

Aus der Richard Thoma Laboratorien für Arteriogenese
Center for Cardiovascular Research (CCR)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung des Mechanismus der Bradykinin
Rezeptor 1 vermittelten peripheren Arteriogenese im
Hinterlauf-Ligaturmodell der Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Meijing Li

aus der VR. China

Datum der Promotion: 27.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt.....	I
Abstract.....	II
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Die Formen des Gefäßwachstums	- 2 -
1.1.1 Vaskulogenese	- 3 -
1.1.2 Angiogenese	- 3 -
1.1.3 Arteriogenese.....	- 6 -
1.2 Mechanismus der Arteriogenese	- 6 -
1.2.1 Entdeckung der Arteriogenese.....	- 6 -
1.2.2 Prinzip der Arteriogenese	- 7 -
1.2.3 Zeitlicher Verlauf der Arteriogenese.....	- 10 -
1.3 Kallikrein-Kinin-System	- 12 -
1.3.1 Bradykinin Rezeptor 1 (B1R) und Bradykinin Rezeptor 2 (B2R) -	14 -
1.3.2 Die Bedeutung des B1R für das Gefäßwachstum	- 17 -
1.4 Studienziel	- 19 -
2. Material und Methoden	- 20 -
2.1 Übersicht.....	- 20 -
2.2 Versuchstiere	- 20 -
2.2.1 Tierversuchsgenehmigung.....	- 21 -
2.2.2 Tiermodell	- 21 -
2.2.3 Operation	- 21 -
2.3 Laser-Doppler-Imaging (LDI)	- 23 -
2.3.1 Prinzip vom Laser-Doppler-Imaging	- 23 -
2.3.2 Quantifizierung des Blutflusses in Füßen im Mausmodell mittels Laser-Doppler-Imaging	- 24 -
2.4 Auswertung der Fußfunktion nach Femoralarterienligatur (FAL).....	- 25 -
2.5 Gewebeentnahme und Histologie.....	- 26 -
2.5.1 Probenvorbereitung	- 26 -

2.5.2 Herstellung von Gewebeschnitten	- 27 -
2.5.3 Immunhistologische Färbung.....	- 28 -
2.5.4 Quantifizierung des kollateralen Arterienwachstums	- 29 -
2.6 Knochenmarktransplantation	- 30 -
2.6.1 Generierung der Knochenmarks-chimären Mäuse	- 30 -
2.6.2 Generierung der Maus-Chimären mit Gen für grün Fluoreszierendes Protein (GFP)	- 31 -
2.6.3 Femoralarterienligatur im Mausmodell.....	- 32 -
2.6.4 Messung der kollateralen Konduktanz.....	- 33 -
2.6.5 Untersuchung der Einwanderung der aus dem Knochenmark stammenden Leukozyten.....	- 34 -
2.7 Statistische Analyse	- 35 -
3. Ergebnisse.....	- 36 -
3.1 Evaluierung der peripheren Perfusionserholung mittels Laser Doppler basierte Flussmessung (LDF).....	- 36 -
3.1.1 Perfusionsmessung vor und nach Femoralarterienligatur.....	- 36 -
3.1.2 Messung der peripheren Perfusionserholung vom Tag 1 bis Tag 7 nach Femoralarterienligatur	- 37 -
3.2 Auswertung der Fußfunktion vom Tag 1 bis Tag 7 nach Femoralarterienligatur.....	- 39 -
3.3 Immunhistologische Auswertung der Arteriogenese	- 41 -
3.3.1 Morphologie der Kollateralarterien.....	- 42 -
3.3.2 Vergleich des kollateralen Arterienwachstums in WT und B1R Knockout (B1R ^{-/-}) Mäusen	- 43 -
3.4 Knochenmarktransplantation	- 45 -
3.4.1 Auswertung des kollateralen Perfusionsindexes (CPI) in Knochenmarks-chimären Mäusen nach Femoralarterienligatur	- 45 -
3.4.2 Transmigration von Leukozyten in den perivaskulären Bereich von Kollateralarterien im Femoralisligatur Mausmodell nach Knochenmarktransplantation	- 47 -

4. Diskussion	- 49 -
4.1 Tiermodell	- 49 -
4.2 Laser Doppler basierte Flussmessung.....	- 51 -
4.3 Auswertung der Fußfunktionsbeeinträchtigung nach FAL.....	- 53 -
4.4 Immunhistologische Analyse.....	- 54 -
4.5 Mechanismen der B1R Signalwirkung für die Arteriogenese	- 57 -
4.5.1 Knochenmarktransplantation	- 57 -
4.5.2 Die Mikrosphären-basierte Technik.....	- 58 -
4.5.3 Mechanismus der B1R vermittelten Arteriogenese	- 59 -
4.6 Klinische Bedeutung der Rolle des B1R für Arteriogenese	- 63 -
5. Zusammenfassung	- 66 -
6. Literaturverzeichnis.....	- 69 -
7. Abkürzungsverzeichnis	- 77 -
8. Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung.....	- 80 -
9. Lebenslauf	- 82 -
10. Publikationsliste	- 83 -
11. Danksagung	- 84 -

Abstrakt

Arteriogenese bezeichnet das Wachstum von präexistenten Kollateralarteriolen und den Kompensationsmechanismus nach Okklusion einer großen Hauptarterie. Diese Studie konzentriert sich auf die Analyse der Rolle des Bradykinin Rezeptor 1 (B1R) in der Arteriogenese und auf die Regulation der B1R vermittelten Arteriogenese durch Leukozyten. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein Arteriogenese-Femoralisligatur Modell im Hinterlauf von C57BL/6 Mäusen etabliert.

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit lieferten dabei drei grundlegende Ergebnisse:

1). Die hämodynamischen Daten zeigten, dass ab Tag 1 nach Femoralarterienligatur (FAL) rechts die Wildtyp (WT) Mäuse eine signifikant bessere Perfusionserholung im ligierten Hinterlauf zeigten, als die Bradykinin Rezeptor 1 *Knockout* (B1R^{-/-}) Mäuse. Die maximale Perfusionsdifferenz zwischen den beiden Mäusen Gruppen wurde am postoperativen Tag 7 beobachtet.

2). Die immunhistologische Analyse der Adduktorenmuskeln in Hinterläufen zeigte, dass 7 Tage nach FAL rechts die Diameter der Kollateralarterien in ligierten Hinterläufen in WT Mäusen - im Vergleich zu B1R^{-/-} Mäusen - signifikant anwachsen. Jedoch hatte sich die Dichte der Kollateralarterien 7 Tage nach FAL rechts in den ligierten und nicht-ligierten Adduktorenmuskeln in beiden Mäusen-Gruppen nicht verändert.

3). Zur Erklärung der funktionellen Rolle von zirkulierenden Blut-Leukozyten bei der B1R vermittelten Arteriogenese wurde ein Knochenmark-chimäres Mausmodell aus WT und B1R^{-/-}-Mäusen in einem Crossover-Design generiert. Nach Knochenmarktransplantation von WT Mäusen und 7 Tage nach FAL rechts nahm die kollaterale Konduktanz im ligierten Hinterlauf in chimären

Mäusen deutlich zu, während die kollaterale Konduktanz in chimären Mäusen mit Knochenmark von B1R^{-/-}-Mäusen deutlich sank. In GFP-Reporter-Chimären wurde gezeigt, dass 3 Tage nach FAL rechts die GFP-positiven Leukozyten (GFP-Leukozyten haben hier einen WT-Phänotyp und sind somit B1R-positiv) im perivaskulären Bereich der wachsenden Kollateralarterien akkumulierten; die Anzahl der akkumulierten GFP-positiven Leukozyten in beiden Chimären Gruppen (GFP/WT-Chimären *versus* GFP/B1R^{-/-}-Chimären) war hierbei nicht signifikant unterschiedlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die B1R Signal-Wirkung über die Rekrutierung von B1R positive Leukozyten erfolgt, welche dann eine entscheidende regulatorische Funktion für das Kollateralwachstum ausüben. Eine Aktivierung von B1R positiven Leukozyten zur therapeutischen Stimulation der peripheren Arteriogenese bietet somit neue Grundlagen für potenzielle Therapiestrategien für periphere arterielle Verschlusskrankheit.

Schlagwörter: Arteriogenese, Bradykinin Rezeptor 1, Leukozyten

Abstract

Arteriogenesis refers to the adaptive outward growth of pre-existing collateral arterioles and is considered as an efficient compensation mechanism after occlusion of a major artery. This study focused on analysis of the roles of bradykinin receptor 1 (B1R) in arteriogenesis and the role of leukocytes in regulation of B1R-modulated-arteriogenesis. For this purpose a hindlimb femoral artery ligation model was established in C57BL/6 mice, in which arteriogenesis was induced through occlusion of the right femoral artery (FAO) in hindlimb.

The research in this study provided three basic results:

- 1). The hemodynamic data shows that the blood flow in ligated hindlimb is better recovered in wild-typ (WT) mice than in B1R *knockout* mice (B1R^{-/-}) since already 1 day post FAO. The maximum difference in blood flow recovery between the two groups was detected 7 days after femoral artery ligation.
- 2). Immunohistological staining of adductors in ligated hindlimbs demonstrated a significant diameter increase of collateral arteries 7 days after femoral artery ligation in WT mice as compared to that in B1R^{-/-} mice. However, the density of collateral arteries 7 days after femoral artery ligation did not change in ligated and non-ligated adductors in both mice groups.
- 3). To explain the functional role of circulating leukocytes in B1R-mediated arteriogenesis, a bone marrow (BM)-chimeric mouse model was generated from WT and B1R^{-/-} mice in a cross-over design. After BM transplantation from WT mice and 7 days after femoral artery ligation, the collateral conductance in the ligated hindlimb in chimeras rose significantly, while the collateral conductance in chimeric mice with BM from B1R^{-/-} mice was significantly reduced. It was shown in GFP-reporter chimeras, that 3 days after femoral artery ligation the GFP-positive leukocytes (GFP leukocytes have a WT

phenotype and are thus B1R-positiv) accumulated in the perivascular area of growing collateral arteries. The number of accumulated GFP-positive leukocytes in both chimeric mice (GFP/WT chimeras vs GFP/ B1R^{-/-} chimeras) was here not significantly different.

The results of this study indicate that the B1R signaling plays a crucial role in the collateral growth through recruiting B1R positive leukocytes. Therapeutic stimulation of peripheral arteriogenesis through the activation of B1R positive leukocytes provides new approaches for potential therapeutic strategies in peripheral arterial occlusive diseases.

Keywords: arteriogenesis, bradykinin receptor 1, leukocytes

1. Einleitung

Die Folgen von okklusiven kardiovaskulären Erkrankungen (Herzinfarkt, Schlaganfall) gehören in den industrialisierten Ländern zu der häufigsten Todesursache. In den westlichen Industrieländern stirbt alle 34 Sekunden ein Mensch an den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Nicht alle kardiovaskulären Erkrankungen führen zum Tode und werden durch solche Statistiken erfasst, sondern können wie im Falle der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führen. In Deutschland leiden heute bereits etwa 15-20% der über Siebzigjährigen an verschiedenen Stadien der pAVK [1, 2]. Angesichts der alternden Gesellschaft wird sich die Problematik von gefäßbedingten Erkrankungen nach Meinung der führenden Experten noch weiter verschärfen.

Trotz der dramatischen Zahlen und großer Anstrengungen im Bereich der bio-medizinischen Forschungen gibt es noch immer wenige Therapiekonzepte um kardiovaskuläre Verschlusskrankheiten nachhaltig zu heilen oder präventiv entgegenzuwirken. Aktuell bestehen neben der konservativen medikamentösen Maßnahme [3] die invasive revaskularisierende Therapie wie perkutane Koronarintervention (PCI), perkutane transluminale Angioplastie (PTA) und Bypassoperationen [4, 5]. Diese interventionellen und operativen Maßnahmen haben sich in den letzten Jahrzehnten weiter entwickelt und können heute bei Patienten unter niedrigem Risiko durchgeführt werden. Dennoch kommen sie aufgrund von schweren Komorbiditäten oder ungünstigen anatomischen Gefäßsituationen für ca. 1/5 der Patienten [6] mit kardiovaskulären Verschlusskrankheiten nicht in Betracht. Diese rein symptomatischen Therapien können jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass derzeit keine zufriedenstellende prophylaktische Behandlungsstrategie existiert. Die therapeutische Stimulierung der adaptiven Arteriogenese soll zukünftig als wichtiges neues Therapiekonzept ausgebaut werden, um präventiv ein klinisches Ereignis wie den Herzinfarkt oder

Schlaganfall zu verhindern. Bei der sogenannten Arteriogenese erfolgt eine Größenzunahme präexistenter kollateralarterieller Anastomosen durch Zellproliferation und Gefäßumbau (Remodeling) [7]. Zahlreiche *In-vitro*- und *In-vivo*-Forschungen haben in den letzten Jahren zu einem umfassenden Verständnis der Grundmechanismen der Arteriogenese geführt.

1.1 Die Formen des Gefäßwachstums

Um erfolgreich Revaskularisationsstrategien umzusetzen, ist es wichtig die unterschiedlichen Formen des Gefäßwachstums zu verstehen. Im Allgemeinen unterscheidet man drei verschiedene Formen des Gefäßwachstums (Abb. 1): Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese [8].

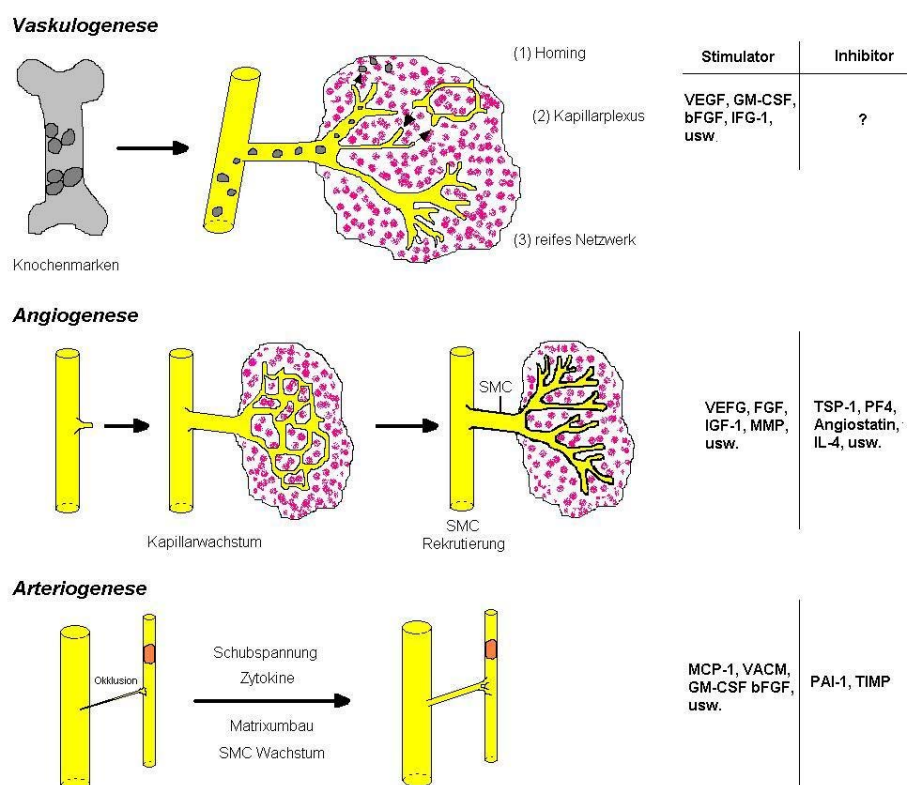


Abb. 1 Schematische Darstellung unterschiedlicher Formen des Gefäßwachstums. Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese. (entnommen aus Carmeliet P, 2000 [9])

1.1.1 Vaskulogenese

Vaskulogenese bezeichnet die De-novo-Entstehung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten). Sie beginnt mit der Ausbildung der als „Blutinseln“ bezeichneten Zellaggregaten, die von Hämangioblasten aus den mesodermalen Zellen des Dottersacks gebildet werden. Die Hämangioblasten bilden den gemeinsamen Ursprung für die randständigen endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) und die zentral gelegenen hämatopoetischen Stammzellen [10]. CD31, CD34 und Tyrosine-Kinase-Rezeptor Typ 2 von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-R2) [11] werden als die frühesten gemeinsamen Marker von Endothelzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen identifiziert. Durch die Differenzierung und Fusion von endothelialen Vorläuferzellen bilden sich die primitiven vaskulären Netzwerke [12].

Bereits um 1900 wurde gezeigt, dass Vaskulogenese in der frühen Embryogenese stattfindet [13]. Durch den Nachweis der Existenz zirkulierender endothelialer Progenitorzellen (EPC) [14] im adulten Organismus wurde angenommen, dass Vaskulogenese auch im Erwachsenenalter auftritt.

1.1.2 Angiogenese

Der Begriff *Angiogenese* wurde 1935 von Hertig [15] für die Beschreibung des Plazenta Gefäßwachstums eingeführt. Im Jahr 1971 kategorisierte Folkman Angiogenese als ein Prozess der Neovaskularisation während des Tumorwachstums [16]. Heutzutage beschreibt *Angiogenese* die Formierung der neuen Kapillaren aus präexistenten Mikrogefäßen [17] und sie spielt im Wesentlichen eine Rolle bei der Versorgung der ischämischen Gewebe durch lokale Neovaskularisierung. Angiogenese wird dabei mechanistisch über einen Prozess der endothelialen Aussprossung (sprouting angiogenesis) und durch

intussuszeptives mikrovaskuäres Wachstum (Intussusceptive microvascular growth, IMG) (intussusceptive angiogenesis) gesteuert.

Als initialer Schritt wird die Angiogenese durch Gewebhypoxie induziert, wodurch es zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Hypoxie-induzierbare Faktoren, HIFs) wie HIF-1 β , HIF-1 α und HIF-2 α kommt. HIFs binden an spezifischen DNA Sequenzen wie das Hypoxie-responsive Element (HRE) [18] und regulieren dann die Transkription von unterschiedlichen regulatorischen Genen, welche die Neovaskularisierung steuern. Zusätzlich kommt es bei den durch Hypoxie aktivierten Endothelzellen zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). NO induziert zum einen eine NO-modulierte-Vasodilatation der Muttergefäße und zum anderen die Aktivierung von VEGF [19]. VEGF ist maßgeblich an der Regulation der Neovaskularisierung beteiligt und führt zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität (VEGF=VPF, vascular permeability factor) [20, 21], welches die Sezernierung weiterer regulatorischer Proteine begünstigt (z.B. Bildung eines Gerüsts für die Zellmigration).

Im weiteren Verlauf der Angiogenese wird die Basalmembran abgebaut, um Platz für neue wachsende Kapillare zu bilden. Der Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix ist ein streng regulierter Prozess, der von Proteasen und antagonistischen Protease-Hemmern abhängig ist. Hier regulieren unterschiedliche Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) [22, 23], Chymase, Heparanase und Serin-Protease den Umbauprozess. Letzlich löst Angiopoietin-2 die Verbindung zwischen Endothelzellen ab und lockert somit die Periendothelmatrix. Der Auflockerung der Gefäßstruktur folgt die Proliferation von Endothelzellen durch die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren wie Plazenta Wachstumsfaktor (PlGF), Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF), Platelet Derived Growth Faktor (PDGF) [24] sowie VEGF und seiner Rezeptoren. Die Migration der proliferierenden

Endothelzellen wird durch chemotaktische Faktoren reguliert, welche im Folgenden von verschiedenen Zellen wie Fibroblasten, Monozyten, Mastozyten usw. sezerniert werden. Letztendlich beendet NO die durch Wachstumsfaktoren induzierte Proliferation der Endothelzellen und fördert die Gefäßbildung [25]. Die Gefäßbildung wird durch die Ausdünnung der Endothelzellen ausgelöst. Die Wände der Kapillare bilden sich durch die Wirkung von VEGF, Angiotensin-1 und Integrine ($\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$) [26] und die neu entwickelten Kapillaren können einen Durchmesser von 5 μm bis 8 μm erreichen. Nach dem Umbau der neu formierten Kapillaren entsteht endlich ein strukturiertes kapilläres Netzwerk.

In den letzten Jahren hat die Strategie der therapeutischen Angiogenese zur Verhinderung der Minderperfusion in gefährdeten Geweben große Aufmerksamkeit erhalten [27]. Obwohl am Anfang viel versprechende Ergebnisse aus kleinen, nicht-kontrollierten Studien bei Patienten mit pAVK [28, 29] und koronarer Herzkrankheit (KHK) [27, 30] erzielt wurden, konnten diese Ergebnisse leider nicht in den nachfolgenden Placebo-kontrollierten multizentrischen Studien bestätigt werden. Es scheint dass die therapeutische Angiogenese nicht zielführend ist, um die Minderperfusionsen in gefährdeten Geweben zu verhindern. Die Ursache hierfür könnte sein, dass Angiogenese nur zur Bildung kapillärer Netzwerke anstelle der notwendigen großen Konduktanzarterien führt. Gemäß dem Gesetz von Hagen-Poiseuille (Abb. 2) ist der arterielle Fluss von der vierten Potenz des Gefäß-Radius abhängig.

$$\dot{V} = \frac{dV}{dt} = \frac{\pi \cdot r^4 \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot l}$$

Abb. 2 Hagen-Poiseuillesches Gesetz für die Rohrströmung.

\dot{V} : Volumenstrom durch das Rohr, r: Innenradius des Rohres, ΔP : Druckdifferenz, l: Länge des Rohres, η : Blutviskosität.

Dies bedeutet, dass wenn eine Konduktanzarterie ersetzt werden soll, müsste eine enorme Menge von Kapillaren (Durchmesser ca. 10 μm) erforderlich sein,

um den Blutfluß in dem zu versorgenden Funktionsgewebe zu kompensieren. Als Resultat der Angiogenese wäre der Fluss in dem kapillaren Netzwerk nicht erhöht, sondern aufgrund eines größeren Gefäßwiderstandes reduziert. Die Bedeutung der Angiogenese liegt daher vielmehr auf einer Funktion zur lokalen Versorgung innerhalb des hypoxischen Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen. Hingegen kann der Verschluss einer Hauptarterie durch Angiogenese nicht kompensiert werden, woraus sich die Probleme und die mangelnden Erfolge bei den klinischen Pilotstudien zur therapeutischen Angiogenese erklären [31].

1.1.3 Arteriogenese

Der Begriff *Arteriogenese* bezeichnet die Umstrukturierung (Remodelling) und Proliferation von präexistenten kollateralen Arteriolen zu funktionellen größeren Arterien. Dieser Begriff hat sich zur Abgrenzung des Kollateralarterienwachstums von der Angiogenese durchgesetzt und unterscheidet sich in grundlegenden physiologischen Prozessen [32]. Arteriogenese findet im nicht-ischämischen Milieu abseits der Gewebshypoxie statt. Die Tierexperimenten der transienten Femoralarterienokklusion verdeutlichen die Unterschiede und hier sieht man, dass es zu einer Gewebe-Ischämie und Angiogenese im distalen Hinterlauf kommt, während Arteriogenese bei erhöhter Flussschubspannung im Oberschenkel auf der Höhe der Femoralarterienokklusion stattfindet (hier wurden keine erhöhte Ischämie marker gefunden) [33].

1.2 Mechanismus der Arteriogenese

1.2.1 Entdeckung der Arteriogenese

Bereits im 17. Jahrhundert beschrieb der englische Anatom Richard Lower (1631–1691) die Funktion der Arteriogenese als alternativen Perfusionsweg im Falle einer Gefäßokklusion. Im Jahr 1893 veröffentlichte der deutsche Anatom Richard Thoma [34] das sogenannte „Gesetz der

Histomechanismen“, welches das Verhältnis zwischen der Arteriengröße und der Blutflussgeschwindigkeit beschreibt. Gemäß diesem Gesetz verkleinern sich große Gefäße bei wenig Durchfluss, während die kleinen Gefäße bei erhöhtem Durchfluss wachsen. Dadurch wurde der Mechanismus des kollateralen Arterienwachstums eigentlich schon erkannt. Zwischen 1956 und 1965 demonstrierte Fulton [35, 36], dass unabhängig von einer bestehenden okklusiven Gefäßerkrankung die kollateralen Verbindungen zwischen Koronararterien bei Menschen in großer Zahl vorhanden sind. Im Jahr 1971 wurde von Wolfgang Schaper [37] erstmals gezeigt, dass die Entwicklung von präexistenten Kollateralarteriolen hin zu großen Konduktanzarterien, Gewebeischämien im Myokard verhindern können. Bei diesem Prozess kommt es nach Verschluss eines Gefäßes nicht nur zu einer rein passiven Vasodilatation, sondern einer aktiven Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen.

1.2.2 Prinzip der Arteriogenese

Arteriogenese (Abb. 3) beschreibt das Wachstum von präexistenten Arteriolen zu großen Konduktanzarterien in Reaktion auf einen Anstieg der intravaskulären Schubspannung (Shear stress). Dieser Prozess wird durch eine komplexe Kaskade von aufeinanderfolgenden Mechanismen kontrolliert.

Nach einem akuten Verschluss oder einer hochgradigen Stenose eines Hauptgefäßes entsteht ein Druckgradient zwischen dem prästenotischen Hochdruckgebiet und dem poststenotischen Tiefdruckgebiet. Entlang dem Druckgradient wird der Blutfluss in den präexistenten Kollateralarteriolen mit erhöhter Durchflussgeschwindigkeit geleitet [38], wodurch eine deutlich erhöhte Schubspannung auf Endothel des kollateralen Netzwerks erzeugt wird. Die nachhaltige Schubspannungserhöhung führt zur morphologischen und biochemischen Aktivierung der Endothelzellen der Kollateralgefäßwand und wurde als initialer Auslöser der Arteriogenese identifiziert [39]. Die nun

aktivierten Endothelzellen schwellen an und bilden vermehrt Chemokine wie Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), welches zur Rekrutierung von Monozyten und Proliferation der glatten Muskelzellen führt [40]. Gleichzeitig wird an der Zelloberfläche eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie vaskulär-zelluläres Adhäsionsmolekül (VCAM), interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 und -2 (ICAM-1 und ICAM-2) [41] sowie Zytokinen wie transformierender Wachstumsfaktor (TGF)- β induziert. Dies führt zu einer gesteigerten Chemoattraktion von mononukleären Zellen und somit Anlockung dieser aus dem Blut. Sie adhäreren zunächst an der Gefäßwand, transmigrieren anschließend durch die Gefäßwand, sodass sie in den perivaskulären Raum eintreten können [42]. Die eingewanderten Monozyten differenzieren sich dann zu Makrophagen und sezernieren verschiedene Zytokine wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) [43], MCP-1, Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) [44], basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) [43, 45, 46], welche für weitere Aktivierungskaskaden des Endothels, der glatten Muskelzellen und Monozyten bedeutsam sind. TNF- α generiert das notwendige lokal-inflammatorische Milieu, TGF- β [47] führt zur Freisetzung der weiteren Wachstumsfaktoren wie Blutplättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) und bFGF, MCP-1 fördert erneut die Einwanderung von weiteren Monozyten [40]. MMPs sind die primären proteolytischen Enzyme, sie verdauen die Extrazellulärmatrix, um den notwendigen Raum für die wachsenden Kollateralarterien zu bilden [48]. VEGF-A [49] und FGF-2 [50] fördern die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen [51, 52], welche die wesentlichen Prozesse von Arteriogenese sind.

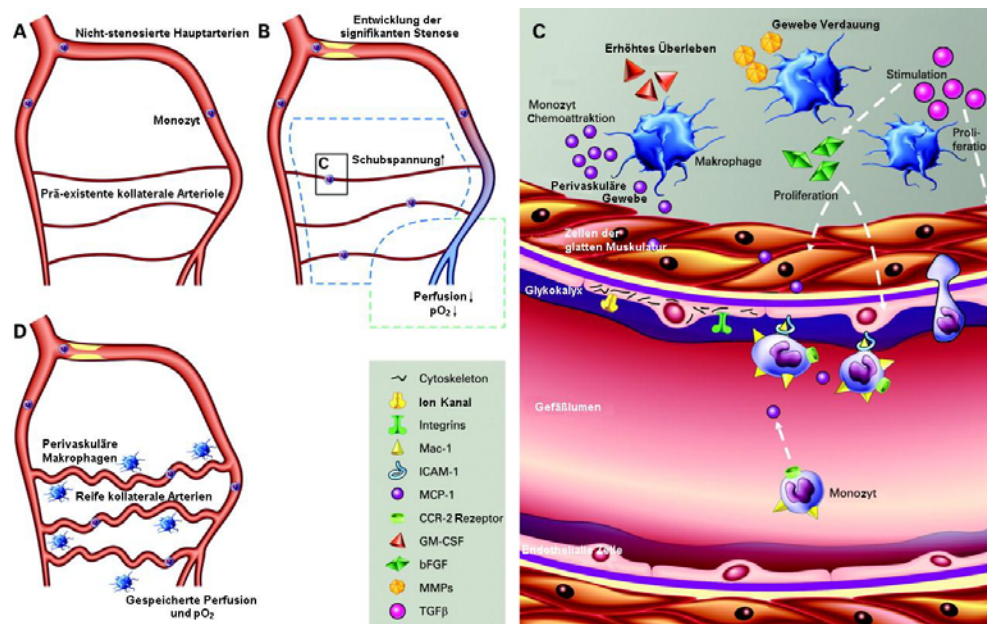


Abb.3 In der Ausgangssituation [A] verläuft der Blutfluss in die Hauptarterie; in den präexistierenden kollateralen Anastomosen existiert nur ein geringer Blutfluss. Bei Stenosierung einer größeren Arterie kommt es zur Bildung eines Druckgradientes über die Kollateralarteriolen [B]. Der daraus resultierende erhöhte Blutfluss und die aufs Endothel wirkende Schubspannung aktivieren kollateralarterielle Endothelzellen über membranständige Rezeptoren, über das endotheliale Zytoskelett, sowie durch Ionenkanäle der Zellmembran. In Folge kommt es zu einer Chemokin-Expression und der Rekrutierung von Monozyten, die über das Adhäsionsmolekül Mac-1 an ICAM-1 der Endothelzelle adhären, in den perivaskulären Raum transmigrieren und Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen sezernieren [C]. Die Zellproliferation und das Größenwachstum der Kollateralarterien stellen den Blutfluss und die Sauerstoffsättigung im distalen Gewebe wieder her [D] (Abbildung aus Schirmer SH [53])

Durch Proliferation der Endothelzellen und glatten Muskelzellen kann der Durchmesser der sich neu entwickelnden Kollateralgefäße von 30-50 μm bis zu 25-fach erhöhen [54, 55]. Während die Perfusion nach der Okklusion stark eingeschränkt ist, kann tierexperimentell das Wachstum der Kollateralarterien bis zu einer 60%-igen Wiederherstellung der Ausgangsperfusion führen. Wenn sich der Druckgradient über die kollateralen Arterien, infolge des zunehmenden Durchmessers, normalisiert, nimmt die Flussgeschwindigkeit und demzufolge nimmt auch die Schubspannung als treibende Kraft ab. Über diese negative Feedback Situation reguliert sich das kollaterale Gefäßwachstum selber.

1.2.3 Zeitlicher Verlauf der Arteriogenese

Die Entwicklung von präexistenten Kollateralarteriolen in eine reife Konduktanzarterie in der Arteriogenese lässt sich in vier Phasen (Initialphase, Proliferationsphase, Synthese / Migrationsphase und Reifungsphase) einteilen [42].

Direkt nach Gefäßokklusion werden in der Initialphase (~1 Tag nach Gefäßokklusion) die Endothelzellen durch erhöhte Schubspannung aktiviert (das aktivierte Endothel ist durch Schwellung und Ödeme gekennzeichnet). Transkriptionsfaktoren werden innerhalb von 30 Minuten hochreguliert [42] und vermitteln eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Zirkulierende Monozyten werden durch MCP-1 angelockt und binden mittels ihres Lymphozyten-Funktions-assoziierten Antigen 1 (LFA-1) an Integrin Rezeptoren des Endothel.

Die Proliferationsphase (1-3 Tage nach Gefäßokklusion) beginnt mit Lockerung der interzellulären Verbindungen zwischen glatten Muskelzellen. Danach folgt ein Anstieg der Permeabilität der Endothelzellen durch VEGF. Die zirkulierenden Monozyten wandern dann durch die Gefäßwand ein und akkumulieren in der Adventitia und in dem perivaskulären Raum der Kollateralarterien. Der GM-CSF schafft nun ein proliferatives Umfeld für die akkumulierenden Monozyten. Nach Umwandlung zu Makrophagen produzieren diese Zellen weitere Wachstumsfaktoren wie FGF-2 und VEGF und Zytokine wie TNF- α . Dieses inflammatorische Milieu lockt weitere Entzündungszellen an. Nach ungefähr 3 Tagen in der Proliferationsphase erreicht die mitotische Aktivität des Endothels und der glatten Muskelzellen ihr Maximum, wobei die Mitose der Endothelzellen und der glatten Muskelzellen ca. um einen Tag vorausgeht.

Die Synthese / Migrationsphase (3-14 Tage nach Gefäßokklusion) ist durch die Herunterregulation der mitotischen Aktivität über Initiierung der synthetischen und proteolytischen Aktivität der glatten Muskelzellen gekennzeichnet. Dabei kommt es in den glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Degeneration kontraktile Elemente (z.B. SM-Actin) und einer verstärkten Ausprägung des endoplasmatischen Retikulums. Die Lamina elastica interna als Hauptbarriere für die Zellmigration wird durch die elastolytischen Enzyme verdaut und zerstört. Die glatten Gefäßmuskelzellen verlassen die Media und wandern in den subendothelialen Raum ein und bilden eine neue Lamina elastica interna (Neointima) aus [8]. Über verminderte Aktivität von Gewebehemmer der Matrix-Metalloproteinasen (TIMPs) und vermehrter Expression von MMPs wird die Wirkung der MMPs verstärkt, die das perivaskuläre Gewebe auflockern und ein Größenwachstum des Gefäßes erst möglich machen [54].

In der folgenden Reifungsphase (14-21 Tage nach Gefäßokklusion) wird das wachsende Kollateralgefäß durch die Neointima sowie Matrixproteine stabilisiert. Die glatten Muskelzellen wandeln sich in dieser Phase wieder von einem undifferenzierten - proliferativen Phänotyp in einen ausdifferenzierten - kontraktile Phänotyp um. Der zunehmende Kollagengehalt zwischen glatten Muskelzellschichten und das übermäßige Längenwachstum der neu entstandenen Kollateralgefäße führen zu einer typischen „Korkenzieher – Morphologie“. Aufgrund eines höheren Widerstands ist der Blutfluss in kleinen Kollateralen eingeschränkt. Im Gegensatz dazu fließt in den größeren Kollateralen mit geringerem Widerstand mehr Blut. Daher kann in dieser Phase auch eine Regression kleinerer Kollateralen und der Reifeprozess der größeren Kollateralarterien gleichzeitig beobachtet werden [56].

1.3 Kallikrein-Kinin-System

Mehrere Vorarbeiten deuteten darauf hin, dass das Kallikrein-Kinin-System (KKS), und die Bradykinin Rezeptor Signalwege, von großer Bedeutung für das arterielle Gefäßwachstum ist. Im Folgenden sollen daher die Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems kurz beschrieben und die Zusammenhänge mit dem vaskulären Gefäßwachstum erleutert werden.

Das KKS übernimmt im Menschen viele biologische Funktionen und spielt eine wichtige Rolle bei der kardiovaskulären Homöostase, Nozizeption, Inflammation und Angiogenese [57]. Das KKS umfasst im Wesentlichen (Abb. 4): (1) Kininogen (das Substrate), (2) Kallikrein, (3) Kinine (vasoaktive Peptide), (4) Kininase (Kinin abbauende Enzyme), und die (5) Bradykinin-Rezeptoren (Bradykinin Rezeptor 1 und 2).

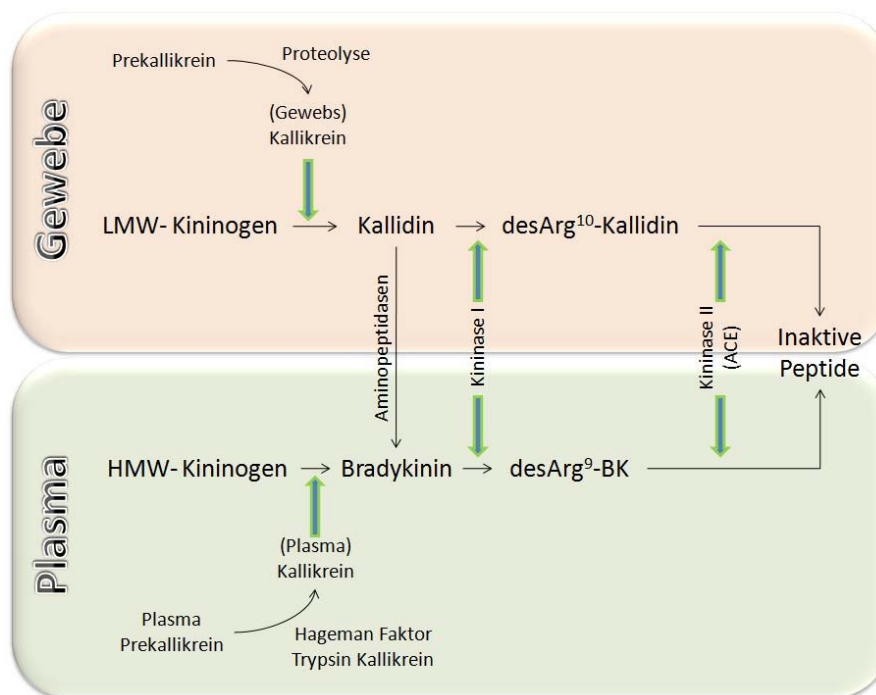


Abb. 4 Das Kallikrein-Kinin-System (entnommen aus Sharma JN [58])

Kininogene werden hauptsächlich in der Leber gebildet und später ins Blut abgegeben, wo sie als Komplex mit der Proteasevorstufe Präkallikrein

zirkulieren. Im Plasma werden zwei Arten von Kininogen gefunden und beschrieben: das hochmolekulare Kininogen (high molecular weight kininogen, HMWK) und das niedermolekulare Kininogen (low molecular weight kininogen, LMWK) [59]. Beide Kininogene sind single-chain Glykoproteine, die aus einem identischen amino-terminalen Abschnitt mit vier Domänen und einem divergenten carboxyl-terminalen Abschnitt mit 6 Domänen bestehen. Die beiden Kininogene unterscheiden sich lediglich im C-terminalen Bereich. Etwa 15-20% der gesamten Plasma Kininogene sind in HMW Form und ist hier unter anderem Bestandteil des endogenen Gerinnungssystems und beteiligt sich an der Aktivierung des Faktors XI. LMWK wird hingegen hauptsächlich in vielen verschiedenen Körpergeweben gebildet und beteiligt sich an inflammatorischen Prozessen, wie z.B. bei Gewebeerletzungen [60]. Hillmeister *et al* identifizierte Gewebe-Kininogen als einen molekularen Marker der Arteriogenese und es zeigte eine starke expression in wachsenden kollateralen Gefäßen der Ratte [61].

Kallikreine werden als inaktive Vorstufen (Präkallikreine) sezerniert, die im Blutplasma und bei Bedarf durch den aktivierten Hageman-Faktor (Faktor XIIa) in Kallikrein überführt werden [62]. Kallikrein ist eine Kininogenase, die aus Kininogen durch Proteolyse aktive Kinine freisetzt. Kallikreine lassen sich hierbei ebenso in Gewebekallikrein (Tissue-Kallikrein, TK) und Plasmakallikrein (PK) unterteilen. Sie unterscheiden sich im Molekulargewicht, der Substratspezifität und bei immunologischen Merkmalen. TK ist ein Glycoprotein der Serin Proteinase Superfamilie und wird in vielen Geweben synthetisiert; z.B. in der Niere, Pankreas, den Speicheldrüsen, dem Gefäßsystem und den Skelettmuskeln. PK wird ebenso wie Plasma Kininogen hauptsächlich in der Leber exprimiert und später in den Blutstrom freigesetzt [63].

Die Kinin Familie umfasst eine Gruppe von strukturell ähnlichen Peptiden,

wichtige Vertreter sind unter anderem Bradykinin (BK, Arg-Pro-Pro-gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) und Kallidin (Lys-BK, Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg). Die Kinine entstehen durch Katalyse mit Kallikreinen aus Kininogenen. TK spaltet aus LMWK das Dekapeptid Kallidin ab, während PK das Nonapeptid Bradykinin aus HMWK abspaltet [64]. Kallidin unterscheidet sich von Bradykinin nur durch ein zusätzliches Lysin am N-Terminus. Kallidin kann durch die Aminopeptidase in Bradykinin umgewandelt werden. Bradykinin ist ein natürlich vorkommendes Neuropeptid (Plasma Protein) und ein pharmakologisch aktives Kinin, welches als kardioprotektives und proinflammatorisches Agent betrachtet wird [65].

Kinine sind sehr kurzlebige Peptide mit Plasma Halbwertszeit von weniger als 15 Sekunden [66]. Durch verschiedene Exo- und Endopeptidasen führt weiterer Abbau zur Inaktivierung der Kinine. Die Carboxypeptidase (Kininase I) spaltet die C-terminale Aminosäure beider Peptide ab und führt zur Entstehung von des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg¹⁰-Kallidin [57]. Sowohl Bradykinin und Kallidin als auch ihre aktiven Metabolite des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg¹⁰-Kallidin zeigen unterschiedliche, aber starke agonistische Eigenschaften an den Bradykinin Rezeptoren. In der weiteren Desaktivierung über die Kininase II, die mit dem Angiotensin konvertierenden Enzym (ACE) identisch ist, entstehen inaktive Metabolite, sodass der Kininstoffwechsel außerdem mit dem Renin-Angiotensin-Weg gekoppelt ist [67].

1.3.1 Bradykinin Rezeptor 1 (B1R) und Bradykinin Rezeptor 2 (B2R)

Die biologischen Wirkungen von Kinine werden über zwei Rezeptoren vermittelt [60, 68]. Der B1R wurde zunächst als Vermittler des kontraktiven Effektes von Kininen in der isolierten Aorta von Kaninchen [69] entdeckt. Danach entdeckten Regoli und Barabé [70] 1980 die Existenz von zwei Kinin Rezeptoren: B1R und B2R. B2R wird konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert, während B1R in der Regel unter physiologischen Bedingungen

wenig bis gar nicht exprimiert ist [71]. Jedoch wird B1R häufig unter inflammatorischen Bedingungen oder oxidativem Stress hochreguliert und von Immunzellen oder anderen Geweben exprimiert. Mit besonders hoher Affinität bindet B1R an Kinin Metaboliten (z.B. des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg¹⁰-Kallidin), während der B2R an Bradykinin und Kallidin selber bindet [57, 72, 73].

Beide Bradykinin Rezeptoren bestehen aus sieben Transmembran-Domänen und gehören zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Verschiedene Signaltransduktionsmechanismen für Kinine, welche vom Zelltyp abhängig sind, wurden schon beschrieben. Der Wirkmechanismus beinhaltet die Aktivierung von Phospholipasen A2, C und D sowie die anschließende Freisetzung von Prostaglandinen, Stickstoffmonoxid (NO), Inositolphosphate und Diacylglycerol aus Membran Inositol-Phospholipiden, was zur Mobilisierung von intrazellulären Calcium und Aktivierung mehrerer Isoformen der Proteinkinase C (PKC) führt. Neben dem klassischen Weg werden die B2R auch mit der Aktivierung von Protein Tyrosin Kinasen, Phosphatasen und Mitogen-aktiviertem Protein (MAP) Kinase verknüpft. Im Gegensatz dazu verknüpfen die B1R hauptsächlich mit der Aktivierung von Phosphoinositid-Phospholipase C Weg [74]. Die Aktivierung des B2R durch Bindung mit Bradykinin führt zu einer schnellen Internalisierung des Rezeptor Proteins durch Endozytose. Das heißt, dass sofort nach Ligandenbindung und Internalisierung B2R schnell desensibilisiert wird, während B1R nicht davon betroffen ist [75]. Diese unterschiedlichen Anfälligkeiten für Desensibilisierung von Bradykinin Rezeptoren unterstützt die Hypothese, dass die B2R in der akuten Phase der Inflammation und Schmerzreaktion auswirken, während die B1R chronische oder langfristige Entzündungsreaktion vermitteln [76].

Die Bradykinin Rezeptoren haben verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Geweben. Im kardiovaskulären System regulieren B2R die

lokale Durchblutung durch Vasokonstriktion oder Vasodilatation der Gefäße, sodass B2R die Größe des Herzinfarktes reduzieren und das Herz gegen ischämische Ereignisse vorbedingen können [77]. Außerdem zeigten B2R einen antiarrhythmischen Effekt im Herzen [78]. B2R sind in den meisten kardinalen Zeichen einer akuten Inflammation einbezogen, einschließlich der erhöhten vaskulären Permeabilität, Venokonstriktion, arterielle Dilatation und Schmerzreiz durch Aktivierung der sensorischen Nervenenden. Die B2R spielen aber eine limitierte Rolle in der zellulären Komponente der Entzündungsreaktion, wie die Leukozyten Rekrutierung in Mikrozirkulation [79].

In den letzten Jahren haben unterschiedliche Studien gezeigt, dass B1R sich auch an der Regulation von Vasodilatation und Inflammation beteiligen [79] - Aufgaben die vorher prinzipiell dem B2R zugedacht waren. Eine Stimulation des B1R führt über die NO Bildung zur Vasodilatation der Gefäße und reguliert dadurch ebenso den Blutdruck. Su [80] et al zeigten, dass die intrakoronare Infusion von des-Arg⁹-Bradykinin eine dosis-abhängige Vasodilatation von koronaren Arterien erzeugte. Diese Vasodilatation konnte nicht von B2R Antagonisten, sondern nur von Inhibitoren der NOS abgeschwächt werden [81]. Die Hauptaufgabe des B1R ist aber seine Rolle bei der Entstehung von Entzündungsreaktionen [74]. Ein Hauptaktivator des B1R ist hierbei der nukleare Faktor kappa B (NF-κB) [82]. Die Aktivierung des B1R induziert alle drei Phasen des Leukozyten Rekrutierungsprozesses: Zell Rolling, Adhäsion und Migration [79]. Der B1R ist insbesondere bei der Aktivierung von Rezeptoren auf Leukozyten relevant, wodurch die Produktion von pro-inflammatorischen Molekülen und die Leukozytenmigration gesteuert wird [83]. So kommt es letztlich zu einer gesteigerten Bildung von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Leukotrienen, Hydroxyeicosatetraensäure und der Thrombozyten-aktivierende Faktor (PAF)

[83]. Letzendlich führt diese Reaktionskaskade zu den typischen pathophysiologischen Effekten der Kinine.

Erst in den letzten Jahren haben Wissenschaftler mit den funktionellen Analysen der Bradykinin Rezeptoren in transgenen Modellen angefangen. Vor ca. 20 Jahren wurde B2R *Knockout* (B2R^{-/-}) Maus von Borkowski et al [84] generiert. Die B2R^{-/-} Mäuse sind fruchtbar und zeigen keine morphologischen Veränderungen, somit ist eine wesentliche Rolle des B2R in der Reproduktion auszuschließen. B2R^{-/-} Mäuse sind hypertensiv und zeigen einen übertriebenen Blutdruckanstieg in Reaktion auf Angiotensin II (Ang II) oder einen hohen Verzehr von Nahrungssalz [85]. Darüber hinaus entwickeln die B2R^{-/-} Mäuse Herzinsuffizienz im Laufe des Alters. So konnte dysfunktioneller B2R Signalweg zur Pathogenese der Hypertonie und Herzinsuffizienz beitragen. Das erste transgene Modell von B1R *Knockout* (B1R^{-/-}) Maus wurde 2000 von Pesquero et al [86] erzeugt. In seiner Studie wurde zunächst das B1R Gen von der Maus isoliert und dann durch den Ersatz der kodierenden Region mit einem Neomycin Resistenz Gen in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mutiert. Die homozygoten mutierten Mäuse ohne B1R Gen präsentieren sich als lebensfähig und entwickeln sich normal. Im Vergleich zu B2R^{-/-} Mäusen haben B1R^{-/-} Mäuse einen normalen Blutdruck, zeigen aber eine Hyperalgesie bei chemischer und thermischer Nozizeption. Außerdem zeigte sich in B1R^{-/-} Mäusen eine verminderte Akkumulation der Leukozyten in entzündetem Gewebe und in Reaktion auf pro-inflammatorische Reize [86].

1.3.2 Die Bedeutung des B1R für das Gefäßwachstum

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass B1R in unterschiedlichen Prozessen bei vaskulären Umbausprozessen und kardiovaskulären Ischämien involviert ist.

Hinsichtlich seiner Rolle bei kardiovaskulären Ischämien zeigte sich für den

B1R eine starke Expression, welche durch Gewebeischämie induziert wurde; z.B. konnte hier eine starke Expression von B1R im reperfundierten Herzen von Ratten bei Myokardischämie nachgewiesen werden [87]. Mittels RNase Protection Assay konnte Tschope *et al* [88] auch beweisen, dass in frühen Stadien nach Myokardinfarkt eine deutliche Hochregulation der Expression von B1R zu beobachten ist. Mazonot *et al* [89] zeigte, dass B1R eine wichtige Rolle bei der Abwehrreaktion auf ischämische Schädigung spielt. Des Weiteren übt B1R eine schützende Wirkung vor Arrhythmien nach kardialen Ischämien aus [90].

Auch hinsichtlich von Gefäßumbauprozessen wurden für den B1R wichtige und bedeutende Funktionen nachgewiesen. So wurde gezeigt, dass die Aktivierung des B1R die Angiogenese *in vivo* und die endotheliale Zellproliferation *in vitro* mittels NOS-Aktivierung fördern konnte [91]. Die Angiogenese konnte durch B1R Antagonist inhibiert werden und war interessanterweise nicht durch eine Inhibierung von B2R-Signalwegen beeinflussbar. Besondere Aufmerksamkeit verdient hier ein Versuch von Emanuelli *et al* [92], bei welchem die Neovaskularisierung (Angiogenese) in einem Mausmodell mit Hinterlauf-Ischämie nach Teil-Entfernung der Femoralisarterie induziert wurde. Emanuelli zeigte dabei, dass die Hinterlauf-Ischämie in Mäusen über eine Überexpression des B1R Gen verbessert werden konnte und so eine erhöhte muskuläre Kapillardichte induziert wurde. Parenti *et al* [93] konnte in diesem Zusammenhang die funktionelle Relevanz des B1R auch beim Kaninchen dokumentieren und zeigte, dass dies ein primärer Schritt im komplexen Prozess der Angiogenese darstellt. Die Angiogenese in Folge dieser Hinterlauf-Ischämie konnte durch eine chronische Infusion eines B1R-Antagonists inhibiert werden [92]. Eine Aktivierung der Angiogenese über B1R Agonist, insbesondere der peptidase-resistente B1R Agonist Sar-[D⁸Phe⁸]des-Arg⁹-BK, wurde auch von Emanuelli *et al* [94] beobachtet. In diesem Zusammenhang wurde aber eine

Veränderung oder Stimulation der Arteriogenese von niemanden untersucht. Da eine relevante Funktion des B1R bei kardiovaskulären Ischämien beschrieben wurde und der B1R im Kontext der Angiogenese eine bedeutende Funktionen einnimmt, sollte der B1R als Kandidat für therapeutische Strategien bei Gefäßerkrankungen in Betracht gezogen werden und insbesondere seine Rolle für die physiologische hoch-relevante Arteriogenese beschrieben werden.

1.4 Studienziel

Wie in der Einleitung beschrieben, nimmt der Bradykinin Rezeptor Signalweg (insbesondere B1R) eine wichtige Funktion für die Gefäßbiologie ein. Die Rolle des Bradykinin Rezeptor Signalweges für die Arteriogenese wurde jedoch bisher noch nicht untersucht. Da die Vorarbeiten [92-94] zeigten, dass der B1R Signalweg für die Angiogenese relevant ist, ist die Frage, ob die Arteriogenese auch über den B1R Signalweg stimuliert werden kann. Weiterhin ist es wichtig, die Mechanismen zu verstehen, über welche der B1R seine potentielle pro-arteriogene Wirkung vermittelt.

In dieser Studie wurde daher ein Hinterlaufigatur-Mausmodell verwendet, wobei die Arteria Femoralis rechts in Wildtyp (WT) und B1R^{-/-} Mäusen durch zwei Ligaturen okkludiert wurde und dadurch die periphere Arteriogenese induziert wurde. Diese Arbeit zielt auf die Abklärung der funktionellen Rolle des B1R Signalwegs für die Arteriogenese, und weitgehend auf die Aufklärung der zellulären Mechanismen.

2. Material und Methoden

2.1 Übersicht

Um die Arteriogenese im Hinterlauf zu beobachten, haben wir ein Mausmodell mit Hinterlaufischämie entwickelt. Am Tag 0 wurden alle Mäuse (Wildtyp (n=8) und B1R^{-/-} (n=8)) einer Ligatur-Operation am rechten Oberschenkel unterzogen. Dabei wurde die rechte Arteria femoralis operativ okkludiert. In den folgenden 7 Tagen wurde die Wiederherstellung des Blutflusses in Muskeln unterhalb der Okklusionsstelle mittels Laser Doppler Imaging (LDI) zu bestimmten Zeitpunkten (am postoperativen Tag 1, Tag 3 und Tag 7) sequentiell quantifiziert. Somit wurde die relative Durchblutung des Fußes als Maß für die Leistung des proximalen kollateralen Netzwerks ermittelt. 7 Tage nach dem Okklusionseingriff wurden alle Mäuse geopfert und die Adduktorenmuskeln beidseits für die histologische Analyse entnommen.

Zur Abklärung der Relevanz zwischen B1R und Arteriogenese wurde ein BM (bone marrow)-chimäres Mausmodell mit einem Crossover-Design (WT und B1R^{-/-}) etabliert. Die Ligatur-Operation der rechten Arteria femoralis wurde bei allen Knochenmarks-chimären Mäusen durchgeführt. 7 Tage nach dem Okklusionseingriff wurden die Adduktorenmuskeln entnommen und die Endpunktmessung des kollateralen Perfusionsindexes in den Muskeln wurde mithilfe einer Mikrosphären-basierten Technik bestimmt. Zur Entdeckung des Mechanismus des arteriogenen Potentials des B1R wurde die Wanderung der aus dem Knochenmark stammenden Leukozyten in dem Knochenmarks-chimären Mausmodell durch grün fluoreszierendes Protein (GFP) - Marker verfolgt.

2.2 Versuchstiere

Die WT-Mäuse und B1R^{-/-}-Mäuse wurden von Prof. Michael Bader (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin) zur Verfügung gestellt.

Für alle Versuche wurden männliche C57BL/6-Mäuse im Alter von 10-14 Wochen und Gewicht von 20-25g verwendet. Tierhaltung und experimentelle Durchführung der Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Mäuse wurden unter sterilen und pathogenfreien Bedingungen gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

2.2.1 Tierversuchsgenehmigung

Das vorliegende Projekt wurde gemäß §8 Tierschutzgesetz unter dem Titel „Untersuchung der funktionellen Bedeutung des neu identifizierten Arteriogenese-Markers Kininogen für das Wachstum von zerebralen Kollateralarterien (Kurzbezeichnung: „Kininogen and Arteriogenesis“) am 21.08.2008 unter der Genehmigungsnummer G 0108/08 und seinem Folgeprojekt am 27.08.2010 unter der Genehmigungsnummer G 0164/10 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales der Stadt Berlin genehmigt.

2.2.2 Tiermodell

Die Tierexperimente wurden in einem Femoralisligaturmodell im Maushinterlauf durchgeführt. Dieses von der Arbeitsgruppe um Wolfgang Schaper etablierte Hinterlauf-Ischämie-Modell in der Maus ermöglicht die Induktion der peripheren Arteriogenese. Damit und durch die Verwendung gen-defizienter Mäuse (B1R^{-/-}-Mäuse) sollte es möglich werden, den Einfluss der Unterexpression des B1R Gens auf die Arteriogenese zu untersuchen.

2.2.3 Operation

In dieser Studie wurde das FAO-Modell (Okklusion der Arteria femoralis, FAO) nach Hofer [41] verwendet, in dem die Arteria femoralis im Bereich (Abb. 5) distal des Abgangs der Arteria profunda femoris und proximal der Arteria poplitea durch zwei Ligaturen okkludiert wurde. Die Ligaturen wurden

unmittelbar proximal und distal des Abgangs der Arteria caudalis femoralis lateralis durchgeführt. Da es sich um sehr kleine Gefäße handelt, wurden die Mäuse unter einem Operationsmikroskop operiert.

Die Mäuse wurden mit 0,08 ml Lösung von 10 % Ketamin (2 mg/kg Körpergewicht) und 2 % Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) in 0,9 % NaCl narkotisiert. Zum Schutz der Hornhaut vor Entzündung wurden die Augen mit einer Bepanthen-Salbe bedeckt. Während der Operation wurden die Mäuse auf ein Heizkissen (37 °C) gelegt und die Hinterläufe wurden mit Pflaster fixiert. Bei der Operation wurde oberhalb des inguinalen Ligaments rechts die Haut ca. 1 cm eingeschnitten. Die Arteria femoralis rechts wurde von der Vena femoralis und dem Nervus femoralis durch eine stumpfe Präparation getrennt. Die A. femoralis rechts wurde im Bereich distal des Abgangs der Arteria profunda femoris und proximal des Abgangs der Arteria poplitea durch chirurgischen Knoten mit einem nicht resorbierbaren Seidenfaden (USP 5-0) zweimal ligiert: unmittelbar proximal und distal des Abganges der Arteria caudalis femoris lateralis rechts (Lateral Caudal Femoral Artery, LCFA) (Abb. 5). Das Operationsgebiet wurde dann mit 0,9 % NaCl nachgespült, damit das Gewebe vor dem Austrocknen geschützt wurde. Schließlich wurde die Haut mit einem Seidenfaden (USP 5-0) verschlossen. Die Tiere erhielten peri- und postoperativ Buprenorphin (0,05 mg/kg) subkutan als Zusatz zur Analgesie.

Die Ligatur der Arteria femoralis im Hinterlauf ist der Prototyp eines reinen Arteriogenese-Modells, weil die Gefäße distal der ligierten A. femoralis durch Kollateralen versorgt werden, intakt und funktionstüchtig bleiben können und es nicht zur Ischämie und Hypoxie am Ort des Gefäßwachstums führt.

Intensität in einem Raster Mode mit einem beweglichen Spiegel über die Gewebefläche gescannt. Es gibt keinen direkten Kontakt zwischen Laserstrahl und dem geprüften Gewebe. Die Grundelemente des LDIs sind schematisch in der folgenden Abb. 6 dargestellt. Der gescannte Bereich wird von dem Prüfer definiert. Das LDI bietet räumliche Informationen und rechnet die durchschnittlichen Werte des Blutflusses über eine große Fläche.

Der durch LDI gemessene Blutfluss ist als „Flux“ beschrieben: eine Quantität im Verhältnis zu dem Ergebnis aus der mittleren Geschwindigkeit von Blutzellen und Blutvolumen. Es ist eine Perfusionseinheit und berechnet sich nach dem ersten Moment mit der spektralen Leistungsdichte.

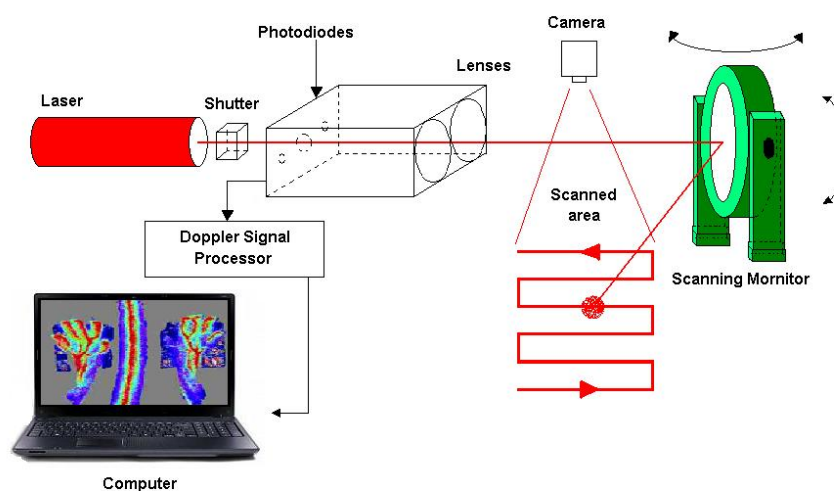


Abb. 6 : Schema des Laser-Doppler-Imagings.

2.3.2 Quantifizierung des Blutflusses in Füßen im Mausmodell mittels Laser-Doppler-Imaging

Der Blutfluß in den Füßen der Maus wurde mit dem LDI [96] (Model LDI2-HR; Moor Instruments, UK) gemessen. Die Messungen wurden am Tag 0 vor und unmittelbar nach der Ligatur-Operation, sowie am postoperativen Tag 1, 3, 7 durchgeführt.

Die Mäuse wurden narkotisiert und zuerst in einer Klimakammer bei 37 °C für 5 Minuten vor jeder Messung gehalten, damit alle Messungen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wurden. Die Mäuse wurden auf den Rücken gelegt, die plantaren Seiten der Füße wurden parallel zueinander nach unten mit einem Doppel-Klebeband auf eine schwarze Unterlage geklebt. Die schwarze Unterlage wurde dann unter den Laserstrahl gelegt und eine-Scan Region der Maus wurde vom Beckenkamm bis zum Fuß beidseits definiert. Die Pixel-Auflösung wurde auf 256 x 256 eingestellt und die Scangeschwindigkeit betrug 4 ms/Pixel für 1,7 cm x 3 cm Fläche. Das Scannen wurde viermal wiederholt und insgesamt 5 Scan-Bilder wurden aufgenommen (5 Minuten pro Scan, 25 Minuten für eine gesamte Messung). Am Ende wurde ein Mittelwert der gesamten Messung berechnet und dokumentiert.

2.4 Auswertung der Fußfunktion nach Femoralarterienligatur (FAL)

Als funktionelle Parameter wurden die aktiven Fußbewegungen und die trophische Veränderung der Füße durch zwei Wertungssysteme [97, 98] (Tabelle1 und 2) beurteilt.

Die Mäuse wurden in einen leeren Käfig gesetzt und stimuliert, sich zu bewegen. Die Auswertung wurde von einem verblindeten Beobachter am postoperativen Tag 1, 3, 7 durchgeführt.

Wertung	Fußbewegung
0	Normal
1	Keine Zehe Flexion
2	Keine Plantarflexion
3	Ziehen des Fußes

Tabelle 1. Wertung der aktiven Fußbewegungen (Index der Muskelfunktion)

Wertung	Trophische Veränderung
0	Normal
1	Zyanose oder Verlust des Nagels
2	Partielle oder vollständige Atrophie der Zehen
3	Partielle oder vollständige Atrophie des Vorfußes

Tabelle 2. Wertung der trophischen Veränderung

2.5 Gewebeentnahme und Histologie

2.5.1 Probenvorbereitung

Die Gewebeentnahme wurde 7 Tage nach Ligatur Operation durchgeführt. Alle Mäuse wurden zuerst durch eine intraperitoneale Injektion von 0,1 ml Heparin heparinisiert und dann durch Injektion einer überdosierten Ketamin und Xylazin (10 % Ketamin, 2 % Xylazin) intraperitoneal anästhesiert. Danach wurden die Mäuse auf den Rücken gelegt, die beiden Krallen und Füße wurden ausgebreitet und mit Klebeband auf eine Alu-Folie fest platziert. Die Brust und der Bauch der Maus wurden geöffnet, damit der proximale Teil der abdominalen Aorta freigelegt werden konnte. Dann wurde dieser Teil der Aorta vom Fettgewebe getrennt und kanüliert. Die Gefäße im Hinterlauf wurden mit Dilatationspuffer (0,1 % Adenosin (Sigma) und 0,5 % Bovine Serum Albumin (BSA; Sigma) in Phosphate-buffered Saline (PBS) mit pH 7,4) unter dem Druck von 100 cm H₂O für 4 Minuten perfundiert. Nach Erreichen der maximalen Vasodilatation wurden die Gefäße dann mit 3 % Paraformaldehyd (PFA; Sigma) in PBS (pH 7,4) für 10 Minuten perfundiert. Anschließend wurden die Gefäße weiter mit PBS für 3 Minuten perfundiert, damit PFA durch PBS ersetzt wurde. Danach wurden die Organe im Bauch entfernt und die Adduktoren der unteren Extremitäten wurden entnommen.

Verwendete Lösungen:

PBS (phosphate-buffered saline):

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
Destilliertes Wasser	1 L

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von HCl oder NaOH auf 7,4 eingestellt.

Dilatationspuffer

Adenosin	1 g
Bovine Serum Albumin	5 g
Phosphate-buffered Saline	1 L

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

2.5.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Die Adduktoren von beiden Hinterläufen (ligiert und nicht-ligiert) wurden entnommen. Die Adduktorenmuskeln wurden in ein Röhrchen eingegeben und in 4 % PFA für 16 Stunden bei 4 °C über Nacht untergetaucht. Anschließend wurden die Muskeln in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die fixierten Gewebe wurden dann in einer Einbettmaschine (Shanon Citadel 1000, Thermo) entwässert und paraffiniert. Das Einbettprogramm umfasst folgende Schritte: 70 % Ethanol für 1 Stunde, 96 % Ethanol für 1 Stunde, 100 % Ethanol für 3 Lösungswechsel (je 1 Stunde), Aceton für 30 Minuten, und Paraffin Typ 9 für 3 Wechsel (2 x 1 Stunde und 1 x über Nacht). Die Muskeln wurden dann in Paraffin als Blöcke eingebettet. Paraffinblöcke von ligierten und nicht-ligierten Adduktoren wurden am Rotationsmikrotom in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Anschließend wurden die Paraffinschnitte ins Wasserbad (45 °C) gelegt und auf Objektträger aufgezogen. Danach wurden die Paraffinschnitte über Nacht im Wärmeschrank bei 60 °C am Objektträger angebackt. Von jedem Adduktorenmuskel wurden 12 Paraffinschnitte

genommen, 4 aus dem oberen Teil, 4 aus dem mittleren Teil und 4 aus dem unteren Teil. Der Abstand zwischen zwei Schnitten von jedem Teil beträgt 100 μm .

Verwendete Lösungen:

4 % PFA:

20 g Paraformaldehyd Pulver wurden im 450 ml destillierten Wasser eingegeben. Unter Rühren wurden 5 Tropfen 2 N NaOH (1 Tropfen pro 100 ml) in die Lösung gegeben. Nach einer kompletten Auflösung der PFA wurde 50 ml PBS dazugegeben und der pH Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Unter Rühren wurde die Lösung über Nacht bei 60 °C und anschließend bei -20 °C bis zur Verwendung eingelagert.

2.5.3 Immunhistologische Färbung

Vor der immunhistologischen Färbung sollten die Schnitten nach folgenden Schritten entparaffiniert werden: Xylol I für 10 min, Xylol II für 10 min, 100 % Ethanol für 3 min, 96 % Ethanol für 3 min, 80 % Ethanol für 3 min, 70 % Ethanol für 3 min, schließlich 3 min in Aqua dest. und zweimal im PBS gewaschen werden. Für Pretreatment wurden Objektträger in Citratpuffer (pH-6,0, 0,05 % Tween 20) für 20 min in der Mikrowelle erwärmt, dann bis auf Raumtemperatur für 40 min abgekühlt, danach wurden sie im destillierten Wasser und PBS gespült. Nachfolgend wurden die Schnitte in Blockierungslösung (1 % Goat Serum, 1 % BSA, 0,1 % Triton X-100, 0,05 % Tween 20) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit unspezifische Bindungen blockiert wurden.

Für die Färbung der glatten Muskelzellen wurde ein Fluoreszenz-5-Isothiocyanat (FITC) - konjugierter monoklonaler Antikörper gegen glattes Muskelzellaktin (α -SMA-Aktin) (Sigma 1A4) verwendet. Die Schnitte wurden in der Lösung mit dem Antikörper (Verdünnung 1:100 mit PBS)

für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Objektträger dreimal für jeweils 3 min in PBS und einmal in PBST (PBST: PBS + 0,1 % Tween 20) für 2 min gewaschen. Die Schnitte wurden dann in Hoechst 33342 (Verdünnung 1:1000 mit PBS, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) für 1 min inkubiert, damit die Endothelzellkerne gefärbt werden konnten. Anschließend wurden die Objektträger für 1 min in Aqua dest. gewaschen. Nach Zugabe von Flouromont G (Southern Biotech) auf die Objektträger wurden die Schnitte mit Deckgläsern bedeckt. Bei Raumtemperatur wurden die Objektträger getrocknet und dann in einem Kästchen bis zur Analyse aufbewahrt. Von jedem Muskel wurden 12 Schnitte verblindet durch drei unabhängige Untersucher analysiert.

2.5.4 Quantifizierung des kollateralen Arterienwachstums

Auf jedem Schnitt wurden die α -SMA-Aktin positiven Arterien unter einem DMRB Leica Mikroskop (Deutschland) mit dem Fluoreszenzlicht bei 40-facher Vergrößerung gezählt und mit einer Leica DMLD Digitalkamera fotografiert. Die präexistenten Kollateralarterien wurden durch die Begleitung von Venole und Nerv erkannt [96], große Arterien wie A. femoralis und A. profunda femoris wurden ausgenommen und nicht gezählt. Der Perimeter der äußeren Gefäßwand von präexistenten Kollateralarterien wurde per Hand gekennzeichnet und der Diameter wurde dann mit Hilfe der Software Image J kalkuliert. Die Gesamtmenge der präexistenten Kollateralarterien in den Schnitten des ventralen Adduktors wurde auf der gesamten Querschnittsfläche normalisiert, so wurde die Gefäßdichte kalkuliert. Die Gefäßdichte spiegelt die Menge der Kollateralarterien wider und der Diameter reflektiert die Größe der Kollateralarterien.

2.6 Knochenmarktransplantation

2.6.1 Generierung der Knochenmarks-chimären Mäuse

Die Verfahren (Abb. 7) zur Generierung der Knochenmarks-chimären Mäusen (Knochenmarktransplantation) wurden nach Schulze et al [99] in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Carmen Infante-Duarte durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Empfänger-Mäuse im Alter von 8 Wochen mit einer Gesamtdosis von 1.100 rad (2 x 550 rad im Abstand von 5 min) bestrahlt, damit die Zellen des strahlenempfindlichen Knochenmarks reduziert wurden (Bestrahlung im MPI für Infektionsbiologie für Experimente am Charité Campus Mitte). 6 Stunden später wurden diese Mäuse mit 12×10^6 gespendeten Knochenmarkzellen über die Schwanzvene rekonstituiert.

Die Knochenmarktransplantation von Spender-Mäusen (C57BL/6J) zu Empfänger-Mäusen (C57BL/6J) wurde wie folgt durchgeführt:

- a.) Generierung Wildtyp-Chimäre mit B1R-Knockout Knochenmark
- | | | |
|--------------------------|----------------|--------------|
| Spender | Empfänger | |
| B1R ^{-/-} (n=3) | Wildtyp (n=10) | → 8 Chimären |
- b.) Generierung B1R^{-/-}-Chimäre mit C57BL/6J Wildtyp Knochenmark
- | | | |
|---------------|---------------------------|--------------|
| Spender | Empfänger | |
| Wildtyp (n=3) | B1R ^{-/-} (n=10) | → 8 Chimären |
- c.) Generierung Wildtyp-Chimären-Kontrollen
- | | | |
|---------------|----------------|--------------|
| Spender | Empfänger | |
| Wildtyp (n=3) | Wildtyp (n=10) | → 8 Chimären |
- d.) Generierung B1R^{-/-}-Chimäre -Kontrollen
- | | | |
|--------------------------|---------------------------|--------------|
| Spender | Empfänger | |
| B1R ^{-/-} (n=3) | B1R ^{-/-} (n=10) | → 8 Chimären |

Als Kontrolle dienten WT-Mäuse / B1R^{-/-}-Mäuse, die Knochenmark von WT-Mäusen / B1R^{-/-}-Mäuse erhielten.

Nach der Bestrahlung und Knochenmarktransplantation wurden die Mäuse

zweimal täglich kontrolliert und zwei Wochen lang analgetisch mit Buprenorphin (0,05-0,01 mg/kg KG) behandelt. Außerdem wurden die Tiere über vier Wochen mittels eines tiermedizinisch häufig verwendeten Breitbandantibiotikums (Baytril) gegen Infektionen geschützt. Nach 6-wöchiger Erholung wurden alle Knochenmarks-chimären Mäusen einer Femoralarterienligatur rechts unterzogen. 7 Tage nach Ligatur Operation wurde das Kollateralwachstum in den ligierten und nicht-ligierten Adduktoren durch Mikrosphären-basierte Technik bestimmt.

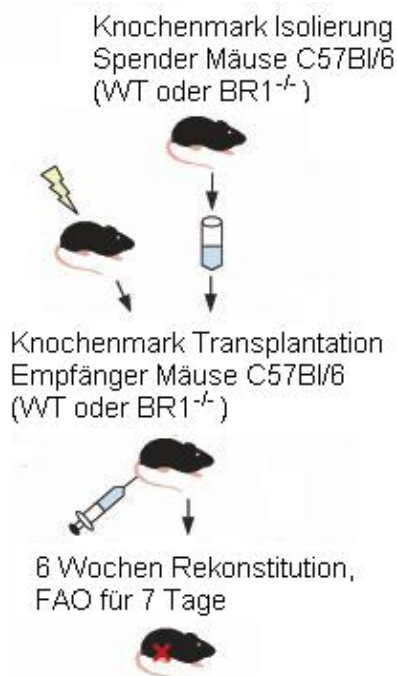


Abb. 7 Die Verfahren zur Knochenmarkstransplantation

2.6.2 Generierung der Maus-Chimären mit Gen für grün Fluoreszierendes Protein (GFP)

Knochenmarkstransplantation wie beschrieben in 2.6.1.

In diesem Prozess wurde Knochenmark von WT-GFP-Mäusen in WT-Mäusen und B1R^{-/-}-Mäusen übertragen. Als Kontrolle dienten die WT-Mäuse, die Knochenmark von WT-GFP-Mäusen erhalten haben.

Generierung der GFP-Reporter-Chimären wurde wie folgt durchgeführt:

e.) Generierung B1R^{-/-}-Chimäre mit GFP positivem Wildtyp Knochenmark

Spender	Empfänger	
Wildtyp GFP (n=3)	B1R ^{-/-} (n=10)	→ 8 Chimären

f.) Generierung WT-Chimäre mit GFP positivem Wildtyp Knochenmark

Spender	Empfänger	
Wildtyp GFP (n=3)	Wildtyp (n=10)	→ 8 Chimären

Nach 6-wöchiger Erholung wurden die Empfänger-Mäuse einer Femoralarterienligatur rechts unterzogen. 3 Tage nach Ligatur Operation wurden die Adduktoren Muskeln (Kollateralbereich) von den ligierten Hinterläufen entnommen (Abb. 8). Die GFP positiven Zellen in Adduktoren Muskeln wurden durch immunhistologische Methode dargestellt und gezählt.

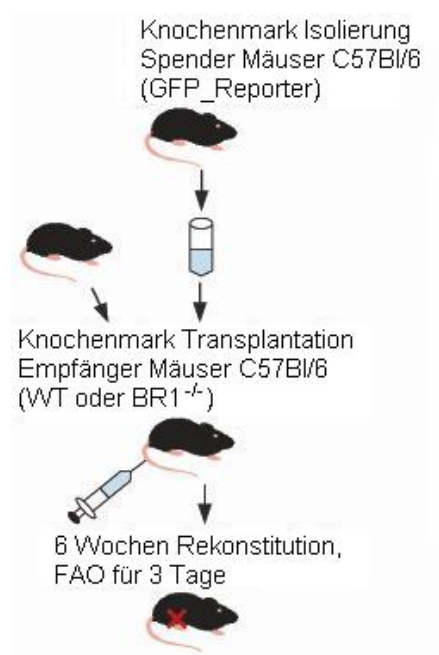


Abb. 8 Generierung der GFP-Reporter-Chimären

2.6.3 Femoralarterienligatur im Mausmodell

Wie beschrieben in 2.2.2.

2.6.4 Messung der kollateralen Konduktanz

Die Quantifizierung des Kollateralwachstums wurde durch Messung der kollateralen Konduktanz nach Mikrosphärenperfusion durchgeführt. Der Leitwert ist der Kehrwert des Gefäßwiderstandes und spiegelt die Erhöhung des Blutflusses pro Druckanstieg wider. Die Bewertung des kollateral-abhängigen Flusses durch Messung der Mikrosphärenperfusion ist als die genaueste experimentelle Technik zur Quantifizierung des Kollateralwachstums anzusehen und wird daher als Goldstandard zur Evaluierung der Arteriogenese betrachtet [100].

$$\text{Kollaterale Konduktanz} = \frac{1}{R} = \frac{\dot{V}}{\Delta p}$$

Abb. 9 Kollaterale Konduktanz. (\dot{V} : Volumenstrom durch das Rohr, ΔP : Druckdifferenz, R : Gefäßwiderstand) Kollaterale Konduktanz ist der Kehrwert des Gefäßwiderstandes.

7 Tage nach Ligatur Operation wurden die Mäuse für die Mikrosphären-basierte Flussberechnungen narkotisiert. Zur Vorbereitung der Mikrosphärenperfusion wurde die nach Eröffnung von Haut und Bauchfell freipräparierte Aorta mit einem Polyethylenkatheter (Innendurchmesser 0,40 mm; Außendurchmesser 0,80 mm) in Richtung distal kanüliert, damit eine optimale Perfusion und Verteilung der fluoreszierenden Mikrosphären in beide Hinterläufe ermöglicht werden konnte. Nach Stabilisierung des systemischen Drucks wurden beide Hinterläufe bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2 ml/min mit 10 ml physiologischer Kochsalzlösung und Adenosin (0,03 mg/ml) bis zur maximalen Vasodilatation des peripheren Kollateralsystems perfundiert. Anschließend wurden jeweils 10 ml von drei verschiedenen Mikrosphären (rot, orange, gelb-grün) nacheinander mit verschiedenen Perfusionsgeschwindigkeiten (2 ml/min, 3 ml/min und 4 ml/min) in aufsteigender Reihenfolge perfundiert.

Nach der Perfusion wurden die Adduktoren beider Hinterläufe vom Knochen abgetrennt und homogenisiert, und anschließend in 15 ml Falcon-Tubes überführt. Zur Freisetzung der Mikrosphären wurden zu jeder Probe 3 ml der Proteinase / SDS-Lösung (1 % SDS, 0,5 % Natriumazid, und 0,8 % Tween 80 in 50 mM pH 8 Tris-Puffer und 1 mg/ml Proteinase K) zugefügt. Blaue fluoreszierende Mikrosphären (4000/ml, Durchmesser: 15 µm, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) wurden als interner Standard der Lösung beigegeben. Alle Tubes wurden verschlossen und in einem schüttelnden Wasserbad bei 50 °C für fünf Tage lysiert. Am Tag 6 wurden alle Proben 30 min bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde in 1 ml Cellwash (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) resuspendiert.

Die Anzahl und Größe der Mikrosphären im Adduktorenmuskel wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Bei der FACS-Analyse wurden die Mikrosphären klassifiziert und mit einem computergestützten Analyse-System (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) gezählt. Zur Bestimmung des kollateralen Perfusionsindexes wurde zunächst jeweils der Quotient der Anzahl perfundierter Mikrosphären und der Anzahl blauer Referenzmikrosphären bestimmt. Der nicht-ligierte linke Hinterlauf wurde wie oben beschrieben in gleicher Weise verarbeitet und der Quotient wurde als 100 % definiert, was als interne Validierung diente. Die generierten Werte repräsentieren die Perfusionsreserve und zwar die Kollateralisationskapazität des ligierten Hinterlaufs.

2.6.5 Untersuchung der Einwanderung der aus dem Knochenmark stammenden Leukozyten

3 Tage nach Ligatur Operation wurden die ligierten Adduktoren von GFP-Chimären-Mäusen postmortem entnommen (Gewebeentnahme und

histologische Analyse wie beschrieben in 2.5). Für die Färbung der GFP-positiven Leukozyten wurden folgende Antikörper verwendet: Goat Anti-Maus GFP (Abcam), Rabbit anti-Goat-Biotin (Vector Laboratories), Donkey anti-Goat-Cy2 (Jackson Lab), Maus anti- α SMC-Cy3 (Sigma), Ratte anti-Maus-CD68- Alexa 647 (AbSerotec). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (rot) oder Hoechst (blau) gefärbt. Mit einem Fluoreszenz- und Hellfeld-Mikroskop (Olympus FSX 100) wurden die GFP-positiven Leukozyten visualisiert.

2.7 Statistische Analyse

Deskriptive statistische Daten wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm SEM angegeben. Gruppenmittelwerte wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede überprüft. Im konsekutiven Post-Hoc Test (Bonferroni) erfolgte der Einzelgruppenvergleich. Die statistische Datenverarbeitung wurde mit Hilfe des SPSS Paketes (Statistical package for analysis in social sciences, release 17, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) durchgeführt. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Evaluierung der peripheren Perfusionserholung mittels Laser Doppler basierte Flussmessung (LDF)

Zur Induktion des peripheren kollateralen Gefäßwachstums wurde in einem Mausmodell die rechte A. femoralis ligiert. Zur Messung des kollateralen Arterienwachstums wurde anschließend die Wiederherstellung der peripheren Perfusion mittels LDF über einen Zeitraum von 7 Tagen sequentiell in den Hinterpfoten (Füßen) quantifiziert. Die Wiederherstellung der Perfusion im ligierten Hinterlauf beruht auf dem Wachstum von proximalen kollateralen Netzwerken, welche den Perfusionsverlust über 7 Tage zunehmend kompensieren.

3.1.1 Perfusionsmessung vor und nach Femoralarterienligatur

Die Ligatur der A. femoralis im Maushinterlauf führt zu einer starken Reduktion der peripheren Perfusion, da das Gebiet distal der Ligatur nur noch über das native kollaterale Gefäßsystem versorgt werden kann. Als Kontrolle und zur Evaluierung der Wirksamkeit der Femoralarterienligatur wurde die Perfusion des ligierten Fußes mittels LDF am Tag 0 unmittelbar vor und nach der Ligatur Operation gemessen. Es wurde in beiden Mäusegruppen (WT Mäuse und B1R^{-/-} Mäusen) gezeigt, dass nach der FAL die Perfusion im Fuß des ligierten Hinterlaufes von über 550 Perfusionseinheiten (Perfusionunits) auf unter 20 Perfusionunits sank (Tabelle 3). Der distale Blutfluss - auf der Seite des ligierten Hinterlaufes - hat sich nach FAL drastisch auf Werte zwischen 2,20 % - 3,65 % der Ausgangsperfusion verringert. Unmittelbar nach FAL waren zwischen WT Mäusen und B1R^{-/-} Mäusen keine Perfusionsunterschiede in Füßen der ligierten Hinterläufe erkennbar. Die Perfusion sank hier in beiden Gruppen auf vergleichbare niedrige Werte (kein signifikanter Unterschied bei Perfusionsreduktion).

Gruppe	Tag 0 vor FAL (Perfusionsunits)	Tag 0 nach FAL (Perfusionsunits)	N
Wildtyp	569,73 ± 19,79	20,79 ± 3,79	8
B1R ^{-/-}	598,71 ± 25,58	13,18 ± 1,15	8

Tabelle 3. Überblick der Fußperfusion in WT und B1R^{-/-} Mäusen unmittelbar vor und nach FAL

3.1.2 Messung der peripheren Perfusionserholung vom Tag 1 bis Tag 7 nach Femoralarterienligatur

Das kollaterale Gefäßwachstum im ligierten Hinterlauf in WT und B1R^{-/-}-Mäusen wurde durch die Messung der peripheren Perfusionserholung am postoperativen Tag 1, 3 und 7 evaluiert. Generell zeigten diese Messungen in den Füßen der ligierten Hinterläufe eine signifikant höhere Perfusion in WT Mäusen als in B1R^{-/-} Mäusen (Abb. 10). Schon ab Tag 1 nach FAL stieg die Perfusion in WT Mäusen signifikant auf 50,63 ± 4,19 Perfusionsunits im Vergleich zu 37,08 ± 1,56 Perfusionsunits in B1R^{-/-} Mäusen ($p < 0,05$). Die Perfusion im Fuß (ligierte Seite) in WT Mäusen erholte sich wie erwartet jeden Tag kontinuierlich und erreichte am postoperativen Tag 7 sein Maximum (229,74 ± 27,82 Perfusionsunits in WT Mäusen *versus* 63,90 ± 10,35 Perfusionsunits in B1R^{-/-} Mäusen, $p < 0,001$). Es wurde gezeigt, dass 7 Tage nach FAL - im Vergleich zum Tag 0 unmittelbar nach FAL - die Perfusion in den Füßen (ligierte Seite) von B1R^{-/-} Mäusen nicht signifikant erhöht war.

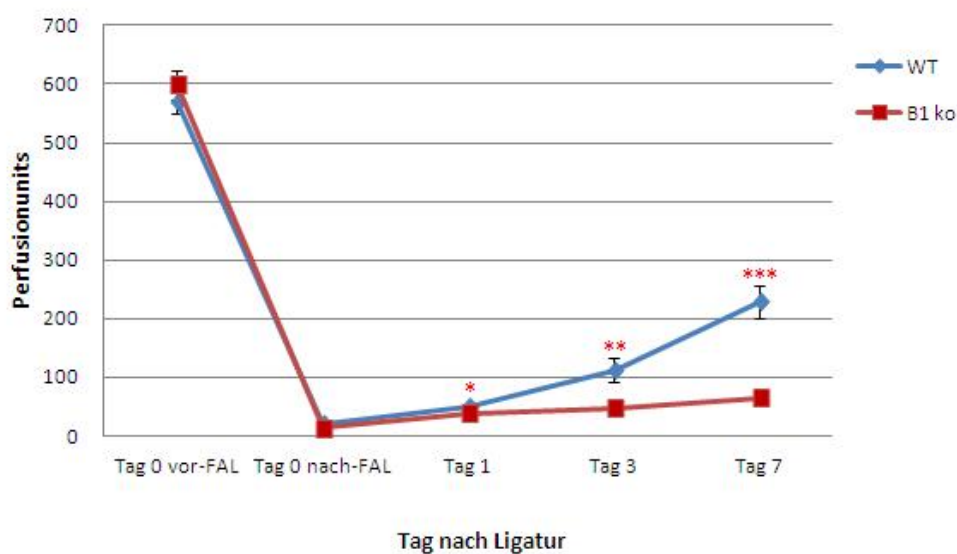


Abb. 10 Messung der Perfusionserholung des Fußes in ligierten Hinterläufen durch LDF vor und nach FAL sowie am postoperativen Tag 1, 3, 7. (WT: Wildtyp Mäuse; B1 ko: B1R^{-/-} Mäuse) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

In Abb. 11 wurde der Verlauf der Perfusionsveränderung der Füße, der ligierten Seite (rechts) und nicht-ligierten Seite (links), nach FAL in LDF-Bildern visualisiert und verdeutlicht. Direkt nach FAL wurde die Perfusion in den Füßen (ligierte Seite, rechts) in beiden Mäusegruppen rasch reduziert. Am postoperativen Tag 1 lässt sich in beiden Gruppen eine kleine Verbesserung der Perfusionsrate nachweisen. Im Laufe der späteren Messpunkte (am postoperativen Tag 3 und 7) ist erkennbar, dass sich die Fußperfusion der ligierten Seite in WT Mäusen deutlich erholt. Eine deutliche Erholung der Perfusion ist in den Füßen der B1R^{-/-} Mäusen nicht erkennbar. Lediglich am postoperativen Tag 7 ist eine sehr leichte Verbesserung der Perfusion in B1R^{-/-} Mäusen erkennbar. LDF Messungen zeigten hier in B1R^{-/-} Mäusen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen postoperativem Tag 1 und 7 (siehe Abb. 10). Am postoperativen Tag 7 war die Fußperfusion der ligierten Seite in WT Mäusen besonders deutlich erhöht im Vergleich zu der in B1R^{-/-} Mäusen. Die Fußperfusion der nicht-ligierten Seite hat sich in den beiden Mäusegruppen über die Beobachtungszeit nicht deutlich verändert.

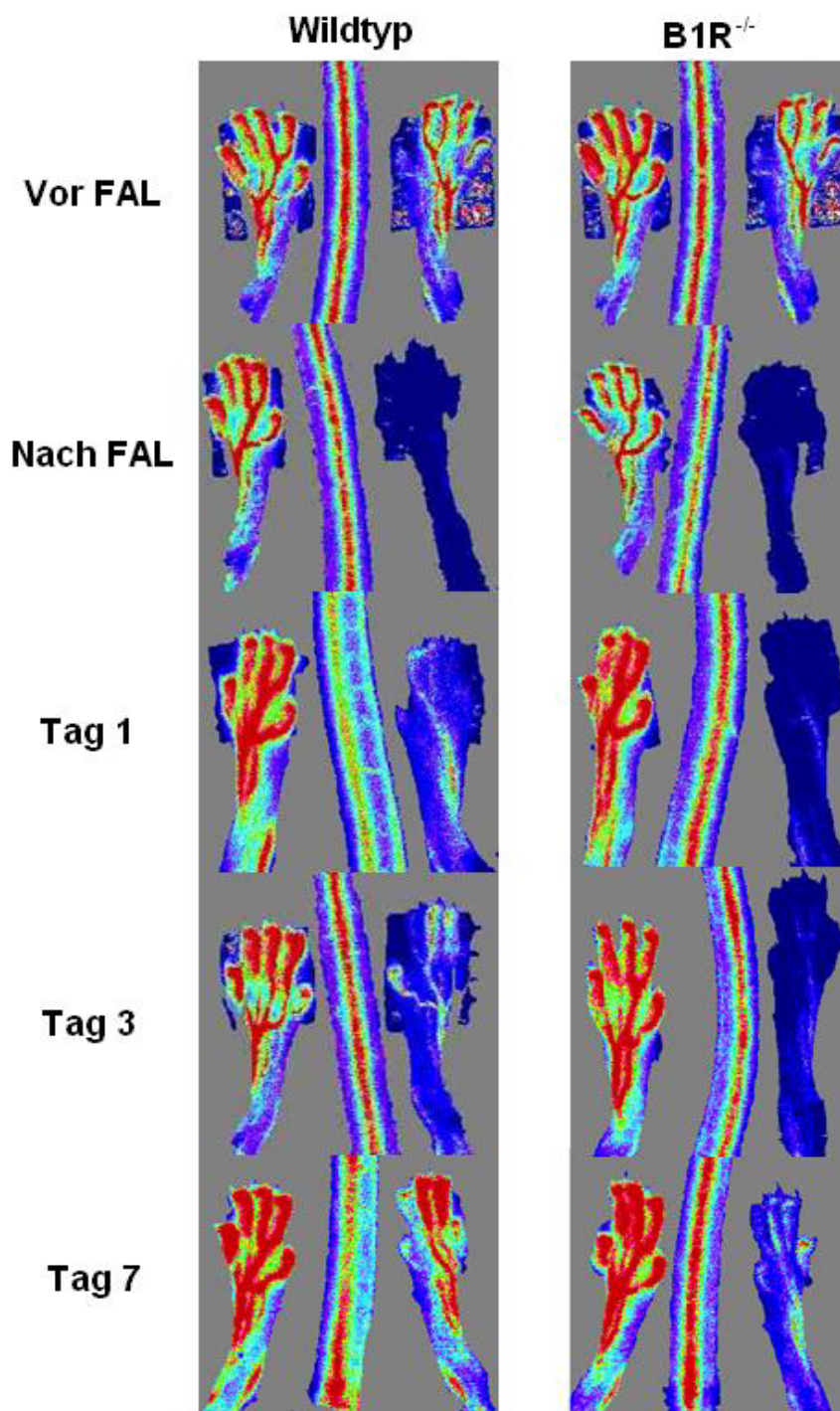


Abb. 11 Visualisierung der LDF-Messung am Fuß von WT und B1R^{-/-} Mäusen. Die FAL wurde am rechten Hinterlauf durchgeführt. Die Intensität der roten Farbe zeigt einen erhöhten peripheren Blutfluss und die Intensität der blauen Farbe zeigt die Verminderung des peripheren Blutflusses an.

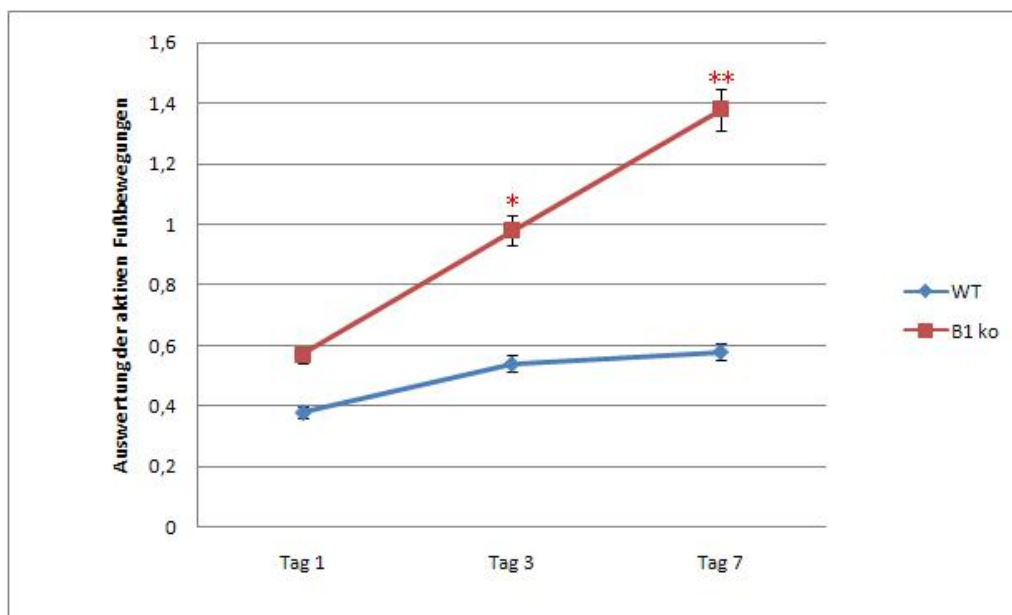
3.2 Auswertung der Fußfunktion vom Tag 1 bis Tag 7 nach Femoralarterienligatur

Um die Folge einer Femoralarterienligatur und die daraus resultierende

beeinträchtigte Fußfunktion zu bestimmen, wurden in WT und B1R^{-/-} Mäusen die aktiven Fußbewegungen und die trophische Veränderung der Hinterläufe vom Tag 1 bis Tag 7 nach Femoralarterienligatur beurteilt. Die Beweglichkeit und die trophische Situation der ligierten Hinterläufe wurden mit Zahlen zwischen 0-4 bewertet, wobei der Wert 0 eine hohe Beweglichkeit, bzw. eine tadellose trophische Situation der Hinterläufe reflektiert. Der Wert 4 steht für eine starke Beeinträchtigung der Beweglichkeit und Fußfunktion, sowie für schwere ischämische Symptome (z.B. Ischämie bedingte Nekrosen).

In der B1R^{-/-} Mäusegruppe (n=8) traten bei fünf Mäusen ab Tag 1 eine Zyanose in den Füßen der ligierten rechten Seite auf. Bis zum Tag 7 verloren vier B1R^{-/-} Mäuse ihren Fußnagel und es wurde in zwei Mäusen eine partielle Atrophie des rechten Vorfußes beobachtet. Von Tag 1 bis Tag 7 mußten alle B1R^{-/-} Mäuse den rechten Fuß nach vorne ziehen, um sich fortzubewegen. Im Laufe der Zeit hatte sich die Beweglichkeit der Hinterläufe von B1R^{-/-} Mäusen deutlich verschlechtert. Im Gegensatz zu B1R^{-/-} Mäusen kam es bei WT Mäusen nicht zur Atrophie der Unterschenkelmuskulatur. Ebenso zeigte sich, dass nach Okklusion der A.femoralis rechts, die WT Mäuse eine deutlich bessere Laufleistung erbringen konnten als die B1R^{-/-} Mäuse. In der WT Mäusegruppe (n=8) zeigte sich bei drei Mäusen in den ersten 3 Tagen eine Zyanose ohne Zehe Flexion. Über den Zeitraum von 7 Tagen genasen die WT Mäuse deutlich schneller als die B1R^{-/-} Mäuse und am Ende der Beobachtungszeit hatten fast alle Mäuse in der WT Gruppe eine vollständige funktionelle Kompensation ihrer ursprünglichen Beweglichkeit erreicht (Abb. 12).

A.



B.

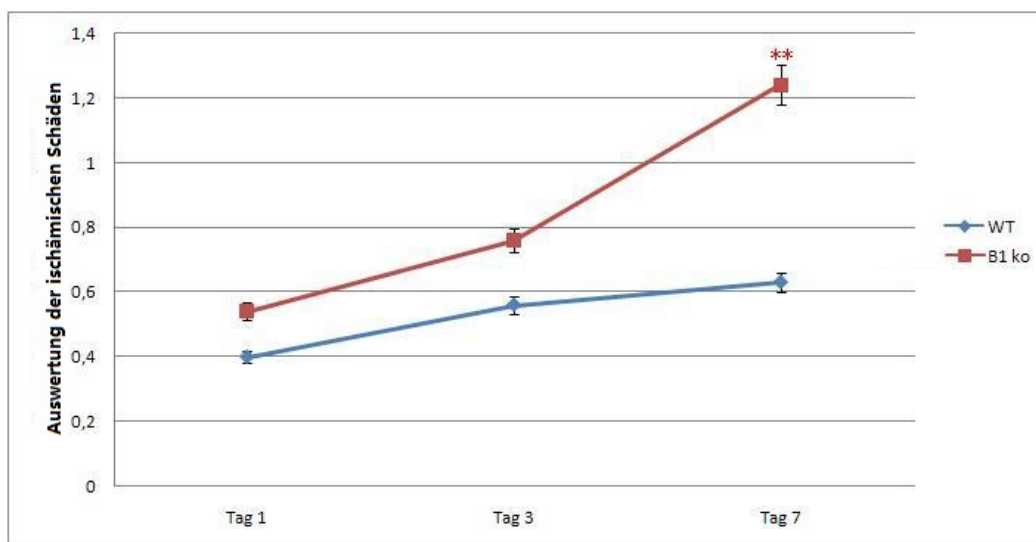


Abb. 12 Beurteilung der Fußfunktion am postoperativen Tag 1, 3, 7 nach FAL. A. Auswertung der aktiven Fußbewegungen; B. Auswertung der ischämischen Schäden in den Hinterläufe. (WT: Wildtyp Mäuse; B1 ko: B1R^{-/-} Mäuse) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

3.3 Immunhistologische Auswertung der Arteriogenese

In den Voruntersuchungen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach Femoralarterienligatur rechts die WT Mäuse eine bessere hämodynamische und funktionelle Kompensationsfähigkeit im Vergleich zu B1R^{-/-} Mäusen aufweisen. Die Ergebnisse wurden durch die Perfusionsmessungen und

Fußfunktionstest erbracht. Hier sollen diese Ergebnisse, insbesondere die Perfusionsmessungen, durch die Messung der kollateralen Diameter und Dichte validiert werden. Nach unserer Hypothese entwickelt sich nach Femoralarterienligatur das Wachstum des proximalen kollateralen Netzwerks in den Hinterläufen, was viel besser in den WT Mäusen als in den B1R^{-/-} Mäusen ist. Zur morphologischen Beurteilung des kollateralen Gefäßwachstums wurden 7 Tage nach FAL rechts die Adduktorenmuskeln von ligierten (n=16) und nicht-ligierten (n=16) Hinterläufen von WT (n=8) und B1R^{-/-} (n=8) Mäusen entnommen und die Kollateralen wurden mittels immunhistologischer Methode gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

3.3.1 Morphologie der Kollateralarterien

In allen Mäusen wurde die A. femoralis rechts ligiert und das Kollateralwachstum in den ligierten Hinterläufen wurde dadurch ausgelöst. Der linke Hinterlauf ohne Ligation diente hierbei als Kontrolle. 7 Tage nach der FAL rechts wurden die Arterien der Mäuse mittels Adenosin Injektion maximal dilatiert und die Adduktorenmuskeln der ligierten und nicht-ligierten Hinterläufe wurden entnommen. Der Adduktorenmuskel wurde in einen proximalen Teil, einen mittleren Teil und einen distalen Teil eingeteilt (im Verhältnis zum Ort der Femoralarterienligatur) und in Paraffin für histologische Untersuchungen eingebettet. Es wurden pro Muskel 12 Paraffinschnitte angefertigt (4 Schnitte von dem proximalen Teil, 4 von dem mittleren Teil und 4 von dem distalen Teil). Die Schnitte wurden immunhistologisch in rot, gegen Aktin der glatten Muskulatur (SM-Actin) in den kollateralen Arterien, angefärbt (Abb. 13). Zusätzlich wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne in blau durchgeführt. In Gewebeschnitten unterscheiden sich die präexistenten Kollateralarteriolen morphologisch nicht von den normalen Arteriolen aber werden nach ihrer typischen Lokalisation in den oberflächlichen Schichten der Adduktorenmuskeln identifiziert. Die ausgewachsenen Kollateralarterien sind

gut an der meist dicken Tunica media zu erkennen und im perivaskulären Raum herum verteilen sich während der Arteriogenese inflammatorische Zellen. Im Vergleich zu den großen Kollateralarterien im ligierten Hinterlauf sollten die präexistenten Kollateralarteriolen im nicht-ligierten Hinterlauf nur einen kleinen Durchmesser und eine dünnere Gefäßwand aufweisen.

3.3.2 Vergleich des kollateralen Arterienwachstums in WT und B1R Knockout (B1R^{-/-}) Mäusen

7 Tage nach Femoralarterienligatur zeigten sich in WT Mäusen die Diameter der kollateralen Arterien in ligierten Adduktoren signifikant größer als die in nicht-ligierten Adduktoren ($30,17 \pm 1,50 \mu\text{m}$ versus $23,46 \pm 0,99 \mu\text{m}$, $p < 0.05$). In B1R^{-/-}-Mäusen nahmen die Diameter der kollateralen Arterien in ligierten Adduktoren gering zu, aber keine deutlichen Unterschiede zwischen ligierten und nicht-ligierten Adduktoren wurden festgestellt ($23,30 \pm 1,01 \mu\text{m}$ versus $20,76 \pm 1,14 \mu\text{m}$, $p > 0.05$). In WT und B1R^{-/-} Mäusen wurde kein Unterschied von Diameter der kollateralen Arterien in nicht-ligierten Adduktoren gezeigt ($23,46 \pm 0,99 \mu\text{m}$ versus $20,76 \pm 1,14 \mu\text{m}$, $p > 0.05$). 7 Tage nach FAL ist das aktive Remodelling der kollateralen Arterien (Lumenexpansion) im ligierten Hinterlauf deutlich stärker in WT Mäusen ausgeprägt, als im Vergleich zu dem in B1R^{-/-} Mäusen (Abb. 13), was wiederum auf eine Einschränkung der Arteriogenese in B1R^{-/-} Mäusen hinwies.

Eindeutige Unterschiede von Dichte (per mm²) der kollateralen Arterien zwischen allen Gruppen (Tabelle 4, $5,08 \pm 1,01$ versus $4,85 \pm 0,60$ versus $4,04 \pm 0,60$ versus $5,18 \pm 0,56$, $p > 0.05$) wurde nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 4 zusammengefasst.

Gruppe		Diameter (μm)	Dichte (per mm^2)
Wildtyp (n=8)	ligierter Hinterlauf	$30,17 \pm 1,50$	$5,08 \pm 1,01$
	nicht-ligierter Hinterlauf	$23,46 \pm 0,99$ *	$4,85 \pm 0,60$
B1 R ^{-/-} (n=8)	ligierter Hinterlauf	$23,30 \pm 1,01$ **	$4,04 \pm 0,60$
	nicht-ligierter Hinterlauf	$20,76 \pm 1,14$	$5,18 \pm 0,56$

Tabelle 4 Vergleich des Lumendiameters und der Dichte der Kollateralarterien zwischen ligierten und nicht-ligierten Hinterläufen in WT- und B1R^{-/-} Mäusen 7 Tage nach FAL rechts

* $p < 0,05$, Vergleich des Lumendiameters der Kollateralen zwischen ligierten und nicht-ligierten Hinterläufen in WT-Mäusen; ** $p < 0,05$, Vergleich des Lumendiameters der Kollateralen in ligierten Hinterläufen zwischen WT- und B1R^{-/-}-Mäusen.

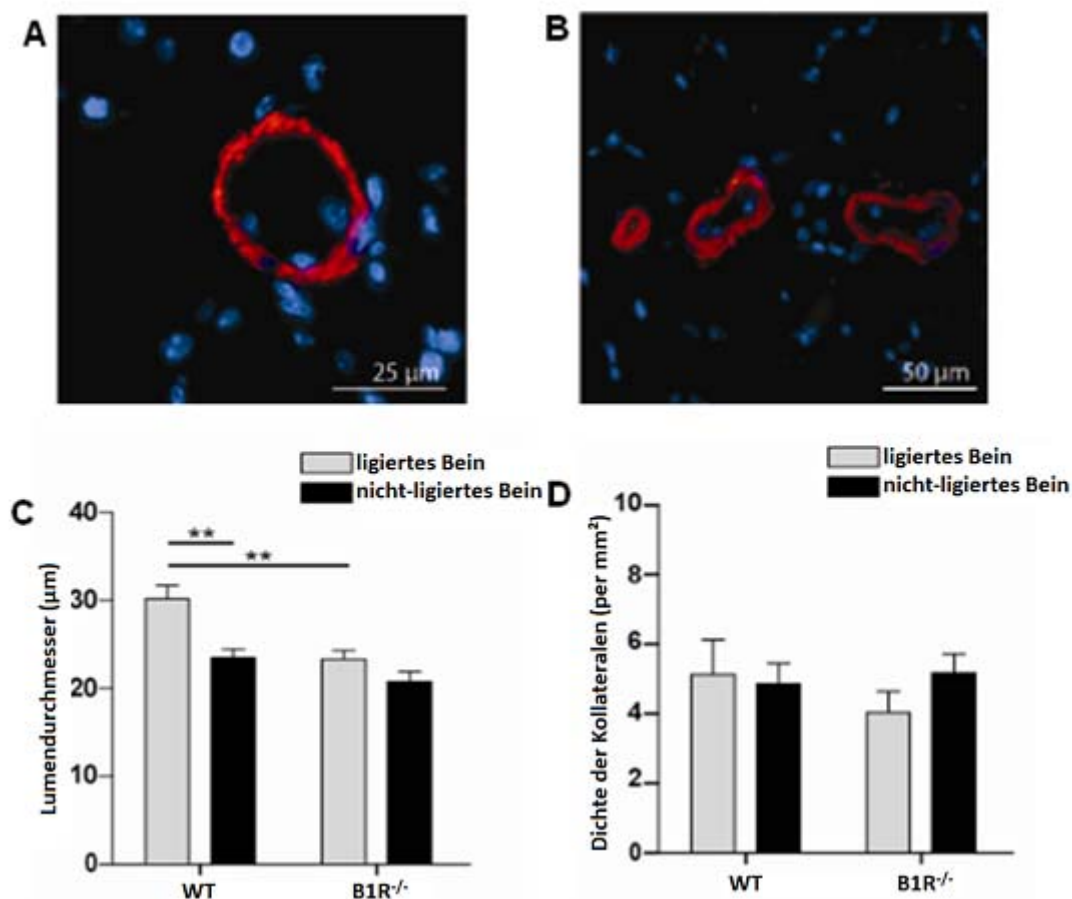


Abb.13 Umbau der Kollateralen nach Femoralarterienligatur rechts

Färbung gegen Aktin in glatten Muskelzellen (rot) (A, B), Analyse des Lumendurchmessers (A) und der Dichte (B) der Kollateralen am postoperativen Tag 7 nach FAL rechts. Vergleich des Lumendurchmessers (C) und der Dichte (D) der Kollateralen zwischen ligierten und nicht-ligierten Hinterläufen in WT und B1R^{-/-} Mäusen 7 Tage nach FAL rechts. ** $p < 0,01$

3.4 Knochenmarktransplantation

Um die Rolle von zirkulierenden Blut-Leukozyten bei der B1R vermittelten Arteriogenese zu untersuchen wurden genetisch chimäre Mäuse durch Knochenmarktransplantationen erzeugt. Hierfür wurde Knochenmark (BM – bone marrow) von WT (C57BL/6J) Spender-Mäusen in B1R^{-/-} Empfänger-Mäuse und vice versa transplantiert (siehe Methoden 2.6.). Als kontrollen dienten die Mäuse, bei denen Knochenmark aus B1R^{-/-} Spender-Mäusen in B1R^{-/-} Empfänger-Mäuse und Knochenmark aus WT Spender-Mäuse in WT Empfänger-Mäuse transplantiert wurde. Dieses Schlüsselexperiment soll die Frage klären, ob die eingeschränkte Perfusionserholung in B1R^{-/-}-Mäusen 7 Tage nach FAL rechts tatsächlich die Folge einer mangelhaften Expression der B1R auf Leukozyten ist. Ebenso soll durch die Bildung von Knochenmarks-chimären Mäusen geklärt werden, ob durch die Knochenmarktransplantation der pro-arteriogene Phänotyp (vergleichbar mit WT-Mäusen) in B1R^{-/-} Mäusen wiederhergestellt werden kann (Rescue-Experiment).

3.4.1 Auswertung des kollateralen Perfusionsindexes (CPI) in Knochenmarks-chimären Mäusen nach Femoralarterienligatur

7 Tage nach FAL rechts wurde die kollaterale Konduktanz in den ligierten Hinterläufen in Knochenmarks-chimären Mäusen durch Mikrosphären-basierte Flussberechnungen ausgewertet. Nach der Knochenmarktransplantation aus WT-Mäusen in WT-Mäuse zeigte sich in den ligierten Hinterläufen von WT/WT-Mäusen eine leichte Reduzierung des kollateralen Perfusionsindexes (n=8: 40,1 %) im Vergleich zu den nicht-bestrahlten unbehandelten WT-Mäusen. Nach der Knochenmarktransplantation aus B1R^{-/-} Spender-Mäusen in B1R^{-/-} Empfänger-Mäuse zeigte es sich, dass die kollaterale Konduktanz in B1R^{-/-}/B1R^{-/-}-Mäusen stark reduziert war (n=8: 24,5 %). Ebenso zeigte sich nach der Knochenmarktransplantation von B1R^{-/-}-Mäusen in WT-Mäuse eine deutliche Abnahme des kollateralen

Perfusionsindex in den B1R^{-/-}/WT-chimären Mäusen (n=8: 27,6 %), diese eingeschränkte kollaterale Konduktanz ist mit der Konduktanz von den nicht-behandelten B1R^{-/-}-Mäusen vergleichbar (Daten aus anderer Studie in unserer Forschungsgruppe und werden hier nicht angegeben [101]). Die Transplantation vom WT-Knochenmark in B1R^{-/-}-Mäuse führte zu einer erheblich verstärkten kollateralen Konduktanz in WT/B1R^{-/-}-chimären Mäusen (n=8: 44,8 %). Zusammenfassend war 7 Tage nach FAL rechts die kollaterale Konduktanz in den ligierten Hinterläufen, unabhängig von den Empfänger-Mäusen, signifikant besser in den chimären Mäusen mit transplantierten Knochenmarkszellen von WT-Spendermäusen, als in den chimären Mäusen mit Knochenmarkszellen von B1R^{-/-}-Spendermäusen (Abb. 14).

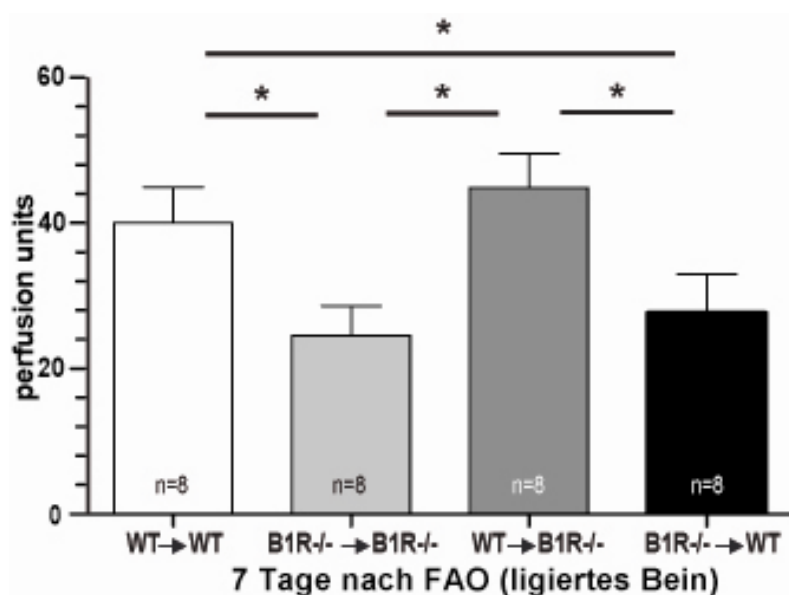


Abb. 14 Der kollaterale Perfusionsindex in den ligierten Hinterläufen in chimären Mäusen nach Knochenmarkstransplantation (7 Tage nach FAL rechts)
 Nach Knochenmarkstransplantation von B1R^{-/-}-Mäusen in WT-Mäuse wurde 7 Tage nach FAL rechts die kollaterale Konduktanz in den ligierten Hinterläufen von B1R^{-/-}/WT-chimären Mäusen signifikant vermindert. Die Knochenmarkstransplantation von WT-Mäusen in B1R^{-/-}-Mäuse verstärkte erheblich die kollaterale Konduktanz in den ligierten Hinterläufen der entstandenen WT/B1R^{-/-}-chimären Mäusen am postoperativen Tag 7 nach FAL rechts. * $p < 0,05$.

3.4.2 Transmigration von Leukozyten in den perivaskulären Bereich von Kollateralarterien im Femoralisligatur Mausmodell nach Knochenmarktransplantation

In einer 2. Versuchsreihe wurde Analog zur 1. Versuchsreihe (3.4.1.) Knochenmark von GFP-positiv-WT-Mäusen in B1R^{-/-}- und WT-Mäuse transplantiert (Abb. 8). Mit Hilfe des GFP-Antikörpers wurden die aus dem Knochenmark stammenden Leukozyten in Adduktormuskeln von GFP-Reporter-Chimären immunhistochemisch dargestellt und analysiert (siehe 2.6.5). Hier zeigte sich, dass die GFP-positiven Leukozyten weder in die Endothelzellschicht noch in die Schicht der glatten Muskelzellen einwanderten, sondern rund um die kollateralen Arterien im Adduktorenbereich akkumulierten. Insbesondere 3 Tage nach FAL rechts zeigte sich eine große Anzahl von GFP-positiven Leukozyten in dem perivaskulären Raum der wachsenden Kollateralarterien (Abb. 15). Die Anzahl der eindringenden GFP-positiven Leukozyten in GFP-Reporter-Chimären (Knochenmark von GFP-positiv-WT-Mäusen in WT-Mäuse *versus* Knochenmark von GFP-positiv-WT-Mäusen in B1R^{-/-}-Mäuse) war nicht signifikant unterschiedlich.

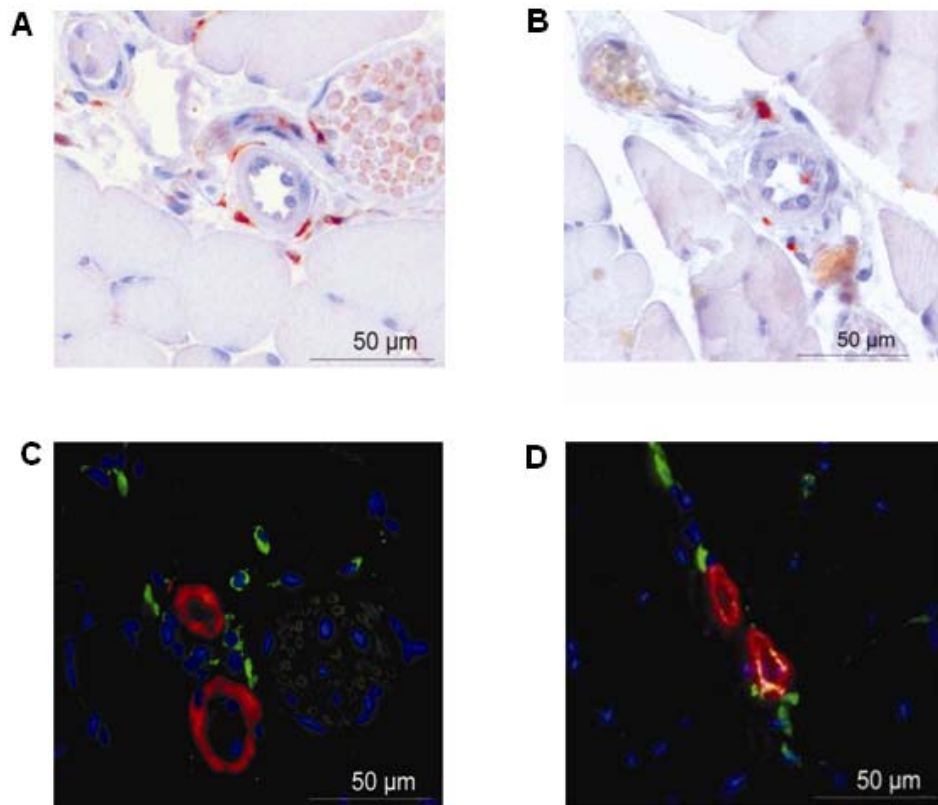


Abb.15 (A,B) Färbung von GFP-positiven Leukozyten (Chromogen rot), Kern (blau); (C,D) Färbung von GFP-positiven Leukozyten mit fluoreszierendem Antikörper, GFP (grün), Aktin glatter Muskelzellen (rot), Kern (blau). Die GFP-positiven Leukozyten akkumulieren im perivaskulären Bereich von Kollateralarterien: WT-Mäusen (A,C) und in B1R^{-/-}-Mäusen (B,D).

4. Diskussion

Vorarbeiten identifizierten das Bradykinin-Rezeptor-1-System als Modulator der Arteriogenese. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine funktionelle Studie durchgeführt, mit dem Ziel die Mechanismen zu entschlüsseln, um zu klären über welche Zellen der B1R die periphere Arteriogenese steuert. Mechanistisch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass zirkulierende Knochenmarkzellen die periphere Arteriogenese steuern, nachdem sie in den perivaskulären Bereich einwandern. Ausschlaggebend für das kollaterale Arterienwachstum war hierbei die B1R Expression auf zirkulierenden Leukozyten. Aus diesem Befund lassen sich neue Möglichkeiten für eine therapeutische Arteriogenese ableiten.

4.1 Tiermodell

Eine experimentelle Induktion der peripheren Arteriogenese durch die Femoralarterienligatur wurde an zahlreichen Tierarten untersucht und optimiert. Die Experimente wurden sowohl an Großtieren, wie z.B. Schweinen und Hunden, sowie auch an Kleintieren wie Kaninchen, Ratten und Mäusen untersucht und beschrieben [7, 33]. Im Vergleich zu anderen Tierarten ist das Mausmodell vom großen Vorteil. Mäuse sind in zahlreichen genetischen Variationen verfügbar. Durch genetisch veränderte Stämme ist es möglich, Einblick in die zugrunde liegenden molekularen Zusammenhänge von Gefäßwachstumsprozessen zu bekommen. Auswirkungen von Veränderungen auf Rezeptorebene können *in vivo* untersucht werden. Außerdem können tierexperimentelle Eingriffe und die Evaluationen der hämodynamischen Situation in Mäusen im Vergleich zu anderen Tierarten einfacher durchgeführt werden (Gold-Standard der Arteriogenese Forschung, FAO in der Maus, siehe unten).

Das Mausmodell wurde zuerst im Jahr 1998 von Couffinhal et al [102]

entwickelt, wobei eine einseitige Ischämie des Hinterlaufs durch Ligatur der A. Femoralis proximal und der A. Saphena distal induziert wurde. In den letzten Jahren wurde das Mausmodell zum Referenzmodell zur Abklärung des molekularen Prozesses des kollateralen Gefäßwachstums [98, 103]. In dieser Studie wurde das FAO-Mausmodell nach Hoefler et al. modifiziert [41]. Die A.femoralis rechts wird in dieser Studie nicht reseziert, sondern durch eine doppelte Ligatur okkludiert. Hierbei werden alle Strukturen in ihrer anatomischen Position belassen. Die minimale Traumatisierung soll begleitende Effekte wie spezifische Entzündungen und Vernarbungsprozesse so gering wie möglich halten.

Für die Ligatur wurde die A. femoralis rechts im Bereich distal des Abgangs der Arteria profunda femoris und proximal der Arteria poplitea durch zwei Ligaturen okkludiert: proximal und distal des Abgangs der A. caudalis femoris lateralis (LCFA). Damit übernehmen die nicht verschlossene A. profunda femoris den Blutstrom zur distalen Hinterlauf-Region. Die Verzweigungen dieser Arterie anastomosieren über präexistente Umgehungskreisläufe mit der A. caudalis femoris lateralis und A. saphena parva [104].

Dieses Modell erlaubt es, die Arteriogenese im Bereich des Oberschenkels direkt um die Okklusion der A. femoralis herum zu induzieren. Hier herrschen in den Gefäßen der Umgehungskreisläufe die erhöhten Scherkräfte und das Wachstum der Kollateralen findet im Stromgebiet des medialen Femurs im Bereich der Mm. adductores statt [105]. Es wurde bereits beschrieben, dass in diesem Ligatur-Mausmodell keine Ischämie in der Adduktorenmuskulatur beobachtet wurde [106, 107]. Die Kapillardichte in der Musculus semimembranosus änderte sich demzufolge über 21 Tage nach der Ligatur nicht signifikant [98]. Die Angiogenese und eine Erhöhung der Kapillardichte findet im Gegensatz dazu im Unterschenkel statt. Hier entsteht eine Ischämie im Muskelgewebe unterhalb des Knies [33, 108], da der Unterschenkel

deutlich unterhalb der Okklusion liegt und vor der Arteriogenese nicht durch ausgewachsene Umgehungskreisläufe versorgt werden kann. Die Kapillarmenge im ischämischen Gewebe ist aber nicht ausschlaggebend für die Perfusion, sondern allenfalls für die Verteilung des Blutes [33]. Deswegen wird die Perfusion im Gewebe unterhalb der Okklusionsstelle nicht durch Angiogenese positiv verändert [31]. Man kann also davon ausgehen, dass die Perfusionskompensation im Hinterlauf vorwiegend von dem Wachstum der präexistenten kollateralen Arteriolen (Arteriogenese) in Oberschenkel abhängig ist.

In dieser Studie wurden alle Eingriffe an Mäusen mit einem genetischen C57BL/6 Hintergrund durchgeführt. Dieser Mäuse-Stamm ist zu einem besonders effizienten kollateralen Arterienwachstum befähigt. Faber *et al* [109] zeigten, dass im C57BL/6-Stamm die Wiederherstellung des Blutflusses nach Femoralarterienligatur im Vergleich zu anderen Stämmen (z.B. BALB/c und A/J) wesentlich schneller und stärker erfolgt. In postmortem-Angiographien wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Ursache zumindest zum Teil auf ein besser entwickeltes präexistentes kollaterales Netzwerk bei den C57BL/6-Mäusen zurückzuführen ist.

4.2 Laser Doppler basierte Flussmessung

Die lokale Phänotyp-Bestimmung infolge einer Femoralarterienligatur bei der Maus erfolgte sowohl durch funktionelle Untersuchungen, wie Blutflussbestimmung und Bestimmung der Aktivität und trophischen Veränderung der Hinterläufe, als auch durch Erstellung und Beurteilung histologischer Präparate von Gefäßen im Bereich der Mm. adductores.

Die Perfusion des Hinterlaufs nach Femoralarterienligatur ist zusammen mit der Größe und Dichte der Kollateralen ein entscheidender Parameter bei der Evaluation der Arteriogenese. Für die Blutflussbestimmung stehen mehrere

Methoden zur Verfügung. Als rein nicht-invasive Perfusionsmessung wird die Laser Doppler basierte Flussmessung gewertet. Dabei scannt ein Laserstrahl den Messbereich ab und ermittelt sequentiell die relative Durchblutung des Fußes als Maß für die Leistung des proximalen kollateralen Netzwerks. Somit wird der zeitliche Verlauf des kollateralen Gefäßwachstums analysiert. Derzeit wird LDF in zahlreichen Forschungsbereichen [110-113] angewendet, insbesondere bei der Messung der peripheren Perfusion, sowohl bei Menschen [114, 115] als auch bei Kleintieren [92, 96, 116]. Mit dieser Technik lässt sich aussagekräftige Perfusionswerte im Mausmodell ermitteln und so direkte Rückschlüsse auf die Arteriogenese als kompensatorischer Mechanismus zu ziehen.

In dieser Studie wurde die Perfusion des ligierten Fußes von Mäusen am Tag 0 unmittelbar vor und nach der FAO, sowie am postoperativen Tag 1, 3 und 7 mittels LDF gemessen. Der Blutfluss im Hinterlauf am Tag 0 vor der FAO spiegelt überwiegend die arterielle Perfusion, da der Hinterlauf durch A. femoralis versorgt wird und die Kollateralen in normalen Geweben keine oder nur geringe Perfusion aufweisen [117]. Diese Studie zeigte keinen signifikanten Perfusionsunterschied im Hinterlauf zwischen WT und B1R^{-/-} Mäusen am Tag 0 vor der FAO rechts. Anatomische Unterschiede in der Architektur von Hinterlaufarterien zwischen WT und B1R^{-/-} Mäusen sind daher eher unwahrscheinlich. Unmittelbar nach der Okklusion der rechten A. Femoralis kommt es zu einer transienten Durchblutungsstörung distal der Ligatur. Dies führt unmittelbar nach der Ligation (am Tag 0) zu einem sofortigen Abfall der Perfusion im Hinterlauf. Der starke Perfusionsabfall unmittelbar nach der Ligation weist auf den Erfolg der FAO hin und ist auf einen noch wenig ausgeprägten kollateralen Blutfluss zurückzuführen. In den folgenden Tagen nach einer FAO wird die Perfusion in der adduktoren Region zum Einen durch autoregulatorische Dilatation der nachgeschalteten Widerstandgefäße und zum Anderen durch flussabhängige Dilatation [118] der

vorgeschalteten kollateralen Versorgungsarterien beeinflusst. Die Vasodilatation der präexistenten Kollateralarterien nach FAO reicht dabei nicht aus, um die distale Hypoperfusionsregion ausreichend zu versorgen. Durch ein aktives Wachstum (Zellproliferation) der kollateralen Arteriolen kann die Perfusion jedoch nach einigen Tagen kompensiert werden, da Arteriogenese bereits direkt nach Gefäßverschluss ausgelöst wird. Bereits ab dem postoperativen Tag 1 zeigten die WT Mäuse im Vergleich zu B1R^{-/-} Mäusen eine signifikant stärkere Perfusionswiederherstellung im ligierten Hinterlauf. Die maximale Differenz zwischen den beiden Gruppen war im Bezug auf die Hinterlaufperfusion am postoperativen Tag 7 zu beobachten (229.74 ± 27.82 Perfusionsunits in WT Mäusen vs 63.90 ± 10.35 Perfusionsunits in B1R^{-/-} Mäusen, $p < 0.001$). Die verringerte Perfusionskompensation, die ein eingeschränktes Wachstum der Kollateralarteriolen bedeutet, bleibt bei B1R^{-/-} Mäusen sogar am postoperativen Tag 21 nach FAO rechts erhalten [101]. Zusammenfassend zeigte diese Studie, dass WT Mäuse zu jedem Zeitpunkt (ab Tag 1 nach FAO rechts) eine signifikant schnellere und stärkere Perfusionserholung im Vergleich zu B1R^{-/-} Mäusen aufweisen. Die kollateralen Arterien scheinen bis einschließlich Tag 21 post FAO in B1R^{-/-} Mäusen nicht signifikant zu Wachsen, da sich keine große Perfusionserholung einstellt.

4.3 Auswertung der Fußfunktionsbeeinträchtigung nach FAL

In dieser Studie wurde die Laser Doppler basierte Flussmessung zur indirekten Messung der Arteriogenese herangezogen. Ergänzend zu der Bestimmung des Blutflusses über LDF wurde im Verlauf des Beobachtungszeitraums die Fußfunktion bewertet, da die Funktionalität der unteren Extremität im Zusammenhang mit einer Perfusionsverminderung eingeschränkt werden könnte. Als Parameter wurde hierbei die aktive Fußbewegung und die atrophische Veränderung des Fußgewebes zur Beurteilung der Funktionsbeeinträchtigung verwendet [116].

Unmittelbar nach der FAO rechts am Tag 0 zeigte sich am distalen Vorfuß in beiden Mäusen Gruppen Zyanosen und ein Erblässen des Gewebes. Auch die Beweglichkeit des Fußes ist im Sinne einer geringgradigen Parese eingeschränkt. Diese Parese ist auf das Durchblutungsdefizit distal der Ligatur zurückzuführen. Am postoperativen Tag 1 wurde auch keinen Unterschied bei der Fußbeweglichkeit und trophischen Veränderung zwischen den WT und B1R^{-/-} Mäusen Gruppen beobachtet. Einhergehend mit der Perfusionsverbesserung und dem Auswachsen von kollateralen Arterien zeigte sich ab dem postoperativen Tag 3 in WT Mäusen eine deutliche Verbesserung bei der Fußbeweglichkeit. Bis zum postoperativen Tag 7 stellte sich bei den WT Mäusen eine nahezu 100-prozentige funktionelle Erholung des ligierten Hinterlaufs ein, da der Blutfluss im ligierten Hinterlauf durch Kollateralen im großen Teil kompensiert wurde. Trotz der anfänglichen distalen Minderperfusion kam es während des gesamten Beobachtungszeitraumes in der WT Gruppe nicht zur Bildung von Nekrose oder Auto-Amputation der Extremitäten, da das Wachstum der Kollateralen bereits direkt nach Gefäßverschluss ausgelöst wurde. Aufgrund von dem offensichtlichen Defekt des kollateralen Gefäßwachstums kam es in B1R^{-/-} Mäusen nur zu einer geringen Perfusionserholung. In den ligierten Hinterläufen der B1R^{-/-} Mäuse kam es daher zu partiellen Atrophien des Vorfußes. In Übereinstimmung mit den verringerten Perfusionswerten (über LDF) im ligierten Hinterlauf der B1R^{-/-} Mäuse zeigte sich hier eine deutlich stärkere Beeinträchtigung der Fußfunktion und Gewebeschäden.

4.4 Immunhistologische Analyse

Durch die Laser Doppler basierte Flussmessung und die Bestimmung der Fußfunktion (Fußbeweglichkeit und Hinterläufe-Atrophien) konnte gezeigt werden, dass die Perfusionswiederherstellung nach FAO rechts, bei B1R^{-/-}

Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen massiv reduziert war. Um sicherzustellen, dass diese funktionellen Daten tatsächlich auf ein schlechteres Kollateralgefäßwachstum von B1R^{-/-} Mäusen zurückzuführen waren, sollte nachträglich ein Arteriogenese-Nachweis mit Hilfe der histologischen Analyse durchgeführt werden. Die periphere Perfusion in den Maushinterläufen ist nach FAO von der Größe und Dichte der präexistenten Kollateralarteriolen abhängig. Dazu wurden die kollateralen Arterienarteriendiameter und die Arterienarteriendichte von Hinterläufen quantifiziert.

Die histologische Analyse der Adduktorenmuskulatur wurde nach der Beschreibung von Chalothorn et al. [96] unter der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. In dem Femoralisligatur-Mausmodell wurde Adenosin in die Gefäße infundiert, damit die Gefäße maximal vasodilatiert wurden. Danach wurden die Adduktorenmuskeln von ligierten und nicht-ligierten Hinterläufen [119] entnommen. Die kollaterale Region und die *Area of Interest* wurde hierbei in früheren Studien [95] mittels postmortalen Angiographien genauestens definiert und die morphologische Veränderung der Kollateralarterien nach FAO wurde im Adduktorenbereich dargestellt. Die kollaterale Arterien verfügen über mindestens eine Schicht der glatten Muskelzellen und wurden hier mit dem anti- α -SMC-Aktin-Antikörper identifiziert.

Die histologische Untersuchung zeigte, dass 7 Tage nach FAO rechts das Gefäßlumen (Durchmesser) der Kollateralarterien in ligierten Adduktorenmuskeln in WT Mäusen deutlich größer als das Gefäßlumen in B1R^{-/-} Mäusen. Der Phänotyp der B1R^{-/-} Mäuse hinsichtlich der Architektur der kollateralen Arterien schien sich hier generell nicht zu unterscheiden. So zeigten die Ergebnisse, dass es vor der FAO keinen signifikanten Unterschied im Lumendiameter und in der Dichte der präexistenten Kollateralarteriolen in Adduktorenmuskeln in WT und B1R^{-/-} Mäusen gab. Dies bedeutete, dass WT

und B1R^{-/-} Mäuse grundsätzlich eine ähnliche Menge und Größe von präexistenten Kollateralarteriolen besitzen. Änderungen der Gefäßdiameter ist also auf Arteriogenese (Kollateralwachstum) zurückzuführen und es zeigt sich hier eine deutliche Inhibierung der Arteriogenese in B1R^{-/-} Mäusen.

Bezüglich der Dichte der α -SMC-Aktin positiven kollateralen Gefäße in Adduktorenmuskeln zeigte sich interessanterweise keine Änderung vor und 7 Tage nach FAO in ligierten und nicht-ligierten Hinterläufen. Die Dichte der kollateralen Arterien änderte sich dabei in B1R^{-/-} Mäusen als auch WT gleichermaßen nicht. Dieses Ergebnis zeigte, dass es zwar zu einer funktionellen Diameterzunahme der kollateralen Arterien kommt; die Anzahl der kollateralen Arterien aber nicht signifikant zunimmt. Eine *de novo* Neubildung von Kollateralen aus Kappilaren und Kleinstgefäßen ist demnach hier auszuschließen. Kappilare und Kleinstgefäße, welche nur aus Endothelzellen bestehen, wurden daher bei dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. Als Widerstandsgefäße würden Kappilare eine Ligatur der Femoralarterie nicht kompensieren können. Zudem wurde in der früheren Studie von Hillmeister et al. gezeigt (Daten nicht publiziert), dass es 7 Tage nach FAO, zu keiner Veränderung der Kapillardichte in den ligierten und nicht-ligierten Adduktorenmuskeln kommt.

In der früheren Studie [95] wurde durch hochauflösende postmortale Mikro-Computer-Tomographie gezeigt, dass 7 Tage nach FAO die Kollateralen im Adduktorenbereich in WT Mäusen in ihrem Durchmesser sich signifikant vergrößerten und ein typisches korkenzieherartiges Aussehen hatten. Die oben beschriebenen Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der morphologischen Analyse von damals [95, 120].

4.5 Mechanismen der B1R Signalwirkung für die Arteriogenese

In dieser Studie wurde durch funktionelle und morphologische Untersuchungen gezeigt, dass der B1R Signalweg für die Arteriogenese relevant ist. Hierbei zeigten B1R^{-/-}-Mäuse einen der stärksten, bisher beobachteten Phänotypen hinsichtlich einer verringerten Arteriogenese (Loss-of-function Experiment). Vice Versa ist es von großer Bedeutung zu klären, ob die Arteriogenese über den B1R Signalweg stimuliert werden kann. Weiterhin wäre hier wichtig, die Mechanismen zu verstehen, über welche die Stimulierung der B1R Signalwirkung zu einer verbesserten Arteriogenese führt. Mechanistisch sollte daher geklärt werden, ob die verringerte Arteriogenese in B1R^{-/-} Mäusen tatsächlich die Folge einer mangelhaften Expression der B1R auf Leukozyten ist. Dafür wurde ein Knochenmark-chimäres Mausmodell mit einem Crossover-Design (Abb. 7) generiert, um zu klären, ob zirkulierende Leukozyten einen pro-arteriogenen Phänotypen wiederherstellen können („Rescue“-Experiment).

4.5.1 Knochenmarktransplantation

In dieser Studie wurde das körpereigene Knochenmark der Empfängermäuse durch radioaktive Bestrahlung zerstört, die Tiere wurden rekonstituiert um 6 Wochen später das Knochenmark der Spendermäuse zu erhalten. Bei dem oben erwähnten Crossover Design, kam es innerhalb dieses Projektes zu einer Übertragung des Knochenmarks von B1R^{-/-} Mäusen in WT Mäuse und von WT Mäusen in B1R^{-/-} Mäuse (Rescue-Gruppe), sowie von B1R^{-/-} Mäusen in B1R^{-/-} Mäuse und von WT Mäusen in WT Mäuse (Kontroll-Gruppen).

Ziegelhoeffer *et al* [121] hat gezeigt, dass nach Bestrahlung und Knochenmarktransplantation das kollaterale Gefäßwachstum in Knochenmarks-chimären Mäusen grundsätzlich nicht beeinflusst wurde. Durch immunologische und flusszytometrische Untersuchungen wurde dabei nachgewiesen, dass die Anzahl und Komposition der zirkulierenden

Leukozyten in Knochenmarks-chimären und nicht-chimären Mäusen grundsätzlich ähnlich sind [121]. Desweiteren wurde hier gezeigt, dass nach Transplantation von Knochenmark aus GFP-positiven Mäusen in WT Mäuse (C57BL/6J), fast alle zirkulierenden Zellen (außgenommen von Erythrozyten) in Wildtyp-Chimären GFP positiv wurden. 6 Wochen nach der Knochenmarktransplantation wurden die meisten kernhaltigen Zellen (79 %-86 %) in der peripheren Zirkulation GFP positiv, was die erfolgreiche hämatopoetische Rekonstitution in Knochenmarks-Chimären bestätigen konnte [122].

In unserer Studie erhielten die $B1R^{-/-}$ -Mäuse nach Transplantation des Knochenmarks von WT Mäusen wieder Leukozyten, welche den B1R funktionell exprimieren konnten. Im Gegensatz dazu besaßen die Wildtyp-Chimäre Mäuse mit Knochenmark von $B1R^{-/-}$ -Mäusen überwiegend Leukozyten, welche keinen funktionellen B1R exprimieren konnten.

4.5.2 Die Mikrosphären-basierte Technik

Zur Beurteilung der arteriogenen Phänotypen der Knochenmarks-chimären Mäuse nach Femoralarterienligatur, wurde eine Mess-Technik basierend auf Mikrosphärenperfusion durchgeführt. Die Mikrosphärenperfusion sollte hierbei als Flussmessung und indirekter Nachweis des kollateralen Gefäßwachstums dienen. Bei dieser Technik werden fluoreszierende Partikel durch Aorta in die arterielle Zirkulation eingebracht. Die Mikrosphären verbleiben aufgrund ihrer Größe von $15\mu\text{m}$ in den präkapillären Arteriolen und können die Kapillaren mit einer Größe von unter $7\mu\text{m}$ nicht erreichen. Das Prinzip der Mikrosphären-basierten Technik liegt darin, dass die regionale Durchblutung eines Organs/Gewebes proportional zur Anzahl der in den Kleinstarterien dieses Organs/Gewebes zurückbleibenden Mikrosphären ist. Die Mikrosphären-Technik gilt als Goldstandard zur Erfassung der Perfusion des Kollateralarterienkreislaufes [100].

Durch die Bestimmung des kollateralen Perfusionsindexes mittels Mikrosphären-basierte Technik lässt sich zudem das im FAO-Modell zu beobachtende kollaterale Gefäßwachstum, deutlich von der Angiogenese abgrenzen. Die Passage dieser Mikrosphären in den distalen Oberschenkel benötigt Konduktanzgefäße, die größer als 30 μm sind. Die im Unterschenkel okklusionsbedingte hypoxische Ischämie, welche die Aussprossungen neuer Kapillaren induziert, wird durch die Mikrosphärenperfusion nicht erfasst. Somit ist die Mikrosphärenperfusion ein eindeutiger Nachweis der Arteriogenese und ermöglicht die Untersuchung der Perfusion und Arteriogenese, unabhängig von kapillarer Aussprossung [123].

Als kritische Anmerkung soll hier der technische Aufwand und hohe Tierzahl für Mikrosphärenperfusionsen nicht unerwähnt bleiben. Die Perfusionsmessung mit Mikrosphären erfordern immer eine Gewebeentnahme, die vor allem bei Kleintieren das Töten derselben voraussetzt. Darüber hinaus sind die im Gewebe gefangenen Mikrosphären nur nach kompletter Verdauung der Gewebe nachweisbar und muss für eine valide Untersuchung mit verschiedenen farbigen Mikrosphären bei verschiedenen Druckstufen durchgeführt werden [124]. Als Zielparameter gilt dann die Anzahl der Partikel je Druckstufe pro Gewichtseinheit des Gewebes. Das gleiche Tier kann also nicht zu verschiedenen Zeitpunkten auf seine Kollateralisierung untersucht werden und das Gewebe steht einer weiteren histologischen Analyse nicht mehr zur Verfügung.

4.5.3 Mechanismus der B1R vermittelten Arteriogenese

Der Bradykinin Rezeptor Signalweg nimmt für die Gefäßbiologie eine große Bedeutung (Vasodilatation, Endothelzellproliferation) ein. Die Rolle von B1R Signalwegen wurde bisher im Zusammenhang mit der Arteriogenese jedoch nicht untersucht. In dieser Studie wurde gezeigt, dass B1R die Arteriogenese

positiv beeinflusst. Daher ist es wichtig zu klären, über welche Mechanismen der B1R seine pro-arteriogene Wirkung vermittelt.

Es ist bekannt, dass der B1R eine wichtige Rolle für inflammatorische Prozesse [86] einnimmt und hier insbesondere die Einwanderung von Neutrophilen in die Gefäßwand steuern kann [125, 126]. Die Einwanderung von Leukozyten in den perivaskulären Bereich von wachsenden Kollateralgefäß wurde vielfach als regulatorischer Schritt für die Arteriogenese experimentell nachgewiesen [127]. Mehrere Studien zeigten hier, dass insbesondere Monozyten kurz nach Initiation der Arteriogenese in den perivaskulären Bereich einwandern und wichtige regulatorische Funktionen übernehmen (Sekretion von Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen, Chemokinen) [128, 129]. Die aus dem Knochenmark stammenden Leukozyten (Monozyten) sind demnach Schlüsselregulatoren der Arteriogenese [130, 131]. Da die Leukozyten-Migration für die Arteriogenese (insbesondere in der Frühphase) [42] diese entscheidende regulatorische Bedeutung einnimmt, war die Grundhypothese dieses Projektes, dass der B1R seine pro-arteriogene Wirkung sehr wahrscheinlich über Leukozyten-spezifischen inflammatorischen Signalweg vermittelt.

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass 7 Tage nach FAO die Arteriogenese in chimären Mäusen mit transplantierten Knochenmarkzellen von WT-Spendermäusen generell schneller und effizienter verläuft als in chimären Mäusen mit Knochenmarkzellen von B1R^{-/-}-Spendermäusen. Die mittels Mikrosphären bestimmte Perfusionsrate der Hinterläufe zeigte hier eine bessere Perfusionsrate in chimären Mäusen mit WT Knochenmarkzellen im Vergleich zu chimären Mäusen mit Knochenmarkzellen von B1R^{-/-}-Spendermäusen. Durch das in dieser Tierstudie verwendete Crossover-Design konnte zudem gezeigt werden, dass eine verbesserte kollaterale Perfusionsrate in jedem Fall durch die Transplantation von

WT-Knochenmarkzellen erfolgte, auch wenn die Empfängermaus einen B1R^{-/-} Hintergrund hatte. Dieses Ergebnis zeigte, dass Leukozyten als Träger des B1R relevant für die Arteriogenese sind. Dies wurde weiterhin bestätigt, da das Perfusionsdefizit von B1R^{-/-} chimären Mäusen mit Leukozyten aus WT Spendermäusen fast völlig wiederhergestellt wurde (Rescue-Experiment). Demnach ist die Expression der B1 Rezeptoren auf Leukozyten eine maßgebliche Determinante und ein wichtiges regulatorisches Prinzip während des Wachstums von Kollateralarterien.

Wie zuvor beschrieben sind Leukozyten im FAO-Modell wichtige Regulatoren der Arteriogenese [127, 128]. Die Leukozyten im perivaskulären Raum generieren mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen eine lokale inflammatorische Bedingung, damit das kollaterale Gefäßwachstum orchestriert erfolgen kann [52, 132, 133]. Eine funktionelle B1R Expression auf Leukozyten scheint also relevant für die Transmigration von Leukozyten in den perivaskulären Bereich und/oder die Produktion von pro-arteriogenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Welche leukozytäre Subpopulation hier besonders relevant ist und welchen inflammatorischen Prozess hier die B1R maßgeblich steuern gilt es in Zukunft zu klären. Da vielfach für Monozyten/Makrophagen eine Schlüsselrolle bei der Modulation der Frühphase [42] der Arteriogenese beschrieben wurde, sind diese Zellen von besonderem Interesse. Schaper et al [46] zeigten eine massive Ablagerung der Monozyten um den koronaren Kollateralen 1-3 Tage nach der Okklusion der Koronararterie. Es wurde gezeigt [121], dass nach Knochenmarktransplantation die aus dem Knochenmark stammenden GFP-positiven Zellen weder einen Endothel- noch glatten Muskelzellen Phänotyp zeigten. Durch Immunfärbung wurde gezeigt, dass diese Zellen hauptsächlich Leukozyten sind, welche typische Eigenschaften von Monozyten/Makrophagen aufweisen. Diese Zellen lagern sich nicht in die Gefäßwand ein sondern sammeln sich in der Adventitia der wachsenden

Kollateralarterien an wo sie lokal als Zytokinfabriken fungieren [121].

In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass 3 Tage nach FAO, in chimären Mäusen mit Knochenmarkzellen von GFP-positiven WT Mäusen, es zu einer starken Transmigration von GFP-positiven Zellen in den perivaskulären Bereich der kollateralen Arterien im Adduktorenbereich kam, unabhängig vom Hintergrund der Empfängermäuse. Zudem wurde gezeigt, dass die Anzahl der transmigrierten GFP-positiven Zellen im perivaskulären Bereich der Kollateralen in GFP/B1R^{-/-} und GFP/WT Chimärenmäusen nicht signifikant unterschiedlich war. In einem vorausgehenden Projekt [101] konnte bereits gezeigt werden, dass die Anzahl der perikollateralen ED1-positiven Zellen (Makrophagen) in B1R^{-/-} Mäusen, im Vergleich zu der Anzahl in WT Mäusen, deutlich reduziert war. Weitere Studien haben gezeigt, dass die Rekrutierung der Leukozyten in B1R^{-/-} Mäusen oder in durch B1R Antagonisten behandelten Mäusen teils oder vollständig gehemmt wurde [134, 135]. Dies bedeutete, dass die Transmigration von B1R-Leukozyten primär nicht von dem Phänotyp des Empfängers und anderen Zelltypen abhängig ist. Es scheint, dass der Effekt der B1 Rezeptoren auf die Arteriogenese auf der Rekrutierung von B1R exprimierenden Leukozyten basiert.

Auch wenn ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen und dem B1R gezeigt wurde, müssen die genauen B1R exprimierenden leukozytären Subpopulationen noch genauer bestimmt werden. Aktuelle *in vivo* und *in vitro* Studien zeigten z.B., dass unter inflammatorischen Situationen die Aktivierung der B1R auf Neutrophilen auch die Adhäsion und Migration von Neutrophilen ins perivaskuläre Gewebe fördern konnte [86, 136]. Dennoch scheinen Monozyten/Makrophagen, insbesondere aufgrund ihrer wichtigen regulatorischen Funktion für die Arteriogenese, die relevante leukozytäre Subpopulation welche über die Expression der B1R die Arteriogenese steuern. Die Expression der B1R auf

Makrophagen wurde bereits nachgewiesen [137] und Hillmeister *et al* [101] zeigte mittels einem Monozyten-Migrations-Assay, dass der B1R Agonist chemotaktisch die Migration von Monozyten signifikant fördern. Die chemotaktische Wirkung von B1R Agonisten war hier vergleichbar mit der Wirkung von Positivkontrollen wie MCP-1. Schlüsselexperimente für die leukozyten-vermittelte Arteriogenese zeigten, dass zirkulierende Monozyten entscheidende zelluläre Faktoren für die adaptive Arteriogenese sezernieren, weil sie den Umbausprozess der Kollateralarterien beschleunigen können [43]. Die genetischen Defekte welche zu einer Defizienz bei der Produktion von Monozyten führen (op/op Mäuse) konnte zu einer kompletten Inhibierung des kollateralen Gefäßwachstums führen [40, 138].

Zusammenfassend kann hier also berichtet werden, dass die B1 Rezeptoren eine entscheidende Determinante der Arteriogenese in Mäusen darstellen, indem sie die Leukozyten- (vermutlich Monozyten-) Rekrutierung in den Perikollateralbereich regulieren.

4.6 Klinische Bedeutung der Rolle des B1R für Arteriogenese

Arteriogenese hat eine hohe klinische Relevanz für die Prävention von kardiovaskulären Ischämien (Herzinfarkt, Schlaganfall und peripherer arterieller Verschlusskrankheit). Diese Umbausprozesse von Kollateralarterien werden durch eine erhöhte Schubspannung [139] in Folge eines erhöhten Perfusionsdruckgradientes ausgelöst. Arteriogenese unterscheidet sich deutlich von Angiogenese, die durch eine lokale Ischämie initiiert wird und eine *de novo* Bildung von kleinen Kapillarenetzwerken resultiert [55]. Während sich bei der Angiogenese neue kleine Kapillare mit geringem Diameter bilden, wächst der Lumendiameter der präexistenten Kollateralarteriolen bei der Arteriogenese aktiv durch Zellproliferation. Die physiologische Bedeutung der Arteriogenese ist daher deutlich größer.

Diese Studie liefert hier zum ersten Mal den direkten Beweis, dass der B1R-Signalweg relevant für die Arteriogenese in Mäusen ist. Die gehemmte Expression der B1 Rezeptoren in B1R^{-/-} Mäusen führt zu einer deutlichen Verringerung der Arteriogenese in der Peripherie. Vergangene Studien zeigten eine starke schützende Wirkung des Kallikrien-Kinin-Systems im Herzen, Gehirn und in der Peripherie vor Gewebeischämien [140]. Das Kallikrien-Kinin System vermittelt seine biologische Funktion über den B1R und den B2R. Hierfür konnte eine relevante Bedeutung des B1 Rezeptors für die Arteriogenese abgeleitet werden. Darüber hinaus konnte hier der funktionelle Nachweis geliefert werden, dass für die Arteriogenese im Mäusehinterlauf nach FAO die B1R Signalwirkung über die aus dem Knochenmark stammenden B1R-exprimierenden Zellen vermitteln. So zeigten die Ergebnisse, dass ein strukturelles Auswachsen der Kollateralarterien durch das Zusammenspiel von hämodynamischen Kräften (Okklusion der Arterie) und der Aktivierung von inflammatorischen Prozessen moduliert wird. Maßgeblich für die Etablierung eines pro-arteriogenen inflammatorischen Milieus im perikollateralen Bereich scheint eine Rekrutierung von B1R positiven Leukozyten (vermutlich Monozyten/Makrophagen).

Ausblick

Arteriogenese hat hohe physiologische Relevanz und ein großes therapeutisches Potential. Würde man bei Patienten mit Verengung einer Beinarterie (peripherer arterieller Verschlusskrankheit) eine Induktion des natürlichen Bypasses bereits zu einem frühen Zeitpunkt vornehmen, könnte das Ausmaß der Gefäßverengung gegebenenfalls deutlich gemindert oder verhindert werden. In diesem Zusammenhang wurde auch Konzepte zur Prävention im myokardialen oder zerebralen Gewebe diskutiert [141]. Zum Beispiel könnten Patienten, welche erste Warnzeichen eines Schlaganfalls erlitten haben (sog. transitorische ischämische Attacke, TIA), von einer

therapeutischen Arteriogenese-Induktion profitieren, insbesondere um die langsame progrediente Okklusion eines gehirnversorgenden Gefäßes zu kompensieren. Studien zeigten tatsächlich, dass sich die Kollateralisierung eines Patienten antiproportional zum Ausmaß eines Schlaganfalls verhält. Auf Basis einer therapeutischen Arteriogenese bietet diese Studie also ein neues potenzielles Therapiekonzept zur Prävention von vaskulären Ischämien – Zum Beispiel durch die Anwendung von B1R Agonisten zur Stimulation der Arteriogenese.

5. Zusammenfassung

Arteriogenese bezeichnet das Wachstum von präexistenten kollateralen Arteriolen und den Kompensationsmechanismus nach Okklusion einer großen Hauptarterie. Bei diesem fein orchestrierten Prozess werden unterschiedliche molekulare Faktoren und periphere Blutzellen (Leukozyten) mit einbezogen. Diese Studie konzentriert sich auf die Analyse der Rolle des Bradykinin Rezeptor 1 in der Arteriogenese und auf die Regulation der B1R vermittelten Arteriogenese durch Leukozyten.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein Arteriogenese-Femoralisligatur Modell im Hinterlauf von C57BL/6 Mäusen etabliert. Die Wiederherstellung des Pedalblutflusses nach Ligatur in Mäusen wurde mittels der Laser Doppler Imaging Technik unmittelbar vor und nach der Femoralarterienligatur rechts sowie an den postoperativen Tagen 1, 3, 7 in WT und B1R^{-/-} Mäusen gemessen. Die funktionelle Erholung des Hinterlaufs wurde durch Beobachtung der aktiven Fußbewegungen und der trophischen Veränderung während der ganzen Studienperiode bewertet. Am postoperativen Tag 7 wurden Adduktoren von ligierten und nicht-ligierten Hinterläufen für die histologische Analyse des Gefäßumbaus entnommen. Zur Erklärung der funktionellen Rolle der B1R und der Bedeutung von zirkulierenden Leukozyten in der B1R vermittelten Arteriogenese wurde ein BM (bone marrow)-chimäres Mausmodell aus WT und B1R^{-/-} Mäusen in einem Crossover-Design generiert. Hier wurde der kollaterale Perfusionsindex in chimären Mäusen mittels Mikrosphären-Perfusion gemessen. Mittels Generierung der GFP-Reporter-Chimären wurde die Transmigration von Leukozyten in den perivaskulären Bereich von kollateralen Hinterlaufarterien untersucht.

Mittels Laser Doppler Imaging Technik zeigten die hämodynamischen Daten, dass ab Tag 1 nach FAL rechts die WT Mäuse eine signifikant bessere Perfusionserholung im ligierten Hinterlauf zeigten, als die B1R^{-/-} Mäuse. Die

maximale Perfusionsdifferenz zwischen den beiden Mäusen Gruppen wurde hierbei am postoperativen Tag 7 beobachtet ($229,74 \pm 27,82$ Perfusionsunits in WT Mäusen vs $63,90 \pm 10,35$ Perfusionsunits in $B1R^{-/-}$ Mäusen, $p < 0,001$).

Die Bewertung der aktiven Fußbewegungen und der trophischen Veränderung der Hinterläufe von $B1R^{-/-}$ und WT Mäusen zeigte, dass in den ersten zwei postoperativen Tagen die Fußbewegungen und der trophische Status der Hinterläufe von beiden Mäusen Gruppen gleich beeinträchtigt wurden, ab dem postoperativen Tag 3 erholten sich die WT Mäuse deutlich schneller als die $B1R^{-/-}$ Mäuse.

Die immunhistologische Analyse der Adduktorenmuskeln in ligierten und nicht-ligierten Hinterläufen zeigte, dass 7 Tage nach FAL rechts die Diameter der kollateralen Arterien in ligierten Hinterläufen in WT Mäusen - im Vergleich zu der Diameter in $B1R^{-/-}$ Mäusen - signifikant anwächst (Diameter der Kollateralarterien: $30,17 \pm 1,50 \mu\text{m}$ in WT Mäusen vs $23,30 \pm 1,01 \mu\text{m}$ in $B1R^{-/-}$ Mäusen, $p < 0,01$). Jedoch hatte sich die Dichte der kollateralen Arterien 7 Tage nach FAL rechts in den ligierten und nicht-ligierten Adduktorenmuskeln in beiden Mäusen Gruppen nicht verändert.

Zur Erklärung der funktionellen Rolle von zirkulierenden Blut-Leukozyten bei der $B1R$ vermittelten Arteriogenese wurde ein Knochenmark (bone marrow, BM)-chimäres Mausmodell aus WT und $B1R^{-/-}$ -Mäusen in einem Crossover-Design generiert. Nach Knochenmarktransplantation (von WT Mäusen in $B1R^{-/-}$ Mäusen) und 7 Tage nach FAL rechts, nahm die kollaterale Konduktanz im ligierten Hinterlauf bei WT/ $B1R^{-/-}$ -chimären Mäusen - im Vergleich zu der kollateralen Konduktanz bei $B1R^{-/-}$ / $B1R^{-/-}$ -chimären Mäusen - deutlich zu (kollaterale Konduktanz: 44,8% in WT/ $B1R^{-/-}$ -Chimären vs 24,5% in $B1R^{-/-}$ / $B1R^{-/-}$ -Chimären, $p < 0,05$), während die kollaterale Konduktanz in chimären Mäusen mit Knochenmark von $B1R^{-/-}$ -Mäusen sank (kollaterale

Konduktanz: 40,1% in WT/WT-Chimären vs 27,6% in B1R^{-/-}/WT Chimären, $p < 0,05$).

In GFP-Reporter-Chimären (Knochenmarktransplantation von GFP-positiv-WT-Mäusen in B1R^{-/-}- und WT-Mäuse) wurde gezeigt, dass 3 Tage nach FAL rechts die aus dem Knochenmark stammenden GFP-positiven Leukozyten (GFP-Leukozyten haben hier einen WT-Phänotyp und sind somit B1R-positiv) im perivaskulären Bereich der wachsenden Kollateralarterien akkumulierten. Die Anzahl der akkumulierten GFP-positiven Leukozyten in beiden Chimären Gruppen (GFP/WT-Chimären *versus* GFP/B1R^{-/-}-Chimären) war hierbei nicht signifikant unterschiedlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die B1R Signal-Wirkung, über die Rekrutierung von B1R positive Leukozyten, eine entscheidende Rolle für das Kollateralwachstums einnimmt. Arteriogenese könnte für die Zukunft eine attraktive und alternative Behandlungsmethode für Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit darstellen. Auf dieser Basis bietet diese Studie neue Ansätze für potenzielle Therapiestrategien bei peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten. Eine Aktivierung von B1R positiven Leukozyten zur therapeutischen Stimulation der peripheren Arteriogenese liefert somit einen sehr interessanten Ausblick für spätere Projekte.

6. Literaturverzeichnis

1. Criqui MH, F.A., Barrett-Connor E, Klauber MR, Goodman D, et al. , *The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population*. . Circulation, 1985. 71(3): p. 510-5.
2. Diehm C, S.A., Allenberg H, Darius H, Trampisch H, et al. , *High prevalence of peripheral arterial disease and comorbidity in 6,880 primary care patients: cross sectional study*. . Atherosclerosis, 2004. 172: p. 95-105.
3. Gibbons, R.J., et al., *ACC/AHA/ACP-ASIM guidelines for the management of patients with chronic stable angina: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients With Chronic Stable Angina)*. J Am Coll Cardiol, 1999. 33(7): p. 2092-197.
4. Smith, S.C., Jr., et al., *ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention)*. Circulation, 2006. 113(7): p. e166-286.
5. Eagle, K.A., et al., *ACC/AHA 2004 guideline update for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999 Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery)*. Circulation, 2004. 110(14): p. e340-437.
6. Seiler, C., *The human coronary collateral circulation*. Heart, 2003. 89(11): p. 1352-7.
7. Herzog, S., et al., *Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 283(5): p. H2012-20.
8. Buschmann, I. and W. Schaper, *Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth*. News Physiol Sci, 1999. 14: p. 121-125.
9. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. 6(4): p. 389-95.
10. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995. 11: p. 73-91.
11. Peichev, M., et al., *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors*. Blood, 2000. 95(3): p. 952-8.
12. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. Circ Res, 1999. 85(3): p. 221-8.
13. A. M. Jousen, B.K., C. Gottstein, *Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese*. Ophthalmologe., 2003. 100: p. 284-291.
14. Asahara, T. and A. Kawamoto, *Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. 287(3): p. C572-9.
15. A.Hertig, *Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the Macaque monkey*. Contrib Embryol, 1935. 25: p. 37-62.
16. Folkman, J., et al., *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. J Exp Med, 1971. 133(2): p. 275-88.
17. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. 386(6626): p. 671-4.
18. Roland H. Wenger, D.P.S., and Gieri Camenisch, *Integration of Oxygen Signaling at the Consensus HRE*. Sci. STKE, 2005(306): p. re12.

19. Kimura, H., et al., *Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide*. Blood, 2000. 95(1): p. 189-97.
20. Keck, P.J., et al., *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF*. Science, 1989. 246(4935): p. 1309-12.
21. Leung DW, C.G., Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N., *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. Science, 1989. 246(4935): p. 1306-9.
22. Nelson, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications*. J Clin Oncol, 2000. 18(5): p. 1135-49.
23. Bergers, G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. Nat Cell Biol, 2000. 2(10): p. 737-44.
24. Lindahl, P., et al., *Role of platelet-derived growth factors in angiogenesis and alveogenesis*. Curr Top Pathol, 1999. 93: p. 27-33.
25. Cooke, J.P. and D.W. Losordo, *Nitric oxide and angiogenesis*. Circulation, 2002. 105(18): p. 2133-5.
26. Bayless, K.J., R. Salazar, and G.E. Davis, *RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins*. Am J Pathol, 2000. 156(5): p. 1673-83.
27. Schumacher, B., et al., *Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease*. Circulation, 1998. 97(7): p. 645-50.
28. Baumgartner, I., et al., *Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia*. Circulation, 1998. 97(12): p. 1114-23.
29. Isner, J.M., et al., *Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb*. Lancet, 1996. 348(9024): p. 370-4.
30. Symes, J.F., et al., *Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease*. Ann Thorac Surg, 1999. 68(3): p. 830-6; discussion 836-7.
31. Henry, T.D., et al., *The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis*. Circulation, 2003. 107(10): p. 1359-65.
32. Schaper, W., *On arteriogenesis--a reply*. Basic Res Cardiol, 2003. 98(3): p. 183-4.
33. Ito WD, A.M., Scholz D, Winkler B, Htun P and Schaper W *Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 1997. 273(3): p. 1255-1265.
34. R.Thoma, *Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems*. Stuttgart, Germany: F. Enke, 1893.
35. Fulton, W., *The coronary arteries*. Springfield, IL: Charles C.Thomas,, 1965.
36. Fulton, W.F., *The Time Factor in the Enlargement of Anastomoses in Coronary Artery Disease*. Scott Med J, 1964. 9: p. 18-23.
37. Schaper, W., M. De Brabander, and P. Lewi, *DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog*. Circ Res, 1971. 28(6): p. 671-9.
38. Schaper, W. and W.D. Ito, *Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth*. Circ Res, 1996. 79(5): p. 911-9.
39. Pipp, F., et al., *Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth*

- and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(9): p. 1664-8.
40. van Royen, N., et al., *Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits*. *Cardiovasc Res*, 2003. 57(1): p. 178-85.
 41. Hoefler, I.E., van Royen, N., Rectenwald, J. E., Deindl, E., Hua, J., Jost, M., Grundmann, S., Voskuil, M., Ozaki, C. K., Piek, J. J., and Buschmann, I. R., *Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1 mediated mechanisms*. *Circ Res*, 2004. 94: p. 1179-1185.
 42. Scholz, D., et al., *Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)*. *Virchows Arch*, 2000. 436(3): p. 257-70.
 43. Arras, M., et al., *Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb*. *J Clin Invest*, 1998. 101(1): p. 40-50.
 44. Buschmann, I., W. Ito, I. Höfer, G. Weiß, S. Kostin, J. Schaper, and W. Schaper, *GM-CSF promotes collateral artery growth via prolongation of macrophage survival*. *J Mol Cell Cardiol.*, 1998: p. 494 (abstr).
 45. Hoefler, I.E., et al., *Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis*. *Circulation*, 2002. 105(14): p. 1639-41.
 46. Schaper, J., et al., *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 Histol*, 1976. 370(3): p. 193-205.
 47. van Royen, N., et al., *Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation*. *Faseb J*, 2002. 16(3): p. 432-4.
 48. Cai W., V.R., Afsah-Hedjri A., Koltai S., Schaper J., *Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis*. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. 32: p. 997-1011.
 49. Ziegelhoeffer T, F.B., Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W., *Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature*. *Circ Res*, 2004. 94(2): p. 230-8.
 50. Sato, K., et al., *Efficacy of intracoronary versus intravenous FGF-2 in a pig model of chronic myocardial ischemia*. *Ann Thorac Surg*, 2000. 70(6): p. 2113-8.
 51. Pöling J, S.M., Schimanski S, Ingelmann ME, Rees W, Gajawada P, Kochfar Z, Lörchner H, Salwig I, Shin JY, Wiebe K, Kubin T, Warnecke H, Braun T., *Induction of smooth muscle cell migration during arteriogenesis is mediated by Rap2*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* , 2011. 31(10): p. 2297-305.
 52. Schaper, W., *Collateral circulation: past and present*. *Basic Res Cardiol*, 2009. 104(1): p. 5-21.
 53. Schirmer, S.H., et al., *Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application*. *Heart*, 2009. 95(3): p. 191-7.
 54. Cai, W.J., et al., *Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284(1): p. H31-40.
 55. Scholz, D., W.J. Cai, and W. Schaper, *Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease*. *Angiogenesis*, 2001. 4(4): p. 247-57.
 56. Schaper, W. and D. Scholz, *Factors regulating arteriogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(7): p. 1143-51.
 57. Bhoola, K.D., C.D. Figueroa, and K. Worthy, *Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases*. *Pharmacol Rev*, 1992. 44(1): p. 1-80.

58. Sharma JN, A.-B.A., *The Role of Inflammatory Mediator Bradykinin in Cardiovascular and Renal Diseases*. 2012. 1(2): p. 1: 142. doi:10.4172/scientificreports.142.
59. Miles, A., *The Kinin System: a history and review of the kinin system*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences., 1969. 173(1032): p. 341-349.
60. Yousef, G.M. and E.P. Diamandis, *The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease*. *Endocr Rev*, 2001. 22(2): p. 184-204.
61. Hillmeister, P., et al., *Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008. 28(11): p. 1811-23.
62. Cochrane, C.G. and S.D. Revak, *Dissemination of contact activation in plasma by plasma kallikrein*. *J Exp Med*, 1980. 152(3): p. 608-19.
63. Wennemuth G, B.S., Schill WB, Aumüller G, Monsees TK., *Bradykinin increases intracellular calcium levels in rat testis peritubular cells via the B2 receptor subtype*. *Br J Pharmacol.* , 2003. 138(2): p. 351-8.
64. Proud, D., et al., *Immunoglobulin E-mediated release of a kininogenase from purified human lung mast cells*. *Am Rev Respir Dis*, 1985. 132(2): p. 405-8.
65. Campbell DJ, K.H., Esler MD., *Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans*. *Circulation*, 2005. 111(3): p. 315-20.
66. Sharma, J.N., *An Overview on Relation between the Bradykinin System and Hypertension and Diabetes*. *Am. J. Biomed. Sci.* , 2009. 1(3): p. 242-249.
67. Tschöpe C, S.H., Walther T., *Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade*. *J Cardiovasc Pharmacol.* , 2002. 39(4): p. 478-87.
68. Marceau F, H.J., Bachvarov DR. , *The B1 receptors for kinins*. *Pharmacol Rev.* , 1998. . 50(3): p. 357-86.
69. Regoli, D., J. Barabe, and W.K. Park, *Receptors for bradykinin in rabbit aortae*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1977. 55(4): p. 855-67.
70. Regoli, D. and J. Barabe, *Pharmacology of bradykinin and related kinins*. *Pharmacol Rev*, 1980. 32(1): p. 1-46.
71. Coelho, M.M., et al., *Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats*. *Br J Pharmacol*, 1997. 121(2): p. 296-302.
72. Faussner A., B.J.M., Proud D., *Comparison of the response of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation*. *Immunopharmacology*, 1999. 45: p. 13-20.
73. Goodfellow V. S., M.M.V., Kuhlmann K. G., Fitzpatrick T. D., Whalley E. T., et al., *Bradykinin Receptor Antagonists Containing N-Substituted Amino Acids: In Vitro and in Vivo B2 and B1 Antagonist Activity*. *J. Med. Chem.*, 1996. 39: p. 1472-1484.
74. Couture, R., et al., *Kinin receptors in pain and inflammation*. *Eur J Pharmacol*, 2001. 429(1-3): p. 161-76.
75. Austin, C.E., et al., *Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways*. *J Biol Chem*, 1997. 272(17): p. 11420-5.
76. Dray, A. and M. Perkins, *Bradykinin and inflammatory pain*. *Trends Neurosci*, 1993. 16(3): p. 99-104.
77. Wall, T.M., R. Sheehy, and J.C. Hartman, *Role of bradykinin in myocardial preconditioning*. *J*

Pharmacol Exp Ther, 1994. 270(2): p. 681-9.

78. Vegh A, R.J., Parratt JR. , *Attenuation of the antiarrhythmic effects of ischaemia preconditioning by blocked of bradykinin B2 receptors.* . Br J Pharmacol 1994. 107: p. 1167- 72.

79. McLean, P.G., M. Perretti, and A. Ahluwalia, *Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function.* Cardiovasc Res, 2000. 48(2): p. 194-210.

80. Su, J.B., et al., *Stimulation of bradykinin B(1) receptors induces vasodilation in conductance and resistance coronary vessels in conscious dogs: comparison with B(2) receptor stimulation.* Circulation, 2000. 101(15): p. 1848-53.

81. Lamontagne, D., et al., *Mechanisms of kinin B1-receptor-induced hypotension in the anesthetized dog.* J Cardiovasc Pharmacol, 1996. 28(5): p. 645-50.

82. Schanstra, J.P., et al., *The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts.* J Clin Invest, 1998. 101(10): p. 2080-91.

83. Bockmann, S. and I. Paegelow, *Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes.* J Leukoc Biol, 2000. 68(5): p. 587-92.

84. Borkowski, J.A., et al., *Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons.* J Biol Chem, 1995. 270(23): p. 13706-10.

85. Madeddu, P., et al., *Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene.* Circulation, 1997. 96(10): p. 3570-8.

86. Pesquero, J.B., et al., *Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(14): p. 8140-5.

87. Bouchard, J.F., J. Chouinard, and D. Lamontagne, *Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning.* Br J Pharmacol, 1998. 123(3): p. 413-20.

88. Tschope, C., et al., *Upregulation of bradykinin B1-receptor expression after myocardial infarction.* Br J Pharmacol, 2000. 129(8): p. 1537-8.

89. Mazonot, C., et al., *Endothelial kinin B(1)-receptors are induced by myocardial ischaemia-reperfusion in the rabbit.* J Physiol, 2001. 530(Pt 1): p. 69-78.

90. Lagneux, C., A. Adam, and D. Lamontagne, *A study of the mediators involved in the protection induced by exogenous kinins in the isolated rat heart.* Int Immunopharmacol, 2003. 3(10-11): p. 1511-8.

91. Regoli, D., *Neurohumoral regulation of precapillary vessels: the kallikrein-kinin system.* J Cardiovasc Pharmacol, 1984. 6 Suppl 2: p. S401-12.

92. Emanuelli, C., et al., *Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia.* Circulation, 2001. 103(1): p. 125-32.

93. Parenti, A., et al., *The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway.* Faseb J, 2001. 15(8): p. 1487-9.

94. Emanuelli, C., et al., *Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization.* Circulation, 2002. 105(3): p. 360-6.

95. Buschmann, I., et al., *Pulsatile shear and Gja5 modulate arterial identity and remodeling events during flow-driven arteriogenesis.* Development, 2010. 137(13): p. 2187-96.

96. Chalothorn, D., et al., *Catecholamines augment collateral vessel growth and angiogenesis in hindlimb ischemia.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. 289(2): p. H947-59.

97. Clayton, J.A., D. Chalothorn, and J.E. Faber, *Vascular endothelial growth factor-A specifies*

formation of native collaterals and regulates collateral growth in ischemia. Circ Res, 2008. 103(9): p. 1027-36.

98. Chalothorn, D., et al., *Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains.* Physiol Genomics, 2007. 30(2): p. 179-91.

99. Schulze-Topphoff, U., et al., *Activation of kinin receptor B1 limits encephalitogenic T lymphocyte recruitment to the central nervous system.* Nat Med, 2009. 15(7): p. 788-93.

100. Schaper W, S.J., *Theory of Arteriogenesis.* Arteriogenesis, Kluwer Academic Publisher, Boston, 2004: p. 253-255.

101. Hillmeister, P., et al., *Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling.* Circ Res, 2011. 109(5): p. 524-33.

102. Couffignal, T., et al., *Mouse model of angiogenesis.* Am J Pathol, 1998. 152(6): p. 1667-79.

103. Aitsebaomo J, S.S., Zhang H, Jha S, Wang Z, Winnik S, Veleva AN, Pi X, Lockyer P, Faber JE, Patterson C., *Recombinant human interleukin-11 treatment enhances collateral vessel growth after femoral artery ligation.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. , 2011. 31(2): p. 306-12.

104. Hoefer, I.E., et al., *Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit.* Cardiovasc Res, 2001. 49(3): p. 609-17.

105. He, Y., et al., *Critical function of Bmx/Etk in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis.* J Clin Invest, 2006. 116(9): p. 2344-55.

106. Scholz, D., et al., *Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice.* J Mol Cell Cardiol, 2002. 34(7): p. 775-87.

107. Deindl, E., et al., *Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit.* Circ Res, 2001. 89(9): p. 779-86.

108. Walgenbach, K.J., Gratas, C., Shestak, K. C. and Becker, D., *Ischaemia induced expression of bFGF in normal skeletal muscle: a potential paracrine mechanism for mediating angiogenesis in ischaemic skeletal muscle.* Nat Med, , 1995: p. 453-9.

109. Chalothorn, D. and J.E. Faber, *Strain-dependent variation in collateral circulatory function in mouse hindlimb.* Physiol Genomics, 2010. 42(3): p. 469-79.

110. M.L. Iabichella, E.M., and G. Mosti,, *A review of microvascular measurements in wound healing.* The International Journal of Lower Extremity Wounds, 2006. 5(3): p. 181-99.

111. L. Devgan, S.B., S. Aylward, and R.J. Spence,, *Modalities for the assessment of burn wound depth.* Journal of Burns and Wounds, 2006. 5(e2).

112. M. Stücker, M.E., M. Hoffmann, K. Hoffmann, P. Altmeyer,, *High-resolution laser Doppler perfusion imaging aids in differentiating between benign and malignant melanocytic skin tumours.* Acta Dermato-Venereologica, 2002. 82(1): p. 25-29.

113. D.I. Booi, I.B.D., W.D. Boeckx, R.R. Van Der Hulst, *A study of perfusion of the distal free-TRAM flap using laser Doppler flowmetry.* Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2008. 61(3): p. 282-8.

114. Boyle NH, R.P., Ng B, Berkenstadt H, McLuckie A, Beale RJ, Mason RC., *Scanning laser Doppler is a useful technique to assess foot cutaneous perfusion during femoral artery cannulation.* Journal of Critical Care,, 1999. 3(4): p. 95-100.

115. Cochrane T, S.S., Boulton AJ, Ward JD, Atkins RM., *Laser Doppler flowmetry: in the assessment of peripheral vascular disorders? A preliminary evaluation.* Clin Phys Physiol Meas., 1986. 7(1): p. 31-42.

116. Stabile, E., et al., *Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in*

CD4-knockout mice. Circulation, 2003. 108(2): p. 205-10.

117. Helisch, A. and W. Schaper, *Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries*. Microcirculation, 2003. 10(1): p. 83-97.

118. Price, R.J., et al., *Hemodynamic stresses and structural remodeling of anastomosing arteriolar networks: design principles of collateral arterioles*. Microcirculation, 2002. 9(2): p. 111-24.

119. Longland, C., *The collateral circulation of the limb*. Ann R Coll Surg Engl, 1953. 13: p. 161-176.

120. Distasi MR, C.J., Ziegler MA, Dinauer MC, Yoder MC, et al., *Suppressed hindlimb perfusion in Rac2-/- and Nox2-/- mice does not result from impaired collateral growth*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. 296(3): p. 877-86.

121. Tibor Ziegelhoeffer, B.F., Sawa Kostin, Matthias Heil, Wolfgang Schaper, *Bone Marrow-Derived Cells Do Not Incorporate Into the Adult Growing Vasculature*. Circ Res. , 2004. 94: p. 230-238.

122. Okabe M, I.M., Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. , *"Green mice" as a source of ubiquitous green cells*. FEBS Lett, 1997. 407: p. 313-319.

123. Hershey J.C., B.E.P., Glass J.D., Hartman H.A., Cook J.J, et al., *Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis*. . Cardiovasc Res, 2001. 49: p. 618-25.

124. Unger, E.F., *Experimental evaluation of coronary collateral development*. Cardiovasc Res, 2001. 49(3): p. 497-506.

125. Araujo, R.C., Kettritz, R., Fichtner, I., Pesquero, J.B., Bader, M. et al., *Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice*. Biol. Chem., 2001. 382: p. 91-95.

126. Ehrenfeld, P., et al., , *Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils*. . J Leukoc Biol, 2006. 80(1): p. 117-24.

127. Buschmann, I., et al., *Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis*. Microcirculation, 2003. 10(3-4): p. 371-9.

128. Heil M, Z.T., Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, and Schaper W. , *Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 283: p. 2411-2419.

129. Pipp F, H.M., Issbrucker K, Schaper W, Clauss M. et al., *VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism*. Circ Res. , 2003. 92: p. 378-385.

130. de Groot, D., et al., *Arteriogenesis requires toll-like receptor 2 and 4 expression in bone-marrow derived cells*. J Mol Cell Cardiol, 2010. 50(1): p. 25-32.

131. Rehman, J., et al., *Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors*. Circulation, 2003. 107(8): p. 1164-9.

132. Kinnaird T, S.E., Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, and Epstein SE. , *Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms*. . Circ Res, 2004. 94: p. 678-685.

133. Kinnaird T, S.E., Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, and Epstein SE., *Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms*. . Circulation, 2004. 109: p. 1543-1549.

134. Duchene, J., et al., *A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5*. J Immunol, 2007. 179(7): p. 4849-56.

135. McLean PG, A.A., Perretti M., *Association between kinin b(1) receptor expression and*

leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. J Exp Med., 2000. 192: p. 367-380.

136. Souza DG, L.E., Pinho V, Pesquero JB, Bader M, Pesquero JL, Teixeira MM., *Role of bradykinin b2 and b1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury*. J Immunol., 2004. 172: p. 2542-2548.

137. Bertram, C.M., et al., *Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca²⁺ and cell migration*. J Leukoc Biol, 2007. 81(6): p. 1445-54.

138. Bergmann CE, H.I., Meder B, Roth H, van Royen N, Breit SM, Jost MM, Aharinejad S, Hartmann S, Buschmann IR., *Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice*. J Leukoc Biol., 2006. 80: p. 59-65.

139. Ando, J., H. Nomura, and A. Kamiya, *The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells*. Microvasc Res, 1987. 33(1): p. 62-70.

140. Chao, J. and L. Chao, *Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease*. Exp Physiol, 2005. 90(3): p. 291-8.

141. Love, R., *GM-CSF induced arteriogenesis: a potential treatment for stroke?* . Lancet Neurol, 2003. 2(8): p. 458.

7. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA-Aktin	Glattes Muskelzellaktin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
BK	Bradykinin
B1R	Bradykinin Rezeptor 1
B1R ^{-/-}	Bradykinin Rezeptor 1 <i>Knockout</i>
B2R	Bradykinin Rezeptor 2
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BSA	Bovine Serum Albumin
CPI	Kollateraler Perfusionsindex
DABK	Endogene Agonisten des-Arg ⁹ BK
EC	Endothelzellen
EPC	Endotheliale Progenitorzell
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FAL	Femoralarterienligatur
FAO	Okklusion der Arteria femoralis
FITC	Fluoreszenz-5-Isothiocyanat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
HIFs	Hypoxie-induzierbare Faktoren
HMWK	Hochmolekulares Kininogen
HRE	Hypoxie-responsives Element
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IMG	Intussuszeptives mikrovaskuäres Wachstum
KHK	Koronare Herzkrankheit
KKS	Kallikrein-Kinin-System

LCFA	Lateral Caudal Femoral Artery
LDI	Laser Doppler Imaging
LDF	Laser Doppler basierte Flussmessung
LFA-1	Lymphozyten-Funktions-assoziierten Antigen 1
LMWK	Niedermolekulares Kininogen
MAP-Kinase	Mitogen-aktiviertes Protein Kinase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF	Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
NF- κ B	Nuklearer Faktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Thrombozyten-aktivierende Faktor
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCI	Perkutane Koronarintervention
PDGF	Blutplättchen-Wachstumsfaktor
PFA	Paraformaldehyd
PIGF	Plazenta Wachstumsfaktor
PK	Plasmakallikrein
PKC	Proteinkinase C
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TIMPs	Gewebeinhibitor der Matrix-Metalloproteinasen
TK	Gewebskallikrein
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM	Vaskulär-zelluläres Adhäsionsmolekül
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPF	vascular permeability factor

VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzellen
WT	Wildtyp

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Meijing Li, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Untersuchung des Mechanismus der Bradykinin Rezeptor1 induzierten peripheren Arteriogenese im ischämischen Hinterlauf-Ligaturmodell der Maus], 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.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Meijing Li hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Hillmeister P, Gatzke N, Dulsner A, Bader M, Schadock I, Hofer I, Hamann I, Infante-Duarte C, Jung G, Troidl K, Urban D, Stawowy P, Frentsch M, **Li M**, Nagorka S, Wang H, Shi Y, le Noble F, Buschmann I. Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circ Res.* 2011; 109:524-33.

Beitrag im Einzelnen: die Doktorandin trug in mehrfachen Bereichen zu dieser Publikation bei, einschließlich der Durchführung von histologischen Experimenten und Perfusionstests, deren Analyse und Diskussion der Ergebnisse.

[Gesamtbeitrag des Doktoranden: 25%]

Publikation 2: Duelsner A, Gatzke N, Glaser J, Hillmeister P, **Li M**, Lee EJ, Lehmann K, Urban D, Meyborg H, Stawowy P, Busjahn A, Nagorka S, Persson AB, Buschmann IR. Acetylsalicylic acid, but not clopidogrel, inhibits therapeutically induced cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Jan; 32(1):105-14.

Beitrag im Einzelnen: die Doktorandin führte die histologischen Experimente für diese Studie durch.

[Gesamtbeitrag des Doktoranden: 15%]

Publikation 3: Duelsner, A and Gatzke, N, Glaser, J, Hillmeister, P, **Li, M**, Lee, EJ, Lehmann, K, Urban, D, Meyborg, H, Stawowy, P, Busjahn, A, Nagorka, S, Bondke Persson, A, Buschmann, IR. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Improves Cerebrovascular Reserve Capacity by Collateral Growth in the Circle of Willis. *Cerebrovasc Dis.* 2012; 33(5):419-29.

Beitrag im Einzelnen: die Doktorandin führte die histologischen Experimente für diese Studie durch.

[Gesamtbeitrag des Doktoranden: 15%]

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

9. Lebenslauf

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

10. Publikationsliste

1. Hillmeister P, Gatzke N, Duelsner A, Bader M, Schadock I, Hoefler I, Hamann I, Infante-Duarte C, Jung G, Troidl K, Urban D, Stawowy P, Frentsch M, **Li M**, Nagorka S, Wang H, Shi Y, le Noble F, Buschmann I. Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circ Res.* 2011; 109:524-33.
2. Duelsner A, Gatzke N, Glaser J, Hillmeister P, **Li M**, Lee EJ, Lehmann K, Urban D, Meyborg H, Stawowy P, Busjahn A, Nagorka S, Persson AB, Buschmann IR. Acetylsalicylic acid, but not clopidogrel, inhibits therapeutically induced cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Jan; 32(1):105-14.
3. Duelsner, A and Gatzke, N, Glaser, J, Hillmeister, P, **Li, M**, Lee, EJ, Lehmann, K, Urban, D, Meyborg, H, Stawowy, P, Busjahn, A, Nagorka, S, Bondke Persson, A, Buschmann, IR. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Improves Cerebrovascular Reserve Capacity by Collateral Growth in the Circle of Willis. *Cerebrovasc Dis.* 2012; 33(5):419-29.

11. Danksagung

Ich danke herzlich meinem Doktorvater PD Dr. med. Ivo Buschmann für die Ermöglichung und Betreuung meiner Doktorarbeit und für seine Unterstützung.

Meinem Betreuer Dr. rer. nat. Philipp Hillmeister danke ich für seine Unterstützung, seine kritischen Korrekturen, seine Bereitschaft zu Diskussionen und für die Einführung in die Welt der Histologie. Besonders danken möchte ich ihm auch für seine Hilfsbereitschaft bei der Erstellung der Bilder und Diagramme. Seine Geduld und die angenehme Arbeitsatmosphäre haben die Durchführung meiner Doktorarbeit sehr erleichtert.

Dr. André Dülsner gebührt besonderer Dank, da er mir geduldig die Operationstechniken gezeigt und beigebracht hat.

Außerdem möchte ich Dr. med. Eva Buschmann danken, die mich in den vergangenen Jahren mit bereichernden Tipps und Diskussionsbeiträgen wiederholt in neue thematische Bahnen gelenkt hat.

Ebenso geht mein Dank an allen Mitarbeitern des Institutes, besonders Dr. Nora Gatzke, Dr. rer. nat. Dong Liu und Dr. med. Haitao Wang, da sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern und meinem Mann Biao Zhang, die zu jeder Zeit an mich geglaubt haben und die mich während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit mit unendlicher Geduld und mit liebevoller Fürsorge auf dem richtigen Weg gehalten haben. Ihnen gilt mein besonderer Dank.