

Aus dem Institut für Biochemie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Interrelationship of angiogenesis and lymphangiogenesis in a murine model-  
Phenotypic transformation of intimal and adventitial lymphatics in atherosclerosis:  
a regulatory role for soluble VEGF receptor 2

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mahdi Taher  
aus Berlin

Datum der Promotion: 08.12.2017

# **Inhaltsverzeichnis**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Abstract in Deutsch</b>  | <b>2</b>  |
| <b>2. Abstract in Englisch</b>   | <b>4</b>  |
| <b>3. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung</b>            | <b>5</b>  |
| <b>4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)</b> | <b>7</b>  |
| <b>5. Publikation</b>  | <b>8</b>  |
| <b>6. Lebenslauf</b>   | <b>18</b> |
| <b>7. Publikationsliste</b>  | <b>21</b> |
| <b>8. Danksagung</b>   | <b>23</b> |

# 1. Abstract in Deutsch

Inflammation nimmt einen wesentlichen Bestandteil in der Pathogenese der Atherosklerose ein. Lymphgefäße und ihre Neubildung spielen in inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Ihr Verhalten in der Pathophysiologie der Atherosklerose ist bisher nur vereinzelt beschrieben und bedarf weiterer Erforschung.

In der vorliegenden Arbeit untersuchen wir die Wachstumsdynamik von Lymphgefäßen und die Expression von Lymphgefäßmarkern bei der Atherosklerose in Apolipoprotein E-defizienten (apoE<sup>-/-</sup>) Mäusen, einem der gängigsten murinen Modelle zur Erforschung der Atherosklerose.

Diesen Mäusen fehlt das zum Transport von Lipiden notwendige Apolipoprotein E, wodurch sie spontan atherosklerotische Plaques entwickeln, welche denen bei Menschen in vielen Aspekten ähneln.

Der prolymphangiogenetische Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C) geht eine Bindung mit seinem Rezeptor VEGF-Rezeptor-3 (VEGFR-3) ein, um die Neubildung von Lymphgefäßen zu ermöglichen. Atherosklerotisch veränderte aortale Gefäße zeigten eine erhöhte Expression von VEGF-C. Trotz erhöhter VEGF-C Expression beobachteten wir jedoch eine Regression von adventitialen Lymphgefäßen während der Entwicklung von Atherosklerose ( $P < 0.01$ ). Mit der Lymphregression, verringerte sich die Anzahl von Lymphgefäßendothel-Hyaluron-Rezeptor-1 (LYVE-1+) exprimierenden Makrophagen in der Adventitia von apoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit Atherosklerose ( $P < 0.01$ ), welchen bei der inflammationsassoziierten Lymphgefäßneubildung eine wesentliche Beteiligung beigemessen wird. Des Weiteren beobachteten wir intimale Lymphgefäße in atherosklerotischen Läsionen mit einem atypischen Phänotyp. Diese Gefäße exprimierten die Lymphgefäßmarker Podoplanin und VEGFR-3, wohingegen die Expression von LYVE-1 und Prospero-Homeobox-Protein-1 nicht zu beobachten war.

In Aorten von Mäusen mit Atherosklerose zeigte sich eine verstärkte Expression von nicht membrangebundenem VEGFR-2. VEGFR-2 wird in der Regel auf Blutendothel exprimiert und ist hauptsächlich Rezeptor für VEGF-A im Rahmen der Blutgefäßneubildung. Wir vermuten, dass das erhöhte nicht membrangebundene VEGFR-2 an VEGF-C bindet und dessen Wirkung somit blockiert. Dieser Fallenmechanismus könnte die Regression von adventitialen Lymphgefäßen trotz erhöhtem VEGF-C erklären. Regression von Lymphgefäßen vermindert die Drainage von Lipiden, Wachstumsfaktoren,

inflammatorischen Zytokinen und Immunzellen. Ineffiziente Drainage über Lymphgefäße könnte demzufolge zu einer Verstärkung der Atherosklerosebildung führen. Unsere Untersuchungen tragen zu neuen Einsichten über zuvor unbekannte dynamische Veränderungen von adventitialen Lymphgefäßen bei. Nichtmembrangebundenes VEGFR-2 in Atherosklerose ins Visier zu nehmen, könnte eine neue Strategie werden, endogenes VEGF-C freizusetzen, um so eine Regression von Lymphgefäßen zu verhindern.

## 2. Abstract in English

Inflammation is a key component of atherosclerosis. Lymphangiogenesis is a common feature of inflammatory processes. Yet the role of lymphatics in atherosclerosis is not understood. Here, we investigate lymphatic growth dynamics and marker expression in atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient (apoE<sup>-/-</sup>) mice, one of the most commonly used murine models of atherosclerosis. These mice lack apolipoprotein E an essential lipoprotein for the transport of lipids and thus develop spontaneous atherosclerotic lesions similar in many aspects to those found in humans.

The prolymphangiogenic growth factor, vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C), binds to its receptor vascular endothelial growth factor-3 (VEGFR-3) to promote lymphangiogenesis. VEGF-C was elevated in atherosclerotic aortic walls. Despite increased VEGF-C, we found that adventitial lymphatics regress during the course of formation of atherosclerosis ( $P < 0.01$ ). Similar to lymphatic regression, the number of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE-1<sup>+</sup>) macrophages decreased in the aortic adventitia of apoE<sup>-/-</sup>-mice with atherosclerosis ( $P < 0.01$ ), which are considered to play a crucial role in inflammation associated lymphangiogenesis.

Further we observed intimal lymphatics in atherosclerotic lesions, which exhibited an atypical phenotype. They expressed the lymphatic endothelial markers podoplanin and VEGFR-3 but not LYVE-1 and prospero homeobox protein 1.

In the aortas of atherosclerotic animals, we found markedly increased soluble VEGFR-2. VEGFR-2 is usually the main receptor for VEGF-A in the process of angiogenesis. We hypothesized that the elevated soluble VEGFR-2 that was found in the aortas of apoE<sup>-/-</sup>-mice with atherosclerosis binds to and diminishes the activity of VEGF-C. This trapping mechanism explains, despite increased VEGF-C in the atherosclerotic aortas, how adventitial lymphatics regress. Lymphatic regression impedes the drainage of lipids, growth factors, inflammatory cytokines, and immune cells. Insufficient lymphatic drainage could thus exacerbate atherosclerosis formation. Our study contributes new insights to previously unknown dynamic changes of adventitial lymphatics. Targeting soluble VEGFR-2 in atherosclerosis may provide a new strategy for the liberation of endogenous VEGF-C and the prevention of lymphatic regression.

### 3. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mahdi Taher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Interrelationship of angiogenesis and lymphangiogenesis in a murine model- Phenotypic transformation of intimal and adventitial lymphatics in atherosclerosis: a regulatory role for soluble VEGF receptor 2” selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

#### Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation :Taher M, Nakao S, Zandi S, Melhorn MI, Hayes KC, Hafezi-Moghadam A. Phenotypic transformation of intimal and adventitial lymphatics in atherosclerosis: a regulatory role for soluble VEGF receptor 2. FASEB J. 2016 Jul;30(7):2490-9. doi: 10.1096/fj.201500112. Epub 2016 Mar 22.

Ausarbeiten eines Status quo bezüglich der Fragestellung eines Zusammenhanges von Atherosklerose und Lymphangiogenese, mittels Literaturrecherche.

Wesentliche Beteiligung an der Ausarbeitung der Fragestellung und entsprechender Versuchsplanung.

Vorbereitung und Betreuung der Versuchstiere und Gewinnung aller Untersuchungsmaterialien.

Erstellung von Gefrierschnitten und deren Immunfluoreszenz-Färbung.

Wesentliche Beteiligung bei der Erstellung von Aorten-ganz-präparaten und deren Immunfluoreszenz Färbung. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und deren Auswertung.

Gewinnung von Blutplasma zur Bestimmung von Plasma-Cholesterin und Triglycerid Werten.

Anteilige Mitwirkung bei der Erstellung von Western Blots.

Wesentlicher Beitrag zur statistischen Auswertung und graphischen Gestaltung der Ergebnisse dieser Untersuchungen.

Wesentlicher Beitrag zur Erstellung des Manuskripts und dessen Überarbeitung im Rahmen des Revisions-Prozesses.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## 4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>  
Journal Citation Reports<sup>®</sup>

WELCOME ? HELP 2015 JCR Science Edition

**Journal Summary List** [Journal Title Changes](#)

Journals from: **subject categories BIOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

---

Journals 1 - 20 (of 86) Page 1 of 5

[MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#)

 << << [ 1 | 2 | 3 | 4 | 5 ] >> >>

*Ranking is based on your journal and sort selections.*

| Mark                                | Rank | Abbreviated Journal Title<br><i>(linked to journal information)</i> | ISSN      | JCR Data <sup>j</sup> |               |                      |                 |          |                 | Eigenfactor <sup>®</sup> Metrics <sup>j</sup> |                                      |
|-------------------------------------|------|---|-----------|-----------------------|---------------|----------------------|-----------------|----------|-----------------|---|--------------------------------------|
|                                     |      |   |           | Total Cites           | Impact Factor | 5-Year Impact Factor | Immediacy Index | Articles | Cited Half-life | Eigenfactor <sup>®</sup> Score                | Article Influence <sup>®</sup> Score |
| <input type="checkbox"/>            | 1    | <a href="#">BIOL REV</a>  | 1464-7931 | 8895                  | 10.725        | 12.028               | 3.141           | 64       | 9.2             | 0.01858                                       | 4.869                                |
| <input type="checkbox"/>            | 2    | <a href="#">PLOS BIOL</a>   | 1545-7885 | 25871                 | 8.668         | 10.731               | 2.437           | 183      | 7.1             | 0.07966                                       | 5.632                                |
| <input type="checkbox"/>            | 3    | <a href="#">PHYS LIFE REV</a>                                       | 1571-0645 | 1124                  | 8.615         | 8.885                | 22.455          | 11       | 3.8             | 0.00275                                       | 2.975                                |
| <input type="checkbox"/>            | 4    | <a href="#">ELIFE</a>   | 2050-084X | 7951                  | 8.303         | 8.533                | 2.620           | 408      | 1.7             | 0.06869                                       | 5.634                                |
| <input type="checkbox"/>            | 5    | <a href="#">BMC BIOL</a>  | 1741-7007 | 3908                  | 6.967         | 7.104                | 0.630           | 92       | 4.9             | 0.01610                                       | 2.977                                |
| <input type="checkbox"/>            | 6    | <a href="#">PHILOS T R SOC B</a>                                    | 0962-8436 | 34017                 | 5.847         | 7.224                | 2.581           | 360      | 7.5             | 0.07899                                       | 3.171                                |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 7    | <a href="#">FASEB J</a>   | 0892-6638 | 41645                 | 5.299         | 5.464                | 1.311           | 424      | 9.4             | 0.06404                                       | 1.878                                |
| <input type="checkbox"/>            | 8    | <a href="#">Q REV BIOL</a>  | 0033-5770 | 3473                  | 5.000         | 7.367                | 0.273           | 11       | >10.0           | 0.00273                                       | 3.673                                |
| <input type="checkbox"/>            | 9    | <a href="#">P ROY SOC B-BIOL SCI</a>                                | 0962-8452 | 41127                 | 4.823         | 5.366                | 0.962           | 599      | 8.3             | 0.09362                                       | 2.286                                |

## 5. Publikation

Phenotypic transformation of intimal and adventitial lymphatics in atherosclerosis: a regulatory role for soluble VEGF receptor 2.

Taher M, Nakao S, Zandi S, Melhorn MI, Hayes KC, Hafezi-Moghadam A.

FASEB J. 2016 Jul;30(7):2490-9. doi: 10.1096/fj.201500112. Epub 2016 Mar 22.

<http://dx.doi.org/10.1096/fj.201500112>



















## **6. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.





## 7. Publikationsliste Stand September 2016

1. [Lymphangiogenesis and angiogenesis: concurrence and/or dependence? Studies in inbred mouse strains.](#)

Nakao S, Maruyama K, Zandi S, Melhorn MI, Taher M, Noda K, Nusayr E, Doetschman T, Hafezi-Moghadam A.

FASEB J. 2010 Feb;24(2):504-13. doi: 10.1096/fj.09-134056. Epub 2009 Oct 26. Impact Factor 5.299

2. [VAP-1-mediated M2 macrophage infiltration underlies IL-1 \$\beta\$ - but not VEGF-A-induced lymph- and angiogenesis.](#)

Nakao S, Noda K, Zandi S, Sun D, Taher M, Schering A, Xie F, Mashima Y, HafeziMoghadam A.

Am J Pathol. 2011 Apr;178(4):1913-21. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.011. Erratum in: Am J Pathol. 2011 Jul;179(1):537.

Impact Factor 4.206

3. [Larger therapeutic window for steroid versus VEGF-A inhibitor in inflammatory angiogenesis: surprisingly similar impact on leukocyte infiltration.](#)

Nakao S, Zandi S, Lara-Castillo N, Taher M, Ishibashi T, Hafezi-Moghadam A.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Jun 5;53(7):3296-302. doi: 10.1167/iovs.11-8114. Impact Factor 3.427

4. [ROCK-isoform-specific polarization of macrophages associated with age-related macular degeneration.](#)

Zandi S, Nakao S, Chun KH, Fiorina P, Sun D, Arita R, Zhao M, Kim E, Schueller O, Campbell S, Taher M, Melhorn MI, Schering A, Gatti F, Tezza S, Xie F, Vergani A, Yoshida S, Ishikawa K, Yamaguchi M, Sasaki F, Schmidt-Ullrich R, Hata Y, Enaida H, Yuzawa M, Yokomizo T, Kim YB, Sweetnam P, Ishibashi T, Hafezi-Moghadam A.

Cell Rep. 2015 Feb 24;10(7):1173-86. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.050. Epub 2015 Feb 19.

Impact Factor 7.870

5. [Phenotypic transformation of intimal and adventitial lymphatics in atherosclerosis: a regulatory role for soluble VEGF receptor 2.](#)

Taher M, Nakao S, Zandi S, Melhorn MI, Hayes KC, Hafezi-Moghadam A.

FASEB J. 2016 Jul;30(7):2490-9. doi: 10.1096/fj.201500112. Epub 2016 Mar 22.

Impact Factor 5.299

## 7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich PD Dr. rer. nat. Kerstin Danker für ihre stets unkomplizierte Unterstützung und Betreuung meinen ausdrücklichen Dank aussprechen. Sie stand mir ausnahmslos hilfsbereit zur Seite und scheute keine Zeit und Mühe, mich zu unterstützen.

Dr. Hafezi-Moghadam danke ich für die herzliche Aufnahme in seinem Labor und die inspirierende Leitung während meiner Forschungsaufenthalte in Boston. Sein Enthusiasmus, seine visionäre Sicht und Neugier sind mir prägendes Vorbild geblieben.

Shintaro Nakao ist mir ein unvergesslicher Mentor zu dessen Fleiß, Genialität und Loyalität ich stets emporschaue. Ich hoffe, dass seine Weisheiten durch mein zukünftiges Wirken weiter zum Tragen kommen.

Einen besonderen Dank möchte ich Dr. Fritz Fellmer für seine Motivation aussprechen, die mir immer wieder Antrieb gab dieses Projekt abzuschließen und mir meine Ziele durch seinen Scharfsinn und seine Dynamik greifbarer machten.

Meinen Eltern, meiner Frau, meiner Familie und meinen Freunden gilt besonderer Dank für ihre offenen Ohren und Herzen, welche mir immer Halt schenken.