Wachstum stark zurückgeblieben ist. Daher ist in der Abb. III.12. unten im Vergleich mit den Abbildungen der nicht okkludierten Seiten kaum ein Größenunterschied festzustellen. Im Durchschnitt sind die Kollateralen der okkludierten Seite in der PLGF -/- Gruppe aber – wenn auch knapp – signifikant gewachsen (siehe Morphometrie III.6.2.).

Die Kollateralen der **okkludierten Seite der PLGF (-/-) Maus mit Knochenmarktransplantat** sind wesentlich stärker gewachsen als die der PLGF (-/-) Mäuse. Sie sind ungefähr so groß wie die der PLGF (+/+) Gruppe.

Die gewachsenen Kollateralen der PLGF (-/-) Gruppe und der PLGF (-/-) mit Knochenmarktransplantat haben beide den gleichen Aufbau wie die anderen Kollateralen auch.



**Abb. III.11:** Lichtmikroskopie: Wildtypgruppe (PLGF+/+)  
Oben: Kollateralarteriole des Hinterlaufes ohne Femoralokklusion  
Unten: Kollateralarteriole 7 Tage nach Okklusion der Femoralarterie  
Kollaterale (K), quergeschnittene Muskelfaser (M), Vene (V), Lymphgefäß (L)

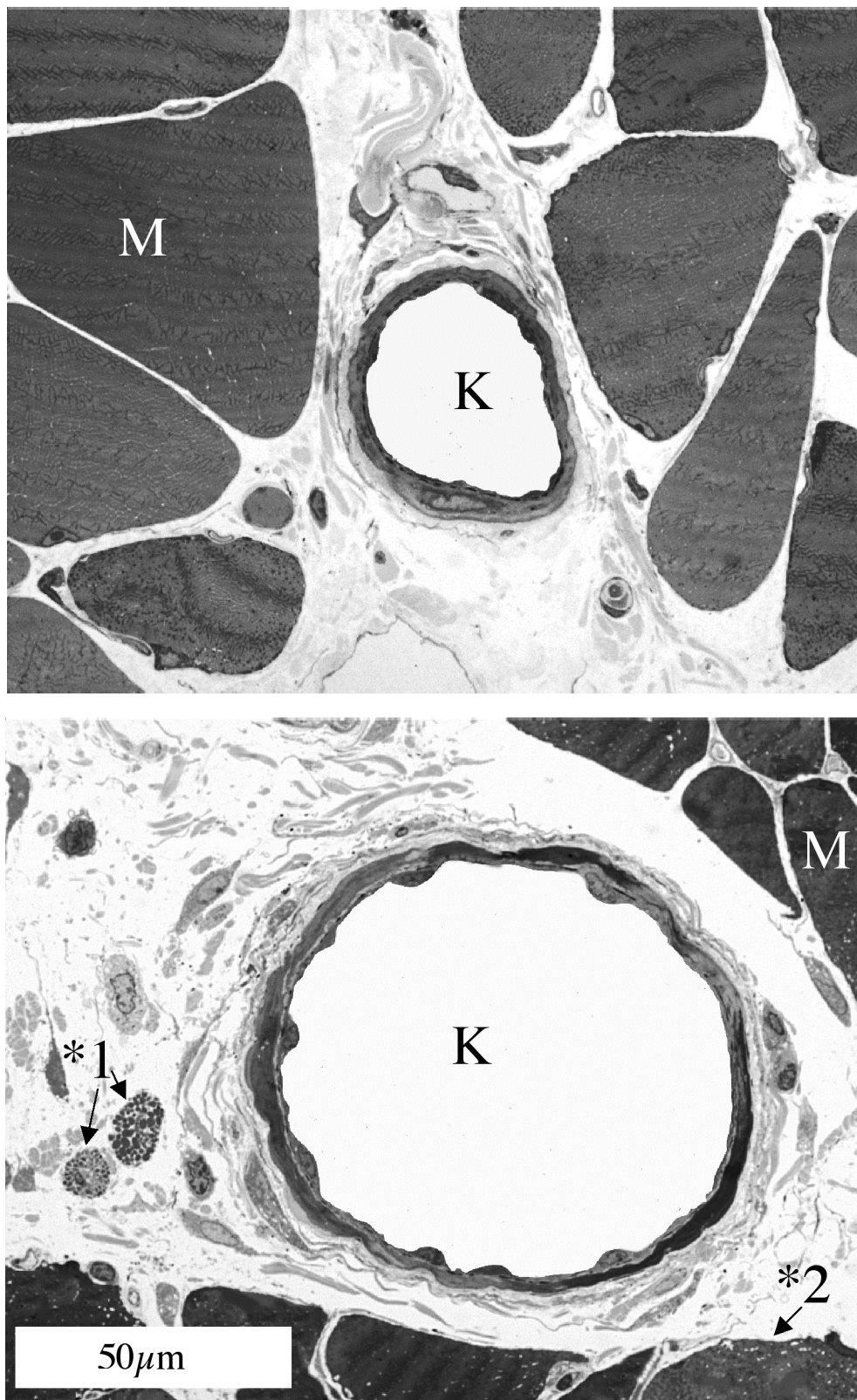


**Abb III.12:** Lichtmikroskopie: PLGF<sup>-/-</sup> Gruppe

Oben: Kollateralarteriole des Hinterlaufes ohne Femoralokklusion

Unten: Kollateralarteriole 7 Tage nach Okklusion der Femoralarterie

Kollaterale (K), quergeschnittene Muskelfaser (M), quergeschnittener Nerv (N), Muskelspindel (MS)



**Abb III.13:** Lichtmikroskopie: PLGF -/- Gruppe, der PLGF +/+ Knochenmark transplantiert wurde

Oben: Kollateralarteriole des Hinterlaufes ohne Femoralokklusion

Unten: Kollateralarteriole 7 Tage nach Okklusion der Femoralarterie

Links im Bild sind zwei Mastzellen (\*1) angeschnitten, die Vakuolen in den Muskelzellen sind Artefakte (\*2); Kollaterale (K), quergeschnittene Muskelfaser (M)



### III.6.2. Morphometrie

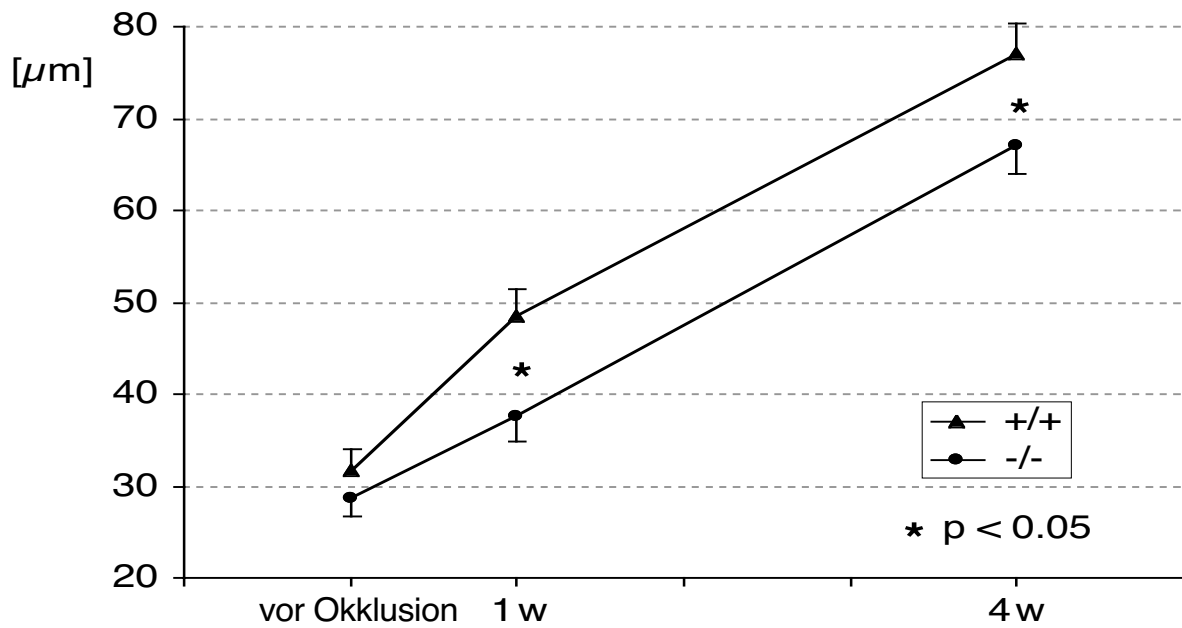
An lichtmikroskopischen Bildern wie diesen (Abb.III.11., 12.+13.) wurden die inneren Durchmesser der Kollateralen bestimmt. Die aus der Übersichtsangiographie und den Schnittbildern gewonnenen Ergebnisse wurden durch die Morphometrie objektiviert und quantifiziert.

**Morphometrie eine Woche nach der Okklusion** (Abb. III.14.+15.): Die präexistierenden Kollateralarteriolen des nicht okkludierten Beines wiesen in der PLGF (+/+) Gruppe einen Durchmesser von  $31,7 \pm 2,4 \mu\text{m}$  auf. 7 Tage nach der Okklusion betrug der mittlere Durchmesser der Kollateralen  $48,5 \pm 2,9 \mu\text{m}$  (n=11). Im Gegensatz dazu waren die Kollateralen der PLGF (-/-) Gruppe signifikant weniger gewachsen. Von  $28,8 \pm 2,7 \mu\text{m}$  kam ihr Durchmesser im Mittel nur auf  $37,5 \pm 2,7 \mu\text{m}$  (n=7).

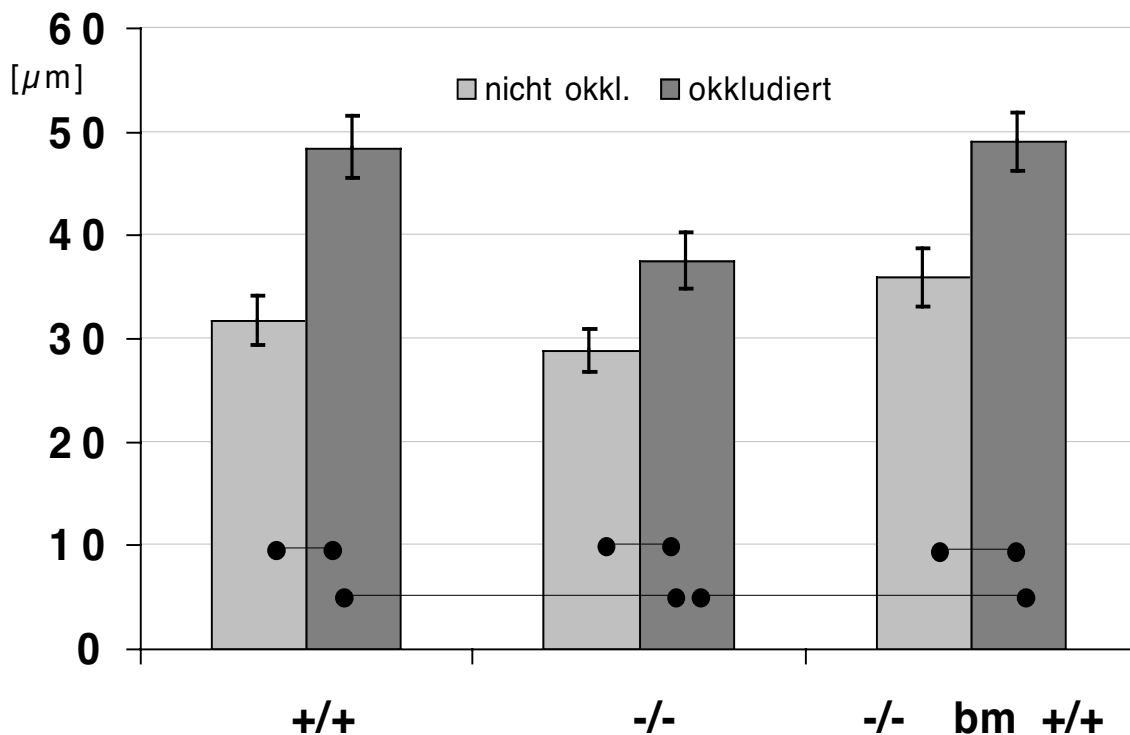
**Morphometrie vier Wochen nach der Okklusion** (Abb. III.14.): Weitere 18 Wildtyp und 11 PLGF -/- Tiere wurden zunächst mit den wenig-invasiven Methoden (LDI, HbSS, IT) über einen Zeitraum von 3 Wochen beobachtet. 4 Wochen nach der Femoralokklusion wurden auch bei diesen Tieren die Kollateralarterien gewonnen und deren Durchmesser bestimmt. 4 Wochen nach der Okklusion waren die Durchmesser der Kollateralen der Wildtypgruppe auf  $77,0 \pm 3,4 \mu\text{m}$  (n=18) und die der PLGF -/-Gruppe auf  $67,1 \pm 3,1 \mu\text{m}$  (n=13) angewachsen.

Im Zeitverlauf (Abb III.14) erkennt man zunächst einen Wachstumsschub und -vorsprung in der Wildtypmaus. Nach einer Woche nimmt die Arteriogenese in den PLGF -/- Mäusen das gleiche Tempo auf wie in der PLGF +/+ Maus.

**Knochenmarktransplantation** (Abb.III.15): Die Knochenmarktransplantation stellte die normale Arteriogenesegeschwindigkeit, wie sie bei der Wildtypgruppe beobachtet werden konnte, wieder her. Die Kollateraldurchmesser der PLGF -/- Mäuse mit Wildtypknochenmarktransplantation (-/-bm+/+) wuchsen in der ersten Woche auf nahezu die gleiche Größe wie die der Wildtypmäuse und erreichten  $49,0 \pm 2,7 \mu\text{m}$  (n=8).



**Abb. III. 14:** Zeitverlauf der Kollateraldurchmesser im PLGF (+/+) und PLGF (-/-) Tier vor Okklusion der Femoralarterie, eine (1w) und 4 Wochen (4w) danach

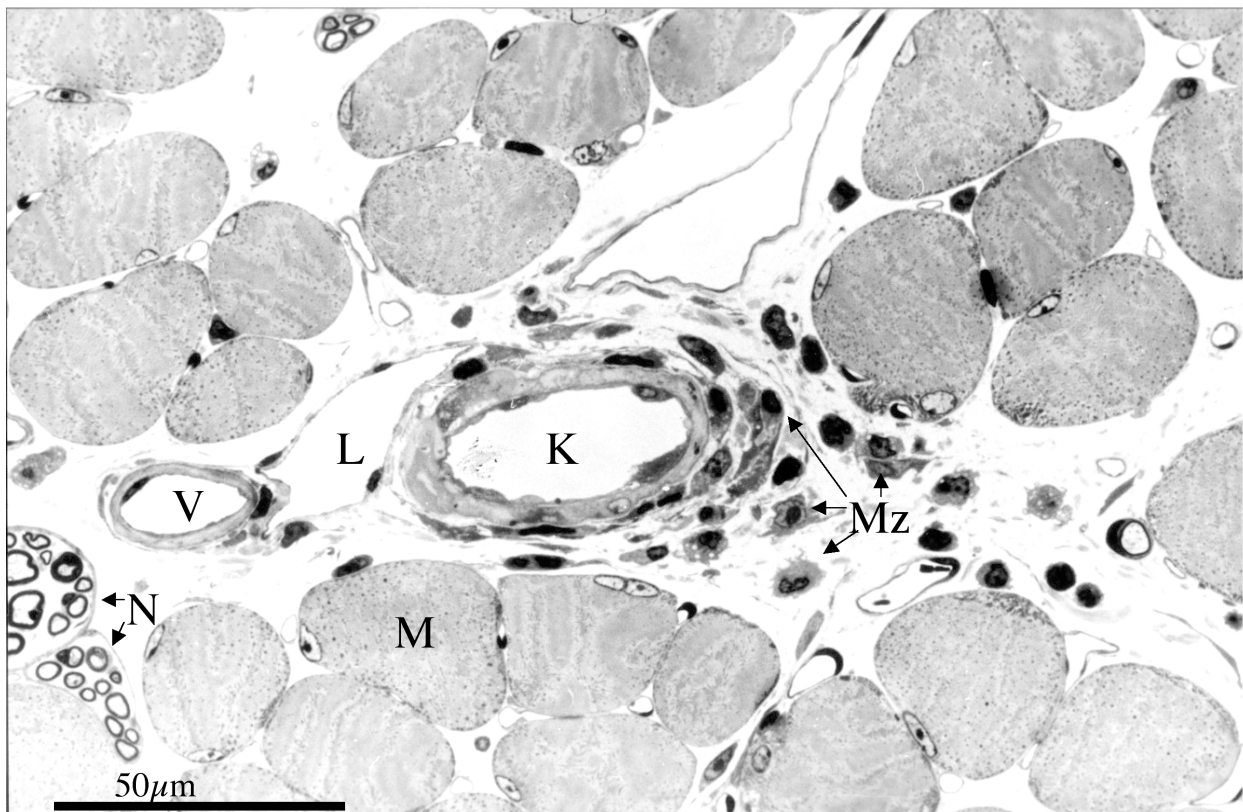


**Abb. III.15:** Durchmesser der Kollateralarteriolen **eine Woche nach** Okklusion im PLGF Wildtyp (+/+) und im PLGF -/- Tier ohne (-/-) bzw. mit (-/-bm+/+) Knochenmarktransplantation

•• :  $p < 0,05$  (Signifikante Differenzen mit One Way Anova und Bonferroni)

### III.6.3. Monozytenrekrutierung

Den Monozyten gilt eine besondere Aufmerksamkeit, da sie zum einen Quelle von PLGF sein dürften und es andererseits möglich ist, dass PLGF die Rekrutierung und Funktion der Monozyten beeinflusst. Von früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Kaninchen- und Mäusen ist bekannt, dass drei Tage nach der Okklusion der Femoralarterie ein gehäuftes Auftreten von Monozyten in der Adventitia der Kollateralarterien festzustellen ist (unter Verwendung von CD 68 Antikörpern). Eine Woche nach der Okklusion trifft man die perivaskulären Monozyten in der Wildtypmaus auch noch an, jedoch schon nicht mehr so zahlreich. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass man in der PLGF (-/-) Gruppe die Monozyten noch seltener antrifft. Längst nicht bei jedem Präparat waren die Monozyten zu sehen. Man gewinnt beim Schneiden und Durchmustern den Eindruck, dass in der PLGF (-/-) Gruppe während der Angiogenese weniger Monozyten rekrutiert wurden. In der PLGF (-/-) Gruppe mit (+/+) Knochenmarktransplantation sind dagegen nach einer Woche etwa genauso viele Monozyten anzutreffen, wie bei der Wildtypmaus.



**Abb. III.16:** Beispiel Monozytenrekrutierung\* (Tag 3 nach Okklusion)

Kollaterale (K), Monozyt (MZ), Muskelfaser (M), Vene (V), Lymphgefäß (L), Nerv (N)

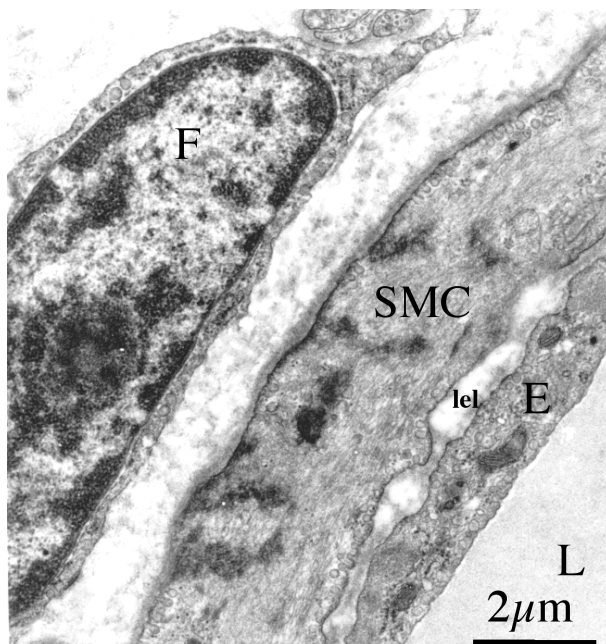
\*Identifizierung mit CD 68 AB`s, mit freundlicher Genehmigung von Dr. D. Scholz

### III.7. Transmissionselektronenmikroskopie

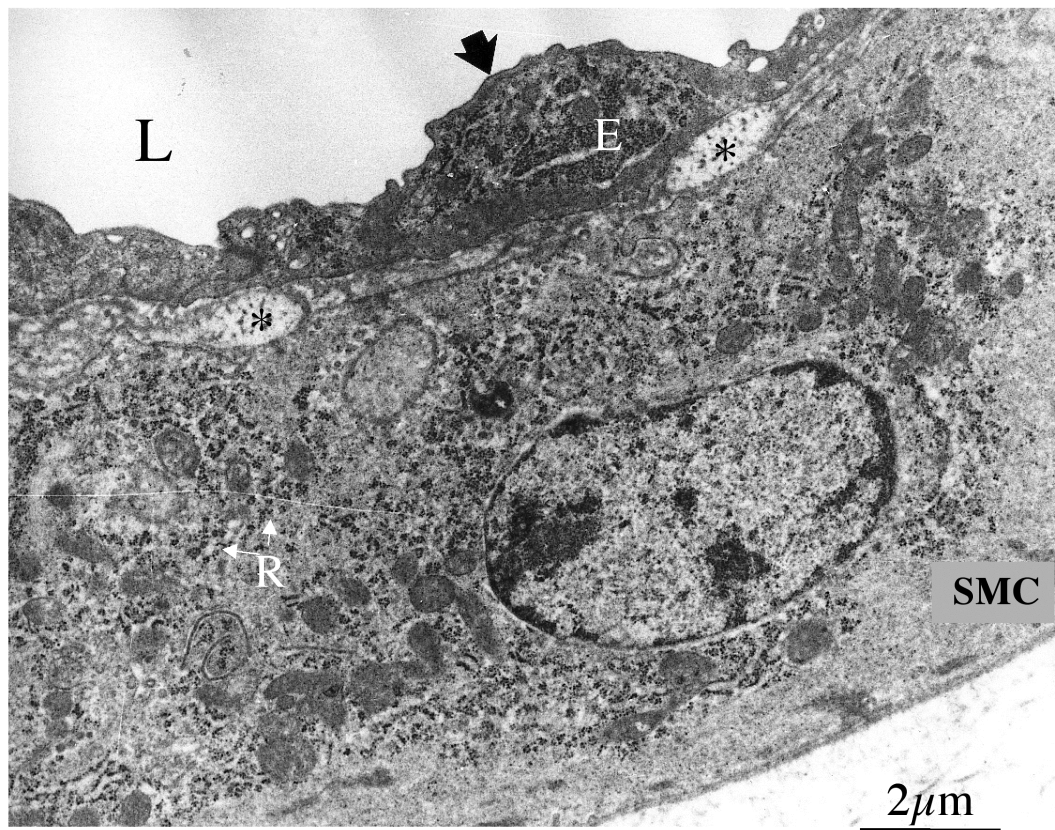
Zunächst werden die Kollateralen der nicht okkludierten Seite betrachtet. Sie stehen für den Urzustand der Kollaterale vor Beginn der Arteriogenese, für die *prä-existente* Kollaterale (Abb. III.17). Die Endothelzellschicht ist einreihig und flach (vergleiche Lichtmikroskopie III.11). Die Zellkerne sind klein und nicht aktiviert. Zwischen dem Endothel und der glatten Muskelschicht befindet sich die vollkommen intakte Lamina elastica interna. Die glatten Muskelzellen sind ihrer Funktion entsprechend zum kontraktiven Typ voll ausdifferenziert. Deutlich sieht man die kontraktiven Filamente. Freie Ribosomen sind nicht zu sehen, was als Indiz für eine geringe Syntheseleistung zu werten ist.

Die präexistierenden Kollateralen der verschiedenen Versuchstiergruppen unterscheiden sich nicht voneinander. In allen Fällen handelt es sich um ruhende (nicht-aktivierte), funktionstüchtige Zellen und Gefäße.

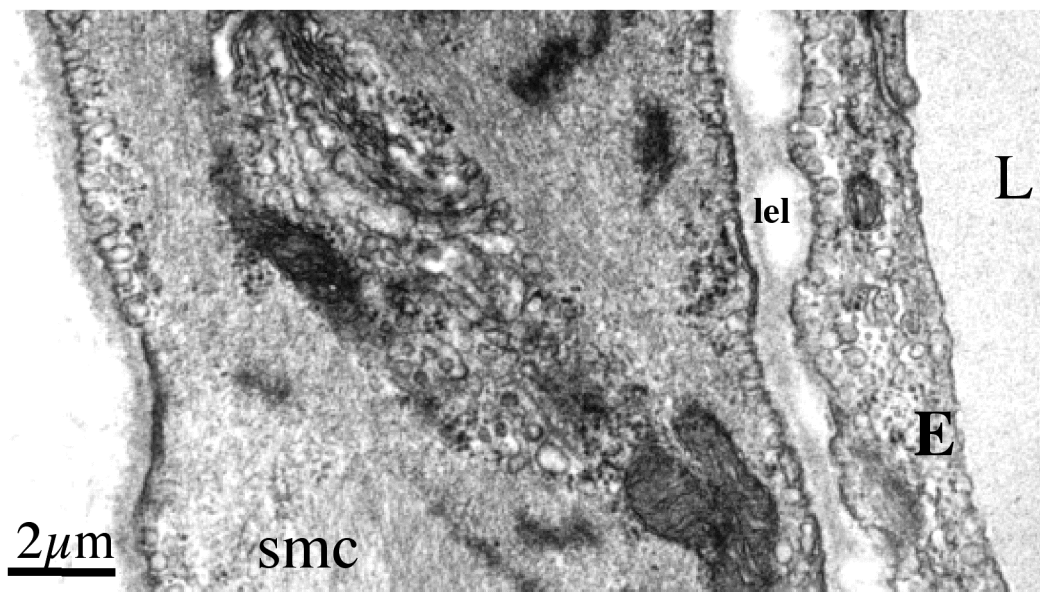
Die Ultrastruktur der Gefäßwand 3 Tage nach der Operation ist in den Kollateralen der okkludierten Seite deutlich verändert (Abb.III.18). Die Wand befindet sich in der Proliferationsphase: Die Endothelzellen sind zwar einreihig geblieben, sie haben aber ein deutlich verändertes Erscheinungsbild. Die Endothelzellen scheinen größer geworden zu sein, die Endothelzellkerne wölben sich ins Lumen (Pfeil, vergleiche auch mit Lichtmikroskopie, Abb. III.11). Eine Vergrößerung des Kernes mag zum einen für eine hohe Syntheseleistung sprechen, zum anderen für dessen Replikation. Die kontraktiven Filamente sind überhaupt nicht mehr zu erkennen, da die synthetische Organellen dominieren. Auffällig sind die vielen Ribosomen, Indizien für eine große Syntheseleistung.



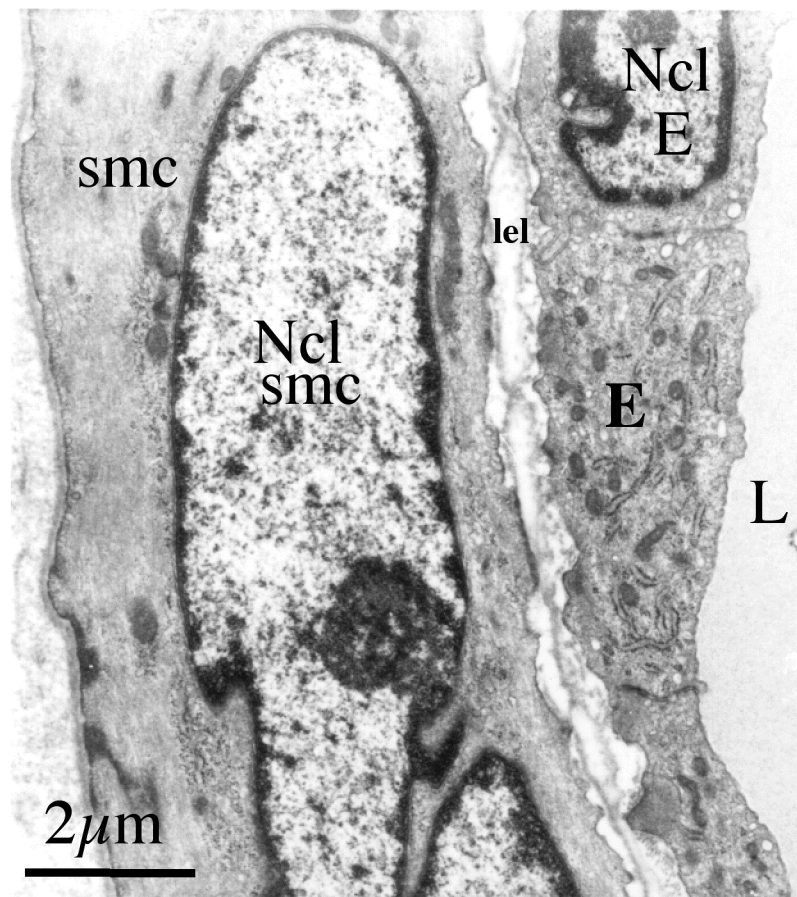
**Abb.III.17:** Das Kollateralgefäß der nicht okkludierten Seite repräsentiert die präexistierende Kollateralarteriole: Endothelzelle (E), die Glatte Muskelzelle (SMC) ist kontraktiv, die Lamina elastica interna (lel) intakt; Fibrozyt (F)



**Abb.III.18:** Kollateralgefäß PLGF +/+ der okkludierten Seite 3 Tage nach der Okklusion: Lumen (L), Endothelzelle (E), Freie Ribosomen (R), Glatte Muskelzelle (smc), Pfeil: prominenter Endothelzellkern, Sterne: diskontinuierliche Lamina elastica



**Abb. III.19:** Kollateralgefäß PLGF +/+ der okkludierten Seite 7 Tage nach Okklusion L:Lumen, E:Endothelzelle, SMC:Glatte Muskelzelle, lel: intakte Lamina elastica interna



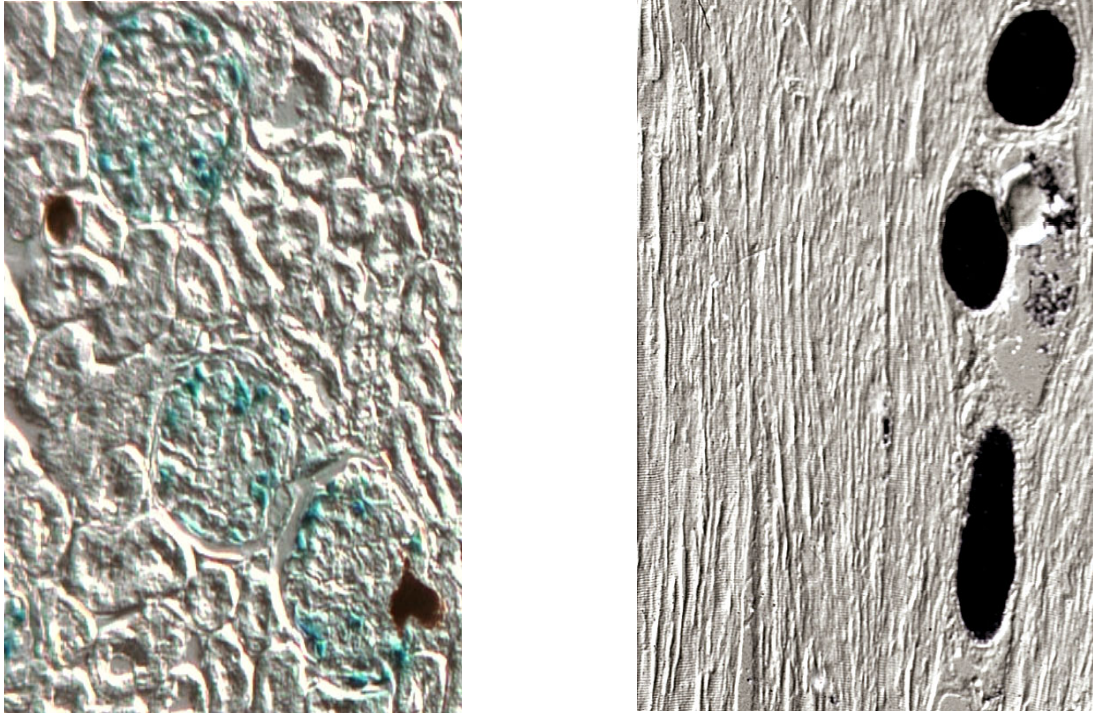
**Abb. III.20:** Kollateralgefäß *PLGF*<sup>-/-</sup> der okkludierten Seite 7 Tage nach der Okklusion L:Lumen, E:Endothelzelle, lel: lamina elastica interna, SMC: Glatte Muskelzelle, Ncl:Nucleus

Nach 7 Tagen ist die lebhafteste Syntheseleistung in der Wildtypmaus schon nicht mehr zu erkennen (Abb.III.19). Die Kerne werden wieder kleiner, die kontraktile Filamente treten wieder in den Vordergrund. Freie Ribosomen sind kaum noch zu erkennen.

In der wachsenden Kollaterale der *PLGF*<sup>-/-</sup> Maus (Abb. III.20) ist die Entwicklung nach 7 Tagen noch nicht so weit fortgeschritten, wie in der Wildtypmaus. Während die Syntheseleistung in der glatten Muskelzellschicht zwar schon wieder deutlich rückläufig ist, weist die Endothelzellschicht mit massenhaft freien Ribosomen noch Zeichen gesteigerter Syntheseleistung auf.

### **III.8. Die VEGF Promotor $\beta$ -gal transgenen Mäuse**

Die Positivkontrolle in der Niere zeigt eine deutliche  $\beta$ -Galactosidaseproduktion, was ein Indiz für VEGF Produktion ist (vergleiche II.1.2.4.).



**Abb. III.21:** *VEGF Promotor  $\beta$ -gal Mäuse*

*A: Niere (Positivkontrolle)*

*B: Skelettmuskel*

Im Skelettmuskel hingegen ist, auch um die Gefäße herum, keine  $\beta$ -Galactosidaseproduktion auszumachen. Mit dieser Methode konnte in den lediglich zwei Versuchstieren während der Arteriogenese keine VEGF Produktion im Kollateral- und im Perikollateralgewebe nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist lediglich als Randbeobachtung zu verstehen, aufgrund von methodischen Unsicherheiten und der geringen n-Zahl streng wissenschaftlich nicht zu verwerten.





## IV. Diskussion

### IV.1. Wichtigste Ergebnisse

- Nach einer Woche ist in der Wildtypgruppe ein signifikantes Kollateralwachstum auszumachen. Das Wachstum der Kollateralen in PLGF  $-/-$  Mäusen hingegen ist nach einer Woche deutlich geringer fortgeschritten als in der Kontrollgruppe. Für diesen Zeitpunkt erlauben sowohl die Lebendmessungen (Durchblutung und Hämoglobin-Sauerstoffsättigung), als auch die Auswertungen post mortem (Aufsichts- und Röntgenangiographie, die Morphometrie und die ultrastrukturellen Untersuchungen) diese Schlussfolgerungen.
- Die Arteriogeneseverzögerung wurden im PLGF  $-/-$  Tier durch Wildtypknochenmarktransplantation wieder aufgehoben. Die Angiographien zeigen ähnlich große Gefäße wie beim PLGF  $+/+$  Tier, auch die Messung der Kollateraldiameter bringt keine signifikanten Unterschiede zwischen PLGF  $+/+$  Tier und PLGF  $-/-$  Tier mit  $+/+$  Knochenmarktransplantation.
- Nach wenigen Wochen sind zwischen den Kollateralen der PLGF  $+/+$  und der PLGF  $-/-$  Gruppe nur noch wenige Unterschiede festzustellen. Die PLGF  $-/-$  Kollateralen haben in der Entwicklung aufgeholt und den Rückstand beinahe ausgeglichen. Die Durchblutung und die Hämoglobin-Sauerstoffsättigung befinden sich in beiden Gruppen auf gleichem Niveau. Die Kollateraldurchmesser 4 Wochen nach der Okklusion sind in der PLGF  $-/-$  Gruppe fast gleichauf mit der PLGF  $+/+$  Gruppe.
- Beide Gruppen unterscheiden sich also eher in der Geschwindigkeit als im definitiven Ausmaß der Arteriogenese.
- Im PLGF  $-/-$  Tier sind perivaskulär während der Arteriogenese weniger und seltener Monozyten anzutreffen als im PLGF  $+/+$  Tier: PLGF scheint die Rekrutierung der Monozyten zu fördern.
- Auch nach Wochen vermag sich in der Wildtypmaus die Pfote der operierten Seite bei maximaler Durchblutung nicht von einer geringen Umgebungstemperatur abzuheben, was der Pfote der nicht okkludierten Seite hingegen gelingt. Die Thermoregulation ist also nach Ligatur der Femoralarterie nachhaltig und dauerhaft gestört, wohingegen sich Durchblutung und Sauerstoffsättigung im Untersuchungszeitraum deutlich verbessern.

## IV.2. Vergleich mit Anfangshypothesen: Sind die Fragestellungen beantwortet?

*Hat PLGF einen Einfluss auf das Wachstum der Kollateralen?*

Die Arteriogenese in PLGF  $-/-$  Mäusen ist gestört, **also beeinflusst PLGF das Kollateralwachstum**. Offensichtlich spielt PLGF eine stimulierende Rolle in der Arteriogenese. Der Faktor scheint zwar nicht unentbehrlich zu sein, da auch im PLGF  $-/-$  Tier Arteriogenese stattfindet, PLGF ist aber allem Anschein nach ein wichtiger Beschleuniger des kollateralen Wachstums. Hält man sich die Bedeutung des Faktors Zeit im Zusammenhang mit der Entstehung von Kollateralkreisläufen und der damit einhergehenden Rettung ischämischen Gewebes vor Augen, so ist der Einfluss von PLGF nicht zu unterschätzen. Die prä-existenten Kollateralarteriolen sind, ohne gewachsen zu sein, meistens nicht in der Lage, Durchblutungsdefizite suffizient zu ersetzen. Je schneller sie wachsen desto rascher verlässt die Ischämie die kritischen Bereiche. Dabei können ein paar Stunden über Leben und Tod eines Gewebeverbandes entscheiden.

*Wie lässt sich die Arteriogenese in PLGF  $-/-$  Mäusen wieder herstellen?*

In PLGF  $-/-$  Mäusen ist durch Knochenmarktransplantation die Arteriogenesehemmung aufgehoben. Durch sie lässt sich die Arteriogenese in PLGF  $-/-$  Tieren also wieder herzustellen.

*Wo liegt die natürliche Quelle des arteriogeneserelevanten PLGF's?*

Der Beweis ist erbracht, dass im Knochenmark die arteriogeneserelevante PLGF Quelle liegt. Zumindest scheint eine (bzw. scheinen mehrere) in den Stammzellen befindliche(n) Zellpopulation(en) die für die normale Arteriogenese hinreichende Menge an PLGF herzustellen. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um eine *autokrine PLGF Produktion von Monozyten* handelt. Kürzlich konnten Carmeliet et al. zeigen, dass Monozyten in der Lage sind, PLGF zu produzieren (Carmeliet, 2001). Mein Versuchsaufbau ist mit der Transplantation von Knochenmark aber nicht eng genug gefasst, um zu beweisen, dass die Monozyten das benötigte PLGF produzieren. Es ist auch denkbar, dass PLGF in selteneren zirkulierenden Zellen entsteht, wie zum Beispiel Mastzellen, die recht häufig perikollateral beobachtet werden (vergleiche Abb. III.13 unten). Eine weitere mögliche PLGF Quelle im Knochenmark stellen die Endothelzellprogenitorzellen (Asahara et al., 1997; Asahara et al., 1999; Boyer et al., 2000) dar.

### **IV.3. Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen wissenschaftlichen Kontext**

#### **IV.3.1. Natürliche Funktion der Kollateralen**

Die Kollateralen sind Teil eines arkadenartigen Netzwerkes das Versorgungsgebiete großer Arterien und ihrer Hauptzweige an deren Grenzgebieten miteinander verbindet. Besonders gut erkennt man diese an der Oberfläche von Skelettmuskeln. Zunächst ist der Frage nachzugehen, warum es die Kollateralen überhaupt gibt. Der Nutzen dieser Gefäße liegt möglicherweise in der effizienten Blutverteilung in nicht synchron kontrahierenden Muskeln (gestreift oder nicht), die zu Hin- und Herbewegung von Blut in verschiedene Muskelpartien führt: von kontrahierten (hoher extravasaler Widerstand) zu relaxierten Partien und zurück bei Umkehrung der Kontraktionsverhältnisse. Das Blut drainiert durch Kapillaren in die Kollateralarterien begleitende Kollateralvenen. Die oszillierende Bewegung ist vielleicht der Grund, warum die Gefäße lebenslang offen bleiben.

Eine andere Überlegung zur Begründung ihrer Existenz ist die, dass in manchen Organen die terminale Differenzierung vom primären kapillären Netzwerk hin zur echten Endarterie nicht komplett abgeschlossen wurde (Schaper, 1971; Risau, 1993).

#### **IV.3.2. Die Rolle der Schubspannung**

In Folge des niedrigen Blutdruckes im Gefäßbereich distal der Ligatur (A. saphena und abwärts) besteht ein Druckgradient entlang der prä-existenten arteriellen Kollateralen. Dadurch ist die Blutgeschwindigkeit in den Umgehungsgefäßen deutlich erhöht und somit auch die Schubspannung („Shear Stress“) an den Wänden. Der Anstieg der Schubspannung ist nach derzeitigem Kenntnisstand der Auslöser der Arteriogenese (Thoma, 1893; Schaper and Schaper, 1993; Ito et al., 1997; Fleming et al., 1998; Scholz et al., 2000). Es muss ein Schwellenwert existieren, bei dem an und in der Endothelzelle der Wachstumsprozess initiiert wird. Wird der Schwellenwert wieder unterschritten, etwa weil die Kollateralgefäße gewachsen sind, könnte die nachlassende Wandstimulation der Schubspannung das Signal für das Ende der Wachstumsvorgänge, für die Reifung (Maturation) sein.

Erste Indizien dafür, dass am Endothel Umwandlungen stattfinden, sind Veränderungen des Phosphorylierungsmusters von Zellproteinen. Die punktförmigen Phosphorylierungen an Adhäsionskontakten und an Endothelzell- zu Endothelzellkontakten werden deutlich geringer innerhalb der ersten 20 bis 30 Minuten und sind 12 Stunden nach Einsetzen der erhöhten Scherkräfte fast völlig zu Gunsten von Zellmembran-Zellsubstratkontakt Phosphorylierungen verschwunden (Scholz et al., 2000). Dieser Wechsel des Phosphorylierungsmusters vom Zelläußeren zum Zellinneren ist der Anfang einer Signalkaskade zum Zellkern, in dem dann die Expression verschiedener Genprodukte beginnt: Es wurden Schubspannungsreaktive Elemente (Shear Stress Responding Elements: SSRE's) in der Promoterregion bestimmter endothelialer Gene beschrieben, die deren Expression regulieren, durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Early Growth Response-1 (EGR-1) und Activator Protein-1 (AP-1) (Khachigian et al., 1995; Gimbrone et al., 1997; Khachigian et al., 1997). In Situationen nicht laminarer Schubspannung wurden besonders hohe Spiegel dieser Transkriptionsfaktoren festgestellt (Nagel et al., 1999).

Es folgt dann als nächstes die Aufregulation verschiedener Adhäsionsmoleküle wie zum Beispiel E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1 (Scholz et al., 1996). Auch die Produktion des wichtigen Zytokins MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) wird in den Endothelzellen erhöht (Wung et al., 1996). Die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen führt zur Rekrutierung von Monozyten aus der Blutbahn, wie man es im Mäusehinterlaufmodell beobachten kann.

Wenn man das perikollaterale Gewebe ein bis drei Tage nach der Okklusion mikroskopisch untersucht, sieht man eine deutliche Ansammlung von Monozyten. Sie produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, wahrscheinlich auch PLGF. Nach etwa 1 bis 3 Tagen ist eine maximale Mitoseaktivität sowohl in den Endothelzellen als auch in den glatten Muskelzellen und Fibroblasten festzustellen. Ki-67, ein Standardmarker für Zellproliferation (Cattoretti et al., 1992) markiert in 20-30% positive Reaktionen der Kerne (Scholz et al., 2000). Nebenbefundlich gibt es Hinweise auf intrazelluläre und perivaskuläre Ödeme (eigene Beobachtung). Sie könnten ein Hinweis auf die Gegenwart von VEGF und/oder PLGF sein.

Der mitotischen Aktivierung in den Zellen der Kollateralen folgen (im Kanninchenhinterlaufmodell ab Tag 3 (Scholz et al., 2000)) die synthetischen Prozesse, welche zum Zellwachstum und zum Zuwachs der Zellmatrix führen. Proteine der Extrazellulärmatrix wie Kollagen I, II, IV, Fibronectin, Laminin, Tenascin und Chondroitin werden gesteigert synthetisiert (Wolf et al., 1998). Auch

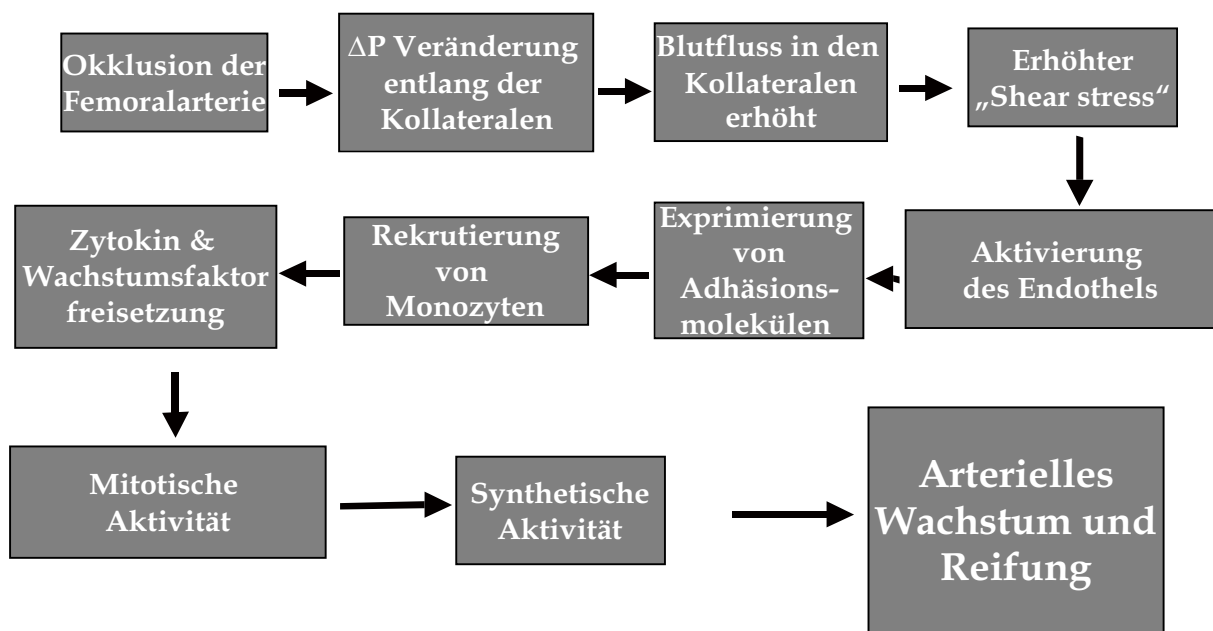
ultrastrukturell kann man in dieser Phase Veränderungen feststellen. So ist die Lamina elastica interna, Hauptbarriere für die Migration glatter Muskelzellen, unterbrochen (Schaper, 1971), glatte Muskelzellen haben ihren kontraktile Phänotyp verloren und die Aktin-Myosin-Filamente sind nicht mehr zu erkennen. Desmin und Aktinfilamente werden durch Vimentin ersetzt. Neu aufgetreten ist eine große Menge an „Rauhem Endoplasmatischem Reticulum“ (RER) in allen Schichten der Gefäßwand. Die mitotische Aktivierung wird heruntergeregelt. Es kommt zur Vergrößerung der ganzen Kollateralarteriole.

Im Anschluss gehen die Zellen wieder in ihren Funktionszustand zurück. Die niedrigere Wandschubspannung der gewachsenen Gefäße könnte der Grund für das Ende der Arteriogenese und eine Hauptvoraussetzung für die Reifung sein: Der Radius eines Gefäßes beeinflusst dessen Wandschubspannung in negativer 3. Potenz:

Schubspannung ( $\tau$ ) =  $4 \eta I r^{-3} \pi^{-1}$  ( $\eta$ : Viskosität;  $I$ : Stromstärke;  $r$ : Radius).

Daraus folgt: Je größer der Gefäßradius desto kleiner die Schubspannung.

Schematisch kann man die Ereignisse wie folgt zusammenfassen:



**Abb. IV.1:** Abfolge der Ereignisse (Hypothese)

Eine **Initialphase**, in der es nach Endothelaktivierung (nach Minuten) zur Zytokinproduktion und Adhäsionsmolekülaufregulierung und folgender Monozytenadhäsion und-aktivierung kommt.

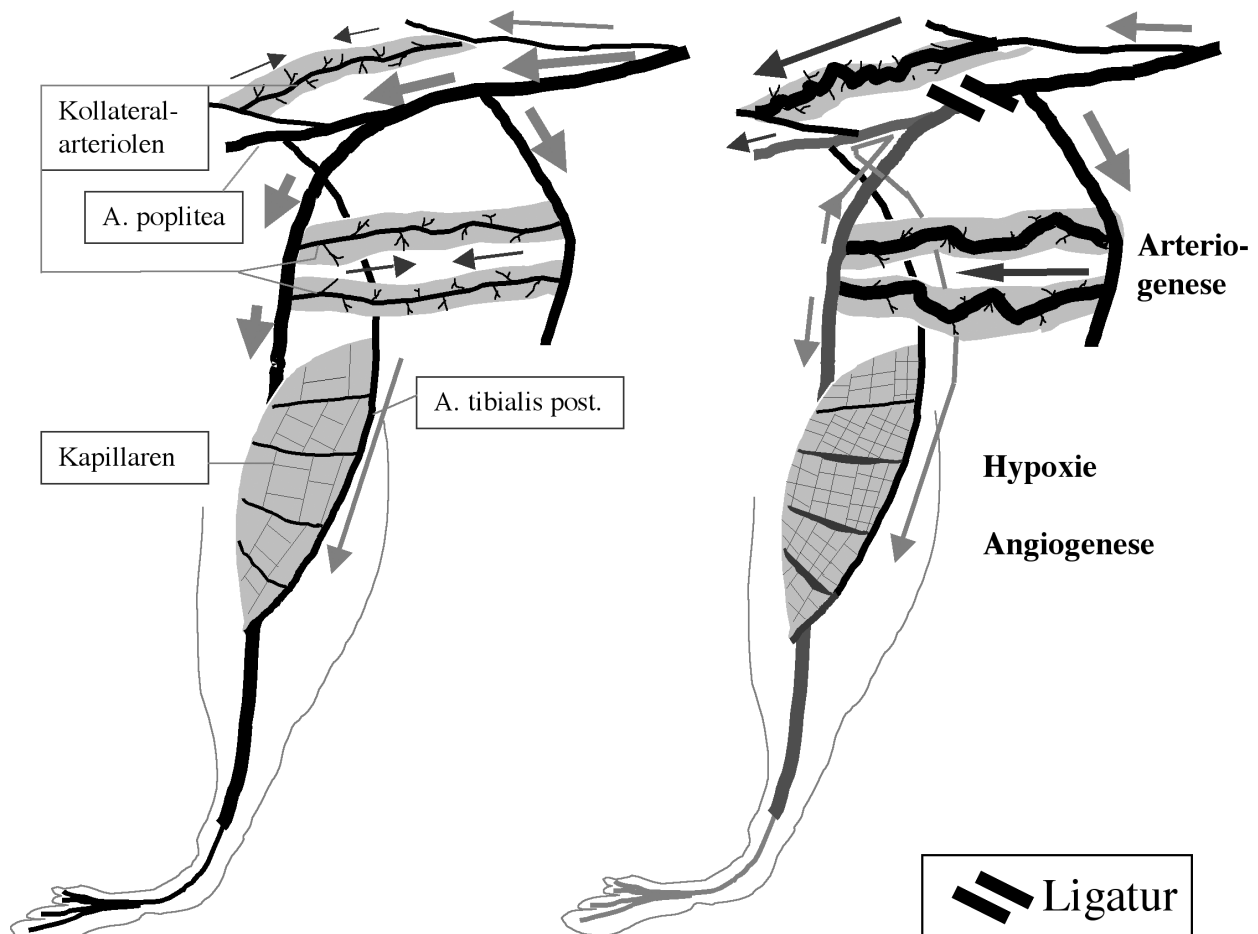
Einer **Proliferationsphase**, in der man (1-3 Tage nach der Okklusion der Hauptstrombahn) maximale mitotische Aktivität der Endothelzellen, der glatten Muskelzellen und der Fibroblasten beobachtet.

Eine **Wachstumsphase** mit abklingender Mitoseaktivität, dafür mehr Proteolyse- und Syntheseaktivität: deutlich 3 bis 7 Tage nach der Okklusion, danach übergehend in eine

**Reifungsphase**, in der die Zellen vom synthetischen wieder in den Ruhe- und Funktionsphänotyp übergehen.

### IV.3.3. Hypoxie ist nicht essentiell für Arteriogenese

Zahlreiche Untersucher machen Hypoxie für die Initiierung der Wachstumsvorgänge verantwortlich (Couffinhal et al., 1998; Murohara et al., 1998). Folgt man dieser These, so müsste die zunehmende Reoxygenierung die Arteriogenesevorgänge beenden. Das ist aber nicht der Fall: auch nach Reoxygenierung setzt sich das Kollateralwachstum noch eine Weile fort (Scholz et al., 2002).



**Abb. IV.2:** Modell der Hinterlaufszirkulation vor (links) und nach (rechts) Femoralisokklusion

Gegen diese These spricht weiterhin, dass die hypoxischen Gebiete und die der Arteriogenese auch räumlich voneinander getrennt sind. In den Muskeln der Oberschenkel, dort wo die wachsenden Kollateralen lokalisiert sind, kommt es nach der Okklusion jedoch nicht zur Hypoxie: Im Gewebe um die Kollateralen herum stellt man weder die Expression hypoxischer Gene noch metabolische Zeichen der Ischämie (erniedrigtes ATP, erhöhtes Laktat) fest (Deindl, 2000). Ischämie beobachtet man, wenn überhaupt, viel weiter distal, im unteren Bereich der Mäusehinterläufe. Sie initiiert dort nicht das Wachstum bereits existierender Gefäße, sondern die Neusprossung von Kapillaren, die Angiogenese (Ito et al., 1997). Falls Ischämie essentiell für die Initialisierung und Unterhaltung der Arteriogenese wäre, gäbe es auf dem Blutweg zwei Möglichkeiten, wie Hypoxie induzierte Botenstoffe zu den Kollateralen gelangen könnten. Entweder handelte es sich um ein retrogrades Signal, das aus dem Bereich der Pfote in den Bereich der Oberschenkelmuskulatur gelangt, oder es handelte sich um ein anterogrades Signal, das dann aber, um die Kollateralen zu erreichen, systemisch vorhanden (und wirksam) sein müsste.

#### **IV.3.4. VEGF**

Das Fehlen eines einzelnen VEGF Allels verursacht fatale vaskuläre Defekte, die noch im Embryonalstadium nicht mehr mit dem Leben zu vereinbaren sind (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Postnatale Suppression einzelner VEGF Subtypen führt ebenfalls zu Gefäßschäden. Diese bedingen Gewebsischämien (Carmeliet et al., 1999). In Versuchen mit VEGF-Rezeptor Antikörpern (gegen Flt-1) konnte gezeigt werden, dass nicht mit Abschluss der Embryonalentwicklung, sondern erst nach der 4. Lebenswoche die Entwicklung unabhängig von VEGF wird (Gerber et al., 1998). Eine weitere wichtige Entdeckung dieser Studie ist, dass VEGF neben der Proliferationsstimulation von Endothelzellen auch deren Apoptose in Grenzen hält. VEGF ist also nicht nur für eine geordnete Endothelzellproliferation, sondern auch für deren Überleben nötig. Im adulten Organismus beeinflusst VEGF vaskuläres Wachstum im Zusammenhang mit der Menstruation und der Schwangerschaft, bei der Wundheilung und in zahlreichen malignen und inflammatorischen Prozessen (Kim et al., 1993; Aiellio, 1994; Ferrara, 1998; Goede, 1998). Für die Aufrechterhaltung der Homöostase maturierter Gefäße ist er aber nicht essentiell (Ferrara, 1999). VEGF wurde bereits auf seinen therapeutischen Nutzen bei ischämischem Herzleiden und PAVK (Peripherer Arterieller Verschlusskrankheit) geprüft. Es gibt hoffnungsvolle Ergebnisse im Gebiet der Applikation von Wachstumsfaktoren bei PAVK (Baumgartner et al., 1998; Folkman, 1998; Isner, 1998). Ein weiteres Feld der

VEGF Forschung ist die Onkologie. Über VEGF-Ausschaltung könnte Angiogenesehemmung in Tumoren und Entzündungsprozessen erreicht werden (Folkman, 1996). Was die Arteriogenese angeht, so gibt es unterschiedliche Auffassungen: Von einigen Autoren wurde festgestellt, dass VEGF das Kollateralwachstum begünstigt (Dvorak et al., 1995a; Dvorak et al., 1995b; Takeshita et al., 1996; Takeshita et al., 1994). An unserem Institut durchgeführte Studien widersprechen den soeben genannten Beobachtungen. Danach hat VEGF keinen Einfluss auf die Arteriogenese (Deindl, 2000): Während der Arteriogenese im Kanninchenhinterlaufmodell erfolgte im Kollateral- und im Perikollateralgewebe (quergestreifter Skelettmuskel) keine Induktion des VEGF-Gens, sowie anderer Hypoxie assoziierter Gene (der Hämoxygenase, der Lactatdehydrogenase A, oder des HiF-1). Es kam auch zu keiner Aufregulierung der VEGF-Rezeptoren Flt-1 und Flk-1. VEGF ist allerdings in der Lage, seine Rezeptoren bei Bedarf hochzuregeln. Eine VEGF Infusion via Minipumpe brachte keine Beschleunigung oder Vergrößerung des Kollateralwachstums (als Positivkontrolle wurde MCP-1, als Negativkontrolle PBS infundiert) (Deindl, 2000). Was schon durch die Lokalisation der Kollateralen vermutet werden konnte, bestätigte sich in der Analyse bestimmter Metabolite wie AMP, ADP, ATP, Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Lactat und Kreatinphosphat: Während der Arteriogenese gibt es keine Anzeichen der Ischämie (Deindl, 2000). Die zuletzt zitierten Versuche wurden am Kanninchenhinterlauf durchgeführt. Es wäre möglich, dass dem VEGF in der Arteriogenese anderer Spezies eine Bedeutung zukommt. Für die Verhältnisse in der Maus haben wir immerhin einen Anhaltspunkt, wenn auch nicht statistisch verwertbar: In den beiden Mäusen, bei denen VEGF Produktion mit  $\beta$ -Galactosidase gekoppelt war, ist 2 Tage nach der Femoralokklusion im Kollateral- und Perikollateralgewebe keine VEGF Produktion festgestellt worden.

#### **IV.3.5. PLGF**

Zunächst verwundert es, dass PLGF  $-/-$  Mäuse eine normale Entwicklung durchmachen - auch in Hinblick auf ihre Gefäße (Carmeliet, 2001). Ist doch PLGF bekannt als Mitglied der VEGF Familie. Bei beiden Wachstumsfaktoren handelt es sich um Glykoproteindimere, die eine Menge biochemischer und funktioneller Merkmale teilen. So stabilisieren sie ihre Sekundär- und Tertiärstruktur mit reichlich Disulphidbrücken und haben 8 charakteristische Cysteinreste in ihrer Aminosäuresequenz (Erstbeschreibung: (Maglione et al., 1991)). Aktiv werden beide, PLGF und VEGF, zumeist als Homodimeren. Es gibt aber auch Zellen, die sowohl VEGF als auch PLGF exprimieren und zur Heterodimerbildung befähigt sind (DiSalvo et al., 1995; Cao et al., 1996a).



Vom ursprünglich in der Plazenta entdeckten PLGF wurde angenommen, dass er Trophoblastenwachstum- und Differenzierung kontrolliert und in die Plazentargefäßentwicklung involviert sei (Maglione et al., 1991; Khaliq et al., 1996; Clark et al., 1998;). Doch nach den Beobachtungen der scheinbar normalen Entwicklungen von PLGF  $-/-$  Mäusen (Carmeliet, 2001) muss man diese Ansicht bezweifeln:

So resultiert die Invasion der Embryonalgefäße (Arterien und Venen) ins Chorion in der erwarteten labyrinthartigen Formation. Die Dicke der Plazenta war im Vergleich mit Wildtypmäusen zu den selben Embryonalstadien gleich groß. Die Gefäßversorgung des Dottersackes war im  $-/-$  Phänotyp unauffällig. Carmeliet et al. beschrieben auch die normale Entwicklung von glatten Muskelzellen in der Plazenta. Es wurden außerdem keine das fehlende PLGF kompensierende Reaktionen, wie beispielsweise eine gesteigerte PLGF Produktion der  $-/+$  Mutter oder eine gesteigerte VEGF Produktion des Embryos oder der Mutter festgestellt. Auch die Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und Tie-2 waren in  $-/-$ ,  $-/+$  und  $+/+$  Phänotypen gleichmäßig vertreten. In PLGF  $+/+$ ;  $+/-$ ;  $-/-$  Müttern war die Entwicklung gleich (Carmeliet, 2001).

PLGF spielt anscheinend in der normalen Entwicklung eine untergeordnete Rolle (vielleicht wird seine Funktion von anderen Faktoren übernommen) und entfaltet seine Wirkung in reagierenden- pathologischen wie physiologischen Prozessen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über die Arteriogenese in den PLGF  $-/-$  Mäusen bestärkt diese Vermutung. Auch Lutton et al. konnten kürzlich die stimulierende Wirkung von PLGF auf die Revaskularisierung ischämischen Gewebes (Mäuseherz und -hinterlauf) beweisen (Lutton et al., 2002). Außerdem ist die PLGF Induktion in menschlichen Keratinozyten während der Wundheilung beschrieben (Failla et al., 2000). Auch die Möglichkeit, mit PLGF Endothelzellrekrutierung zu verstärken, konnte beschrieben werden (zum Beispiel in die eigentlich avaskuläre Kanninchenkornea (Ziche et al., 1997).

Eine besonders interessante Eigenschaft von PLGF ist die, dass er die VEGF Aktivität *in vivo* und *in vitro* moduliert und potenziert (Park et al., 1994; Carmeliet, 2001). Vielleicht ist die Beeinflussung und Kontrolle von VEGF eine entscheidende Aufgabe von PLGF. Eine Studie belegt, dass PLGF an Monozyten die verstärkte Induktion von Wachstumsfaktorenbildung auslösen kann (Bottomley et al., 2000): Es wurde die VEGF Sekretion von Monozyten in der Synovialflüssigkeit von Patienten untersucht, die unter rheumatoider Arthritis leiden. Dabei wurde gefunden, dass die Größe der PLGF Stimulation, also die Höhe der PLGF Spiegel, eine entscheidende Rolle spielt.

Nachgewiesen ist für PLGF also die VEGF Induktion. PLGF induziert aber nicht nur die VEGF Bildung, er kann auch auch VEGF Wirkungen abschwächen. Der Faktor ist zum Beispiel in der Lage Dimere mit VEGF einzugehen, wodurch die Wirkung von VEGF abgeschwächt wird: PLGF/VEGF Heterodimere haben 20 bis 50-fach weniger mitotische Aktivität auf HUVEC's als VEGF<sub>(165)</sub> Homodimere (Cao et al., 1996a).

In einigen bösartigen Tumoren sind die PLGF Spiegel stark herabreguliert, während VEGF aufreguliert ist (Beispiel Thyroid-CA (Viglietto et al., 1995)).

Es lassen sich widersprüchliche Wirkungen von PLGF in Bezug auf VEGF zusammenfassen: Auf der einen Seite steht die VEGF Induktion, nachgewiesen in Monozyten, auf der anderen Seite eine Begrenzung der VEGF Wirkungen. Man kann also von einer Modulation der VEGF Wirkung sprechen. Der Widerspruch lässt sich vielleicht auflösen, indem man von einer schnellen Bereitstellung einer großen VEGF Menge ausgeht, die bald danach wieder heruntergefahren oder eingestellt wird. Ein solche kurze aber große VEGF Verfügbarkeit ist von Vorteil, wenn es darum geht, physiologische Prozesse anzustoßen. Ein VEGF Einfluss auf die Arteriogenese wäre auch am Anfang, in der späten Initial- und in der frühen Proliferationsphase am sinnvollsten. Mit abklingender Mitoseaktivität in der Wachstumsphase sind die bekannten VEGF Wirkungen nicht zu vereinbaren.

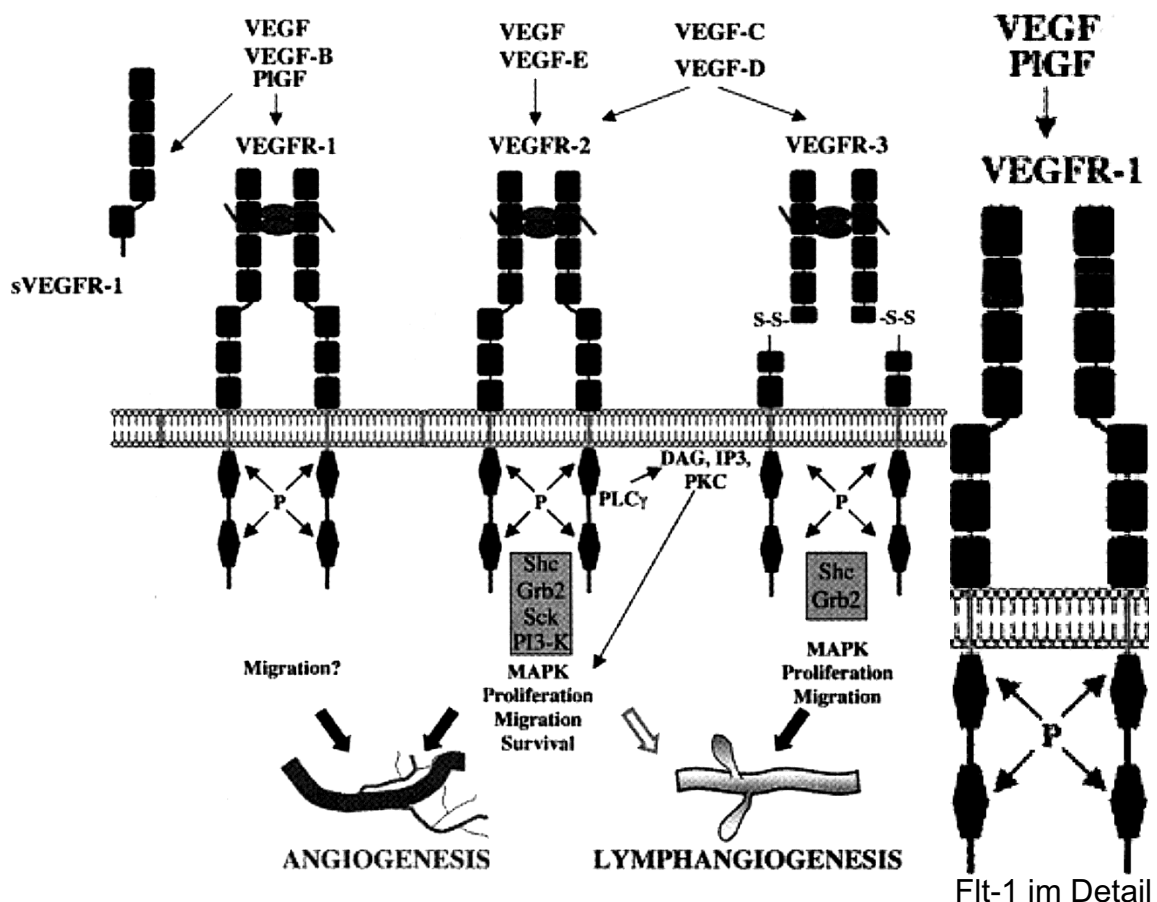
Denkbar wären außer VEGF noch eine Reihe von anderen Produkten, die PLGF in Monozyten und anderen Zellen induziert. Die Kaskade, die PLGF im Monozyten auslöst, ist noch nicht bekannt. Es konnte lediglich der PLGF Rezeptor Flt-1 auf den Monozyten nachgewiesen werden (Clauss, 1998).

Um die Ergebnisse dieser Arbeit genauer interpretieren und die Wirkungsweise von VEGF und PLGF besser verstehen zu können, ist es hilfreich, einen Blick auf die Angriffspunkte von VEGF und PLGF zu werfen - auf deren Rezeptoren.

#### IV.3.6. VEGF und PLGF Rezeptoren

Als man Ende der achtziger Jahre die Bedeutung von VEGF erkannte, suchte man seine Rezeptoren und die von ihnen ausgelösten Signalkaskaden. Mit radioaktiv markiertem VEGF kam man ihnen auf die Spur und entdeckte sie als bisher unbekannte Rezeptortyrosinkinasen (Klasse III). Der **Flt-1-Rezeptor** (VEGFR1) wurde von *Shibuya et al.* im Jahre 1990 entdeckt (Shibuya et al., 1990). Sie isolierten auch aus der Plazenta ein 8-kb cDNA Stück, auf welchem eine dem c-Fms strukturell ähnliche Tyrosinkinase kodiert ist. C-Fms ist ein Colony-Stimulating Factor-1 Rezeptor, früher (viral) Feline McDonough Sarcoma Receptor

(v-Fms) genannt. Daher nannten sie den neuen Rezeptor "Fms-like tyrosine kinase-1" (Flt-1). Flt-1 war das zuerst entdeckte Mitglied einer Tyrosinkaskadenfamilie, die später VEGF-Rezeptoren genannt wurden. Ihr gehören auch Flt-4 und **Flk-1/KDR** (VEGFR2) an. Flt-4 (VEGFR3) ist wichtig im Zusammenhang mit der Entstehung von Lymphgefäßen aber für die Bildung von Blutgefäßen wohl von keiner Bedeutung (Aprelikova et al., 1992). Flk-1, sein humanes Pendant heißt KDR (Kinase containing Domain Receptor), ist der Rezeptor mit der stärksten VEGF Antwort. Er ist bislang am besten erforscht worden (Claus, 1998).



**Abb. IV.3:** 3 VEGF-Rezeptoren, aus (Petrova et al., 1999)

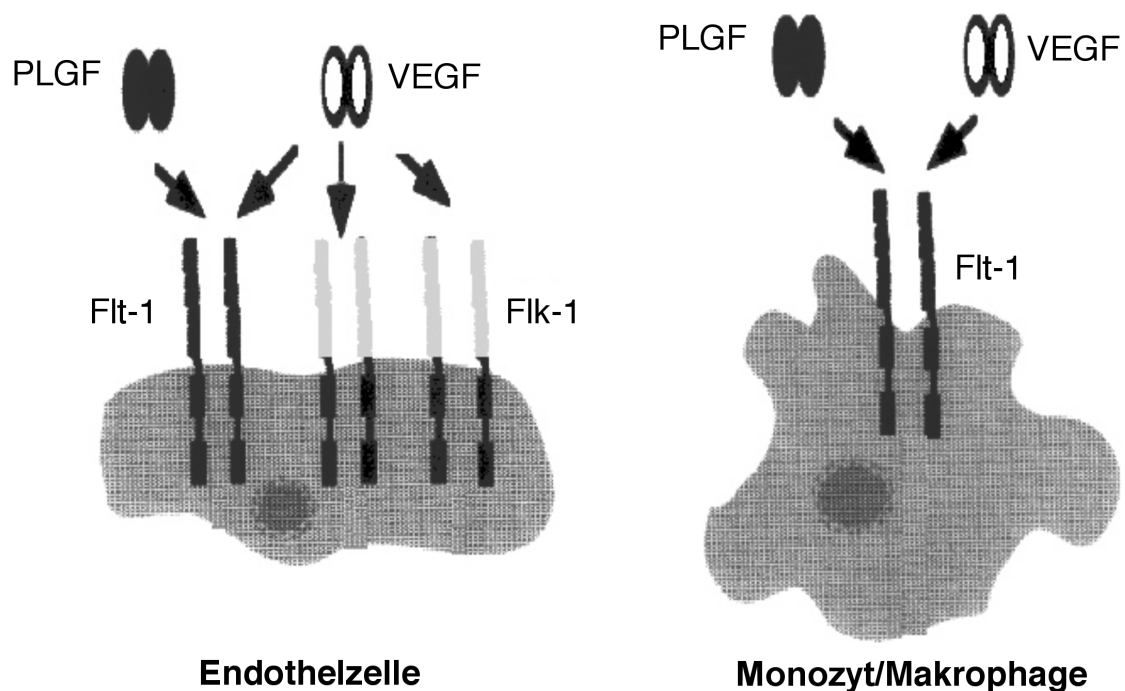
Die Rezeptoren der VEGFR Familie (Flt-1, Flt-4, Flk-1/KDR) bestehen aus

- **7 Ig-like Loops, extrazellulär** (die 2. Ig-like Domäne ist für die VEGF bzw. PLGF - Bindung verantwortlich)
- **2 gesplitteten intrazelluläre Tyrosinkinasedomänen** verbunden mit
- **kurzen AS-Sequenzen.** (Neufeld et al., 1999a)

Die Signaltransduktion von Klasse III Tyrosinkinase (Schlessinger and Ullrich, 1992):

- Dimerisation (evtl. Oligomerisation) der Rezeptoren durch die Ligandenbindung
- Autophosphorylierung der Tyrosinkinasedomänen
- Aktivierung der MAP-Kinasen-Kaskade, die im Zellkern Transkriptionsfaktoren initiieren

Im dritten Punkt unterscheiden sich die beiden Rezeptoren vermutlich erheblich. Während die Flk-1/KDR Kaskade zur Zeit schon recht gut erforscht ist (Takahashi and Shibuya, 1997), bleibt von der Flt-1-Kaskade noch vieles unbekannt (Clauss, 1998; Neufeld et al., 1999b). Es bleibt zu klären, über welche Zwischenschritte welche Faktoren produziert werden.



**Abb. IV. 4:** Bindungspräferenzen von Flt-1 und FLK-1 nach (Clauss, 1998):  
 VEGF bindet sowohl an Flt-1 als auch an Flk-1/KDR und Flt-4.  
 PLGF bindet nur an Flt-1, nicht aber an Flk-1/KDR oder Flt-4.  
 Monozyten präsentieren keine Flk-1 Rezeptoren, nur Flt-1.

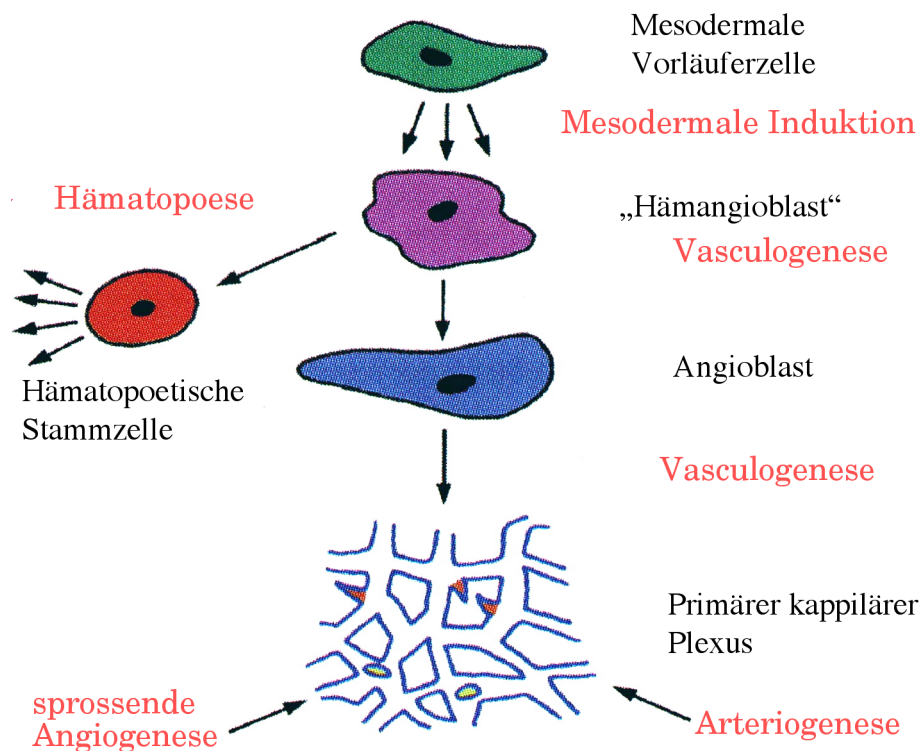
Einige Befunde über die Natur des Flt-1 sind schon bekannt. So hat VEGF eine zehnfach höhere Affinität zu Flt-1 als zu Flk-1/KDR (de Vries et al., 1992; Park et al., 1994; Waltenberger et al., 1994). Dennoch ist seine Kinaseaktivität in Endothelzellen zehnmal geringer als die von KDR (Waltenberger et al., 1994; Seetharam et al., 1995) PLGF/Flt-1 und stärker noch VEGF/Flt-1-Komplexe

vermitteln an Endothelzellen Proliferation, Chemotaxis und Vaskuläre Permeabilitätserhöhung (Park et al., 1994; Cao et al., 1996; Sawano et al., 1996; Ziche et al., 1997). Die VEGF (PLGF) induzierte Migration von humanen Monozyten wird durch Flt-1 vermittelt (Barleon et al., 1996).

Um mehr über die Funktion der Rezeptoren zu erfahren, wurden VEGFR Gen defiziente Mäuse untersucht:

Fong et al. entwickelten **Flt-1**  $-/-$  Mäuse (Fong et al., 1995). Diese zeigten schlecht ausgebildete Gefäße mit Endothelzelldisorganisation und einem teils zu starken, unkontrollierten Wachstum von Endothelzellen in das Gefäßlumen hinein. Die Tiere verstarben am 9. intraembryonalen Tag. In der Hämatopoiese wurden keine Unterschiede zur Entwicklung der Wildtypmäuse festgestellt. Man geht seitdem davon aus, dass Flt-1 Vermittlung für die Endothelzeldifferenzierung und/oder die Interaktionen zwischen Endothel und extrazellulärer Matrix nötig ist.

**Flk-1**  $-/-$  Mäuseembryos versterben am 8. intraembryonalen Tag und zeigen Vasculo- und Angiogeneseprobleme, außerdem Fehler in der Hämatopoiese. Es differenzieren sich signifikant weniger Endothelzellen aus als bei Wildtypmäusen (Shalaby et al., 1995). Flk-1/KDR Aktivität spielt spätestens auf der Hämangioblastenebene eine wichtige Rolle, wenn nicht sogar schon während der mesodermalen Induktion (Risau, 1997).



**Abb. IV.5:** Blutzellentwicklung nach (Risau, 1997)

Dass Flt-1 eine höhere VEGF-Bindung aber eine niedrigere Kinase-Aktivität hat als Flk-1/KDR, legt eine besondere Bedeutung der Bindungsregion des Flt-1 Rezeptors nahe. Deshalb entwickelten Hiratsuka et al. eine Methode, mit der sie die Bedeutung der Bindungsregion von Flt-1 ohne den Einfluss der Tyrosinkinasedomäne untersuchen konnten. Es ist ihnen gelungen, Mäuse mit Flt-1 Rezeptoren zu züchten, die keine Tyrosinkinasedomänen besitzen (Flt-1<sub>tk-/-</sub>) (Hiratsuka et al., 1998). Nun konnten sie die Rolle der extrazellulären Kinasebindungsregion während der Embryonalentwicklung (speziell der Vasculogenese) studieren. Erstaunlicherweise entwickelten diese Tiere vollkommen unauffällige, normale Gefäße. Auch sonst entwickelten sich die Flt-1-Tyrosinkinase defizienten Mäuse annähernd normal, waren sogar fruchtbar. Man kann aus diesen Ergebnissen schließen, dass ein Teil der Flt-1-Funktion bei der Gefäßentwicklung allein in der VEGF (PLGF)-*Bindung* liegt, im Abfangen von Überschüssigem "Reserve" VEGF (PLGF). Die Hämatopoiese verlief in diesen Mäusen ebenfalls normal. Ursprünglich wurde der Grund für die fehlerhafte Entwicklung der Endothelzellen während der Angiogenese bei Flt-1 -/-Mäusen in einer nicht ausgelösten Signalkaskade vermutet. Nun musste die Rolle von Flt-1 in der frühen Blut/Blutgefäßentwicklung anders betrachtet werden. Fong et al. haben dazu eine sehr interessante Entdeckung gemacht. Auch sie beobachteten die Embryogenese bei Flt-1 -/-Mäusen. Sie zeigten, dass ein Überschuss an Endothelvorläuferzellen (Angioblasten) zur vaskulären Disorganisation führt (Fong et al., 1999). Der Angioblastenüberschuss rührt überraschender Weise schon von Veränderungen während der mesodermalen Induktion her. Es werden auch verhältnismäßig (zu) viele Hämangioblasten und Angioblasten beobachtet. Außerdem ist eine erhöhte primäre Erythrozytenzahl aufgefallen. Kontrollversuche der Studie zeigten, dass Wildtypmäuse mit signifikant erhöhter Angioblastenzahl abnorme Gefäße formten und dass Flt-1 -/- Embryos nach Verringerung der Angioblastendichte normale Gefäße entwickelten. Diese Beobachtungen decken sich gut mit der VEGF (PLGF)-Abfangtheorie des Flt-1-Rezeptors- mit der Theorie der negativen Kontrolle.

Während Flk-1/KDR ein positiver Regulator für Gefäßentstehung ist, könnte die Flt-1-Bindungsregion als Abfänger von VEGF eine negative Kontrolle bei der Endothelzellproliferation übernehmen. Es existieren sogar frei lösliche Flt-1 Rezeptoren (ohne Tyrosinkinaseanteil), die wie PLGF bzw. VEGF Antikörper zu verstehen sind (Barleon et al., 1997).

Um normale Gefäßentwicklung zur erreichen, bedarf es jedenfalls keiner via Flt-1 ausgelösten intrazellulären Signalkaskade. Die entscheidende durch VEGF ausgelöste Kaskade scheint durch den Flk-1/KDR oder einen weiteren bislang unbekanntem Rezeptor ausgelöst zu werden.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass theoretisch doch auch in Flt-1<sub>tk-/-</sub> Mäusen eine Flt-1 Signalkaskadenaktivität mit wachstumshemmenden Impulsen in den Endothelzellen ausgelöst werden könnte und ein Gleichgewicht zur Flk-1/KDR Wachstumsaktivierung schaffen könnte. Nach der Deletion der Tyrosinkinase-region verbleibt nämlich intrazellulär ein Rumpf von 11 Aminosäuren, der eventuell dazu ausreicht, eine Kaskade auszulösen.

Da die Monozyten in der Arteriogenese eine so zentrale Rolle einnehmen, ist es für die Beurteilung des Einflusses von PLGF von Interesse, wie sich die Monozyten ohne Flt-1 Tyrosinkinase verhalten, da PLGF die Monozyten direkt ja nur via Flt-1 beeinflussen kann. Und tatsächlich beobachteten Hiratsuka et al. einen gerade für die hier diskutierte Arbeit relevanten Unterschied zu Wildtypmäusen in der Monozytenfunktion von Flt-1<sub>tk-/-</sub> Mäusen: Nach PLGF und auch nach VEGF-Stimulation ist in Flt-1<sub>tk-/-</sub> Mäusen keine Monozytenaktivierung, keine gesteigerte Chemotaxis und keine Beeinflussung der Tissuefactorproduktion zu sehen. Die Monozytenfunktion, die durch PLGF vermittelt wird, ist demnach ohne die Flt-1 Tyrosinkinase gestört.

Somit lässt sich eine zweifache Natur des VEGF/PLGF Rezeptors Flt-1 ausmachen:

- Zum einen fungiert er als **Abfänger und Neutralisierer von VEGF und PLGF** und dient somit der Regulation der VEGF (PLGF)-induzierten Flk-1/KDR-Tyrosinkinase-signal-kaskade. Wenn alle Flt-1 Rezeptoren mit VEGF (oder PLGF) besetzt sind, dann steht das übrige, freie VEGF allein den Flk-1/KDR's zur Verfügung, was zu einer stärkeren Endothelstimulation führen dürfte. Für eine strenge Regulierung der VEGF (PLGF)-induzierten Flk-1/KDR-Tyrosinkinase-signal-kaskade spricht auch die Existenz von frei löslichen Flt-1 Rezeptoren, die wie VEGF (PLGF)-Antikörper wirken (Barleon et al., 1997).
- Zum anderen scheint er als **Ausgangspunkt der inneren, Tyrosinkinase vermittelten, Signalkaskade** eine wichtige Bedeutung zu haben.

Nachgewiesen ist diese Bedeutung für die Monozyten, sie ist aber auch in anderen Zellen zu erwarten. Dabei ist unter anderem an zirkulierende (aus dem Knochenmark stammende) Zellen zu denken. Eine interessante Tatsache ist, dass gerade solche Zellen unter besonderem Einfluss von PLGF zu stehen scheinen.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass in jüngerer Zeit mit Neuropilin-1 ein weiterer PLGF-2 Rezeptor entdeckt worden ist, an den auch VEGF<sub>165</sub> bindet (Migdal et al., 1998). Bindungsentscheidend ist die Heparinbindungsstelle. Vom Charakter dieses Rezeptors und der Konsequenz der PLGF Bindung ist noch viel unbekannt. Er scheint mit den anderen VEGF Rezeptoren zu interagieren und er

könnte auch einen Einfluss auf das Blutgefäßwachstum haben: Embryos, denen das Neuropilin-1 Gen zerstört wurde zeigten Defizite in der Entwicklung des Nerven- und des Kardiovaskulären Systems (Kawasaki et al., 1999).

#### IV.3.7. Monozyten

Auffällig ist, dass die Arteriogenese relativ rasch nach Okklusion der Femoralarterie geschieht. Entscheidende Trigger könnten da die Monozyten liefern, die so zahlreich rekrutiert werden. Eine Rolle der Monozyten in der (damals noch nicht als solche benannten) Arteriogenese wurde schon 1976 vermutet, als eine Monozytenadhäsion an der Intima von wachsenden kardialen Kollateralen nachgewiesen werden konnte (Schaper, 1971). Die Monozytenansammlung und die damit korrelierende Zytokinproduktion erreicht in der Arteriogenese schon nach drei Tagen ihren Höhepunkt, während der Gipfel der Monozytenaktion in der Angiogenese erst nach sieben Tagen erreicht ist (Scholz et al., 2000). Der Monozyteneinfluss auf die Arteriogenese wird vor allem in den ersten Tagen bedeutend sein. Es ist eine bemerkenswerte Parallele, dass gerade in den ersten Tagen die Arteriogenese in PLGF  $-/-$  Tieren gestört ist. Im Kaninchenhinterlaufmodell hat eine MCP-1 Infusion die periphere und die kollaterale Durchblutung erhöht (Ito et al., 1997). Andere zeigten zuvor, dass *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (das bekanntlich Monozyten anlockt) bei erhöhter Schubspannung an humanen Endothelzellen verstärkt exprimiert wird (Wung et al., 1996). Es lässt sich daraus folgern, dass die rekrutierten Monozyten sowohl in der Arteriogenese als auch in der Angiogenese zentrale Funktionen übernehmen.

Auch im Mäusehinterlaufmodell sind Monozyten zu beobachten, die sich an die „gestressten“ Endothelzellen heften, transmigrieren und Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren, mit denen sie weitere Monozyten und wohlmöglich auch andere aus dem Knochenmark stammende Zellen anlocken. Aus dieser Studie geht hervor, dass zirkulierende Zellen den PLGF produzieren. Da Monozyten PLGF produzieren, könnte PLGF dort selber, vermittelt über die Flt1- Signalkaskade, eine Amplifikation von PLGF verursachen. Monozyten sind die Hauptquelle von TNF $\alpha$  und FGF-2 während der Arteriogenese. Vielleicht produzieren sie während der Arteriogenese auch VEGF. Die Normalisierung des Kollaterallwachstums in PLGF  $-/-$  Mäusen nach  $+/+$  Knochenmarktransplantation ist ein Hinweis darauf, dass die Monozyten während der Arteriogenese auch für PLGF als Quelle in Frage kommen. Aber auch Mastzellen oder Endothelzellprogenitorzellen kommen als seine Quelle in Betracht. PLGF muss die Arteriogenese nicht (bzw. nicht *nur*)



direkt an Endothelzellen und am glatten Muskel beeinflussen, sondern vielleicht auch indirekt über die Stimulation der für die Arteriogenese so entscheidenden Monozyten.

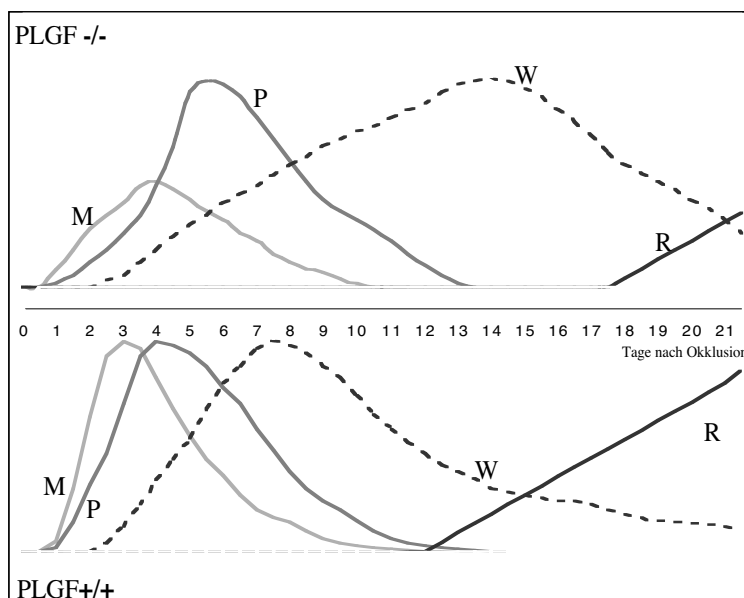
Monozyten verfügen nicht über Flk-1, wohl aber über Flt-1 Rezeptoren. Dort stimuliert PLGF diese Zellen über die noch recht unbekannt intrazelluläre Signalkaskade, was aus zwei Versuchsreihen hervorgeht: Erstens einer Studie von Clauss et al. über die Funktion von Monozyten im allgemeinen und in der Arteriogenese im besonderen. Bei ihr wird gezeigt, dass genetisch nicht manipulierte Monozyten mit natürlichen (kompletten) Flt-1 Rezeptoren (Flt-1<sub>TK+/+</sub>) auf VEGF und PLGF Gabe hin aktiviert werden und sich deren Chemotaxis und Gewebefaktoren-Produktion erhöht. Zweitens sei nochmal auf die Flt-1<sub>TK-/-</sub> Versuche verwiesen (Hiratsuka et al., 1998), bei denen sowohl nach VEGF als auch nach PLGF Stimulation ohne Tyrosinkinase keine Monozytenaktivierung, keine gesteigerte Chemotaxis oder Gewebefaktorenproduktion festzustellen ist (s. IV.3.6).

Schon 1996 äußerten Clauss et al. den Verdacht, dass dem Flt-1 selektiven PLGF eine besondere Bedeutung in der Beeinflussung der Monozytenfunktion zukommt (Clauss et al., 1996). Auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit legen diesen Schluss nah. Die fehlende Monozytenstimulation (und eine daraus resultierende mangelhafte Monozytenfunktion) könnten für die Arteriogenesedefizite in der PLGF -/- Maus verantwortlich sein.

Arras et al. untersuchten für die Arteriogenese und die Angiogenese den Zusammenhang von Monozytenansammlung und deren Zytokinproduktion (FGF-2; TNF $\alpha$ ), sowie der Gefäßausbildung (Arras et al., 1998). Sie arbeiteten an einem dem Mäusehinterlaufmodell ähnlichen Kanninchenhinterlaufmodell. Ihre Studie zeigt sowohl funktionell als auch histologisch den Einfluss der Monozyten auf die Arteriogenese. Zentrale Ergebnisse: TNF $\alpha$  und FGF-2 monozytärer Genese sind während der Arteriogenese stark aufreguliert. Durch LPS-Stimulation erreichten sie besonders große Monozytenrekrutierung und -aktivierung, wodurch sich der Einfluss der Monozyten auf die Arteriogenese vergrößerte. Schon vor langer Zeit wurde die TNF $\alpha$  Produktion von Monozyten untersucht und TNF $\alpha$  als ein Hauptmediator von Entzündungsreaktionen erkannt (Frater-Schroder et al., 1987). Unspezifische Entzündungsreaktionen als Initiator der Monozytenaggregation sind bei unserem Arteriogenesemodell aber auszuschliessen, da sich die Operationsstelle abseits der wachsenden Kollateralen befindet - ebenso wie die Hypoxie ausscheidet, da sich die Gewebsabschnitte, die ischämisch werden können, im Bereich des unteren Beines und der Pfote befinden und nicht im Oberschenkel, dem Ort der Arteriogenese. Das Gewebe um die Kollateralen herum ist zu keinem

Zeitpunkt hypoxisch. Die Rolle von TNF für die Arteriogenese ist aber umstritten. Während TNF $\alpha$  aus spezifisch angelockten Monozyten die Arteriogenese und Angiogenese stimuliert (Lupia et al., 1996) und in TNF $\alpha$  k. o. Mäusen die Erholung der Durchblutung nach Femoralarterienokklusion verlangsamt war (Helisch et al., nicht publiziert), konnte in TNF $\alpha\beta$ , TNF Rezeptor 1 und TNF Rezeptor 2 -/- Mäusen nach Femoralarterien-okklusion keine verlangsamte Erholung der Durchblutung festgestellt werden (auch Helisch et al, nicht publiziert).

Monozyten können als zentrale Vermittler in der Arteriogenese auch Brücken zu solchen Beobachtungen anderer bauen, die sich mit meinen Ergebnissen auf den ersten Blick schlecht vereinbaren lassen: Dass in den Untersuchungen von Deindl et al. keine Aufregulation von VEGF-Genen und seinen Flt-1 Rezeptoren im Gewebe der Kollateralen gefunden wird (Deindl, 2000), spricht nicht generell gegen einen positiven Einfluss von VEGF und PLGF auf die Arteriogenese: PLGF entsteht in zirkulierenden Zellen und wird wirksam über Flt-1 Rezeptoren auf Monozyten. Dabei muss die VEGF Produktion in Endothelzellen und glatten Muskelzellen nicht heraufreguliert sein, ebensowenig wie die dortigen VEGF Rezeptoren. PLGF und VEGF üben ihren positiven Einfluss auf die Arteriogenese vielleicht gar nicht an Endothel- und an glatten Muskelzellen aus. Während PLGF und VEGF an diesen Zellen lediglich von den extrazellulären Domänen des Flt-1 abgefangen werden könnte, stimuliert er vielleicht über andere Schienen wie zum Beispiel der Induktion von TNF $\alpha$ , FGF-2 in Monozyten (allgemeiner: über deren Aktivierung) die Arteriogenese.

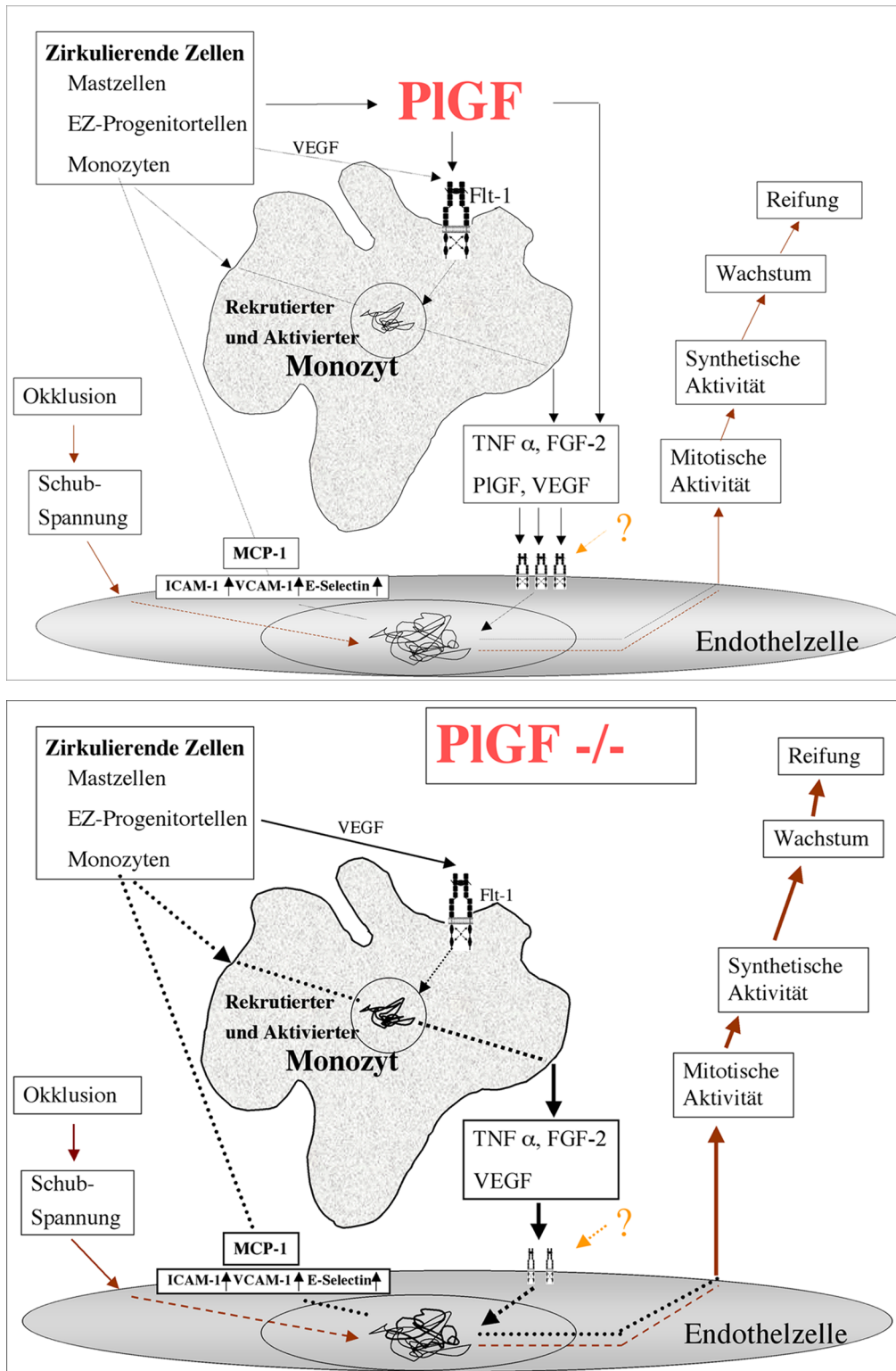


**Abb.IV.6:** Der „lange Weg“ im PLGF -/- Tier (oben):

Weniger Monozyten werden rekrutiert, welche die für die Arteriogenese essentiellen Mediatoren langsamer produzieren – ihre Aktivierung ist geringer. Die einzelnen Phasen der Arteriogenese verlaufen daher langsamer als im PLGF +/+ Tier (unten):

(M) rekrutierte und aktivierte Monozyten; (P) Proliferationsphase; (W) Wachstumsphase; (R) Reifungsphase

(M) rekrutierte und aktivierte Monozyten; (P) Proliferationsphase; (W) Wachstumsphase; (R) Reifungsphase



**Abb.IV.7:** Die zentrale Rolle der Monozyten in der Arteriogenese  
 Obere Abbildung: PIGF stimuliert im Wildtyp und im knochenmarktransplantierten Tier die Monozyten und potenziert ihr Zytokin- und Wachstumsfaktorproduktion, was schnelleres Kollateralwachstum zur Folge hat  
 Untere Abbildung: Im PIGF -/- Tier fehlt diese Stimulation- „der Weg“ von der Endothelaktivierung durch Schubspannung zur Reifung ist länger

## IV.4. Diskussion einzelner Methoden und Ergebnisse

### IV.4.1. Modell

Frühere Studien zeigten, dass es - mit einigen Vorbehalten - grundsätzlich legitim ist, Arteriogenese als einen ubiquitären Mechanismus zu verstehen und am Tierhinterlauf gewonnene Erkenntnisse mit Vorgängen im menschlichen Myokard zu vergleichen (s.o.). Vorteilhaft ist beim Mäusehinterlaufmodell, dass die Femoralarterie ohne folgende Gewebsinfarzierung okkludiert werden kann. Die Durchblutung über die präexistierenden Kollateralen ist für das Überleben der Pfote ausreichend, daher wurden bei korrekter Operation keine Nekrosen festgestellt. Wegen des höheren Sauerstoffbedarfs im Myokard ist solch ein Eingriff im Herzen ohne Infarkt nicht möglich. Das Modell an der Maus hat den weiteren Vorteil, dass man im Vergleich zu größeren Tieren mit geringen Mengen an Wachstumsfaktoren auskommt. (Im Folgeprojekt dieser Arbeit zum Beispiel wird PLGF appliziert). Man kann bei der Maus gezielt gendefiziente Tiere züchten und an denen die Auswirkungen des Fehlens einzelner Genprodukte studieren. Außerdem ist es möglich, mit einer Reihe physiologischer Methoden die Durchblutung im Mäusehinterlauf zu studieren (Laser Doppler Imager, Thermographie, Sauerstoffsättigungsmessung). In anderen Modellen hat das von Kollateralen versorgte Gebiet ein zu großes Volumen und ist zu tief, als dass es durchgängig Laserstrahlen zugänglich sei und seine Durchblutung mit dem Laser Doppler Imager beurteilt werden könne. Nützlich beim Hinterlaufmodell ist, im Gegensatz zu Modellen in anderen Organen, dass Arteriogenese und Angiogenese in definierten Gebieten, räumlich getrennt, auftreten. Das ermöglicht zum einen die abgegrenzte Betrachtung beider Phänomene, zum anderen aber auch die Beobachtung eventueller gegenseitig beeinflussender Aspekte.

Zur Knochenmarktransplantation: Es muss der Möglichkeit nachgegangen werden, dass eine Knochenmarktransplantation als solches die Arteriogenese beeinflusst. Die Knochenmarkstammzellen der PLGF<sup>-/-</sup> Mäuse sind durch die mehrfach letale Strahlendosis völlig zerstört. Eine die Arteriogenese möglicherweise beeinflussende Aufregulation diverser Zytokine und Mediatoren, wie Heil et al. es kürzlich nach Suppression zirkulierender Zellen durch 5-Fluorouracil beobachteten (Heil and etal., 2000), ist also zumindest für das eigene (PLGF<sup>-/-</sup>) Knochenmark ausgeschlossen. Befürchtungen, dass Irritationen des PLGF<sup>+/+</sup> Spenderknochenmarkes arteriogen relevant sein könnten, welche durch die Entnahmeprozedur aus dem Spendertier oder durch Immunreaktionen im Empfängertier denkbar sind, trägt die lange Erholungszeit nach Bestrahlung und Spende (sechs Wochen) vor der

Ligatur Rechnung. Diese Zeit muss auch aus einem anderen Grund, nämlich für die Erholung der Blutzellzahl, eingehalten werden.

#### **IV.4.2. Angiographien**

In den Angiographien fällt die korkenzieherartige Struktur der gewachsenen Kollateralarteriolen auf, die man bei den präexistierenden Gefäßen nicht beobachtet. Der Grund solcher hämodynamisch ungünstigen Struktur ist möglicherweise auf lokale Schubspannungserhöhungen durch verstärkte laminare Strömung zurückzuführen. Eine erhöhte turbulente Strömung vergrößert die Schubspannung zwar noch mehr und aktiviert das Endothel stärker als eine erhöhte laminare Strömung (Nagel et al., 1999). Es kann aber in den kleinen Kollateralen nur von Turbulenzen ausgegangen werden, da diese nur in großen Arterien großer Säuger entstehen können; nur dort erreicht die Reynold'sche Zahl entsprechende Werte. In der Angiogenese ist der Auslöser und die richtungsweisende Variable die Hypoxie. In der Arteriogenese ist die richtungsweisende Kraft die erhöhte Schubspannung. Es gilt: Je höher die Schubspannung, desto größer die gewachsene Kollaterale.

Diese gewundene Form der Gefäße entsteht vielleicht dadurch, dass die Gefäße nicht nur in die Breite, sondern auch in die Länge wachsen. Ursprünglich, in der Embryogenese wächst das Gefäß ja auch in die Breite *und* in die Länge.

#### **IV.4.3. Morphometrie**

Die in der Übersichtsangiographie gemachten Beobachtungen werden durch die morphometrischen Untersuchungen bestätigt und quantifiziert, da der absolute Durchmesser der Kollateralen unter standardisierten Bedingungen ermittelt wird. Durch die Möglichkeit der Quantifizierung des Gefäßwachstums kann man bei der Morphometrie vom derzeitigen „Goldstandard“ in der Arteriogeneseforschung sprechen. Aus diesem Grund wird das sehr aufwendige Verfahren (Kontrastmittelgabe unter konstantem Druck, Fixierung, Kollateralentnahme, Epon-einbettung, Schneiden, Färben, Fotografieren, Ausmessen) stets durchgeführt.

In dieser Studie wird ausschließlich der Durchmesser der Kollateralen ermittelt.

In früheren Studien wurde zusätzlich auch die Wanddicke und ihre Fläche im Querschnitt gemessen (Scholz et al., 2000, Scholz, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass es sich beim Kollateralwachstum nicht um ein reines Dehnen des Gefäßes

handelt, wobei sich die Wanddicke verringern und die Wandfläche im Querschnitt gleich bleiben müsste, sondern um ein echtes Gefäßwachstum.

Bei den Ergebnissen der Morphometrie sei vor allem auf die Tatsache hingewiesen, dass die PLGF +/+ Maus ihren Arteriogenesevorsprung gegenüber der PLGF -/- Maus in den ersten Tagen herausholt (vergleiche Abb. III.14.), in denen auch der Einfluss der Monozyten am stärksten ist (Scholz et al., 2000).

#### **IV.4.4. Die wenig invasiven Methoden im Vergleich**

Alle Messungen wurden in der doppelwandigen Thermobox durchgeführt. Um maximale Vasodilatation zu erreichen, wurde die Kammertemperatur auf 37°C eingestellt.

**Laser Doppler Imaging** wurde erfolgreich eingesetzt, um die Wiederherstellung des Blutflusses in der Mäusepfote nach der Ligatur der Femoralarterie zu studieren und zu dokumentieren. Im Vergleich mit anderen Studien (Couffinhal et al., 1998; Kalka et al., 2000) wurde hier eine niedrigere Durchblutungsdiskrepanz zwischen der rechten und der linken Hinterpfote ermittelt. Das liegt wohl daran, dass die hier bis auf die Okklusion intakte Femoralarterie mehr Dilatationskapazitäten aufweist als eine über weite Strecken exzisierte Femoralarterie (andere Studien). Die Durchblutung der okkludierten Pfote erholt sich nach ein bis drei Wochen, erreicht aber nie gänzlich die Werte, die mit intakter Femoralarterie erreicht wurden. Die Wiederherstellung der Durchblutung geschieht im Wildtyp wesentlich schneller als in der PLGF -/- Maus. Diese Beobachtung korreliert gut mit der jeweiligen Wachstumsgeschwindigkeit der Kollateralen (Morphometrie), also mit den verschiedenen Tempi der Arteriogenese.

Die **Hämoglobin-Sauerstoffsättigung** erholte sich unerwartet schnell im Vergleich zum Blutfluss. Diese Diskrepanz lässt sich vielleicht mit einem gedrosselten Gewebismetabolismus erklären, der weniger Energie verbraucht und folglich auch weniger Sauerstoff. Die Mechanismen einer solchen Drosselung müssen noch ergründet werden. Hierbei handelt es sich um eine scheinbar folgenlose Reduzierung des Umsatzes (ohne Ischämie- oder gar Nekrosezeichen) im Gewebe. Sie ist aber voraussichtlich nur unter absoluter Schonung und Reduzierung auf wesentliche Strukturerhaltungsumsätze möglich. Die Ausübung einer Organfunktion wird erschwert. Skelettmuskulatur (zB einer Mäusehinterextremität) braucht nicht permanent zu arbeiten. Die Reduzierung der Herzmuskelarbeit ist aber nur in sehr engen Grenzen mit dem Überleben des Gesamtorganismus zu vereinbaren. Für den Herzmuskel ist ein Phänomen

beschrieben worden, das ebenfalls von einer vorübergehenden Einsparung der Energie für die Funktion berichtet. Ein kleiner Anteil des Herzmuskels, auf den für die Pumpfunktion vorübergehend bei Schonung des Gesamtorganismus verzichtet werden kann, wird zum „Hibernating Myocardium“ (zu deutsch: Überwinterndes Herzmuskelgewebe“) (Schaper, 1991; Elsässer and Schaper, 1995): Statt effektiv und synchron zu kontrahieren, beschränkt sich ein Myokardabschnitt während (und noch eine Weile nach) einer Ischämiephase auf schwache, unvollständige Kontraktionen. Das Myokard beschränkt sich auf Strukturhaltung.

Im PLGF -/- Tier ist die HbSS länger gedrosselt als in der Wildtypmaus. Aufgrund der länger andauernden gefäßbedingt schlechten Blutzufuhr ist ein großzügigerer Energieverbrauch ebenfalls länger unmöglich. Ob PLGF oder andere Wachstumsfaktoren in den Energieumsatz mittelbar eingreifen, gilt es noch zu klären. Dass VEGF unter ischämischen Bedingungen vermehrt produziert wird, ist bekannt (Shweiki et al., 1992; Sharma et al., 1992), ebenso dass er über seine proangiogenen Eigenschaften mittelfristig eine bessere Gewebsdurchblutung unterstützt. Ob er aber mittelbar die Ischämie abschwächt, ist unklar.

In perikollateralen Skelettmuskeln haben Deindl et al. (Deindl, 2000) während der Arteriogenese keine direkten Zeichen der Ischämie festgestellt. Die oben postulierte Drosselung des Gewebemetabolismus in der Pfote (ohne Ischämie) ist aber prinzipiell auch in höheren Abschnitten der Extremität (auch im Muskelbett der Mäusekollateralen) denkbar und durch die Untersuchungen Deindls nicht ausgeschlossen.

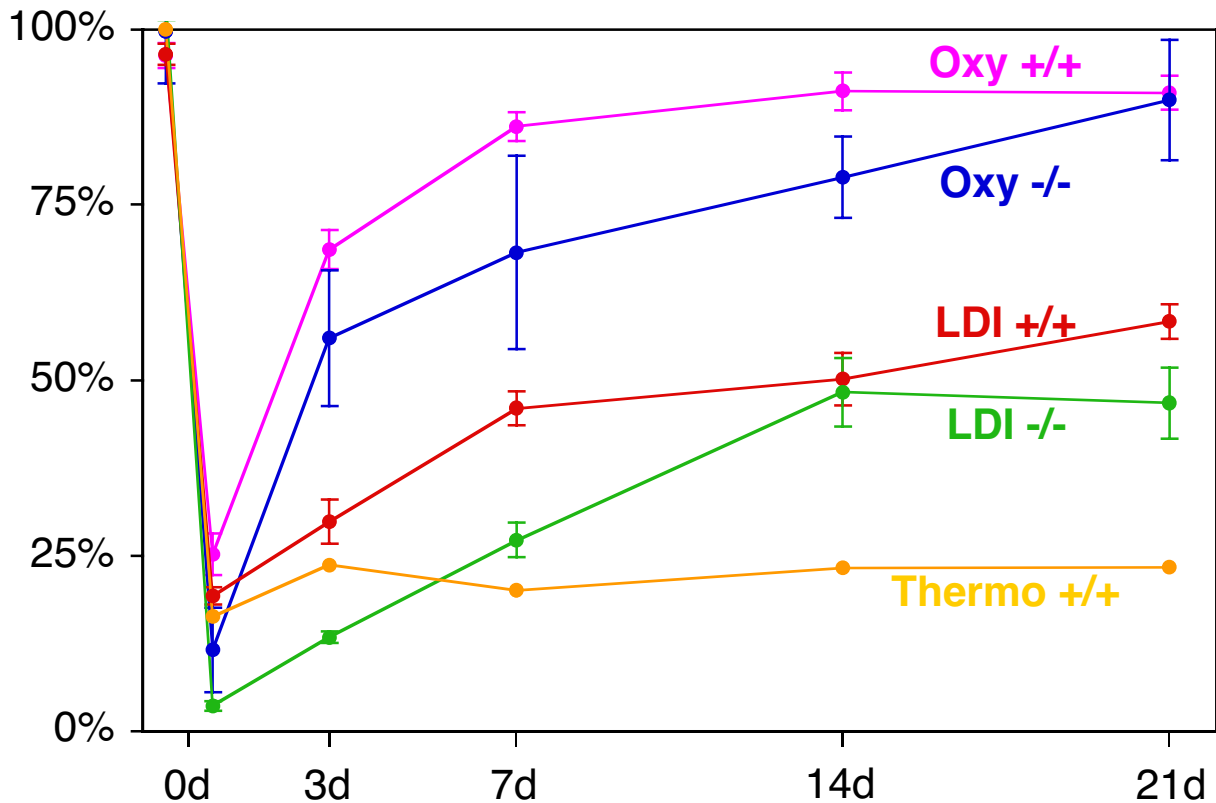
Die Wiederherstellung der Durchblutung im femoralokkludierten Hinterlauf reichte nicht aus, um die periphere Thermoregulation wieder herzustellen. Die Bedeutung der Thermoregulation in den Extremitäten sollte aber nicht unterschätzt werden, da die Maus als sehr kleines Tier mit großem Körperoberfläche/Volumen Verhältnis den klimatischen Bedingungen ausgelieferter ist als ein großes Tier mit verhältnismässig kleinem Körperoberfläche/Volumen Verhältnis. Es sei noch einmal darauf hingewiesen, dass als Besonderheit bei der Infrarot-Thermographie nur beinahe der gesamte Mäusekörper auf 37°C erwärmt wurde. Die Pfoten wurden in eine auf 25°C temperierte Kammer gehalten. Dieser Unterschied zur LDI und HbSS Messung musste erfolgen, da wenn die ganze Maus - und somit auch ihr Blut - auf 37°C erwärmt wird, in einer 37°C Kammer mit der Infrarotkamera keine Durchblutungsveränderungen festgestellt werden können. Als Beweis, dass die Durchblutung in der Pfote durch die lokale Temperatursenkung nicht beeinflusst ist, wurde eine Extramesserie mit dem LDI unter Thermographiebedingungen

(37°C Körper, 25°C Pfoten) durchgeführt (siehe Abb. III.4.). Ein signifikanter Unterschied in der Pfortendurchblutung konnte zwischen 37°C Pfoten und 25°C Pfoten ausgeschlossen werden. Sofort nach der Okklusion fiel die Temperatur der rechten Pfote auf Werte, die nur knapp über der Kammertemperatur lagen.

Auch 6 Monate nach der Operation, als man sicher davon ausgehen konnte, dass sämtliche Adaptationsprozesse an die Erfordernisse nach der Femoralokklusion, explizit die Arteriogenese, abgeschlossen sein durften, war die Pfote der okkludierten Seite unter den gegebenen Bedingungen (Körper 37°C, Pfoten 25°C) noch immer kaum wärmer als die 25°C der die Pfote umgebende Kammer. Es ist möglich, dass selbst eine um die 80 prozentige Kompensation der Blutzufuhr noch unter der Mindestfordernisschwelle für die Aufwärmung der Pfote liegt. Unsere Versuche mit einem Phantomwärmeaustauscher (nicht gezeigt) unterstützen diese These: In der auf 25°C temperierten Thermomesskammer wurde, mit verschiedenen Geschwindigkeiten Wasser bzw. heparinisiertes Blut, welches zuvor auf 37°C erwärmt wurde, durch ein langes, auf ein Stäbchen gewickeltes, extrem kleinlumiges, Kunststoffkabel gepumpt. Das Ergebnis dieser Untersuchung war eine (zumindest für dieses Phantom) spezifische Blutfluss/Temperatur-Kurve. Auffällig war an dieser, dass in der Kurve von niedrigem bis hin zu recht hohem Blutfluss die Temperatur konstant nicht weit über der Kammertemperatur blieb. Erst ab einem bestimmten, ziemlich hohen Blutfluss, stieg die Temperatur auf einmal recht rasch an und erreichte Werte von 33 bis 34°C.

Wache Mäuse haben eine Pfortentemperatur von 26-28°C und zwar auf beiden, der gesunden und der kranken Seite. Erst bei der Erwärmung der anästhesierten Maus auf 37°C treten Unterschiede zwischen gesunder und kranker Pfote zu Tage. Während in der gesunden Seite eine maximale Vasodilatation, einhergehend mit Pfortentemperaturen von 32-34°C hervorgerufen werden kann, hat der femoralokkludierte Hinterlauf geringere Dilatationskapazitäten und kann schon daher keine Thermoregulation durchführen. Es zeigt sich, dass Differenzen im kollateralen Blutfluss erst bei maximaler Dilatation sichtbar werden. Der Widerstand aller Kollateralen zusammen und der des folgenden Versorgungsgebietes sind in Serie geschaltet. Statt wie im gesunden Bein, wo sich ein nur geringer Widerstand vor das Versorgungsgebiet (der A. femoralis) stellt, ergibt sich durch die vielen schmalen und langen Kollateralen ein neuer, nicht zu vernachlässigender Widerstand. Ein weiterer Grund für die bleibend niedrige Temperatur in der femoralokkludierten Pfote ist der, dass die Arteriolen von eng anliegenden Venolen begleitet sind, die teils durch die Wände hindurch und teils über Diffusionsschunts eine Abkühlung des arteriellen Blutes bewirken, bevor es die Pfote erreicht.





**Abb. VI.8:** Rechts/Links Verhältnis: Oxygenierung, Durchblutung (LDI) und Thermoregulation der Pfoten (+/+ Wildtyp; -/- PLGF -/-)

Es wird durch diese Erkenntnisse leider offensichtlich, dass die Thermographie nicht dazu geeignet ist, die Arteriogenese unter den Bedingungen verschiedener Gendefizienzen zu studieren. Denn wenn schon im Wildtyp nach vollendeter Arteriogenese kein Temperaturanstieg der Pfote der operierten Seite, geschweige denn ein Angleich an die nicht operierte Seite zu sehen ist, dann wird im Arteriogenese reduzierten Tier erst recht kein Temperaturanstieg zu sehen sein. Thermographien der PLGF -/- Gruppen haben auch diese Schlussfolgerung bestätigt. Eventuell wäre die Infrarot-Thermographie beim Studium proarteriogener Faktoren ein probates Mittel zur Verlaufskontrolle, wahrscheinlich ist die aber Thermoregulation postoperativ insuffizient.

## IV.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

### IV.5.1. PLGF

Der Nachweis der Beeinflussung der Arteriogenese durch PLGF ist erbracht. Zum ersten mal konnte experimentell gezeigt werden, dass ohne PLGF die übliche Wachstumsgeschwindigkeit von Kollateralen nach akutem Verschluss der

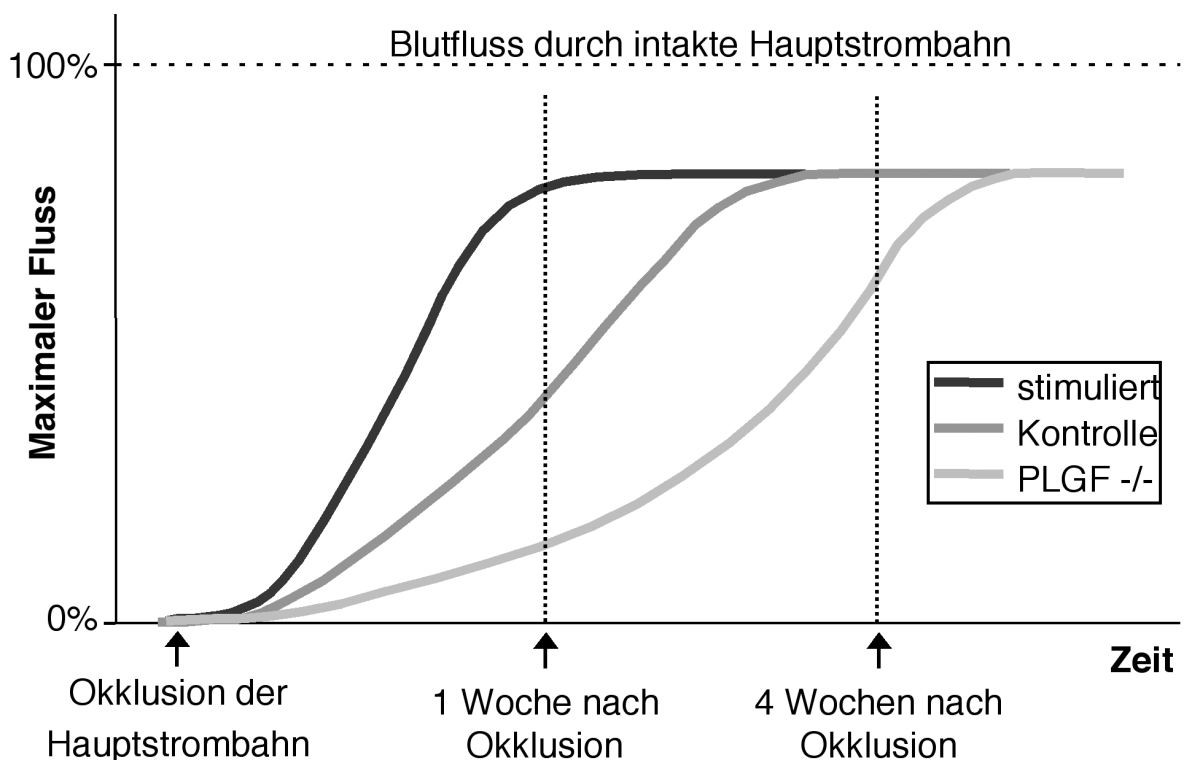
Hauptstrombahn nicht erreicht wird. Dementsprechend erholt sich auch die Durchblutung des nachgeschalteten Gewebes nicht so schnell wie mit PLGF. Nach einem Zeitraum von zwei bis drei Wochen haben die PLGF<sup>-/-</sup> Mäuse die Defizite weitestgehend aufgeholt. Dass die signifikante Störung und Verzögerung der Arteriogenese im PLGF<sup>-/-</sup> Tier schon allein durch Knochenmarktransplantation wieder aufgehoben wird, spricht für die große Bedeutung der im Blut zirkulierenden Zellen in diesem Zusammenhang. Dort befindet sich zum einen die Quelle des für die Arteriogenese relevanten PLGF's und zum anderen mit den Monozyten möglicherweise auch dessen zentraler Angriffspunkt.

PLGF stimuliert die Monozyten. Bei der Stimulation ist besonders an die Aufregulation der Produktion von TNF $\alpha$ , FGF-2 und auch an VEGF und PLGF selber zu denken. Das alles ist für die rasche Abfolge der Ereignisse bei der Arteriogenese essentiell. Die Interaktion zwischen den Monozyten, Endothelzellen (und auch glatten Muskelzellen und Fibroblasten ?) ist in PLGF<sup>-/-</sup> Tieren gestört. PLGF beschleunigt in den Monozyten die Produktion wichtiger Zytokine und Wachstumshormone, die diese ohne Stimulation nur langsamer zu produzieren vermögen. In den PLGF<sup>-/-</sup> Tieren fehlen für die Eigenrekrutierung wichtige Impulse.

Diese Arbeit zeigt Unterschiede zwischen dem selektiven Flt-1-Liganden PLGF und VEGF auf. Während es in der VEGF abhängigen Embryonalentwicklung mehr auf die Abfangfunktion der extrazellulären Domänen von Flt-1 auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen ankommt (siehe auch IV.3.6.), spielt bei postembryonaler Gefäßformierung wie der Arteriogenese der komplette Flt-1 Rezeptor auf den Monozyten und die dort ausgelöste Signalkaskade die wichtigere Rolle und mit ihm wird auch sein selektiver Ligand wichtiger. Die untergeordnete Rolle des PLGF in der Embryonalentwicklung ist möglicherweise auf den dort geringen Einfluss von Monozyten zurückzuführen. VEGF ist essentiell für die Embryonalentwicklung. Angenommen VEGF spielt in der Arteriogenese tatsächlich wie an mancher Stelle behauptet eine untergeordnete Rolle, dann haben die beiden strukturell so ähnlichen Wachstumsfaktoren in der Blutgefäßformierung eine strenge Aufgabenteilung.

Es könnte aber noch ein ganz anderer Aspekt hinzukommen: Auch die Blockade der Bindungsregion zellständiger Flt-1 Rezeptoren für VEGF durch PLGF, sowie die Blockade von freien im Blut befindlichen Flt-1 Rezeptoren („VEGF- Abfänger“, die ausgebaut sind wie die extrazellulären Domänen von wandständigem Flt-1) durch PLGF, könnte für die Arteriogenese essentiell sein. Es ständen dann für Flk-1 relativ mehr Liganden (VEGF- Homodimeren, VEGF/PLGF Heterodimeren)

zur Verfügung, ohne dass eine absolute Aufregulation der Faktorenproduktion stattfinden müsste. So wäre es möglich, dass VEGF verdeckt die Arteriogenese beeinflusst. Auch Flk-1 müsste unter diesem Gesichtspunkt nicht absolut messbar aufreguliert werden. Während die absolute Aufregulation von VEGF oder Flk-1 Rezeptoren ohne ischämische Bedingungen vielleicht nicht möglich ist, so ist es aber die relative, über den Umweg der Blockade von PLGF. Dass PLGF die relative VEGF Konzentration an den Flk-1 Rezeptoren erhöht, ist gewiss. Dass eine erhöhte Flk-1 Stimulation arteriogeneserelevant ist, müsste noch bewiesen werden. Man sollte den Einfluss von VEGF auf die Arteriogenese in PLGF<sup>-/-</sup> Tieren prüfen. Vielleicht könnte man in diesen Versuchen den VEGF Einfluss in der Arteriogenese demaskieren.



**Abb. IV.9:** Einfluss von PLGF auf die Arteriogenese (Hypothese): PLGF Applikation (Stimulierung) führt zur Beschleunigung und nicht zum absoluten Größenzuwachs

Wie könnte es weitergehen mit der PLGF Forschung? Nach den Negativversuchen mit Ausschaltung des PLGF Genes und Rettungsversuchen dieser Tiere stehen Positivversuche an, mit denen der Einfluss einer übernatürlich hohen Dosis von PLGF auf die Arteriogenese geprüft wird. Zu diesem Zweck werden in unserem Institut genetisch nicht manipulierten Mäusen Minipumpen, gefüllt mit PLGF, in die ligierte Femoralarterie implantiert, mit dem Zweck, PLGF möglichst lokal zum Ort des Geschehens, zu den Kollateralen, zu bringen. Es ist zu vermuten, dass mit einer solchen Menge an PLGF auch „nur“ die Arteriogenesegeschwindigkeit, nicht

aber das definitive Ausmaß des Kollateralwachstums beeinträchtigt wird. Erstrebenswerter wäre, wenn die Unterbrechung der Hauptstrombahn im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe zu größeren Gefäßen führte.

Auch interessant wären Versuche mit ausschließlicher Wildtyp Monozytengabegabe an Tiere mit PLGF -/- Genotyp. Solche Versuche könnten neue Ansatzpunkte zum Verständnis und zum Wesen der essentiellen Monozytenfunktion in der Arteriogenese liefern.

#### IV.5.2. Zukunft des Modells

Da die Durchblutung der Pfote der femoralokkludierten Seite die Werte der gesunden Seite nicht erreicht, ist erstens zu klären, inwieweit die Kollateralen die Durchblutung über die Hauptstrombahn, in diesem Fall über die Femoralarterie, zu kompensieren im Stande sind. Scholz et al konnten in diesem Zusammenhang nachweisen (Scholz et al., 2002), dass in unterschiedlichen, genetisch nicht veränderten, Mäusestämmen, die Kollateralen verschieden stark wachsen und somit auch die Durchblutung der Femoralarterie unterschiedlich kompensieren können. Zweitens ist zu klären, ab welcher Größe sie in der Lage wären, die volle Funktion der Hauptstrombahn zu übernehmen. Um den Antworten näher zu kommen ziehe ich das Hagen-Poiseuille-Gesetz heran. Es beschreibt die Beziehung zwischen der Stromstärke (I) und den sie bestimmenden Parametern für laminare (1) und stationäre (2) Strömungen (1: alle Flüssigkeitsteilchen bewegen sich parallel zur Rohrachse; 2: zeitlich konstant) in starren Röhren und ist somit für Blut in Blutgefäßen nur eingeschränkt gültig:

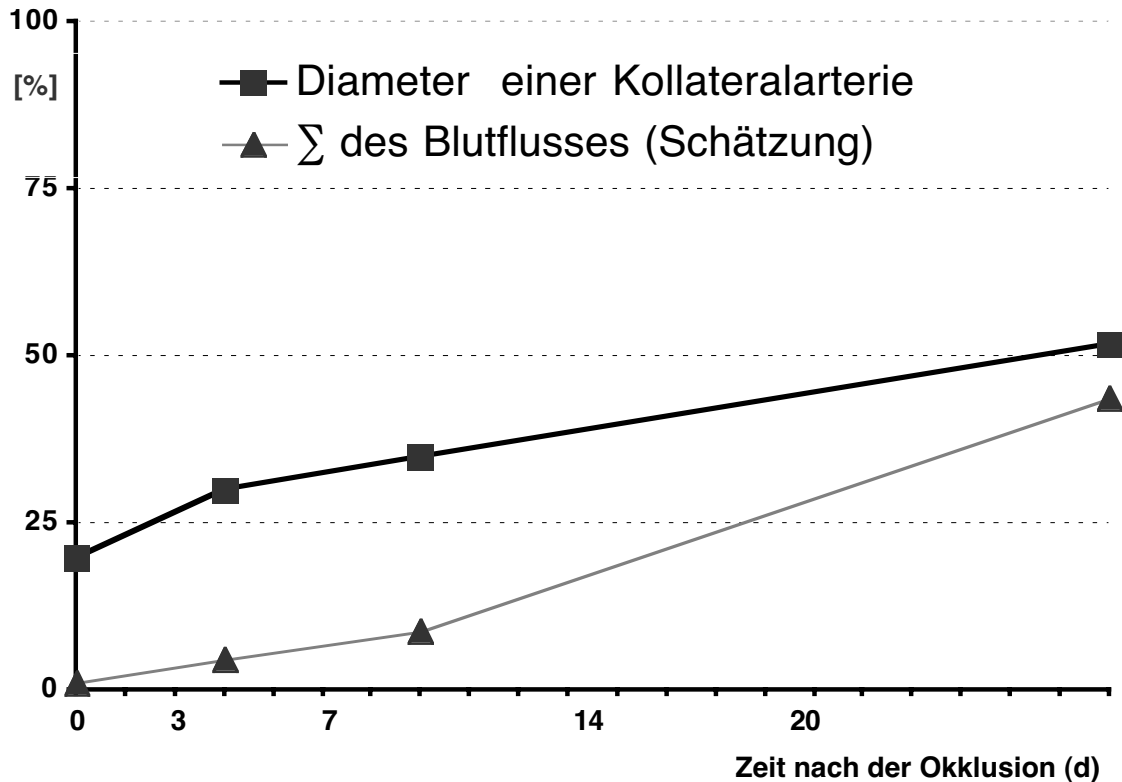
$$I = \frac{r^4 \pi \Delta p}{8 \eta L}$$

r: Innenradius des Rohres ( $\mu\text{m}$ );  $\Delta p$ : Druckdifferenz (mmHg)

$\eta$ : Viskosität der Flüssigkeit (Pa \* sec); L: Länge des Rohres ( $\mu\text{m}$ )

Demnach ist die Stromstärke einfach proportional zur 4. Potenz des Radius (und zum Druckgefälle) und umgekehrt proportional zur Länge des Rohres (und zur Viskosität der Flüssigkeit). Die Größe des Radius der Kollateralgefäße hat durch die Wertung in 4. Potenz einen enormen Einfluss auf die Stromstärke. Die Länge der Gefäße darf aber auch nicht unterschätzt werden. Schließlich muss nach der Okklusion das Blut durch Gefäße hindurch, die wesentlich länger sind als die einer Femoralarterie. Für den Blutfluss kommt erschwerend hinzu, dass die Kollateralen

eine korkenzieherartigen Verlauf haben. Bei der Passage des Blutes durch solche Gefäße muss es zum starken Abweichen einer idealen laminaren Strömung kommen. Es wird im Vergleich zur Hauptstrombahnpassage Energie verloren.



**Abb.IV.10:** Größenvergleich des **Diameters einer Kollateralarterie** (zum definierten Zeitpunkt nach der Femoralokklusion) und des Diameters der intakten SV/129 (Wildtyp) Femoralarterie (in %) und Größenvergleich der geschätzten Summe  $\Sigma$  **des Blutflusses** aller Kollateralarterien (zu definiertem Zeitpunkt nach der Femoralokklusion) und des Blutflusses einer nicht okkludierten Femoralarterie (in %, Erläuterung siehe Text)

Nach Abschluss der Arteriogenese (3 bis 4 Wochen nach der Okklusion) erreicht eine wachsende Kollaterale in der hier verwandten SV/129 Maus mit  $89 \mu\text{m}$  etwa 52% des Femoralisdurchmessers. Da nach Hagen-Poiseuille der Durchmesser eines Gefäßes in 4. Potenz die Stromstärke beeinflusst, muss man von 52% die 4. Wurzel ziehen, um den Anteil der Femoralisdurchblutung zu errechnen, den eine Kollaterale nach gut drei Wochen Wachstum kompensiert (7,3%) und ihn mit 6 multiplizieren, um die Kompensation aller 6 Kollateralen zu erhalten (43,8%, s. Abb.IV.10). Um zu wissen, welchen Durchmesser jede Kollaterale haben müsste, um 16,6% der Femoralarterie zu ersetzen -sodass alle 6 zusammen 100% des ursprünglichen Blutflusses kompensieren- zieht man die vierten Wurzel aus 16,6%. Man erhält dann den Faktor mit dem man den Durchmesser der intakten

Femoralarterie multipliziert, um auf den Durchmesser einer einzelnen Kollaterale zu kommen. Man errechnet, dass der Durchmesser einer einzelnen Kollaterale ganze 64% der intakten Femoralarterie (172  $\mu\text{m}$  Durchmesser) erreicht haben muss. In unserem Modell erhält man also einen die Femoralarterie völlig kompensierenden Durchmesser der 6 Kollateralen von jeweils ca. 110  $\mu\text{m}$ . Es bleibt in der 129/SV Maus eine Diskrepanz von etwa 20  $\mu\text{m}$  zu den mit ca. 90  $\mu\text{m}$  nicht mehr wachsenden Gefäßen. Für das Mäusehinterlaufmodell kann man neben weiteren Überlegungen der Grundlagenforschung also ein praktisches Ziel formulieren: einen Stoff (oder eine Kombination) und seine geeignete Applikationsform zu finden, der das Wachstum derart stimuliert, dass in kürzestmöglicher Zeit (präventiv?) die präexistenten Gefäße auf einen Innendurchmesser von ca. 110  $\mu\text{m}$  angewachsen sind. Man soll aber nicht aus den Augen verlieren, was das eigentliche Ziel der Arteriogeneseforschung ist. Es geht darum, die Funktion eines Organes, trotz Einengung der Hauptstrombahn, zu erhalten oder wieder herzustellen. Im Fall des Hinterlaufmodells geht es um die Wiederherstellung der Laufleistung. Es macht also Sinn, die Laufleistung (Ausdauer/Schnelligkeit) der Mäuse auf einem Laufband zu studieren: vor Okklusion der Femoralarterie und zu definierten Zeitpunkten danach die Erholung der Durchblutung und der HbSS zu dokumentieren. Auch solche Studien laufen bereits an diesem Institut. Eine weitere Verbesserung wäre die in vivo Messung der Kollateralen während der Arteriogenese. Dadurch wäre die Zunahme der Durchblutung, der Hämoglobin-Sauerstoff-Sättigung und die Veränderung anderer physiologischer Parameter noch besser mit der Arteriogenese zu korrelieren. Größere in vivo Einblicke erhofft man sich zukünftig von der Untersuchung der Magnetresonanz des Hinterlaufes. Mit ihrer Hilfe wird nicht nur die reine Morphometrie möglich sein (mit Kernspintomographie), sondern es können auch Aussagen über den Stoffwechsel im Hinterlauf gemacht werden (NMR-Spektroskopie).

## V. Literaturangaben

Aiello, L. 1994. VEGF in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *New England Journal of Medicine*. 1994:1480-1487.

Aprelikova, O., K. Pajusola, J. Partanen, E. Armstrong, R. Alitalo, S. Bailey, J. McMahon, J. Wasmuth, K. Huebner, and K. Alitalo. 1992. FLT4, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter. *Cancer Research*. 52:746-748.

Arras, M., W. Ito, D. Scholz, B. Winkler, J. Schaper, and W. Schaper. 1998. Monocyte activation in Angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J. Clin. Invest.* 101:40-50.

Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzendichler, G. Schatteman, and J. Isner. 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 275:964-967.

Asahara, T., T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver, and J.M. Isner. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO Journal*. 18:3964-3972.

Banai, S., M.T. Jaklitsch, M. Shou, D.F. Lazarous, M. Scheinowitz, S. Biro, S.E. Epstein, and E.F. Unger. 1994. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*. 89:2183-2189.

Barleon, B., G. Siemeister, G. Martiny-Baron, K. Weindel, C. Herzog, and D. Marme. 1997. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Research*. 57:5421-5425.

Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H.A. Weich, A. Mantovani, and D. Marme. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*. 87:3336-3343.

Baroldi, G., O. Mantero, and G. Scomazzoni. 1956. The collaterals of the coronary arteries in normal and pathologic hearts. *Circ Res*. 4:223-229.

Baumgartner, I., A. Pieczek, O. Manor, R. Blair, M. Kearney, K. Walsh, and J.M. Isner. 1998. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia [see comments]. *Circulation*. 97:1114-1123.

- Bottomley, M., N. Webb, C. Watson, L. Holt, M. Bukhari, J. Denton, A. Freemont, and B. PE. 2000. Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clinical & Experimental Immunology*. 119:182-188.
- Boyer, M., L. Townsend, L. Vogel, J. Falk, D. Reitz-Vick, K. Trevor, M. Villalba, P. Bendick, and J. Glover. 2000. Isolation of endothelial cells and their progenitor cells from human peripheral blood. *Journal of Vascular Surgery*. 31:181-189.
- Burri, Ph. 1992. Intussusceptive microvascular growth, a new mechanism of capillary network formation. *Experientia*.61: 32-9.
- Buschmann, I., and W. Schaper. 1999. Arteriogenesis Versus Angiogenesis. *News Physiol. Sci*. 14:121-125.
- Bussolino, F., A. Mantovani, and G. Persico. 1997. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem. Sci*. 22:251-256.
- Cao, Y., H. Chen, L. Zhou, M. Chiang, B. Anand-Apte, J. Weatherbee, Y. Wang, F. Fang, J. Flanagan, and M. Tsang. 1996a. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry*. 271:3154-3163.
- Cao, Y., W. Ji, P. Qi, A. Rosin, and Y. Cao. 1997. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 235:493-498.
- Cao, Y., P. Linden, D. Shima, F. Browne, and J. Folkman. 1996b. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *Journal of Clinical Investigation*. 98:2507-2511.
- Carmeliet, P. 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine*. 7:575-583.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 380:435-439.



Carmeliet, P., D. Nuyens, G. Theilmeier, K. Brusselmans, I. Cornelissen, E. Ehler, V. Kakkar, I. Stalmans, V. Mattot, J. Perriard, M. Dewerchin, W. Flameng, A. Nagy, F. Lupu, L. Moons, D. Collen, P. D'Amore, and D. Shima. 1999. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nature Medicine*. 5:491-492.

Catoretto, G., M.H.G. Becker, G. Key, M. Duchrow, C. Schlüter, J. Galle, and J. Gerdes. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 168:357-363.

Clark, D., S. Smith, D. Licence, A. Evans, and D. Charnock-Jones. 1998. Comparison of expression patterns for placenta growth factor, vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-B and VEGF-C in the human placenta throughout gestation. *Journal of Endocrinology*. 159:459-467.

Clauss, M. 1998. Functions of the VEGF Receptor-1 (FLT-1) in the Vasculature. *TCM*. 8:241-245.

Clauss, M., H. Weich, G. Breier, U. Knies, W. Rockl, J. Waltenberger, and W. Risau. 1996. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry*. 271:17629-17634.

Conn, G., M. Bayne, D. Soderman, P. Kwok, K. Sullivan, T. Palisi, D. Hope, and K. Thomas. 1990. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:2628-2632.

Couffinhal, T., M. Silver, L.P. Zheng, M. Kearney, B. Witzembichler, and J. Isner. 1998. Mouse Model of Angiogenesis. *Am J Pathol*. 152:1667-1679.

Damert, A., L. Miquerol, M. Gertsenstein, W. Risau, and A. Nagy. 2002. Insufficient VEGFA activity in yolk sac endoderm compromises haematopoietic and endothelial differentiation. *Development*. 129:1881-92.

de Vries, C., J. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, and L. Williams. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*. 255:989-991.

Deindl, E. 2000. Collateral Artery Growth is not Dependent on Ischemia or an Increased Expression of VEGF. *Circulation*. 102:II-51 (Abstract 237).

DiPalma, T., M. Tucci, G. Russo, D. Maglione, C.T. Lago, A. Romano, S. Saccone, G. Della Valle, L. De Gregorio, T.A. Dragani, G. Viglietto, and M.G. Persico. 1996. The placenta growth factor gene of the mouse. *Mammalian Genome*. 7:6-12.

DiSalvo, J., M. Bayne, G. Conn, P. Kwok, P. Trivedi, D. Soderman, T. Palisi, K. Sullivan, and K. Thomas. 1995. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor/placenta growth factor heterodimer. *Journal of Biological Chemistry*. 270:7717-7723.

Dvorak, H., L. Brown, M. Detmar, and A. Dvorak. 1995a. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. [Review]. *American Journal of Pathology*. 146:1029-1039.

Dvorak, H.F., M. Detmar, K.P. Claffey, J.A. Nagy, L. van de Water, and D.R. Senger. 1995b. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *International Archives of Allergy & Immunology*. 107:233-235.

Elsässer, A., and J. Schaper. 1995. Hibernating myocardium: adaptation or degeneration? *Basic Res Cardiol*. 90:47-48.

Failla, C., T. Odorisio, F. Cianfarani, C. Schietroma, P. Puddu, and G. Zambruno. 2000. Placenta growth factor is induced in human keratinocytes during wound healing. *Journal of Investigative Dermatology*. 115:188-195.

Ferrara, N. 1999. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 237:1-30.

Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K.S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K.J. Hillan, and M.W. Moore. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 380:439-442.

Fleming, I., J. Bauersachs, B. Fisslthaler, and R. Busse. 1998. Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circulation Research*. 82:686-695.

Folkman, J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. [Review]. *New England Journal of Medicine*. 285:1182-1186.

Folkman, J. 1983. Angiogenesis: initiation and modulation. [Review]. *Symposium on Fundamental Cancer Research*. 36:201-208.

Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. [Review]. *Nature Medicine*. 1:27-31.

Folkman, J. 1996. New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. [Review]. *European Journal of Cancer*. 32A:2534-2539.

Folkman, J. 1998. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation*. 97:1108-1110.

Folkman, J., and S. Y. 1992. Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 267:10931-10934.

Fong, G.H., J. Rossant, M. Gertsenstein, and M.L. Breitman. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 376:66-70.

Fong, G.H., L. Zhang, D.M. Bryce, and J. Peng. 1999. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*. 126:3015-3025.

Frater-Schroder, M., W. Risau, R. Hallmann, P. Gautschi, and P. Bohlen. 1987. Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84:5277-5281.

Fulton, W.F.M. 1965. Arterial anastomoses in the coronary circulation. In *The Coronary Arteries. Arteriography, Microanatomy, and Pathogenesis of Obliterative Coronary Artery Disease*. W.F.M. Fulton, editor. Thomas, C.C., Springfield, Illinois. 72-128.

Gerber, H.P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B.A. Keyt, V. Dixit, and N. Ferrara. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *Journal of Biological Chemistry*. 273:30336-30343.

Gimbrone, M., Jr., N. Resnick, T. Nagel, L. Khachigian, T. Collins, and J. Topper. 1997. Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. [Review]. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 801:1-10.

Heil, M., and etal. 2000. Reactive Monocytomia... *J of Mol and Cell Card.*:abstract C7.

Herzog, S., Sager H., Khmelevski, E. and Ito, W. Collateral arteries grow from pre-existing anastomoses in the rat hindlimb. 2002 *Am J Physiol*. Vol 283 H2012-20.

Hiratsuka, S., O. Minowa, J. Kuno, T. Noda, and M. Shibuya. 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*. 95:9349-9354.

Isner, J. 1998. Vascular endothelial growth factor: gene therapy and therapeutic angiogenesis. *American Journal of Cardiology*. 82:63s-64s.

Isner, J., K. Walsh, J. Symes, A. Pieczek, S. Takeshita, J. Lowry, K. Rosenfield, L. Weir, E. Brogi, and D. Jurayj. 1996. Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Human Gene Therapy*. 7:959-988.

Ito, W.D., M. Arras, D. Scholz, B. Winkler, P. Htun, and W. Schaper. 1997. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*. 273:H1255-H1265.

Kalka, C., H. Masuda, T. Takahashi, W. Kalka-Moll, M. Silver, M. Kearney, T. Li, J.M. Isner, and T. Asahara. 2000. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *PNAS*. 97:3422-3427.

Kawasaki, T., T. Kitsukawa, Y. Bekku, Y. Matsuda, M. Sanbo, T. Yag, and H. Fujisawa. 1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*. 126:4895-4902.

Keck, P., S. Hauser, G. Krivi, K. Sanzo, T. Warren, J. Feder, and D. Connolly. 1989. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 246:1309-1312.

Khachigian, L., K. Anderson, N. Halnon, M. Gimbrone, N. Resnick, and T. Collins. 1997. Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-chain promoter. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. 17:2280-2286.

Khachigian, L., N. Resnick, M. Gimbrone, Jr. , and T. Collins. 1995. Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Journal of Clinical Investigation*. 96:1169-1175.

- Khaliq, A., X.F. Li, M. Shams, P. Sisi, C.A. Acevedo, M.J. Whittle, H. Weich, and A. Ahmed. 1996. Localisation of placenta growth factor (PlGF) in human term placenta. *Growth Factors*. 13:243-250,color plates I-II,pre.bk cov.
- Kim, K., and etal. 1993. Inhibition of VEGF-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature*. 362:841-844.
- Koch, A., L. Harlow, G. Haines, E. Amento, E. Unemori, W. Wong, R. Pope, and N. Ferrara. 1994. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology*. 152:4149-4156.
- Landgren, E., P. Schiller, Y. Cao, and L. Claesson-Welsh. 1998. Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene*. 16:359-367.
- Lefkovits, I. 1997. *Immunology Methods Manual*. Academic Press, London.
- Litvak, J., L.E. Siderides, and A.M. Vineberg. 1957. The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion. *Am Heart J*. 53:505-518.
- Lupia, E., G. Montrucchio, E. Battaglia, V. Modena, and G. Camussi. 1996. Role of tumor necrosis factor-alpha and platelet-activating factor in neoangiogenesis induced by synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*. 26:1690-1694.
- Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Schepper, A., Liao, F., Nagy, J.A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B., Compernelle, V., Daci, E., Bohlen, P., Dewerchin, M., Herbert, J.-M., Fava, R., Collen, D., Dvorak, H.F., Hicklin, D.J. and Carmeliet, P. 2002 Revascularisation of ischemic tissue by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1, *Nature Med*, Vol 8, Issue 8, 831-40
- Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, and M.G. Persico. 1991. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:9267-9271.
- Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, M. Ferraro, O. Aprelikova, K. Alitalo, S. DelVecchio, K. Lei, J. Chou, and M. Persico. 1993. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene*. 8:925-931.

- Migdal, M., B. Huppertz, S. Tessler, A. Comforti, M. Shibuya, R. Reich, H. Baumann, and G. Neufeld. 1998. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 273:22272-22278.
- Murohara, T., T. Asahara, M. Silver, C. Bauters, H. Masuda, C. Kalka, M. Kearney, D. Chen, J.F. Symes, M.C. Fishman, P.L. Huang, and J.M. Isner. 1998. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *Journal of Clinical Investigation*. 101:2567-2578.
- Nagel, T., N. Resnick, C.F. Dewey, Jr., and M.A. Gimbrone, Jr. 1999. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. 19:1825-1834.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak. 1999a. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal*. 13:9-22.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak. 1999b. VEGF and its receptors (Rev.). *The FASEB Journal*. 13:9-22.
- Park, J.E., H.H. Chen, J. Winer, K.A. Houck, and N. Ferrara. 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *Journal of Biological Chemistry*. 269:25646-25654.
- Persico, M., V. Vincenti, and T. DiPalma. 1999. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Current Topics in Microbiology & Immunology*. 237:31-40, 1999. 237:31-40.
- Risau, W. 1993. *Development of the vascular system of organs and Tissues*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London.
- Risau, W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 386:671-674.
- Risau, W., and F. I. 1995. Vasculogenesis. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*. 11:73-91.
- Sawano, A., T. Takahashi, S. Yamaguchi, M. Aonuma, and M. Shibuya. 1996. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth & Differentiation*. 7:213-221.

Schaper, J., R. Koenig, D. Franz, and W. Schaper. 1976a. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A (Pathol Anat)*. 370:193-205.

Schaper, W. 1971. *The Collateral Circulation of the Heart*. Elsevier North Holland Publishing Company, Amsterdam London.

Schaper, W. 1991. "Hibernating Myocardium". *Zeit für einen Paradigmenwechsel? Z Kardiol*. 80:712-715.

Schaper, W., W. Flameng, B. Winkler, B. Wuesten, W. Türschmann, G. Neugebauer, M. Carl, and S. Pasyk. 1976b. Quantification of collateral resistance in acute and chronic experimental coronary occlusion in the dog. *Circ Res*. 39:371-377.

Schaper, W., and W. Ito. 1996. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res*. 79:911-919.

Schaper, W., and J. Schaper. 1993. *Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs*. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London.

Schaper, W., and D. Scholz. 1997. Growth and remodeling of coronary collateral vessels. In *Arterial Remodeling: a Critical Factor in Restenosis*. A. LaFont and E.J. Topol, editors. Kluwer, Boston, Dordrecht, London. 31-48.

Schlessinger, J., and A. Ullrich. 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. [Review] [90 refs]. *Neuron*. 9:383-391.

Scholz, D., B. Devaux, A. Hirhe, B. Pötzsch, B. Kropp, W. Schaper, and J. Schaper. 1996. Expression of Adhesion Molecules is specific and time dependent in Cytokine Stimulated Endothelial Cells in Culture. *Cell Tis Res*. 284:415-423.

Scholz, D., W. Ito, I. Fleming, E. Deindl, A. Sauer, A. Babiak, A. Bühler, M. Wiesnet, R. Busse, J. Schaper, and W. Schaper. 2000. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hindlimb collateral artery growth. *Virchows Archiv*. in press.

Scholz, D., T. Ziegelhoeffer, and e. al. 2002. Contribution of Arteriogenesis and Angiogenesis to the restoration of postocclusive blood flow in the mouse hindlimb. *JMCC*. in press.

Scholz D, Elsaesser H, Sauer A, Friedrich C, Luttun A, Carmeliet P, Schaper W. 2003. Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (PlGF)  $-/-$  mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2003 Feb;35(2):177-84.

Seetharam, L., N. Gotoh, Y. Maru, G. Neufeld, S. Yamaguchi, and M. Shibuya. 1995. A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene*. 10:135-147.

Shalaby, F., J. Rossant, T. Yamaguchi, Gertsenstein.M., X. Wu, M. Breitman, and A. Schuh. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376:62-66.

Sharma, H., M. Wunsch, T. Brand, P. Verdouw, and W. Schaper. 1992. Molecular biology of the coronary vascular and myocardial responses to ischemia. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 20:23-31.

Shibuya, M., S. Yamaguchi, A. Yamane, T. Ikeda, A. Tojo, H. Matsushime, and M. Sato. 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*. 5:519-524.

Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet. 1992. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 359:843-845.

Spalteholz, W. 1907. Die Koronararterien des Herzens. *Verhandl Anat Ges*. 21:141; in *Anat Anz* 130.

Steg, P., L. Feldman, J. Scoazec, O. Tahlil, J. Barry, S. Boulechfar, T. Ragot, J. Isner, and M. Perricaudet. 1994. Arterial gene transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of an adenoviral vector. *Circulation*. 90:1648-1656.

Takahashi, T., and M. Shibuya. 1997. The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. 14:2079-2089.

Takeshita, S., Y. Tsurumi, T. Couffinahl, T. Asahara, C. Bauters, J. Symes, N. Ferrara, and J. Isner. 1996. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Laboratory Investigation*. 75:487-501.

Takeshita, S., L.P. Zheng, E. Brogi, M. Kearney, L.Q. Pu, S. Bunting, N. Ferrara, J.F. Symes, and J.M. Isner. 1994. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *Journal of Clinical Investigation*. 93:662-670.

Thoma, R. 1893. Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems. .



Viglietto, G., D. Maglione, M. Rambaldi, J. Cerutti, A. Romano, F. Trapasso, M. Fedele, P. Ippolito, G. Chiappetta, G. Botti, and et al. 1995. Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PlGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene*. 11:1569-1579.

Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, and C. Heldin. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 269:26988-26995.

Wolf, C., W.-J. Cai, R. Vosschulte, S. Koltai, D. Mousavipour, D. Scholz, A. Afsah-Hedjri, W. Schaper, and J. Schaper. 1998. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol*. 30:2291-2305.

Wung, B., J. Cheng, Y. Chao, J. Lin, Y. Shyy, and D. Wang. 1996. Cyclical strain increases monocyte chemotactic protein-1 secretion in human endothelial cells. *American Journal of Physiology:H* 1462-1468.

Yancopoulos, G., M. Klagsbrun, and J. Folkman. 1998. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell*. 93:661-664.

Ziche, M., D. Maglione, D. Ribatti, L. Morbidelli, C. Lago, M. Battisti, I. Paoletti, A. Barra, M. Tucci, G. Parise, V. Vincenti, H. Granger, G. Viglietto, and M. Persico. 1997. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Laboratory Investigation*. 76:517-531.



## VI. Anhang

### VI.1. Rezepte

#### VI.1.1. Epon (Epoxidharz)

Rezept für 48 ml (nach LADD Research Industries, USA)

- 22 ml LX-120 (Resin) • 17 ml DDSA (Dodeceny Succinic Anhydride)
- 8 ml NMA (Nadic Methyl Anhydride) • 1 ml DMP-30 ( Katalysator)

#### Einbettungsschema

	Medium	Zeit	Temperatur
1	Osmium	120 min	20°C
2	PBS	15 min	20°C
3	PBS	15 min	20°C
4	PBS	15 min	20°C
5	Alkohol 30%	15 min	20°C
6	Alkohol 50%	30 min	20°C
7	Alkohol 70%	30 min	20°C
8	Alkohol 90%	30 min	20°C
9	Alkohol 100%	30 min	20°C
10	Alkohol 100%	30 min	20°C
11	Propylenoxid (PO)	15 min	20°C
12	Propylenoxid (PO)	15 min	20°C
13	Propylenoxid/Epon	60 min	20°C
14	Epon	60 min	37°C
15	Epon	60 min	37°C
16	Epon	15 min	56°C

\*1 PBS: Phosphat Buffer Saline; Rezept siehe Abb. IV.1.3.

\*2 Osmiumtetroxid: Dieser Stoff bindet und stabilisiert die Lipide des eingebetteten Gewebes

\*3 Epon: Kunstharz

Nach der Einbettung mussten die Eponblöcke zwei Tage bei 50°C auspolymerisieren.

### **VI.1.2. Wismut Gelatine Kontrastmittel**

30 g Wismut(III)Nitrat-Pentahydrat (der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim) wird 100 ml 18 prozentiger Natriumchloridlösung zugegeben und mit dem Magnetrührer untergemischt. Um eine vollständige Lösung zu erreichen, wird ein wenig HCl hinzugefügt.

Anschließend wird diese Lösung möglichst langsam zu 5 l Wasser gegeben und wiederum mit dem Magnetrührer verrührt.

Danach wird die Lösung 1h lang stehen gelassen, bis die Kristalle sedimentieren. Gegenfalls wird zentrifugiert.

Bei 40°C wird das Sediment mit 10 prozentiger Wassergelatine im Verhältnis 1:1 vermischt.

### **VI.1.3. PBS-Lösung**

Konzentrierte, lagerfähige Lösung (Stock solution):

- 397,4 g Natriumchlorid
- 10 g Kaliumchlorid
- 10 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 88,75 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{H}_2\text{O})$

Die Gebrauchslösung wird dann aus 0,5 Litern der Stock Solution, verdünnt mit 4,5 Litern Aqua dest., hergestellt. Mit NaOH- bzw. HCl- Lösungen wird der pH-Wert der Gebrauchslösung auf 7,4 titriert.

## **VI.2. Sonstiges**

### **VI.2.1. Knochenmarktransplantation**

*Knochenmarksgewinnung:*

Die Spendermäuse waren 6-18 Wochen alt, als ihnen Knochenmark unter aseptischen Bedingungen entnommen wurde.

Zunächst wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurden deren Hinterteile im Bereich der unteren Wirbelsäule abgetrennt. Dann

wurden Femur und Tibia von Haut- und Muskelgewebe getrennt. Zur Markentnahme wurden diese Knochen zunächst mit RPMI 1640 (Gibco BRL #11835-030) + 2% FBS + 10U/ml Heparin (Sigma # H-3393) gespült, dann wurden sie rasch aufgebrochen. Mit einer sterilen Spritze (mit 25-er Kanüle) wurden die Zellen entnommen und mit RPMI 1640 ohne FBS und Heparin gewaschen.

Die Zellen wurden gezählt und resuspendiert in RPMI 1640 (ca. 5 Mio. Zellen in 0,5 ml).

#### *Bestrahlung und Transplantation der Empfängermäuse:*

Die sieben Empfängermäuse mussten mit einer letalen Röntgenstrahlendosis bestrahlt werden, um ihr eigenes Knochenmark irreversibel zu zerstören. Um die lethale Dosis zu beweisen, wurden zwei Kontrollmäuse verwendet, die nach der Bestrahlung nicht transplantiert wurden. Sie starben 7 Tage bis zwei Wochen nach der Bestrahlung.

Die 6-8 Wochen alten Mäuse wurden mindestens 4 Stunden vor der Knochenmarkgabe bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte mit einem linearen Akzelerator. Die Strahlendosis lag bei 9-9,5 Gy und bei 250-300 rad pro Minute.

Das Knochenmark wurde der unter einer Wärmelampe aufgewärmten Maus in die zentrale Schwanzvene injiziert. Mit einer 27 er Nadel wurden etwa 500000 Zellen in einer 300 - 500  $\mu$ l Dosis injiziert.

Die Tiere wurden in autoklavierten Isolationskäfigen gehalten. Alle Manipulationen wie Wiegen, Blutprobenentnahme, Futter- und Wassergabe, Käfigreinigung etc. fanden unter hochsterilen Bedingungen statt.

Das Gewicht wurde täglich bestimmt, um die Entwicklung einer Graft versus Host Erkrankung (GVHD) oder eine Sepsis früh zu erkennen.

Die volle Rekonstruktion der Tiere ist 4 bis 6 Wochen nach Bestrahlung und Transplantation erreicht. Sie wird definiert durch ähnliche Blutzelllevel im Vergleich von Blutproben, die eine Woche vor und 4 und 6 Wochen nach der Transplantation untersucht werden.

Die Transplantation wurde von Herrn Diplombiologen Dr. Aernout Lutten aus Leuven, Belgien, durchgeführt.

### VI.2.2. Stefan-Boltzmann-Gesetz

$$P = \epsilon * \sigma * A * (T_k^4 - T_u^4)$$

*P*: Gesamtstrahlung                       $\sigma$ : Stefan-Boltzmann-Konstante:  $\frac{5,67W}{10^8 m^2 k^4}$   
*A*: abstrahlende Fläche                  *T<sub>k</sub>*: absolute Temperatur des Körpers  
*ε*: Emissionsgrad                          *T<sub>u</sub>*: absolute Temperatur der Umgebung

### VI.2.3. Thermodoppelkammer

Der Institutstechniker Herr Siegfried Langsdorf konzipierte extra für die Forschungsgruppe Mäusearteriogenese eine Thermokammer, mit der wir in der Lage waren, die Mäuse stets auf ein und die selbe Temperatur zu bringen. Unsere Absicht war es, die narkotisierte Maus auf 37°C zu erwärmen, um maximale Vasodilatation zu erreichen. Speziell für die Thermographie wurde eine zweite Kammer neben der auf 37°C temperierten Kammer 1 benötigt, die nur durch eine sehr dünne aber gut isolierende Wand von der ersten getrennt war. Durch zwei kleine Löcher in dieser Trennwand konnten die Pfoten der auf 37°C aufgewärmten Maus in die auf 25°C temperierte Kammer 2 gehalten und dort thermographiert werden.



**Abb. VI.1:** Messvorrichtungen für LDI mit der (Thermo-)Messkammer

In der 37°C warmen Kammer wäre die Thermographie sinnlos gewesen, da sich dort eine auf 37°C aufgewärmte Pfote nicht vom Temperaturhintergrund abhebt, unabhängig davon ob nun viel oder wenig 37°C warmes Blut durch sie hindurch fließt. Die Wände der Kammern sind hohl und werden mit Hilfe von Pumpen mit Wasser umspült. In den Kammern ist jeweils ein Thermomessfühler angebracht, der mit einem Heizelement verbunden ist. Die Heizung hört auf zu heizen, wenn die gewünschte Kammertemperatur überschritten ist und nimmt ihren Dienst wieder auf, wenn die gewünschte Kammertemperatur unterschritten ist. So wird die Temperatur in den Kammern konstant gehalten.

#### VI.2.4. $\beta$ -Galaktosidasenachweis

Vorgehen nach Lefkovits (Lefkovits, 1997):

Zunächst werden zwei Lösungen erstellt (Lösung A und Lösung B).

Lösung A: 10 mg X-Galaktopyranoside wird in 500  $\mu$ l N,N- Dimethylformamid gelöst.; Lösung B: 7 ml 1,1 millimolarer Magnesiumchlorid-6-Hydrid werden zu 500  $\mu$ l 50 milimolarer Kalium-Eisenzyanidlösung gegeben

12,5  $\mu$ l der Lösung A wird zu 500  $\mu$ l der Lösung B gegeben (Diese Mengenangaben sind relativ zu sehen). Mit dieser Mixtur werden die Gedrierschnitte, welche 5  $\mu$ m dick zu sein haben, 10-60 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird die Reaktion mit einer Phosphatpufferspülung gestoppt, die Schnitte werden eingedeckelt.

Auf diese Weise wird die  $\beta$ -Galaktosidase so aufbereitet, dass sie, angeregt mit Licht bestimmter Frequenz, zur Fluoreszenz gebracht werden kann.

### VI.3. Abkürzungen

<b>A.</b>	Arterie
<b>AP-1</b>	Activator Protein-1
<b>BM (bm)</b>	Bone Marrow: Knochenmark
<b>Coll</b>	Kollaterale(n)
<b>EGR-1</b>	Early Growth Response-1
<b>Flt-1</b>	Fms-like tyrosine kinase, VEGFR-1
<b>Flt-1tk<sup>-/-</sup></b>	Mäuse mit Flt-1 Rezeptoren, deren Tyrosinkinasedomänen fehlen
<b>Flk-1</b>	Fetal liver kinase-1, tierischer VEGFR-2
<b>HbSS</b>	Hämoglobin Sauerstoffsättigung
<b>IRT</b>	Infrarotthermographie
<b>KDR</b>	Kinase Domaining Region, humaner VEGFR-2
<b>-/-</b>	Knock Out, das Genprodukt kann nicht hergestellt werden
<b>LDI</b>	Laser Doppler Imaging
<b>MCP-1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein-1
<b>MRT</b>	Magnet Resonanz Tomographie
<b>N.</b>	Nerv
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear Factor- $\kappa$ B
<b>PAVK</b>	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
<b>PLGF</b>	Placenta(l) Growth Factor, Plazenta(ren) Wachstumsfaktor
<b>PLGF (+/+)</b>	Wildtypmaus mit intaktem PLGF Gen
<b>PLGF (-/-)</b>	PLGF Gen defiziente Maus
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor
<b>SSRE</b>	Shear Stress Responding Elements
<b>V.</b>	Vene
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor,
<b>VEGFR</b>	VEGF Rezeptor
<b>Wt (wt)</b>	Wildtyp, in dieser Arbeit ausdrücklich PLGF Genotyp +/+



---

<b>Nicht okkludierte Seite</b>	Hinterlauf dessen Femoralarterie über den gesamten Versuchszeitraum nicht okkluiert wurde. Die Okklusion erfolgte erst terminal zur besseren Kontrastmittelfüllung der Kollateralen
<b>Okkludierte Seite</b>	Hinterlauf dessen Femoralarterie über den gesamten Versuchszeitraum okkludiert war



## VII. Danksagung

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Schaper danke ich für die Überlassung des spannenden Themas, für seine wertvollen Ratschläge, sowie die Unterstützung während der gesamten Arbeit.
- Frau Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jutta Schaper möchte ich für ihr ständig für Fragen und Sorgen offenes Ohr und ihre Hilfsbereitschaft danken, insbesondere für die kritische Auseinandersetzung mit dem Manuskript dieser Arbeit.
- Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Dimitri M. Scholz, dem Betreuer meiner Dissertation und Kopf der Arbeitsgruppe, die sich mit der Arteriogenese im Mäusehinterlauf beschäftigt. Er entwickelte maßgeblich das Modell und arbeitete mich in den Großteil der Arbeitstechniken ein. Zu jeder Zeit war er zur Hilfe und zu konstruktiver Kritik meiner Arbeit bereit.
- Frau Anne Sauer und Herr Christian Friedrich waren ebenfalls Doktoranden in unserer Arbeitsgruppe. Während Frau Sauer als erste Doktorandin der Arbeitsgruppe besonders an der Modellentwicklung beteiligt war und mir bei der Einarbeitung in die Thematik und in diverse Arbeitstechniken half, hat Herr Friedrich mit seinem großen operativen Geschick die Standardisierbarkeit und Qualität der Versuche wesentlich verbessert. Vielen Dank den beiden.
- Herrn Prof. Dr. Peter Carmeliet und Herrn Diplombiologen Aernout Lutton vom Center for Transgene Technology in Leuven, Belgien, sei für die Überlassung der PLGF -/- Mäuse, sowie für die Knochenmarktransplantationen gedankt.
- Den Mitarbeitern der Abteilung Frau Beate Grohmann, Frau Renate Möhren, Frau Annemarie Möbs und Herrn Siegfried Langsdorf danke ich für die technische Assistenz. Herrn Gerd Stämmeler bin ich für seine Hilfe bei der elektronischen Verarbeitung dieser Arbeit sehr dankbar.
- Auch den nicht namentlich genannten Kollegen sei herzlich gedankt.
- Ich bin froh und dankbar, dass ich die Möglichkeit erhielt, die Arbeit auf einem internationalen Kongress vorzustellen.
- Ich möchte nicht versäumen, meinen Eltern und Großeltern, meinem Bruder Thilo, sowie meinen Freunden, speziell meiner Freundin Marina Starikowitsch, für die emotionale und finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums zu danken.



## VIII. Lebenslauf

- 1975            Geburt am 08.06. in Frankfurt am Main  
 Vater:        Oberstudienrat Dr. Horst Elsässer  
 Mutter:      Grundschullehrerin Wiltrud Elsässer  
 Bruder:      Diplomphysiker Thilo Elsässer, geboren 1973
- 1978-81        Besuch des Evangelischen Kindergartens von Königstein
- 1981-85        Besuch der Grundschule Königstein
- 1985-94        Besuch der Taunusschule Königstein  
 Abschluss: Abitur am 30.06.94
- 1994-95        Wehrersatzdienst im St. Josef Krankenhaus Königstein
- 1995 –2002    Studium der Humanmedizin in Gießen  
 1997            Physikum  
 1998            1. Staatsexamen  
 2001            2. Staatsexamen  
 2002            3. Staatsexamen
- seit 1999      Promotionsarbeit am Max-Planck Institut für Physiologische  
 und Klinische Forschung, Abteilung Experimentelle Kardiologie,  
 Bad Nauheim

### *Famulaturen und Praktika im Rahmen des Praktischen Jahres (PJ):*

- 1998            Bezirkskrankenhaus Woloszin, Weißrussland: Chirurgische  
 Intensivstation
- 1999            Universitätsklinik Erlangen: Kardiologie
- 2000            Ratcliffe Hospital Oxford, UK: Nuffield Department of  
 Anaesthetics  
 Praxisfamulatur: Chirurgische Praxis Dr. Hausmann,  
 Königstein
- 2001-2002     PJ-Tertiale:        Kreiskrankenhaus Wetzlar, Chirurgie,  
 Traumatologie  
 Kantonsspital Basel, Schweiz, Innere Medizin  
 Portiuncular Hospital Ballinasloe Co. Galway, Irland,  
 Anaesthetic Department



## IX. Zusammenfassung

Knochenmarktransplantation hebt die Arteriogenesehemmung bei PLGF (Placental Growth Factor)  $-/-$  Mäusen auf

**Einleitung:** Eine Rolle von PLGF, Ligand des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Rezeptors Fms-like tyrosine Kinase-1 (**Flt-1**) bei der Arteriogenese ist unbekannt, ebenso wie seine relevante natürliche Quelle. Geprüft wird, ob die Arteriogenese in PLGF  $-/-$  Mäusen gestört ist und ob die mutmaßliche Störung durch Knochenmarktransplantation aufzuheben ist. **Methoden:** Das Kollateralarterienwachstum wurde nach Verschluss der rechten Femoralarterie studiert: in Wildtyp Mäusen ( $+/+$ ), in PLGF gendefizienten Mäusen ( $-/-$ ) und in ( $-/-$ ) Mäusen, denen nach Röntgenbestrahlung Wildtypknochenmark transplantiert wurde ( $-/-$ ; **bm** $+/+$ ). Am 7. Tag (alle Gruppen) bzw. am 21. Tag (nur ( $+/+$ ) und ( $-/-$ )) nach der Okklusion wurden die Hinterbeine durch die Bauchorta perfusionsfixiert und nach Kontrastmittelinjektion die Kollateralarterien fotografisch und röntgenologisch dokumentiert, semidünn geschnitten und morphometriert. Für ( $+/+$ ) und für ( $-/-$ ) Mäuse wurden Infrarotthermographie und Laser Doppler Imager Untersuchungen sowie Hämoglobin-Sauerstoffsättigungs (HbSS) Messungen der Hinterpfoten narkotisierter Tiere durchgeführt: vor, akut nach , 3, 7, 14 und 21 Tage nach der Operation. **Ergebnisse:** Das Kollateralwachstum der ( $-/-$ ) Mäuse war signifikant verzögert (nach einer Woche signifikant geringer) im Vergleich mit der ( $+/+$ ) Gruppe. Auch die Durchblutung und die HbSS erholten sich langsamer. Das Wachstumsdefizit wurde durch Knochenmarktransplantation verhindert. Nach drei Wochen hatten die ( $-/-$ ) Kollateralen in allen Untersuchungen nahezu das ( $+/+$ ) Niveau erreicht. Die Thermoregulation blieb im ( $+/+$ ) und im ( $-/-$ ) Tier gestört. **Schlussfolgerungen:** PLGF ist ein physiologischer Beschleuniger der Arteriogenese. Die arteriogenetisch relevante PLGF Quelle befindet sich im Knochenmark. Die Wirkung von Wildtypknochenmarktransplantation könnte auf der Wiederherstellung der Monozytenfunktion beruhen.

Wichtige Ergebnisse der Arbeit wurden veröffentlicht:

(Scholz D, Elsaesser H, Sauer A, Friedrich C, Luttun A, Carmeliet P, Schaper W. 2003. Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (PLGF)  $-/-$  mice. J Mol Cell Cardiol. 2003 Feb;35(2):177-84)