

Aus dem
Charité Centrum 11 für Herz-, Kreislauf- und Gefäßmedizin
Medizinische Klinik für Kardiologie und Pulmologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Herr Prof. Dr. med. H.-P. Schultheiß

HABILITATIONSSCHRIFT

**Einsatz angiogenetischer Wachstumsfaktoren in der Behandlung
kardiovaskulärer Erkrankungen**

zur Erlangung der Venia legendi

für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Bernhard Witzenbichler

geboren am 29.10.1963 in München

Eingereicht im März 2007

Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Drexler/Hannover

2. PD Dr. J. Bauersachs/Würzburg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Problemstellung – Konzept der ‚Therapeutischen Angiogenese‘	4
1.2. Definitionen	5
1.3. Zielsetzung	9
2. Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C/VEGF-2) – Bioaktivität im Vergleich zu VEGF-A/VEGF-1 und Induktion postnataler Angiogenese in ischämischem Gewebe	11
2.1. Einleitung	11
2.2. Material und Methoden	12
2.3. Ergebnisse	20
<i>Einfluß von rhVEGF-C auf die endotheliale Zellproliferation</i>	20
<i>Einfluß von rhVEGF-C auf die endotheliale Zellmigration</i>	21
<i>NO-Freisetzung aus kultivierten HUVECs durch VEGF-C</i>	21
<i>Einfluß von VEGF-C auf die Gefäßpermeabilität</i>	23
<i>VEGF-C Rezeptorexpression</i>	24
<i>Einfluß von pcVEGF-C und rhVEGF-C auf Blutdruck und Dopplerfluß</i>	24
<i>Einfluß von pcVEGF-C und rhVEGF-C auf die anatomisch nachweisbare Kollateralentwicklung</i>	25
2.4. Diskussion	28
2.5. Zusammenfassung	32
3. Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1; aFGF) – Intramuskulärer Gentransfer stimuliert die Kollateralgefäßbildung (Arteriogenese) bei chronischer Ischämie	33
3.1. Einleitung	33
3.2. Material und Methoden	34
<i>FGF-1 Nomenklatur und Plasmide</i>	34
3.3. Ergebnisse	39
<i>In vitro-Testung der FGF-1 Expressionsvektoren</i>	39
<i>Transfektionseffizienz in der ischämischen Extremität nach intramuskulärem Gentransfer</i>	40
<i>Proteinexpression nach intramuskulärem Gentransfer</i>	42
<i>Einfluß von pCOR FGF-1 auf Blutdruck-Index und Blutfluß</i>	42
<i>Einfluß von pCOR FGF-1 auf die anatomisch nachweisbare Kollateralentwicklung</i>	44
3.4. Diskussion	46
3.5. Zusammenfassung	49
4. Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor (SF/HGF) - Parakrin amplifizierte Angiogenese durch Induktion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	51
4.1. Einleitung	51
4.2. Material und Methoden	52
4.3. Ergebnisse	57
<i>SF/HGF induziert die Expression von VEGF mRNA und Protein in kultivierten HVSMCs</i>	57
<i>In vitro-Effekte von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf die Endothelzell-Migration und –Proliferation</i>	59
<i>Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf die Kollateralgefäßentwicklung in ischämischer Extremität</i>	61
<i>Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf den Blutdruck-Index</i>	63
<i>Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf den iliakal-arteriellen Blutfluß</i>	63
<i>Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf die Muskeldurchblutung</i>	64
<i>Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf die Muskelatrophie</i>	65
<i>Systemische Wirkungen von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅</i>	65
4.4. Diskussion	66
4.5. Zusammenfassung	68

5. Chemotaktische Eigenschaften von Angiopoietin-1 und -2, Liganden für die endothelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase Tie2	70
5.1. Einleitung	70
5.2. Material und Methoden	72
5.3. Ergebnisse	76
<i>Einfluss von Angiopoietin-1 und -2 auf die Endothelzell-Proliferation und DNA-Synthese</i>	76
<i>Einfluss von Angiopoietin-1 und -2 auf die Migration von Endothelzellen</i>	77
<i>Einfluss von Angiopoietin-2 auf den chemotaktischen Effekt von Angiopoietin-1</i>	80
<i>Chemotaktische Antwort von stabil mit Tie2-Rezeptor transfizierten Fibroblasten auf Angiopoietin-1 und -2</i>	81
<i>RT-PCR Analyse der Angiopoietin-1, -2 und Tie2-Rezeptor mRNA Expression in humanen Gefäßabschnitten und in kultivierten Zellen</i>	83
<i>Northern Blot-Analyse der Angiopoietin-1, -2 und Tie2-Rezeptor mRNA-Expression in Endothelzellen</i>	84
<i>Western Blot-Analyse von Angiopoietin-1 und -2 Protein in mittels HUVECs konditioniertem Medium</i>	84
5.4. Diskussion	85
5.5. Zusammenfassung	89
6. Die Rolle des Angiopoietin/Tie2-Systems für die Gefäßreifung: Einfluß von Angiopoietin-1/2 auf das Integrinexpressionmuster von Endothelzellen	90
6.1. Einleitung	90
6.2. Material und Methoden	91
6.3. Ergebnisse	95
<i>Expression von Angiopoietin-1 und -2 mRNA in Humanen Geweben</i>	95
<i>Einfluß der Angiopoietine auf die endotheliale Integrin-Zelloberflächen-Expression</i>	96
<i>Einfluß der Angiopoietine auf die Integrin α_v, β_3 und β_5 Monomer-Expression</i>	99
<i>Angiopoietin-1 hemmt die Aktivität des β_3 und β_5 Integrin-Promoters</i>	101
<i>Kontinuierliche Expression von Angiopoietin-1 in Kokultur von Endothel- und glatten Gefäßmuskulzellen reduziert die endotheliale $\alpha_v\beta_3$-Zelloberflächenexpression</i>	103
<i>Angiopoietin-1-induzierte Reduktion der endothelialen $\alpha_v\beta_3$- und $\alpha_v\beta_5$-Expression verringert Zellmotilität</i>	103
6.4. Diskussion	106
7. Protektive Rolle von Angiopoietin-1 beim Endotoxin-induzierten septischen Schock	108
7.1. Einleitung	108
7.2. Material und Methoden	109
7.3. Ergebnisse	112
<i>Angiopoietin-1 Protein Expression nach adenoviralem Gentransfer</i>	112
<i>Angiopoietin-1 verbessert die durch LPS-Injektion induzierten hämodynamischen Veränderungen</i>	113
<i>Angiopoietin-1 schwächt LPS-induzierte Lungenschäden deutlich ab</i>	115
<i>Angiopoietin-1 verbessert die Überlebenschancen beim LPS-induzierten septischen Schock</i>	117
7.4. Diskussion	118
7.5. Zusammenfassung	120
8. Diskussion	122
8.1. Klinische Studien zur therapeutische Angio- und Arteriogenese – Übersicht	122
8.2. Klinische Studien mit Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C/VEGF-2)	128
8.3. Klinische Studien mit Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1/aFGF)	131
8.4. Potentielle klinische Anwendung von Angiopoietin-1	135
9. Zusammenfassung und Perspektive	136
10. Literaturverzeichnis	138
11. Danksagung	158
12. Eidesstattliche Erklärung	159

1. Einleitung

1.1. Problemstellung – Konzept der ‚Therapeutischen Angiogenese‘

Trotz wesentlicher Fortschritte in der interventionellen und chirurgischen Therapie von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und peripher-arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) gibt es eine große Zahl von Patienten, welche aufgrund von multiplen Gefäßverschlüssen nicht mehr konventionell, d.h. mittels Katheter- oder Bypassverfahren, revaskularisierbar sind. Ein Teil dieser Patienten weist ein ausgeprägtes Netz von feinen Kollateralgefäßen auf, welche im Falle der KHK das Myokard in Ruhe gerade noch ausreichend mit Sauerstoff versorgen (**Abb. 1.1**). Bei bereits geringer Belastung mit einem in der Folge erhöhten Sauerstoffbedarf des Herzens reicht diese Minimaldurchblutung jedoch nicht mehr aus, und die Patienten verspüren einerseits als Ausdruck der Durchblutungsstörung Angina pectoris-Beschwerden und andererseits aufgrund der funktionellen Beeinträchtigung der linksventrikulären Funktion Luftnot. Ähnlich ist die Situation bei der pAVK, bei welcher das Symptompektrum von der Claudicatio intermittens mit belastungsabhängigem, reversiblen Schmerz im Bein (Stadium II nach Fontaine) über Ruheschmerz (Stadium III) bis zum Absterben von Teilen des Fusses (Stadium IV) mit konsekutiv notwendigen Amputationen reicht. Das Vorhandensein von Kollateralgefäßen, welche eine für das Überleben des ischämischen Gewebes erforderliche Minimaldurchblutung gewährleisten, ist dabei von Patient zu Patient in unterschiedlichem Maße ausgeprägt. Ein ungenügendes Wachstum von Kollateralgefäßen stellt somit ein wesentliches klinisches Problem bei atherosklerotisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen mit chronischer Ischämie dar.



Abb. 1.1. Koronarangiogramm eines 41-jährigen Patienten mit schwerer koronarer 3-Gefäß-Krankheit. Links: Rechte Koronararterie, welche im mittleren Drittel verschlossen ist. Über feine Kollateralen stellt sich die Peripherie der rechten Koronararterie dar. Rechts: Linke Koronararterie. Verschluss der Vorderwandarterie (RIVA) unmittelbar nach Abgang aus dem Hauptstamm. Verschluss der Seitenwandarterie (Ramus circumflexus) noch im proximalen Abschnitt. Über ein feines Kollateralnetz stellen sich periphere Anteile der verschlossenen Koronararterien dar und ermöglichen ein Überleben des Patienten.

Ein möglicher therapeutischer Ansatz ist die Förderung der Kollateralformation zur Perfusionsverbesserung chronisch ischämischer Gewebeareale durch Anwendung angiogenetisch wirksamer Wachstumsfaktoren, welche in den letzten Jahren identifiziert wurden.¹⁻³ Darüber hinaus erfüllen einige dieser Faktoren neben der Angiogenese weitere biologisch wichtige Funktionen.⁴⁻⁶ Mit der Wirkungsweise angiogenetischer Faktoren, den daran beteiligten molekularen Mechanismen und deren möglichen therapeutischen Anwendung (*Therapeutische Angiogenese*) beschäftigt sich die vorliegende Arbeit.

1.2. Definitionen

Eine vermehrte Kollateralbildung setzt eine Neubildung von Kapillaren und ein Größenwachstum vorhandener feiner Kollateralen ebenso wie zuführender Arteriolen und Arterien voraus. Verschiedene Mechanismen sind in diesem Prozess involviert, sodass zunächst eine genaue Begriffsbestimmung erforderlich ist (**Abb. 1.2**).

Vaskulogenese bezeichnet die rein embryonale Anlage und Bildung primitiver Blutgefäße, welche ursprünglich von mesodermalen Zellen abstammen und sich zunächst unter dem Einfluß u.a. von Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) (=bFGF) zu VEGF-R2-(=Flk-1, KDR-Rezeptor)-positiven Angioblasten differenzieren. Diese Angioblasten lagern sich dann unter Einfluß von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zu Tuben-ähnlichen Gebilden mit feinen Lumina zusammen und bilden somit die Grundstrukturen embryonaler Blutgefäße. Wesentlich für die Ausbildung kapillarähnlicher Strukturen ist zusätzlich eine Aktivierung spezieller Oberflächenproteine, den Integrinen. Insbesondere den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ wird hierbei eine wichtige Rolle zugeschrieben.⁷⁻⁹

Angiogenese bedeutet das Aussprossen von neuen Kapillen aus präexistenten Kapillaren.¹⁰⁻¹² Unter dem Einfluß von VEGF kommt es hierbei zu einer Proliferation und Migration von Endothelzellen, welches zum Aussprossen einer neuen Kapillarverzweigung führt. Die Angiogenese ist der Vaskulogenese nachgeschaltet und sie ereignet sich nicht nur im embryonalen Organismus, sondern auch postnatal, z.B. bei der Wundheilung, bei der endometrialen Proliferation, bei Entzündungsreaktionen, in ischämischen Gewebsarealen, aber auch beim Tumorwachstum. Hierzu erforderlich ist eine Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen durch VEGF, welche dem Gefäß anliegendes Bindegewebe aufweichen und so ein Austreten und Migrieren von Endothelzellen ermöglichen (**Abb. 1.3**). Auch hierbei ist eine Aktivierung des Endothels durch vermehrte Expression von Integrin $\alpha_v\beta_3$ erforderlich. Die Expression dieser Oberflächenproteine ermöglicht den Endothelzellen erst eine Migration im umliegenden Bindegewebe, da sie sich hiermit gleichsam an Haken in den Bindegewebsstrukturen fortbewegen können. Die Notwendigkeit der Expression von VEGF für die Blutgefäßbildung wurde durch knock-out Experimente in der Maus eindrucksvoll belegt, da diese

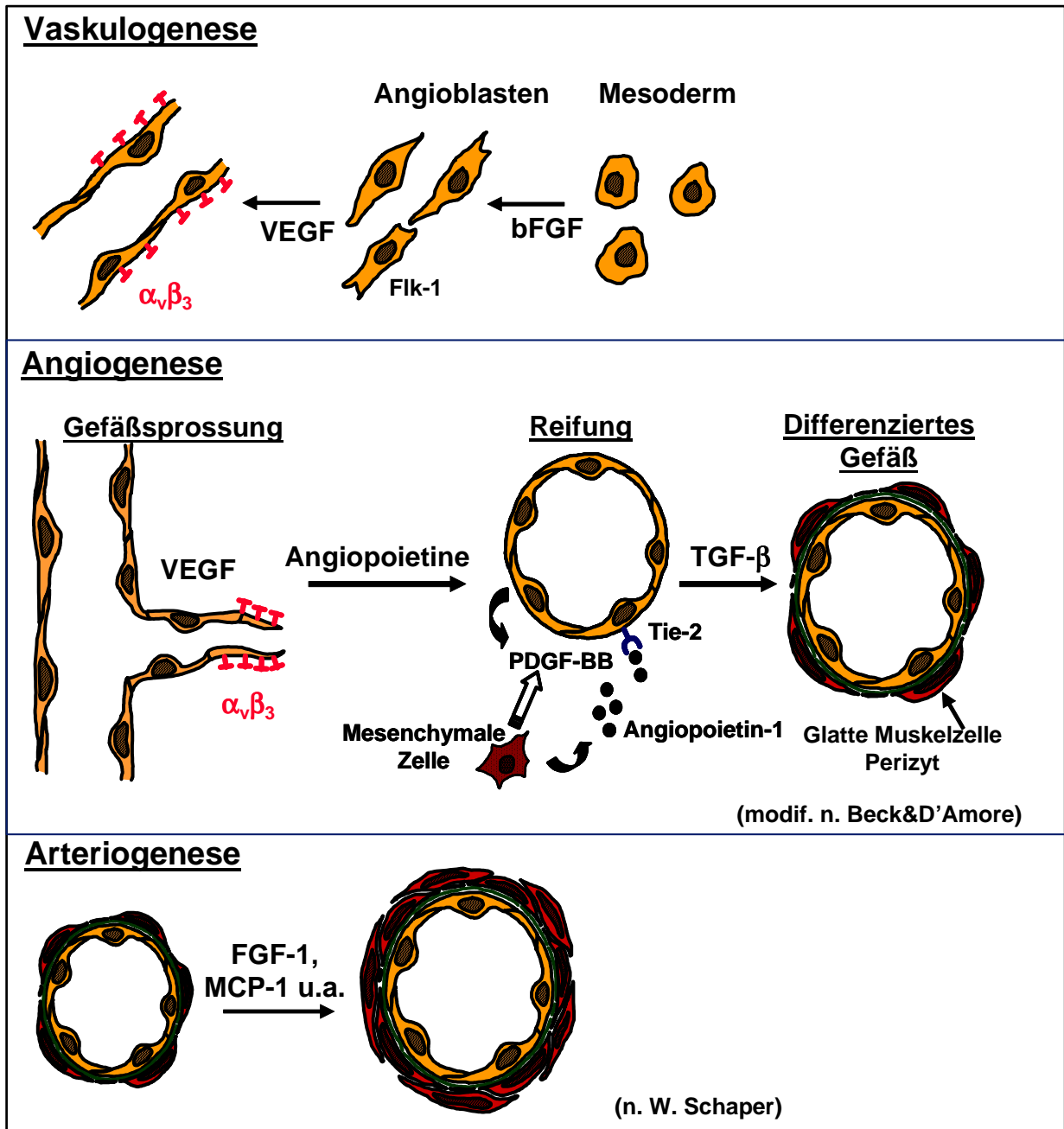


Abb. 1.2. Mechanismen des Blutgefäßwachstums.

Tiere keine Endothelzellen und somit keine Blutgefäßanlagen ausbilden und dadurch bereits pränatal sterben. Nach Ausbildung einer Kapillare kommt es nachgeschaltet unter dem Einfluß der Angiopoietine zu einer Gefäßreifung, was ein Abdichten der Kapillaren voraussetzt. So wurde gezeigt, dass ein genetisches Ausschalten des Gens für Angiopoietin-1 zwar zur Anlage von Blutgefäßen führt, diese jedoch brüchig sind und die Gefäßstrukturen zerstört wirken.^{13, 14} Umgekehrt führte eine transgene Überproduktion von sowohl VEGF als auch Angiopoietin-1 zu einer verstärkten Ausbildung bzw. Verzweigung von Kapillaren,¹⁵ und in den Angiopoietin-1 transgenen Mäusen zeigten sich die

Blutgefäße weniger durchlässig.^{16, 17} Eine Reifung eines Blutgefäßes setzt eine Rekrutierung von mesenchymalen Zellen voraus, welche sich von außen dem neugebildeten Gefäß anlagern müssen. Hierbei wird ein parakriner Regelkreis vermutet, wobei die Endothelzellen chemotaktisch auf mesenchymale Zellen wirksames PDGF-BB produzieren, umgekehrt die mesenchymale Zellen Angiopoietin-1 sezernieren, was den zugehörigen Rezeptor auf den Endothelzellen, Tie-2, aktiviert. Unter dem Einfluß von TGF- β kommt es im weiteren zur Ausbildung eines differenzierten Blutgefäßes, bestehend aus der Endothelzellschicht und aus mesenchymalen Zellen abstammenden glatten Muskelzellen und Perizyten.¹⁸⁻²²

Arteriogenese bezeichnet das Wachstum prä-existenter Kollateralgefäße. Diese Fluß-abhängige Größenzunahme von vorhandenen Kollateralen spielt eine wesentliche Rolle zur funktionellen Perfusionssteigerung ischämischer Gewebeareale.²³ Arteriogenetisch wirksame Wachstumsfaktoren sind beispielsweise FGF-1 (=aFGF) und MCP-1.²³⁻²⁶

Der allgemein übliche, eher unscharfe Begriff der *therapeutischen Angiogenese* bezeichnet meist den erwünschten Vorgang einer Perfusionsverbesserung, welcher auf beide Prozesse, nämlich einerseits Angiogenese im engeren Sinne, und andererseits Arteriogenese zurückzuführen ist.²⁷

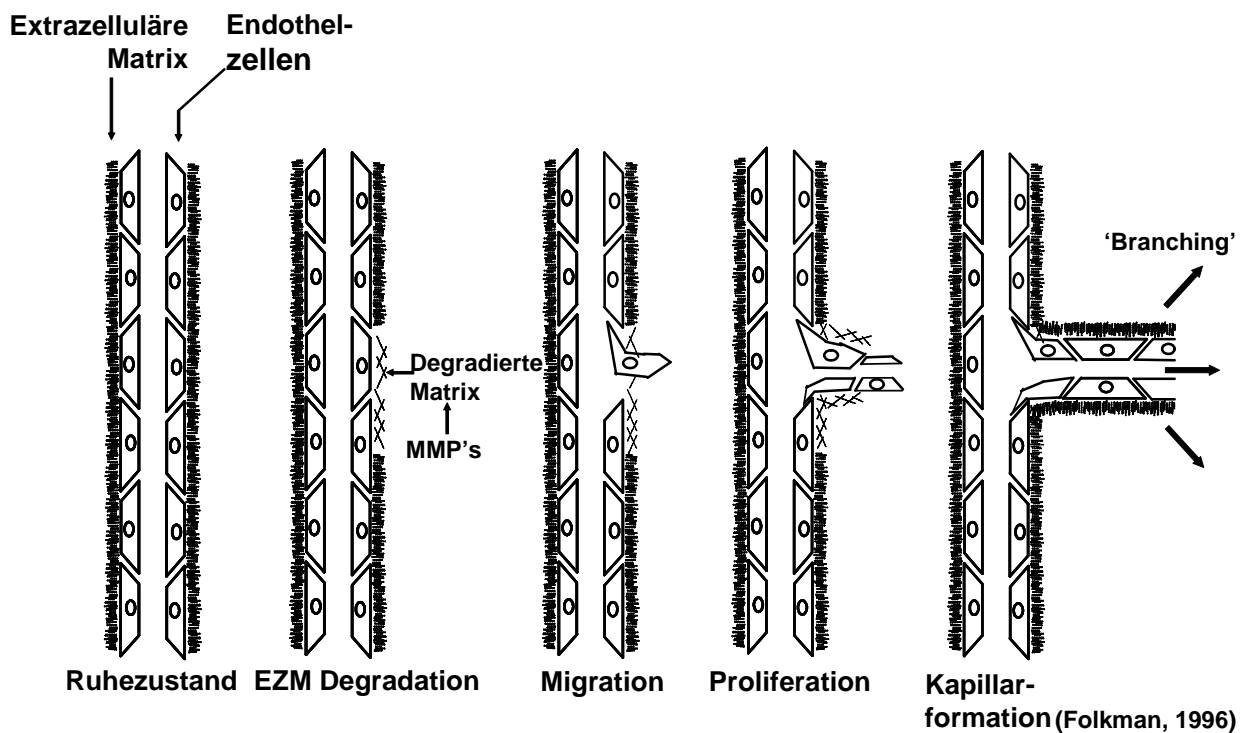


Abb. 1.3. Mechanismen der Angiogenese. EZM: extrazelluläre Matrix.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe Angiogenese-fördernder Wachstumsfaktoren isoliert. Im Folgenden sind die bekanntesten aufgelistet:

- VEGF-A²⁸
- VEGF-C^{29, 30}
- VEGF-B, D, E³¹
- Angiopoietin-1, 2^{32, 33}
- FGF-1²⁶
- FGF-2³⁴
- FGF-4, 5³⁵
- HGF/SF (Hepatocyte growth factor/Scatter factor)^{36, 37}
- MCP-1³⁸
- TGF- β ³⁹
- GM-CSF⁴⁰

Vom theoretischen Ansatz her sind aufgrund ihrer überwiegend endothelspezifischen Wirkungsweise insbesondere die beiden ersten Familien interessant, nämlich die VEGF-Familie mit ihren Mitgliedern A bis E sowie die Angiopoietine mit ihren Mitgliedern 1 bis 4. Die jeweils zugehörigen Rezeptoren sind weitgehend bekannt und charakterisiert (**Abb. 1.4**). Der Ligand für den Tie1-Rezeptor ist bisher nicht identifiziert. Die VEGF- und Angiopoietin-Rezeptoren sind mit wenigen Ausnahmen⁴¹ auf dem Endothel exprimiert, also dem Zelltyp, der für die Angiogenese besonders wichtig ist. Diese Rezeptorenverteilung begründet somit die Endothelspezifität dieser Familien. Beide Familien unterscheiden sich aber in wesentlichen Wirkmechanismen, worauf in der vorliegenden Arbeit im Detail eingegangen wird.

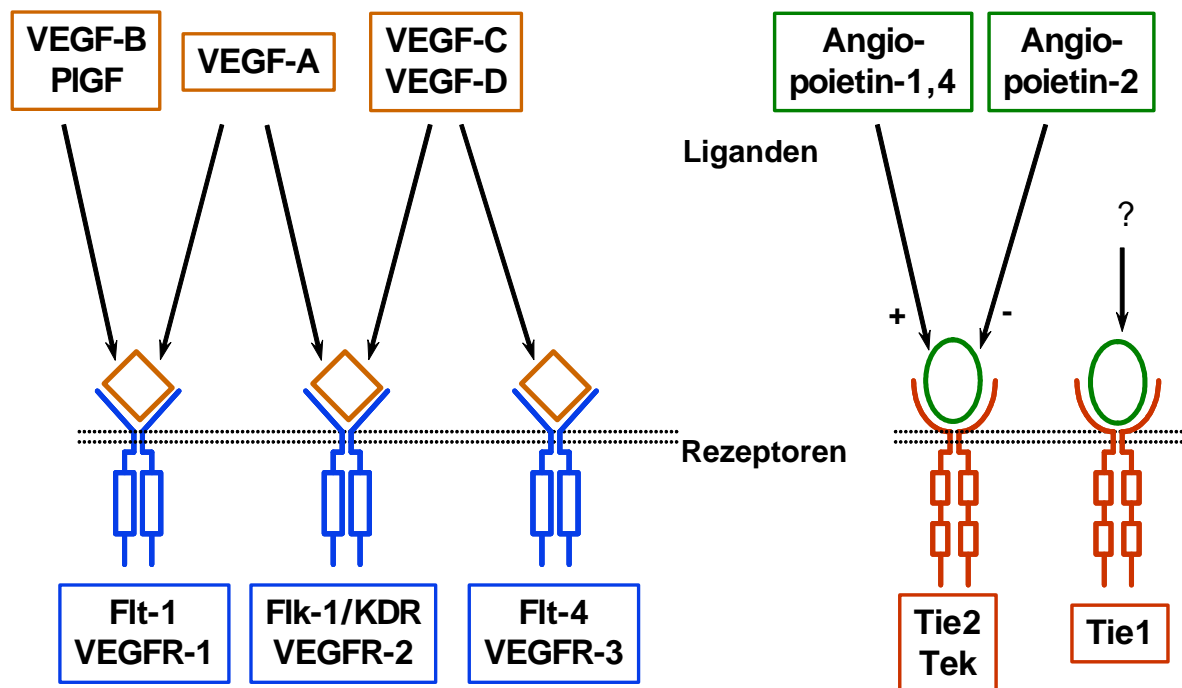


Abb. 1.4. Die VEGF- und Angiopoietin-Familie endotheelspezifischer angiogenetischer Faktoren. Die Pfeile kennzeichnen das Bindungsverhalten der Liganden an die entsprechenden Rezeptoren. Der Ligand für den Tie1-Rezeptor ist bisher nicht identifiziert.

1.3. Zielsetzung

Der mögliche vorteilhafte therapeutische Effekt einer Wachstumsfaktor-induzierten Förderung der Angiogenese in Geweben mit chronischer Ischämie begründet ein weitreichendes Interesse an der Erforschung der daran beteiligten molekularen Mechanismen und an einer Umsetzung in klinisch relevanten Tiermodellen. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist daher, verschiedene angiogenetische Faktoren mit unterschiedlichem Rezeptorverteilungsmuster einerseits hinsichtlich ihrer Potenz zur Induktion therapeutischer Angiogenese, andererseits der damit verbundenen molekularen Mechanismen zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die enge Verzahnung, synergistische Wirkungsweise und wechselseitige Induktion der Faktoren gelegt, da in der *in vivo*-Situation multiple Klassen von Faktoren zum Prozess der Angiogenese beitragen. In der Vergangenheit wurde in erster Linie versucht, die Funktionen individueller Klassen angiogenetischer Faktoren zu verstehen. Sehr viel weniger ist bekannt über die kombinierte Rolle multipler Klassen von Faktoren im Prozess der Angiogenese. In der vorliegenden Arbeit wird daher versucht, unterschiedliche Wirkungsweisen einzelner angiogenetischer Faktoren gegeneinander abzugrenzen, therapeutische Vor- und Nachteile zu charakterisieren sowie synergistische Effekte herauszuarbeiten.

Zunächst wird ein Mitglied der VEGF-Familie, VEGF-C/VEGF-2, mit einem klassischen Angiogenese-Faktor, nämlich VEGF-A/VEGF-1, hinsichtlich seiner angiogenetischen Eigenschaften verglichen und im Tiermodell mit chronischer Ischämie auf seine therapeutische Potenz untersucht. In einem weiteren Schritt wird ein Mitglied der FGF-Familie, also einer weiteren klassischen Wachstumsfaktor-Familie, nämlich FGF-1/aFGF, auf seine angio- und insbesondere arteriogenetische Wirkungsweise mittels eines verbesserten Plasmid-Designs für effektiven Gentransfer evaluiert. Danach wird anhand eines anderen angiogenetisch wirksamen Faktors, nämlich dem SF/HGF, gezeigt, dass Angiogenese parakrin amplifiziert werden kann, indem dieser Faktor seine Wirkung durch Induktion von VEGF-A/VEGF-1 potenziert. Dieses Beispiel belegt die Möglichkeit wechselseitiger Interaktionen zwischen angiogenetischen Faktoren, welche in diesem Fall zu synergistischen Effekten führen.

Ein wesentlicher Schwerpunkt in der zweiten Hälfte der vorliegenden Arbeit liegt auf der Beschreibung des biologischen Effekts der Angiopoietine. Während die Entdeckung des VEGF mittlerweile mehr als zwei Jahrzehnte zurück liegt,^{42, 43} wurde das Angiopoietin-1 erst vor wenigen Jahren identifiziert.⁴⁴ Seine biologischen, pathologischen und potentiell therapeutischen Eigenschaften sind bisher somit deutlich weniger klar. Ein wesentlicher, sich immer mehr herauskristallisierender Aspekt liegt darin, dass die VEGFs und die Angiopoietine nicht redundante, sondern vielmehr distinkte und komplementäre Rollen spielen, indem die VEGFs früh ein initiales Gefäßwachstum bewirken, und die Angiopoietine nachfolgend eine Reifung und ein Überleben dieser neu gebildeten Gefäße bewerkstelligen.⁴⁵ So zeigt die vorliegende Arbeit eindeutige Unterschiede in der biologischen Aktivität zwischen VEGF-A und den Angiopoietinen hinsichtlich der Beeinflussung der

Endothelzellproliferation und -migration, wobei selbst innerhalb der Angiopoietin-Familie Unterschiede in den Eigenschaften der Mitglieder Angiopoietin-1 und -2 bestehen. Insbesondere die Zellmigration (Chemotaxis) wurde als einer der wesentlichsten Teilschritte im Prozess der Angiogenese erkannt,⁴⁶ weswegen in der vorliegenden Arbeit hierauf für alle untersuchten Faktoren besonderes Augenmerk gelegt wird und die chemotaktischen Eigenschaften der Angiopoietine und der hierbei involvierten Zelloberflächenrezeptoren (Integrine) besonders eingehend charakterisiert werden. Bezüglich letzteren ist bekannt, dass möglicherweise eine Querverbindung („Crosstalk“) zwischen angiogenetischen Faktoren und Integrinen besteht. So wurde gezeigt, dass VEGF die Expression der Integrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ in mikrovaskulären Endothelzellen hochreguliert^{47, 48}, folglich die Zelladhäsion und -migration verstärkt, welche durch verschiedene Integrine und hierbei insbesondere $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ vermittelt wird.⁴⁹ Da der Einfluß der Angiopoietine auf die Integrin-Expression nicht bekannt ist, zielt ein weiterer Abschnitt in der Arbeit darauf ab, diese Frage zu beantworten. Dabei wird gezeigt, dass eine Stimulation von Endothelzellen mit Angiopoietin-1, nicht aber mit Angiopoietin-2, die Zell-Oberflächenexpression der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ reduziert. Als funktionelle Konsequenz hieraus fand sich eine verminderte Zellmotilität auf Vitronektin, welches Bestandteil der extrazellulären Matrix und adhäsiver Ligand für $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ ist. Diese Ergebnisse unterstützen somit die Annahme, dass Angiopoietin-1 eine Stabilisierung und Reifung von neu geformten Kapillaren fördert.

Im Gegensatz zum VEGF-A/VEGF-1, welches aufgrund seiner Eigenschaft, die mikrovaskuläre Permeabilität gegenüber Blutplasma-Proteinen zu erhöhen, auch als VPF=Vascular Permeability Factor bekannt ist, hat Ang1 die Fähigkeit, die Gefäßdurchlässigkeit zu reduzieren.^{6, 16, 17} In transgenen Ang1-überexprimierenden Mäusen ist gezeigt worden, dass die Blutgefäße weniger undicht waren,¹⁶ und adenovirale Überexpression von Angiopoietin-1 verhinderte die Ausbildung eines durch VEGF oder Senföl induzierten Gewebeödems.¹⁷ Ferner ist bekannt, dass Ang1 anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist, indem es endotheliale Zell-Adhäsionsmoleküle und cell junctions modifiziert.⁶ Daher könnte Ang1 durch Beeinflussung der mikrovaskulären Undichtigkeit therapeutisch nützlich sein bei Krankheitszuständen, in welchen eine Gefäßundichtigkeit und Ödemneigung aus einer Gefäßentzündung resultiert. Da der Endotoxin-induzierte septische Schock ein Zustand erhöhter mikrovaskulärer Undichtigkeit ist, welcher aus einem entzündlichen Prozess resultiert, war das Ziel des letzten Abschnittes der vorliegenden Arbeit, den möglichen therapeutischen Vorteil von Ang1 in einem Tiermodell mit Mäusen zu untersuchen, in welchen mittels LPS ein septischer Schock induziert wurde. Hierbei zeigte sich eine verbesserte Überlebensrate von Ang1-behandelten Mäusen im LPS-induzierten Schock, was ein Beispiel darstellt für einen möglichen Einsatz von Angiopoietin-1 bei einer im weitesten Sinne kardiovaskulären Erkrankung, bei welcher biologische Effekte eines angiogenetischen Faktors fernab von seiner bekannten Rolle in der Angiogenese potentiell therapeutisch genutzt werden können.

2. Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C/VEGF-2) – Bioaktivität im Vergleich zu VEGF-A/VEGF-1 und Induktion postnataler Angiogenese in ischämischem Gewebe

2.1. Einleitung

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF),⁵⁰⁻⁵² auch bekannt als Vascular Permeability Factor,⁵³ zeichnet sich durch seine Besonderheit als Endothelzell-Mitogen aus, weil seine Hochaffinitäts-Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1) ganz überwiegend auf Endothelzellen exprimiert sind. Es wurde gezeigt, dass VEGF kritisch für Entwicklung⁵⁴⁻⁵⁷ und Aufrechterhaltung⁵⁸⁻⁶⁰ der normalen Blutgefäße ist, ebenso wie für therapeutische⁶¹⁻⁶⁴ und Tumor-induzierte Angiogenese⁶⁵⁻⁶⁸

Die kürzliche Reinigung und Charakterisierung von Proteinen mit starker Homologie zu VEGF führte zur Designierung einer ganzen Familie von vaskulär-endothelialen Wachstumsfaktoren, bestehend aus derzeit vier Mitgliedern. Zusätzlich zu VEGF/Vascular Permeability Factor, mittlerweile umbenannt in VEGF-A oder VEGF-1, wurden zwei weitere Proteine, VEGF-C oder VEGF-2³⁰ und VEGF-B oder VEGF-3³¹ isoliert, und es wurde gezeigt, dass diese in hohem Maße in stark vaskularisierten Geweben wie Herz und Skelettmuskulatur exprimiert sind. Im Unterschied zur weitverbreiteten Verteilung der VEGFs erscheint die Expression des vierten Mitglieds der VEGF-Familie, Placenta Growth Factor (PlGF),⁶⁹ *in vivo* beschränkt auf Plazenta und bestimmte Tumoren.⁷⁰ ⁷¹ Alle vier Proteine teilen strukturelle Homologie untereinander, ebenso wie mit den Platelet-Derived Growth Factor A und B Polypeptiden, insbesondere einschließlich eines konservierten Motifs, welches aus acht Zystein-Einheiten in der vermuteten Rezeptor-Bindungsdomäne besteht.⁷² Ähnlich wie bei den A- und B-Ketten des Platelet-Derived Growth Factors (PDGF) können VEGF-A und PlGF Heterodimere formen, welche nachweisbare biologische Effekte besitzen.⁷³⁻⁷⁶ VEGF-B kann möglicherweise auch mit VEGF-A in Zellen, welche beide Faktoren exprimieren, heterodimerisieren.³¹ Darüberhinaus war vor kurzem gezeigt worden, dass Hypoxie, welches wesentlichster Stimulus für eine Hochregulation von VEGF-A ist,^{66, 77, 78} auch differentiell die Induktion von Homo- und Heterodimeren von PlGF/VEGF-A regulieren könnte.⁷⁵

Während VEGF-A ein Hochaffinitäts-Ligand für die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 ist, wurde gezeigt, dass VEGF-C an eine andere kürzlich identifizierte Rezeptortyrosinkinase, VEGFR-3 (Flt-4), bindet; weiterhin bindet VEGF-C an VEGFR-2, nicht aber an VEGFR-1.³⁰ Nach Vergleich der Aminosäuresequenz eines unabhängig isolierten spezifischen Aktivators von VEGFR-3, ursprünglich Vascular Endothelial Growth Factor-Related Protein genannt,⁷⁹ mit VEGF-C stellte sich dessen Identität mit VEGF-C heraus. PlGF bindet mit hoher Affinität an VEGFR-1, aber nicht an VEGFR-2⁷³ oder VEGFR-3.⁸⁰ Der/die Rezeptor(en) für VEGF-B³¹ sind bisher nicht charakterisiert.

Die Rolle des VEGF-A für die Angiogenese ist mittlerweile *in vivo* und *in vitro* extensiv untersucht worden.⁴³ Vor kurzem ist gezeigt worden, dass VEGF-A in der Media von humanen

Arterien und Venen exprimiert ist,⁸¹ was in Einklang ist mit der vermuteten Rolle von VEGF-A in einer Aufrechterhaltung der Integrität des Gefäßendothels. Die konstitutive Koexpression aller VEGF-Typen in vielen adulten Geweben^{30, 31, 79} legt eine interaktive oder wenigstens redundante Kapazität der VEGF-Mitglieder in der Regulation von Angiogenese und Modulation endothelialer Funktion nahe.

Daten hinsichtlich der Bioaktivität von VEGF-C und VEGF-B sind bisher begrenzt.^{30, 31, 79, 82} Daher war die Intention der folgenden Experimente herauszufinden, ob VEGF-C Angiogenese induzieren kann, wenn es in adulten Tieren überexprimiert wird. Es wird die mitogene Aktivität von VEGF-C bestätigt und seine Fähigkeit gezeigt, Zell-Migration in verschiedenen Endothel-Zelltypen zu stimulieren. Darüberhinaus wird gezeigt, dass VEGF-C die Freisetzung von Stickoxid (NO) aus Endothelzellen induzieren kann, was wahrscheinlich einen wichtigen Mediator VEGF-induzierter Angiogenese darstellt.⁸³⁻⁸⁶ In der Tat erhöhte VEGF-C, verabreicht als rekombinantes Protein, die Gefäßpermeabilität *in vivo* und förderte Angiogenese, verabreicht als rekombinantes Protein oder als Plasmid-DNA, in einem Kaninchen-Modell mit chronischer Ischämie der unteren Extremität. Diese Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass VEGF-C als primäre oder adjunktive Therapiemaßnahme zur Förderung von Angiogenese bei ischämischen Erkrankungen nützlich sein könnte.

2.2. Material und Methoden

Rekombinantes Protein

Heterodimerisches rekombinantes humanes (rh) VEGF-A (VEGF-1) Protein, gereinigt aus *Escherichia coli*, wurde freundlicherweise von Drs. N. Ferrar, B. Keyt und S. Bunting von der Fa. Genentech Inc. (South San Francisco, CA) zur Verfügung gestellt. rhVEGF-A aus *E. coli* erschien als eine einzelne Proteinbande bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit einem Molekulargewicht von 39.8 kD unter nicht-reduzierenden Bedingungen. rhVEGF-C (VEGF-2) wurde im BaculoGold Virusexpressions-Vectorsystem (Pharmingen) exprimiert und gereinigt mittels Ionaustausch- und hydrophober Interaktions-Chromatographie, wie anderweitig beschrieben.⁸⁷ Unter nicht-reduzierenden Bedingungen lieferte SDS-PAGE Analyse Banden von 52 kd und 90 kd, welche multimere, Disulfid-gebundene rhVEGF-C Komplexe repräsentieren.³⁰ Für alle rekombinanten Proteine wurde das Vorhandensein von Endotoxin mittels des Limulus-Lysatassays ausgeschlossen.

Plasmide

Komplementäre DNA-Klone für rhVEGF-C, isoliert aus einer human Osteoklasten cDNA-Library, wurden in einen pcDNAI/Amp-Expressionsvektor inkloniert, welche einen Cytomegalievirus-Promoter/Enhancer beinhaltet, um eine konstitutive Genexpression zu gewährleisten. Dieses Genkonstrukt wurde pcVEGF-C benannt. Das Plasmid pGSVLacZ (freundlicherweise von Dr. C.

Bonnerot zur Verfügung gestellt), welches eine Zellkern-gerichtete β -Galaktosidasesequenz, gekoppelt an den SV40 early Promoter, beinhaltet, wurde für die Kontroll-Transfektionsexperimente benutzt.

Zellkultur

Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) wurden aus Nabelschnurvenen mittels Kollagenasebehandlung isoliert wie anderweitig beschrieben⁸⁸ und in Medium 199 (Gibco Life Technologies) kultiviert, welchem 20% fetales Rinderserum (FBS) (Gibco), 100 μ g/ml Endothelzellwachstumszusatz und 50 U/ml Heparin (Sigma Chemical Co.) zugesetzt worden waren. Die HUVECs wurden zwischen Passage 2 und 5 benutzt.

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen dermalen Ursprungs (HMECs) wurden von Cascade Biologics, Inc., käuflich erworben. Repräsentative Platten wurden mit einem Antikörper gegen PAL-E⁸⁹ gefärbt, um die Abwesenheit lymphatischer Endothelzellen zu bestätigen. Die Zellen wurden in EBM-Medium kultiviert, welches humanen epidermalen Wachstumsfaktor (10 ng/ml), Hydrocortison (10 ng/ml), 5% FBS und 0.4% bovinen Gehirnextrakt enthielt. Die HMECs wurden zwischen Passage 4 und 6 für die Experimente eingesetzt.

Endothelzell-Proliferationsassay

Die mitogene Aktivität wurde mittels dem kolorimetrischem MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) Assay mit dem Elektronenkopplungsreagenz Phenazinmethosulfate (CellTiter 96 AQ; Promega), welcher vorher validiert worden war,⁹⁰ durchgeführt. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten (5000 Zellen/Well) in 0.1 ml Serum-ergänzt Medium ausgesät und übernacht zur Anheftung inkubiert. VEGF (rhVEGF-A oder rhVEGF-C) in 5% FBS mit Heparin (10 U/l) wurde für 48 Stunden in die Wells zugegeben. Dann wurde in jedes Well MTS/Phenazinmethosulfat-Mischung (20 μ l; 1:0.05) zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Messung der Absorption bei 490 nm in einem ELISA-Plattenleser. Die Hintergrundabsorption von Kontrollwells wurde subtrahiert, und sieben wells wurden parallel analysiert und für jede Bedingung gemittelt. Die Proliferationsexperimente wurden jeweils dreimal wiederholt.

Endothelzell-Migrationsassay

Endothelzell-Migrationsassays wurden mittels einer 48-well-Mikrochemotaxis-Kammer (modifizierte Boyden-Kammer) (Neuroprobe) durchgeführt.⁹¹ Polyvinylpyrrolidon-freie Polycarbonat-Filter mit einer Porengröße von 8 μ m (Nuclepore) wurden mit 0.1% Gelatin für wenigstens 8 Stunden bei Raumtemperatur beschichtet und in steriler Luft getrocknet. Die zu testenden Substanzen wurden zu entsprechenden Konzentrationen in Medium 199, ergänzt mit 1% FBS, verdünnt, und 25 μ l der Endverdünnung wurden in der unteren Kammer der modifizierten Boyden-Kammer plaziert.

Subkonfluente HUVEC- oder HMEC-Kulturen wurden mit PBS gewaschen und für eine möglichst kurze Zeit trypsinisiert, um gerade ein Ablösen der Zellen von den Platten zu bewirken. Nach Platzieren des Filters zwischen unterer und oberer Kammer wurden 2.5×10^5 Zellen, resuspendiert in 50 μ l Medium 199, ergänzt mit 1% FBS, in das obere Kompartiment eingebracht. Der Apparat wurde dann für 5 Stunden bei 37°C in einem Zellinkubator mit 5% CO₂ aufbewahrt. Nach der Inkubationszeit wurde der Filter entfernt und die obere Seite des Filters, auf welcher sich die nicht-migrierten Zellen befinden, mit einem Gummischaber entfernt. Die Filter wurden dann mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung (Diff-Quick, Baxter Diagnostics) gefärbt. Zellmigration wurde quantifiziert, indem die Zellen in drei zufälligen 100fach-Vergrößerungsfeldern gezählt wurden. Alle Gruppen wurden parallel in vierfach-Ansätzen untersucht.

NO-Messung

Zur Messung der Stickoxid-(NO-)Freisetzung aus HUVEC-Kulturen in Monoschicht wurde eine NO-spezifische polarographische Elektrode, angeschlossen an ein NO-Meter (Iso-NO, World Precision Instruments), benutzt. Die Kalibrierung der NO-Elektrode erfolgte gemäß der folgenden Gleichung: $2\text{KNO}_2 + 2\text{KI} + 2\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{NO} + \text{I}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{K}_2\text{SO}_4$. Die Standard-Kalibrierungskurve wurde erhalten durch Zugabe steigender Konzentration von KNO₂ (0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 und 500 nmol/l) zur Kalibrierungslösung, welche KI und H₂SO₄ enthält. Die Spezifität der iso-NO-Elektrode für NO war zuvor bestimmt worden durch Messung von NO aus authentischen NO-Gas.⁹² Das Kulturmedium wurde entfernt, und die HUVECs wurden zweimal mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Salzlösung (DPBS) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 5 ml gefilterter Krebs-Henseleit-Lösung in 6-well-Platten inkubiert, und die Zellplatten dann auf einem Objektträger-Wärmer (Lab Line Instruments) platziert, um sie auf 37°C zu temperieren. Der NO-Probensensor wurde vertikal in die wells platziert, und zwar mit der Spitze der Elektrode 2 mm unter der Oberfläche der Lösung, bevor dann die Reagenzien zugegeben wurden. *S*-Nitroso-*N*-Acetyl-Penicillamin (Sigma) diente als Positivkontrolle. Der Gehalt an freigesetztem NO wurde als pmol pro 1×10^6 Endothelzellen ausgedrückt. Alle Werte repräsentieren den Mittelwert von vier bis sechs Messungen (Zahl der Zellkultur-Platten), die in jeder Gruppe durchgeführt wurden.

Miles-Assay

Hierfür wurden haarlose männliche Albino-Meerschweinchen (200 bis 600 g; Charles River Breeding Laboratories) mit Äther (Fischer Scientific) anästhesiert. Evansblau-Lösung (Sigma) wurde durch 0.2- μ m Mikropore-Filter gefiltert und dann als 0.5- bis 1.0 ml Bolus einer 0.5% Lösung in Kochsalz via linke V. femoralis infundiert. Der Evansblau-Farbstoff bindet zirkulierende Plasma-Proteine und tritt nach extravasal aus als Antwort auf bestimmte Reagenzien, was dazu führt, dass sich hyperpermeable Hautstellen blau färben.⁹³ Nachdem die Tiere wieder ihr Bewußtsein erlangten, wurden verschiedene Reagenzien in einem festen Volumen von 0.1 ml intradermal injiziert. Die

intradermalen Injektionen wurden 20 Minuten nach der intravenösen Injektion des Evansblau-Farbstoffes mit einer 30-Gauge Nadel (Becton-Dickinson) am Rumpf, posterior zur Schulter, durchgeführt, was eine Quaddel mit einem Durchmesser von 9 bis 11 mm verursacht. Eine Zunahme der Gefäßpermeabilität läßt sich abschätzen durch ein Eindringen des blauen Farbstoffes in die Quaddel.⁹³ Wie ursprünglich von Miles und Miles beschrieben kann teilweise eine kleine Fläche traumatischer Blaufärbung mit einem Durchmesser von 1-3 mm im Zentrum der Quaddel nach intradermaler Injektion von Kochsalzlösung beobachtet werden. Die Intensität und Größe der Blaufärbung innerhalb der Quaddeln wurde identifiziert und abgeschätzt, desweiteren die intradermale Injektionsstelle photographiert. Folgende Reagenzien wurden intradermal appliziert: 1) Kochsalzlösung allein (Transportvehikel), 2) ansteigende Konzentrationen von rhVEGF-A (4, 8, 16, 32, 64 und 128 ng), und 3) ansteigende Konzentrationen von rhVEGF-C (4, 8, 16, 32, 64 und 128 ng).

Um die Rolle von NO an der VEGF-induzierten Veränderung der Gefäßpermeabilität zu untersuchen, wurde N_ω-nitro-L-Argininmethylester (L-NAME; 20 mg/kg; Sigma) via Femoralvene kurz vor Applikation der Evansblau-Farblösung injiziert. 20 Minuten später wurden folgende Reagenzien intradermal appliziert: 1) Kochsalzlösung allein (Negativkontrolle), 2) ansteigende Konzentrationen von rhVEGF-A (8, 16, 32, 64 und 128 ng), und 3) ansteigende Konzentrationen von rhVEGF-C (4, 8, 16, 32, 64 und 128 ng).

Analyse der VEGF-Rezeptor mRNA in explantierten arteriellen und venösen Gefäßen

Gesamt-RNA wurde aus ungebrauchten Segmenten menschlicher, während Bypass-Operationen entnommener A. mammaria interna- und Vena saphena-Gefäßstücken mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion isoliert,⁹⁴ und die RNA-Konzentration wurde aus der Absorption bei 260 nm bestimmt.

Für die Reverse Transkription⁹⁵ wurde ein 10 µl Reaktionsgemisch, bestehend aus 1 µg Gesamt-RNA und 20 µg/ml Oligodeoxythymidin (GIBCO BRL) bei 70°C für 10 Minuten erhitzt. Nach Abkühlen wurden 60 Einheiten eines humanen Placenta-Ribonukleaseinhibitors (Promega) und 200 U Moloney's murine Leukämievirus Rnase H Reverse Transkriptase (GIBCO BRL) in einem 20 µl Reaktionsvolumen zusammengemischt, welches (mmol/l) dNTP (Pharmacia) jeweils 1, Dithiothreitol 10, Tris-HCl (pH 8.3) 25, KCl 75 und MgCl₂ 3 enthielt, inkubiert für 1 Stunde bei 42°C, 5 Minuten erhitzt bei 95°C and verdünnt zu 50 µl mit doppelt-destilliertem Wasser. Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit einer thermostabilen DNA-Polymerase⁹⁶ wurde eine 50 µl Reaktion bestehend aus 5 µl der cDNA, 200 µmol/l dNTP (Pharmacia), 20 mmol/l Tris-HCl (pH 8.55), 2.5 mmol/l MgCl₂, 16 mmol/l (NH₄)₂SO₄, 150 µg/ml BSA, 1 µmol/l von jedem Oligonukleotid-Primer, und 1.25 U *Taq*-Polymerase (Perkin Elmer) den folgenden Temperaturzyklen unterworfen: 30 Sekunden Denaturing bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei 56°C, und 1 Minute Extension bei 72°C. Am Ende des letzten Zyklus wurde ein verlängerter Extensionsschritt bei 72°C für 10 Minuten ausgeführt. Die PCR-Produkte wurden analysiert, indem 10 µl jedes PCR-Reaktionsgemisches in

einem 1.5% Agarose-Gel mittels Elektrophorese aufgetrennt wurde, und die Banden wurden mit Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Amplifikationen aus zwei getrennten Ansätzen.

Die gewählten Primer waren für humanen VEGFR-3 (Gene bank accession number X68203) für Sense (5'-3') CAG GAT GAA GAC ATT TGA und für Antisense (5'-3') AAG AAA ATG CTG ACG TAT GC⁹⁷ (190 bp PCR-Produkt); für humanen VEGFR-2 (Gene bank accession number X61656) CAA CAA AGT CGG GAG AGG AG und ATG ACG ATG GAC AAG TAG CC (819 bp); für humanen VEGFR-1 (Gene bank accession number X51602) CAG CGG CTT TTG TGG AAG ACT CAC und ACA TCT CGG TGT CAC TTC TTG GAC (735 bp); und für humane GAPDH TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG und CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC (983 bp). Die Zyklenzahl war für VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3 40, and für GAPDH 30.

Tiermodell

Die Fähigkeit von VEGF-C, Angiogenese *in vivo* zu fördern wurde in einem Kaninchenmodell mit chronischer Ischämie der unteren Extremität, welches früher beschrieben worden war,^{98, 99} durchgeführt. Alle Protokolle wurden von der zuständigen Tierkommission geprüft. Insgesamt wurden 28 (sieben pro Gruppe) männliche New Zealand White Kaninchen (3.5 bis 4.0 kg) (Pine Acre Rabbitry) mit einer Mischung aus Ketamin (50 mg/kg) und Azepromazin (0.8 mg/kg) nach Prämedikation mit Xylazin (2 mg/kg) anästhesiert. Die Arteria femoralis einer unteren Extremität wurde komplett von seinem proximalen Beginn ab der Abzweigung aus der A. iliaca externa bis distal zum Übergang in die A. poplitea exzidiert und die Seitenäste ligiert. Als Konsequenz hiervon hängt der Blutfluß zur ischämischen Extremität von Kollateralen ab, welche aus der A. iliaca interna entspringen.^{98, 99} Danach wurde ein Intervall von 10 Tagen für die postoperative Wundheilung und Entwicklung endogener Kollateralen abgewartet. Untersuchungen, die bis zu 90 Tage nach diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass es nach diesem Zeitpunkt zu keiner signifikanten endogenen Zunahme der Kollateralgefäße mehr kam.⁹⁹

Perkutaner arterieller Gentransfer von pcVEGF-C

Am 10. postoperativen Tag (Tag 0) wurde zuerst ein Basis-Angiogramm durchgeführt (s.u.) und anschließend die A. iliaca interna der ischämischen Extremität von 8 Tieren mit pcVEGF-C in Form von nackter Plasmid-DNA auf einem 2.0 mm, mit-Hydrogel.beschichteten Ballonkatheter (Slider mit Hydroplus, Boston Scientific) transfiziert. Der Katheterballon wurde zuerst *ex vivo* präpariert, indem der deflatierte Ballon durch eine 5-F Teflonschleuse (Boston Scientific) durchgezogen wurde, dann 500 µg pcVEGF-C-Lösung auf die 20 µm-dicke Hydrogelschicht, welche die äußere Oberfläche des jetzt inflatierten Ballons bedeckt, aufgebracht und dann der inflatierte Ballon zurück in die Schutzschleuse gezogen. Schleuse und Angioplastie-Katheter wurden dann via der rechten A. carotis eingeführt und mittels eines 0.014-Inch Führungsdrahtes (Hi-Torque Floppy II; Advanced Cardio

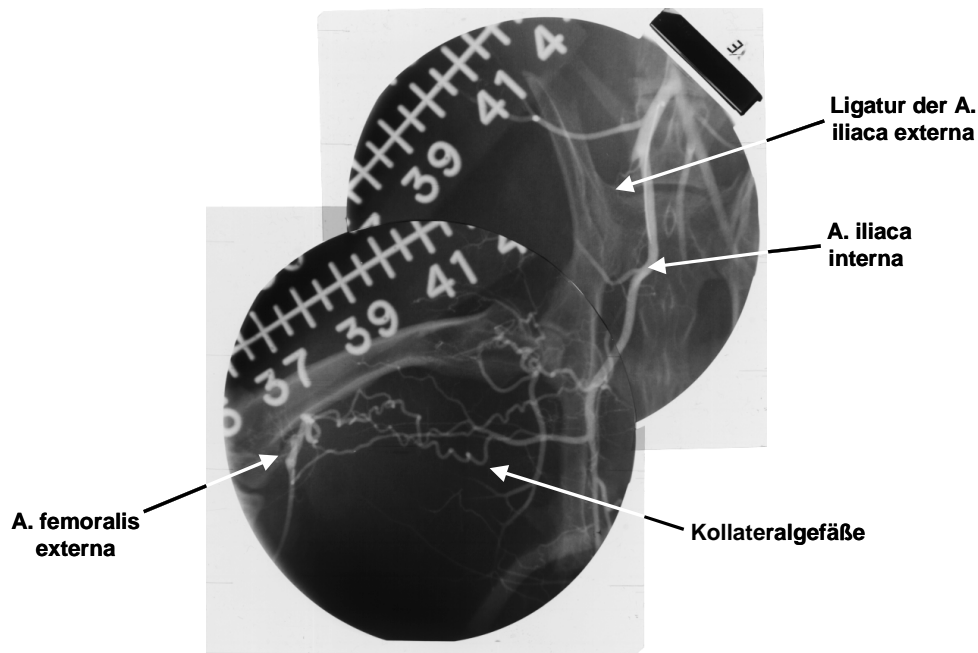


Abb. 2.1. Tiermodell chronischer Ischämie der unteren Extremität (Kaninchen). Die A. femoralis einer unteren Extremität wird komplett von seinem proximalen Beginn an der Abzweigung aus der A. iliaca externa bis zur distalen A. femoralis externa, kurz vor Übergang in die A. poplitea, exzidiert und die Seitenäste ligiert. Der Blutfluß zur Extremität hängt dann von Kollateralen ab, welche aus der A. iliaca interna entspringen.

vascular Systems) unter Röntgendurchleuchtung in die untere Aorta abdominalis vorgeschoben. Der Ballonkatheter wurde dann in die A. iliaca interna der ischämischen unteren Extremität eingebracht, für 1 Minute mit 6 bar inflatiert, deflatiert und wieder zurückgezogen. Nach dem identischen Schema wurde die A. iliaca interna von Kontrolltieren (n=8) mit dem Promoter-identischen Plasmid pGSVLacZ tranfiziert, welches eine zellkerngerichtete β -Galaktosidase-Sequenz enthält.

Am Tag 30 wurden alle Messungen wiederholt (s.u.), die Tiere eingeschläfert und Gewebeproben für die histologische Untersuchung entnommen.

Intraarterielle Administration von rhVEGF-C Protein

10 Tage postoperativ (Tag 0) wurden die nicht-invasiven und invasiven Basis-hämodynamischen Parameter (s.u.) erhoben. Dann wurde ein intraarterieller Bolus mit rhVEGF-C (500 μ g; n=8) in 3 ml Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung oder Vehikel-Lösung (3 ml Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit 0.1% Kaninchen-Serumalbumin (RSA), n=8) über eine Zeitspanne von 1 Minute durch einen 3-F Endloch-Infusionskatheter (Tracker-18; Target Therapeutics), welcher in der A. iliaca interna positioniert worden war, verabreicht. Der Katheter wurde dann mit 3 ml Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit 0.1% Kaninchen-Serumalbumin durchgespült. Die für diese Experimente gewählte Dosis für rhVEGF-C Protein (500 μ g) ist im Einklang mit vorausgehenden

Untersuchungen, bei denen gezeigt worden war, dass rhVEGF-A mit dieser Dosis einen maximalen Effekt aufwies.^{28, 61}

PHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN

Unterschenkel-Blutdruckindex

Der Unterschenkelblutdruck an den Tagen 0 und 30 wurde an der A. tibialis posterior in beiden unteren Extremitäten mittels eines Doppler-Flußmessgeräts (Modell 1050, Parks Medical Electronics) und einer Manschette verbunden mit einem Druckmanometer gemessen.^{98, 100} Der Unterschenkel-Blutdruckindex wurde für jedes Kaninchen als das Verhältnis aus systolischem Blutdruck der ischämischen mit dem der normalen Extremität bestimmt.

Intravaskuläre Blutfluß-Messung

Vor der selektiven iliakalen Angiographie am Tag 30 wurde der Blutfluß *in vivo* mittels eines 0.018-Inch Dopplerdrahtes (Cardiometrics) quantifiziert, welcher wie früher beschrieben¹⁰¹ in die linke A. carotis communis eingeführt worden war. Der Draht wurde via einem 3-F Infusionskatheter (Target Therapeutics), welcher am Ursprung der A. iliaca communis positioniert worden war, bis zum proximalen Segment der A. iliaca interna, welche die ischämische Extremität versorgt, vorgeschoben (**Abb. 2.2**). Die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit (Average Peak Velocity = APV) wurde in Ruhe aufgezeichnet, und die maximale APV wurde nach intraarterieller, über 2 Minuten konstanter Gabe von Nitroprussid (Sigma) mittels einer Infusionspumpe (1 ml/Minute) ermittelt. Das Medikament wurde in einer Dosis von 1.5 µg/Minute/kg verabreicht.

Wie schon anderweitig beschrieben,⁹⁸ wurde der angiographische Lumendurchmesser der A. iliaca interna in Ruhe und nach Nitroprussid-Infusion mittels eines automatischen Gefäßbrand-Erkennungssystems (Quantum 2000I; QCS) bestimmt. Der lumenale Durchmesser wurde 5 mm distal der Drahtspitze, was dem Doppler-Messbereich entspricht, ermittelt. Die Querschnittsfläche wurde unter der Annahme eines zirkulären Lumens berechnet.

Der Blutfluß wurde aus dem Dopplersignal berechnet als $Q_D = (\pi d^2/4)(0.5 \times APV)$, wobei Q_D den über die Zeit gemittelten Fluß, d den Gefäßdurchmesser und APV den Durchschnitt über die Zeit der spektralen Spitzengeschwindigkeit darstellt.¹⁰² Die mittlere Geschwindigkeit wurde näherungsweise angesetzt als 0.5 x APV unter der Annahme eines im zeitlichen Mittel parabolischen Geschwindigkeitsprofils entlang des Gefäßes. Der auf diese Weise aus dem Dopplersignal berechnete Blutfluß war in vorausgehenden Untersuchungen *in vivo* validiert worden.¹⁰² Für die ischämische Extremität, in welcher die A. iliaca externa entfernt worden war, repräsentiert der Fluß durch die A. iliaca interna den Fluß zur gesamten Extremität.⁹⁸ Die Flußreserve wurde definiert als das Verhältnis von Ruhefluß zu pharmakologisch induziertem maximalem Fluß.

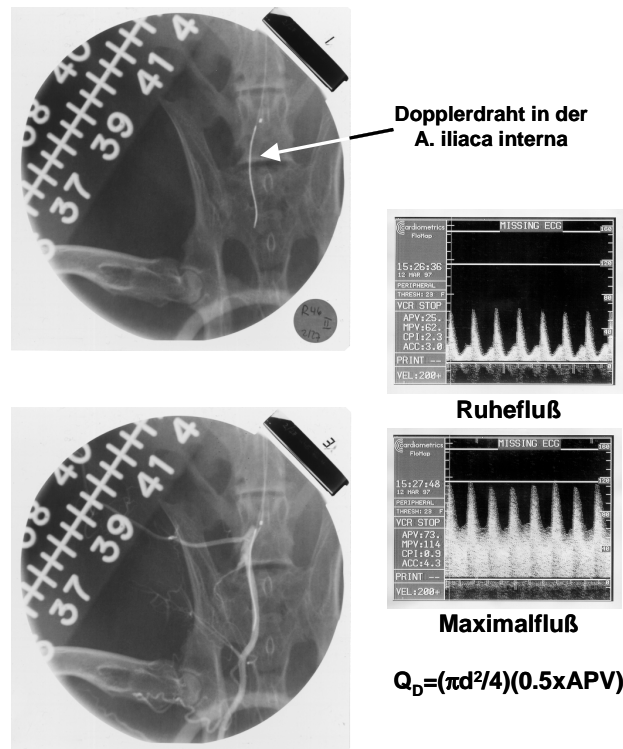


Abb. 2.2. Intravaskuläre Blutflußmessung mittels Doppler-Draht. Darstellung links oben ohne, unten mit Kontrastmittelinjektion in die A. iliaca communis. Ein 0.018-Inch Dopplerdraht (Cardiometrics) wird durch einen in der A. iliaca communis positionierten 3-F Infusionskatheter (Target Therapeutics) im proximalen Segment der A. iliaca interna, welche die ischämische Extremität versorgt, plaziert. Daraufhin erfolgt zunächst die Ruheflußmessung, dann die Messung des maximalen Flusses, induziert durch Nitroprussid-Infusion. Der Blutfluß errechnet sich aus der angegebenen Formel. Q_D : mittlerer Fluß, d: Gefäßdurchmesser, APV: durchschnittliche Spitzengeschwindigkeit.

ANATOMISCHE MESSUNGEN

Selektive Angiographie der A. iliaca

Die angiographische Analyse der Kollateralgefäßentwicklung in der ischämischen Extremität wurde anhand des 4-Sekunden-Angiogramms durchgeführt, welches nach Injektion von 0.25 mg Nitroglycerin und 5 ml nicht-ionischem Kontrastmittel (Isovue-370; Squibb Diagnostics) durch einen 3-F Infusionskatheter (Target Therapeutics) in die A. iliaca interna aufgezeichnet wurde. Zur Auswertung wurde auf das Angiogramm auf Höhe der medialen Hüfte eine gitterartige Folie angelegt, welche aus kleinen Kreisen mit einem Durchmesser von 2.5 mm bestand, angeordnet in Reihen mit einem Abstand von 5 mm untereinander. Dann wurde die Anzahl Kontrastmittel-gefüllter Gefäße (Kollateralen), welche jeweils einen Kreis kreuzten, pro Kreis gezählt, ebenso wie die Gesamtzahl an Kreisen, welche das Gebiet der medialen Hüfte bedeckte. Der angiographische Score wurde dann berechnet als Verhältnis aus der Anzahl an Kreisen, die von Kontrastmittel-gefüllten Arterien gekreuzt wurden, geteilt durch die Gesamtzahl der Kreise in dem ischämischen Hüftareal. Dieser angiographische Score kann als Maß für die Gefäß- bzw. Kollateraldichte in dem medialen Hüftgebiet angesehen werden.¹⁰⁰

Kapillardichte

Das Ausmaß an Angiogenese wurde weiterhin in lichtmikroskopischen Schnitten von ischämischer und nicht-ischämischer Extremitätenmuskulatur untersucht.¹⁰⁰ Am Tag 30 wurden nach Einschlafen der Tiere Gewebeprobe von jeder unteren Extremität aus dem M. adductor und semimembraneus quer zur Faserrichtung entnommen. Diese zwei Muskeln wurden gezielt deswegen ausgewählt, weil sie die zwei Hauptmuskeln im Bereich der medialen Hüfte sind, welche ursprünglich durch die A. femoralis profunda perfundiert wurden, welche zum Operationszeitpunkt ligiert worden war. Die Gewebeprobe wurden in Ornithincarbonyltransferase-Verbindung (OCT) (Miles Inc.) eingebettet und in Flüssigstickstoff tiefgefroren. 5 µm dicke Gefrierschnitte wurden dann mit alkalischer Phosphatase nach der Indoxyltetrazolium-Methode angefärbt, um kapilläre Endothelzellen nachzuweisen, gefolgt von einer Eosin-Gegenfärbung.¹⁰³ Zur Bestimmung der Kapillardichte (mittlere Anzahl von Kapillaren/mm²) wurden die Kapillaren dann unter einem 20x Objektiv identifiziert. Insgesamt wurden 20 verschiedene, zufällige Gesichtsfelder von den zwei Muskeln ausgewählt und die Zahl der Kapillaren gezählt. Um sicherzugehen, dass die Analyse der Kapillardichte nicht durch eine Muskelatrophie überschätzt werden könnte, wurde die Kapillardichte zusätzlich in Abhängigkeit von der Zahl der Muskelfasern in dem Gesichtsfeld ermittelt (Verhältnis aus Kapillaren/Myozyten).

Statistische Auswertungen

Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung vom Mittelwert (standard error of the mean (SEM)) angegeben. Statistische Signifikanz wurde mittels dem unpaarigen Students t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte und mittels Varianzanalyse (ANOVA) für den Vergleich mehrerer Mittelwerte ermittelt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.3. Ergebnisse

Einfluß von rhVEGF-C auf die endotheliale Zellproliferation

Die Effekte von rhVEGF-C auf die endotheliale Proliferation sind in **Abb. 2.3** gezeigt. Bei einer Konzentration von 10 ng/ml war die mitogene Aktivität von VEGF-C Protein in HUVECs 35% von der mit VEGF-A erzielten. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (p<0.005) (**Abb. 2.3A**). Der mitogene Effekt von VEGF-C war stärker ausgeprägt nach Anwendung in HMECs (**Abb. 2.3B**): mit 10 ng/ml war die mitogene Antwort von VEGF-C 72% im Vergleich zu der mit VEGF-A (p<0.01).

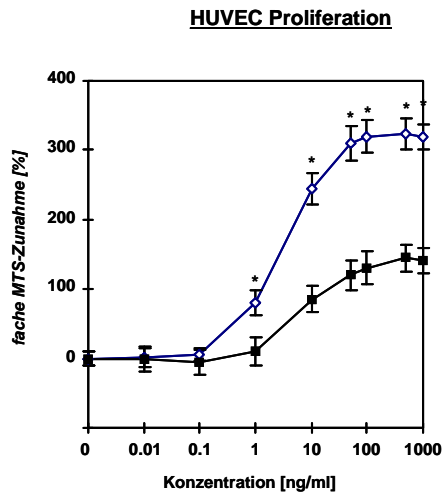
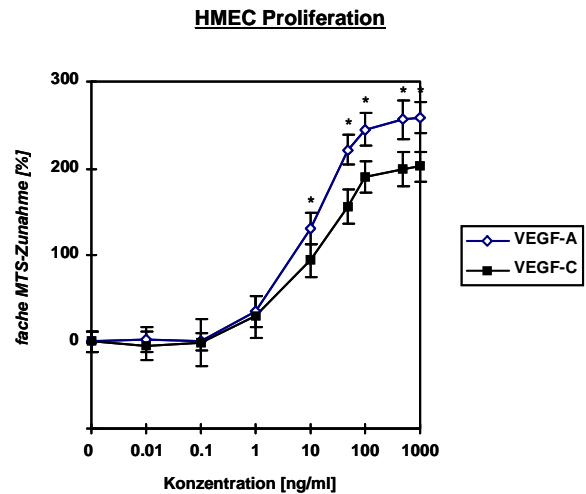
(A)**(B)**

Abb. 2.3. Proliferative Antwort von (A) HUVECs oder (B) HMECs auf rekombinantes humanes VEGF-A/VEGF-1 oder VEGF-C/VEGF-2 Protein. 5×10^3 Zellen wurden pro well ausgesät und die Zunahme der Zellzahl wurde 48 Stunden nach Zugabe der Wachstumsfaktoren mit dem MTS-kolorimetrischen Assay ermittelt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM mehrerer paralleler Messungen. *: $p < 0.05$ VEGF-A/VEGF-1 vs. VEGF-C/VEGF-2 Protein.

Einfluß von rhVEGF-C auf die endotheliale Zellmigration

Sowohl VEGF-A als auch VEGF-C Protein zeigten einen ausgeprägten chemotaktischen Effekt auf Endothelzellen. Die Dosis-Wirkungs-Kurven zeigten eine typische Gauss'sche Verteilung, beginnend mit einem Effekt auf die Zellmigration, welcher nachweisbar war bei einer minimalen Konzentration von 0.1 ng/ml (**Abb. 2.4**). Für HUVECs war bei einer Konzentration von 10 ng/ml die chemotaktische Antwort auf VEGF-C 83% von der, welche mit VEGF-A nachweisbar war ($p < 0.05$) (**Abb. 2.4A**); für HMECs war die chemotaktische Antwort auf VEGF-A und VEGF-C nicht zu unterscheiden (**Abb. 2.4B**).

NO-Freisetzung aus kultivierten HUVECs durch VEGF-C

Behandlung von HUVECs mit VEGF-C (1, 10 und 100 ng/ml) verursachte einen konzentrations-abhängigen Anstieg der NO-Synthese (**Abb. 2.5**). Maximale NO-Synthese wurde zwischen 3 und 6 Minuten nach Zugabe von VEGF-C beobachtet. Behandlung von HUVECs mit VEGF-A (100 ng/ml) unter den gleichen experimentellen Bedingungen induzierte NO-Synthese wie bereits früher berichtet.¹⁰⁴ S-Nitrosoacetylpenicillamin (SNAP) diente als Positivkontrolle, und 0.1 mmol/l resultierte in einem signifikanten Anstieg der NO-Konzentration in dem Puffermedium. Im direkten Vergleich war der maximale gemessene NO-Gehalt als Antwort auf VEGF-C 92.7% und auf VEGF-A in gleicher Dosis 80.9% in Bezug auf 0.1 mM SNAP (100%).

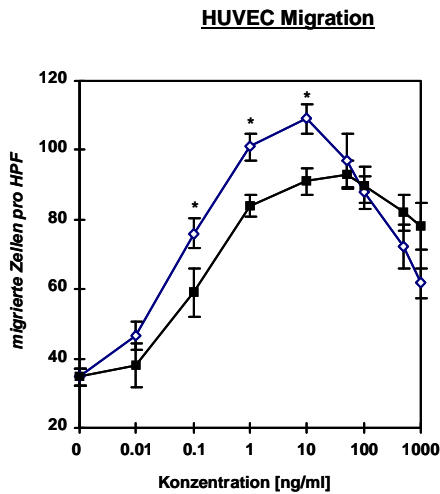
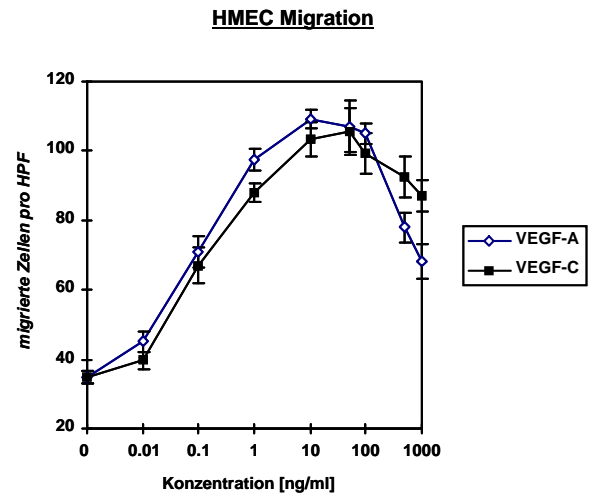
(A)**(B)**

Abb. 2.4. Chemotaktische Antwort von (A) HUVECs oder (B) HMECs auf rekombinantes humanes VEGF-A/VEGF-1 oder VEGF-C/VEGF-2 Protein. 2.5×10^4 Zellen wurden in die oberen wells einer 48-well Mikrochemotaxis Boydenkammer eingebracht und für 4 Stunden bei 37°C in M199-Medium mit 1% FBS inkubiert. Die unteren wells enthielten verschiedene Konzentrationen an Wachstumsfaktor. Die durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von $8 \mu\text{m}$ migrierten Zellen wurden durch Färben der Zellen an der Unterseite der Membran mit Giemsa-Lösung und Zählen von drei Gesichtsfeldern unter dem Mikroskop (100x) quantifiziert. Jede Bedingung wurde in Vierfach-Ansätzen durchgeführt. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM mehrerer paralleler Messungen. *: $p < 0.05$ VEGF-A/VEGF-1 vs. VEGF-C/VEGF-2 Protein.

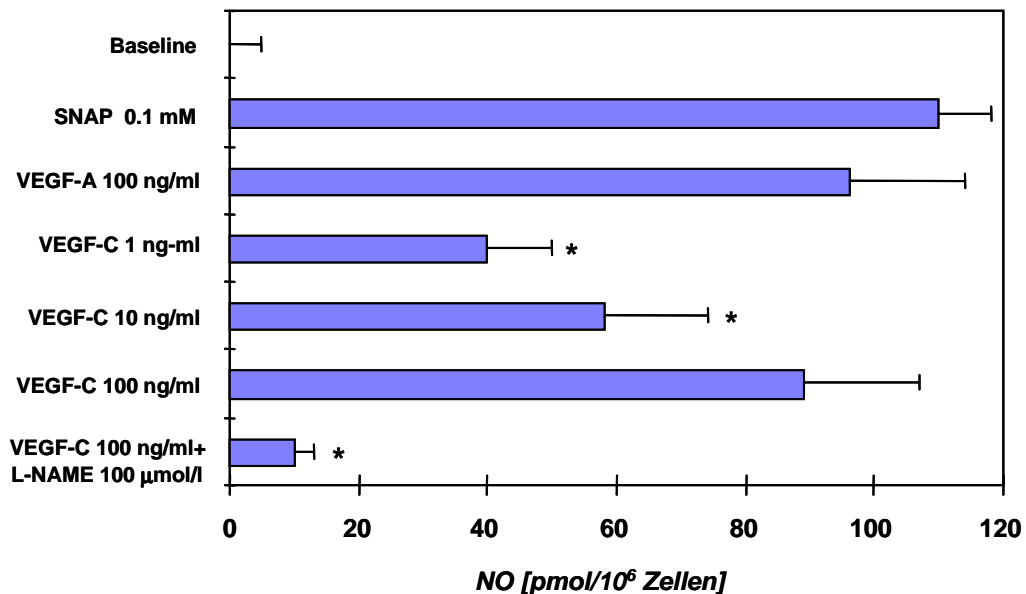


Abb. 2.5. Induktion einer Freisetzung von Stickoxid (NO) aus HUVECs durch VEGF-C/VEGF-2, gemessen mit einer NO-spezifischen, an einem NO-Meter angeschlossenen polarographischen Elektrode. HUVECs in 6-well Platten wurden mit Krebs-Henseleit-Lösung vor Zugabe der Reagenzien äquilibriert. S-Nitrosoacetylpenicillamin (SNAP, 0.1 mM) und VEGF-A/VEGF-1 (100 ng/ml) dienten als Positivkontrollen. Die Balken zeigen Mittelwert \pm SEM von 4-6 Messungen in jeder Gruppe.

Einfluß von VEGF-C auf die Gefäßpermeabilität

Wiederholte intradermale Injektionen der Kontrollvehikel-Kochsalzlösung (0.1 ml) erhöhte nicht die Gefäßpermeabilität. Intradermale Injektion von sowohl VEGF-A als auch VEGF-C (16, 32, 64, 128 ng) steigerte signifikant die Gefäßpermeabilität in Dosis-abhängiger Weise (**Abb. 2.6A**). Die Entwicklung einer positiven (blauen) Antwort begann 155 ± 6 Sekunden ($n=3$) nach der intradermalen Injektion. Wiederholte Experimente ($n=3$) zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Induktion eines Anstiegs der Gefäßpermeabilität zwischen VEGF-A und VEGF-C. Als Positivkontrollen wurden Bradykinin und Histamin (100 nM) benutzt, welche beide an den Injektionsstellen die Gefäßpermeabilität erhöhten (nicht dargestellt).

Um die Rolle des NO in der VEGF-C vermittelten erhöhten Gefäßpermeabilität zu untersuchen wurde der NO-Synthetaseinhibitor L-NAME (20 mg/kg) systemisch injiziert, und zwar 20 Minuten vor der intradermalen Applikation von VEGF-A und VEGF-C. L-NAME schwächte die durch sowohl VEGF-A als auch VEGF-C induzierte vermehrte Gefäßdurchlässigkeit deutlich ab (**Abb. 2.6B**). Das inaktive Stereoisomer D-NAME (20 mg/kg), welches die endotheliale NO-Synthese nicht hemmt, konnte dagegen den mit sowohl VEGF-1 als auch VEGF-C beobachteten Anstieg der Gefäßpermeabilität nicht verhindern (nicht dargestellt). Demzufolge ist die erhöhte Gefäßpermeabilität sowohl für VEGF-A als auch für VEGF-C abhängig von lokaler NO-Produktion.

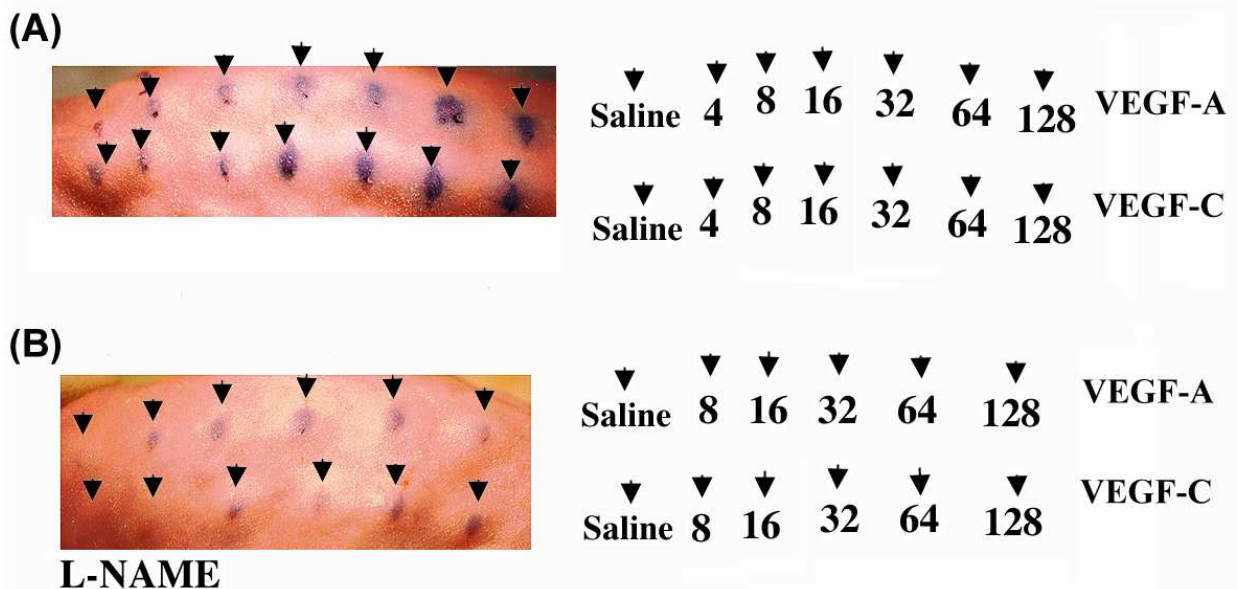


Abb. 2.6. Einfluß von VEGF-A und VEGF-C auf die Gefäßpermeabilität (Miles-Assay). **(A)** Sowohl VEGF-A als auch VEGF-C erhöhten die Gefäßpermeabilität in Dosis-abhängiger Weise. Die Dosen sind durch die Pfeile angezeigt. Ein kleines Gebiet traumatischer Blaufärbung war nach Injektion von Kochsalz-Kontrolle zu beobachten. **(B)** Einfluß des NO Synthetaseinhibitors L-NAME (20 mg/kg) auf VEGF-A und VEGF-C induzierter erhöhter Gefäßpermeabilität. Systemische Injektion von L-NAME 20 Minuten vor Administration von Evansblau-Farbstofflösung schwächte die VEGF-A und VEGF-C medierte erhöhte Gefäßdurchlässigkeit deutlich ab. Die Photographie ist repräsentativ für jeweils 3 durchgeführte Experimente.

VEGF-C Rezeptorexpression

Um mögliche Zielgefäße für eine Bioaktivität von VEGF-C in Erwachsenen zu identifizieren untersuchten wir die VEGFR-3 und VEGFR-2 mRNA-Expression in explantierten Segmenten menschlicher A. mammaria interna und Vena saphena mittels Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR). Für diese Experimente wurden menschliche Gewebeproben benutzt, da die korrespondierenden Nukleotidsequenzen für Kaninchenspezies bisher nicht publiziert sind. **Abb. 2.7** zeigt, dass die VEGF-C Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3, ebenso wie VEGFR-1 sowohl im venösen als auch arteriellen Gewebe exprimiert sind. Als Positivkontrolle wurden HUVECs benutzt, da für diese Zellen eine Koexpression von VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 bereits beschrieben worden war.⁹⁷ RNA aus humanen Fibroblasten, für welche eine PCR-Amplifikation nie positive Banden für diese Rezeptoren ergab, diente als Negativkontrolle.

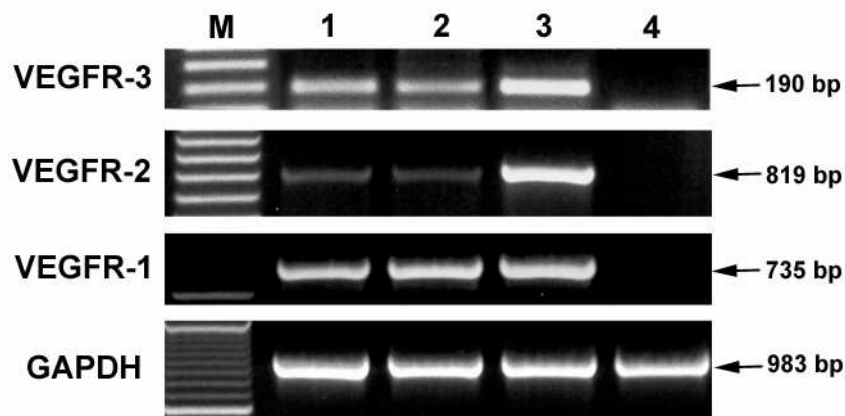


Abb. 2.7. Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) zeigt die VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3 mRNA-Expression in explantierten Segmenten von normaler menschlicher V. saphena vein (Spur 1) und A. mammaria interna (Spur 2). HUVECs (Spur 3), welche bekanntermaßen alle drei Rezeptoren koexprimieren, dienten als Positivkontrolle. M: DNA Größenmarker. Die Größen der PCR-Produkte sind rechts angegeben.

Einfluß von pcVEGF-C und rhVEGF-C auf Blutdruck und Dopplerfluß

Der Unterschenkel-Blutdruckquotient war in allen Gruppen am Tag 0 vergleichbar (**Abb. 2.8A**). Am Tag 30 hatte der Blutdruckquotient in den mit pcVEGF-C und VEGF-C Protein-behandelten Gruppen auf 0.83 ± 0.03 bzw. 0.76 ± 0.04 zugenommen. In beiden Fällen überschritt dieser Wert den in den Kontrollgruppen gemessenen signifikant (0.59 ± 0.04 bzw. 0.58 ± 0.03 ; $p=0.002$ bzw. 0.009). Der Blutdruckquotient in den Kaninchen, welche Gentransfer mit phVEGF-C erhalten hatten, unterschied sich nicht signifikant von dem, der in den mit rekombinanten VEGF-C Protein behandelten Kaninchen ermittelt wurde.

Der Blutfluß in der A. iliaca interna der ischämischen Extremität wurde an den Tagen 0 und 30 gemessen. Am Tag 0 bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich dem Ruhe- oder

dem maximalen Blutfluß (nicht dargestellt). Für pcVEGF-C Plasmid war der maximale iliakale Blutfluß nach Nitroprussid-Infusion am Tag 30 deutlich angestiegen im Vergleich zu den pGSVLacZ Kontrollen (53.7 ± 5.9 vs 31.6 ± 1.2 ml/min, $p=0.0009$). Am Tag 30 war der maximale Fluß auch in der VEGF-C Protein-behandelten Gruppe (39.1 ± 6.7 ml/min) signifikant höher als der in der RSA Kontrollgruppe (26.1 ± 5.4 ml/min, $p=0.03$). Ein Vergleich zwischen der Plasmid- und der Protein-behandlungsgruppe ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0.17$).

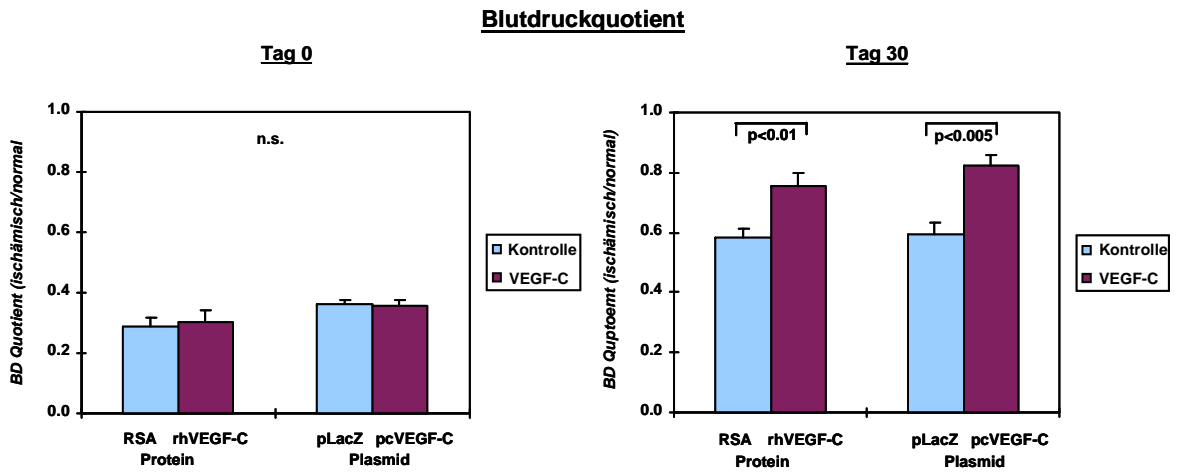
Die iliakale Flußreserve, das Verhältnis zwischen dem Blutfluß in Ruhe und nach maximaler pharmakologischer Stimulation, betrug 2.90 ± 0.31 bzw. 2.65 ± 0.14 für die pcVEGF-C bzw. rhVEGF-C behandelten Kaninchen. In beiden Fällen bedeutet dies einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (pGSVLacZ= 2.10 ± 0.17 bzw. RSA= 2.04 ± 0.23 ; $p=0.04$ bzw. $p=0.04$) (**Abb. 2.8C**).

Einfluß von pcVEGF-C und rhVEGF-C auf die anatomisch nachweisbare Kollateralentwicklung

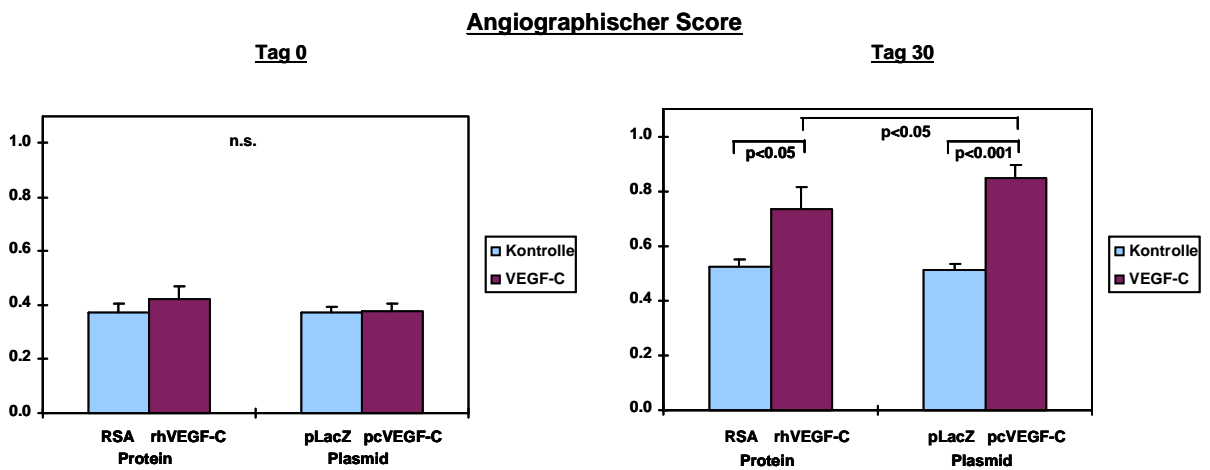
Die quantitative Analyse der Kollateralgefäßentwicklung in der medialen Hüftregion der ischämischen Extremität ist in **Abb. 2.8B** zusammengefaßt. Vor Behandlung (Tag 0) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf den angiographischen Score. Am Tag 30 übertraf der angiographische Score sowohl in der VEGF-C Gentransfergruppe (0.85 ± 0.05) als auch in der Proteingruppe (0.74 ± 0.08) dem in den Kontrollgruppen gemessenen (pGSVLacZ= 0.51 ± 0.02 ; $p=0.00003$ bzw. RSA= 0.53 ± 0.03 , $p=0.023$). Der angiographische Score in der pcVEGF-C Gentransfergruppe war signifikant höher als der in der proteinbehandelten Gruppe gemessene ($p=0.02$). **Abb. 2.9** zeigt repräsentative Angiogramme der A. iliaca interna, welche am Tag 30 von Kontrolltieren, VEGF-C Plasmid-, und rekombinanten VEGF-C Protein-behandelten Tieren aufgenommen wurden. In beiden Behandlungsgruppen war das Ausmaß der Kollateralgefäßentwicklung im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollgruppen stärker ausgeprägt.

Gewebeproben aus der medialen Hüftmuskulatur von ischämischen und nicht-ischämischen unteren Extremitäten wurden lichtmikroskopisch am Tag 30 untersucht. Die histologische Evaluation nach Färbung mit alkalischer Phosphatase ergab, dass die Kapillardichte in der mit pcVEGF-C-transfizierten Gruppe ($252 \pm 12/\text{mm}^2$) ebenso wie in der mit VEGF-C Protein behandelten Gruppe ($229 \pm 20/\text{mm}^2$) signifikant ausgeprägter war als diejenige, welche für die korrespondierenden Kontrollgruppen beobachtet worden waren (pGSVLacZ= $183 \pm 10/\text{mm}^2$, $p=0.001$; bzw. RSA= $164 \pm 20/\text{mm}^2$, $p=0.043$) (**Abb. 2.8D**). Die Analyse des Verhältnisses aus Kapillaren zu Muskelfasern erbrachte vergleichbare Ergebnisse (nicht dargestellt). Die Analyse der Kapillardichte und des Quotienten Kapillare/Muskelfaser in der medialen Hüftmuskulatur der nicht-ischämischen kontralateralen Extremität zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (nicht dargestellt). Repräsentative Beispiele für histologische, mit alkalischer Phosphatase gefärbte Schnitte in den verschiedenen experimentellen Gruppen sind in **Abb. 2.10** dargestellt.

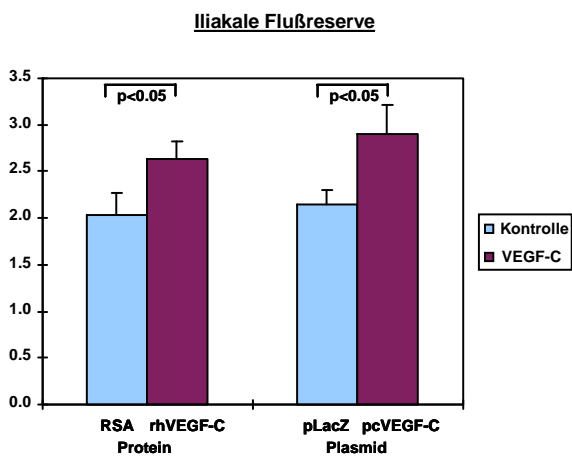
(A)



(B)



(C)



(D)

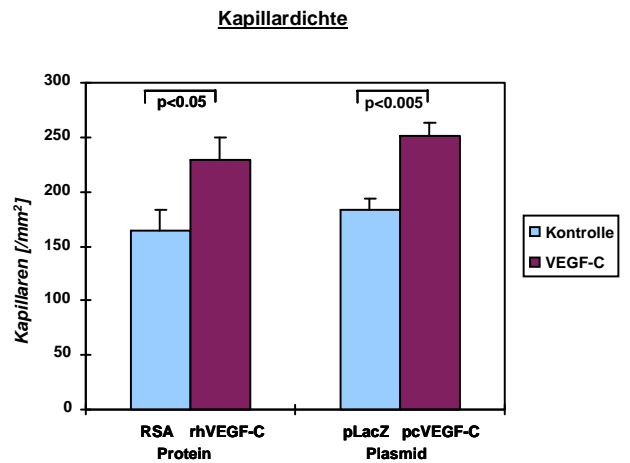


Abb. 2.8. (vorige Seite) **(A)** Quotient der unteren Extremitäten-Perfusionsdrücke an Tag 0 (unmittelbar vor Behandlung) und Tag 30. Der Blutdruckquotient für jedes Kaninchen wurde definiert als das Verhältnis des systolischen Drucks der ischämischen Extremität zum systolischen Druck der normalen Extremität (jeweils n=8). Am Tag 0 wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet. Am Tag 30 war der Blutdruckquotient signifikant größer in Kaninchen, welche rhVEGF-C/VEGF-2 Protein erhalten hatten im Vergleich zu RSA-Kontrolle, und in Kaninchen, welche pcVEGF-C/VEGF-2 Plasmid erhalten hatten im Vergleich zu pGSVLacZ-Kontrollen. **(B)** Angiographischer Score, ermittelt aus der quantitativen Analyse angiographisch nachweisbarer Kollateralgefäße in der medialen Hüftregion der ischämischen Extremität, an den Tagen 0 und 30. Am Tag 0 war kein Unterschied zwischen den Gruppen. Am Tag 30 ist die Zahl der Gefäße signifikant größer in den VEGF-C/VEGF-2 Protein- und Plasmid-behandelten Gruppen verglichen mit den Kontrollen. Anwendung von Plasmid-DNA schien einen ausgeprägteren Effekt zu verursachen als der Gebrauch von rekombinanten Protein (jeweils n=8). **(C)** Iliakale Blutflußreserve (Verhältnis aus Blutfluß in Ruhe und maximalem, durch Nitroprussid-induziertem Fluß) gemessen in der A. iliaca interna der ischämischen Extremität am Tag 30 mittels eines intraarteriellen Dopplerdrahtes. Sowohl VEGF-C/VEGF-2 Protein als auch Plasmid führte zu einer signifikanten Verbesserung der iliakalen Flußreserve (jeweils n=8). **(D)** Kapillardichte, gemessen am Tag 30 in histologischen Schnitten, welche aus medialen Hüftmuskeln der ischämischen und der nicht-ischämischen kontralateralen Extremität gewonnen worden waren. In den nicht-ischämischen Extremitäten war die Kapillardichte zwischen den Gruppen vergleichbar (nicht abgebildet). In den ischämischen Extremitäten hat die Kapillardichte durch VEGF-C/VEGF-2 Protein und Plasmid (jeweils n=8) signifikant zugenommen. n.s.=nicht signifikant; RSA=Kaninchen (rabbit) Serum-Albumin.

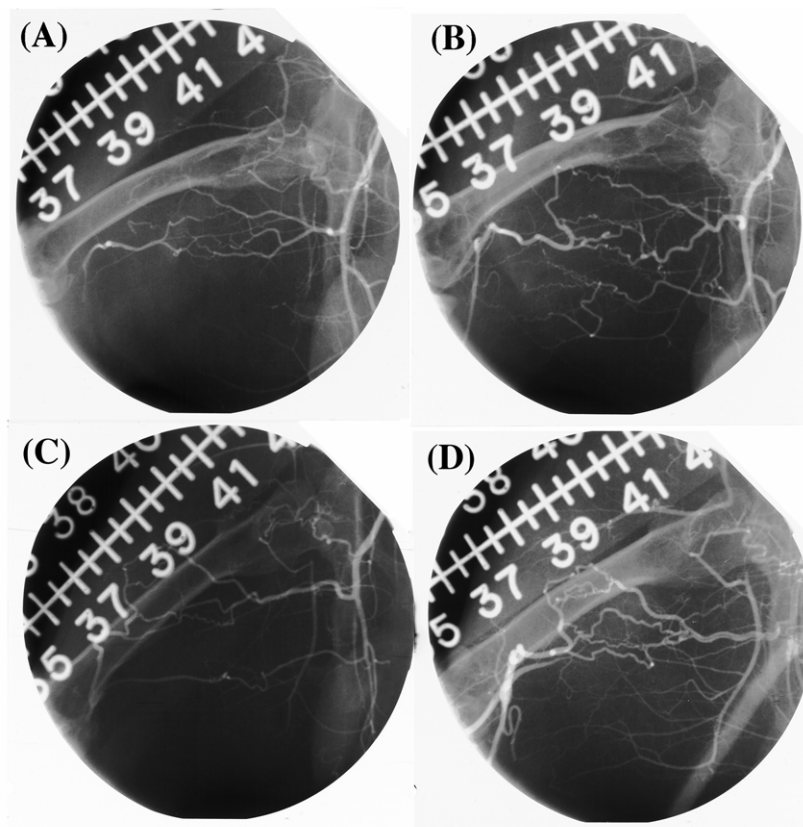


Abb. 2.9. Selektive Angiogramme der A. iliaca interna an Tag 30 von Tieren, welche **(A)** RSA-Kontrolle, **(B)** rhVEGF-C/VEGF-2 Protein, **(C)** pGSVLacZ Kontrollplasmid und **(D)** pcVEGF-C Plasmid DNA erhalten haben. Im Gegensatz zu den Kontrollen weisen die Behandlungsgruppen eine Zunahme an angiographisch sichtbaren Kollateralgefäßen auf.

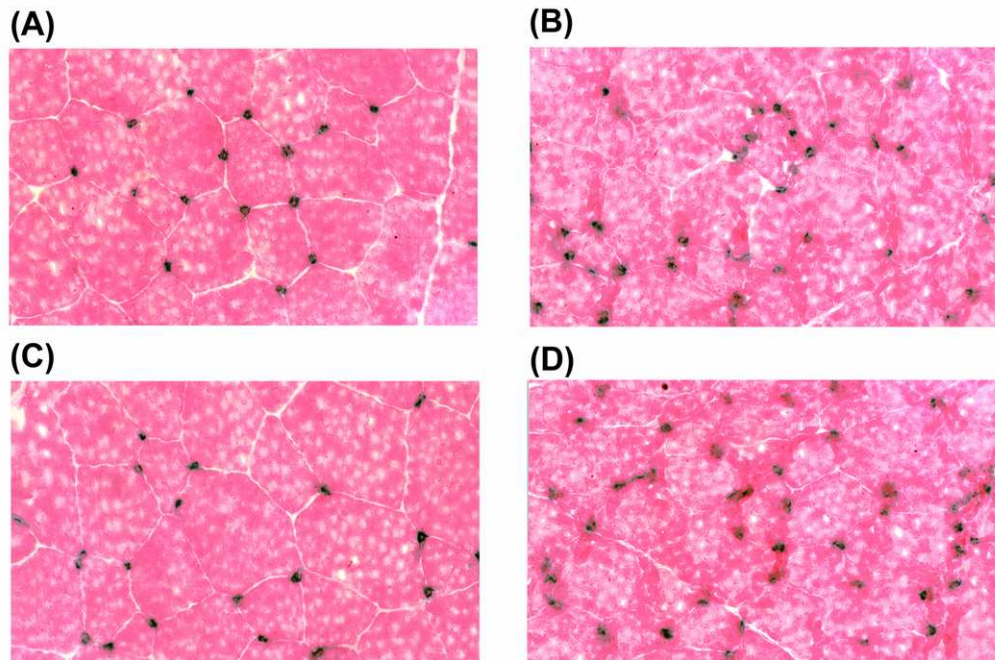


Abb. 2.10. Histologische Schnitte, welche am Tag 30 aus ischämischer Extremitätenmuskulatur (M. adduktor) entnommen und mit alkalischer Phosphatase (gegengefärbt mit Eosin) gefärbt wurden. (A) RSA-Kontrolle, (B) rhVEGF-C/VEGF-2 Protein-, (C) pGSVLacZ Kontroll-Plasmid- und (D) pcVEGF-C/VEGF-2 Plasmid-behandeltes Kaninchen. Behandlung mit VEGF-C als rekombinantes Protein oder Plasmid bewirkte eine Zunahme der Kapillardichte. Die dunkelblauen Punkte markieren Kapillaren.

2.4. Diskussion

Die kürzliche Identifizierung und Reinigung von VEGF-C/VEGF-2³⁰ und VEGF-B/VEGF-3,³¹ zusätzlich zu VEGF-A/VEGF-1 und PlGF, hat die Zahl der bekannten Mitglieder der VEGF-Familie auf vier erhöht und demzufolge eine weitere Stufe an Komplexität zu den gegenwärtigen Konzepten hinsichtlich Angiogenese und vaskulärem Remodeling hinzugefügt. Alle vier Mitglieder werden von verschiedenen Genen kodiert, welche auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, aber sie teilen eine bemerkenswerte Homologie. Im Falle von VEGF-C zum Beispiel ist 32% der Aminosäuresequenz identisch zu VEGF₁₂₁ und 27% zu PlGF₁₃₁.

Die Verschiedenheit in der Bioaktivität, wie sie beispielsweise für VEGF-A und PlGF gezeigt wurde,^{73, 75} ist sehr wahrscheinlich auf verschiedene Affinitäten der vier VEGF-Mitglieder zu den drei bekannten endothelspezifischen fms-ähnlichen Tyrosinkinase VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3 zurückzuführen. VEGF-C wurde isoliert als ein Ligand und spezifischer Aktivator von VEGFR-3,^{30, 79} und es wurde darüberhinaus gezeigt, dass es die Autophosphorylierung von VEGFR-2 stimuliert.³⁰ Zusätzlich wurde die mRNA Expression von VEGFR-3 und VEGFR-2 in kultivierten HUVECs,⁹⁷ HMECs und Endothelzellen aus der V. femoralis¹⁰⁵ nachgewiesen. Daher begannen wir unsere Untersuchungen der Bioaktivität von VEGF-C, indem wir Proliferations- und Migrationsassays mit

verschiedenen Endothelzell-Typen *in vitro* unternahmen. Wir beobachteten eindeutige mitogene und chemotaktische Reaktionen der Endothelzellen auf VEGF-C, was vorausgegangene Berichte bestätigt.^{30, 79} Obwohl der Einfluß auf die Zellmigration für VEGF-A und VEGF-C in vergleichbarer Größenordnung lag, war die proliferative Antwort auf VEGF-C geringer als die für VEGF-A erhaltene, insbesondere im Fall der HUVECs. Trotz dieser Tatsache war die beobachtete *in vivo*-Angiogenese kräftig ausgeprägt und nicht zu unterscheiden von der Reaktion, welche im gleichen Tiermodell mit rekombinanten VEGF-A Protein⁶¹ oder Plasmid-DNA¹⁰⁶ in vorausgegangenen Experimenten beobachtet worden war.

Die Tatsache, dass die *in vivo*-Ergebnisse dieser Experimente die *in vitro*-Analyse der Zellmigration im Gegensatz zu der Zellproliferation besser widerspiegeln, ist konsistent mit Beobachtungen, welche sich mit den relativen Beiträgen dieser beiden Aktivitäten zur Angiogenese beschäftigen. In einem klassischen Experiment, welches in der Cornea der Ratte durchgeführt worden war, zeigten Sholley und Mitarbeiter,⁴⁶ dass Gefäßaussprossungen induziert und für mehr als 2 Tage aufrechterhalten werden konnten, obwohl zuvor eine Bestrahlungsbehandlung durchgeführt worden war, welche ausreichte, um DNA-Synthese und somit Proliferation zu unterdrücken. Die angiogenetische Aktivität war in diesem Modell dahingehend interpretiert, dass sie den dominierenden Einfluß der Endothelzell-Migration reflektierte. Alternativ ist es möglich, dass die gewissermaßen eindimensionalen *in vitro*-Assays, die üblicherweise benutzt werden, um Endothelzell-Proliferation und -migration zu charakterisieren, nicht notwendigermaßen das Potential einzelner Faktoren widerspiegeln oder vorhersagen, *in vivo* angiogenetisch wirksam zu sein.

Stickoxid (NO) wird von Endothelzellen und arteriellen Segmenten in Zell- und Organkultur freigesetzt^{101, 104} und es wurde im Corneaassay mit Kaninchen gezeigt, dass NO VEGF-induzierte Neovaskularisierung mediiert.¹⁰⁷ Vor kurzem haben Experimente, welche in Mäusen durchgeführt wurde, denen die endotheliale NO-Synthetase genetisch fehlt, aufgezeigt, dass endogenes NO essentiell ist für die endogene Angiogenese, welche sich als Antwort auf eine Extremitätenischämie entwickelt,¹⁰⁸ und dass das Fehlen von endogenem NO ein günstiges Ansprechen auf rekombinantes VEGF₁₆₅ ausschließt.¹⁰⁸ Unser Ergebnis, dass VEGF-C die Freisetzung von NO *in vitro* in vergleichbarem Ausmaß wie VEGF-A fördert, ist im Einklang mit dem Nachweis, dass VEGF-C Angiogenese *in vitro* fördert.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis erhöhte VEGF-C die Gefäßpermeabilität im Miles-Assay; dieser Effekt war fast vollständig hemmbar durch vorausgehende Gabe eines NO-Synthetaseinhibitors. Ähnliche Ergebnisse sind zuvor für VEGF-A publiziert worden.¹⁰⁹ Wenn man das Ausmaß in Betracht zieht, mit welchem Angiogenese und Gefäßpermeabilität offenbar verbunden sind,⁴² dann liefert dieses Ergebnis ein zusätzliches Argument für eine Beteiligung von NO in der Vermittlung VEGF- (A und C) medierter Angiogenese. Soweit derzeit bekannt dürfte VEGF-C aufgrund der mit

dem Miles-Assay erhaltenen Ergebnisse der einzige zusätzliche Wachstumsfaktor neben VEGF-A sein, welcher die Gefäßpermeabilität erhöht.

In der Folge der initialen Beschreibungen von VEGF-C und VEGF-B¹¹⁰ stellten sich verschiedene Fragen hinsichtlich der Bioaktivität dieser beiden Genprodukte. *In vitro* wurde gefunden, dass beide Faktoren mitogene Aktivität aufwiesen,^{30, 31, 79} und VEGF-C stimulierte das Auswachsen von Rinder-Endothelzellen in einem Kollagengel-Assay.³⁰ Überexpression von VEGF-C in der Haut von transgenen Mäusen führte jedoch nach Beobachtungen von Jeltsch und Mitarbeitern⁸² zu einer Hyperplasie von lymphatischen Gefäßen. Weil keine Hinweise auf Angiogenese beobachtet wurden, wurden diese Ergebnisse dahingehend interpretiert, dass VEGF-C nicht Angiogenese fördert, sondern ein spezifischer Ligand für lymphatisches Endothel ist.⁸² Wie die Autoren einräumen war dieses Ergebnis „unerwartet spezifisch“, weil gezeigt worden war, dass VEGF-C den VEGFR-2 transduziert, welcher als der hauptverantwortliche Rezeptor für eine VEGF-A induzierte Angiogenese betrachtet wird.

Unsere Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der Hypothese von Jeltsch und Mitarbeitern.⁸² Mit einem zuvor etablierten und validierten Kaninchen-Modell mit ischämischer unterer Extremität^{98, 99} ließ sich eindeutig zeigen, dass VEGF-C *in vivo* Angiogenese fördert. Es war zuvor gezeigt worden, dass der anatomische und physiologische Nachweis verstärkter Angiogenese bzw. Arteriogenese, welche in diesem Tiermodell beobachtet wird, zurückzuführen ist auf eine deutlich erhöhte proliferative Aktivität von Endothelzellen als Antwort auf ein endotheliales Mitogen, was eine vermehrte Entwicklung vaskulärer Aussprossung nahelegt. Präklinische Untersuchungen mit diesem Tiermodell, bei welchen nackte DNA kodierend für VEGF-A benutzt wurde, sind mittlerweile in Patienten durchgeführt worden.^{64, 111} Vergleichbar zu den Ergebnisse, welche bisher für VEGF-A berichtet wurden,^{61, 106} verbesserte VEGF-C – verabreicht als nackte DNA oder als rekombinantes Protein – die Flußreserve sowie den Perfusionsdruck der ischämischen Extremität und verstärkte die angiographisch nachweisbaren Kollateralgefäße sowie die Kapillardichte. In den Experimenten, in denen VEGF-A als Plasmid-DNA transferiert wurde, konnte mittels Reverser Transkriptions-PCR mit nachfolgender Southern Blot-Analyse eine Expression des übertragenen Gens bis zu 21 Tage nach der Transfektion in der arteriellen Gefäßwand nachgewiesen werden.¹¹² Eine derartige anhaltende Expression des eingebrachten Gens stellt eine mögliche Erklärung für den deutlicheren Effekt auf physiologische und anatomische Parameter nach Gentransfer *versus* einmaliger Bolus-Verabreichung rekombinanten VEGF-C Proteins dar. Alternativ könnte VEGF-C, nachdem es transkribiert und translatiert wurde, intrazelluläre Heterodimere mit anderen VEGF-Familienmitgliedern bilden, wie es für VEGF-A⁷⁴⁻⁷⁶ und VEGF-C³¹ schon gezeigt worden war, und damit seine Effekte verstärken, was nur für einen Faktor alleine nicht möglich wäre.

Es gibt mindestens zwei mögliche Erklärungen für die unterschiedlichen Resultate, die einerseits in den transgenen Mäusen, andererseits jetzt in dem Kaninchenmodell beobachtet wurden.

Erstens ist die physiologische Funktion eines jeden Liganden abhängig von der zeitlichen und räumlichen Expression seines spezifischen Rezeptors. Es bleibt noch herauszufinden, welche der beiden Rezeptoren, VEGFR-2 oder VEGFR-3, oder beide, die Effekte von VEGF-C transduziert, wenn man bedenkt, dass eine Autophosphorylierung beider Rezeptoren nach Stimulation mit VEGF-C gezeigt worden war,^{30, 79} und wir konnten nun zeigen, dass beide postnatal in arteriellen und venösen Gefäßabschnitten exprimiert sind. Ähnliche Ergebnisse sind in vorangegangenen Untersuchungen in kultivierten HMECs, HUVECs und Endothelzellen der V. femoralis beobachtet worden.^{97, 105} Selbst wenn die Funktion des VEGFR-3 in Erwachsenen begrenzt ist auf die Aufrechterhaltung von lymphatischen Gefäßen, wie es vor kurzem für die embryonale Entwicklung gezeigt wurde,^{82, 113} könnte die postnatale, VEGF-C induzierte Angiogenese ausschließlich durch den VEGFR-2 vermittelt werden.⁸² Zusätzlich könnte die mögliche Bildung von VEGFR-2/VEGFR-3 Heterodimeren zu mehr zelltyp- oder gewebsspezifischen Effekten führen.⁸²

Darüberhinaus haben vorausgegangene Untersuchungen gezeigt, dass Ischämie zu einer lokalen Hochregulierung des VEGFR-2 führt,^{114, 115} also dem hauptsächlichen Rezeptor, welcher VEGF-A induzierte Angiogenese vermittelt. In der Abwesenheit einer solchen Ischämie-bedingten Hochregulation wurde bisher nie Angiogenese als Antwort auf eine transiente Überexpression von VEGF-A beobachtet.^{61, 116} Konsequenterweise wäre es in der Abwesenheit einer adäquaten Rezeptor-Hochregulation verständlich, dass auch eine transiente Überexpression von VEGF in postnatalen Tiermodellen keine Angiogenese auslöst.

Eine zweite mögliche Erklärung bezieht sich auf das Konstrukt, welches Jeltsch und Mitarbeiter⁸² benutzt haben, um VEGF-C transgene Mäuse zu generieren. Da es den menschlichen Keratin-14 (K14) Promoter benutzt, ist die Genexpression auf die Basalzellschicht von Plattenepithel beschränkt. Es ist somit nicht unbedingt zulässig, die dort erzielten Ergebnisse auf die Genexpression in anderen Geweben oder Organen zu extrapolieren.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass trotz Hinweise auf Spezifität für lymphatisches Endothel in einem embryonalen Entwicklungsmodell VEGF-C Angiogenese und Blutfluß zu ischämischen Geweben verbessern kann, wenn es in erwachsenen Tieren in einem Milieu ischämischer Gewebe zeitlich begrenzt überexprimiert wird. Diese Ergebnisse unterstreichen das Prinzip, dass konstitutive Überexpression eines gegebenen Proteins während der Embryogenese nicht notwendigerweise in der Wirkung äquivalent ist zu einer transienten Überexpression des gleichen Proteins im postnatalen Organismus; eine postnatale Rezeptormodulation, die mit spezifischen pathologischen Prozessen assoziiert ist, in diesem Fall mit Gewebsischämie, könnte teilweise die verschiedenen Ergebnisse erklären, die im embryonalen *versus* erwachsenen Organismus beobachtet wurden. Somit könnte VEGF-C nützlich sein als ein primärer oder zumindest begleitender Wirkstoff zur Förderung von Angiogenese bei ischämischen Erkrankungen.

2.5. Zusammenfassung

Vor kurzem wurde Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C oder VEGF-2) als spezifischer Ligand für die endothelspezifische Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-2 und VEGFR-3 beschrieben. *In vivo* Daten, die auf eine konstitutive Überexpression in transgenen Mäusen beschränkt sind, wurden dahingehend interpretiert, dass die wachstumsfördernden Eigenschaften von VEGF-C auf die lymphatischen Gefäße beschränkt sind. Die folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt um die Hypothese zu testen, dass eine konstitutive Expression von VEGF-C in adulten Tieren Angiogenese fördern kann. *In vitro* wies VEGF-C einen Dosis-abhängigen mitogenen und chemotaktischen Effekt auf Endothelzellen, insbesondere auf mikrovaskuläre endotheliale Zellen auf (72% bzw. 95% im Vergleich mit VEGF-A/VEGF-1). VEGF-C stimulierte Freisetzung von Stickoxid (NO) aus Endothelzellen und erhöhte die vaskuläre Permeabilität im Miles-Assay; dieser Effekt wurde abgeschwächt durch Vorbehandlung mit dem NO-Synthetase-Inhibitor N_ω-Nitro-L-Argininmethylester. Die Expression beider VEGFR-2 und VEGFR-3 Rezeptoren konnte in humanen Gefäßstücken der V. saphena magna und der A. mammaria interna gezeigt werden. Das Potential von VEGF-C, Angiogenese *in vivo* zu fördern, wurde dann in einem Kaninchenmodell mit chronischer Ischämie der unteren Extremität getestet. Zehn Tage nach Ligatur der A. iliaca externa wurde VEGF-C in Form von nackter Plasmid-DNA (pcVEGF-C; 500 µg) in Polymer-Beschichtung eines Angiopastie-Ballons oder als rekombinantes humanes Protein (rhVEGF-C; 500 µg) in direkter intra-arterieller Infusion (jeweils n=8) verabreicht. Physiologische und anatomische Messungen zeigten nach 30 Tagen Hinweise für therapeutische Angiogenese, und zwar sowohl für pcVEGF-C als auch für rhVEGF-C. Das Blutdruckverhältnis der unteren Extremitäten (ischämisch/normal) stieg nach pcVEGF-C auf 0.83 ± 0.03 versus 0.59 ± 0.04 ($p < 0.005$) in pGSVLacZ-Kontrollen und auf 0.76 ± 0.04 nach rhVEGF-C versus 0.58 ± 0.03 ($p < 0.01$) in Kontroll-Kaninchen, welche Kaninchen-Serumalbumin als Kontrolle erhalten hatten. Die aus Doppler-Messung abgeleitete iliakale Fluß-Reserve betrug 2.7 ± 0.1 versus 2.0 ± 0.2 ($p < 0.05$) für pcVEGF-C versus LacZ-Kontrollen und 2.9 ± 0.3 versus 2.1 ± 0.2 ($p < 0.05$) für rhVEGF-C versus Albumin-Kontrollen. Neovaskularität wurde durch *in vivo* Angiographie dokumentiert (angiographische Scores: 0.85 ± 0.05 versus 0.51 ± 0.02 ($p < 0.001$) für Plasmid-DNA und 0.74 ± 0.08 versus 0.53 ± 0.03 ($p < 0.05$) für Protein), und die Kapillardichte (pro mm²) *post mortem* histologisch bestimmt (252 ± 12 versus 183 ± 10 ($p < 0.005$) für Plasmid-DNA und 229 ± 20 versus 164 ± 20 ($p < 0.05$) für Protein). Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit transgenen Tieren fördert somit die konstitutive Expression von VEGF-C in erwachsenen Tieren Angiogenese in einer Situation mit chronischer Gewebsischämie. VEGF-C und seine Rezeptoren konstituieren somit einen offensichtlich redundanten Weg für postnatale Angiogenese und repräsentieren möglicherweise eine Alternative zu VEGF-A im Hinblick auf Strategien zur Anwendung therapeutischer Angiogenese bei Patienten mit chronischer Bein- und/oder myokardialer Ischämie.

3. Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1; aFGF) – Intramuskulärer Gentransfer stimuliert die Kollateralgefäßbildung (Arteriogenese) bei chronischer Ischämie

3.1. Einleitung

Fibroblast Growth Factor (FGF)-1 und 2 sind potente angiogenetisch wirksame Peptide mit mitogenen und chemotaktischen Effekten auf endotheliale und glatte Gefäßmuskelzellen.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Es ist gezeigt worden, dass Ischämie die Hochregulation von FGF-Rezeptor und Ligand stimulieren kann,^{23, 25} und eine Verabreichung von FGF-1 oder -2 verbesserte die Kollateralbildung und Myokardfunktion in verschiedenen Tiermodellen chronischer Ischämie.¹²⁰⁻¹²³ Die FGF-1 Liganden- und Rezeptor-Expression und Lokalisierung während der embryonalen Herzentwicklung korreliert mit kapillärer Angiogenese und Differenzierung von Koronargefäßen.^{124, 125} In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung erhöhte die transgene Überexpression von FGF-1 die Koronararteriendichte und -verzweigung.²⁶ Zusammengefaßt legen diese Untersuchungen nahe, dass FGF-1 klinische Bedeutsamkeit haben könnte in der Behandlung ischämischer Krankheiten.^{126, 127}

Wachstumsfaktoren zur therapeutischen Angiogenese können als rekombinante Proteine oder durch somatischen Gentransfer verabreicht werden.^{128, 129} Ein wesentlicher theoretischer Vorteil der Genterapie im Vergleich zur Gabe von Proteinen ist die Möglichkeit, dass eine einzelne lokale Verabreichung eines Gens einen lang-andauernden therapeutischen Effekt im Zielgewebe geben kann.¹³⁰ Zwei verschiedene Arten von DNA-Trägersystemen sind derzeit für die somatische Genterapie in Gebrauch: rekombinante Viren und bakterielle Plasmide („nackte DNA“). Obwohl Virus-basierte Vektoren sehr effiziente Trägersysteme sind, muß das potentielle Risiko einer viralen Genübertragung berücksichtigt werden. Vor kurzem wurde eine neue Generation von Plasmid-Vektoren entwickelt, indem die Plasmid-Anteile komplett neu überarbeitet wurden, was zu verbesserten Eigenschaften hinsichtlich der Biosicherheit führte, während eine hoch-effiziente Genexpression erreicht werden konnte.¹³¹ Diese sogenannten pCOR-Plasmide enthalten einen konditionalen Replikationsursprung (conditional origin of replication = pCOR), welcher eine Disseminierung während Produktion oder Therapie verhindert, tragen nur eine minimale Menge an bakteriellen Sequenzen und enthalten kein Antibiotika-Resistenzgen. Diese Veränderungen im Vektordesign könnten diesen DNA-Vektor ideal für die humane Genterapie machen.

Während die Effizienz des intravaskulären Gentransfers durch die vorhandenen Barrieren aufgrund atherosklerotischer, oft stark kalzifizierter Läsionen begrenzt ist,¹³² führt eine intramuskuläre Anwendung zu einer anhaltenden Expression des Transgens und ist bei peripherer arterieller Verschlußkrankheit und im ischämischen Myokard angewendet worden.^{111, 132-134} In der vorliegenden Studie wollten wir herausfinden, ob intramuskulärer Gentransfer nackter, für FGF-1 kodierende DNA nützlich ist, um die Kollateralbildung in einem Kaninchenmodell mit chronischer peripherer Ischämie anzuregen. Um Aspekte der Biosicherheit zu erhöhen, benutzten wir die pCOR-Plasmide mit

neuem Design als DNA-Transportvehikel. Wir testeten zuerst *in vitro* verschiedene für FGF-1 kodierende Plasmidkonstrukte, um die Expressionseffizienz abzuschätzen, und benutzten dann das Konstrukt mit der höchsten Transgen-Expression für die Gentransfer-Experimente im Tiermodell. In dem Extremitätenmodell konnten wir eine bemerkenswerte Expression des Transgens in dem injiziertem Muskelgebiet, ebenso wie einen Dosis-abhängigen Effekt von FGF-1 auf die Kollateralbildung in der ischämischen Extremität nachweisen. Und schließlich verglichen wir, da in der Struktur des FGF-1 Translationsprodukts ein klassisches sekretorisches Signalprodukt fehlt,¹³⁵ *in vitro* und *in vivo* den Einfluß unseres Plasmids mit hoher Expressionseffizienz, kodieren für das natürlich vorkommende FGF-1, mit dem einer konstruierten FGF-1 Form, wobei hier eine hydrophobe Signalsequenz vom humanen Fibroblasten-Interferongen zur ersten kodierenden Aminosäure des FGF-1 ligiert worden war.

3.2. Material und Methoden

FGF-1 Nomenklatur und Plasmide

In **Abb. 4.1** ist schematisch die FGF-1 Nomenklatur dargestellt. Wie früher berichtet¹³⁶ entsteht aFGF ebenso wie das α -ECGF-Polypeptid aus dem offenem Leserahmen (open reading frame) des β -ECGF durch proteolytisches Zerschneiden. Zwei verschiedene Expressionsvektoren, welche für sekretorische und nicht-sekretorische FGF-1 Formen kodieren, wurden in den folgenden Experimenten benutzt. Die sekretorische Form des FGF-1 (sp.FGF-1; sp: Signal-Peptid) wurde als Fusionngen des humanen Fibroblasten-Interferon-Signalpeptids (FINsp) und dem offenen Leserahmen des α -ECGF konstruiert.¹³⁷ Das parentale FGF-1 (benannt ns: nicht-sekretorisch) und sp.FGF-1 wurden ursprünglich in einen eukaryotischen Expressionsvektor unter der Kontrolle eines chimärischen Promoters, bestehend aus dem CMV-Enhancer fusioniert mit dem SV40-Promoter, einkloniert und seine Transkription wurde terminiert mit der SV40-frühen Polyadenylationssequenz mit viralem Intron. In diesen Expressionsvektor einkloniertes nicht-sekretorisches FGF-1 (ns.FGF-1) wurde p267 benannt, und, parallel hierzu, in diesen Vektor einkloniertes sekretorisches FGF-1 (sp.FGF-1) wurde pMJ35 benannt (**Abb. 4.2A**). Das zweite Expressionsvektor-System wurde mit dem Ziel konstruiert, Expressionseffizienz und Biosicherheit des Vektors zu verbessern. Dieser optimierte Vektor wurde in ein Plasmidgrundgerüst mit einem konditionalen, auf das Plasmid beschränkten Ursprung der Replikation (pCOR) eingebaut und er ist ausgestattet mit dem CMV-Promoter CMV promoter (-522/+72), welcher mit der 5'UTR (untranslated region) der Thymidinkinase (+51/+101) und dem SV40 late polyA Signal ohne Intron fusioniert ist. In vorausgegangenen transienten Transfektionsexperimenten mittels Luciferase-Reportergen hatte sich gezeigt, dass dieser zuletzt beschriebene Vektor, wenn man ihn mit anderen Vektoren oder Promotoren vergleicht, den besten Promoter und SV40-Kontext für eine hohe Expression aufweist. Drei verschiedene FGF-1 Kassetten

wurden in dieses pCOR Grundplasmid einkloniert: Die erste besteht aus dem gesamten β -ECGF ORF (open reading frame) (kodierend für ns.FGF-1₍₁₋₁₅₅₎), die zweite Form startet bei der Aminosäure 22 des β -ECGF, welches nicht-sekretorisches FGF-1 repräsentiert (kodierend für ns.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎), und die dritte ist das Fusionskonstrukt aus dem humanen Interferon-Signalpeptid (FINsp) an β -ECGF Aminosäuren 22 bis 155 (kodierend für sp.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎) (**Abb. 4.2B**). Plasmide mit dem pCOR Grundgerüst, welche für Kontrollen benutzt wurden, kodieren das E.coli lacZ-Gen, fusioniert an das SV40 large T nukleäre Lokalisierungssignal (CMV-nlsLacZ), sowie CMV-Luciferase.

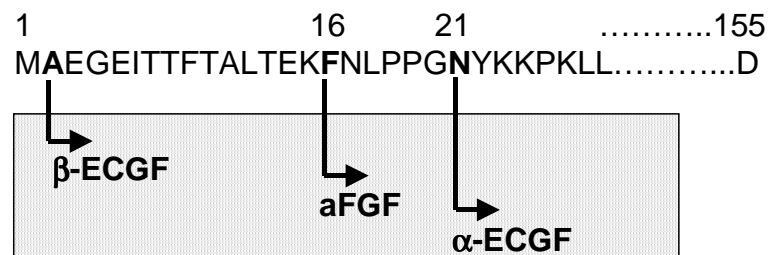


Fig. 4.1. Schematische Darstellung der FGF-1 Nomenklatur. Aus dem β -ECGF open reading frame (ORF) entstehen drei Polypeptide, β -ECGF, aFGF and α -ECGF durch proteolytisches Schneiden. Die erste Aminosäure jedes Polypeptids ist fett markiert, und seine Position relativ zu der β -ECGF Numerierung ist angezeigt.

Zellkultur

Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human vein endothelial cells (HUVECs)) wurden aus Nabelschnurvenen mittels Kollagenasebehandlung wie vorbeschrieben⁸⁸ isoliert und kultiviert in Medium 199 (M199) (Gibco Brl), ergänzt mit 20% fetalem Rinderserum (FBS) (Life Technologies), 100 μ g/ml Endothelzell-Wachstumszusatz und 50 U/ml Heparin (Sigma). Primäre glatte Muskelzellen aus Kaninchen und C2C12-Myoblasten wurden in DMEM (Gibco Brl), ergänzt mit 10% FBS kultiviert.

In vitro-Transfektionsexperimente

Primäre glatte Muskelzellen aus Kaninchen, C2C12-Myoblasten und die ECV 304-Endothelzelllinie wurden für die Transfektionsexperimente verwendet. 1 μ g Plasmid-DNA wurde mit 6 μ g Lipofektamin (Gibco Brl) gemischt, auf 200 μ l mit Optimem I reduziertem Serum-Medium (Gibco Brl) aufgefüllt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 5×10^4 Zellen/well wurden zweimal mit PBS gewaschen und 800 μ l Optimem I wurde zu den Zellen zugegeben. Nach Zugabe der 200 μ l Liposomen-Komplexlösung wurden die Zellen für 5 Stunden bei 37°C im 5%-Inkubator aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und frisches Wachstumsmedium

hinzugegeben. Die Zellextrakte und Überstände wurden 48 Stunden nach Beginn der Transfektion für die Tragenexpression gewonnen.

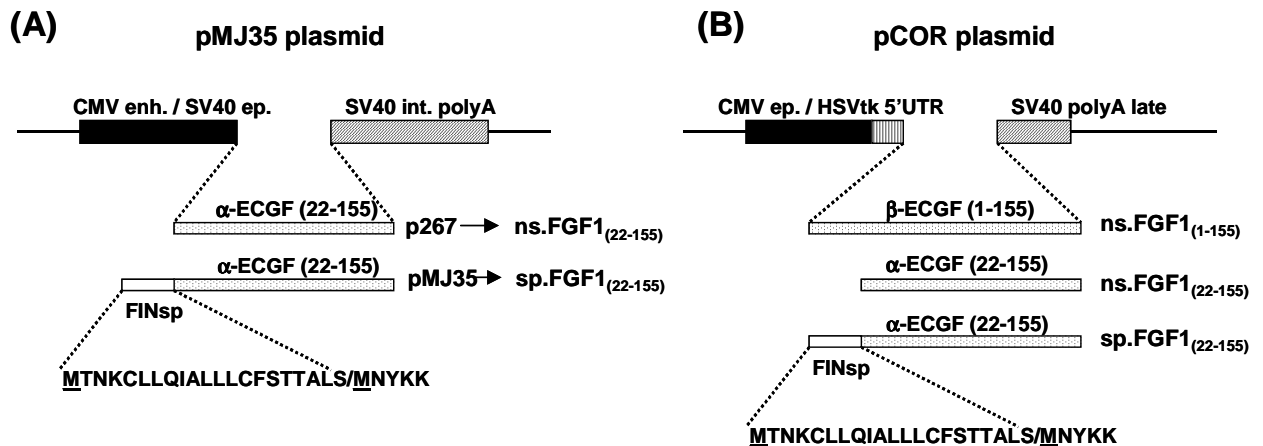


Abb. 4.2. Schematische Repräsentation der verschiedenen getesteten aFGF-Expressionsvektoren. (A) p267 kodiert für nicht-sekretorisches FGF-1, pMJ35 kodiert für FGF-1, fusioniert an seinem N-terminalen Ende an das humane Fibroblasten-Interferon-Signalpeptid (FINsp), dessen Aminosäuresequenz an seiner Verbindung mit aFGF gezeigt ist. In sowohl p267 als auch pMJ35 wird FGF-1 kontrolliert durch Fusion des CMV-Enhancers mit dem SV40-Promoter (CMVenh./SV40ep) und wird terminiert durch die Intron-beinhaltenen SV40 frühe polyA Signalsequenzen (SV40 int. polyA). (B) Drei verschiedene offene Leserahmen (open reading frames), konstruiert aus β-ECGF wurden in das pCOR (conditional origin of replication) Grundgerüst inkloniert. Diese optimierten pCOR Expressionsvektoren benutzen den CMV-Promoter (-522/+72) fusioniert an die 5'UTR der Thymidinkinase (+51/+101) und das SV40 späte polyA-Signal ohne Intron. Sowohl p267 als auch pMJ35 hat somit ein entsprechendes pCOR-Gegenstück.

Western Blot-Analyse

Die Zellen wurden lysiert durch Zugabe von RIPA-Puffer (1% NP-40, 0.5% Natrium-Deoxycholinsäure, 0.1% SDS in PBS, pH 7.4; 1 μM Leupeptin; 5 μM Aprotinin; 1mM PMSF; 1 μM Pepstatin) (alle Sigma) und die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay (BioRad) bestimmt. Zur Proteinanalyse der Zell-Überstände wurden die Medien 48 Stunden nach Transfektion gesammelt und mit TCA präzipitiert. Die Zellextrakte bzw. konzentrierten Kulturmedien wurden mittels 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine 0.2 Micron PVDF-Membran (BioRad) transferiert. Die Membranen wurden dann in 10% Trockenmilch, 0.2% Tween-20 in PBS (TPBS), pH 7.4 geblockt und mit einem polyklonalen, in Kaninchen gewonnenen Antikörper gegen rekombinantes humanes β-ECGF-Protein (1:1000 Verdünnung; RPR Gencell) bei 4°C übernacht inkubiert. Die Blots wurden mehrfach mit TBS gewaschen und anschließend mit Peroxidase-gekoppeltem Anti-Kaninchen-Antikörper aus Ziege für 45 Minuten inkubiert. Die Immunkomplexe wurden abschließend mit dem ECL-Reagenz (Amersham) sichtbar gemacht.

Tiermodell

Das Potential der verschiedenen FGF-1-Plasmidkonstrukte, Angio- bzw. Arteriogenese *in vivo* zu induzieren, wurde wie vorbeschrieben in einem Kaninchenmodell mit ischämischer unterer Extremität untersucht (siehe 2.2).

Intramuskulärer Gentransfer

Am 10. postoperativen Tag (Tag 0) wurden nach Durchführung eines Ausgangs-Angiogramms (s.u.) in fünf verschiedenen Bereichen der drei hauptsächlichen Hüftmuskeln mittels einer 3-ml Spritze und einer 27-Gauge-Kanüle, welche durch eine kleine Hautinzision eingebracht wurde, direkte Injektionen mit Plasmid-DNA vorgenommen. Für jede Injektion wurde die Spitze der Nadel etwa 3 bis 5 mm tief in den M. adductor (2 Stellen), M. medianus magnus (2 Stellen) und M. semimembranosus (1 Stelle) eingeführt. In Bezug auf die Blutversorgung sind diese Muskeln zwischen dem Ursprung der exziierten A. femoralis und dem Ursprung der A. poplitea (Reentry) lokalisiert, d.h. in dem minderdurchbluteten Gebiet, welches durch die Femoralarterienresektion verursacht wurde.¹³⁴ Um ein komplettes Durchstechen der Nadel durch die injizierten Muskeln zu verhindern und um sicherzugehen, dass es zu keinem Austreten des Injektats aus der Punktionsstelle kam, wurde jede Injektion langsam unter Sichtkontrolle durchgeführt. Mit dieser Technik wurden insgesamt 100, 500 oder 1000 µg sp.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎-Plasmid, 100 µg ns.FGF-1₍₁₋₁₅₅₎-Plasmid, 1000 µg CMV-nlsLacZ-Plasmid (kodierend für β-Galactosidase) oder 0.9%ige Kochsalzlösung (jeweils n=8 Kaninchen) verabreicht. Nach Vervollständigung der fünf Injektionen (500 µl pro Injektionsstelle, somit insgesamt 2.5 ml pro Tier)¹³⁸ wurde die Haut mit 4-0 Nylonnähten zugenäht. Am Tag 30 (40. postoperativer Tag) wurden alle Messungen wiederholt (s.u.), die Tiere eingeschlafert und Gewebeproben für die histologischen Untersuchungen entnommen.

Transfektionseffizienz

Das Ausmaß der Transgenexpression wurde morphometrisch in vier zusätzlichen Kaninchen überprüft durch Verabreichung von 500 µg CMV-nlsLacZ pCOR-Plasmid (kodierend für β-Galactosidase) mit einem nukleären Lokalisierungssignal in den M. adductor ischämischer Extremitäten. Die transfizierten Muskelgebiete wurden nach 5 Tagen entfernt, in frisch hergestellter 2% Paraformaldehydlösung in PBS für 5 Minuten fixiert und anschließend in X-Gal-Lösung (5-Bromo-4Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid; Sigma) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.¹³⁹ Nach Postfixation in 2% Paraformaldehyd/PBS wurden die entnommenen Gewebeproben in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin/Eosin leicht gegengefärbt. Aus jeder entnommenen Muskelprobe wurden fünf Schnitte zufällig ausgewählt und die Anzahl der positiven Myozyten sowie die Gesamtzahl der Myozyten unter dem Mikroskop in fünf Gesichtsfeldern bei niedriger Vergrößerung gezählt.

Zusätzlich wurden 500 µg pCOR CMV-Luciferase-Plasmid in den M. adductor ischämischer Extremitäten von sechs zusätzlich operierten Kaninchen mittels Injektion verabreicht. An

verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion (1, 2 und 4 Tage) wurden die transfizierten und kontralateralen Mm. adductores von jeweils zwei Kaninchen entnommen, homogenisiert und für einen Chemilumineszenz-Assay nach Standardprotokoll (Promega) wie vorbeschrieben¹⁴⁰ aufbereitet. Die Lichtemission jeder Probe wurde für 5 Sekunden mit einem LUMAT Luminometer (Berthold) gemessen. Die ermittelten Lichteinheiten (LU=light units) wurden normalisiert durch ermitteln des Proteingehalts jedes Gewebshomogenisats mittels eines Protein-Assays (BioRad). Die kontralaterale, nicht-injizierte Seite jedes Kaninchens wurde als Negativkontrolle verwendet.

Immunhistologischer Nachweis der FGF-1 Expression

Die FGF-1 Proteinexpression nach dem intramuskulären Gentransfer wurde durch Immunfärbung nachgewiesen. Um Probleme, die aufgrund einer Kreuzreaktion des polyklonalen Antikörpers aus Kaninchen gegen FGF-1 in Kaninchengewebe entstehen könnten, zu vermeiden, wurden 200 µg sp.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎ pCOR Plasmid in den M. tibialis anterior von Ratten injiziert. Die transfizierten Muskeln wurden 7Tage nach Gentransfer entnommen, mit Methanol fixiert und in Paraffin eingebettet. 5 µm dicke Schnitte wurden dann in 3% Wasserstoffperoxid inkubiert, mit 10% Pferdeserum vorbehandelt und dann mit polyklonalem anti-humanen FGF-1 Antikörper aus Kaninchen (Aventis Gencell) bei 4°C übernacht inkubiert. Gebundener primärer Antikörper wurde dann mit Avidin-Biotin-Immunperoxidase (Signet) detektiert. Muskelproben, welche mit CMV-nlsLacZ pCOR Plasmid transfiziert worden waren, dienten als Negativkontrollen.

PHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN

Unterschenkel-Blutdruckindex

Siehe 2.2.

Intravaskuläre Blutfluß-Messung

Siehe 2.2.

ANATOMISCHE MESSUNGEN

Selektive Angiographie der A. iliaca

Siehe 2.2.

Kapillardichte

Siehe 2.2.

Statistische Auswertungen

Siehe 2.2.

3.3. Ergebnisse

In vitro-Testung der FGF-1 Expressionsvektoren

Primäre glatte Muskelzellen aus Kaninchen, C2C12 Myoblasten und eine Endothelzelllinie aus Nabelschnurvenen (ECV) wurden transient mit gleichen DNA-Mengen der verschiedenen pCOR-Vektoren, kodierend für FGF-1, ebenso wie mit pMJ35 transfiziert. Die Kulturmedien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt und gleiche Mengen mittels Western Blot auf Proteinintegrität und Ausmaß der Sekretion mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen rekombinantes humanes β -ECGF-Protein überprüft (**Abb. 4.3**, obere Reihe). Rekombinantes β -ECGF Protein, identisch mit FGF-1₍₁₋₁₅₅₎, ergab eine Bande bei 18 kD. Transfektion mit pCOR ns.FGF-1₍₁₋₁₅₅₎ führte zu einer Proteinbande der gleichen Größe, wohingegen Transfektion mit pMJ35 (sp.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎), pCOR ns.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎ sowie pCOR sp.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎ zu einer weiter wandernden Bande bei 17 kD führte, entsprechend des 21 Aminosäuren-kürzeren Proteinprodukts (α -ECGF). Während die Verwendung des pMJ35-Vektors zu einer relativ schwachen Bande führte, bewirkten alle drei FGF-1 pCOR-Plasmide eine signifikant größere Menge an sezernierten FGF-1 Protein in den Zellüberständen, wie man an den viel stärkeren Banden erkennen kann. Dieses Ergebnis traf auf alle drei getesteten Zelltypen zu, wie sich in den vergleichenden Western Blots zeigt. Wir analysierten ebenfalls die jeweiligen intrazellulären Gehalte an FGF-1 für alle verwendeten Expressionsvektoren (**Abb. 4.3**, obere Reihe). Diese Analyse zeigt eindeutig, dass in den pCOR-transfizierten Zellen eine signifikant größere Menge an FGF-1 Protein akkumuliert ist, im Vergleich zu den mit pMJ35 transfizierten Zellen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die hohe Sekretionsrate an FGF-1, die mit den pCOR-Plasmiden erhalten wurde, auf eine erhöhte Transkriptionsrate in der optimierten Expressionskassette zurückzuführen ist.

Bemerkenswerterweise war das Ausmaß der FGF-1 Sekretion für alle pCOR-Plasmide identisch, sogar für das pCOR-Plasmid ohne additives Signalpeptid. Dies traf für alle getesteten Zelltypen und für die Zellysate ebenso wie die Zellüberstände zu.

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die pCOR-Plasmide hinsichtlich des Expressionslevels deutlich interessanter sind als das pMJ35-Konstrukt. Wir beschlossen daher, die pCOR-Plasmide ns.FGF-1₍₁₋₁₅₅₎ und sp.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎ auf ihre Fähigkeit zu überprüfen, die Kollateralbildung in unserem Tiermodell zu verbessern.

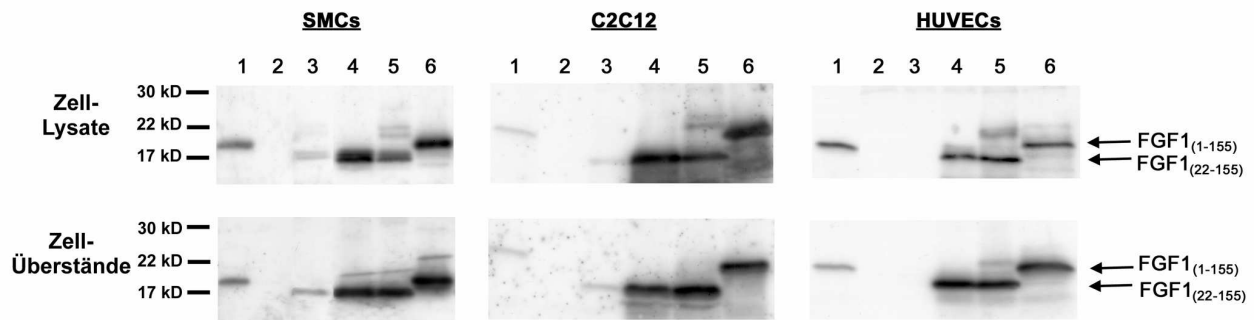
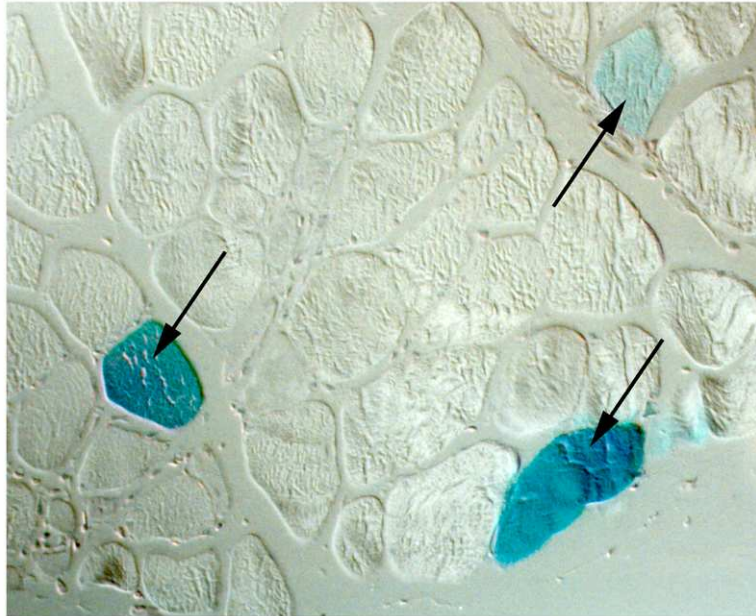


Abb. 4.3. Western Blot, welcher die Expressionseffizienz verschiedener, für FGF-1 kodierender Expressionsplasmide zeigt, in primären glatten Muskelzellen vom Kaninchen (smooth muscle cells=SMCs), C2C12 Maus-Myoblasten und humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVECs). Die Zellen wurden transient mit 1 µg Expressionvektor-DNA wie angegeben transfiziert. **(A)** Die Kulturmedien (Zellüberstände) wurden 48 Stunden nach Transfektion gesammelt und jeweils gleiche Mengen wurden auf die FGF-1 Sekretionsmenge hin mittels eines polyklonalen anti-FGF-1 Antikörpers aus Kaninchen analysiert. **(B)** Zum intrazellulären FGF-1 Gehalt korrespondierende Zellhomogenate für jeden Expressionsvektor. **1:** 5 ng rekombinantes β-ECGF-Protein (Positivkontrolle); **2:** Mock-Transfektion (Negativkontrolle); **3:** pMJ35: nicht-optimiertes Plasmid, kodierend für sezerniertes α-ECGF (sp.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎); **4:** pCOR-Plasmid, kodierend für nicht-sezerniertes α-ECGF (ns.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎); **5:** pCOR-Plasmid, kodierend für sezerniertes α-ECGF (sp.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎), und **6:** pCOR-Plasmid, kodierend für nicht-sezerniertes β-ECGF (ns.FGF-1₍₁₋₁₅₅₎).

Transfektionseffizienz in der ischämischen Extremität nach intramuskulärem Gentransfer

Die Effizienz der Transgen-Expression wurde in vier zusätzlichen Kaninchen überprüft, in welchen der ischämische M. adductor mit 500 µg CMV-nlsLacZ pCOR-Plasmid transfiziert wurde. Die morphometrische Analyse ergab eine Transfektionseffizienz von $2.5 \pm 1.5\%$, aufgrund der Berechnung des Verhältnisses zwischen transfizierten (blaue Färbung) und nicht-transfizierten Myofibrillen innerhalb des Injektionsgebiets (**Abb. 4.4A**). Diese Größenordnung der Transfektionseffizienz ist in Übereinstimmung mit vorausgegangenen Daten.¹³⁴ Der Chemiluminiszenz-Nachweis der Luziferase-Aktivität nach intramuskulärer Injektion in den ischämischen M. adductor zu verschiedenen Zeitpunkten nach Injektion ergab einen signifikanten Anstieg der Luziferase-Aktivität im Vergleich zum nicht-injizierten kontralateralen Muskel (Kontrolle: 93.5 ± 5.0 , Tag 1: 113.5 ± 5.0 (n.s.), Tag 2: $3.95 \pm 1.10 \times 10^3$ ($p < 0.001$), Tag 4: $6.85 \pm 1.32 \times 10^5$ LU=light units/mg Protein ($p < 0.0001$)) (nicht abgebildet). Der hohe Expressionslevel am 4. Tag ist vergleichbar mit publizierten Daten, welche ein Maximum der Transgen-Expression 4 bis 14 Tage nach intramuskulärer Injektion demonstrieren.^{138, 141, 142}

(A)



(B)



Abb. 4.4. (A) Expression von β -Galaktosidase im M. adductor einer ischämischen Extremität im Kaninchen, 5 Tage nach Injektion von pCOR-Plasmid, kodierend für CMV-nlsLacZ. Positive Expression zeigt sich als blaue Färbung von Muskelfibrillen nach Inkubation mit X-Gal Lösung. (B) Immunhistologischer Nachweis von FGF-1 in einem Muskelbezirk 7 Tage nach Transfektion mit pCOR-Plasmid, kodierend für sezerniertes FGF-1 (sp.FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎). Humanes FGF-1 wird durch einen anti-humanen FGF-1 polyklonalen Antikörper nachgewiesen und die dunkelrote Färbung markiert Muskelfasern, welche FGF-1 exprimieren (Pfeile). In mit pCMV-nlsLacZ transfiziertem Muskel kam es zu keiner Anfärbung (nicht dargestellt).

Proteinexpression nach intramuskulärem Gentransfer

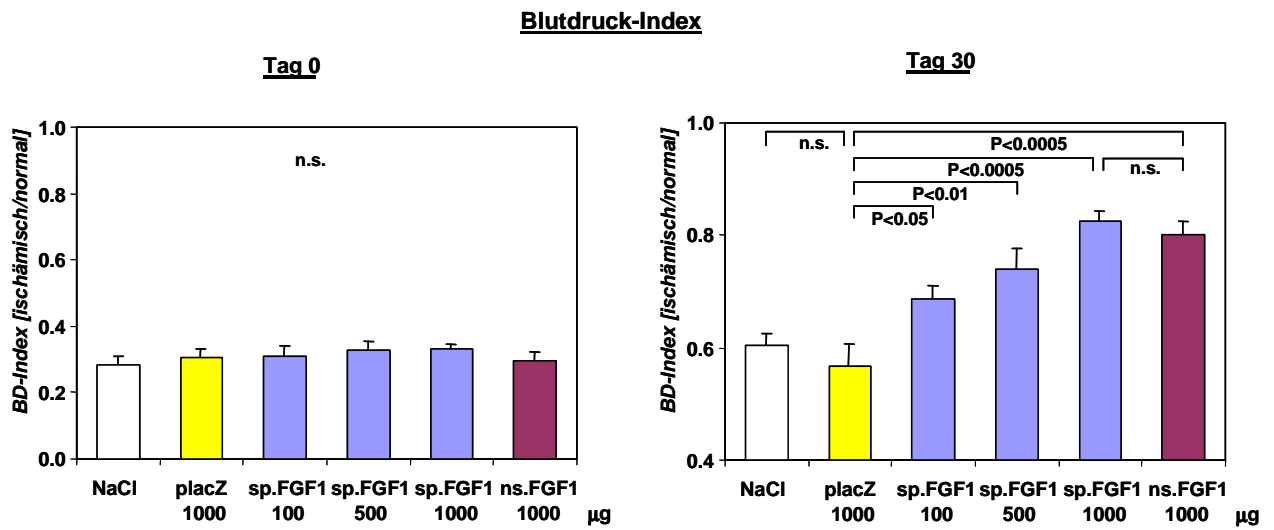
Eine immunhistologische Analyse 7 Tage nach intramuskulärer Injektion von 200 µg pCOR-Plasmid, kodierend für sp.FGF-1 erbrachte den Nachweis einer FGF-1 Genexpression auf der Proteinebene in den skeletalen Muskelfibrillen (**Abb. 4.4B**). Die positive Färbung beschränkte sich auf die Myofasern und zeigte sich nicht in umgebenden mononukleären Zellen. Es fand sich keine Färbung in nicht-injizierten Muskelbezirken (nicht dargestellt).

Einfluß von pCOR FGF-1 auf Blutdruck-Index und Blutfluß

Alle Kaninchen überlebten die Operation und alle Ausgangsparameter konnten gemessen werden. Am Tag 0 war der Blutdruck-Index in allen Versuchsgruppen ähnlich niedrig (ANOVA-Analyse; **Abb. 4.5A**, linkes Diagramm). Am Tag 30 bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (Mittelwert±standard error of the mean=sem) für den Blutdruck-Index zwischen den beiden Kontrollgruppen (Kochsalz-Injektion vs. *placZ* Kontrollplasmid-Injektion) (0.60 ± 0.02 vs. 0.57 ± 0.04 ; **Abb. 4.5A**, rechtes Diagramm). Bis zum Tag 30 hatte der Blutdruck-Index signifikant und Dosis-abhängig in den 100 µg, 500 µg und 1000 µg pCOR sp.FGF-1 Behandlungsgruppen (100 µg: 0.69 ± 0.02 , $p<0.05$; 500 µg: 0.74 ± 0.04 , $p<0.01$; 1000 µg: 0.82 ± 0.02 , $p<0.001$) ebenso wie in der 1000 µg pCOR ns.FGF-1 Behandlungsgruppe (0.80 ± 0.02 , $p<0.001$) im Vergleich zur *placZ*-Kontrollgruppe zugenommen. Es bestand dabei kein signifikanter Unterschied in dem günstigen Einfluß auf den Blutdruckindex zwischen 1000 µg sp.FGF-1 und 1000 µg ns.FGF-1.

Die Bestimmung des Blutflusses erfolgte am Tag 30 mittels Dopplermessung in der A. iliaca interna der ischämischen Extremität. Der Blutfluß in Ruhe ebenso wie der pharmakologisch induzierte maximale Blutfluß unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Kontrollgruppen (Kochsalz vs. *placZ*-Injektion: 12.1 ± 1.3 vs. 10.8 ± 0.8 in Ruhe bzw. 30.0 ± 2.4 vs. 30.7 ± 3.1 ml/min Maximalfluß; **Abb. 4.5B**). Hinsichtlich des Dopplerfluß in Ruhe führte nur die Hochdosis-Behandlungsgruppe zu einem signifikantem Anstieg im Vergleich zur *placZ*-Kontrolle (1000 µg sp.FGF-1: 15.7 ± 1.4 , $p<0.01$, 1000 µg ns.FGF-1: 13.7 ± 1.0 ml/min; **Abb. 4.5B**, linkes Diagramm). Hinsichtlich des maximalen Blutflusses reichten 100 µg sp.FGF-1 nicht aus, um einen signifikanten Anstieg auszulösen (37.8 ± 4.5 ml/min), wohingegen die beiden anderen Dosen an sp.FGF-1 ebenso wie 1000 µg ns.FGF-1 den maximalen iliakalen Fluß deutlich im Vergleich zur *placZ*-Kontrolle erhöhten (42.4 ± 3.8 , $p<0.05$ bzw. 50.6 ± 3.6 , $p<0.001$ bzw. 42.7 ± 2.8 ml/min, $p<0.05$; **Abb. 4.5B**, rechtes Diagramm). Die Effekte von 1000 µg sp.FGF-1 und ns.FGF-1 waren statistisch hinsichtlich des iliakalen Blutflusses weder in Ruhe noch unter Maximalbedingungen nicht zu unterscheiden.

(A)



(B)

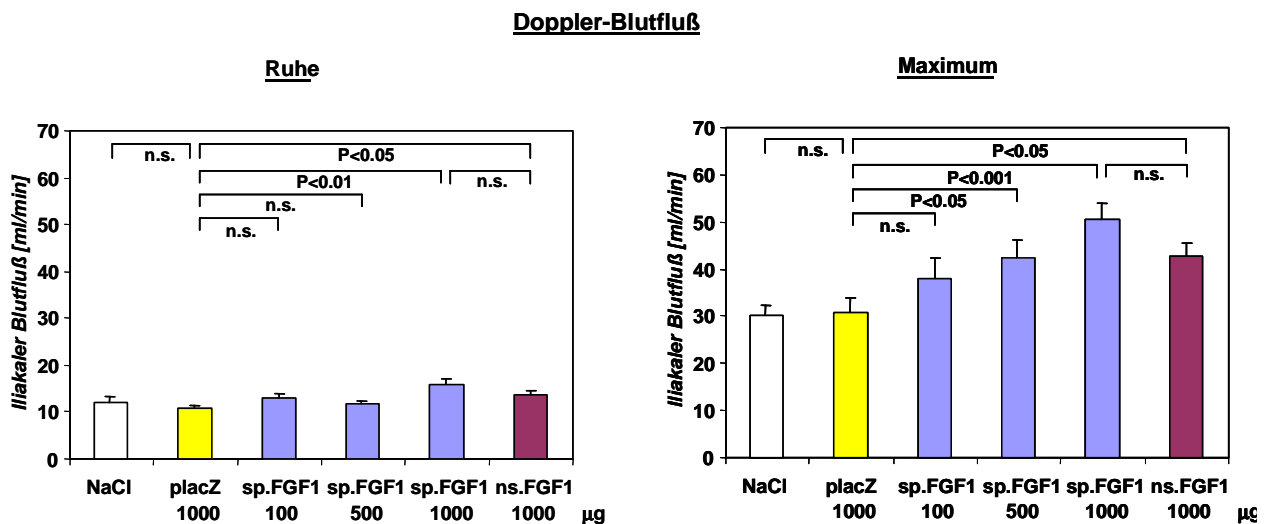


Abb. 4.5. (A) Extremitäten-Blutdruck-Index am Tag 0 (unmittelbar vor Behandlung) und Tag 30. Der Blutdruck-Index (BDI) wurde für jedes Kaninchen definiert als das Verhältnis aus systolischem Druck der ischämischen Extremität zu dem systolischem Druck der normalen kontralateralen Extremität (jeweils $n=8$). Am Tag 0, fanden sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Am Tag 30 war der BDI signifikant höher in den Kaninchen, welche pCOR-Plasmid kodierend für sezerniertes (sp.FGF-1) und nicht-sezerniertes (ns.FGF-1) FGF-1 erhalten hatten als in den Kontrollen (Kochsalzlösung und pCMV-nlsLacZ). (B) Iliakaler Blutfluß in Ruhe (links) und nach maximaler Stimulation mit Nitroprussid (rechts), gemessen in der A. iliaca interna der ischämischen Extremität mittels eines intraarteriellen Dopplerdrahtes am Tag 30 nach Behandlung. Beide FGF-1 Plasmide verbesserten den iliakalen Blutfluß signifikant im Vergleich zur pCMV-nlsLacZ Kontrollgruppe. n.s.: nicht signifikant. Jeder Balken repräsentiert den Durchschnitt von 8 Tieren \pm SEM.

Einfluß von pCOR FGF-1 auf die anatomisch nachweisbare Kollateralentwicklung

Am Tag 0 fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede für den angiographische Score zwischen den fünf Versuchsgruppen (nicht gezeigt). In den Kontrolltieren, denen Kochsalzlösung oder *placZ*-Plasmid verabreicht wurden, erschien die Kollateralarterienentwicklung in der medialen Hüftregion unverändert oder nur leicht verbessert in den seriellen Angiogrammen, aufgenommen an den Tagen 0 und 30. Nach Behandlung mit 100 µg sp.FGF-1 war der angiographische Score 0.58 ± 0.07 , was keinen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Kontrollgruppen bedeutet. Im Unterschied hierzu fand sich eine deutliche Verbesserung des angiographischen Scores am Tag 30 in den mit 500 and 1000 µg sp.FGF-1 transfizierten Behandlungsgruppen (0.68 ± 0.02 , $p < 0.05$; 0.81 ± 0.04 , $p < 0.005$), im Vergleich zur *placZ*-Kontrolle (0.39 ± 0.02 ; **Abb. 4.6A**). Der angiographische Score am Tag 30 betrug 0.77 ± 0.09 für 1000 µg ns.FGF-1, welcher somit ebenfalls den für die Kontrollgruppen gemessenen signifikant übertraf ($p < 0.05$). Direkter Vergleich der Werte für 1000 µg sp.FGF-1 und ns.FGF-1 untereinander ergab wiederum keinen statistisch signifikanten Unterschied. **Abb. 4.7** zeigt repräsentative Angiogramme der A. iliaca interna am Tag 30, aufgenommen von mit Kochsalzlösung behandelten oder mit *placZ*-Plasmidkontrolle, sp.FGF-1 oder ns.FGF-1 transfizierten Tieren.

Für die Kapillardichte bestand kein statistisch signifikanter Unterschied am Tag 30 zwischen den beiden Kontrollgruppen (Kochsalzinjektion 174.4 ± 13.5 vs. *placZ* Kontrollplasmid $169 \pm 10.0/\text{mm}^2$; n.s.) oder zwischen der 100 µg sp.FGF-1 niedrig-Dosis-Gruppe ($200 \pm 18.7/\text{mm}^2$) und *placZ*-Kontrolle (**Abb. 4.6B**). Dagegen führte Applikation von 500 und 1000 µg sp.FGF-1 zu einer signifikanten, Dosis-abhängigen Zunahme der Kapillardichte ($220 \pm 18.7/\text{mm}^2$, $p < 0.05$; 242 ± 17.9 , $p < 0.005$) im Vergleich zur *placZ*-Kontrollgruppe. In vergleichbarer Weise war die Kapillardichte bei 1000 µg ns.FGF-1 deutlich erhöht nach 30 Tagen ($228 \pm 14.8/\text{mm}^2$, $p < 0.01$). Ein direkter Vergleich der erhaltenen Werte für 1000 µg sp.FGF-1 und für ns.FGF-1 erbrachte, dass sich das angiogenetische Potential dieser beiden verschiedenen Kontrukte nicht signifikant voneinander unterschied. Repräsentative Beispiele histologischer, mit alkalischer Phosphatase gefärbter Schnitte zum Nachweis der Kapillardichte in den experimentellen Gruppen sind in **Abb. 4.8**. zusammengestellt.

Insgesamt führte somit die Verabreichung steigender Mengen an pCOR-Plasmid, kodierend für FGF-1 unter Einschluß eines synthetischen Signalpeptids (sp.FGF-1), zu einer Dosis-abhängigen Verbesserung der Kollateralbildung und der Gewebserfusion im Kaninchenmodell mit chronisch-ischämischer Extremität, im Vergleich zu Kochsalzgabe und zu pCOR *lacZ*-Kontrollplasmid. Applikation von ns.FGF-1 in hoher Dosis verbesserte, obwohl ohne Signalpeptid, ebenso alle untersuchten Parameter, wenngleich ns.FGF-1 tendenziell für alle getesteten Parameter etwas weniger wirksam zu sein schien als sp.FGF-1.

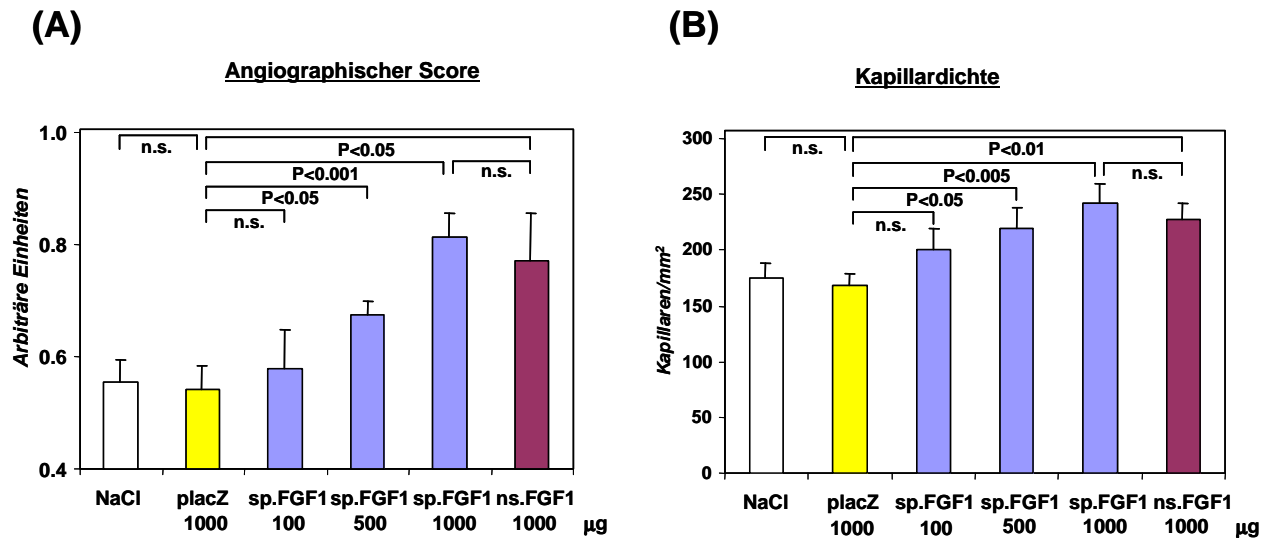


Abb. 4.6. (A) Angiographischer Score, abgeleitet aus der am Tag 30 durchgeführten quantitativen Analyse angiographisch nachweisbarer Gefäße im medialen Hüftbereich ischämischer Extremitäten. Am Tag 0 bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (nicht abgebildet). Am Tag 30 ist die Anzahl der Gefäße in den mit FGF-1 Plasmid-behandelten Gruppen signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen (jeweils n=8). (B) Kapillardichte, ermittelt am Tag 30 in histologischen Schnitten, welche aus medialen Hüftmuskeln von ischämischen Extremitäten entnommen worden waren. Die Kapillardichte ist durch FGF-1 deutlich angestiegen (jeweils n=8).

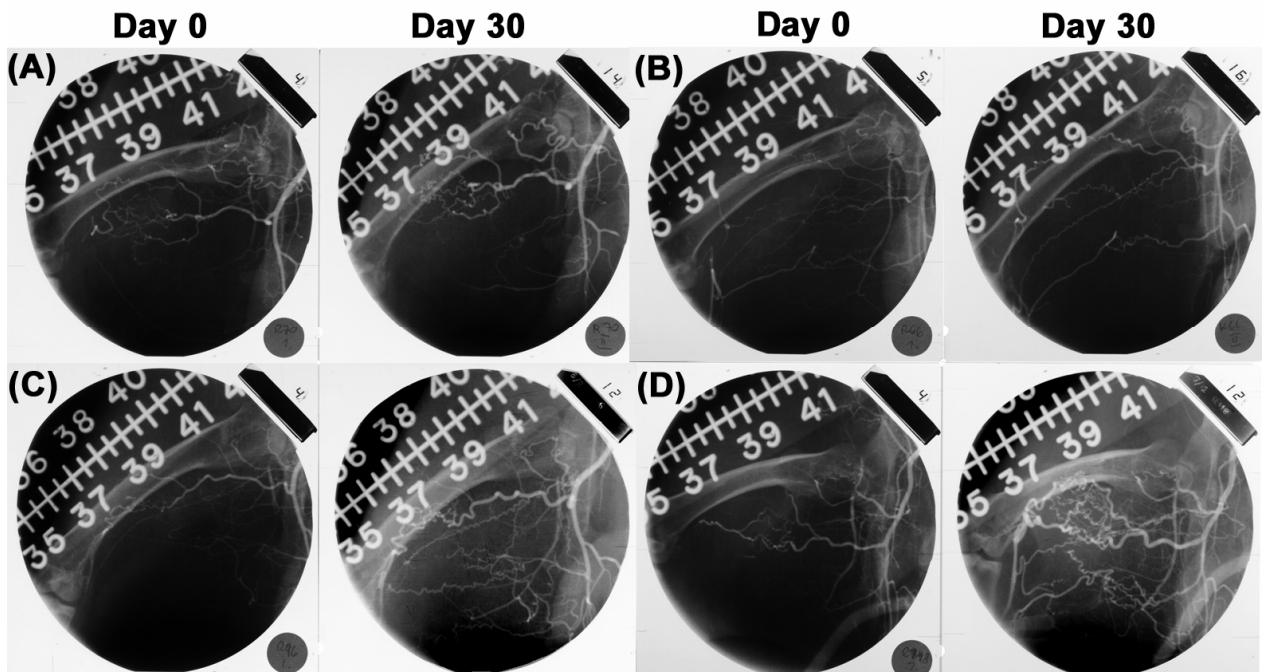


Abb. 4.7. Selektive Angiogramme der A. iliac interna an den Tagen 0 und 30 von Tieren, welche (A) Kochsalzlösung, (B) pCOR nlsLacZ-Plasmid, (C) 1000 µg sp.FGF-1 Plasmid oder (D) 1000 µg ns.FGF-1 Plasmid-DNA erhalten haben. Im Unterschied zu den Kontrollgruppen zeigen die Behandlungsgruppen einen deutlichen Anstieg an angiographisch nachweisbaren Kollateralschlagadern.

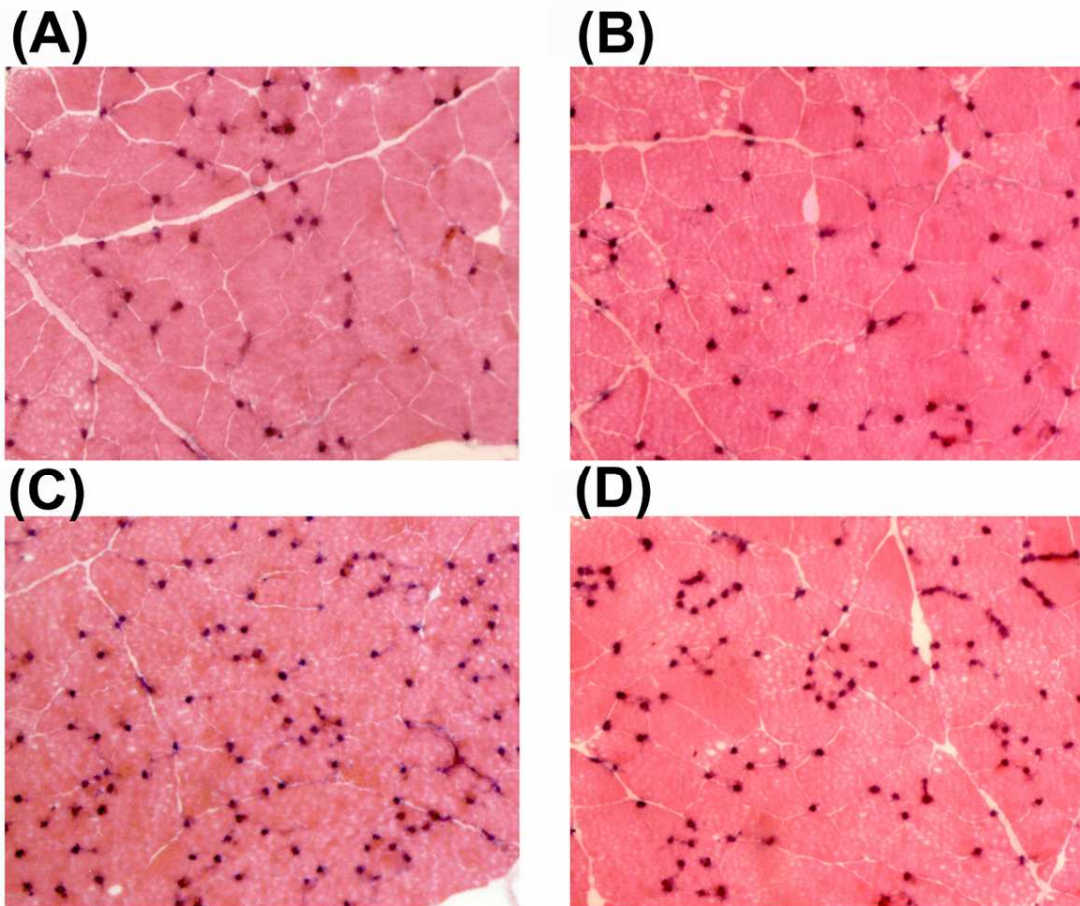


Abb. 4.8. Histologische Schnitte, entnommen am Tag 30 aus ischämischer Extremitätenmuskulatur (*M. adductor*), angefärbt mit alkalischer Phosphatase (gegengefärbt mit Eosin). (A) Mit Kochsalzlösung, (B) 1000 µg pCOR nlsLacZ-Plasmid, (C) 1000 µg sp.FGF-1 Plasmid oder (D) 1000 µg ns.FGF-1 Plasmid behandelte Kaninchen. Verabreichung von FGF-1 Plasmid führte zu einer Zunahme der Kapillardichte. Die dunkelblau gefärbten Punkte markieren Kapillaren.

3.4. Diskussion

Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass FGF-1 die Kollateralenbildung in einer Situation chronischer Gewebsischämie fördern kann. Generell dürften zwei Mechanismen wichtig sein, um die Gewebsdurchblutung zu verbessern: Einmal die Angiogenese, welche definiert ist als Aussprossung von Kapillaren aus präexistierenden Kapillaren,¹¹⁹ wodurch die Blutverteilung innerhalb des ischämischen Gewebes erhöht wird; und zum anderen die Arteriogenese, womit das aktive Wachstum von präexistierenden arteriolen Verbindungen gemeint ist,^{23, 143} was zu einem verstärkten Blutangebot in Richtung des ischämischen Gebietes führt. Unsere Experimente mit dem Kaninchenmodell mit chronischer peripherer Ischämie legen nahe, dass FGF-1 sowohl Angiogenese, wie durch den Anstieg der Kapillardichte innerhalb der ischämischen Muskelbezirke gezeigt, als auch Arteriogenese fördert, wie durch den Anstieg des Blutangebots zur ischämischen Extremität mittels Dopplerfluß-Messungen

und durch die angiographisch nachweisbaren Kollateralen demonstriert. Das Potential von FGF-1, Angiogenese zu induzieren, war mittels eines adenoviralen Vektors, kodierend für FGF-1, in vorausgegangenen Untersuchungen bereits gezeigt worden.¹⁴⁴ Unsere Beobachtung eines möglichen therapeutischen Nutzens von FGF-1 wird unterstützt durch andere Untersuchungen, welche zeigen, dass FGF-1 eine wesentliche Rolle im Wachstum von Koronararterien spielt: FGF-1 und sein Rezeptor kolokalisieren mit kapillärer Angiogenese in der Herzentwicklung,¹²⁵ und, wie kürzlich gezeigt, führte transgene Überexpression von FGF-1 zu sowohl einer erhöhten Dichte an Koronararterien, als auch zu einer Zunahme der Anzahl an Verzweigungen von Hauptarterien.²⁶

Es gibt, soweit bekannt, vier verschiedene FGF-Rezeptoren (FGFR): FGFR-1 und FGFR-2 sind auf einer Vielzahl von Zelltypen einschließlich Fibroblasten, Endothel- und glatte Muskelzellen exprimiert, wohingegen FGFR-3 und FGFR-4 ein deutlich beschränkteres Expressionsmuster aufweisen.¹⁴⁵ Der angiogenetische Effekt von FGF-1 wird wahrscheinlich durch die FGF-Rezeptoren auf Endothelzellen vermittelt, was zur Endothelzellproliferation und Bildung tubenartiger Strukturen führt.¹⁴⁴ Der biologische Mechanismus von FGF-1, der zum Arterienwachstum führt, ist bisher nicht klar: er könnte vermittelt werden durch eine direkte Wirkung von FGF-1 auf glatte Gefäßmuskelzellen und adventitielle Fibroblasten via FGF-Rezeptoren, welche auf diesen Zelltypen exprimiert sind. Alternativ könnte FGF-1 Monozyten aktivieren; es ist gezeigt worden, dass dieser Mechanismus wichtig ist für das arterielle Kollateralenwachstum,²⁴ und man kann annehmen, dass dies auch den Mechanismus darstellt für einen VEGF-induzierten positiven Effekt auf die Arteriogenese, da Monozyten VEGFR-1 (flt-1) besitzen.⁴¹

Insgesamt weisen unsere Daten darauf hin, dass FGF-1 therapeutisch nützlich sein könnte in der Behandlung ischämischer Krankheiten. Um einen biologisch bedeutsamen Effekt durch FGF-1 zu erzielen, wählten wir eine Gentransferstrategie, indem wir ischämische Skelettmuskelareale mit nackter Plasmid-DNA, kodierend für FGF-1, transfizierten. Für die intramuskuläre Transfektion ist gezeigt worden, dass es prinzipiell durchführbar und suffizient ist, um eine kontinuierliche Expression des Transgens über einen Zeitraum von wenigstens 2-3 Wochen aufrechtzuerhalten.^{134, 146, 147} In Übereinstimmung mit diesen Berichten haben wir eine Transgenexpression in den transfizierten Muskelarealen sowohl für Reporterplasmide (*lacZ* und Luziferase) als auch für FGF-1 durch immunhistologische Färbung nachweisen können. Um unspezifische proinflammatorische Effekte, induziert durch die Plasmidtransfektion des Skelettmuskels und möglicherweise lokale Angiogenese auslösend, ausschließen zu können, schlossen wir zwei Kontrollgruppen in unsere Tieruntersuchungen mit ein: Einmal die Injektion einer gleichen Menge an Kochsalzlösung, zum anderen Transfektion eines β -Galaktosidase-Reporterplasmids. Zwischen beiden Kontrollgruppen fanden sich keine Unterschiede für alle getesteten Parameter, was somit proinflammatorische Effekte durch die Transfektionsprozedur selbst ausschließt.

Anliegen unserer Experimente war nicht nur, FGF-1 Gentransfer als mögliche Behandlungsmodalität für humane ischämische Krankheiten zu erproben, sondern auch die Biosicherheit in der Behandlung von Menschen mittels Gentransfer zu verbessern. Wir benutzten daher ein neues Plasmiddesign, welches optimiert wurde für nicht-virale humane Gentherapie.¹³¹ Dieses Plasmid enthält einen konditionalen Replikationsursprung (conditional region of replication=COR) und muss in einem spezifisch veränderten E.coli-Stamm propagiert, d.h. vermehrt werden, wodurch die Möglichkeit einer Vermehrung in der Umwelt oder in behandelten Patienten drastisch reduziert wird. Dieser Replikationsursprung erfordert ein Plasmid-spezifisches Initiator-Protein, welches die Dissemination auf bakterielle Stämme limitiert, welche dieses trans-agierende Protein produzieren.¹³¹ Zusätzlich wurde der Selektionsmarker dieses Plasmids von einem Antibiotika-Resistenzgen ausgetauscht zu einem Gen, welches eine bakterielle Suppressor-tRNA kodiert, und die Expressionskassette wurde durch den Gebrauch eines CMV-Promoters optimiert, welcher an die 5'UTR der Thymidinkinase und an das SV40 späte (late) Polyadenylierungssignal ohne Intron fusioniert wurde. Unser Vergleich der Expressionseffizienz zwischen den pCOR-Plasmiden und älteren Plasmidgenerationen mittels Western Blot-Analyse zeigte deutlich eine stärkere und überlegene Transgenexpression durch das pCOR-Plasmid. Aus diesen Gründen könnte dieses optimierte Vektordesign besonders geeignet sein für die humane somatische Gentherapie im Hinblick auf Biosicherheit und Expressionseffizienz, während es die Nachteile adenoviraler Trägersysteme vermeidet.

Der natürlich vorkommenden Form von FGF-1 fehlt eine sekretorische Signalsequenz, ähnlich wie bei der Struktur von FGF-2 (basic FGF).¹³⁶ Wir modifizierten daher die cDNA des natürlich vorkommenden FGF-1₍₂₂₋₁₅₅₎ durch Hinzufügen einer Signalsequenz zur Sekretion des humanen Fibroblasten-Interferons (FIN) an dessen N-terminales Ende. Aber sogar ohne das Hinzufügen dieses Signalpeptids ließ sich eine Sekretion von FGF-1 Protein bei allen getesteten Vektoren in unseren *in vitro*-Transfektionsexperimenten primärer glatter Muskelzellen, Myoblasten und Endothelzellen mittels Western Blot nachweisen. Im direkten Vergleich waren die FGF-1 Expressionslevel zwischen den verschiedenen pCOR-Konstrukten, welche sekretorische und nicht-sekretorische Varianten des FGF-1 exprimieren, praktisch nicht zu unterscheiden. Darüberhinaus führten in unseren Kaninchenexperimenten sowohl die sekretorischen als auch das nicht-sekretorische FGF-1 Plasmidkonstrukt(e) zumindest bei der hohen Dosis (1000 µg) zu vergleichbar günstigen Effekten auf die Kollateralbildung, was darauf hinweist, dass durch die Verwendung eines hocheffizienten Expressionsvektors ein Signalpeptid nicht unbedingt erforderlich ist, um einen biologischen Effekt transfizierter FGF-1 cDNA zu erhalten. In früheren Untersuchungen wurde in ähnlicher Weise ein biologischer Effekt von FGF-1 Konstrukten, welche kein Signalpeptid kodierten, *in vivo* nachgewiesen, einerseits bei Verwendung adenoviraler Konstrukte,¹⁴⁴ andererseits, zumindest tendenziell, bei Verwendung einer älteren, weniger effizienten Plasmidgeneration.¹⁴⁸ Die Mechanismen einer Externalisation von FGF-1 könnten ähnlich sein zu den für FGF-2 sein, welchem

ebenfalls ein klassisches sekretorisches Signalpeptid fehlt.¹⁴⁹ Es war hierbei gezeigt worden, dass FGF-2 durch einen von der endoplasmatischen Retikulum-Golgi-Route, was der klassische Freisetzungsweg für sekretorische Proteine ist,¹⁵⁰ abweichenden Weg aus der Zelle freigesetzt wird. Dieser alternative Freisetzungsweg könnte ein Prozess ähnlich der Exozytose sein, und hat wahrscheinlich nicht zu tun mit bloßem Zelltod oder Zellverletzung. Die Hypothese einer extrazellulären Wirkungsweise von FGF-1 und FGF-2 wird unterstützt durch die Tatsache, dass eine Vielzahl von Zellen multiple Arten von Plasmamembranrezeptoren besitzen, welche an FGF(s) binden.¹⁵¹

Schlußfolgernd legen unsere Ergebnisse nahe, dass intramuskuläre FGF-1 Genapplikation nützlich sein könnte, um die Kollateralenbildung in einer Situation mit chronischer peripherer Ischämie zu fördern. Ein optimiertes Vektordesign verbessert hierbei sowohl die Biosicherheit des Gentransfers als auch die Expressionseffizienz des Transgens. Und schließlich scheint das Vorhandensein eines klassischen Signalpeptids nicht unbedingt erforderlich zu sein, um ausreichende Bioaktivität von transfiziertem FGF-1 zu erreichen.

3.5. Zusammenfassung

Fibroblast Growth Factor (FGF)-1 ist ein angiogenetischer Faktor, von dem bekannt ist, dass er eine Schlüsselrolle im Wachstum von Arterien spielt. Der Zweck dieser Untersuchungen war herauszufinden, ob direkte intramuskuläre Injektion eines optimierten Plasmids, welches für FGF-1 kodiert, nützlich sein könnte, um die Kollateralbildung und die Gewebepfusion in einem Kaninchenmodell mit ischämischer Extremität zu verbessern. Eine verkürzte FGF-1-Variante, welche an das menschliche Fibroblasten-Interferon (FIN) Signalpeptid fusioniert wurde, wurde durch einen neu konstruierten Expressionsvektor mit einem konditionalen Replikationsursprung exprimiert. *In vitro* führte die Optimierung des Plasmiddesigns zu einem dramatischen Anstieg des Expressionseffizienz für FGF-1 im Western Blot, und zwar unabhängig vom Vorhandensein eines Signalpeptids. *In vivo* konnte eine erfolgreiche Transgenexpression sowohl durch Analyse von Reportergenen (β -Galaktosidase und Luziferase) als auch durch FGF-1 Immunfärbung nach jeweiliger Genapplikation gezeigt werden. Injektion eines FGF-1 Plasmid, welches ein FIN Signalpeptid beinhaltet, in steigender Dosierung (100, 500 und 1000 μ g) in ischämische Muskelbezirke von Kaninchen 10 Tage nach Ligatur der A. iliaca externa führte zu einer ausgeprägten, dosisabhängigen Verbesserung der Kollateralenbildung zur ischämischen Extremität, wie sich anhand der physiologischen (Blutdruck-Index, maximaler intraarterieller Doppler-Blutfluß) und anatomischen (angiographischer Score, histologischer Nachweis der Kapillardichte) Messungen 30 Tage nach Therapie im Vergleich zu Kochsalz- oder Kontrollplasmid Injektionen zeigte. Ein entsprechendes FGF-1 Plasmid ohne Signalpeptidsequenz führte zu einem vergleichbaren therapeutischen Effekt auf die Kollateralbildung

bei Einsatz einer hohen Dosis (1000 µg). Die Ergebnisse legen nahe, dass intramuskulärer FGF-1 Gentransfer nützlich sein könnte, um die Kollateralenbildung in einer Situation chronischer peripherer Ischämie anzuregen. Ein optimiertes Vektordesign verbessert dabei sowohl die Biosicherheit des Gentransfers als auch die Expressionseffizienz des Transgens, womit diese neue Vektorgeneration besonders geeignet erscheint für die humane somatische Gentherapie. Abschließend scheint das Vorhandensein eines Signalpeptids nicht unbedingt erforderlich zu sein, um eine ausreichende Bioaktivität von transfiziertem FGF-1 zu erreichen.

4. Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor (SF/HGF) - Parakrin amplifizierte Angiogenese durch Induktion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

4.1. Einleitung

Angiogenese beinhaltet Aktivierung, Migration und Proliferation von Endothelzellen¹⁹ und wird durch bestimmte Wachstumsfaktoren reguliert.¹⁰ Eine exogene Verabreichung von wachstumsregulierenden Molekülen ist möglicherweise nützlich in der Behandlung einer Gewebischämie, welche sonst nicht durch konventionelle Revaskularisierungstechniken beseitigt werden kann. Diese Strategie, welche üblicherweise als „therapeutische Angiogenese“ bezeichnet wird, wurde in verschiedenen Tiermodellen mit peripherer oder myokardialer Ischämie^{35, 61-63, 120, 121, 152, 153} erprobt und innerhalb von Studien bereits auch in Patienten eingesetzt, welche mit Plasmid-DNA kodierend für VEGF behandelt wurden.^{64, 111, 133, 154, 155}

Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor (SF/HGF) ist ein vor kurzem charakterisierter Wachstumsfaktor,^{156, 157} welcher eine durch Disulfid-Brücken verbundene heterodimere Struktur und ein Molekulargewicht von 80 kDa aufweist.¹⁵⁶ Sein Rezeptor wurde als das *c-Met* Protoonkogen-Produkt identifiziert, welches den transmembranären Tyrosinkinase zugeordnet ist.¹⁵⁷ Die Synthese von SF/HGF durch mesenchymale Zellen (z.B. Fibroblasten und glatte Muskelzellen), in Zusammenhang mit den nachgewiesenen Effekten auf Epithel- und Endothelzellen, legt eine parakrine Wirkungsweise nahe.¹⁵⁸ SF/HGF wird als ein wesentlicher Mediator mesenchymaler-epithelialer/endothelialer Wechselwirkungen betrachtet, welcher zur Embryogenese, Organregeneration, Wundheilung und Angiogenese beiträgt.¹⁵⁸⁻¹⁶¹

Dazu passend haben vorausgegangene Untersuchungen belegt, dass SF/HGF direkt die Proliferation und Migration kultivierter Endothelzellen stimuliert,^{37, 162} die Entwicklung von kapillarähnlichen Strukturen *in vitro* fördert,^{37, 163} und eine Kapillarbildung in Matrigel-Plomben und normaler Cornea stimuliert.^{37, 161} Desweiteren ist gezeigt worden, dass die Expression von SF/HGF in Skelettmuskulatur nach Ischämie induziert wird.¹⁵⁹ Vor kurzem wurde SF/HGF mit einer Regeneration endothelialer Kapillaren in ischämischem Myokard in Zusammenhang gebracht.¹⁶⁴

Vorausgegangene Untersuchungen haben zweifelsfrei gezeigt, dass bestimmte Zytokine wie Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) und Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1), die Expression von VEGF in glatten Gefäßmuskelzellen hochregulieren und damit indirekt angiogenetische Effekte aufweisen können,⁷⁸ obwohl sie *per se* nicht-mitogen oder sogar inhibitorisch auf die Endothelzellproliferation *in vitro* sind.^{20, 165} Weil der *c-Met* Rezeptor für SF/HGF sowohl auf Endothelzellen als auch auf glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert ist,¹⁶⁶ haben wir die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass SF/HGF auch die VEGF-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen hochregulieren könnte. Dadurch könnte das angiogenetische Potential von SF/HGF *in vivo* durch direkte und indirekte Effekte, reguliert auf koordinierte Art und Weise, verstärkt werden.

Die folgende Reihe von Experimenten zeigt, dass die direkten Effekte von SF/HGF auf die Endothelzellproliferation und -migration vergleichbar sind mit denen von VEGF; die Kombination von SF/HGF und VEGF resultierte in einem additiven Effekt auf die Endothelzellproliferation und einem synergistischen Effekt auf die Endothelzellmigration. Darüberhinaus induzierte die *in vitro*-Gabe von SF/HGF zu menschlichen glatten Gefäßmuskelzellen eine Hochregulation von sowohl VEGF mRNA als auch Protein. *In vivo* zeigen die angiographischen, physiologischen und histologischen Ergebnisse, dass SF/HGF-induzierte Angiogenese deutlicher ausfiel als wie mit VEGF erzielt. SF/HGF ist somit eine potente Substanz für Strategien, welche darauf gerichtet sind, therapeutische Angiogenese zu fördern, wahrscheinlich als Ergebnis der Kombination direkter Effekte von SF/HGF auf Endothelzellen und der indirekten Effekte, einschließlich einer parakrinen Hochregulation von VEGF in glatten Muskelzellen, wie *in vitro* gezeigt wird.

4.2. Material und Methoden

rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅

rhSF/HGF wurde in Ovarzellen chinesischer Hamster produziert, welche mit einem Plasmid transfiziert wurden, das die natürliche menschliche SF/HGF-Sequenz in gesamter Länge kodiert. Das rhSF/HGF wurde dann in seine bioaktive, heterodimere Form durch eine Modifikation der von Naka und Mitarbeitern¹⁶⁷ beschriebenen Methode konvertiert und durch konventionelle Chromatographie wie früher beschrieben aufgereinigt.¹⁶⁸ Die 165-Aminosäuren homodimerische Isoform von VEGF (rhVEGF₁₆₅) wurde von transfizierten Ovarzellen chinesischer Hamster wie vorbeschrieben gereinigt.¹⁶⁹ Die Reinheit des Materials wurde durch eine silber-gefärbte SDS-PAGE Gelelektrophorese und durch das Vorhandensein der spezifischen NH₂-terminalen Aminosäuresequenz bestätigt.

Zellkultur

HUVECs wurden aus Nabelschnurvenen mittels Kollagenasebehandlung isoliert wie anderweitig beschrieben⁸⁸ und in Medium 199 (Gibco Life Technologies) kultiviert, welchem 20% fetales Rinderserum (FBS) (Gibco), 100 µg/ml Endothelzellwachstumszusatz und 50 U/ml Heparin (Sigma Chemical Co.) zugesetzt worden waren. Humane glatte Gefäßmuskelzellen (HVSMCs) wurden durch Auswachsenlassen von unbenutzten Abschnitten der Aa. mammariae internae gewonnen, welche wie vorbeschrieben während aortokoronarer Bypassoperationen erhalten wurden.¹⁷⁰ Diese Zellen wurden in DMEM ergänzt mit 10% FBS kultiviert.

Northern Blot-Analyse kultivierter HVSMCs

Konfluente HVSMCs der Passagen 3 bis 5 wurden für 48 Stunden vor jedem Experiment in gefiltertem DMEM, welches 0.5% FBS enthielt, Wachstums-arretiert. Die Zellen wurden dann für

verschiedene Zeitspannen und mit unterschiedlichen Konzentrationen wie im weiteren angegeben mit rhSF/HGF behandelt. Stimulation der HVSMCs mit PMA (Phorbol-12-Myristat, 13-Acetat; ein Phorbolster) (Sigma) diente als Positivkontrolle für die VEGF-Genexpression.¹⁷¹ Von den HVSMCs wurde dann Gesamt-RNA mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion isoliert,⁹⁴ und anschließend eine Northern Blot-Analyse nach Standardmethoden durchgeführt.^{78, 95} Die cDNA-Probe für humanes VEGF bestand in einem 675 bp *EcoRI/Bgl II*-Fragment (erhalten von N. Ferrara, Fa. Genentech).

RT-PCR-Analyse kultivierter HVSMCs

cDNA-Synthese mittels reverser Transkription und PCR-Analyse wurden nach Standardmethoden bzw. wie unter 2.2 beschrieben durchgeführt.^{95, 96} Die für humanes VEGF (Gen bank accession number M32977) gewählten Primer waren für Sense (5'-3') GAA CTT TCT GCT GTC TTG GG und für Antisense (5'-3') TCA CCG CCT CGG CTT GTC AC. PCR resultierte in drei Banden (438-, 570- und 642-bp), korrespondierend zu den drei hauptsächlichlichen VEGF-Isoformen 121, 165 und 189, welche in human glatten Muskelzellen exprimiert sind.¹⁷¹ Für humanes GAPDH (X01677) wurden die folgenden Primer benutzt: Sense (5'-3') TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG, Antisense (5'-3') CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC. PCR ergab eine 983-bp Bande. Der lineare Bereich der exponentiellen PCR-Amplifikation wurde für jedes Primerpaar bestimmt, um eine semiquantitative PCR-Analyse zu ermöglichen.¹⁷² Die Anzahl der Zyklen wurde dann im linearen Bereich der Amplifikation gewählt: 29 Zyklen für VEGF, 20 Zyklen für GAPDH. Zehn µl jeder PCR-Reaktion wurde dann in einem 1.5% Agarosegel aufgetragen, und die Banden wurden dann nach Elektrophorese mittels Ethidiumbromid Färbung sichtbar gemacht. Die Banden wurden anschließend durch Scannen und Analyse mit der Eagle's Eye II Software densitometrisch quantifiziert. Die Signale für VEGF₁₆₅ wurden durch Teilen des Wertes mit dem Signal für GAPDH normalisiert, welches als Housekeeping-Gen hoch und weitgehend konstant exprimiert wird. Die Daten, die als relative Werte (VEGF₁₆₅/GAPDH) gezeigt sind, wurden dann gegen die Zeit geplottet. Die Ergebnisse repräsentieren drei unabhängige Amplifikationen aus zwei getrennt durchgeführten Experimenten.

Analyse der VEGF-Proteinexpression in kultivierten HVSMCs

Zur Analyse der VEGF-Proteinexpression in glatten Gefäßmuskelzellen mittels Western Blot wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer (1% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholsäure, 0.1% SDS in PBS, pH 7.4; 1 µM Leupeptin; 5 µM Aprotinin; 1mM PMSF; 1 µM Pepstatin (alle von Sigma Chemical Co.) pro 100 mm Platte lysiert. 100 µg der Proteinextrakte wurden mittels 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine 0.2 Micron PVDF-Membran (BioRad) transferriert. Die Membran wurde in 10% Trockenmilchpulver, 0.2% Tween-20 in PBS (TPBS), pH 7.4, geblockt und übernacht bei 4°C mit einem polyklonalen anti-humanem VEGF-Antikörper aus Kaninchen (1:200; Santa Cruz) inkubiert. Die Blots wurden dann mit 0.2% TPBS gewaschen und mit Peroxidase-gekoppeltem anti-Kaninchenantikörper aus Ziege (1:7,500; Santa Cruz) für 45 Minuten inkubiert. Nach ausgiebigem

Waschen mit TPBS und einem abschließendem Waschschritt mit PBS alleine wurden die immunreaktiven Banden mit dem ECL-Reagenz sichtbar gemacht (Amersham).

Endothelzell-Proliferationsassay

Zur Evaluierung der Zellproliferation wurde der kolorimetrische MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) Assay durchgeführt.¹⁷³ Hierzu wurden HUVECs in einer 96-well-Platte (5.000 Zellen/well) in 0.2 ml M199 (GIBCO BRL), ergänzt mit 5% FBS, ausgesät. MTT wurde in PBS aufgelöst, um eine Stammlösung von 5 mg/ml herzustellen. Nach der Inkubation der HUVECs mit rhSF/HGF, rhVEGF₁₆₅ oder der Kombination von beiden für 48 Stunden wurde die MTT-Lösung zu jedem well hinzugegeben (10 µl pro 100 µl Medium) und die Platten wurden bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Das Medium wurde verworfen und DMSO zu jedem well zugegeben, um die dunkelblauen Farbkristalle aufzulösen. Nach einigen Minuten Schwenken bei Raumtemperatur, um sicherzugehen, dass sich alle Kristalle aufgelöst haben, wurden die Platten mittels eines EAR 400 AT automatischen Plattenlesers (SLT Labinstruments, Salzburg) bei einer Test-Wellenlänge von 560 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 650 nm abgelesen. Die Platten wurden normalerweise innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe des DMSA ausgewertet. Alle Experimente wurden in vierfachen Ansätzen durchgeführt.

Endothelzell-Migrationsassay

Die Endothelzell-Migrationsassays wurden wie in 2.2. beschrieben durchgeführt.

Tiermodell

Die Fähigkeit rhVEGF₁₆₅ and rhSF/HGF, eine Kollateralbildung als physiologische Antwort auf Ischämie zu verstärken, wurde in einem Kaninchenmodell mit chronischer Ischämie der unteren Extremität, welches anderweitig beschrieben ist,^{98, 99} durchgeführt. Alle Protokolle wurden von der zuständigen Tierkommission geprüft. Insgesamt wurden 27 männliche New Zealand White Kaninchen (3.5 bis 4.0 kg) mit einer Mischung aus Ketamin (50 mg/kg) und Azepromazin (0.8 mg/kg) nach Prämedikation mit Xylazin (2 mg/kg) anästhesiert. Anschließend wurde eine Femoralarterie chirurgisch wie bereits beschrieben entfernt.⁹⁸ In diesem Modell resultiert die Exzision der Femoralarterie in einer retrograden, fortschreitenden Thrombusbildung und einem Verschluss der A. iliaca externa. Als Konsequenz hiervon hängt der Blutfluss zur ischämischen Extremität von Kollateralen ab, welche aus der A. iliaca interna entspringen.^{98, 99}

Design der in vivo-Experimente

Die Dosis an rhVEGF₁₆₅, welche in den folgenden *in vivo*-Experimenten benutzt wurde (500 µg), hatte sich in vorausgegangenen Untersuchungen als günstig herausgestellt, um in diesem Tiermodell mit Bolusgabe von rekombinaten rhVEGF₁₆₅-Protein einen angiogenetischen Effekt zu erzielen.^{28, 61} Um einen maximalen Effekt der alleinigen rhVEGF₁₆₅-Gabe zu erzielen, wurden drei

separate Injektionen von 500 µg verabreicht: die erste Dosis lokal (intraarteriell in die A. iliaca interna der ischämischer Extremität) und dann zwei zusätzliche Dosen intravenös; es ist vorbeschrieben, dass letzterer Verabreichungsweg ebenfalls einen biologischen Effekt erzielen könnte.¹⁷⁴ Weil die Dosis-Wirkungs-Kurven von rhVEGF₁₆₅ und rhSF/HGF bezüglich Migration und Proliferation von Endothelzellen in einem sehr ähnlichen Bereich lagen (siehe „Ergebnisse“), wurde die gleiche Dosis (500 µg pro Injektion) für SF/HGF gewählt.

10 Tage nach der Operation (Tag 0) und nach Messungen des Körpergewichts und der nicht-invasiven und invasiven hämodynamischen Parameter (s.u.) erhielten die Tieren einen intraarteriellen Bolus rhSF/HGF (500 µg, n=9), rhVEGF₁₆₅ (500 µg, n=9), oder Kontroll-Transportlösung (3 ml 0.9% Kochsalzlösung mit 0.1 % Kaninchen-Derumalbumin (Sigma); n=9), verabreicht als Bolus über eine Minute durch einen 3F-Endloch-Infusionskatheter (Tracker-18, Target Therapeutics), welcher in der A. iliaca interna der ischämischen Extremität positioniert worden war. Am 2. und 4. Tag wurde die gleiche Dosis des Wirkstoffes (oder Plazebo) intravenös verabreicht.

Am Tag 30 wurden alle Messungen wiederholt und die Tiere eingeschläfert. Leber, Nieren und Extremitäten wurden gewogen, und aus jedem Organ wurden Proben für eine histologische Untersuchung entnommen. Muskel- und Nierenproben wurden auch für die Mikrosphären-Analyse des Gewebeflusses (s.u.) entnommen.

Unterschenkel-Blutdruckindex

Siehe 2.2.

Angiographie und Dopplerdraht-Flußmessungen

Angiographie und Dopplerdraht-Messungen der Flußgeschwindigkeit wurden an den Tagen 0 und 30 wie anderweitig beschrieben durchgeführt.^{98, 100}

Zusätzlich zu den in Ruhe durchgeführten Messungen wurden die Endothel-abhängigen und Endothel-unabhängigen Gefäßreaktionen mittels intraarterieller Gabe von Acetylcholin und Nitroprussid (Sigma) nach zweiminütiger Gabe über eine Infusionspumpe mit konstanter Geschwindigkeit (1 ml/min) gemessen. Jedes Medikament wurde in die A. iliaca interna der ischämischen Extremität in einer Dosis von 1.5 µg/min/kg verabreicht.

Intravaskuläre Blutfluß-Messung in der ischämischen Extremität

Siehe 2.2.

Selektive Angiographie der A. iliaca zur Analyse der Kollateralgefäße

Siehe 2.2.

Messung des muskulären, renalen und hepatischen Blutflusses

Der Blutfluß zur Extremitätenmuskulatur und zu den Nieren wurde mittels farbigen Polystyren-Mikrosphären mit einem Durchmesser von 15 µm gemessen.^{100, 175} Das Prinzip der Quantifizierung von Mikrosphären basiert auf der Analyse der linearen Beziehung zwischen spektrophotometrisch bestimmter Absorption des Farbstoffs und der Anzahl der Mikrosphären. Nachdem die oben beschriebenen invasiven Messungen abgeschlossen waren, wurden demzufolge zwei verschiedene Sets von 3×10^6 gefärbten Dye-Trak Mikrosphären (Triton Technology) durch einen 3F Teflon-Katheter in den linken Ventrikel an den Tagen 0 und 30 injiziert. Zu jedem Zeitpunkt wurde die erste Injektion des Sets unter Ruhe-Ausgangsbedingungen und die zweite nach Nitroprussid-Infusion (15 µg/min/kg) in die abdominale Aorta verabreicht. Jedesmal wurde eine Referenz-Blutprobe mit einer Spritzenpumpe (Sage 351, Orion Research) aus einer peripheren Arterie (zentrale Ohrarterie) entnommen, um Mikrosphären mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1.2 ml/min zu erhalten. Nach Einschlafen der Tiere wurden insgesamt 14 Gewebeproben (jeweils 2 g) von sieben verschiedenen Muskeln (M. tensor fasciae latae, vastus lateralis, vastus medialis, adductor, semimembranosus, gastrocnemius und tibialis anterior) aus jeder unteren Extremität (ischämisch und nicht-ischämisch) entnommen. Ebenso wurden Proben aus rechter und linker Niere und von der Leber gewonnen und benutzt (1) als Kontrolle für eine rechts-links Homogenität des Blutmikrosphären-Gehalts und (2) um den Effekt der verabreichten angiogenetischen Faktoren auf den Blutfluß zu nicht-ischämischen Geweben zu untersuchen. Nach Gewebe- und Blutproben-Digestion mit Kaliumhydroxid, Mikrosphären-Extraktion durch Filtern und komplettes Entfernen des Farbstoffs mit Dimethylformamid wurde jede Probe mittels eines konventionellen Spektrophotometers (Modell 8452A, Hewlett Packard) analysiert.^{100, 175} Aus den Messungen der optischen Dichte (OD) wurde die Muskelperfusion, ausgedrückt in ml / min / 100 g, berechnet aus der folgenden Gleichung: Blutfluß der Muskelprobe (ml/min/g) = (OD der Gewebeprobe/OD der Referenz-Blutprobe) x {Entnahmegeschwindigkeit der Referenz-Blutprobe (ml/min)/Gewicht der Gewebeprobe (g)}.

Der muskuläre Blutfluß in jeder Extremität wurde als Mittelwert von 14 Proben ermittelt. Für jedes Tier wurde der muskuläre Blutfluß in der ischämischen Extremität zusätzlich als Prozentsatz des muskulären Blutflusses der nicht-ischämischen Extremität ausgedrückt.

Kapillardichte

Siehe 2.2.

Muskelgewicht

In jeder Extremität wurden die Muskeln in drei Gruppen eingeteilt: Externe Hüftregion, interne Hüftregion und Unterschenkel. Zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere wurde das Gewicht jeder Muskelgruppe (einschließlich den Proben, die für die Mikrosphären- und histologische Analyse benutzt wurden) für jede Extremität ermittelt. In jedem Tier wurde ein Muskelatrophie-Index für jede Muskelgruppe und für die gesamte Gliedmaße wie folgend berechnet: Muskelatrophie-Index = {1-

(Muskelgewicht in der ischämischen Extremität/Muskelgewicht in der nicht-ischämischen Extremität)} x 100.

Histologische Untersuchung von Leber und Nieren

Um mögliche systemische Nebenwirkungen der verabreichten angiogenetischen Faktoren zu erfassen, wurden Leber und Nieren gewogen, hiervon Gewebeproben systematisch entnommen und in 5-mm Scheibchen geschnitten, um mögliche morphologische Abweichungen erkennen zu können.

Statistische Auswertungen

Siehe 2.2.

4.3. Ergebnisse

SF/HGF induziert die Expression von VEGF mRNA und Protein in kultivierten HVSMCs

Zugabe von 25 ng/ml rhSF/HGF zu kultivierten HVSMCs bewirkte eine zeitabhängige Induktion der VEGF mRNA-Expression im Northern Blot (**Abb. 3.1A**). Während die Menge der VEGF mRNA in ruhenden (quiescent) glatten Gefäßmuskelzellen niedrig bis unterhalb der Nachweisgrenze lag, verstärkte sich die VEGF mRNA-Expression bereits deutlich innerhalb 3 Stunden nach Stimulation, war am stärksten nach 6 Stunden und hielt für mindestens 24 Stunden an. Die Induktion der VEGF mRNA-Expression war dosisabhängig, mit einem maximalen Effekt zwischen 25 und 50 ng/ml rhSF/HGF (**Abb. 3.1B**). Um unspezifische Effekte auszuschließen wurde als Negativkontrolle Rinderserumalbumin (BSA) zu glatten Muskelzellen gegeben, was zu keiner nennenswerten Änderung der VEGF mRNA-Basisexpression führte (**Abb. 3.1C**). PMA, welches die VEGF-Expression stark aktiviert, wurde als Positivkontrolle benutzt. RT-PCR-Analyse (**Abb. 3.2A**) zeigte eine gleichmäßige Induktion aller drei hauptsächlicher VEGF-Isoformen, und semiquantitative Auswertung des VEGF₁₆₅ PCR-Produkts bestätigte, dass die maximale Induktion sechs Stunden nach Stimulation mit rhSF/HGF auftrat (2.9 ± 0.13 -facher Anstieg im Vergleich mit nicht-stimulierten Kontrollen). Nach 18 und 24 Stunden nahm die VEGF₁₆₅ mRNA-Expression ab auf 2.4 ± 0.16 bzw. 2.3 ± 0.11 -fach (**Abb. 3.2B**).

Western Blot-Analyse bestätigte den Effekt von rhSF/HGF auf die VEGF-Expression auf der Proteinebene (**Abb. 3.3**).

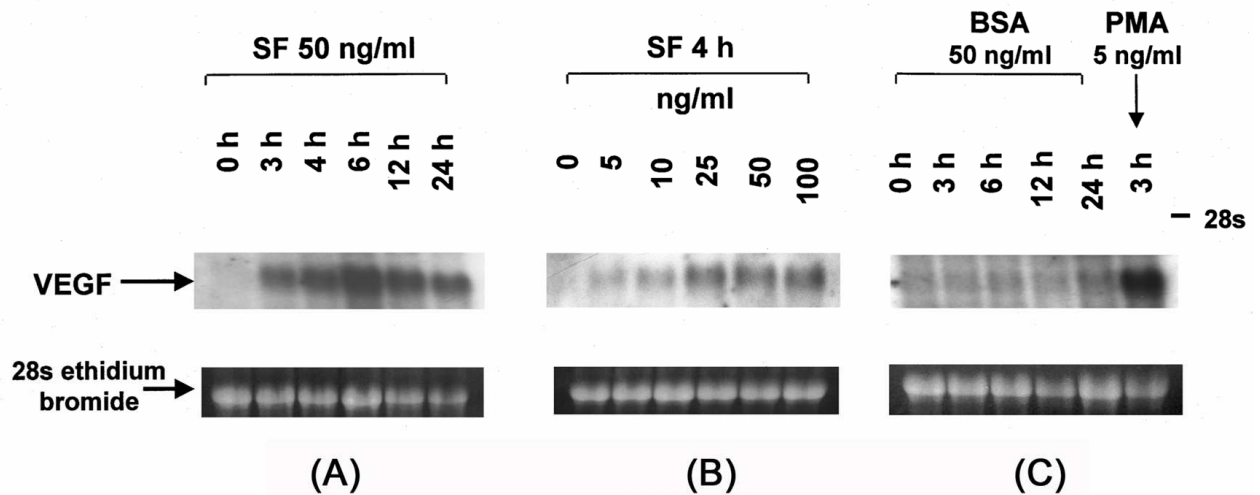


Abb. 3.1. Northern Blot Analyse, welche die Induktion von VEGF mRNA-Expression in glatten Muskelzellen (SMCs) nach Stimuliation mit rhSF/HGF zeigt. (A) Zeitverlauf der VEGF mRNA-Expression in SMCs nach Zugabe von rhSF/HGF. Stimulation von humanen glatten Gefäßmuskelzellen (HVCMCs) erbrachte eine zeitabhängige Induktion der VEGF mRNA-Expression. Während ruhende SMCs sehr wenig oder nicht-nachweisbare Mengen an VEGF mRNA enthalten, ist eine Zunahme 3 Stunden nach Stimulation sichtbar, welche nach 6 Stunden maximal ist und über 24 Stunden persistiert. (B) Northern Blot-Analyse der VEGF mRNA nach 4 Stunden, mit den angegebenen Konzentration an rhSF/HGF. Die Induktion der VEGF mRNA ist dosisabhängig, mit einem maximalen Effekt zwischen 25 und 100 ng/ml rhSF/HGF. (C) Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurden 50 ng/ml BSA zu HVSMCs zugegeben, was zu keiner Änderung der VEGF mRNA-Expression führt. PMA wurde als Positivkontrolle benutzt.

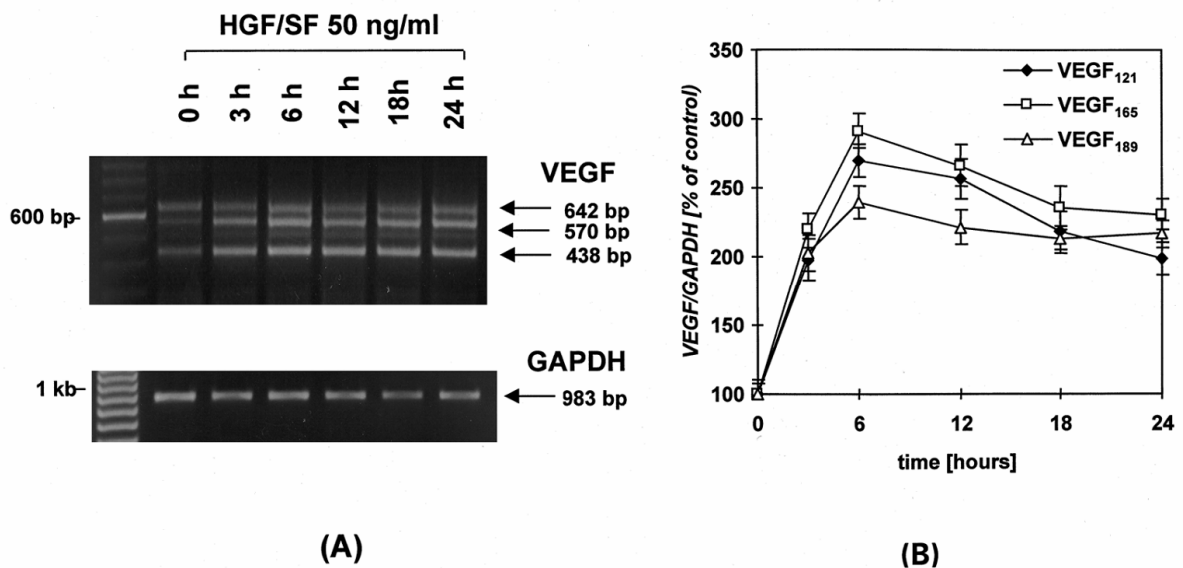


Abb. 3.2. RT-PCR, welche die simultane Induktion der mRNA aller drei hauptsächlich VEGF-Isoformen durch rhSF/HGF zeigt. (A) RT-PCR-Analyse ergab, dass die mRNA für alle drei hauptsächlich vorkommenden VEGF-Isoformen (121, 165, 189), welche durch alternatives Splicing entstehen, nach Zugabe von rhSF/VEGF induziert wird. (B) Quantitative Analyse der RT-PCR Produkte bestätigt, dass die Expression von VEGF₁₆₅ ihr Maximum nach 6 Stunden erreicht. Die Quantifizierung der PCR-Produkte durch Scannen und Normalisieren der Werte durch Teilen mit dem jeweiligen GAPDH-Wert zeigt, dass die maximale Induktion 6 Stunden nach Stimulation nachweisbar ist (2.9 ± 0.2 facher Anstieg im Vergleich mit dem Ausgangswert für VEGF₁₆₅). Nach 12 bzw. 24 Stunden ging die VEGF₁₆₅ mRNA wieder leicht zurück auf das 2.7 ± 0.1 - bzw. 2.4 ± 0.1 -fache des Ausgangswertes.

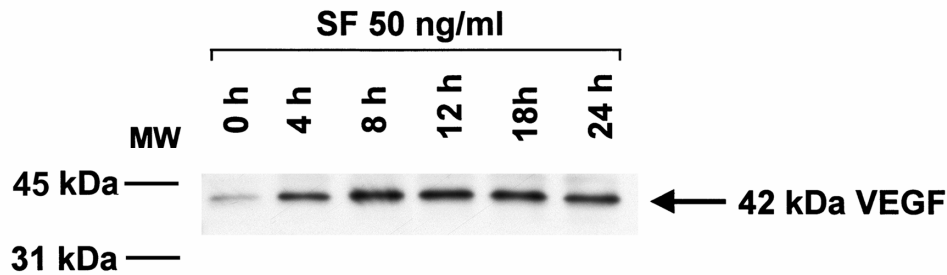


Abb. 3.3. Induktion von VEGF-Protein durch rhSF/HGF. Der Western Blot zeigt den Zeitverlauf der VEGF-Proteinproduktion in HVSMCs nach Stimulation mit 50 ng/ml rhSF/HGF.

In vitro-Effekte von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅, allein und kombiniert, auf die Endothelzell-Migration und -Proliferation

Der Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf die Proliferation und Migration kultivierter HUVECs ist in **Abb. 3.4** dargestellt. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der Antwort der Endothelzellen auf die beiden Zytokine über einen Konzentrationsbereich von 0.1 bis 1000 ng/ml. Für rhSF/HGF war der maximale Effekt (ausgedrückt als Prozent des Ausgangswertes) auf die Proliferation von HUVECs $139 \pm 13.4\%$ und für rhVEGF₁₆₅ $158.2 \pm 7.6\%$, $p = \text{n.s.}$ (**Abb. 3.4A**). In analoger Weise betrug der maximale Effekt von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf die Migration von HUVECs $233.9 \pm 6.4\%$ bzw. $278.1 \pm 6.7\%$, $p = \text{n.s.}$ (**Abb. 3.4B**).

Der kombinierte Effekt von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅, wenn gleichzeitig verabreicht, war wenigstens additiv für die Endothelzell-Proliferation ($p < 0.01$, **Abb. 3.4A**) ebenso wie für die - Migration ($p < 0.0001$, **Abb. 3.4B**). Zusätzlich zeigte sich, wenn submaximale Konzentrationen (1, 10, 50 und 100 ng/ml) benutzt wurden, ein synergistischer Effekt der beiden Zytokine hinsichtlich der Endothelzell-Migration ($p < 0.0001$). Bei 10 ng/ml ergab sich zum Beispiel ein Wert für rhSF/HGF+rhVEGF₁₆₅ von 250.3% des Ausgangswertes im Vergleich zu einem erwarteten Wert von 178.9% (rhSF/HGF alleine 76.3% und rhVEGF₁₆₅ alleine 102.6%; $p < 0.0001$).

Repräsentative Beispiele der Endothelzell-Migrationsassays mit einer Wachstumsfaktor-Konzentration von 10 ng/ml sind in **Abb. 3.5** gezeigt. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen erhalten (nicht gezeigt).

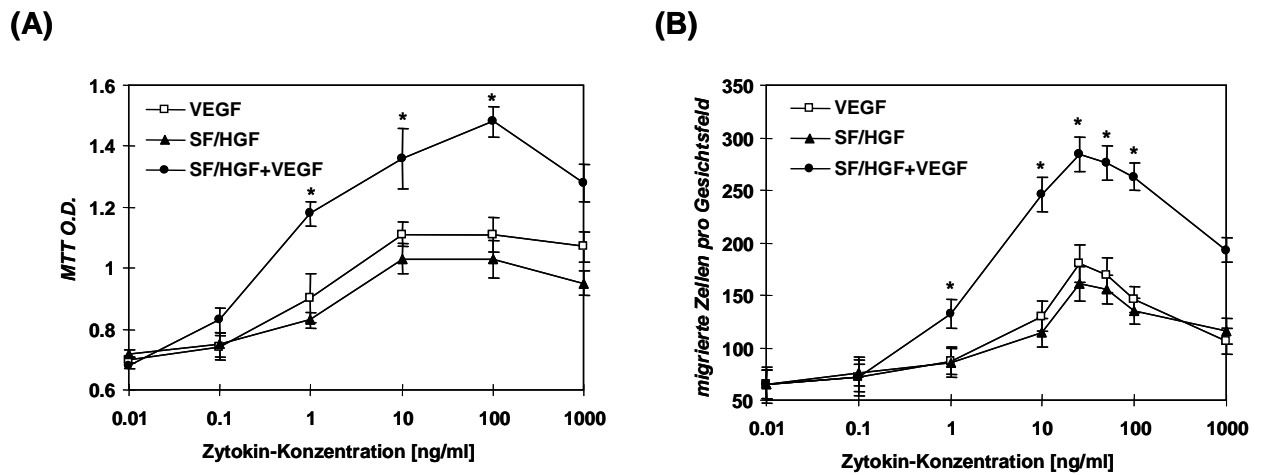


Abb. 3.4. Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF auf die Endothelzell-Proliferation und -Migration. **(A)** Proliferationsassay mittels MTT zeigt keinen Unterschied in der Dosis-Wirkungs-Kurve von HUVECs auf rhSF/HGF und rhVEGF, wenn beide Zytokine getrennt verabreicht werden. Ein additiver Effekt ist zu beobachten, wenn die beiden Zytokine kombiniert werden ($p < 0.01$). **(B)** Ein in einer modifizierten Boyden-Kammer durchgeführter Migrationsassay zeigt keinen Unterschied in der Dosis-Wirkungs-Kurve von HUVECs gegenüber rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅, wenn beide individuell verabreicht werden. Es besteht ein additiver Effekt wenn beide kombiniert werden ($p < 0.001$), und bei Dosen welche eine submaximale Antwort bewirken (1, 10, 50 und 100 ng/ml), besteht ein synergistischer Effekt (zweiseitiger ANOVA-Test; $p < 0.001$ für die Wechselwirkung).

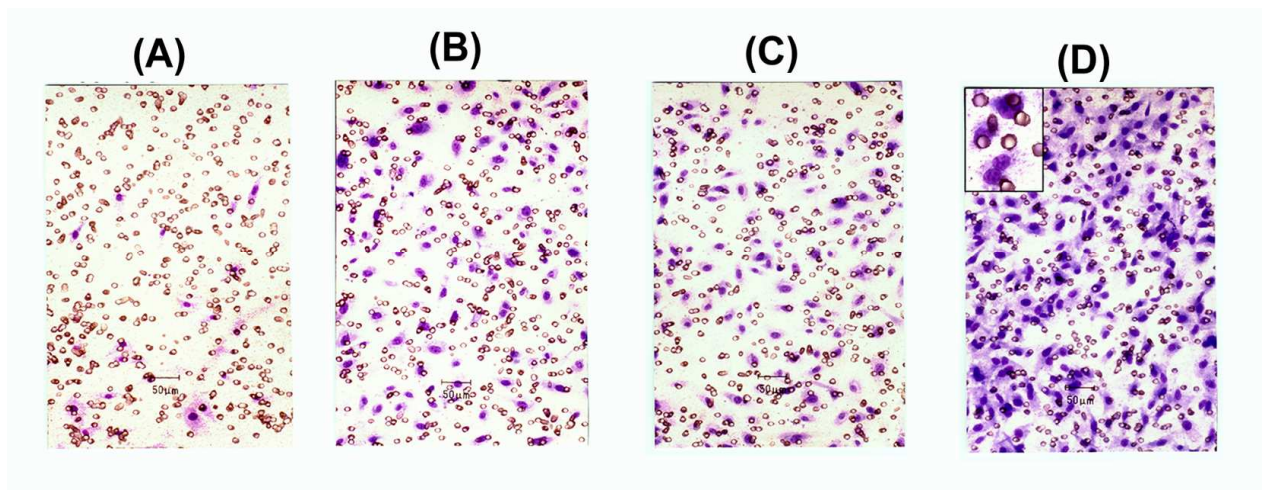


Abb. 3.5. Mikroskopische Aufnahmen der Endothelzellmigration. Fotomikrographien repräsentativer Membranen aus einer modifizierten Boyden-Apparatur für Migrationsassays, nachdem die nicht-migrierten HUVECs von der oberen Seite der Membran entfernt wurden und mit Giemsa-Lösung gefärbt wurden (x100). **(A)** Negativ-Kontrolle (keine Zugabe von Faktoren zur unteren Kammer); **(B)** rhVEGF₁₆₅ (10 ng/ml); **(C)** rhSF/HGF (10 ng/ml); **(D)** rhVEGF₁₆₅ (10 ng/ml)+rhSF/HGF (10 ng/ml). Der Einschub zeigt durch die Membranporen (8 µm) migrierte Zellen bei stärkerer Vergrößerung (x400).

Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf die Kollateralgefäßentwicklung in ischämischer Extremität

Auf der Grundlage der erhaltenen Ergebnisse, welche ähnliche direkte Effekte beider Zytokine auf Endothelzellen *in vitro* zeigen, wählten wir die gleiche Dosis an rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ um mittels dem Modell der ischämischen unteren Extremität die entsprechenden Einflüsse auf die Angiogenese *in vivo* zu untersuchen. Unsere Annahme war dabei, dass zusätzlich zu dem direkten Einfluß von SF/HGF auf die Endothelzell-Proliferation und dem synergistischen Effekt auf die Endothelzell-Migration in Kombination mit VEGF, die Fähigkeit von SF/HGF, eine vermehrte Synthese von VEGF in glatten Muskelzellen zu induzieren, zu einem stärkeren Effekt relativ zu rhVEGF₁₆₅ alleine auf die Angiogenese *in vivo* führen könnte.

Die quantitative Analyse der Kollateralgefäßentwicklung in der medialen Hüftregion der Kaninchen mit Extremitätenischämie ist in **Abb. 3.6A** zusammengefaßt. Vor Behandlung (Tag 0) unterscheiden sich die angiographischen Scores nicht signifikant zwischen den Behandlungsgruppen. Am Tag 30 ist der angiographische Score in sowohl der rhVEGF₁₆₅- als auch der rhSF/HGF-Behandlungsgruppe deutlich höher ($p < 0.001$) als in der Kontrollgruppe (Kontrolle = 0.55 ± 0.03 ; rhVEGF₁₆₅ = 0.71 ± 0.04 ; rhSF/HGF = 0.89 ± 0.04). Darüber hinaus war der angiographische Score in der rhSF/HGF-Gruppe signifikant höher als in der rhVEGF₁₆₅-Gruppe ($p = 0.02$).

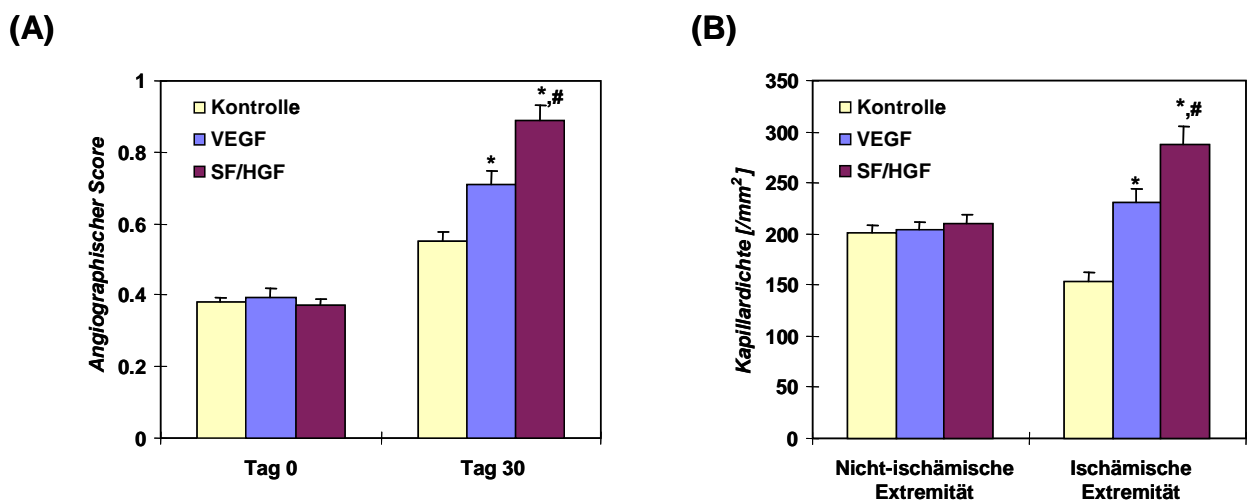


Abb. 3.6. Angiographischer und histologischer Nachweis verstärkter Durchblutung. **(A)** Angiographischer Score, welcher sich ergibt durch Quantifizierung von angiographisch sichtbaren Gefäßen in der medialen Hüftregion der ischämischen Extremitäten an den Tagen 0 und 30. Am Tag 0 bestehen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Am Tag 30 ist die Zahl der Gefäße signifikant mehr in den rhVEGF- und rhSF/HGF-behandelten Gruppen. Die Antwort auf rhSF/HGF ist signifikant stärker ausgeprägt als im Vergleich zu rhVEGF ($p = 0.02$). $*p < 0.001$ vs. Kontrolle; $\#p < 0.05$ vs. VEGF. **(B)** Kapillardichte, evaluiert am Tag 30 in histologischen Schnitten der medialen Hüftmuskulatur von nicht-ischämischen und ischämischen Extremitäten. In den nicht-ischämischen Extremitäten ist die Kapillardichte nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen. In den ischämischen Extremitäten erhöhte rhVEGF und rhSF/HGF signifikant die Kapillardichte. Der Effekt von rhSF/HGF ist signifikant stärker ausgeprägt als der Effekt von VEGF ($p = 0.018$). $*p < 0.001$ vs. Kontrolle; $\#p < 0.05$ vs. VEGF.

In **Abb. 3.7** sind repräsentative Angiogramme der A. iliaca interna, durchgeführt am Tag 30, von Kontrollen, rhVEGF₁₆₅- und rhSF/HGF-behandelten Tieren dargestellt. In den rhVEGF₁₆₅- und rhSF/HGF-behandelten Gruppen ist die Kollateralgefäßentwicklung stärker ausgeprägt.

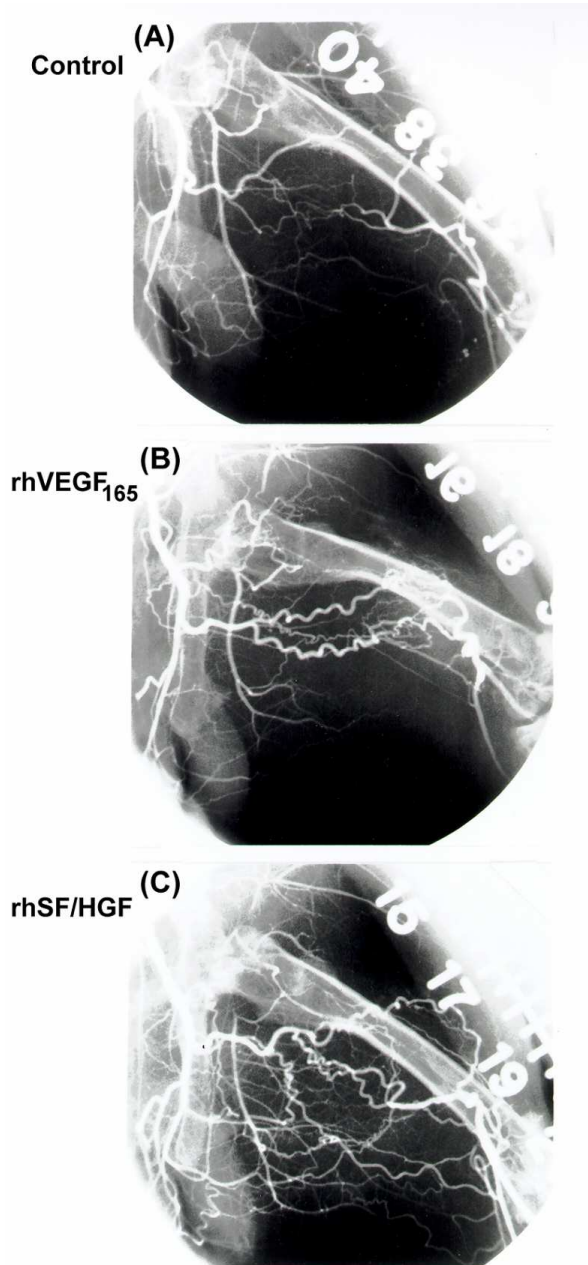


Abb. 3.7. Repräsentative angiographische Befunde. Selektive Angiogramme der A. iliaca interna am Tag 30, welche die Kollateralgefäßbildung zeigen. (A) Kontrolle, (B) rhVEGF₁₆₅-behandelte, (C) rhSF/HGF-behandelte Kaninchen. Mit rhSF/HGF-behandelte Tiere zeigen mehr angiographische sichtbare Kollateralen als Kontrollen (A) und rhVEGF₁₆₅-behandelte Tiere (500 µg x 3).

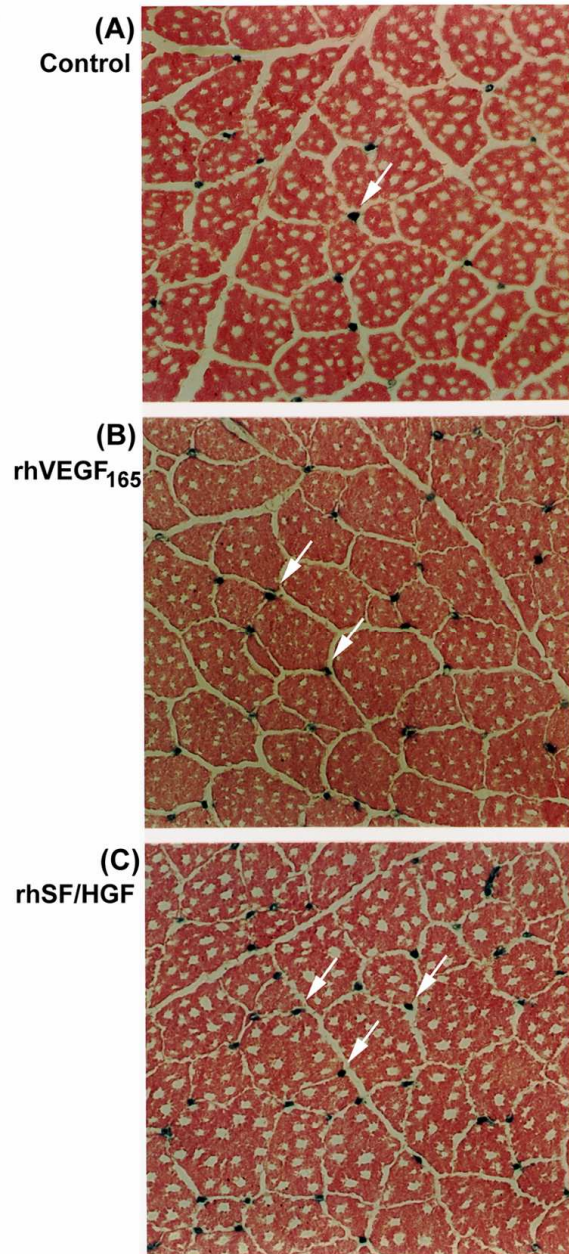


Abb. 3.8. Repräsentative histologische Befunde. Repräsentative Beispiele histologischer Schnitte, gefärbt mit alkalischer Phosphatase zur Identifizierung von Kapillaren in drei Versuchsgruppen: (A) Kontrolle, (B) rhVEGF₁₆₅ und (C) rhSF/HGF. Die mit rhSF/HGF-behandelten Tieren zeigen eine Zunahme der Kapillardichte im Vergleich zu den anderen Gruppen.

Der Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF auf die Blutgefäßdichte wurde ebenso mittels Lichtmikroskopie auf der Kapillarebene untersucht, um die Kapillaren/mm² in Gewebsschnitten, die von der medialen Hüftmuskulatur von ischämischen und nicht-ischämischen Extremitäten entnommen wurden zu quantifizieren. Die morphometrische Analyse ergab, dass die Kapillardichte in den rhVEGF₁₆₅- und rhSF/HGF-behandelten Gruppen signifikant höher ($p < 0.001$) als in der Kontrollgruppe lag (Kontrolle=153±10/mm²; rhVEGF₁₆₅=231±14/mm²; und rhSF/HGF=288±18/mm²). Die Kapillardichte in der rhSF/HGF-Gruppe war ebenso signifikant höher als in der rhVEGF₁₆₅-Gruppe ($p = 0.02$) (**Abb. 3.6B**). Eine Analyse des Verhältnisses zwischen Kapillaren und Zahl der Muskelfasern ergab ähnliche Ergebnisse (Kontrolle=0.41±0.03; rhVEGF₁₆₅=0.65±0.04; und rhSF/HGF=0.84±0.05 Kapillaren/Muskelfaser).

Eine Analyse der Kapillardichte und der Zahl der Kapillaren pro Muskelfaser aus Schnitten von der medialen Hüftmuskulatur der nicht-ischämischen kontralateralen Extremitäten ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Kontrolle=201±8; rhVEGF₁₆₅=204±8; und rhSF/HGF=210±9; $p = \text{n.s.}$) (**Abb. 3.6B**).

Repräsentative Beispiele von histologischen Schnitten, die mit alkalischer Phosphatase zur Identifizierung der Kapillardichte in den drei Versuchsgruppen angefärbt wurden, sind in **Abb. 3.8** dargestellt.

Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf den Blutdruck-Index

Der Unterschenkel-Blutdruckindex war in allen Gruppen am Tag 0 gleich. Am Tag 30 hatte sich der Blutdruckindex in allen Gruppen verbessert; in den mit rhVEGF₁₆₅- und rhSF/HGF-behandelten Gruppen war der Blutdruckindex jedoch höher ($p < 0.01$) als in der Kontrollgruppe (Kontrolle= 0.51±0.05; rhVEGF₁₆₅=0.71±0.04; und rhSF/HGF=0.88±0.04). Der Blutdruckindex in den mit rhSF/HGF-behandelten Kaninchen war wiederum signifikant höher als der in den mit rhVEGF₁₆₅-behandelten Tieren ($p < 0.05$).

Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf den iliakal-arteriellen Blutfluß

Die Blutfluß-Parameter wurden mittels eines in der A. iliaca interna der ischämischen Extremität positionierten Dopplerdrahtes an den Tagen 0 und 30 gemessen (**Abb. 3.9A**). Am Tag 0 bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen, weder im Ruhe- noch im maximalen Fluß. Am Tag 30 war der Ruhefluß höher in den rhVEGF ($p < 0.05$) und in den rhSF/HGF-behandelten Tieren ($p < 0.005$) als in den Kontrollen (Kontrolle=17.9±0.9 ml/min; rhVEGF₁₆₅=21.2±0.7 ml/min; rhSF/HGF=23.9±1.2 ml/min). Der maximale Fluß nach Nitroprussid-Infusion war signifikant höher ($p < 0.004$) sowohl in der mit rhVEGF₁₆₅- als auch in der mit rhSF/HGF-behandelten Gruppe, verglichen mit der Kontroll-Gruppe (Kontrolle=36.1±2.3 ml/min; rhVEGF₁₆₅=48.0±2.7 ml/min; rhSF/HGF=59.4±3.7 ml/min). Der maximale Fluß in den mit rhSF/HGF-behandelten Tieren war höher als in den mit rhVEGF₁₆₅-behandelten Tieren ($p = 0.02$). Die signifikante Zunahme im maximalen Fluß

in den mit rhVEGF₁₆₅- und rhSF/HGF-behandelten Kaninchen bedingte ein signifikant höhere ($p < 0.005$) Flußreserve als in der Kontrollgruppe (Kontrolle= 2.01 ± 0.06 ; rhVEGF₁₆₅= 2.26 ± 0.06 ; rhSF/HGF= 2.47 ± 0.05). Die Flußreserve in den mit rhSF/HGF-behandelten Tieren war ebenfalls signifikant höher als in den mit rhVEGF₁₆₅-behandelten Tieren ($p = 0.016$).

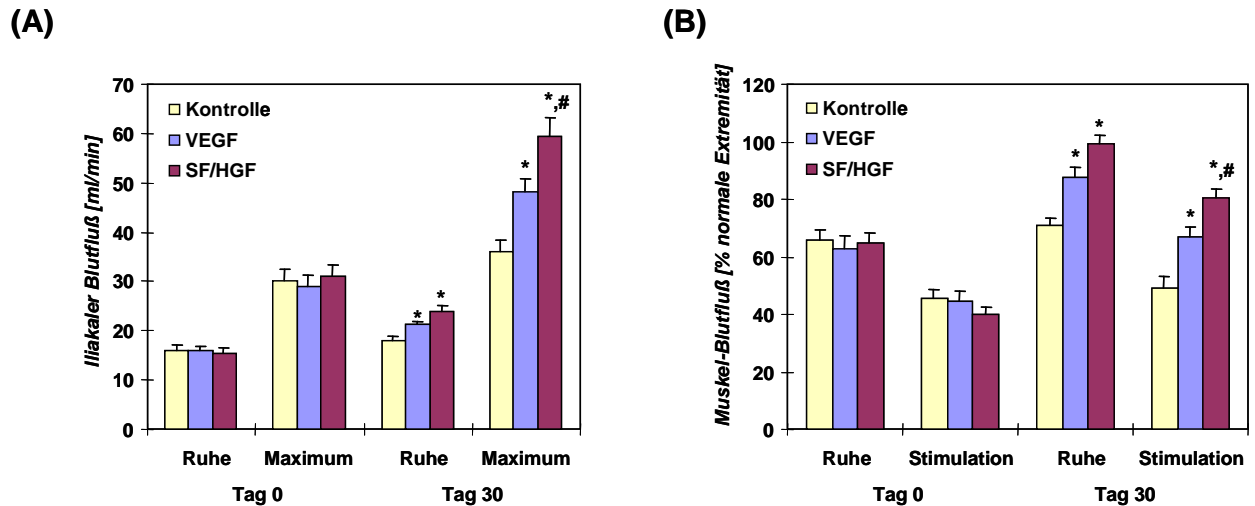


Abb. 3.9. Analyse des iliakalen Blutflusses und der Durchblutung der Skelettmuskulatur. **(A)** Blutfluß in der A. iliaca interna der ischämischen Extremität, gemessen an den Tagen 0 und 30. Am Tag 0 bestehen keine Unterschiede zwischen den Gruppen, weder in Ruhe noch nach Nitroprussid-Infusion („Maximum“). Am Tag 30 ist der Ruhefluß durch SF/HGF signifikant erhöht ($p = 0.0012$), während der maximale Blutfluß sowohl durch VEGF ($p = 0.0039$) als auch durch SF/HGF ($p < 0.0001$) deutlich erhöht ist. Der maximale Blutfluß ist in der SF/HGF-behandelten Gruppe signifikant höher als in der VEGF-behandelten Gruppe * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; # $p < 0.05$ vs. VEGF. **(B)** Skelettmuskeldurchblutung der ischämischen Extremität (ausgedrückt als Prozentsatz der Perfusion der nicht-ischämischen Extremität), gemessen an den Tagen 0 und 30. Am Tag 30 bestehen keine Unterschiede zwischen den Gruppen, weder in Ruhe noch nach Stimulation mit Nitroprussid. Am Tag 30 hat der in Ruhe gemessene Muskelblutfluß durch VEGF ($p = 0.002$) und SF/HGF ($p < 0.0001$) zugenommen. Ein vergleichbarer Effekt zeigt sich nach Stimulation (für VEGF, $p = 0.0004$ und für SF/HGF, $p < 0.0001$), mit einer noch deutlicheren Verbesserung durch SF/HGF ($p = 0.01$). * $p < 0.005$ vs. Kontrolle; # $p < 0.01$ vs. VEGF.

Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf die Muskeldurchblutung

Der muskuläre Blutfluß wurde an den Tagen 0 und 30 mittels farbiger Mikrosphären gemessen (**Abb. 3.9B**). Für jedes Tier ist die Muskeldurchblutung in der ischämischen Extremität angegeben als Prozentsatz des Muskelflusses in der nicht-ischämischen Extremität. Die Homogenität der Mikrosphärenverteilung wurde durch die Messung der Blutflüsse zur rechten und linken Niere verifiziert ($r = 0.99$; Steigung= 0.97 ± 0.04 , Achsenabschnitt= 0.14 ± 0.10).

Am Tag 0 bestand kein Unterschied zwischen den Gruppen für den in Ruhe gemessenen muskulären Durchblutungsindex (Kontrolle= $65.6 \pm 3.9\%$; rhVEGF₁₆₅= $62.9 \pm 4.2\%$; rhSF/HGF= $64.6 \pm 3.7\%$;

p=n.s.) oder nach Gabe von Nitroprussid (Kontrolle=45.4±3.0%; rhVEGF₁₆₅=44.4±3.7%; rhSF/HGF=39.8±2.9%; p=n.s.). Am Tag 30 war der Muskelblutfluß-Index in Ruhe in den mit rhVEGF₁₆₅- und rhSF/HGF-behandelten Tieren (p<0.002) im Vergleich zu den Kontrollen angestiegen (Kontrolle=71.1±2.3%; rhVEGF₁₆₅=87.6±3.7%; rhSF/HGF=99.1±3.4%). Der nach Nitroprussid gemessene Muskelblutfluß-Index verbesserte sich sowohl in der mit rhVEGF₁₆₅- als auch in der mit rhSF/HGF-behandelten Gruppe signifikant (p<0.0005) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle=49.1±3.9%; rhVEGF₁₆₅=66.9±3.7%; rhSF/HGF=80.3±3.3%). Der Muskelblutfluß-Index nach Nitroprussid war gleichzeitig höher für die mit rhSF/HGF-behandelten als für die mit rhVEGF₁₆₅-behandelten Tieren (p=0.01).

Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf die Muskelatrophie

Die Muskelatrophie, ermittelt durch den Muskelatrophie-Index (wie unter "Methoden" beschrieben), war in den Tieren, welche rhVEGF₁₆₅ or rhSF/HGF erhalten hatten, deutlich und signifikant (p<0.01) reduziert im Vergleich zu den Kontrollen (Kontrolle=28.67±2.47%; rhVEGF₁₆₅=14.25±2.52%; rhSF/HGF=4.27±2.65%). Der in der rhSF/HGF-Gruppe beobachtete Effekt war signifikant stärker ausgeprägt als in der rhVEGF₁₆₅-Gruppe (p=0.013) (**Tab. 3.1**).

Tabelle 3.1. Einfluß von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ auf den Index der Muskelatrophie in der ischämischen Extremität

	Kontrolle (n=9)	rhVEGF (n=9)	rhSF/HGF (n=9)
Interne Hüftregion	23.54±3.35	13.48±3.03*	2.90±2.21‡
Externe Hüftregion	29.50±2.66	14.41±2.28†	1.01±4.25§
Unterschenkel	35.06±4.76	13.70±4.82†	9.48±3.30‡
Extremität gesamt	28.67±2.47	14.25±2.52†	4.27±2.65§

Muskelatrophie-Index={1-(Muskelgewicht in der ischämischer Extremität/Muskelgewicht in der nicht-ischämischen Extremität) x 100

*p<.05 vs. Kontrolle; †p<0.01 vs. Kontrolle; ‡p<0.001 vs. Kontrolle; §p<0.0001 vs. Kontrolle; ||p<0.01 vs. rhVEGF;

Systemische Wirkungen von rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅

Obwohl ein Trend zu einem höheren Gewicht in den mit rhVEGF₁₆₅- and rhSF/HGF-behandelten Tieren zu beobachten war, bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Ebenso unterschieden sich weder Gewicht noch regionaler Blutfluß von Leber oder Niere zwischen den Gruppen. Eine mikroskopische Untersuchung histologischer Schnitte von diesen Organen ergab keine pathologischen Befunde (**Tab. 3.2**).

Tabelle 3.2. Einfluß von rhSF/HGF und von rhVEGF₁₆₅ auf Leber, Nieren- und Gesamtkörpergewicht und auf Leber- und Nierendurchblutung

	Kontrolle (n=9)	rhVEGF (n=9)	rhSF/HGF (n=9)
Körpergewichtszunahme (%)*	6.84±1.35	10.01±1.71	11.72±2.51
Nierengewicht (%)†	0.25±0.009	0.27±0.016	0.26±0.014
Lebergewicht (%)†	2.85±0.09	2.82±0.10	2.67±0.13
Nieren-Blutfluß (ml/min/g)	3.89±0.20	3.54±0.15	4.03±0.18
Leber-Blutfluß (ml/min/100 g)	12.23±2.05	10.54±1.77	11.44±1.94

Zwischen den Gruppen besteht für keinen Parameter ein signifikanter Unterschied.

*%=(Abschlußkörpergewicht-Ausgangskörpergewicht)/Ausgangskörpergewicht (x100).

†%=Organgewicht/Abschlußkörpergewicht (x100).

4.4. Diskussion

SF/HGF ist ein pleiotroper Wachstumsfaktor; sein Rezeptor *c-Met* wird in weit verbreitetem Ausmaß auf verschiedenen Zellpopulationen exprimiert, einschließlich auf sowohl Endothel- als auch glatten Gefäßmuskelzellen.¹⁶⁶ Zellen, welche mit der gesamten kodierenden *met*-cDNA transfiziert wurden, reagieren auf SF/HGF mit einem breiten Spektrum an biologischen Aktivitäten.¹⁷⁶ Wir zogen daher die Möglichkeit in Betracht, dass SF/HGF ebenso die VEGF-Expression in glatten Muskelzellen hochregulieren könnte. In der ersten Reihe von *in vitro*-Experimenten konnten wir in der Tat zeigen, dass SF/HGF die VEGF-Expression in humanen glatten Gefäßmuskelzellen induziert. Eine Induktion der VEGF-mRNA durch SF/HGF war in vorausgehenden Untersuchungen durch Ergebnisse, welche mit implantiertem Matrigel erhalten wurden, vermutet worden.¹⁷⁷ In diesem Bericht war weder die Zellart, welche für die Zunahme der VEGF-mRNA verantwortlich ist, noch die Möglichkeit einer Zunahme von VEGF auf der Protein-Ebene untersucht worden. Die vorliegenden Ergebnisse beweisen, dass in glatte Muskelzellen sowohl die VEGF-mRNA als auch die Proteinproduktion nach Stimulation mit SF/HGF erhöht ist. Darüberhinaus nahm die Expression aller drei hauptsächlich vorkommender VEGF-Isoformen gleichmäßig zu.

Die zweite Reihe von *in vitro* Experimenten legt nahe, dass der Einfluß von SF/HGF auf die Endothelzell-Migration und -Proliferation ähnlich ist zu der durch VEGF. Wenn SF/HGF und VEGF kombiniert verabreicht werden, übertrifft jedoch die mitogene und chemotaktische Antwort von kultivierten Endothelzellen diejenige, welche mit jeweils einem Zytokin alleine erreicht wird. Zusammengenommen legen die Ergebnisse nahe, dass in einem Milieu, in welchem sowohl Endothel- als auch glatte Muskelzellen vorhanden sind, wie es *in vivo* der Fall ist, SF/HGF eine potente Kombination von direkten und indirekten Effekten ausübt, einschließlich direkten Auswirkungen auf

Endothelzellen und indirekten Mechanismen, welche via einer Zunahme in der Produktion an VEGF vermittelt werden. Als Konsequenz solcher kombinierter Effekte könnte man einen potenten Wirkungsmechanismus vermuten, um Angiogenese *in vivo* zu stimulieren.

Die Ergebnisse der *in vivo* Experimente bestätigen in der Tat diese Annahme. Die im Kaninchenmodell mit ischämischer Extremität erhaltenen Ergebnisse legen nahe, dass SF/HGF therapeutisch nützlich sein könnte, um die Kollateralgefäßentwicklung und den Blutfluß zur ischämischen Extremität zu verbessern. Andere Untersucher haben in früheren Untersuchungen den Einfluß von SF/HGF in anderen *in vivo*-Assays untersucht, einschließlich in Matrigel- und Cornea-Taschenassays.^{37, 161} Die vorliegenden Beobachtungen erweitern diese vorausgegangenen Ergebnisse, indem sie zeigen, dass die Gefäßneubildung bzw. -umformung, welche sich als Reaktion auf SF/HGF entwickelt, auch zu einer funktionellen Verbesserung führt, wie der Anstieg des arteriellen Blutflusses zur ischämischen Extremität, die Verbesserung in der Skelettmuskeldurchblutung und die signifikante Reduzierung der Muskelatrophie nahelegen.

Der Nachweis eines aufgeprägten günstigen Effekts auf die Angio- bzw. Arteriogenese nach exogen zugeführten SF/HGF in diesem Modell peripherer Extremitätenischämie ist im Einklang mit früheren Beschreibungen einer transienten Expression in der Skelettmuskulatur während der Embryogenese und nach Ischämie,¹⁵⁹ im Gegensatz zur fehlenden Expression in normaler erwachsener Muskulatur.^{158, 159} Die Möglichkeit, dass SF/HGF eine Schlüsselrolle in der Modulation von Angiogenese als Reaktion auf Ischämie spielen könnte, wird zusätzlich unterstützt durch das vor kurzem veröffentlichte Ergebnis, dass die Expression von SF/HGF nach myokardialer Ischämie und Reperfusion verstärkt ist.¹⁶⁴

Unsere vorliegenden *in vivo*-Untersuchungen lassen ebenfalls erkennen, dass SF/HGF die mit VEGF alleine induzierte Neovaskularität übertrifft. Trotz einer vergleichbaren Dosis-Wirkungs-Beziehung *in vitro* und dem gleichen Verabreichungsschema (3x500 µg) *in vivo* war sowohl der angiographische als auch der histologische Nachweis stattgehabter Angio- bzw. Arteriogenese in den Tieren, welche SF/HGF erhalten hatten, deutlicher ausgeprägt als in denen, welche mit VEGF behandelt wurden. Diese *in vivo*-Ergebnisse erweitern unsere *in vitro*-Resultate, indem sie nahelegen, dass die Fähigkeit von SF/HGF, Angiogenese durch direkte Effekte auf die Endothelzell-Proliferation und -Migration zu induzieren, *in vivo* potenziert wird durch die Fähigkeit, indirekt Angiogenese durch Hochregulation eines oder mehrerer anderer Zytokine zu induzieren, wie hier für VEGF gezeigt ist.

Der direkte Vergleich zwischen SF/HGF und VEGF, wie er in unseren *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt wurde, läßt vermuten, dass Endothelzell-Spezifität nicht notwendigerweise eine vorteilhafte Eigenschaft für Zytokine ist, welche Angiogenese fördern sollen. Tatsächlich legen die *in vivo*-Ergebnisse vom Standpunkt der Bioaktivität aus nahe, dass die pleiotropen Eigenschaften von nicht-endothelzellspezifischen Mitogenen wie SF/HGF ein wichtiges Mittel zum Zweck sein könnte,

Neovaskularisierung in ischämischen Geweben zu optimieren. Der mögliche Nachteil pleiotroper Effekte, wie sie mit einem nicht-endothelzellspezifischem Mitogen verbunden sind, könnte das Risiko sein, in diesem Zusammenhang überflüssige Zellpopulationen zu stimulieren. In dieser Hinsicht ist es bemerkenswert, dass keine pathologischen Folgen mit der Dosis und dem Protokoll für die Verabreichung von SF/HGF beobachtet wurden, wie in diesen Experimenten angewandt. Insbesondere war das Körpergewicht nicht verändert und es bestanden keine Hinweise auf Angiogenese oder vermehrter Blutfluß in nicht-ischämischen Geweben. Wohingegen in früheren Berichten nahegelegt wurde, dass Anwendung von SF/HGF mit wachstumsfördernden Eigenschaften auf Leber und Niere assoziiert ist,^{160, 178-180} wurden darüberhinaus keine dieser Effekte in unserer Studie beobachtet. Es ist jedoch wichtig, darauf hinzuweisen, dass in diesen vorausgegangenen Berichten die wachstumsfördernden Eigenschaften von SF/HGF nur im Fall von Organverletzungen^{160, 178, 179} und /oder kontinuierlicher Gabe des angiogenetischen Zytokins gezeigt wurden.^{179, 180}

Die Abwesenheit begleitender pathologischer Effekte in der vorliegenden Reihe von Experimenten ebenso wie in einer anderen publizierten Arbeit¹⁷⁸ ist vereinbar mit der Vermutung, dass die *in vivo*-Antwort auf SF/HGF durch einen zugrundeliegenden Stimulus erleichtert bzw. vermittelt wird. In der Tat wurde eine ähnliche Ortsspezifität für basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) gezeigt.³⁵ In der bereits zitierten Arbeit von Ono und Mitarbeitern¹⁶⁴ wird vermutet, dass lokale Hochregulation des *c-Met* Rezeptors für die Regulation des Ausmaßes der SF/HGF-Bioaktivität verantwortlich sein könnte. Ein ähnliches Paradigma wurde für VEGF beschrieben, wobei die ortsspezifische Wirkung von VEGF zumindest zum Teil durch eine parakrine Hochregulation des KDR-Rezeptors (VEGFR-2) durch Faktoren, welche von hypoxischen Myozyten freigesetzt werden, erklärt werden kann.¹¹⁴ Es ist ebenfalls bemerkenswert, dass in vorausgegangenen Untersuchungen eine Stimulation des *c-Met* Rezeptors in glatten Gefäßmuskulzellen keine proliferative Antwort hervorgerufen hat.¹⁶⁶ Zudem könnte das Risiko von möglichen unerwünschten Nebenwirkungen in gesunden Organen durch ein Protokoll mit beschränkter Verabreichung vermieden werden. Diesbezüglich ist es günstig, dass das Zeitintervall, welches erforderlich ist für eine Neovaskularisierung ischämischer Gewebe in Tieren^{61, 174, 181} und Patienten,^{64, 111} typischerweise unter 30 Tagen liegt.

4.5. Zusammenfassung

Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor (SF/HGF) ist ein pleiotroper Wachstumsfaktor, welcher Proliferation und Migration von Endothelzellen stimuliert via seinen *c-Met* Rezeptor, welcher auf Endothelzellen ebenso wie auf anderen Zelltypen präsent ist, einschließlich glatten Muskelzellen. Wir untersuchten die Effekte von rekombinantem humanem SF/HGF (rhSF/HGF) *in vitro* und *in vivo* in einem Kaninchenmodell mit Ischämie der unteren Extremität. Wir verglichen darüberhinaus diese

Effekte mit denen von rekombinatem humanen Vascular Endothelial Growth Factor (rhVEGF₁₆₅), welches ein fast ausschließlich Endothelzell-spezifisches Mitogen ist. *In vitro* wiesen rhSF/HGF und rhVEGF₁₆₅ ähnliche Effekte auf die Proliferation und Migration von Endothelzellen auf. Wenn beide Zytokine zusammen verabreicht wurden, zeigte sich als Ergebnis ein additiver Effekt auf die Endothelzell-Proliferation und ein synergistischer Effekt auf die Endothelzell-Migration. Gabe von rhSF/HGF zu kultivierten human glatten Gefäßmuskelzellen resultierte in einer Induktion von VEGF mRNA und Protein. *In vivo* bewirkte die Verabreichung von rhSF/HGF (3x500 µg) eine signifikante Verbesserung der Kollateralgefäßbildung (p<0.001) und des regionalen Blutflusses (p<0.0005) sowie eine signifikante Reduktion der Muskelatrophie (p<0.0001). Diese Effekte waren deutlich stärker ausgeprägt als die mit rhVEGF₁₆₅ erzielten, bei gleichem Verabreichungsweg und -protokoll. Weder mit rhSF/HGF noch mit rhVEGF₁₆₅ zeigten sich Hinweise auf Angiogenese in weiter entfernt gelegenen Organen oder andere pathologische Folgeerscheinungen. Zusammenfassend könnten die pleiotropen Effekte bestimmter Wachstumsfaktoren Angiogenese potenzieren, und zwar einerseits durch eine Kombination von direkten Einflüssen auf die Endothelzell-Proliferation und -Migration und andererseits durch indirekte Einflüsse, welche in der Bildung anderer potenter Endothelzell-Mitogene in nicht-Endothelzellpopulationen resultiert. Die gezeigten synergistischen Effekte, wenn SF/HGF und VEGF *in vitro* kombiniert verabreicht werden, werden möglicherweise *in vivo* reproduziert durch eine Hochregulation von VEGF in glatten Gefäßmuskelzellen.

5. Chemotaktische Eigenschaften von Angiopoietin-1 und -2, Liganden für die endothel-spezifische Rezeptor-Tyrosinkinase Tie2

5.1. Einleitung

Die Tyrosinkinase-Rezeptoren spielen als Familie von Zelloberflächenproteinen eine Schlüsselrolle in der Transduktion interzellulärer Signale zum Zytoplasma.¹⁸² Zahlreiche Tyrosinkinase-Rezeptoren und verschiedene Expressionsmuster der Tyrosinkinase-Rezeptoren, welche während der embryonalen Entwicklung und unter pathologischen Bedingungen temporär modifiziert werden, bestimmen das Zellschicksal und erlauben gewebsspezifische Zellreaktionen. Die Ligandenbindung an die umfangreiche extrazelluläre Domäne der Tyrosinkinase-Rezeptoren führt zur Rezeptor-Dimerisierung und Autophosphorylierung von Tyrosin-Aminosäuren an der intrazellulären Domäne des Rezeptors.¹⁸³ Verschiedene Proteine mit Homologie zur Src 2-Domäne, welche an diese Phosphorylierungsstellen rekrutiert werden, sind dabei identifiziert worden.¹⁸⁴ Diese Proteine werden als Initiatoren verschiedener Signalkaskaden betrachtet, welche schließlich zu zellspezifischen Antworten wie Proliferation, Migration, Differenzierung und morphologische Organisation im Kontext von umgebenden Geweben führen.¹⁸⁵

Auf der Grundlage von Sequenzähnlichkeiten und strukturellen Charakteristiken ist es möglich, Tyrosinkinase-Rezeptoren in Subfamilien einzuteilen.¹⁸² Zwei Tyrosinkinase-Rezeptor-Subfamilien sind durch ihre weitgehende endothelspezifische Expression charakterisiert. Eine davon besteht aus den drei bekannten Vascular Endothelial Growth Factor-(VEGF-) Rezeptoren VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1 und VEGFR-3/Flt-4.^{30, 186} Die kritische Rolle dieser Rezeptoren in der Vermittlung von Vaskulogenese und Angiogenese während der normalen embryonalen Entwicklung wurde mittels Knock-out Mäusen mit gezielter Ausschaltung des *flt-1*¹⁸⁷ oder *flk-1*¹⁸⁸-Gens gezeigt. Darüber hinaus wird vermutet, dass die Expression dieser Rezeptoren in der Endothelschicht von Blutgefäßen Erwachsener⁸¹ einerseits VEGF-induzierte postnatale Angiogenese unter pathologischen⁶⁵⁻⁶⁷ oder therapeutischen^{61, 64} Gegebenheiten vermittelt, andererseits wichtig ist für die Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität.⁶⁰

Die Tie- (Tyrosinkinase mit Immunglobulin-(Ig) und Epidermal Growth Factor-(EGF-) Homologie-Domänen) Rezeptorfamilie stellt eine zweite endothelspezifische Tyrosinkinase-Rezeptor-Subfamilie dar, bestehend aus den Mitgliedern Tie1¹⁸⁹⁻¹⁹¹ und Tie2/Tek.¹⁹¹⁻¹⁹³ Ähnlich wie für die VEGF-Rezeptoren ist auch für diese beiden Rezeptoren gezeigt worden, dass sie maßgeblich an der Entstehung der embryonalen Vaskulatur beteiligt sind. Sowohl Tie1 knock-out Mäuse^{194, 195} als auch Tie2-defiziente Mäuse¹⁹⁶ wiesen einen letalen Phänotyp auf, verursacht durch schwere Defekte in der embryonalen Gefäßstruktur. Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass eine aktivierende Mutation des Tie2-Rezeptors Ursache angeborener venöser Malformationen bei Patienten sein kann;¹⁹⁷ diese missgebildeten Gefäße wiesen eine dysproportioniert große Zahl an Endothelzellen im Verhältnis zu

glatten Gefäßmuskelzellen auf, was die Bedeutung eines intakten Tie2-Rezeptorsystems für die Kommunikation zwischen Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen in der vaskulären Morphogenese unterstreicht.

Im Gegensatz zu den Liganden der drei VEGF-Rezeptoren, deren Bindungseigenschaften und Funktionen relativ gut charakterisiert sind,^{30, 31, 186} wurde der Ligand für den Tie2-Rezeptor, genannt Angiopoietin-1 (Ang1), erst kürzlich isoliert,⁴⁴ während der/die Ligand(en) für den Tie1-Rezeptor immer noch unbekannt sind. Gezielte Unterbrechung des Ang1-Gens in Mäusen führte zu einem letalen embryonalen Phänotyp am Tag 12.5 mit generalisierten Defekten in der Gefäßstruktur, welche an die erinnerten, die zuvor in Mäusen mit ausgeschaltetem Tie2-Rezeptor beobachtet wurden.¹³ Ang1-Protein phosphorylierte den Tie2-Rezeptor in verschiedenen Endothelzellarten, induzierte aber weder ein Wachstum von Endothelzellen noch die Bildung von gefäßartigen Tuben.⁴⁴ Tatsächlich konnte bisher in nur ganz wenigen *in vitro*-Assays eine biologische Funktion von Ang1 für Endothelzellen demonstriert werden. Eine Analyse der Ang1 mRNA-Expression in adulten Geweben ergab eine reichlich vorhandene Expression in stark vaskularisierten Geweben wie Skelettmuskulatur, Prostata, Ovar, Uterus und Plazenta,¹⁹⁸ was eine Rolle von Ang1 nicht nur für die embryonale Angiogenese, sondern auch im adulten Gefäßbaum nahe legt. In Anbetracht der spärlichen *in vitro*-Daten bleibt die physiologische Beteiligung von Ang1 an diesen Prozessen gegenwärtig jedoch noch unklar. Das zeitlich begrenzte Erscheinen der embryonalen Ang1-Expression lässt vermuten, dass das Ang1/Tie2-System nicht an der initialen vaskulogenen Phase der Gefäßentwicklung (wie es für des VEGF-System belegt ist) mitwirkt, sondern vielmehr am angiogenetischen Auswachsen und Verzweigen (sprouting), am Gefäßremodeling und an der vaskulären Gefäßreifung beteiligt ist.^{188, 194, 196} Die vor kurzem erfolgte Entdeckung eines natürlichen Antagonisten für den Tie2-Rezeptor, genannt Angiopoietin-2 (Ang2), welcher an den Tie2-Rezeptor bindet, ihn aber nicht transduziert, führte zu einer weiteren Erhöhung der Komplexität in der Regulation des Ang/Tie2-Systems.¹⁹⁸

Die in den vorliegenden Untersuchungen beschriebenen Ergebnisse sind mit die ersten, welche einen *in vivo*-Effekt von Ang1 auf Endothelzellen beschreiben. Es wird gezeigt, dass Ang1, aber nicht Ang2, als potentes und spezifisches chemotaktisches Protein auf Endothelzellen wirkt. Weder Ang1 noch Ang2 führte zu einer mitogenen Antwort in Endothelzellen. Die chemotaktische Antwort von Endothelzellen gegenüber Ang1 konnte durch Zugabe von löslichem Tie2-, nicht aber Tie1-Rezeptor, im Überschuss, ebenso wie durch ansteigende Mengen von Ang2 unterdrückt werden. Im Unterschied zu den für Ang2 und Endothelzellen gezeigten Befunden wiesen stabil mit Tie2-Rezeptor transfizierte Fibroblasten jetzt eine deutliche chemotaktische Reaktion auf sowohl Ang1 als auch Ang2 auf, was konsistent ist mit vorausgegangenen Beobachtungen, dass Ang2 den Tie2-Rezeptor in nicht-Endothelzellen aktivieren kann. Schließlich legt der konstitutive Nachweis einer Expression sowohl von Tie2-Rezeptor als auch Ang1 in normalen arteriellen und venösen Gefäßabschnitten von

erwachsenen Patienten eine mögliche Rolle des Ang2/Tie2-Systems in der Aufrechterhaltung einer vaskulären Integrität nahe.

5.2 Material und Methoden

Zellkultur und Medien

Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) wurden aus Nabelschnurvenen wie vorbeschrieben⁸⁸ mittels Kollagenasebehandlung isoliert und in Medium 199 (Gibco Life Technologies) kultiviert, welchem 20% fetales Rinderserum (FBS) (Gibco), 100 µg/ml Endothelzellwachstumszusatz und 50 U/ml Heparin (Sigma Chemical Co.) zugesetzt worden waren. Die HUVECs wurden zwischen Passage 3 und 5 benutzt. Humane mikrovaskuläre Endothelzellen dermalen Ursprungs (HMECs) wurden von Clonetics gekauft. Die Zellen wurden in EBM-Medium kultiviert, welchem humaner epidermaler Wachstumsfaktor (10 ng/ml), Hydrocortison (10 ng/ml), 5% FBS und 0.4% boviner Gehirnextrakt zugesetzt worden war. Die HMECs wurden zwischen Passage 4 und 6 für die Experimente eingesetzt. Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte wurden aus Ratten-Aorta wie vorbeschrieben¹⁹⁹ isoliert und in Dulbecco's modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) mit 10% FBS kultiviert. Menschliche glatte Gefäßmuskelzellen wurden durch Auswachsen aus unbenutzten Anteilen von V. saphena-Gefäßsegmenten, welche während Bypass-Operationen von Patienten entnommen worden waren, gewonnen¹⁷⁰ und in DMEM mit 15% FBS kultiviert. NIH 3T3-Fibroblasten wurden von der American Type Culture Collection (ATTC) erworben und in DMEM mit 10% FBS kultiviert. Stabile Transfektionen von Fibroblasten mit einem Expressionsplasmid, welches entweder für die Tie2-Rezeptor cDNA in gesamter Länge, oder für einen chimärischen Rezeptor bestehend aus der Ektodomäne von TrkC fusioniert an die zytoplasmatische Domäne von Tie2 kodiert, oder mit leerem Vektor (Mocktransfektion), wurden wie vorbeschrieben hergestellt.¹⁹⁸

Rekombinante Proteine

Rekombinantes Ang1* und Ang2-Protein wurden mittels Baculovirus-Vektoren hergestellt und mittels Protein A-Sepharose wie anderweitig beschrieben gereinigt.⁴⁴ Im Falle des Ang1 wurde das in den folgenden *in vitro*-Untersuchungen benutzte Protein vom Originalen modifiziert und mit Ang1* gekennzeichnet.¹⁹⁸ Die Reinheit der Proteine betrug aufgrund durchgeführter SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mehr als 95%. Lösliche Tie1-Rezeptor-Fc (rTie1-Fc) und Tie2-Rezeptor-Fc (rTie2-Fc) Fusionsproteine wurden konstruiert, produziert und gereinigt wie anderweitig beschrieben.⁴⁴ Heterodimeres rekombinantes humanes VEGF₁₆₅-Protein, produziert in *Escherichia coli*, wurde von Fa. Genentech (Drs. N. Ferrara, B. Keyt und S. Bunting) erhalten.

Zellproliferations-Assay

Das Ausmaß der Zellproliferation wurde mit dem kolorimetrischem MTS- (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) Assay mit dem Elektronenkopplungsreagenz Phenazinmethosulfate (CellTiter 96 AQ; Promega),] abgeschätzt. Die Validierung dieses Assays war bereits früher erfolgt und es ist gezeigt worden, dass die Extinktion mit der Zellzahl positiv korreliert.⁹⁰ Die Zellen wurden in Fibronectin-beschichtete 96-Well-Platten (5000 Zellen/Well) in 0.1 ml Serum-ergänzt Medium eingebracht und übernacht zur Anheftung inkubiert. Die angegebenen Faktoren wurden dann in 5% FBS für 48 Stunden in die wells zugegeben. Dann wurde in jede Well MTS/Phenazinmethosulfat-Mischung (20 µl; 1:0.05) zupipettiert und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Messung der Absorption bei 490 nm in einem ELISA-Plattenleser. Die Hintergrundabsorption von Kontrollwells wurde subtrahiert, und sieben Wells wurden parallel analysiert und für jede Bedingung gemittelt. Die Proliferationsexperimente wurden jeweils dreimal wiederholt.

Messung der DNA-Synthese (Thymidin-Assay)

Die endotheliale DNA-Synthese wurde mittels eines [³H]Thymidin-Inkorporationsassays untersucht. Insgesamt 2x10⁴ Zellen in M199 mit 5% FBS wurden pro Well in eine mit 1.5% Gelatine beschichtete 24-Well-Platte ausgesät und übernacht zur Anheftung inkubiert. Die spezifischen Konditionen (s.u.) wurden für 48 Stunden zugegeben, bevor dann 2 µl/ml [³H]Thymidin (Amersham Pharmacia Biotech) hinzupipettiert wurden. Nach 4 Stunden wurden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen und mit 10% Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert, in 0.25 N NaOH lysiert und dann in mit Szintillationsflüssigkeit gefüllte Glassgefäße überführt. Die Radioaktivität wurde dann in einem Beckmann-Zählgerät gemessen und als counts/Minute (cpm) ausgedrückt. Die Zugabe von Phorbol-12-Myristat 13-Acetat (PMA) (Sigma) dieste als Positivkontrolle, um [³H]Thymidin-Inkorporation zu induzierten. Alle Proben wurden in Dreifachansätzen gemessen.

Zellmigrationsassay

Die Zellmigrationsassays wurden prinzipiell wie unter 2.2 beschrieben durchgeführt. Die Polycarbonat-Filter wurden mit 50 µg/ml Fibronectin und 0.1% Gelatin für wenigstens 6 Stunden bei Raumtemperatur beschichtet.

Analyse der Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 und Tie2 Rezeptor-mRNA in kultivierten Zellen und in humanen Gefäßsegmenten

Ungebrauchte Segmente von menschlichen Blutgefäßen (Aa. mammae internae, Aa. radiales und Vv. Saphenae) wurden während Bypass-Operationen gewonnen. Diese Gefäßstücke wurden aus dem Operationsraum zum Zeitpunkt der Exzision erhalten und unmittelbar verarbeitet, um eine RNA-Degradation zu vermeiden. Dabei wurde besondere Vorsicht darauf verwendet, dass diese Gefäßabschnitte möglichst atraumatisch entfernt wurden, insbesondere auch unter weitgehender Begrenzung der Manipulationen der Endabschnitte der Gefäßsegmente. Die Gesamt-RNA aus diesen

Gefäßproben oder aus Zellkulturen, wie später angegeben, wurde dann unmittelbar mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion isoliert,⁹⁴ und die RNA-Konzentration anhand der Absorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt.

Die Reverse Transkription (RT)⁹⁵ wurde durchgeführt, indem zunächst ein 10 µl Reaktionsmix bestehend aus 1 µg Gesamt-RNA und 20 µg/ml Oligodesoxythymidin für 10 min bei 70°C erhitzt wurde. Nach Abkühlen wurden 60 Einheiten humaner plazentarer Ribonuclease-Inhibitor (Promega) und 200 Einheiten Moloney's murine Leukämievirus Rnase H (MMLV) Reverse Transkriptase (Life Technologies) in einem 20 µl-Reaktionsansatz hinzugegeben, welcher jeweils 1 mmol/l dNTP (Amersham), 10 mmol/l Dithiothreitol, 25 mmol/l Tris-HCL, pH 8.3, 75 mmol/l KCl und 3 mmol/l MgCl₂ enthielt, und für eine Stunde bei 42°C inkubiert, dann für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und schließlich auf 50 µl mit aqua bidest verdünnt. Für die Polymerase Kettenreaktion (PCR)⁹⁶ wurde eine 50 µl Reaktion, bestehend aus 5 µl cDNA, 200 µmol/l dNTP (Amersham), 20 mmol/l Tris-HCl, pH 8.55, 2.5 mmol/l MgCl₂, 16 mmol/l (NH₄)₂SO₄, 150 µg/ml BSA, 1 µmol/l des jeweiligen Oligonukleotid-Primers und 1.25 Einheiten *Taq*-Polymerase (Perkin-Elmer) den folgenden Temperaturzyklen unterworfen: 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 5 Sekunden Annealing bei 56°C und 1 Minute Extension bei 72°C. Am Ende des letzten Zyklus wurde ein verlängerter Extensionsschritt für 10 Minuten ausgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese analysiert, indem 10 µl von jedem PCR-Reaktionsgemisch in einem 1.5% Agarose-Gel aufgetragen wurden, und die Banden wurden durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt.

Die verwendeten Primer, jeweils Sense (3'-5') bzw. Antisense (5'-3') waren: für humanes Tie2 (GenBank Accession Number L06139) ATCCATTTGCAAAGCTTCTGGCTGGC und TGTGAAGCGTCTCACAGGTCCAGGATG (PCR-Produkt 512 Basenpaare); für humanes Ang1 (GenBank Accession Number U83508) GGGGGAGGYGGACTGTAAT und AGGGCACATTTGCACATACA (362 Basenpaare); für humanes Ang2 (GenBank Accession Number AF004227) GGATCTGGGGAGAGAGGAAC und CTCTGCACCGCGTCATCGTA (535 Basenpaare); und für humanes GAPDH (Glycerinaldehyd-3 Phosphatdehydrogenase) GenBank Accession Number X01677) TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTG und CATGTG GGCCATGAGGTCCACCAC (983 Basenpaare). Die Anzahl der Zyklen betrug 40 für Tie2, Ang1 und Ang2 und 28 für GAPDH.

Northern Blots von humanen Endothelzellen

Die Expression der Angiopoietine, von VEGF, Tie1 und Tie2 in humanen Endothelzellen wurde mittels Northern Blots untersucht. Gesamt-RNA wurde isoliert aus HUVECs niedriger Passage, aus humanen aortalen Endothelzellen, aus mikrovaskulären Endothelzellen dermalen Herkunft und aus mikrovaskulären Endothelzellen von kutanem Fettgewebe (alle von Fa. Clonetics). Die Zellen wurden

in dem empfohlenen Basalmedium ergänzt mit 5% FBS und Endothelzellzusätzen (Fa. Clonetics) bei 37°C im Inkubator mit gesättigter 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zur RNA-Isolation wurde das Medium entfernt und die Zellschicht mit PBS kurz gewaschen und dann mittels Guanidium Thiozyanat lysiert und nach Standardmethode verarbeitet.⁹⁴ Die Gesamt-RNA wurde mittels Elektrophorese im Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf Nylon-Membran geblottet und mit radioaktiv markierten cDNA-Proben hybridisiert. Zu Kontrollzwecken enthielten die Blots zusätzlich Poly(A)-RNA von humaner Plazenta und Lunge (von Fa. Clontech). Die Proben für Ang1, Ang2, Tie1 und Tie2 waren radioaktiv markierte Abschnitte der entsprechenden humanen cDNAs; die Probe für VEGF war die gesamte Länge einer Maus-VEGF₁₆₄ cDNA.¹⁸³

BIAcore und Western Blot – Nachweis von Ang2-Protein in konditioniertem Medium von HUVECs

Da HUVECs offensichtlich Ang2-RNA exprimieren, war die Frage, ob diese Zellen auch Ang2-Protein in das Kulturmedium sezernieren. Daher wurde konditioniertes Medium von HUVEC-Kulturen wie im Folgenden beschrieben gesammelt. Das normale Medium von subkonfluent gewachsenen HUVECs wurde mit Serum-freiem definiertem Medium ersetzt, die Zellen für weitere 24 Stunden kultiviert und danach erneut mit frischem definiertem Medium gefüttert. Nach zusätzlichen 24 Stunden Zellwachstum wurde das HUVEC-konditionierte Medium gesammelt, 10-fach durch Filtration konzentriert (Fa. Amicon, 10,000 molecular weight cut-off (MWCO)) und dann auf das Vorhandensein von Tie2-Bindungsaktivität auf einem Tie2-Fc-gekoppelten BIAcore Sensor-Chip (Fa. Amersham) untersucht, wie anderswo beschrieben.⁴⁴ Das HUVEC-konditionierte Medium enthielt 190 Resonanz-Einheiten für Tie2-spezifische Bindungsaktivität oder anders ausgedrückt ein rund 10-fach stärkeres Signal als das mit konditioniertem Medium von Angiopoietin-negativem Zellmedium.

Um nachzuweisen, ob diese Tie2-Bindungs-Aktivität tatsächlich Ang2-Protein darstellt, wurde das HUVEC-konditionierte Medium weiter 50-fach konzentriert (Fa. Centricon, 3000 MWCO), unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf einem SDS-Polyacrylamid-Elektrophoresegel aufgetrennt und auf Polyvinylidendifluorid-Membranen transferiert. Der anschließende immunspezifische Nachweis erfolgte mittels spezifischen Antikörpern gegen Ang1- und Ang2 und dem ECL-Kit (Fa. Amersham).

Statistische Analysen

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert±mittlere Standardabweichung (standard error of the mean=SEM). Die statistische Signifikanz wurde ermittelt durch Anwendung des ANOVA-Tests bei mehr als zwei Mittelwerten und des Student-t-Test für Vergleiche zwischen zwei Mittelwerten. Ein P-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant interpretiert.

5.3 Ergebnisse

Einfluss von Angiopoietin-1 und -2 auf die Endothelzell-Proliferation und DNA-Synthese

Um den Einfluss von Ang1- oder Ang-2 auf die zelluläre Proliferation zu untersuchen, wurden HUVECs mit steigenden Mengen an Ang-1, Ang-2 oder VEGF, welches bekanntermaßen ein Endothelzell-spezifisches Mitogen ist, für 48 Stunden stimuliert und MTS-Tests durchgeführt. Es war früher gezeigt worden, dass dieser Test präzise mit der Zellzahl korreliert.⁹⁰ VEGF-Behandlung führte zu einem signifikanten Dosis-abhängigem Anstieg der optischen Dichte, welche mit einem Anstieg der absoluten Zellzahl positiv korreliert. Die halb-maximale Antwort lag zwischen 1 und 10 ng/ml VEGF-Protein. Im Gegensatz hierzu führte weder die Stimulation mit Ang-1 noch mit Ang-2 über einen weiten Dosisbereich zu einem signifikantem Anstieg der Zellzahl (Abb. 5.1A). Darüber hinaus wurde der Effekt von Ang1- und Ang-2 auf die DNA-Synthese in HUVECs mittels [³H]Thymidin-Inkorporations-Assay evaluiert. Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (20 ng/ml) wurde als Positivkontrolle benutzt und führte zu einem 5.2±0.2-fachen Anstieg der DNA-Synthese im Vergleich zur Kontrolle. Während 10 ng/ml VEGF einen 2.1±0.03-fachen signifikanten Anstieg der [³H]Thymidin-Inkorporation induzierte, führten weder Ang-1 noch Ang-2, noch eine Kombination aus beiden zu einer Veränderung der DNA-Synthese im Vergleich zum Kontrollwert. Darüber hinaus änderte die Kombination von VEGF mit Ang-1 (2.2±0.1 fach) oder Ang-2 (2.1±0.01) nicht den Effekt von VEGF alleine auf die DNA-Synthese. Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn andere Konzentrationen von Ang-1 und Ang-2, alleine oder in Kombination, getestet wurden (Abb. 5.1B).

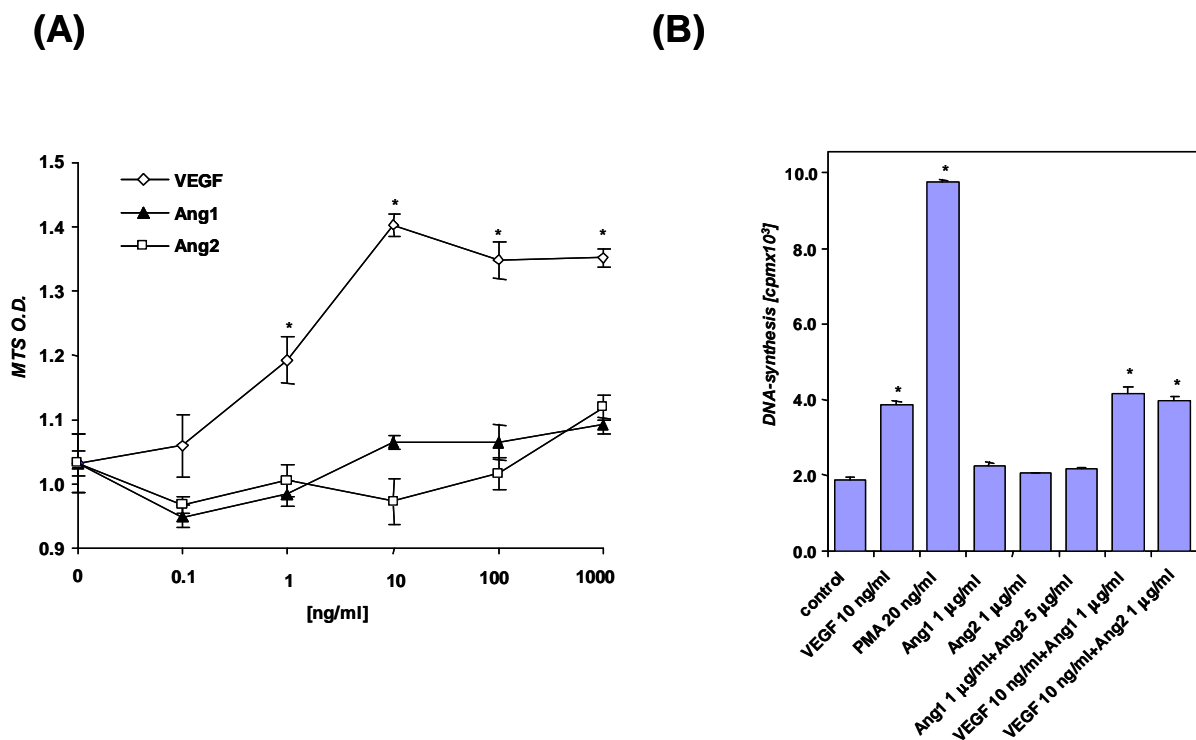


Abb. 5.1. (vorige Seite) **(A)** Messung der HUVEC- (human umbilical vein endothelial cell-) Proliferation mittels MTS-Assay, nach Stimulation mit steigenden Mengen an VEGF, Angiopoietin (Ang)1 oder Ang2. Insgesamt 5×10^3 Zellen/well wurden in eine Fibronectin-beschichtete 96-well-Platte eingebracht, und die Faktoren wurden für 48 Stunden zu den Zellen in die einzelnen wells wie angegeben eingebracht. Eine Stunde nach Zugabe des MTS/PM-Mix wurde die Absorbanz bei 490 nm in einem ELISA-Plattenleser gemessen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM für 7 wells. O.D.= optische Dichte. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle (kein Faktor zugegeben). **(B)** Messung der DNA-Synthese mittels $[3H]$ Thymidin-Inkorporation in HUVECs, nach Stimulation mit entweder einzelem Faktor oder Faktoren in Kombination wie angegeben. Insgesamt 2×10^5 Zellen wurden pro well in eine Gelatin-beschichtete 24-well-Platte eingebracht, und die angegebenen Konditionen wurden für 48 Stunden durchgeführt. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation mit $[3H]$ Thymidin und Präzipitation mit 10% TCA wurde die Radioaktivität gemessen und als Counts pro Minute (cpm) ausgedrückt. Zugabe von PMA (Phorbol-Myristat-Azetilat) wurde als Positivkontrolle benutzt. Jede Probe wurde im Dreifach-Ansatz gemessen, und die Balken zeigen die Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Kontrolle (Medium ohne Faktoren).

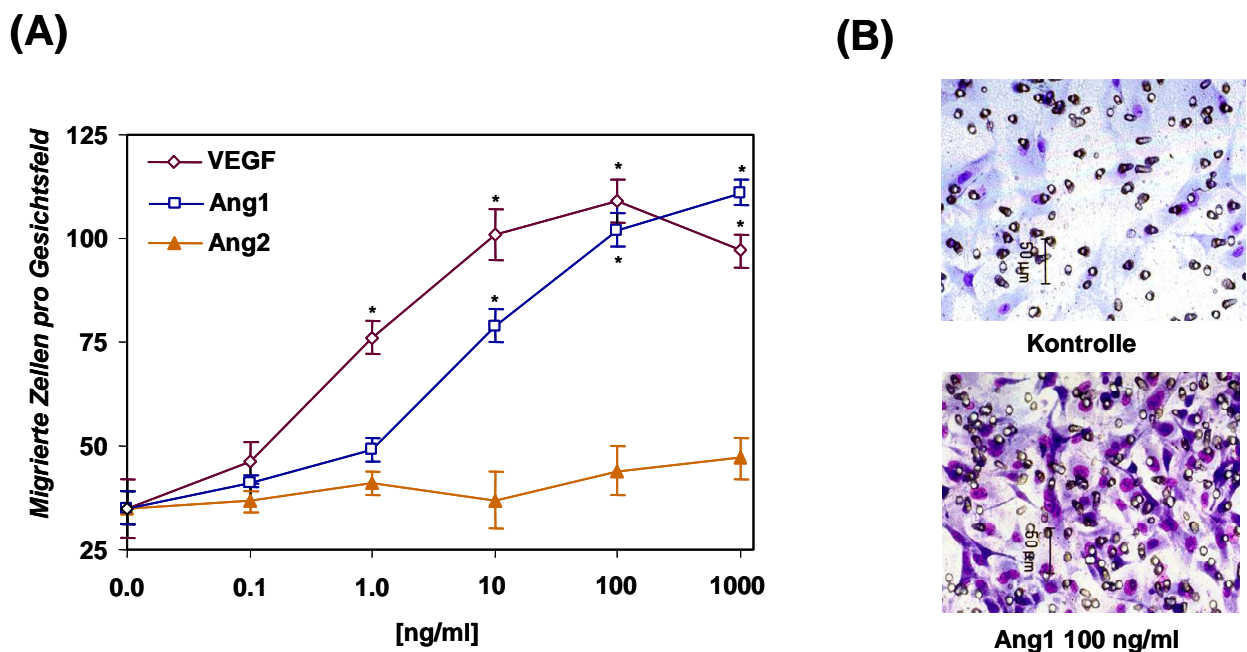


Abb. 5.2. **(A)** Chemotaktische Antwort von HUVECs auf steigende Konzentrationen von VEGF, Ang1 oder Ang2 wie angegeben. Die verdünnten Testsubstanzen wurden in die untere Kammer einer 48-well Mikrochemotaxis-Boydenkammer platziert. Insgesamt 2.5×10^5 Zellen wurden pro well in die untere Kammer eingebracht, und die Zellen konnten für 5 Stunden durch $8 \mu\text{m}$ -Poren einer mit Fibronectin und Gelatin-beschichteten Polycarbonat-Membran migrieren, welche zwischen oberer und unterer Kammer platziert worden war. Nach diesem Migrations-Zeitraum wurden die nicht-migrierten Zellen von der Oberseite der Membran entfernt und die Membran mit einer Giemsa-Lösung gefärbt. Die migrierten Zellen wurden quantifiziert, indem die Zellkerne in drei zufälligen Gesichtsfeldern (*HPF*) unter hoher Auflösung (100x) für jedes well gezählt wurden. Die Datenpunkte repräsentieren die migrierten Zellen für jeweils vier parallel ausgewertete wells \pm S.E. * $p < 0.05$ versus Kontrolle (Medium mit Lösungspuffer, ohne Zugabe eines Faktors). **(B)** Repräsentatives Beispiel einer Membran mit durch die $8 \mu\text{m}$ Poren migrierten Endothelzellen unter Kontrollbedingungen (oben; nur Medium) und mit 100 ng/ml Ang1 in der unteren Boydenkammer (unten). Zellkerne migrierter Zellen stellen sich nach Färbung violett dar.

Einfluss von Angiopoietin-1 und -2 auf die Migration von Endothelzellen

Mittels einer modifizierten Mikrochemotaxis-Boydenapparatur mit 48 Kammern wurde die chemotaktische Reaktion von HUVECs auf steigende Mengen Ang-1 und Ang2 bestimmt und mit der

auf VEGF verglichen, welches bekanntermaßen chemotaktisch für Endothelzellen ist.⁵⁶ Ang-1 führte zu einer signifikanten, dosisabhängigen Zunahme der gerichteten Migration von HUVECs, mit einer halb-maximalen Konzentration bei 10 ng/ml (Abb. 5.2). Während bei Konzentrationen von 1 und 10 ng/ml der chemotaktische Effekt von Ang-1 im Vergleich zu VEGF weniger stark ausgeprägt war, unterschied sich dieser bei höheren Dosen (100 und 1000 ng/ml) kaum. Im Gegensatz hierzu führte Ang-2 über einen weiten Dosisbereich zu keinen chemotaktischen Eigenschaften.

Um die Spezifität des beobachteten Effekts auf die gerichtete Zellmigration nachzuweisen, wurden zwei verschiedenen Dosen (0.1 und 1 µg/ml) Ang-1 mit oder ohne einem 10-fachen Exzess von entweder löslichem Tie2-Rezeptor (rTie2-Fc) oder löslichem Tie1-Rezeptor (rTie1-Fc) (1 und 10 µg/ml) in die untere Kammer der Boyden-Apparatur eingebracht. Wie in Abb. 5.3 gezeigt, blockierte rTie2-Fc, indem es Ang-1 von seinem zellulären Rezeptor aufgrund des molaren Überschusses verdrängte, vollständig den chemotaktischen Effekt von ang-1 auf HUVECs. Im Unterschied hierzu war rTie1-Fc, welcher ein nahe verwandter Rezeptor mit bisher unbekanntem Liganden ist und Ang-1 nicht bindet, nicht in der Lage, die Zellmigration suffizient zu unterdrücken. Beide Ergebnisse zusammengenommen sprechen dafür, dass die beobachteten Effekte tatsächlich auf Ang-1 in der Lösung zurückzuführen sind und nicht durch verbliebene Verunreinigungen nach dem Aufreinigungsprozess von Ang-1 und -2 erklärt werden können.

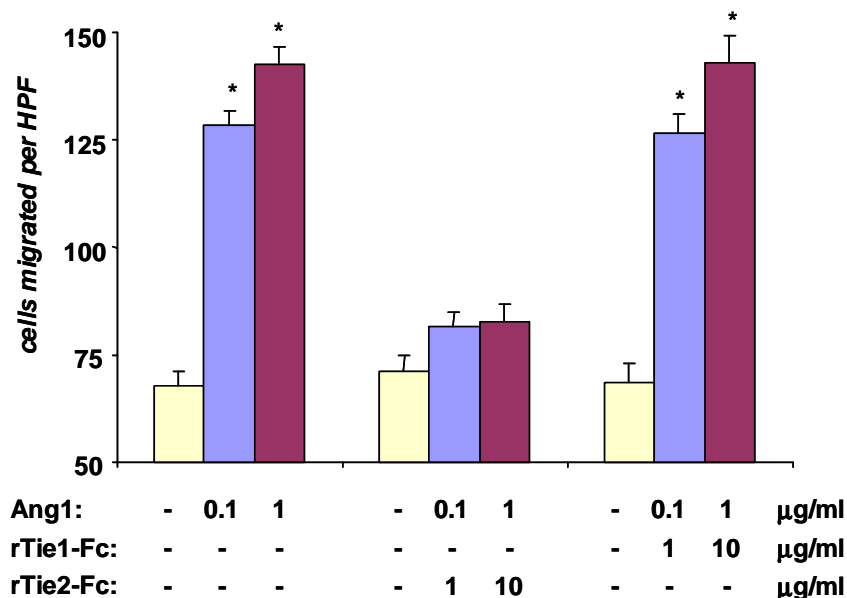


Abb. 5.3. Migrations-Assay, welcher demonstriert, dass der chemotaktische Effekt von HUVECs gegenüber Ang1 durch löslichen Tie2-Rezeptor (*rTie2-Fc*) im Überschuss, aber nicht durch löslichen Tie1-Rezeptor (*rTie1-Fc*) blockiert werden kann. Die Experimente wurden wie unter Abb. 5.3 beschrieben durchgeführt, indem zwei verschiedene Konzentrationen an Ang1 (0.1 und 1 µg/ml) in die unteren Migrations-Kammern mit oder ohne Ko-Inkubation mit einem 10-fachen Überschuss (1 und 10 µg/ml) an entweder *rTie1-Fc* oder *rTie2-Fc* gegeben wurden. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± S.E. aus vier parallel angelegten wells. *HPF*: 100x Gesichtsfeld. * $p < 0.05$ versus Kontrolle (Medium mit Lösungspuffer).

Um zwischen chemotaktischen und chemokinetischen Effekten von Ang1 auf Endothelzellen unterscheiden zu können, wurde eine modifizierte Checkerboard-Analyse durchgeführt, bei welcher die Konzentrationen der chemotaktischen Substanz ober- und unterhalb des Filters variiert werden. Die Tabelle 5.I zeigt auf, dass eine signifikante Migration nur beobachtet wurde, wenn ein Konzentrationsgradient von Ang-1 zwischen oberem und unterem Kompartiment besteht, was ein typischer Befund für Chemotaxis-induzierende Faktoren ist. Im Gegensatz hierzu, erhöhten äquivalente Konzentrationen von Ang1 auf beiden Seiten der Filtermembran nicht die Zellmotilität, was somit einen signifikanten chemokinetischen Effekt von Ang1 ausschließt.

Um die Zellspezifität des chemotaktischen Effekts nachzuweisen, wurde die chemotaktische Antwort von Endothelzellen und von glatten Gefäßmuskelzellen aus verschiedenen Geweben gegenüber Ang1 und Ang2 untersucht. Diesbezüglich wies Ang2 wiederum keinen Effekt auf die getesteten Zelltypen auf. Ang1 allerdings stimulierte die gerichtete Zellmigration boviner aortaler und humaner mikrovaskulärer Endothelzellen, wohingegen kein Effekt auf humane oder glatte Gefäßmuskelzellen beobachtet wurde (Abb. 5.4). Diese Ergebnisse belegen, dass der chemotaktische Effekt von Ang1 Zelltyp-spezifisch ist, aber nicht auf Endothelzellen einer bestimmten Herkunft limitiert ist.

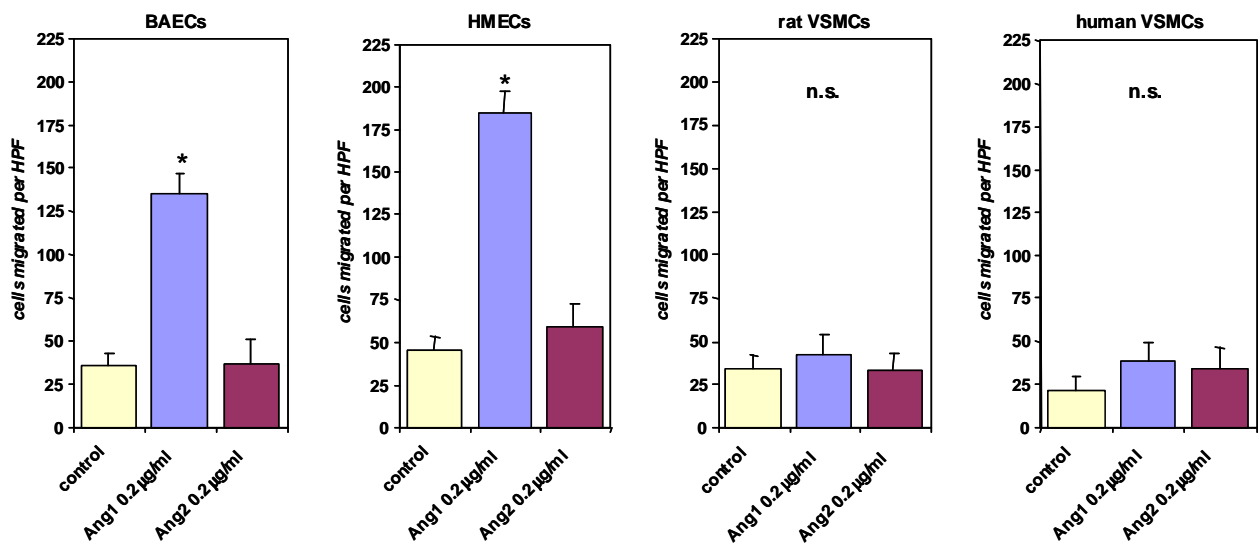


Abb. 5.4. Zelltyp-spezifischer chemotaktischer Effekt von Ang1 und Ang2. Die Migrationsassays wurden mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (*HMECs*), bovinen aortalen Endothelzellen (*BAECs*), vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte (*rat VSMCs*) sowie humanen glatten Gefäßmuskelzellen aus der V. saphena (*human VSMCs*) wie unter Abb. 5.2 beschrieben durchgeführt. 0.2 µg/ml Ang1 oder Ang2 wurden in die unteren Kammern der Boyden-Apparatur eingebracht. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± S.E. von vier parallelen Ansätzen. HPF: 100x Gesichtsfeld. * $p < 0.05$ versus Kontrolle. n.s., nicht signifikant.

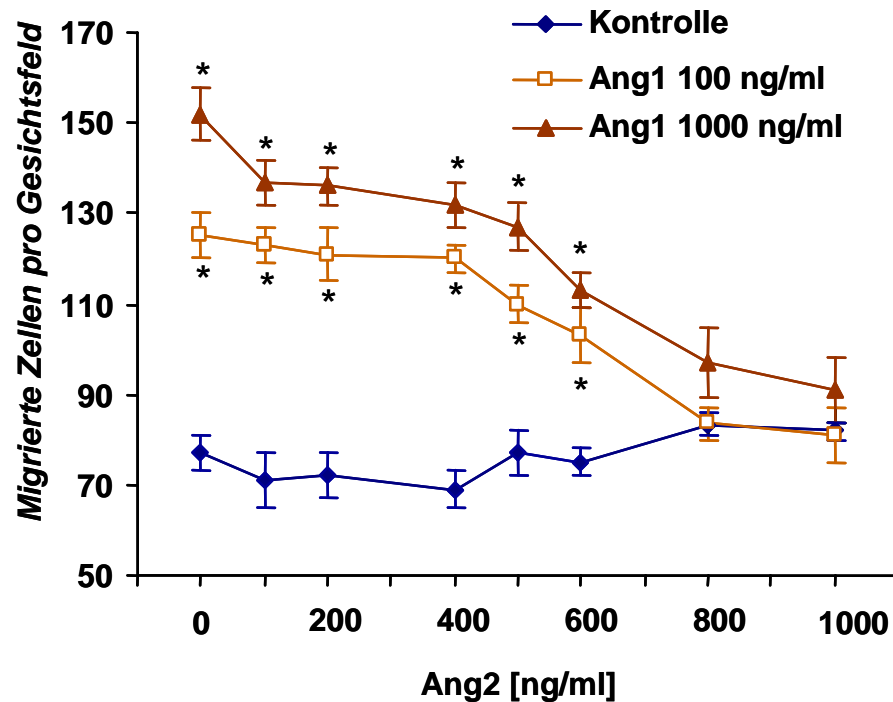


Abb. 5.5. Hemmung Ang1-induzierter Chemotaxis durch Ang2. Die Migrationsassays wurden mit HUVECs wie unter Abb. 5.2 beschrieben durchgeführt. Entweder Kontrolle (Medium kombiniert mit Lösungspuffer), 10 ng/ml oder 100 ng/ml Ang1 in Kombination mit ansteigenden Mengen an Ang2 (0-1000 ng/ml) wurden in die unteren Kammern der Boyden-Apparatur eingebracht, und die resultierende Zellmigration wurden nach 5 Stunden Inkubation quantifiziert. Mit 800 und 1000 ng/ml Ang2 kombiniert mit 100 ng/ml Ang1 (bzw. mit 1000 ng/ml Ang1), was einem 8- und 10fachen Überschuss an Ang2 gegenüber Ang1 entspricht, fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollwerten (kein Ang1). Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert \pm S.E. von 4 parallelen Ansätzen. HPF: 100x Gesichtsfeld. * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

Einfluss von Angiopoietin-2 auf den chemotaktischen Effekt von Angiopoietin-1

Weil vorausgehende Untersuchungen nahe gelegt haben, dass Ang2 ein natürlich vorkommender Antagonist für den Tie2-Rezeptor ist, haben wir untersucht, ob Ang2 fähig ist, die durch Ang1 hervorgerufene chemotaktische Reaktion auf HUVECs zu unterdrücken. Wenn man steigende Mengen von Ang2 zu einer konstanten Menge von Ang1 (100 ng/ml) in die untere Kammer der Boyden-Apparatur hinzufügte, dann wurde der chemotaktische Effekt von Ang1 auf diese Zellen kontinuierlich inhibiert (Abb. 5.5). Um die Zahl der migrierten Zellen auf den Ausgangs-Kontrollwert zu supprimieren, war hierbei ein 8-10-facher Überschuss von Ang2 gegenüber Ang1 erforderlich. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Ang2 fähig ist, kompetitiv zu Ang1 die Tie2-Rezeptorbindungsstellen zu belegen, jedoch führt die Bindung von Ang2 an Tie2 nicht zu den gleichen Rezeptorvermittelten -Signaltransduktions-Ereignissen, welche erforderlich sind, um Chemotaxis auszulösen.

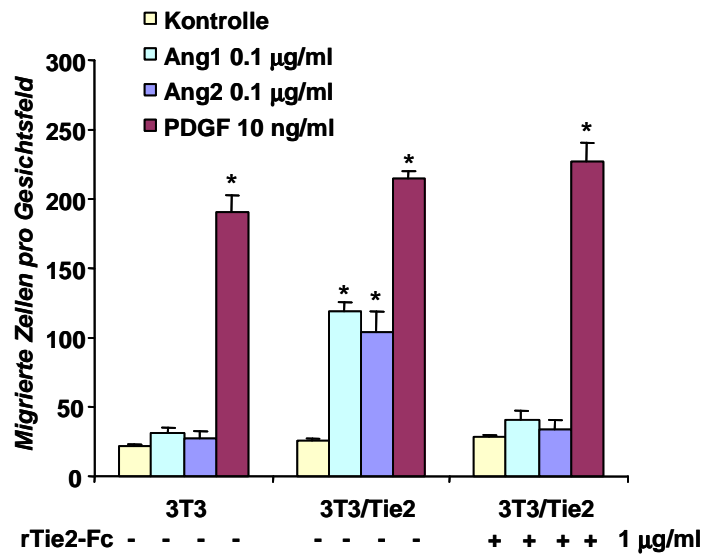


Abb. 5.6 (A) Migrationsassay mit NIH 3T3-Fibroblasten (mock-transfizierte Kontrolle) und aus stabilen Transfektionen stammenden 3T3-Fibroblasten, welche Tie2-Rezeptor ektopisch exprimieren (*3T3/Tie2*). Medium mit Lösungspuffer (Kontrolle), Ang1 oder Ang2 (200 ng/ml), oder PDGF-BB (10 ng/ml) als Positivkontrolle wurden in die unteren Kammern der Boyden-Apparatur eingebracht. Im Fall der rechten Säulengruppe wurde löslicher Tie2-Rezeptor (*rTie2-Fc*) in 10fachem Überschuss (2 µg/ml) zugegeben. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert ± S.E: von 4 parallelen Ansätzen. Gesichtsfeld: 100x Vergrößerung. * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

Chemotaktische Antwort von stabil mit Tie2-Rezeptor transfizierten Fibroblasten auf Angiopoietin-1 und -2

Um mögliche chemotaktische Effekte von Ang-1 und Ang-2 auf nicht-endotheliale Zellen, welche ektopisch den Tie2-Rezeptor exprimieren, zu untersuchen, wurden Migrations-Assays mit NIH 3T3-Fibroblasten unternommen, welche mit dem Tie2-Rezeptor stabil transfiziert wurden, und dann mit nicht-transfizierten Fibroblasten verglichen. Hierbei diente PDGF-BB, was bekanntermaßen eine stark chemotaktische Substanz für Fibroblasten und glatte Muskelzellen ist,²⁰⁰ als Positivkontrolle (10 ng/ml). Die transfizierten Rezeptoren wurden zuvor genetisch manipuliert, um die basale Rezeptor-Phosphorylierung zu minimieren und damit die Hintergrund-Aktivierung zu unterdrücken.¹⁹⁸ In den Kontroll-NIH 3T3-Zellen induzierte weder Ang-1 noch Ang-2 eine signifikante Zunahme der Zellmigration (Abb. 5.6, linke Säulen). Im Gegensatz hierzu wiesen mit dem Tie2-Rezeptor stabil transfizierte NIH 3T3-Fibroblasten eine deutliche Zunahme der Zellmigration auf $466 \pm 6\%$ bei 100 ng/ml Ang-1 und auf $410 \pm 13\%$ bei der gleichen Menge an Ang-2 im Vergleich zu Kontroll-Pufferlösung auf (jeweils $p < 0.05$, Abb. 5.6, mittlere Säulen). Zugabe eines 10-fachen Überschusses von *rTie2-Fc* zum unteren Kompartiment der Boyden-Apparatur ließ den chemotaktischen Effekt von sowohl Ang-1 als auch Ang-2 auf 3T3-Tie2-Fibroblasten komplett verschwinden ($147 \pm 16\%$ für Ang-1, $120 \pm 21\%$ für Ang-2, $p =$ nicht signifikant *versus* Kontrolle), wohingegen die Chemotaxis gegenüber PDGF-BB nicht durch *rTie2-Fc* im Exzess beeinflusst wurde

(Abb. 5.6, rechte Säulen). Somit demonstrierten Fibroblasten, welche den Tie2-Rezeptor ektopisch exprimieren, eine spezifische chemotaktische Antwort gegenüber sowohl Ang-1 als auch Ang-2; im Unterschied hierzu wiesen Endothelzellen eine spezifische chemotaktische Antwort nur gegenüber Ang-1 auf.

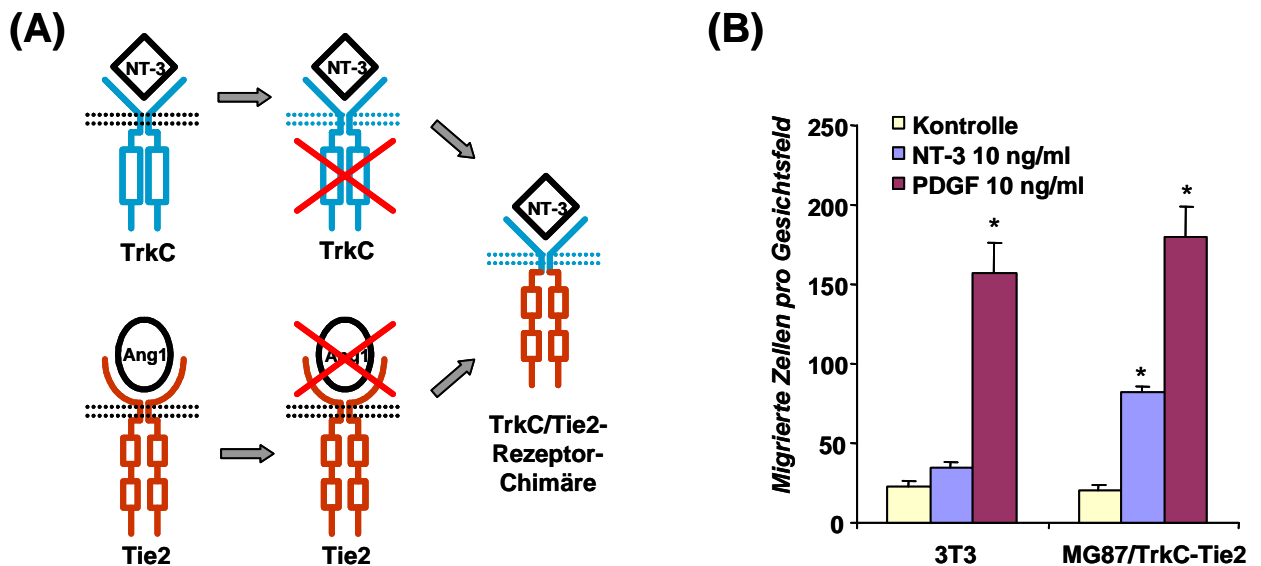


Abb. 5.7 (A). Schematische Darstellung der Konstruktion eines chimären Rezeptors, bestehend aus der Ektodomäne von TrkC, fusioniert mit der zytosplasmatischen Domäne von Tie2 (TrkC-Tie2). **(B)** Migrationsassay mit NIH 3T3-Fibroblasten (mock-transfizierte Kontrolle) und MG87-Fibroblasten (eine 3T3-abgeleitete Zelllinie), in welche der chimäre TrkC-Tie2-Rezeptor stabil transfiziert wurde (MG87/TrkC-Tie2). Medium, welches Lösungspuffer enthielt (Kontrolle), 10 ng/ml Neurotrophin-3 (NT-3) oder 10 ng/ml PDGF-BB (Positiv-Kontrolle) wurden in die unteren Kammern der Boyden-Apparatur eingebracht. Die Migrationsexperimente wurden ansonsten wie unter Abb. 5.2 beschrieben durchgeführt. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert ± S.E. von 4 parallelen Ansätzen. Gesichtsfeld: 100x Vergrößerung. *p<0.05 versus Kontrolle.

Darüber hinaus untersuchten wir noch weitere mögliche Wege, auf welchen eine Aktivierung der katalytischen Domäne des Tie2-Rezeptors eine chemotaktische Antwort produzieren könnte. Dafür wurden MG87-Fibroblasten (eine 3T3-Zelllinien-Variante) stabil mit einem chimären Rezeptor transfiziert, welcher aus der Ektodomäne von TrkC, welche an die zytosplasmatische Domäne von Tie2 fusioniert worden war (MG87/TrkC-Tie2-Fibroblasten), besteht (Abb. 5.7A).²⁰¹ Der Nachweis, dass dieser chimäre Rezeptor funktionell aktiv ist, wurde vor kurzem geführt, indem die Tyrosin-Phosphorylierung der TrkC-Tie2-Schimäre nach Zugabe von Neurotrophin-3 (NT-3), dem Liganden von TrkC, nachgewiesen werden konnte.¹³ Wir benutzten diese Zellen für Migrations-Assays und verglichen die damit erhaltenen Ergebnisse mit denen von 3T3-kontrolltransfizierten Zellen. Da sowohl 3T3- als auch MG87-Fibroblasten endogen PDGF-Rezeptoren besitzen, benutzten wir PDGF-BB als Positiv-Kontrolle, was zu einer starken chemotaktischen Reaktion im Vergleich zu Kontrollmedium in beiden Zelltypen führte (Abb. 5.7B). In den 3T3-Zellen ohne den TrkC-Rezeptor

resultierte die Zugabe von 10 ng/ml NT-3 zu keinem chemotaktischen Effekt ($142 \pm 10\%$ migrierte Zellen versus Kontrolle, $p =$ nicht signifikant). Im Unterschied hierzu wiesen die MG87/TrkC-Tie2-Zellen eine ausgeprägte chemotaktische Antwort auf 10 ng/ml NT-3 auf (Zunahme auf $399 \pm 4\%$ versus Kontrolle, $p < 0.05$), was anzeigt, dass die Aktivierung dieses schimärischen Rezeptors, welche wie früher gezeigt zur Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Tie2-Domäne führt, ausreichend ist, um eine Signalkaskade auszulösen, welche letztlich zu einer erhöhten Zellmotilität führt.

RT-PCR Analyse der Angiopoietin-1, -2 und Tie2-Rezeptor mRNA Expression in humanen Gefäßabschnitten und in kultivierten Zellen

Die mRNA-Expression von Ang-1, Ang-2 und Tie2 wurde mittels RT-PCR in explantierten, unbenutzten humanen Gefäßabschnitten der A. mammaria interna, der A. radialis und der V. saphena parva untersucht, welche intraoperativ während koronarer Bypass-Operationen entnommen worden waren. Wie in Abb. 5.8 gezeigt, waren sowohl die Ang1 als auch Ang2 mRNA in allen drei Gewebeproben nachweisbar. Darüber hinaus fand sich auch eine Tie2-Expression in allen untersuchten Gefäßen. Nicht-transfizierte NIH 3T3-Fibroblasten exprimierten weder Ang-1/-2 noch Tie2 und dienten als Negativ-Kontrollen. (Abb. 5.8, Spur 4), während Amplifikation der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Kontrolle für vergleichbare Mengen und Qualität der mRNA innerhalb der Proben benutzt wurde. Als Positiv-Kontrollen wurden Klonierungsvektoren benutzt, welche cDNAs in kompletter Länge, kodierend für Ang-1, Ang-2 und Tie2, enthielten. Die nach PCR-Amplifikation erhaltenen PCR-Produkte deckten sich nach Gel-Auftrennung mit der vorhergesagten Größe. Erfolgreiche Expression der Tie2-Rezeptor-mRNA in den stabil mit Tie2-transfizierten Fibroblasten wurde ebenso mittels RT-PCR bestätigt (Abb. 5.8, Spur 5). Wie zu erwarten, war Tie2-mRNA in Endothelzellen verschiedener Herkunft leicht nachzuweisen (HUVECs, human mikrovaskuläre Endothelzellen, BAECs; in Abb. 5.8, Spur 6 nur für HUVECs dargestellt). Ang-1 war in humanen glatten Gefäßmuskelzellen nachweisbar, aber auch in einem etwas geringeren Ausmaß in Endothelzellen; Ang-2 mRNA dagegen war sehr stark in Endothelzellen, und, im Gegensatz zu Ang-1, nicht in glatten Gefäßmuskelzellen nachweisbar (Abb. 5.8, Spur 6 und 7).

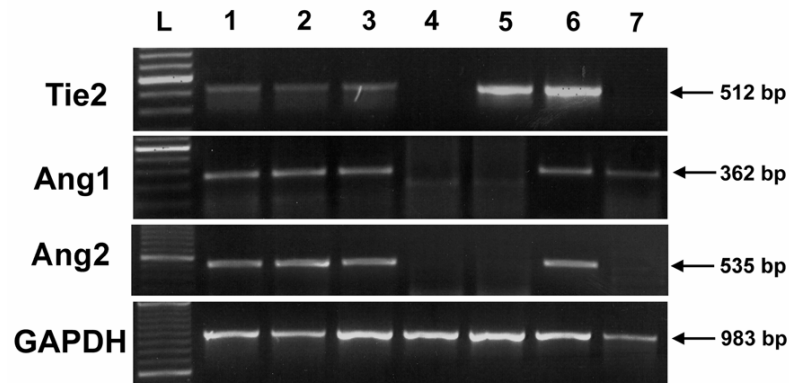


Abb. 5.8. RT-PCR, welche die Expression von Ang1, Ang2 und Tie2-Rezeptor-mRNA in explantierten Gefäßsegmenten von humaner A. mammaria interna (*Spur 1*), A. radialis (*Spur 2*) und V. saphena (*Spur 3*) nachweist. *Spur 4*: mock-transfizierte NIH-3T3 Fibroblasten; *Spur 5*: stabil transfizierte 3T3-Fibroblasten, welche Tie2-Rezeptor exprimieren und für die Migrationsexperimente verwendet wurden; *Spur 6*: HUVECs; *Spur 7*: humane vaskuläre glatte Muskelzellen (SMCs). Amplifikation von Glycerinaldehyd-Dehydrogenase (*GAPDH*) zeigt vergleichbare RNA-Mengen und -Qualität zwischen den Proben auf. Die Größen der errechneten PCR-Produkte sind durch *Pfeile* angezeigt. *L*: DNA-Längenstandard; *bp*: Basenpaare.

Northern Blot-Analyse der Angiopoietin-1, -2 und Tie2-Rezeptor mRNA-Expression in Endothelzellen

Mittels Northern Blot-Analyse von aus Endothelzellen extrahierter mRNA bestätigte sich die Expression von Ang-2 ebenso wie von Tie1 und Tie2 auf der mRNA-Ebene in HUVECs, kultivierten humanen aortalen Endothelzellen und kultivierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (Abb. 5.9). Im Unterschied hierzu exprimierten humane kutane Fettgewebs-Endothelzellen eine außergewöhnlich starke Menge an Ang-1 Transkripten, waren aber negativ für Ang-2.

Western Blot-Analyse von Angiopoietin-1 und -2 Protein in mittels HUVECs konditioniertem Medium

Analyse von HUVEC-konditioniertem Medium mittels Western Blot zeigte den Nachweis von Ang-2, nicht aber von Ang-1 (Abb. 5.10). Ang-2 ließ sich dabei in oligomerischen Einheiten nachweisen, welche den in gereinigtem, bioaktiven Ang-2 vorliegenden sehr ähnlich sind (nach S. Davis).

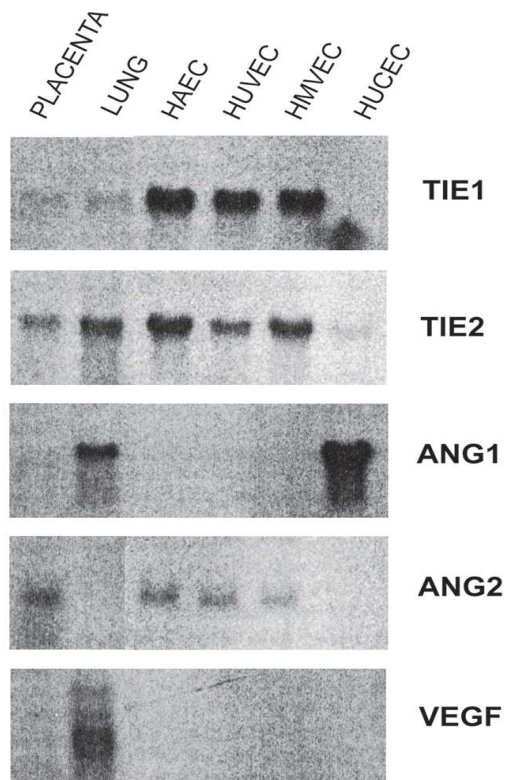


Abb. 5.9. Expression von Ang1, Ang2, Tie2, Tie2 und VEGF-mRNA in humanen Endothelzellen. Gesamt-RNA (10µg) aus verschiedenen kultivierten humanen Endothelzellen und Poly(A)+-RNA (2 µg) aus humaner Plazenta und Lunge wurden auf Formaldehyd-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylon-Membranen transferiert und mit radioaktiv markierten cDNA-Proben wie angegeben hybridisiert. HAEC; humane aortale Endothelzellen; HMVEC: humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen; HUVEC: humane kutane Fettgewebs-Endothelzellen.

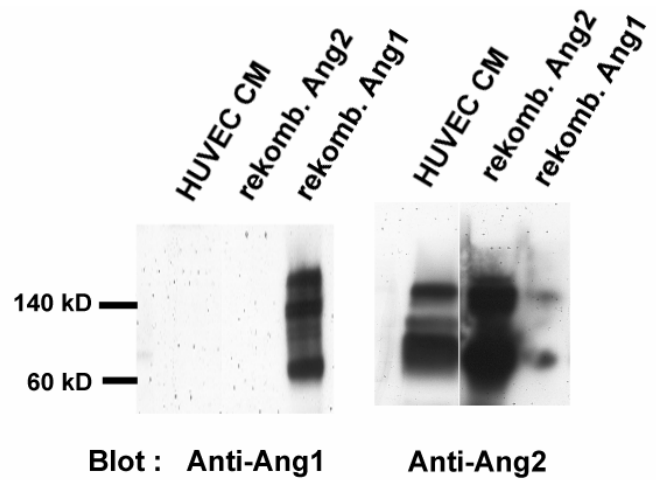


Abb. 5.10. Sezerniertes Ang2-Protein in HUVEC-konditioniertem Medium. HUVEC-konditioniertes Medium (CM) wurde gesammelt, auf SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen und mittels Western Blot mit spezifischen Ang1- und Ang2-Antikörpern analysiert. Ang2-, aber nicht Ang1-Protein ist eindeutig im konditioniertem Medium von HUVEC-Zellen nachzuweisen.

5.4 Diskussion

Knock-out Experimente in Mäusen mit Ausschaltung des Gens von entweder Tie2^{194, 196} oder Ang-1¹³ haben eindeutig eine wichtige Rolle des Tie2/Ang-1-Systems für die embryonale Angiogenese etabliert. Während in VEGF-Rzeptor-2 Null-Mäusen Endothelzellen fehlen,¹⁸⁸ sind in den Tie2 Null-Mäusen Endothelzellen in normaler Zahl vorhanden und finden sich tubenförmig angeordnet. Die Gefäße der Tie2 Knock-out Mäuse erscheinen jedoch unreif, wirken nicht ausreichend organisiert und es fehlen die Aufzweigungen, welche für normale Gefäße typisch sind. Ähnliche Gefäßdefekte, wenngleich weniger stark ausgeprägt, fanden sich in Ang-1 Knock-out Mäusen:¹³ Die Endothelzellen waren abnorm abgerundet, spreizten und flachten sich nicht wie normalerweise ab, waren nur lose mit der zugrunde liegenden Matrix assoziiert und verbanden sich nicht regelrecht mit periendothelial gelegenen Zellen. Diese Befunde wurden dahingehend interpretiert, dass die

physiologische Rolle des Tie2/Ang-Systems im zeitlichen Ablauf der Angiogenese zu einem späteren Zeitpunkt als die Regulation durch VEGF ins Spiel kommt, obwohl der genaue Wirkungsmechanismus des Tie2/Ang-Systems noch nicht geklärt ist. Der Befund einer ausgeprägten und spezifischen chemotaktischen Antwort von Endothelzellen auf Ang1 ist nach jetzigem Kenntnisstand die erste Beschreibung einer direkten biologischen Funktion des Tie2/Ang1-Systems, was enge räumliche und gerichtete Interaktionen zwischen Ang1-sezernierenden Zellen und Endothelzellen, welche den Tie2-Rezeptor exprimieren, impliziert und somit eine mögliche Grundlage ist für die defekte Angiogenese in Mäusen, welchen der Tie2-Rezeptor oder Ang1 fehlt.

Der zwingend erforderliche Beitrag der Endothelzell-Migration, im Gegensatz zur Proliferation, für die Angiogenese ist in früheren Untersuchungen mittels eines klassischen Experiments an der Cornea der Ratte demonstriert⁴⁶ worden. Dabei konnten trotz einer Bestrahlungsbehandlung, welche ausreichend war um die DNA-Synthese zu unterdrücken, Gefäßaussprossungen induziert und für mehr als zwei Tage aufrechterhalten werden. Dieses Ergebnis wurde dahingehend interpretiert, dass die Endothelzell-Migration für die Initiierung der Angiogenese die dominierende Rolle spielt.

Tie2-Rezeptor und Ang1-mRNA waren in normalen human arteriellen und venösen Gefäßproben leicht nachzuweisen. Das Vorhandensein einer Expression von Tie2 wurde mittels immunhistologischer Färbung in ruhenden erwachsenen Geweben nachgewiesen, einschließlich im Gefäßendothel;²⁰² das Ausmaß der Tie2-Phosphorylierung wurde als indirekter Beweis für das Vorhandensein eines oder mehrerer Tie2-Liganden in nicht-aktivierten adulten Geweben interpretiert, was in Einklang mit vorausgegangenen Ergebnissen ist, dass Ang1 in erwachsenen Geweben weit verbreitet ist.¹⁹⁸ Unser direkter Nachweis von Ang1 in der Gefäßwand von Erwachsenen ist in Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen.

Das Tie2/Ang1-Expressionsmuster legt zusammen mit dem neuartigen Befund eines endothelspezifischen chemotaktischen Effekts von Ang1 zwei mögliche Funktionen des Tie2/Ang1-Systems nahe. Zum einen sezernieren in der normalen adulten Gefäßwand periendotheliale Zellen (Perizyten, glatte Gefäßmuskelzellen) konstitutiv Ang1, was somit den Kontakt zwischen benachbarten Zellen und zwischen Endothel- bzw. periendothelialen Zellen verstärkt, und damit die endotheliale Integrität und die Orientierung der Endothelzellen auf des Basallamina erhält. Eine Unterbrechung der endothelialen Monoschicht könnte zu einer Hochregulation der Ang1-Expression in umliegenden Zellen und/oder zu Veränderungen in der Tie2-Rezeptorexpression in den Endothelzellen führen, welche den Kontakt mit den benachbarten Endothelzellen verloren haben. Eine Hochregulation der VEGF-Expression in der Gefäßwand als Folge einer Verletzung der Endothelschicht mit einem Ballon ist vor kurzem gezeigt worden, was dann zu einem starken mitogenen Effekt auf Endothelzellen und nachfolgender Reendothelialisierung von denudierten Gefäßbezirken führt.⁶⁰ Der chemotaktische Effekt von Ang1 könnte dabei begleitend zu VEGF wirksam sein in der Rekrutierung von Endothelzellen, um die Reendothelialisierung einzuleiten und

zu beschleunigen. In den Ang1- und Tie2-knock out Mäusen könnte der fehlende Einfluß von Ang1 auf Endothelzellen zu der schwachen Assoziation zwischen Endothel- und periendothelialen Zellen beitragen, ebenso wie das Fehlen der Endothelzell-Abflachung und -Ausbreitung („Spreading“), was dann zu unreif erscheinenden Gefäßen führt.

Zum zweiten könnte unter Bedingungen der postnatalen Angiogenese, wie bei chronischer Gewebeischämie oder beim Tumorwachstum, der chemoattraktive Effekt von Ang1 auf Endothelzellen wichtig sein für die Initiierung von neuen Kapillaraussprossungen, ebenso wie die Bewegung von Endothelzellen aufeinander zu, was für die Fusion in Kapillar-artige Strukturen erforderlich ist. Drei-dimensionale Fusionsprozesse dieser Art sind wahrscheinlich verantwortlich für das korkenzieherartige Erscheinungsbild der Kollateralgefäße in ischämischen Gewebebezirken oder in neovakularisierten Tumoren. In dieser Hinsicht könnten die Effekte von Ang1 nur auf eine streng lokalisierte Art und Weise erreicht werden, was möglicherweise einen Konzentrationsgradienten von Ang1 erfordert, um einen Effekt zu induzieren. *In vitro*-Versuchsbedingungen wie beim Assay zur Induktion von tubulären Strukturen („tube assay“) sind daher möglicherweise nicht erfolgreich, weil exogene Faktoren nur gleichsam von oben herab auf die Zellen gegeben werden, was nicht berücksichtigt, dass bei der Angiogenese *in vivo* typischerweise Konzentrationsgradienten von Molekülen vorhanden bzw. erforderlich sind. Der Auslöser für eine verstärkte Ansprechbarkeit des Tie2/Ang1-Systems bleibt derzeit noch unklar; im Unterschied zu VEGF, was bekanntermaßen in positivem Sinne durch Hypoxie reguliert wird,²⁰³ scheint Ang1 nicht direkt durch Hypoxie hochreguliert zu werden.²⁰⁴ Es wurde jedoch eine verstärkte Expression von Tie2 im Gefäßendothel von Melanom-Metastasen beobachtet,²⁰⁵ ebenso wie während der Ovulation und Wundheilung,²⁰⁶ was die Möglichkeit nahe legt, dass das Tie2/Ang1-System auf der Ebene der Rezeptorexpression reguliert wird.

Vor kurzem wurde ein zweiter Ligand für den Tie2-Rezeptor mit 60%iger Homologie in der Aminosäuresequenz zu Ang1 identifiziert und Ang2 benannt.¹⁹⁸ Dabei wurde aus folgenden zwei experimentellen Befunden der Schluß gezogen, dass Ang2 einen natürlich vorkommenden Bioantagonisten für den Tie2-Rezeptor darstellt. Zum einen zeigte sich, dass Ang2 an den Tie2-Rezeptor, welcher auf Endothelzellen exprimiert ist, bindet, aber ihn nicht transduziert, und dabei gleichzeitig fähig war, die Ang1-induzierte Rezeptorphosphorylierung zu blockieren.¹⁹⁸ Und zum zweiten führte transgene Überexpression von Ang2 zur Unterbrechung der Blutgefäßbildung im Maus-Embryo.¹⁹⁸ Unser *in vitro*-Befund, dass die chemotaktische Wirkung von Ang1 auf Endothelzellen durch Zugabe steigender Mengen von Ang2 blockiert werden kann ist konsistent mit diesen Ergebnissen und legt eine negative Regulationsfunktion von Ang2 *versus* Ang1 durch kompetitive Bindung an Tie2 ohne nachfolgende Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne nahe. Darüber hinaus wurde der von uns gezeigte Nachweis einer Expression von Ang2 in der normalen ruhenden Gefäßwand bisher nicht beschrieben und lässt ein sensibles Gleichgewicht in der Erhaltung der Gefäßintegrität durch positive und negative Regulatoren vermuten.

Bei den Untersuchungen von kultivierten Zellen zeigte sich, dass die Expression von Ang2 quantitativ deutlich weniger in glatten Gefäßmuskelzellen als in Endothelzellen ausgeprägt war. Insbesondere ließ sich Ang2-mRNA mittels RT-PCR in HUVECs, mittels Northern Blot in HUVECs, humanen aortalen Endothelzellen und dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, und mittels Western Blot in HUVECs nachweisen. Diese Ergebnisse bestätigen die mittels *in situ*-Hybridisierung erhobenen Befunde, welche eine Expression von Ang2-Transkripten *in vivo* in Endothelzellen demonstrierten.¹⁹⁸ Eine offensichtliche Ausnahme sind mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem kutanen Fettgewebe, bei welchen sich im Northern Blot eine außergewöhnlich große Menge an Ang1-Transkripten zeigte, bei gleichzeitig fast fehlender Expression von Ang2. Die Bedeutung dieses Befundes ist derzeit unklar, da bisher die Lokalisation der Expression von Ang1 *in vivo* immer nicht-endothelialen Zellen zugeordnet wurden.⁴⁴ Für die Endothelzellen allerdings, die Ang2 exprimieren, könnte man sich einen autokrinen Wirkungsmechanismus der Ang2-Expression vorstellen, bei welchem sich die Endothelzellen selbst vom Einfluß extern entstandenem Tie2-Ligand(en) abblocken könnten.

Vorausgegangene Arbeiten haben gezeigt, dass Ang2, obwohl es die Ang1-induzierte Rezeptorphosphorylierung in Endothelzellen antagonisiert, überraschenderweise dann äquivalent zu Ang1 hinsichtlich der Promotion einer Tie2-Phosphorylierung wirkt, wenn der Rezeptor ektopisch in Fibroblasten exprimiert wird.¹⁹⁸ Unser Nachweis einer ähnlichen chemotaktischen Antwort von Tie2-exprimierenden Fibroblasten auf Ang1 und Ang2 erweitert diese vorausgegangenen Befunde auf eine funktionelle Ebene. Somit scheinen Fibroblasten ein ausreichendes „Repertoire“ von intrazellulären Adaptor-Proteinen zu exprimieren, um effektiv mit ektopisch exprimiertem Tie2-Rezeptor interagieren und eine Signalkaskade auslösen zu können, welche in Zellmigration resultiert. Dies wird insbesondere bestärkt durch unser Ergebnis, dass Fibroblasten, welche mit einem schimärischen Rezeptorgen transfiziert wurden, welches die zytoplasmatische Domäne von Tie2 fusioniert zur extrazellulären Bindungsdomäne von TrkC, einem Neuronen-spezifischen Rezeptor für NT-3, kodiert, zur Migration stimuliert werden können durch Zugabe von NT-3. Die differentiellen Effekte von Ang2 in endothelialen und nicht-endothelialen Zellen könnten möglicherweise auf das Fehlen eines oder mehrerer kritischer Signalelemente in den ersteren zurückzuführen sein. Eine zusätzliche, alternative Erklärung ist allerdings erforderlich, wenn man davon ausgeht, dass Chemotaxis das Endresultat einer Tie2-Rezeptoraktivierung in beiden Zelltypen ist. Eine mögliche Erklärung für dieses Paradigma ist, dass Bindung von Tie2 durch Ang2 zu einer vorzugsweisen Heterodimerisation des Rezeptors mit einer weiteren Membrankomponente führt, wie zum Beispiel Tie1 oder eines anderen bisher nicht identifizierten Endothelspezifischen Rezeptors, was dann in einem „Einfangen“ des Tie2-Monomers resultiert und dadurch eine reziproke Phosphorylierung der zytoplasmatischen Rezeptorkinase-Domänen verhindert wird. Um dieses Konzept zu unterstützen, sind weitere Experimente erforderlich, einschließlich der Transfektion von Fibroblasten mit Tie1 und Tie2 gleichzeitig.

5.5 Zusammenfassung

Angiopoietin 1 (Ang1) und sein mutmaßlicher natürlicher Bioantagonist, Ang2, wurden erst kürzlich isoliert, und die kritische Rolle von Ang1 für die embryonale Angiogenese wurde durch gezielte Genmanipulationen in Knock-Out- und transgenen Überexpressions-Mausmodellen gezeigt. Spezifische biologische Effekte von Ang1 wurden zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht gefunden. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Ang1, nicht aber Ang2, chemotaktisch für Endothelzellen ist. Im Unterschied hierzu wiesen Ang1 genauso wie Ang2 keine proliferativen Effekte auf Endothelzellen auf. Löslicher Tie2-Rezeptor, nicht aber Tie1-Rezeptor, im Überschuss ließ die chemotaktische Antwort von Endothelzellen gegenüber Ang1 verschwinden. Ang2 blockierte dosis-abhängig die gerichtete Migration gegenüber Ang1, wobei dieses Ergebnis konsistent ist mit der vermuteten Rolle von Ang2 als ein natürlich vorkommender Inhibitor von Ang1. Fibroblasten, welche stabil mit dem Tie2-Rezeptor transfiziert worden waren, wiesen chemotaktische Reaktionen zu beiden Angiopoietinen, sowohl Ang1 als auch Ang2, auf. Fibroblasten, welche stabil einen transfizierten chimärischen Rezeptor bestehend aus der Ektodomäne von TrkC fusioniert zur zytoplasmatischen Domäne von Tie2 exprimierten, zeigten ebenfalls eine chemotaktische Antwort auf NT-3, einen spezifischen Liganden für TrkC. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass Endothelzellen Ang2-mRNA exprimieren, was die Möglichkeit einer autokrinen Aktivierung des Ang/Tie2-Systems nahelegt. Abschließend legt das Ergebnis, dass Tie2-Rezeptor und Ang1-Agonist gleichzeitig in normalen humanen Arterien und Venen konstitutiv exprimiert werden, nahe, dass das Tie2/Ang1-System über die embryonale Angiogenese hinaus von Bedeutung ist, um die Integrität der postnatalen Gefäßstruktur zu erhalten. Mit möglichen weiteren spezifischen biologischen Effekten von Ang1 für die Gefäßwand und daraus resultierenden potentiell therapeutischen Einsatzmöglichkeiten beschäftigen sich die beiden folgenden Abschnitte.

6. Die Rolle des Angiopoietin/Tie2-Systems für die Gefäßreifung: Einfluß von Angiopoietin-1/2 auf das Integrinexpressionmuster von Endothelzellen

6.1. Einleitung

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist für Endothelzellen proliferativ und chemotaktisch wirksam und wird durch Hypoxie hochreguliert,^{203, 207} wobei alle diese Eigenschaften seine Rolle als endogener Initiator für Angiogenese belegen. Im Gegensatz hierzu induziert Angiopoietin-1 in Endothelzellen kein Wachstum⁴⁴ und wird durch Hypoxie herabreguliert.²⁰⁴ In Analogie zu diesen Unterschieden haben Experimente, welche die entsprechenden Gene ausschalten oder überexprimieren, gezeigt, dass während VEGF notwendig ist für die frühen Stadien der Gefäßentwicklung, Angiopoietin-1 zusammen mit seinem endothelspezifischen Rezeptor Tie2 für die späteren Reifungsschritte der Gefäßbildung verantwortlich ist¹⁹¹ und seine Expression immer mehr verbreitet auftritt, je weiter die Entwicklung fortschreitet.⁴⁴ Es wurde daher vermutet, dass Angiopoietin-1 für die Stabilisierung und Reifung neu gebildeter Gefäße notwendig ist.²⁰⁸ Die molekularen Mechanismen, durch welche Angiopoietin-1 diese Effekte vermittelt, sind bisher nicht vollständig bekannt. Angiopoietin-2 wurde durch Homologie-Screening als Verwandter von Angiopoietin-1 identifiziert, und es war gezeigt worden, dass Angiopoietin-2 an die Rezeptor-Tyrosinkinase Tie2 zwar bindet, aber den Rezeptor nicht phosphoryliert.¹⁹⁸ Darüber hinaus zerstörte transgene Überexpression von Angiopoietin-2 die Blutgefäßbildung in der embryonalen Entwicklung.¹⁹⁸

Angiogenese hängt aber nicht nur von sezernierten Faktoren wie VEGF und die Angiopoietine und ihren Rezeptoren ab,¹²⁷ sondern wird auch durch Zelloberflächenrezeptoren für extrazelluläre Matrix-(EZM-) Proteine beeinflusst.^{8, 209} Insbesondere werden bestimmte Eigenschaften der Angiogenese, wie Zelladhäsion und -migration durch Integrine vermittelt, welche eine Familie von heterodimeren transmembranösen Proteinen darstellen und aus α - und β -Untereinheiten gebildet werden.^{210, 211} Von den verschiedenen Kombinationen aus Integrin-Untereinheiten, welche auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert werden, wurden die α_v -Integrine aufgrund ihres für die Angiogenese und Gefäßumbildungsvorgänge spezifischen Expressionsmusters als interessant erkannt.⁸ Insbesondere dem Integrin $\alpha_v\beta_3$, welches auf aktivierten Endothelzellen, wie sie in Wunden, Tumoren oder entzündeten Geweben vorkommen, in hohem Maße exprimiert wird, scheint somit eine wichtige Funktion während der Angiogenese zuzukommen.^{7, 9, 212} Dieses Konzept wurde allerdings wieder in Frage gestellt, da Knock-Out Mäuse, denen das Integrin β_3 und/oder β_5 fehlt, eine eher verstärkte als verminderte Angiogenese aufwiesen,²¹³ was darauf hinweist, dass die Rolle der Integrine bei Angiogenese noch nicht vollständig verstanden ist.²¹⁴

Mehrere Berichte legen eine Querverbindung („Crosstalk“) zwischen angiogenetischen Faktoren und Integrinen zum Zwecke der Feineinstellung der Angiogenese nahe. Bisher sind nur positive

Regulatoren der endothelialen Integrinfunktion identifiziert worden. So ist gezeigt worden, dass VEGF die Expression der Integrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ in mikrovaskulären Endothelzellen hochreguliert^{47, 48} und die Zelladhäsion und -migration verstärkt, welche durch verschiedene Integrine einschließlich $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ vermittelt wird.⁴⁹ Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) erhöhte die endotheliale $\alpha_v\beta_3$ -Expression,²¹⁵ und es wurde gezeigt, dass bFGF-induzierte Angiogenese von $\alpha_v\beta_3$ abhängig ist.⁹ Hepatocyte growth factor (HGF) und Hypoxia-inducible factor (HIF) erhöhten ebenfalls die endotheliale Integrin-Funktionalität.^{216, 217} Die zugehörige „inside-out“ Signal-Kaskade ist bisher nicht vollständig charakterisiert, obwohl eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) involviert zu sein scheint.⁴⁹

Obwohl es bekannt ist, dass Ang1 und Ang2 direkt an Integrine auf Endothelzellen und Fibroblasten binden kann,²¹⁸⁻²²⁰ ist ein direkter Einfluß der Angiopoietine auf die Integrin-Expression bisher nicht beschrieben. Im Folgenden wird gezeigt, dass eine Stimulation von Endothelzellen mit Angiopoietin-1, nicht aber mit Angiopoietin-2, die Zell-Oberflächenexpression der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Zeit- und Dosisabhängig reduziert, wohingegen die Expression von α_1 , β_1 und CD31 (PECAM) unverändert bleibt. Diese Reduktion zeigte sich unabhängig von einer Stimulation der PI3 kinase, reguliert auf der Ebene der Transkription und interferiert mit dem PKC-Stoffwechselweg. Als eine funktionelle Konsequenz führte Vorbehandlung von Endothelzellen mit Ang1 zu einer reduzierten Haptotaxis von Endothelzellen auf Vitronektin, welches ein ECM-Adhäsionsligand für $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ ist. Diese Ergebnisse identifizieren Ang1 als einen negativen Regulator der $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Expression und unterstützen die Annahme von Ang1 als einen Faktor, der die Stabilisierung und Reifung von ruhenden Blutgefäßen sicherstellt, in dem er das endotheliale Integrin-Expressionsmuster zu einem eher „deaktivierten“ Zustand verändert.

6.2. Material und Methoden

Zellkultur und rekombinante Proteine

Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVECs) wurden von TEBU gekauft und auf Kollagen-beschichteten Platten im Medium 199 (M199) kultiviert, welches mit 20% fetalem Kälberserum (FBS), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endothelzell-Wachstumszusatz und 50 U/ml Heparin ergänzt wurde. Die HUVECs wurden für die Experimente zwischen Passagen 3 bis 7 benutzt. Bovine aortale Endothelzellen (BAECs) wurden von Rinder-Aortas durch Kollagenase-Digestion wie vorbeschrieben isoliert²²¹ und in DMEM mit Penicillin/Streptomycin und 10% FBS kultiviert. Alle Experimente wurden in M199 mit 5% FBS ohne weitere Zusätze durchgeführt. BALB/c NIH 3T3-Fibroblasten, die von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen worden waren, wurden in DMEM („high glucose“) mit L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin und 10% FBS kultiviert. Stabil mit einem Expressions-Plasmid, kodierend für die gesamte Länge der Tie2-Rezeptor cDNA, transfizierte

Fibroblasten wurden wie vorbeschrieben hergestellt,¹⁹⁸ und diese Zellen wurden in Medium kultiviert, welchem G418 (GIBCO) zugesetzt worden war, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Primäre glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) wurden gewonnen, indem die Media der thorakalen Aorta einer männlichen Sprague-Dawley-Ratte durch Enzyme wie vorbeschrieben behandelt¹⁹⁹ und anschließend in DMEM/10% FBS kultiviert wurde.

Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Reverse Transkription (RT) und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde gemäß Standardverfahren durchgeführt^{95, 96}, wobei mit 1 µg Gesamt-RNA (human total RNA panel, Clontech) und 20 µg/ml oligodeoxy-thymidine (GIBCO BRL) begonnen wurde. Das Temperatureprogramm bestand aus 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei 56°C, und 1 Minute Extension bei 72°C. Am Ende des letzten Zyklus wurde ein verlängerter Extensionsschritt für 10 Minuten ausgeführt. Als Primer wurden jeweils gewählt für Sense (3'-5') und Antisense (5'-3'): für humanes Angiopoietin-1 (Gen-Bank Zugangsnummer HSU83508) GGG GGA GGT TGG ACT GTA AT und AGG GCA CAT TTG CAC ATA CA (362 bp PCR-Produkt); für humanes Angiopoietin-2 (AF004327) GGA TCT GGG GAG AGA GGA AC und CTC TGC ACC GAG TCA TCG TA (535 bp); und für humanes GAPDH (X01677) TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG und CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC (983 bp).

Der Bereich der linearen Phase der exponentiellen PCR-Amplifikation wurde zunächst für jedes Primer-Paar bestimmt, um eine semiquantitative PCR Analyse zu ermöglichen¹⁷². Die Zahl der Zyklen wurde dann in der linearen Phase der Amplifikation gewählt: 29 Zyklen für Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2, und 24 Zyklen für GAPDH. Die PCR Produkte wurden durch Elektrophorese von 10 µl jedes PCR-Reaktionsmix in einem 1.5% Agarosegel analysiert, und die Banden wurden durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

Durchflußzytometrische (FACS) Analyse der Integrin-Expression

HUVECs oder BAECs wurden DPBS, welches 0.5% EDTA enthält, für 20 Minuten behandelt. Die abgelösten Zellen wurden dann vorsichtig abgenommen, mit DPBS/10% FBS gewaschen, in 50 µl Volumina (5×10^5 Zellen) aliquotiert, und spezifischer primärer Maus-Antikörper or Maus-IgG-Kontrolle zur Zellsuspension für 45 Minuten auf Eis hinzupipettiert. Nach erneutem Waschen mit DPBS/10% FBS wurde Fluoreszenz-markierter (FITC) sekundärer polyklonaler Anti-Maus Antikörper für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln hinzugegeben. Die Zellen wurden dann in 250 µl 1% Paraformaldehyd in PBS fixiert, und die Fluoreszenz-Intensität mit einem FacsScan Durchflußzytometer mit Lysis II Software (Becton-Dickinson) gemessen. Die IgG₁ isotypische Kontrolle, α_1 , α_2 und β_1 (CD29) monoklonale Antikörper stammten von Immunotech (Marseille, France), $\alpha_v\beta_3$ (Klon LM609), $\alpha_v\beta_5$ (Klon P1F6) and anti-PECAM (CD31) Antikörper von Chemicon Inc. (Temecula, CA).

Western Blots

Die Zellen wurden durch Zugabe von RIPA Puffer (1% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholsäure, 0.1% SDS in PBS, pH 7.4; 1 μ M Leupeptin; 5 μ M Aprotinin; 1mM PMSF; 1 μ M Pepstatin; Sigma Chemical Co) lysiert und die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay (BioRad) bestimmt. Die Zellextrakte wurden auf einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine 0.2 Micron PVDF-Membran (BioRad) transferiert. die Membranen wurden in 10% Trockenmilch, 0.2% Tween-20 in PBS (TPBS), pH 7.4, geblockt und dann mit einem polyklonalen, in Kaninchen hergestellten Antikörper gegen die Integrinmonomere α_v oder β_3 (1:200 Verdünnung; Sta. Cruz, California) bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert. Die Blots wurden dann mit TPBS gewaschen und mit Meerrettich Peroxidase-gekoppeltem, in Ziegen hergestellten anti-Kaninchen Antikörper für 45 Minuten inkubiert. Die Immunokomplexe wurden mittels ECL-Reagenz (Amersham) sichtbar gemacht. Nach Strippen der Blots wurden diese dann jeweils wieder mit einem anti-Tubulin Antikörper (1:200, Santa Cruz) inkubiert, um eine gleiche Menge an geladenem Protein zu gewährleisten.

Northern Blots

Gesamt-RNA wurde aus HUVECs durch Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert und weiterverarbeitet wie vorbeschrieben.⁹⁴ Die Northern Blots wurden durch Elektrophorese von 15 μ g Gesamt-RNA in Formaldehyd-Agarosegelen angefertigt, welche dann auf Nylonmembranen (Amersham) geblotet und mit radioaktiv markierten cDNA-Proben hybridisiert wurden.²²² Als cDNA-Proben für α_v , β_3 und β_5 wurden humane cDNA-Fragmente,⁴⁸ für Angiopoietin-1 ein 570 bp *EcoRI/NotI*-cDNA Fragment zur Markierung benutzt.

Promoter-Konstrukte und transiente Transfektions-Assays

Ein -1084/+35 murines β_3 -Integrin (GenBank Zugangsnummer AF026509)²²³ und ein -875/+111 murines β_5 -Integrin Promoterkonstrukt (GenBank Zugangsnummer AF022111)²²⁴ wurde mit Hilfe des GenomeWalker Kits (Clontech) nach der Anleitung des Herstellers konstruiert. Anschließend erfolgte eine Subklonierung in den pGL3-basic Vektor (Promega), welcher das Luziferase-Reportergen enthält, und zwar mittels Sense-Primer 5' CTG AGT TCT TTC CAC ACC CTT C 3' und Antisense-Primer 5' TCC TGT CCG CCG CCC TTC ACG 3' für den β_3 -Integrin, und Sense-Primer 5' ATT CAA ACG CCT TAG GTA GGT TTT TGC 3' und Antisense-Primer 5' AGT CCC CCG CGC GTC TAC TCT CGG AGA 3' für den β_5 -Integrin-Promoter.

BAECs mit einer Dichte von 80% in 6-Well-Platten wurden dann transient mit den Promoter-Konstrukten und Lipofektamin entsprechend den Herstellerangaben (GIBCO Laboratories) transfiziert. Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurden korrigiert relativ zu dem Ausmaß der Aktivität von alkalischer Phosphatase, welche produziert wurde durch das kotransfizierte interne

Kontrollplasmid pSV-AP, welches das Reporter-gen unter der Kontrolle des Simian-Virus 40 Promoter-Enhancers enthält.²²⁵ Die Transfektionsmixturen enthielten 1 µg Reporter-Vector, 0.5 µg pSV-AP und 9 µg Lipofektamin in Opti-MEM I. Nach 4 Stunden wurden die Zellen mit DPBS gewaschen, mit 10% FBS in DMEM gefüttert, und rekombinantes Angiopoietin-1 Protein wurde wie angegeben hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 20 ng/ml Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA; Sigma) oder nur Lösungsmittel (DMSO) für 4 Stunden stimuliert und dann in Reporter-Lysepuffer (Promega) aufgelöst mit nachfolgender Messung der Luziferase- (Promega) und alkalischer Phosphatase- (CSPD Chemilumineszenz-Substrat; Tropix) Aktivitäten mit einem Berthold Lumat LB9501 Luminometer. Die Balken repräsentieren die Aktivität von 3 unabhängigen Transfektionen (Mittelwert±SEM), normalisiert durch die alkalische Phosphatase-Aktivität.

Adenovirale Konstrukte

Hierzu wurde wie Eingangs dargestellt rekombinant hergestellter Adenovirus, welcher Angiopoietin-1 exprimiert (Ad-Ang1), verwendet. Die aus menschlichem Herzgewebe selbst hergestellte Angiopoietin-1 cDNA wurde vor Rekombination in die AdE1-deletierte Region unter der Kontrolle des CMV5-Promoters durch Sequenzierung bestätigt. Ein identischer Vektor, welcher green fluorescent protein (Ad-GFP) exprimiert, wurde für Kontrollzwecke verwendet. Die rekombinanten Viren wurden propagiert und abschließend gereinigt mittels eines Cäsium/Chlorid-Gradienten.²²⁶

Ko-Kultur-Experimente

Für Ko-Kultur-Experimente wurden 6-Well Platten mit Zellkultur-Einsätzen benutzt, welche eine anorganische Membran mit einer Porengröße von 0.02 µm enthalten (Anopore TC Einsätze, Nunc). VSMCs wurden in das untere Well eingebracht und mit adenoviralem Konstrukt für 4 Stunden mit moi's wie angegeben transduziert. Die Zellen wurden dann sorgfältig dreimal mit DPBS gewaschen, um jegliche Spuren von Adenovirus vollständig zu entfernen, bevor dann die Einsätze mit BAECs hinzugegeben wurden. Die Zellen wurden dann in DMEM mit 2% FBS für alle Kokultur-Experimente für bis zu 72 Stunden gehalten.

Immunhistologische Färbung

VSMCs wurden 48 Stunden nach Transduktion mit verschiedenen Mengen Ad-Ang1 ("moi's" = multiplicity of infection wie angegeben) mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert und für 1 Stunde in 10% FBS geblockt. Dann erfolgte die Inkubation mit einem anti-Angiopoietin-1 Antikörper (1:200; Santa Cruz) oder IgG₁ isotypischer Kontrolle für 30 Minutes bei Raumtemperatur. Biotinylierter sekundärer Antikörper wurde für 1 Stunde und Avidin-biotinylierter alkalische Phosphatase-Komplex für 30 Minuten zugegeben. Die Färbung wurde abschließend durch Inkubation mit Fast Red-Substrat für 12 Minuten entwickelt.

Zell-Migrationsassay

Zell-Migrationsassays wurden mittels einer 48-well Mikro-Chemotaxiskammer (Neuroprobe Inc., Cabin John, MD) durchgeführt.⁹¹ Humanes Vitronektin wurde auf eine Konzentration von 20 µg/ml in M199 Medium verdünnt, und 25 µl der verdünnten Lösung wurden in die untere Kammer der modifizierten Boyden-Apparatur eingebracht. Subkonfluente HUVEC-Kulturen wurden mit Calcium- und Magnesium-freien PBS gewaschen und durch Inkubation mit 0.5% EDTA für 30 Minuten bei 37°C und vorsichtigem Pipettieren abgelöst. Das Ablösen von Zellen in Klumpen wurde durch Beobachtung mit dem Mikroskop ausgeschlossen. Nach Gewinnung der Zellen durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 3 Minuten und Platzierung eines Polyvinylpyrrolidon-freien Polycarbonat-Filters mit einer Porengröße von 8 µm (Nuclepore Corp., Cambridge, MA) wurden 2.5×10^5 Zellen, welche in 50 µl M199 ergänzt durch 1% FBS suspendiert worden waren, in das obere Kompartiment eingebracht und der Apparat für 4 Stunden bei 37°C in einem Zellinkubator mit 5% CO₂ inkubiert, während dessen Zellmigration durch die Membranporen auf die Unterseite des Filters stattfindet. Nach der Inkubationsperiode wurde der Filter entfernt und die obere Seite des Filters mit einem Gummischieber mehrfach bearbeitet, um die nicht-migrierten Zellen zu entfernen. Die Filter wurden dann mit Methanol fixiert und mit einer Giemsa-Lösung (Diff-Quick, Baxter Healthcare Corp.) gefärbt. Die Migration wurde durch Zählen der Zellen in drei zufällig gewählten Gesichtsfeldern (100x) für jedes Well quantifiziert, und alle Bedingungen wurden in Vierfachansätzen evaluiert.

Statistische Analysen

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert±Standard Error of the Mean (m±SEM). Statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA-Test für den Vergleich von mehr als zwei Mittelwerten, und unpaarigen Student's *t* Test für den Vergleich zwischen genau zwei Mittelwerten untersucht. Ein p-Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant interpretiert.

6.3. Ergebnisse

Expression von Angiopoietin-1 und -2 mRNA in Humanen Geweben

Um die *in vivo* Expression von Angiopoietin-1 und -2 zu untersuchen, wurde eine RT-PCR mit einem breiten Spektrum an menschlichen Geweben durchgeführt (Abbildung **6.1**). Eine Expression von mRNA für Angiopoietin-1 war in allen analysierten Gewebetypen leicht nachweisbar, wobei eine stärkere Expression in besonders stark vaskularisierten Geweben wie Lunge, Knochenmark, Skeltnmuskulatur, Testes, Uterus, Plazenta und Prostata zu beobachten war. Angiopoietin-2 fand sich in hohem Maße nur in Uterus und Plazenta, wohingegen es in den meisten anderen Geweben auch nachweisbar war, allerdings in einem deutlich niedrigeren Ausmaß im Vergleich zu Angiopoietin-1. Aus diesen Ergebnissen kann man schlußfolgern, dass Angiopoietin-1 nicht nur während der fetalen Entwicklung, sondern auch fast ubiquitär in den Organen von Erwachsenen exprimiert wird, was einen konstitutiven Expressionstyp nahe legt, wohingegen die Expression von Angiopoietin-2 im

Erwachsenen hauptsächlich auf das weibliche Reproduktionssystem beschränkt ist. Aufgrund des konstitutiven Expressionsmusters scheint dem Angiopoietin-1 im erwachsenen Organismus somit eine Rolle über die Angiogenesefunktion hinaus zuzukommen.

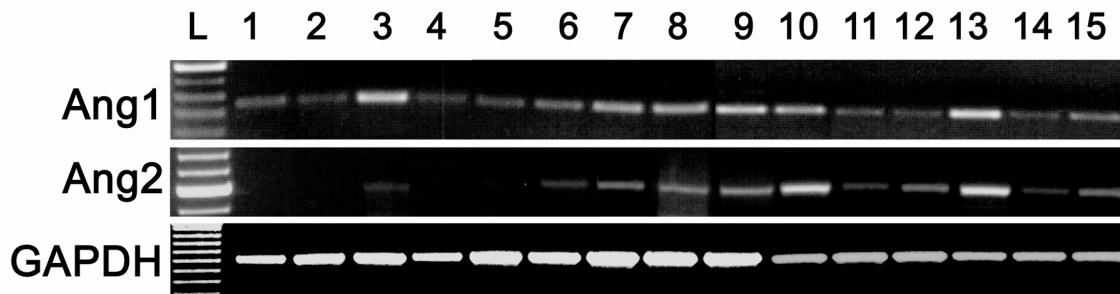


Abb. 6.1: RT-PCR, welche die Expression von Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 in verschiedenen menschlichen adulten Organen zeigt. Die PCR von GAPDH dient als Nachweis der Qualität der verwendeten mRNA's. 1: Rückenmark, 2: Thymus, 3: Lunge, 4: Leber, 5: Nebenniere, 6: Gehirn, 7: Knochenmark, 8: Skelettmuskulatur, 9: Testis, 10; Uterus, 11: Herz, 12: Niere, 13: Plazenta, 14: Colon, 15: Prostata.

Einfluß der Angiopoietine auf die endotheliale Integrin-Zelloberflächen-Expression

Um den Einfluß der Angiopoietine auf die endotheliale Integrinexpression zu untersuchen, stimulierten wir HUVECs mit 100 ng/ml Angiopoietin-1 oder Angiopoietin-2 für 24 Stunden und unternahmen FACS-Analyse, um Veränderungen der Zelloberflächenexpression verschiedener bekannter Integrine und Adhäsionsmoleküle zu evaluieren. Gemessen an der FACS-ermittelten mittleren Fluoreszenz-Intensität fand sich unter basaler Ausgangsbedingung (keine Stimulation) eine sehr niedrige Expression des Integrins α_1 (CD49a), eine mittlere Expressionsstärke für α_2 und eine hohe Expression von β_1 (CD29), PECAM (CD31) und $\alpha_v\beta_3$, wohingegen $\alpha_v\beta_5$ in geringerem Ausmaß exprimiert wurde. Dieses Expressionsmuster der Zelloberflächenrezeptoren auf Endothelzellen stimmt überein mit früher ermittelten Daten.²²⁷ Während Stimulation mit Angiopoietin-1 keinen Einfluß auf die endotheliale α_1 , α_2 , β_1 und PECAM-Expression hatte, wurden die Vitronektin-Rezeptoren $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ signifikant nach 24-stündiger Stimulation mit 100 ng/ml Ang1 herunterreguliert, wie sich durch eine Verschiebung der mittleren Fluoreszenzintensität nach links anzeigte (von einer mittleren Fluoreszenzintensität von 98 ± 4.0 auf 41 ± 2.6 , $p < 0.0005$, bzw. von 35 ± 2.3 auf 18 ± 2.9 , $p < 0.01$) (Abbildung **6.2A** und **6.2B**). Die Fluoreszenz des korrespondierenden Isotyp-gleichen IgG-Immunglobulins diente als Negativ-Kontrolle (auf der linken Seite jedes Histogramms). Stimulation mit 200 ng/ml Angiopoietin-2 führte zu keinen signifikanten Veränderungen in der Zelloberflächenexpression von weder α_1 , α_2 , β_1 , $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ noch PECAM. Die Herabregulierung von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ durch Angiopoietin-1 war Dosis-abhängig, begann bei einer Menge von 100 ng/ml (hier

Reduktion von 63.6% bzw. 60.9% vs. Kontrolle, $p < 0.005$ bzw. $p < 0.05$) und führte zu Werten von 36.7% ($p < 0.0005$) und 42.0% ($p < 0.01$) bei 400 ng/ml Angiopoietin-1 im Vergleich zu Kontrolle (Abbildung 6.3A). Wie in Abbildung 6.3B dargestellt, ergab eine Analyse im Zeitverlauf eine signifikante Reduktion der $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ -Expression bereits nach 4 Stunden Exposition zu 200 ng/ml Angiopoietin-1 (mittlere Abnahme der Fluoreszenz für $\alpha_v\beta_3$ von 98 ± 4.0 auf 53 ± 10.7 , $p < 0.05$, für $\alpha_v\beta_5$ von 35 ± 2.3 auf $19. \pm 4.7$; $p < 0.05$). Eine minimale Expression beider Integrine wurde nach 24 Stunden Exposition erreicht. Ähnliche Ergebnisse wurden mit BAEC-Zellen erhalten (nicht dargestellt). Diese Ergebnisse zeigen, dass Angiopoietin-1 spezifisch die Zelloberflächenexpression der Vitronektin-Rezeptoren $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ auf Endothelzellen in einer Zeit- und Dosis-abhängigen Art und Weise herunterreguliert.

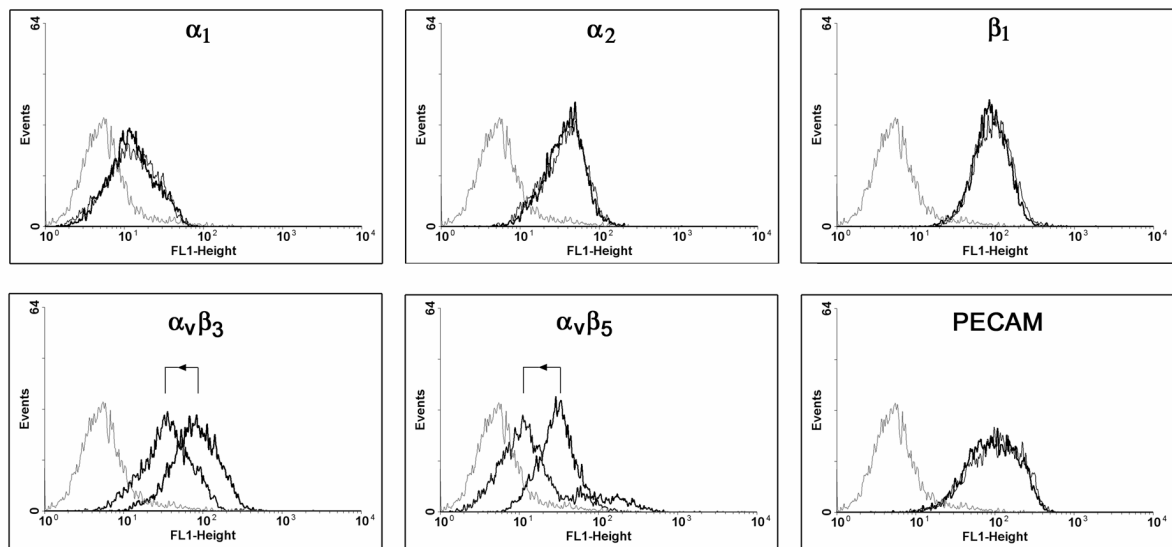


Abb. 6.2A: Angiopoietin-1 vermindert die Oberflächenexpression von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ auf endothelialen Zellen. Durchflußzytometrische (FACS-) Analyse der Integrin- und PECAM-Expression auf HUVECs mit oder ohne Zugabe von 100 ng/ml Angiopoietin-1 für 24 Stunden. Die HUVECs wurden mit EDTA abgelöst, mit anti-Integrin-Antikörpern wie angegeben für 45 Minuten inkubiert, gefolgt von Inkubation mit FITC-konjugiertem anti-Maus IgG, und dann mittels Durchflußzytometrie analysiert. Die Histogramme zeigen Fluoreszenzintensität (x -Achse) gegen Anzahl der Ereignisse (y -Achse). Die Fluoreszenz-Intensität des korrespondierenden Isotyp-gematchten Kontroll-IgGs ist auf der linken Seite von jedem Histogramm aufgezeigt. Die x -Achse ist in logarithmischer Skala dargestellt.

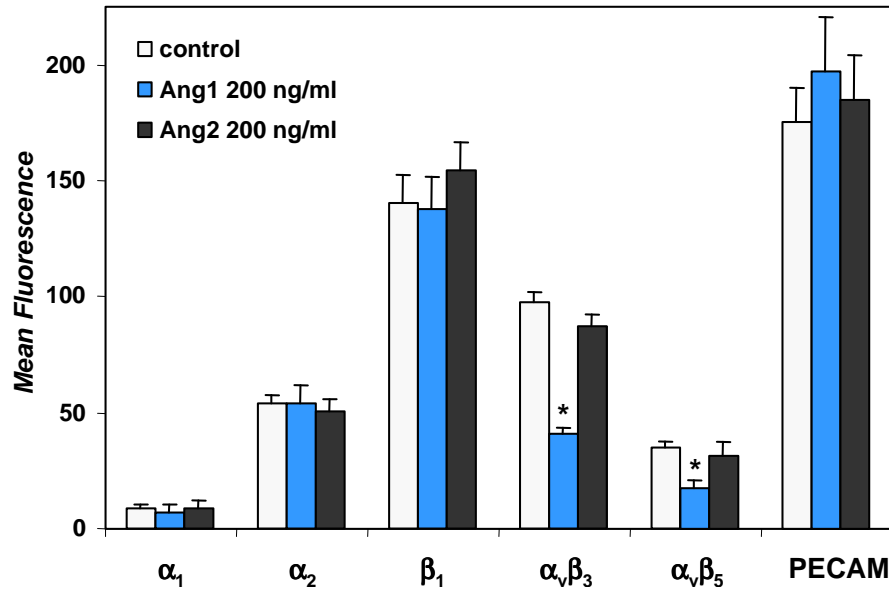


Abb. 6.2B: Angiotensin-1 vermindert die Oberflächenexpression von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ endothelialer Zellen. Quantitative Analyse des Effekts von Angiotensin-1 auf die Integrin- und PECAM-Zelloberflächenexpression. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SEM der mittleren Fluoreszenzintensität von 3 Experimenten. * $p < 0.05$ versus unbehandelte Kontrolle.

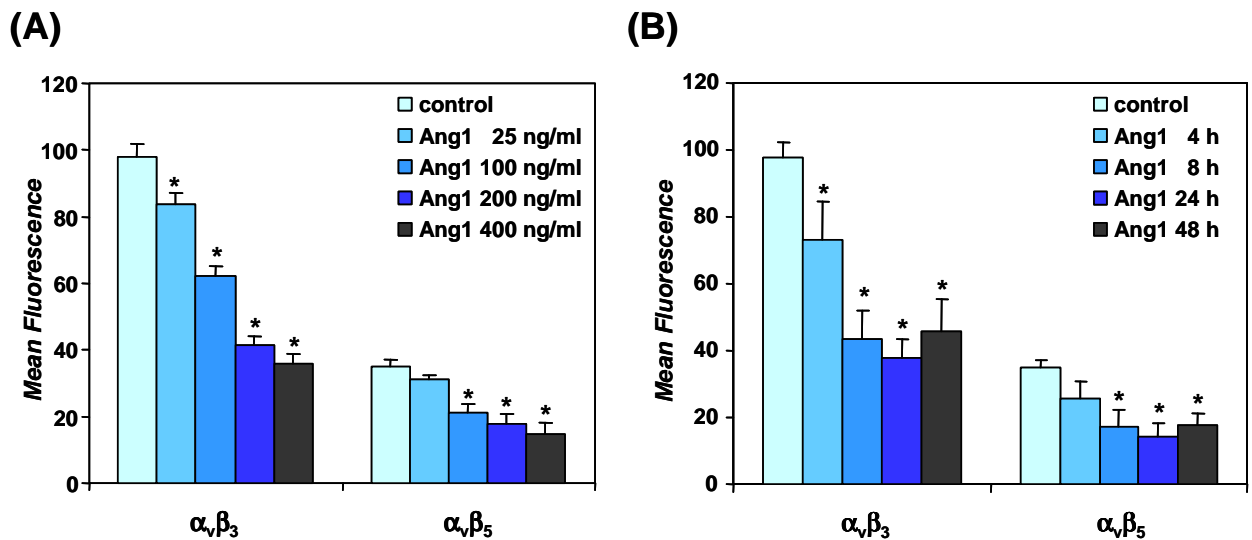


Abb. 6.3: Durchflußzytometrische (FACS-) Analyse, welche den Einfluß der Angiotensin-1 Dosierung (25-400 ng/ml) (A) und der Inkubationsdauer (4-48 Stunden) (B) auf die HUVEC $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrin-Zelloberflächenexpression veranschaulicht. Die Experimente wurden wie unter Abbildung 2.2 beschrieben durchgeführt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ versus unbehandelte Kontrolle.

Einfluß der Angiopoietine auf die Integrin α_v , β_3 und β_5 Monomer-Expression

Da die Integrine aus Dimeren bestehen, führten wir Western-Blots mit Zellextrakten unter reduzierenden Bedingungen durch, um mögliche distinkte Veränderungen der Integrin-Monomerexpression zu untersuchen. Es war berichtet worden, dass VEGF die $\alpha_v\beta_3$ Integrin-Expression in Endothelzellen hochreguliert.⁴⁸ Wir haben daher HUVECs mit 10 oder 50 ng/ml rekombinantem VEGF₁₆₅-Protein 24 Stunden lang inkubiert, und Western-Blot Analysen bestätigten eine VEGF-induzierte Hochregulation der Integrin-Monomere β_3 und α_v auf der Proteinebene (Abbildung **6.4A**, linke Seite). Im Unterschied hierzu führte eine 24-stündige Stimulation von HUVECs mit steigenden Konzentrationen an Angiopoietin-1 zu einer signifikanten Abnahme der β_3 -Expression, beginnend bei 50 ng/ml (Abbildung **6.4A**, Mitte), während eine Abnahme der Expression von α_v nachweisbar war, wenngleich nicht so ausgeprägt. Wie in Abbildung **6.4A**, rechte Seite, gezeigt, resultierte die Stimulation von HUVECs mit vergleichbaren Mengen an Angiopoietin-2 jedoch nicht in irgendeiner Änderung in der Integrin β_3 und α_v Monomer-Expression. Bei allen Experimenten wurden die Blots gestrippt und mit einem anti-Tubulin Antikörper inkubiert, um sicherzustellen, dass in allen Gruppen die gleiche Menge an Protein geladen wurde.

Es war berichtet worden, dass Angiopoietin-2 in nicht-endothelialen Zellen, welche ektopisch den Tie2-Rezeptor exprimieren, eine Tyrosin-Phosphorylierung der intrazellulären Rezeptordomäne bewirken kann.¹⁹⁸ Wir haben daher NIH 3T3 Fibroblasten, die wir vorher stabil mit dem Tie2 Rezeptor transfiziert hatten, mit 50 oder 200 ng/ml Angiopoietin-1 oder Angiopoietin-2 stimuliert und anschließend Western Blots zur Beurteilung der β_3 -Expression durchgeführt. Bezüglich Angiopoietin-1 fand sich eine Dosis-abhängige, deutliche Abnahme der β_3 Integrin-Expression (Abbildung **6.4B**, linke Seite), vergleichbar mit dem Effekt auf Endothelzellen. Im Gegensatz zu den in Endothelzellen erhaltenen Ergebnissen führte eine Stimulation der 3T3/Tie2-Zellen mit Angiopoietin-2 zu einer signifikanten Abnahme der β_3 -Expression, nicht zu unterscheiden von dem mit Angiopoietin-1 erhaltenem Effekt (Abbildung **6.4B**, rechte Seite). Somit wiesen Fibroblasten, welche den Tie2-Rezeptor ektopisch exprimieren, eine verminderte Expression des Integrins β_3 als Reaktion auf Exposition sowohl mit Angiopoietin-1 als auch mit Angiopoietin-2 auf; im Gegensatz hierzu zeigten Endothelzellen diese Reaktion nur nach Exposition mit Angiopoietin-1.

Um den Einfluß von Angiopoietin-1 auf die β_3 , β_5 und α_v -Expression auf der mRNA-Ebene zu untersuchen, stimulierten wir HUVECs mit 50 oder 200 ng/ml Angiopoietin-1 für 24 Stunden, extrahierten dann RNA und führten dann Northern-Blots durch. Wie in Abbildung **6.4C** gezeigt, führte Behandlung mit Angiopoietin-1 zu einer deutlichen Abnahme der mRNA-Expression beider β -Integrin-Monomere, ebenso wie der α_v -Expression. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die auf der Protein-Ebene beobachtete Herabregulierung von α_v and β_3 transkriptionell reguliert wird.

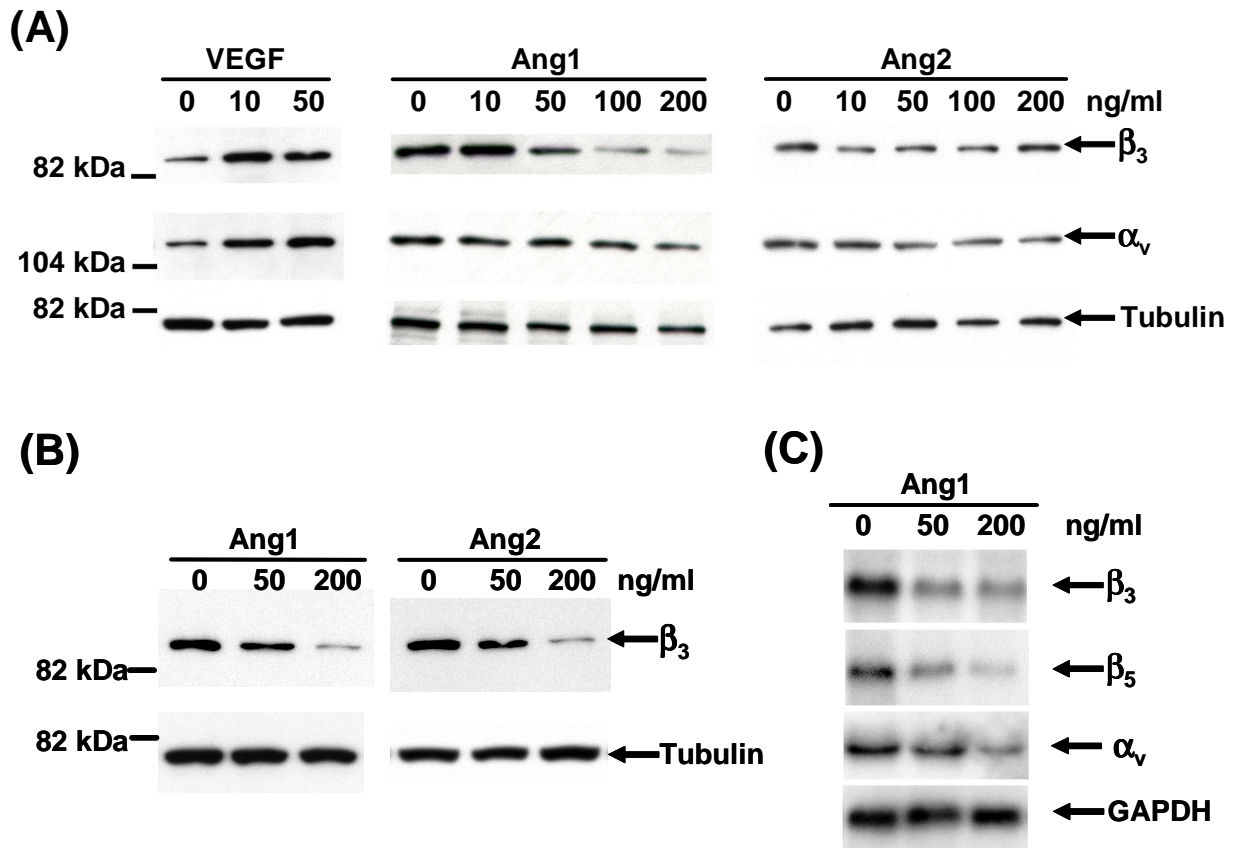


Abb. 6.4: Einfluß von Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 auf die β_3 und α_v Integrin-Monomerexpression. Die Zellen wurden mit zunehmenden Mengen an den angegebenen Faktoren behandelt, und die Zellkulturen wurden dann nach 24 Stunden lysiert. Die Western-Blots wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. **(A)** HUVECs wurden mit 0 bis 50 ng/ml rekombinantem VEGF₁₆₅, 0 bis 200 ng/ml Angiopoietin-1 oder 0 bis 200 ng/ml Angiopoietin-2 Protein behandelt. Gezeigt sind repräsentative Western-Blots, hergestellt mit Antikörpern, welche an das β_3 oder α_v Protein-Monomer binden. Re-Blotting der Membranen mit einem anti-Tubulin Antikörper demonstriert äquivalente Ladebedingungen. **(B)** NIH 3T3-Fibroblasten, welche nach stabiler Transfektion den Tie2-Rezeptor ectopisch exprimieren, wurden mit 0 bis 200 ng/ml Angiopoietin-1 bzw. Angiopoietin-2 behandelt. Gezeigt sind repräsentative Blots mit Antikörpern gezeigt, welche mit β_3 und Tubulin als Ladekontrolle binden. **(C)** HUVECS wurden mit 0 bis 200 ng/ml Angiopoietin-1 behandelt, und nach 24 Stunden wurde Gesamt-RNA für Northern-Blots extrahiert. Jeweils 15 μ g RNA pro Bande wurden auf Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt, auf Nylon-Mmembranen transferiert, und mit radioaktiv markierten cDNA's wie angegeben hybridisiert.

Rolle der PI3 Kinase und PKC auf die Angiopoietin-1 induzierte Modulation der Integrin β_3 Expression

Da bekannt ist, dass die Bindung des Liganden Angiopoietin-1 an seinen Rezeptor Tie-2 eine Aktivierung der PI-3 Kinase (PI3K) bewirkt, und eine PI3K-Aktivierung zumindest teilweise für die Vermittlung der zellulären Effekte von Angiopoietin-1 hinsichtlich Überleben und Migration verantwortlich zu sein scheint,^{228, 229} gaben wir die spezifischen PI3K-Inhibitoren Wortmannin (WM) und LY294002 zu HUVEC-Kulturen. Behandlung mit 25 nM Wortmannin oder 50 nM LY294002 alleine veränderte die β_3 -Proteinexpression nicht signifikant (Abbildung 6.5A). Darüberhinaus verhinderte die Zugabe von WM oder LY294002 in gleicher Menge zu mit 100 ng/ml behandelten HUVECs nicht die Angiopoietin-1-induzierte Herabregulierung der β_3 -Integrinexpression. Daraus läßt

sich der Schluß ziehen, dass die Modulation der endothelialen β_3 -Expression durch Angiopoietin-1 unabhängig ist von einer PI3K-Aktivierung. Es war beschrieben worden, dass Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) β_3 -Integrinexpression induziert, war wir mittels Western Blot bestätigten (Abbildung 6.5B, Spur 2). Zugabe von 50 nM des spezifischen PKC β -Inhibitors LY379196 (Spur 3) oder Zugabe von 100 ng/ml Ang1 (Spur 4) verhinderte die PMA-induzierte Zunahme der β_3 -Expression. In vergleichbarer Weise konnte die durch 50 ng/ml VEGF erhöhte Expression von Integrin β_3 durch Zugabe des PKC β -Inhibitors LY379196 oder im gleichen Ausmaße durch Zugabe von 100 ng/ml Ang1 (Abbildung 6.5C) unterdrückt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Ang1 seinen Effekt auf die Integrin-Expression durch Blockade des PKC-Stoffwechselweges vermitteln könnte.

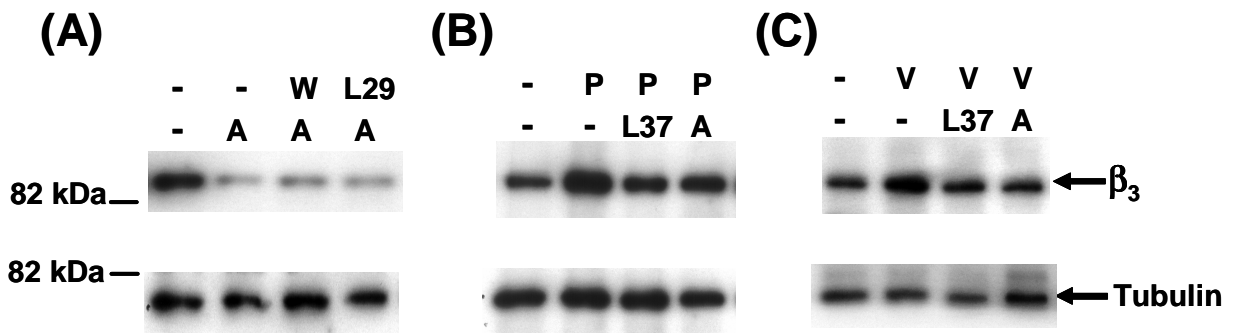


Abb. 6.5: Western Blots zum Nachweis der β_3 -Integrinmonomer-Expression in proliferierenden HUVECs. (A) Einfluss der PI-3 Kinase-Inhibitoren Wortmannin (W) und LY294002 (L29) auf die Angiopoietin-1-induzierte Reduktion der β_3 -Integrinexpression. Spur 1: Kontrolle (DMSO-Trägersubstanz); Spur 2: 100 ng/ml Ang1; Spur 3: 25 nM Wortmannin plus 100 ng/ml Ang1; Spur 4: 50 nM L29 plus 100 ng/ml Ang1. (B) Einfluß von Ang1 oder des Proteinkinase C β (PKC β)-Inhibitors LY379196 (L37) auf die Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)-induzierte Erhöhung der β_3 -Integrinexpression. Spur 1: Kontrolle (DMSO-Trägersubstanz); Spur 2: 20 ng/ml PMA; Spur 3: 20 ng/ml PMA plus 50 nM L37; Spur 4: 20 ng/ml PMA plus 100 ng/ml Ang1. (C) Einfluß von Ang1 oder des PKC β -Inhibitors L37 auf die VEGF-induzierte Erhöhung der β_3 -Integrinexpression Spur 1: Kontrolle (DMSO-Trägersubstanz); Spur 2: 50 ng/ml VEGF; Spur 3: 50 ng/ml VEGF plus 50 ng/ml L37; Spur 4: 50 ng/ml VEGF plus 100 ng/ml Ang1. Die Membranen wurden gestrippt und mit einem anti-Tubulin-Antikörper inkubiert, um vergleichbare Proteinbelasung zu verdeutlichen. Die Western-Blots wurden wie unter Abbildung 6.4 beschrieben durchgeführt.

Angiopoietin-1 hemmt die Aktivität des β_3 und β_5 Integrin-Promoters

Um festzustellen, ob die Herabregulierung von β_3 und β_5 durch Angiopoietin-1 bedingt ist durch eine Hemmung der Gen-Transkription, wurden BAECs mit entweder einem -1084/+35 bp β_3 -Integrin oder mit einem -875/+110 bp β_5 -Integrin-Promoterregion/Luziferase-Reporter-gen-Konstrukt transfiziert. 200 ng/ml Angiopoietin-1 reduzierten hierbei die Transkription der β_3 -Promoterregion auf 0.54 ± 0.09 -fach und der β_5 -Promoterregion auf 0.44 ± 0.17 -fach (jeweils $p < 0.05$ versus unbehandelte BAECs) (Abbildung 6.6). Da bekannt ist, dass Phorbol-ester die β_3 -Integrinexpression transaktivieren können,^{230, 231} stimulierten wir transfizierte BAECs mit 20 ng/ml PMA, was zu einem 2.53 ± 0.32 -fachen Anstieg der β_3 - und zu einem 1.97 ± 0.08 -fachen Anstieg der β_5 -Promoteraktivität im Vergleich

zur unbehandelten Kontrolle führte. Behandlung von BAECs mit 200 ng/ml Angiotensin-1 schwächte die PMA-induzierte Transaktivierung des β_3 (auf 1.37 ± 0.22 ; $p < 0.05$) und β_5 -Promoters (auf 0.86 ± 0.26 -fach versus unbehandelte Kontrolle; $p < 0.05$) signifikant ab (Abbildung 6.6). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Angiotensin-1 seine hemmenden Eigenschaften auf die β_3 - und β_5 -Integrinexpression via eines transkriptionellen Mechanismus ausübt.

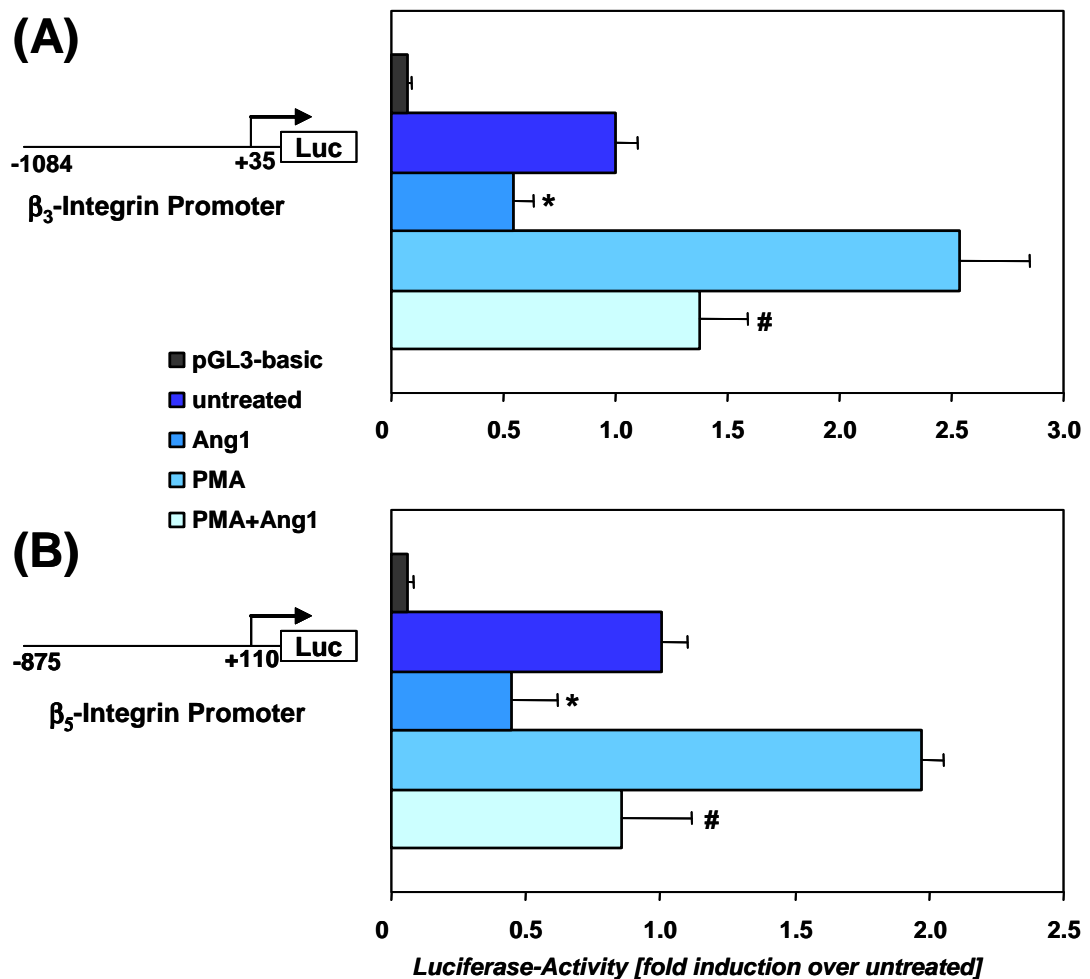


Abb. 6.6: Angiotensin-1 hemmt die β_3 - und β_5 -Integrin-Transkription. BAECs wurden mit einem -1084/+35 bp β_3 (A) oder einem -875/+110 bp β_5 (B) Integrinpromoter-Luziferasekonstrukt transfiziert. pGL3-basic Vektor diente als Negativkontrolle. Die transfizierten Zellen wurden mit Kontrollmedium allein (*unbehandelt*), 200 ng/ml Angiotensin-1 allein, 20 ng/ml Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) allein, oder jeweils in Kombination mit 200 ng/ml Angiotensin-1 exponiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität wurde in einem Luminometer gemessen und mit der Aktivität von kotransfiziertem internem Kontrollplasmid normalisiert. Die Ergebnisse sind als x-fache Induktion im Vergleich zu unbehandelten BAECs dargestellt. Die Balkendiagramme repräsentieren den Mittelwert \pm SEM von 3 Experimenten.

Kontinuierliche Expression von Angiopoietin-1 in Kokultur von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen reduziert die endotheliale $\alpha_v\beta_3$ -Zelloberflächenexpression

Um physiologische Umgebungsbedingungen zu simulieren, wurden Experimente mit einem Zell-Kokultursystem durchgeführt, welches aus zwei Kompartimenten getrennt durch eine poröse Membran besteht. Um eine kontinuierliche Produktion und Sekretion von Angiopoietin-1 zu gewährleisten, wurden glatte Gefäßmuskelzellen in das untere Kompartiment eingebracht und mit verschiedenen Mengen (multiplicities of infection = moi's) eines adenoviralen Konstrukts, welches rekombinantes Angiopoietin-1 exprimiert, für 4 Stunden transduziert.

Wie in Abbildung **6.7A** dargestellt, führte dieses Vorgehen zu einer starken Expression von sowohl Angiopoietin-1 mRNA als auch Proteinexpression, wie man anhand von Northern- und Western-Blots von Extrakten der glatten Gefäßmuskelzellen sehen kann. Ein gleichartiges adenovirales Konstrukt, welches für green fluorescent protein (GFP) kodiert, diente als Negativkontrolle. Bei einer moi von 100 waren ca. 95% der Zellen nach Transduktion mit Ad-GFP positiv für GFP, wie man mittels Fluoreszenz-Mikroskop sehen kann (Abbildung **6.7B**), und ca. 80% in der Immunhistologie positiv für Angiopoietin-1 (Abbildung **6.7C**). 48 Stunden nach adenoviraler Transduktion der glatten Gefäßmuskelzellen und sorgfältiger Entfernung des Mediums, welches den Adenovirus enthielt und Zugabe von frischem Medium wurden die Endothelzellen vom oberen Kompartiment des Kokultursystems entfernt und FACS-Analyse für endotheliale $\alpha_v\beta_3$ -Expression durchgeführt.

Die räumliche Nähe der Endothelzellen zu glatten Muskelzellen, welche kontinuierlich Angiopoietin-1 exprimieren, führte zu einer deutlichen Abnahme der endothelialen $\alpha_v\beta_3$ -Oberflächenexpression im Vergleich zur GFP-Kontrolle, wie man anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten abschätzen kann (bei einer moi von 20: 62.3 ± 8.6 Ad-Angiopoietin-1 vs. 94.0 ± 9.0 , $p < 0.05$; bei moi 50: 34.3 ± 8.1 vs. 93.0 ± 13.1 , $p < 0.05$; bei moi 100: 27.3 ± 4.6 vs. 99.7 ± 10.2 , $p < 0.005$) (Abbildung **6.7D**).

Angiopoietin-1-induzierte Reduktion der endothelialen $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Expression führt zu verringerter Zellmotilität

Um festzustellen, ob die beobachtete Angiopoietin-1-induzierte Reduktion der $\alpha_v\beta_{3/5}$ -Integrinexpression zu funktionellen Konsequenzen führt und da bekannt ist, dass $\alpha_v\beta_{3/5}$ -Integrinen eine außerordentlich wichtige Rolle in der Zellbewegung zukommt,⁴⁹ führten wir Migrationsassays mit einer modifizierten Boyden-Kammer durch. Weil Vitronektin ein Ligand für $\alpha_v\beta_3$ und für $\alpha_v\beta_5$ ist, füllten wir gereinigtes Vitronektin (20 $\mu\text{g/ml}$) in das untere Kompartiment der Boyden-Kammer, was zu einer Beschichtung der Unterseite des mit Poren versehenen Filters führt. Mit dieser Versuchsanordnung mißt der Assay die Zellmigration gegenüber einem Gradienten von gebundenen Liganden, die sog. Haptotaxis.⁴⁸

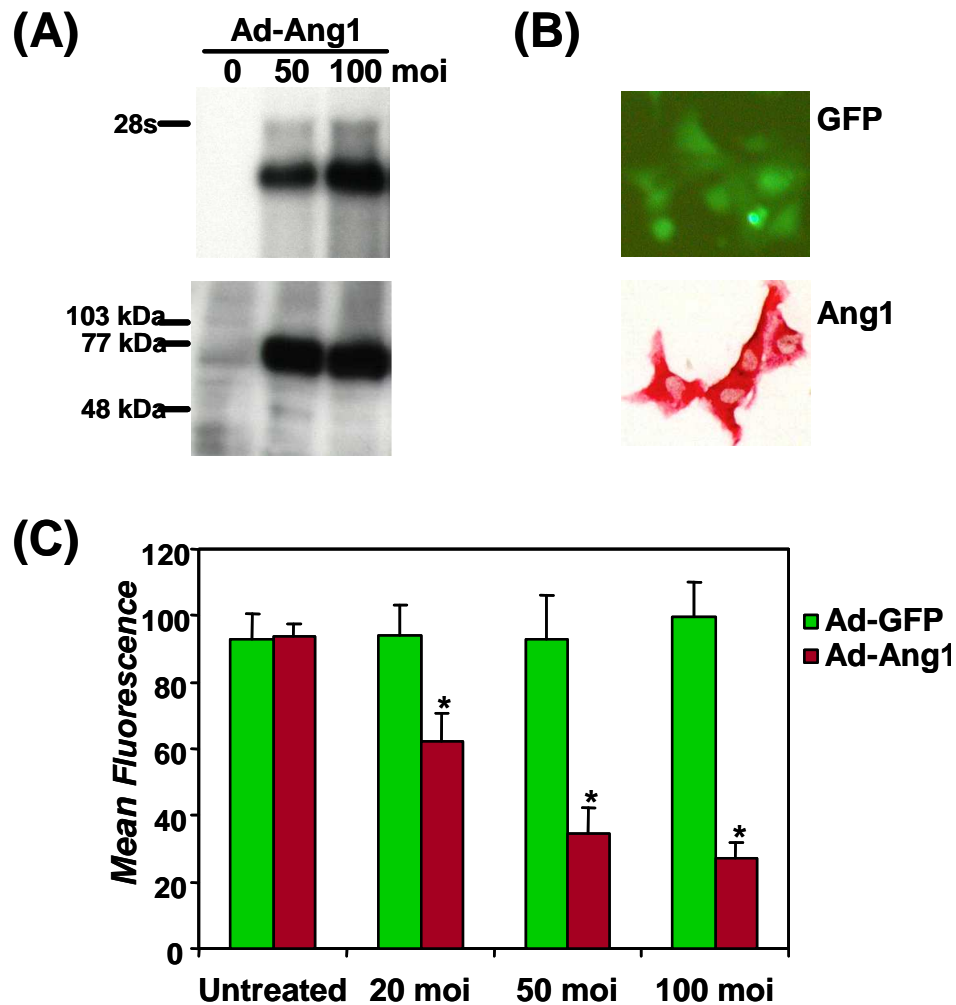


Abb. 6.7 Kokultur-Experimente mit glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs), welche Angiopoietin-1 überexprimieren, und BAECs. **(A)** Western-Blot mit einem anti-Angiopoietin-1 Antikörper (oberer Teil), und Northern Blot mit einem 570 bp radioaktiv markierten Angiopoietin-1 cDNA-Fragment als Probe (unterer Teil) nach Transduktion von VSMCs mit verschiedenen Mengen (multiplicities of infection=moi wie angegeben) eines gereinigten adenoviralen Angiopoietin-1-exprimierenden Konstrukts (Ad-Ang1), welche eine starke Expression von Angiopoietin-1 demonstrieren. **(B)** GFP-Expression (oberer Teil) und Immunhistologie mit einem anti-Angiopoietin-1 Antikörper (unterer Teil) zeigen eine 90 bis 100%ige Transduktion der Zellen bei einer moi von 100. **(C)** Expression von $\alpha_v\beta_3$ auf BAECs, welche einer kontinuierlichen Angiopoietin-1-Sekretion von VSMCs exponiert waren. Mit Ad-Ang1 transduzierte VSMCs zu den angegebenen moi's wurden in das untere Kompartiment des Kokultur-System eingebracht, und anschließend wurden in die oberen Einsätze, welche eine anorganische Membran mit einer 0.02 μm Porengröße enthalten, BAECs zugegeben. Nach 24 Stunden Exposition wurden die BAECs vom oberen Kompartiment mittels EDTA abgelöst, und eine durchflußzytometrische Analyse wie unter Abbildung 2 beschrieben durchgeführt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$ versus unbehandelte Zellen (keine Zugabe von Virus). Die endotheliale $\alpha_v\beta_3$ -Expression war nach Transduktion der VSMCs mit Ad-GFP bei allen untersuchten moi's unverändert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Wie in Abbildung 6.8A dargestellt, begünstigt Vitronectin die Migration von HUVECs. Eine Vorbehandlung von HUVECs mit steigenden Konzentrationen an Angiopoietin-1 für 24 Stunden führte Dosis-abhängig zu einer Abschwächung der Endothelzellmigration auf Vitronectin auf

55.7±7.0% bei 100 ng/ml und auf 46.7±9.3% bei 200 ng/ml Angiopoietin-1 (jeweils $p < 0.05$) im Vergleich zu unbehandelten HUVECs. Das Ausmaß an Reduktion der Zellmotilität auf Vitronektion durch Vorbehandlung mit Angiopoietin-1 war vergleichbar zur Hemmung der Migration durch Zugabe des $\alpha_v\beta_3$ -blockierenden Antikörpers LM609 zur Zellsuspension ohne Vorbehandlung mit Angiopoietin-1 (Abbildung 6.8B). Darüberhinaus wurde die durch Vorbehandlung mit Angiopoietin-1 abgeschwächte Zellmotilität weiter reduziert durch Zugabe von LM609 Antikörper und von $\alpha_v\beta_5$ -blockierenden Antikörper P1F6, was vermuten läßt, dass die Expression und/oder Funktion von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ durch Angiopoietin-1 deutlich reduziert, aber nicht vollständig gehemmt wird.

Zusammengenommen legen diese Daten nahe, dass die durch chronische Angiopoietin-1-Stimulation bewirkte Reduktion der endothelialen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Oberflächenexpression zu einer Verringerung der zellulären Motilität (Haptotaxis) auf spezifischen extrazellulären Matrixproteinen führt.

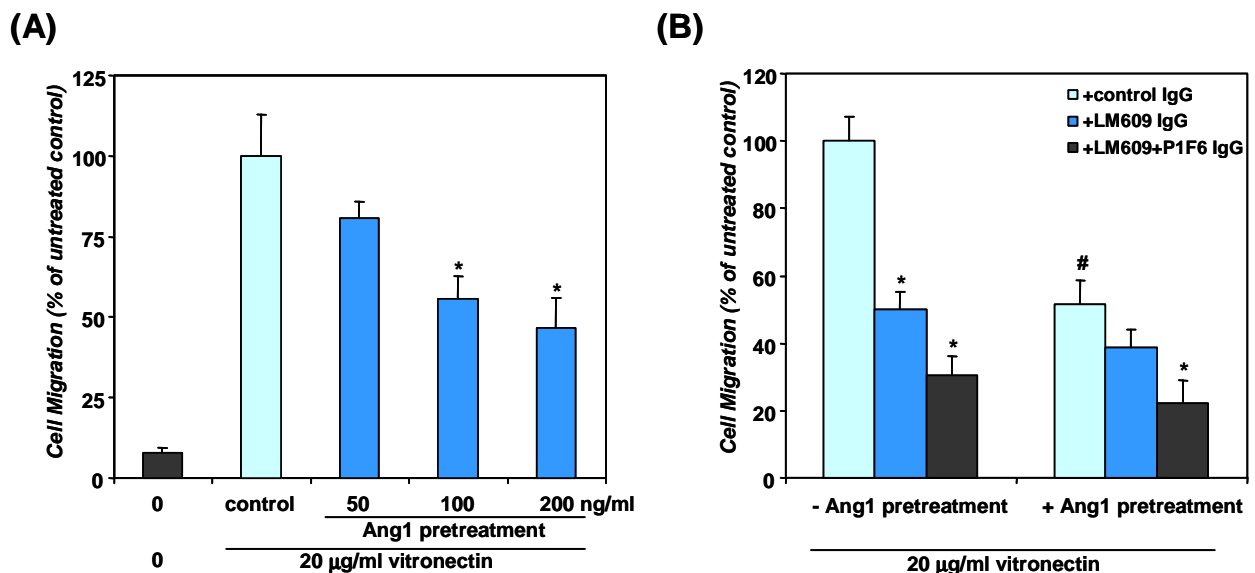


Abb. 6.8: Zell-Migrationsexperimente, um den Einfluß von Angiopoietin-1 auf die Vitronektin-abhängige Haptotaxis von Endothelzellen (HUVECs) abzuschätzen, d.h. die gerichtete Motilität von Zellen entlang eines Gradienten von gebundenem extrazellulären Matrix-Protein. Da Vitronektion ein Ligand für $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ ist, hängt die Haptotaxis in diesem Experiment von der quantitativen Oberflächenexpression seiner Rezeptoren ab. **(A)** Durch Zugabe von 20 µg/ml Vitronektin zur unteren Kammer eines modifizierten Boyden-Apparates induzierte Haptotaxis. Die Zahl der 4 Stunden nach Zugabe von 20 µg/ml Vitronektin migrierten Zellen wurde als 100% (Kontrolle) gesetzt. Vorbehandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen von Angiopoietin-1 (50, 100 oder 200 ng/ml) für 24 Stunden reduzierte Dosis-abhängig die Zellhaptotaxis auf Vitronektin. *: $p < 0.05$ versus Kontrolle (keine Vorbehandlung). **(B)** Hemmung der Haptotaxis von HUVECs auf 20 µg/ml Vitronektin durch Zugabe der Integrin $\alpha_v\beta_3$ -blockierenden Antikörper LM609 und zusätzlich des $\alpha_v\beta_5$ -blockierenden Antikörpers P1F6 (linke Säulen), im Vergleich zum gleichen Experiment mit HUVECs, welche mit 100 ng/ml Angiopoietin-1 für 24 Stunden vorbehandelt wurden (rechte Säulen). * $p < 0.05$ versus Kontroll-IgG. # $p < 0.05$ Vorbehandlung mit Angiopoietin-1 versus keine Vorbehandlung.

6.4. Diskussion

Es ist gezeigt worden, dass Angiopoietin-1 zusätzlich zu seiner wichtigen Rolle in der embryonalen Angiogenese anti-inflammatorische Effekte via Aktivierung seines spezifischen Rezeptors Tie-2 vermittelt.¹⁷ *In vitro* und *in vivo*-Daten ergaben, dass eine Modifikation endothelialer Adhäsionsmoleküle und Zell-Junctions ein Mechanismus ist, wodurch Angiopoietin-1 inflammatorische Reaktionen dämpfen kann.^{6, 232} In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen legen die vorgestellten Ergebnisse nahe, dass Angiopoietin-1 in der Lage ist, das Ausmaß der Expression der Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ zu kontrollieren. Beide Integrine sind auf Endothelzellen exprimiert und, wenn auch nicht essentiell für die embryonale Gefäßentwicklung, für pathologische Angiogenese bedeutsam.^{213, 233} $\alpha_v\beta_3$ wird auf Endothelzellen durch Hypoxie und Zytokine wie VEGF hochreguliert.^{48, 234} Auf Tumorgefäßen und in atherosklerotisch veränderten Arterien ist es in hohem Ausmaß exprimiert, wohingegen seine Expression in normalen Arterien minimal ist.^{235, 236} Dieses Expressionsmuster beider Integrine in adulten Geweben legt nahe, dass ihr Erscheinen „aktiviertes“ Endothel, wie es für Entzündung und Angiogenese erforderlich ist, markiert. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Angiopoietin-1 als parakriner Schalter fungieren könnte, welcher den Übergang von inflammatorischen oder angiogenen Endothel zu „ruhemem“ Endothel vermittelt.²³⁷⁻²³⁹ In dieser Hinsicht würde unser Ergebnis, dass Angiopoietin-1 in der Lage ist, die Zelloberflächenexpression von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ zu kontrollieren, in das Konzept passen, dass Angiopoietin-1 inflammatorischen Prozessen als Gegenspieler entgegenwirkt.

Die Signalwege für die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Angiopoietin-1 sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Aus vorausgehenden Arbeiten ist bekannt, dass Angiopoietin-1 die VEGF-stimulierte Leukozyten-Adhäsion zu Endothelzellen reduzieren sowie die Gewebefaktor-Expression abschwächen kann. Durch Verwendung spezifischer Inhibitoren und dominant-negativer Varianten wurde hierbei gezeigt, dass diese Effekte abhängig sind von einer Aktivierung der PI3-Kinase und des Akt-Stoffwechselweges.^{205, 238, 239} In unseren Experimenten führte eine Zugabe eines spezifischen PI3-Kinase-Inhibitors nicht zu einem Aufheben des Effekts von Angiopoietin-1 auf die β_3 -Expression, aber Angiopoietin-1 war in der Lage, den Effekt von PMA umzukehren. Letzteres ist ein bekannter Aktivator des PKC-Stoffwechselweges. In analoger Weise ist eine PKC-Aktivierung mutmaßlich für die Vermittlung VEGF-induzierter Effekte involviert, insbesondere bei der Erhöhung der vaskulären Permeabilität und bei der Endothelzell-Proliferation.^{240, 241} Hier konnten wir wiederum zeigen, dass Angiopoietin-1 dem Effekt von VEGF auf die β_3 -Integrinexpression entgegenwirkt, was vereinbar wäre mit einer Interferenz zwischen Angiopoietin-1 und dem PKC-Stoffwechselweg. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einem kürzlichen Bericht, welcher zeigte, dass die VEGF-vermittelte Unterbrechung von endothelialen Zell-Zell-Kontakten eine Aktivierung von PKC β erfordert, und dieser Stoffwechselweg konnte durch Angiopoietin-1 blockiert werden.²⁴²

Wie in Kapitel 5 gezeigt und mittlerweile von anderen bestätigt, führt Angiotensin II zu einer gerichteten Migration von Endothelzellen (Chemotaxis).^{222, 229} Wir fanden jetzt, dass eine prolongierte Stimulation von Endothelzellen mit Ang1 die Zellmotilität auf dem $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ -Liganden Vitronektin reduzierte, was auf dem ersten Blick widersprüchlich zu den vorausgegangenen Ergebnissen wirkt. Die unterschiedliche regionale und zeitliche Applikation von Angiotensin II, welche auf dem Unterschied von Chemotaxis und Haptotaxis basiert, erklärt jedoch diese gegensätzlichen Befunde. Die chemotaktische Antwort von Zellen hängt nämlich ab von einem regionalen Gradienten des Liganden, und üblicherweise wie bei Experimenten hierfür der chemotaktische Wirkstoff für 4-6 Stunden appliziert, währenddessen die Zellen Zeit haben, sich zur Testsubstanz hin zu bewegen. Im Falle der Haptotaxis wird die allgemeine Motilität der Zellen auf einem spezifischen extrazellulärem Matrix-Liganden getestet, und diese Motilität, wie mit unserem Experiment gezeigt, kann durch Vor-Inkubation mit Angiotensin II beeinflusst werden, d.h. durch Zugabe des exogenen Faktors gleichsam von oben auf die Zellen für einen verlängerten Zeitraum (24 Stunden). Man könnte daher interessanterweise eine biphasische Reaktion von Endothelzellen gegenüber Angiotensin II postulieren: Im Zusammenhang mit Inflammation oder Angiogenese migrieren Endothelzellen in Richtung von Angiotensin II, solange sie einen Substrat-Gradienten wahrnehmen. Wenn sich dieser Gradient angeglichen hat, d.h. die Zelle hat ihren Zielort erreicht und ist nun von gleichmäßigen Mengen an Angiotensin II umgeben, wird die zelluläre Motilität auf angiogenen extrazellulären Matrixproteinen (wie Vitronektin) dadurch abgeschwächt, dass nun $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ herunterreguliert wird. Diese Theorie würde mit bekannten Befunden zusammenpassen, dass Angiotensin II in ruhendem adulten Gewebe nachweisbar exprimiert wird, und zwar insbesondere in umgebenden periendothelialen Zellen.^{198, 202, 222}

Es wurde gezeigt, dass Zellen direkt an Angiotensin II und -2 mittels Bindung an Integrine adhären können. Abhängig vom Zelltyp, konnte Angiotensin II an $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ binden.^{218, 219, 243} Kardiale und skelettale Myozyten adhärten an Ang1 und Ang2, trotz Fehlens des Tie2-Rezeptors, was Zell-Überlebenssignale vermittelte.²²⁰ Diese Promiskuität von Ang1, an verschiedene Zelltypen über Integrine zu binden, könnte eine außergewöhnliche Klebrigkeit der Angiotensine an Integrine bedeuten, was dann „inside-out“ Signalantworten triggert. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die hier vorgestellten Ergebnisse einer $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ -Modulation durch Ang1 nicht nur durch spezifische Bindung an den Tie2-Rezeptor, sondern auch durch Bindung an Integrine erklären lassen. Diese Bindung könnte dann zu einer Internalisierung von Ang1-Integrin-Komplexen führen mit nachfolgend reduzierter Zelloberflächen-Expression. Nichtsdestotrotz lässt sich aus den mRNA und den β_3/β_5 -Promoter ableiten, dass die beobachteten Effekte auf die Integrin-Oberflächenexpression transkriptionell reguliert sind. Darüberhinaus ist auch gezeigt worden, dass Ang1 an β_1 -Integrine binden kann, und dennoch fand sich bei unseren Experimenten keine Veränderung der β_1 -Oberflächenexpression durch Ang1.

7. Protektive Rolle von Angiopoietin-1 beim Endotoxin-induzierten septischen Schock

7.1. Einleitung

Angiopoietin-1 (Ang1), ein Ligand für die endothelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase Tie2,⁴⁴ spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems.^{13, 15, 244} Im Gegensatz zum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), ein potenter vaskulärer Permeabilitätsfaktor, welcher die mikrovaskuläre Permeabilität gegenüber Blutplasma-Proteinen erhöht, hat Ang1 die Fähigkeit, die Gefäßdurchlässigkeit zu reduzieren.^{6, 16, 17} In transgenen Ang1-überexprimierenden Mäusen ist gezeigt worden, dass die Blutgefäße resistenter gegen Undichtigkeit waren,¹⁶ und adenovirale Überexpression von Ang1, verhinderte die Ausbildung eines durch VEGF oder Senföl induzierten Gewebeödems.¹⁷ Ferner ist bekannt, dass Ang1 anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist, indem es endotheliale Zell-Adhäsionsmoleküle und cell junctions modifiziert.⁶ Daher könnte Ang1 durch Beeinflussung der mikrovaskulären Undichtigkeit therapeutisch nützlich sein bei Krankheitszuständen, in welchen eine Gefäßundichtigkeit und Ödemneigung aus einer Gefäßentzündung resultiert.

Der septische Schock wird hauptsächlich durch eine überschießende systemische Antwort auf Gram-negative Bakterien und ihre typische Zellwand-Komponente, dem Lipopolysaccharid (LPS), verursacht.²⁴⁵ Er ist charakterisiert durch eine systemisch erhöhte Kapillarpermeabilität, ein interstitielles und alveoläres Lungenödem, und eine erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6) und Interferon- γ (IFN- γ).^{246, 247} Trotz Fortschritten im Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge und Verbesserungen im supportiven Management von Patienten im septischen Schock bleibt die Mortalitätsrate aufgrund von systemischer Hypotension, reduzierter myokardialer Kontraktilität und Gewebshypoxie inakzeptabel hoch.²⁴⁸ So beträgt die Mortalität bei schwerer Sepsis bis zu 85%, wenn sie von Schock und Multiorganversagen begleitet wird.²⁴⁹ Verschiedene neuere in Erprobung befindliche Sepsis-Therapien schließen antikoagulatorische Therapie und LPS- und Zytokin-neutralisierende Verfahren mit ein. Während gezeigt wurde, dass der Einsatz von rekombinanten aktiviertem Protein C das Überleben von Sepsis-Patienten verbessern kann,²⁵⁰ behandelt es nur den koagulatorischen Aspekt bei Sepsis. Therapien, die auf die Neutralisation von pro-inflammatorischen Zytokinen oder LPS gerichtet sind, wie dem Einsatz von TNA- α oder LPS-Antikörpern, haben sich in klinischen Studien als weitgehend ineffektiv herausgestellt.²⁵¹⁻²⁵³ Die Entwicklung neuer Therapien zur Verbesserung der Überlebensrate von Patienten im septischen Schock ist daher von großem Interesse.²⁵⁴

In Mäusen führt Verabreichung höherer Dosen von LPS zu einem Syndrom, welches dem septischen Schock beim Menschen ähnelt.²⁵⁵ Da Ang1 entgegenwirkende Eigenschaften auf eine erhöhte Kapillarpermeabilität und endotheliale Entzündung aufweist, war unsere Fragestellung, ob eine Überexpression von Ang1 im Mausmodell des LPS-induzierten septischen Endotoxin-Schocks zu

einem therapeutisch günstigen Effekt im Sinne einer erhöhten Überlebensrate führt. Wir zeigen mit den folgenden Experimenten eine verbesserte Überlebensrate in septischen Mäusen, welche mit einem adenoviralen Konstrukt kodierend für Ang1 behandelt wurden. Die durch Ang1-Behandlung reduzierte Mortalität war begleitet von einer Verbesserung der hämodynamischen Funktion, reduzierten Lungenveränderungen und einer geringeren Expression inflammatorischer endothelialer Adhäsionsmoleküle. Ang1 könnte daher nützlich sein als zusätzliche Therapiemodalität bei der Behandlung des septischen Schocks.

7.2. Material und Methoden

Chemikalien

LPS von *Escherichia coli*, Serotype 055:B5 und alle anderen Chemikalien stammen von Sigma. Das LPS wurde in 0.9% Kochsalzlösung aufgelöst.

Adenovirale Konstrukte

Ein rekombinanter, humanes Angiopoietin-1 (AdhAng1) exprimierender adenoviraler Vektor wurde mithilfe des Adenovator Vector Systems (Qbiogene) wie bereits beschrieben konstruiert.²⁵⁶ Hierfür wurde Ang1 cDNA mittels RT-PCR aus humanem Herzmuskelgewebe generiert, durch Sequenzierung bestätigt und in die AdE1-deletierte Region unter der Kontrolle des CMV5-Promoters inkloniert. Ein identischer Vektor, welcher Green Fluorescent Protein (AdGFP) mit einer nukleären Lokalisations-Sequenz (*nl5*) beinhaltet, wurde für Kontrollzwecke benutzt. Die rekombinanten Viren wurden in 293A-Zellen (Qbiogene) vermehrt, mittels CsCl-Gradienten gereinigt²²⁶ und schließlich in 10 mM Tris pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 5% Sucrose-Puffer dialysiert.²⁵⁷

Tiermodell

Zur Induktion eines septischen Schocks erhielten Wildtyp C57BL/6 Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 80 mg/kg LPS. Diese Dosis wurde gewählt, weil vorausgegangene eigene Experimente gezeigt hatte, dass hiermit eine Mortalitätsrate von >90% erreicht wurde. Für die Überlebensstudien wurde in insgesamt 50 Mäusen ein septischer Schock induziert. 25 dieser Mäuse (Geschlecht- und Alters-gematched) erhielten 1.0×10^9 AdhAng1 plaque forming units (pfu), die zweite Gruppe die gleiche Menge an AdGFP zu Kontrollzwecken intravenös 48 Stunden vor Injektion von LPS. Um sicher zu gehen, dass eine optimale intravenöse Verabreichung erfolgte, wurden die adenoviralen Lösungen in einer 1 ml Spritze mit 0.9% Kochsalzlösung auf 500 µl verdünnt, und, nach einer kleinen Haut-Inzision und Präparation der V. femoralis mit dem Stereomikroskop, unter Sicht mittels einer 29 Gauge Kanüle, welche mit einem feinen Polypropylen-Schlauch verbunden wurde, intravenös verabreicht.

Immunohistologie

Zwei Tage nach dem Gen-Transfer wurden die Lebern der Mäuse chirurgisch entfernt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und 5 µm Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden dann in kaltem Aceton für 10 Minuten fixiert, in 0.005% Wasserstoffperoxid/PBS für 12 Minuten inkubiert und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem aus Ziege gewonnenen anti-Ang1 Antikörper (1:20; Santa Cruz) in PBS/10% FBS oder isotypischer IgG₁ Kontrolle für 2 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer. Nach weiterem zweimaligem Waschen wurde ein anti-Ziege HRP-konjugierter zweiter Antikörper (Dako; 1:50 in PBS/20% FBS) für 1 Stunde bei Raumtemperatur hinzugegeben. Die Färbung wurde entwickelt durch Inkubation mit 3-Amino-9-Äthylcarbazol (AEC) (30 mg AEC, 5 ml N,N-Dimethylformamid, 17.5 ml 0.2 M Natriumazetat mit pH 5.2, 7.5 ml 0.2 M Essigsäure, 50 µl H₂O₂ und Aqua bidest. auf 100 ml) für 12 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Spülen mit PBS wurden die Schnitte mit Meyer's Hämalaun-Lösung für 1 Minute gegengefärbt und Deckgläschen mit Glyzeringelatine angebracht.

Hämodynamische Messungen

Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 125 mg/kg Thiopental anästhesiert, intubiert und mit einem Beatmungsgerät ventiliert (Ugo Basile, Type 7025). Ein 1.4 F Mikrokonduktanz-Druckmesskatheter (ARIA SPR-719; Millar Instruments Inc., Houston, Texas, USA) wurde über die rechte A. carotis im linken Ventrikel (LV) plaziert, um eine kontinuierliche Registrierung der LV Druck-Volumen (PV)-Kurven in den Tieren bei geschlossenem Brustkorb zu erhalten.^{258, 259} Die Kalibrierung des aufgezeichneten Volumen-Signals wurde durch die Einwasch-Technik mit hypertoner (10%) Kochsalzlösung erreicht.²⁶⁰ Alle Messungen wurden durchgeführt, während die Beatmung kurzzeitig abgeschaltet wurde. Die Indizes der systolischen und diastolischen Herzfunktion wurden von den linksventrikulären Druck-Volumen-Daten abgeleitet, welche im Steady-State erhalten worden waren.

Die systolische Funktion und myokardiale Kontraktilität wurden mittels LV end-systolischem Druck (LVP), maximale Anstiegssteilheit im LV-Druck (dP/dt_{max}), Ejektionsfraktion (EF), Cardiac Output (CO) (=Herzzeitvolumen), end-systolischem Volumen (ESV) und Schlagvolumen (SV) quantifiziert. Die diastolische Funktion wurde anhand des LV end-diastolischen Drucks (LVEDP), peak dP/dt_{min} und der Zeitkonstante der isovolumischen Druck-Relaxation (τ) ermittelt.

Western Blot Analyse

Die Gewebe wurden in RIPA-Puffer (1% NP-40, 0.5% Na-desoxy-Cholsäure, 0.1% SDS in PBS, pH 7.4; 1 µM Leupeptin; 5 µM Aprotinin; 1mM PMSF; 1 µM Pepstatin; Sigma Chemical Co) homogenisiert, und die Protein-Konzentration wurde mittels des BCA-Assays (Pierce) bestimmt. Die Gewebeextrakte wurden auf 10% SDS-PAGE-Gele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine 0.2 Micron PVDF-Membran (BioRad) transferriert. Die Membranen wurden in 10%

Trockenmilch-Pulver, 0.2% Tween-20 in PBS (TPBS), pH 7.4 geblockt und dann mit einem polyklonalem Antikörper aus Kaninchen gegen VCAM-1, ICAM-1 oder or E-Selektin (1:200 Verdünnung; Sta. Cruz, Kalifornien) bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert. Die Blots wurden mit TPBS gewaschen und mit einem aus Ziege gewonnenen, gegen Kaninchen-Antikörper gerichteten zweiten Antikörper, an welchen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelt worden war, für 45 Minuten inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mittels des ECL-Reagenz-Kits von Amersham sichtbar gemacht. Nach Strippen der Blots wurden diese mit einem anti- β -Tubulin Antikörper (1:200, Santa Cruz) inkubiert, um gleiche Lademengen zu demonstrieren.

Myeloperoxidase-Aktivität in der Lunge

4 und 24 Stunden nach Verabreichung von LPS wurden die linken Lungenflügel der Mäuse chirurgisch entfernt, mit Kochsalzlösung gespült, trockengetupft und gewogen.²⁶¹ Die Lungengewebe wurden in 2 ml 50 mmol/L Kalium-Phosphat-Puffer (PBS) mit einem pH von 7.4 und zusätzlich 0.5% Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Sigma) homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 25000 g 20 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert, der Überstand für die Myeloperoxidase (MPO) Messungen entfernt, und das Pellet in 1 mL Hexadecyltrimethylammoniumbromid-PBS resuspendiert. Dieser Extraktsschritt wurde dreimal wiederholt und die Überstände gesammelt. Die Überstände wurden im Verhältnis 1:30 (vol/vol) mit 50 mmol/L PBS, pH 6.0, welches 0.167 mg/mL *o*-Dianisidin (Sigma) und 0.0005% Wasserstoffperoxid enthielt, gemischt.²⁶² Die Absorptionsänderung wurde in einem Spektrophotometer bei 460 nm über 5 Minuten gemessen. Die MPO-Aktivität wurde dann berechnet als Absorptionsänderung über die Zeit, normalisiert durch Division mit dem Lungen-Feuchtgewicht.

Lung Wet-to-Dry Weight Ratio

Das Verhältnis des Lungen-Feucht-zu-Trockengewichts (wet-to-dry weight ratios (W/D ratio)) in den Mäusen wurde als Parameter der Wasseransammlung in der Lunge nach LPS injection herangezogen.²⁶³ Die LPS-behandelten Mäuse wurden hierzu 4 und 24 Stunden nach LPS-Injektion untersucht. Das Lungen-Feuchtgewicht wurde unmittelbar nach Entfernung der rechten Lunge ermittelt. Das Lungen-Trockengewicht wurde gemessen, nachdem die Lunge in einem Ofen bei 50°C für 24 Stunden getrocknet worden war. Die W/D ratio wurde dann berechnet, indem das Feuchtgewicht durch das Trockengewicht dividiert wurde.

Histopathologische Untersuchungen

Die Lungenflügel der Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der LPS-Injektion entfernt und mit Formalin bei einem Druck von 20 cm H₂O perfundiert. Die Organe wurden über Nacht in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung von 5 μ m-Schnitten erfolgte eine Färbung mit Hämatoxylin und Eosin.

Statistische Analysen

Die Ergebnisse sind als Mittelwert±Standardabweichung des Mittelwerts ($m\pm SEM$) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA-Test untersucht, gefolgt von einer Post-hoc Analyse im Falle des Vergleiches von mehr als zwei Mittelwerte, und mit dem unpaarigen Student's *t*-Test im Falle des Vergleichs zweier Mittelwerte. Die Überlebensdaten wurden mittels des Kaplan-Meier-Tests analysiert. Ein Wert von $P<0.05$ wurde als statistisch signifikant interpretiert.

7.3. Ergebnisse

Angiopietin-1 Protein Expression nach adenoviralem Gentransfer

Intravenöse Verabreichung von adenoviralen Vektoren führt zu Virus-spezifischer Gen-Aufnahme und Expression in der Leber.²⁶⁴⁻²⁶⁶ Wir analysierten daher die Lebern von Mäusen auf die Expression von Ang1-Protein 48 Stunden nach intravenöser Injektion von 1.0×10^9 pfu AdhAng1 oder AdGFP. Immunhistologische Färbung für Ang1 ergab nur eine leichte Färbung von Hepatozyten als Hinweis auf eine geringe endogene Ang1 Protein-Expression in den AdGFP behandelten Mäusen (Abbildung 7.1A). Die Immunhistologie für GFP demonstrierte erfolgreichen adenoviralen AdGFP Gentransfer (welches eine nukleäre Lokalisations-Sequenz enthält) in die Lebern der Mäuse, wie man an der starken nukleären Färbung der Hepatozyten erkennen kann. (Abbildung 7.1B) In vergleichbarer Weise zeigte sich in den AdhAng1-injizierten Tieren, dass das Zytosol einer großen Zahl von Hepatozyten stark positiv für Ang1-Protein gefärbt war (Abbildung 7.1C).

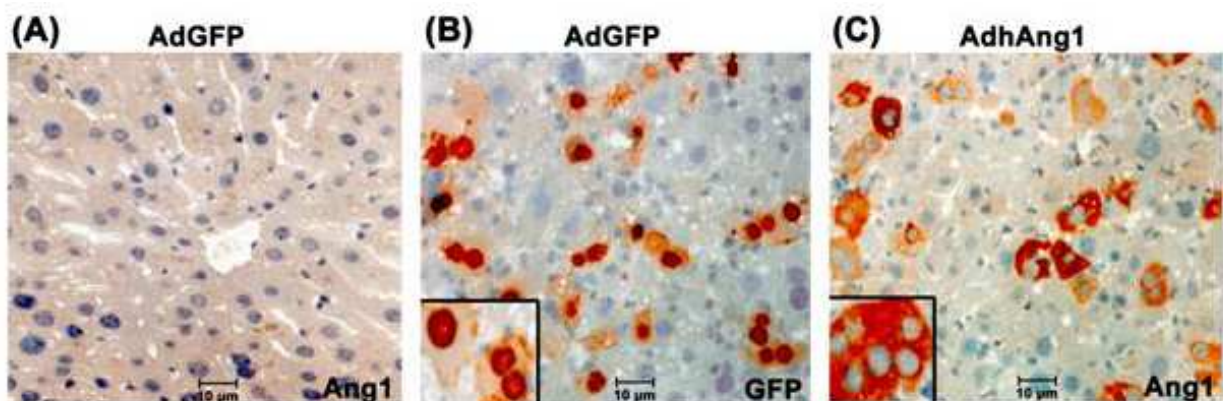


Abb. 7.1: Immunhistologische Färbung (rot-braunes Reaktionsprodukt) von Mäuselebern, 48 Stunden nach intravenöser Injektion von 1.0×10^9 pfu adenoviralem Vektor wie angegeben. (A) Ang1-Färbung in AdGFP-injizierten Mäusen zeigt nur eine schwache Expression von endogenem Ang1 in Hepatozyten. (B) Färbung mit einem anti-GFP-Antikörper führt zu starker Anfärbung der Zellkerne von Hepatozyten, was erfolgreichen Gentransfer nach Gabe von AdGFP, welches eine nukleäre Lokalisations-Sequenz (*nls*) enthält, anzeigt. (C) Ang1-Färbung zeigt starke zytosolische Expression von Ang1-Protein in einer Vielzahl von Hepatozyten nach Injektion von AdhAng1.

Western Blot-Analysen von adenoviral transduzierten Lebern bestätigte eine starke Expression von Ang1-Protein in einer Dosis-abhängigen Weise (Abbildung 7.2A). Als ein zusätzliches Kontroll-Experiment für eine erfolgreiche Transgen-Expression wurde Mäusen intravenös AdVEGF₁₆₅ injiziert, was zu einem dramatischen Anstieg in der VEGF Protein-Expression führte (Abbildung 7.2B). Dieses Vorgehen führt zu hohen zirkulierenden Serum-Spiegeln von Ang1 und VEGF-Protein für mindestens 72 Stunden, wie bereits anderswo mittels ELISA Messungen gezeigt worden war.^{17, 267} Alle Mäuse, welche Ang1 exprimierten, erschienen normal und gesund. Im Gegensatz hierzu wurden die Mäuse, welche VEGF exprimierten, krank und starben innerhalb 24 Stunden an einer generalisierten Ödembildung, was sich mit vorausgegangenen Berichten deckt.¹⁷ Daher gewährleistet dieses Tiermodell durch Produktion und Sekretion von Ang1-Protein aus der Leber hohe systemische Ang1-Blutspiegel für mehrere Tage.

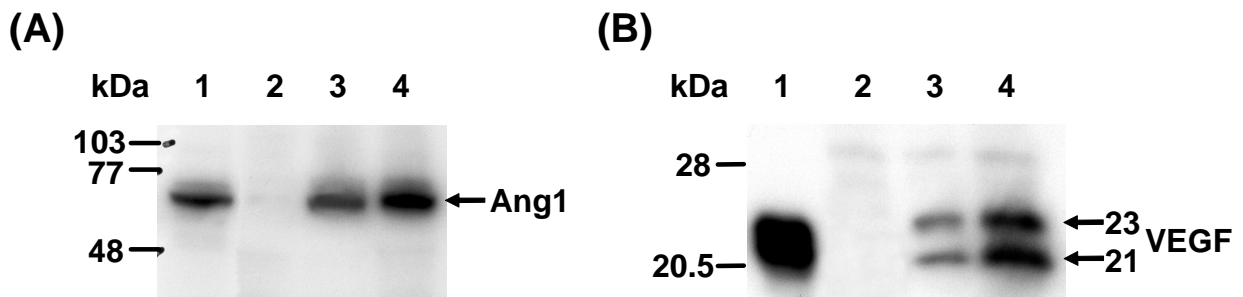


Abb. 7.2: Western Blots von Proteinextrakten aus Lebern, 48 Stunden nach intravenöser Injektion steigender Mengen adenoviralen Vektors wie angegeben (A) Immunoblot mit anti-Ang1-Antikörper. *Spur 1:* 20 ng rekombinantes Ang1-Protein; 2: 1×10^9 AdGFP-; 3: 0.5×10^9 AdhAng1-; 4: 1.0×10^9 AdhAng1-injizierte Maus. (B) Immunoblot mit anti-VEGF-Antikörper. *Spur 1:* 20 ng rekombinantes VEGF-Protein; 2: 1×10^9 AdGFP-; 3: 0.5×10^9 AdVEGF₁₆₅-; 4: 1.0×10^9 AdVEGF₁₆₅-injizierte Maus.

Angiopoietin-1 verbessert die durch LPS-Injektion induzierten hämodynamischen Veränderungen

Die hämodynamischen Messungen wurden 12 Stunden nach LPS-Injektion durchgeführt. Zwischen Kontroll-Mäusen und mit AdGFP-behandelten Mäusen, oder zwischen LPS-behandelten und LPS-behandelten/AdGFP-injizierten Mäusen fanden sich keine signifikanten hämodynamischen Unterschiede. Im Vergleich zu Kontroll-Mäusen waren die hämodynamischen Parameter in den LPS-behandelten Mäusen massiv eingeschränkt. Der systolische Blutdruck fiel von 91 ± 3 auf 49 ± 7 mmHg ($P < 0.0005$), dP/dt_{\max} von $7,284 \pm 550$ auf $2,699 \pm 233$ mmHg/sec ($P < 0.0001$), CO von 11.3 ± 1.2 auf 2.8 ± 0.8 ml/min ($P < 0.0005$), und der LVEDP stieg von 6.3 ± 1.2 auf 9.1 ± 1.1 mmHg an ($P < 0.05$, Abbildung 7.3A). Im Gegensatz hierzu fiel der systolische Blutdruck in LPS-behandelten Mäusen, denen vorab AdhAng1 injiziert worden war, nur auf 76 ± 3 ($P < 0.01$ vs. LPS-behandelte Mäuse), dP/dt_{\max} auf $5,091 \pm 489$ mmHg/sec ($P < 0.005$), CO auf 6.7 ± 1.4 ml/min ($P < 0.05$), und der LVEDP

(5.8 ± 0.8 mmHg) unterschied sich nicht signifikant von den Kontrollen, aber von den LPS-behandelten Mäusen ($P < 0.05$; Abbildung 7.3A). Repräsentative linksventrikuläre Druck-Volumen-Schleifen von Kontroll-, LPS- und AdhAng1/LPS-behandelten Mäusen sind in Abbildung 7.3B dargestellt.

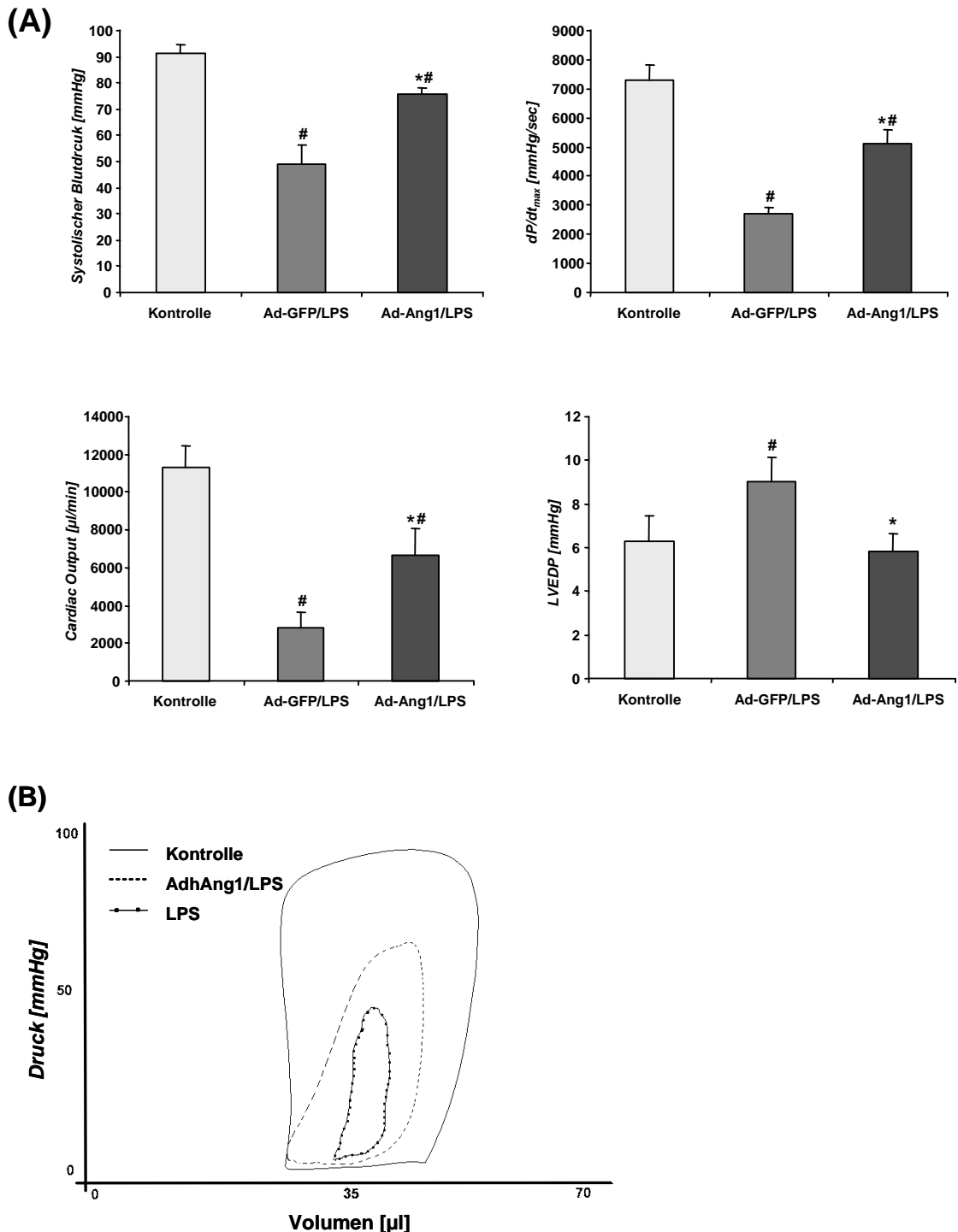


Abb. 7.3: (A) Veränderungen hämodynamischer Parameter 12 Stunden nach Endotoxin-Schock Induktion. Während in den AdGFP-vorbehandelten Mäusen die kardiale Funktion im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen schwer beeinträchtigt ist, sind die hämodynamischen Veränderungen in den AdhAng1-vorbehandelten Mäusen deutlich weniger ausgeprägt. Systolischer Blutdruck, dP/dt_{max} als Parameter der Kontraktilität, Cardiac Output und LVEDP wurden mittels eines Mikro-Konduktanz-Druckkatheters gemessen. * $P < 0.05$ versus AdGFP/LPS-behandelt; # $P < 0.05$ versus Kontrollwerte. (B) Repräsentative Druck-Volumen-Schleifen von Kontroll-, LPS- oder AdhAng1/LPS-behandelten Mäusen.

Somit waren die Mäuse, welche Ang1 überexprimierten, im Vergleich zu Kontroll-Mäusen signifikant resistenter gegen die LPS-induzierten schweren hämodynamischen Veränderungen.

Angiopietin-1 schwächt LPS-induzierte Lungenschäden deutlich ab

Die lichtmikroskopische Untersuchung von Lungen 24 Stunden nach LPS-Injektion zeigte eine massive Infiltration von unzähligen polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen in den interstitiellen Bereichen, hämorrhagische Veränderungen und eine ausgeprägte Anschwellung der alveolären Wände wie vorbeschrieben (Abbildung 7.4C).²⁶¹ Diese Veränderungen waren in den AdhAng1/LPS-behandelten Mäusen deutlich abgeschwächt (Abbildung 7.4D). Injektion von AdhAng1 an sich resultierte nicht in irgendwelchen offenkundigen Veränderungen der Lungenmorphologie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (Abbildung 7.4A und B; 72 Stunden nach Injektion).

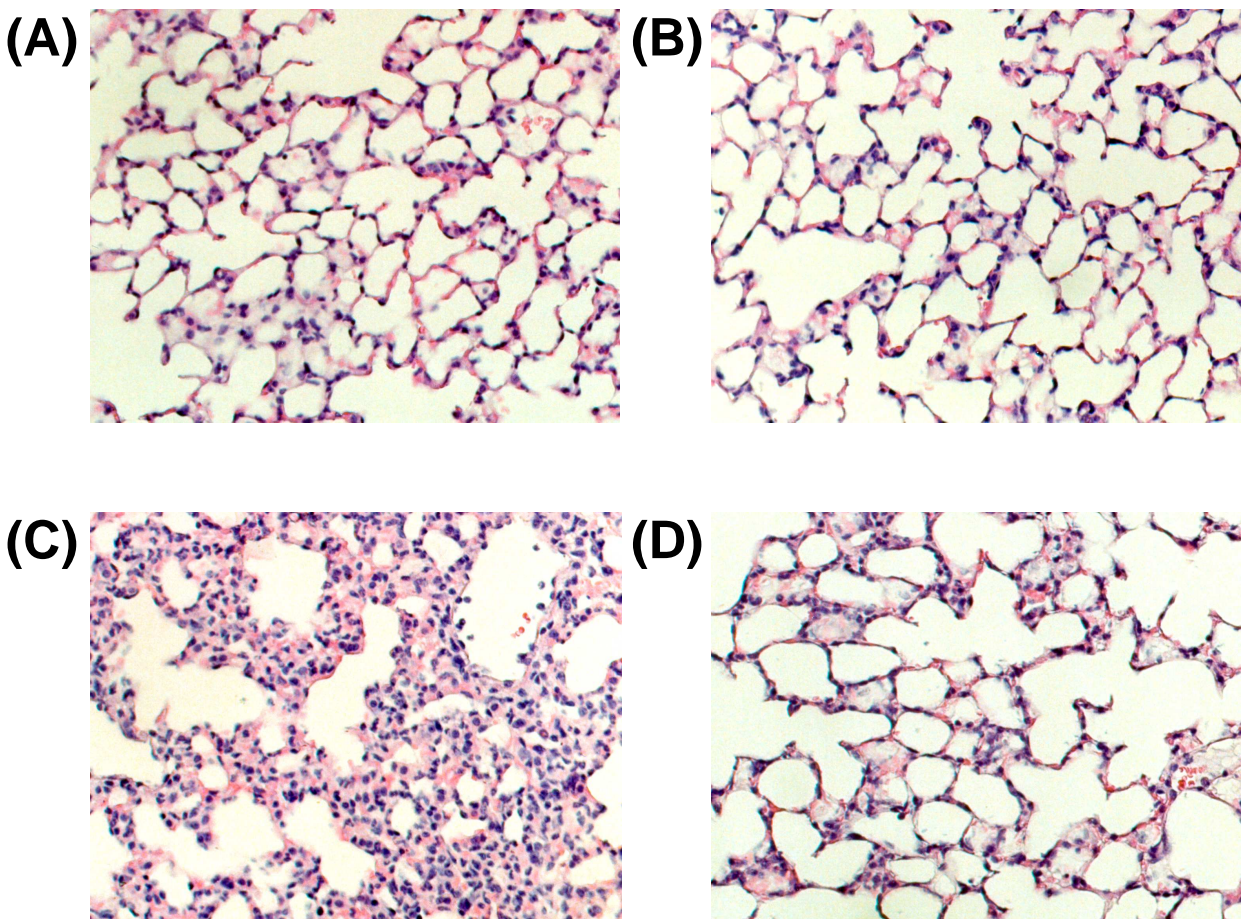


Abb. 7.4: Repräsentative Paraffinschnitte (200× Vergrößerung) von Lungen unbehandelter Mäuse (*oben*) und Mäusen 24 Stunden nach LPS-Gabe (*unten*) (HE-Färbung). (A) Unbehandelte Kontroll-Maus. (B) Kontroll-Maus, 72 Stunden nach intravenöser Injektion von AdGFP. (C) AdGFP/LPS-Maus, 72 Stunden nach intravenöser Injektion von AdGFP, 24 Stunden nach LPS-Gabe. Hierbei extensives interstitielles Ödem, Infiltration von inflammatorischen Zellen und Hämorrhagie. (D) AdhAng1/LPS-Maus, 72 Stunden nach intravenöser Injektion von AdhAng1, 24 Stunden nach LPS-Gabe. Die LPS-induzierte Lungenschädigung ist in Mäusen, welche Ang1 überexprimieren, im Vergleich zu Kontroll-Mäusen, drastisch reduziert.

Untersuchung der VCAM-1, ICAM-1 und E-selectin Proteinexpression ergab einen sehr niedrigen Expressionsgrad aller drei Adhäsionsmoleküle in den Lungen von normalen Kontrollmäusen (Abbildung 7.5). LPS-Verabreichung erhöhte die Expression von VCAM-1, ICAM-1 und E-Selectin Protein in der Lunge beträchtlich. Im Gegensatz hierzu waren diese erhöhten Expressionslevel aller drei Proteine in AdhAng1/LPS-behandelten Mäuse deutlich abgeschwächt im Vergleich zu den mit LPS-behandelten Mäusen (Abbildung 7.5).

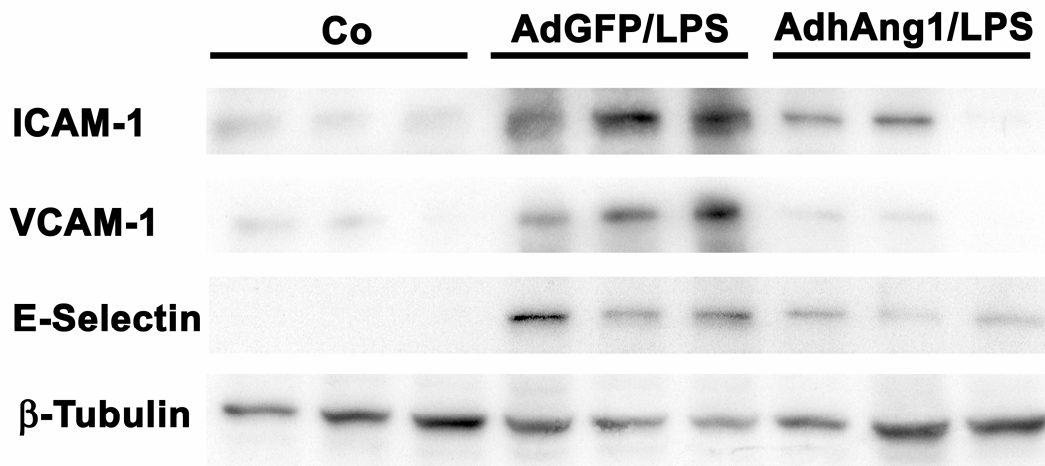


Abb. 7.5: Western Blot-Analyse für Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin. Proteinextrakte aus Lungen unbehandelter Mäuse (co), AdGFP/LPS- und AdhAng1/LPS-behandelter Mäuse (jeweils n=3), entnommen 12 Stunden nach LPS Gabe, wurden mittels SDS Gel Elektrophorese aufgetrennt und mit Antikörpern wie angegeben inkubiert. Die Intensität der β -Tubulin-Bande dient zum Vergleich der Lademengen zwischen den Proben.

Da LPS pulmonale Leukostase und Lungenödem induziert, schätzten wir die Granulozyten-infiltration in das Lungengewebe durch Messung der Lungen-Myeloperoxidase-(MPO)-Aktivität, und das Ausmaß der Ödembildung durch Messung des Verhältnisses von Lungen-Feucht-zu-Trockengewicht (wet-to-dry (W/D) ratio) ab. Im Ausgangszustand, d.h. in Kontrollmäusen, fand sich nur eine geringe MPO-Aktivität. 12 Stunden nach LPS-Behandlung stieg die MPO-Aktivität, ausgedrückt als Δ Absorbance/min/g Gewebe, stark an, nämlich von 12 ± 1.9 auf 150 ± 17 ($P < 0.001$), wohingegen der Anstieg in den AdhAng1-Mäusen signifikant geringer ausfiel (auf 83 ± 10 ; $P < 0.05$ vs. LPS-behandelte Kontroll-Mäuse; Abbildung 7.6A). Darüberhinaus stieg das Lungen-Feucht-zu-Trocken-Gewichtsverhältnis (W/D ratio) als Parameter für eine intrapulmonale Wasseransammlung von 4.2 ± 0.03 auf 4.9 ± 0.2 nach LPS-Injektion an ($P < 0.01$). Im Gegensatz hierzu war der Anstieg in der W/D ratio in den AdhAng1/LPS-behandelten Mäusen deutlich reduziert (auf 4.4 ± 0.08 ; $P < 0.05$ vs. AdGFP/LPS-behandelte Mäuse; Abbildung 7.6B).

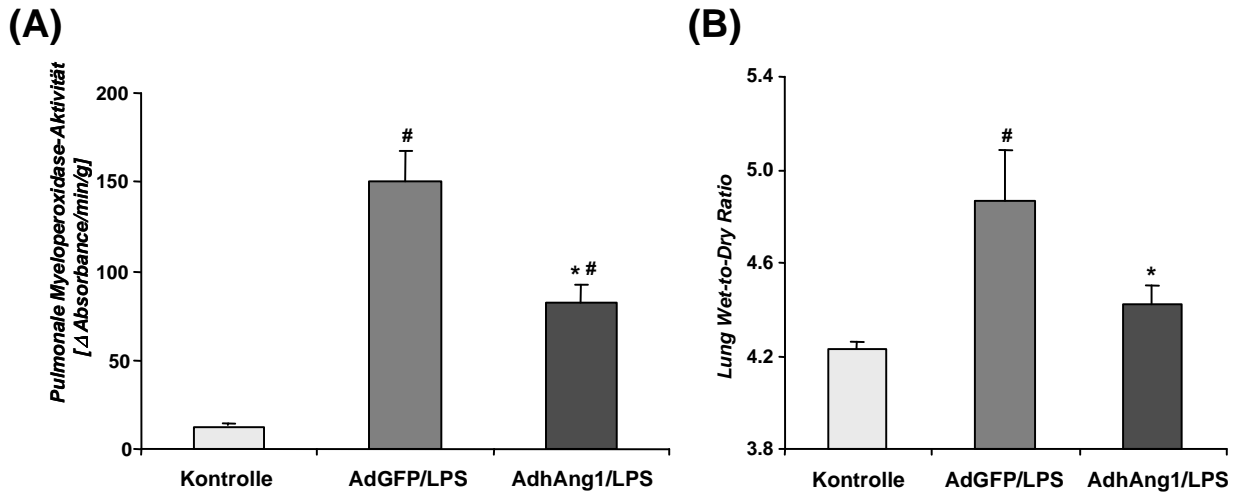


Abb. 7.6: Pulmonale Myeloperoxidase-(MPO) Aktivität (A) und feucht-zu-trocken Lungen-Gewichtsverhältnis (W/D) (B) in Kontroll-Mäusen, und in AdGFP- oder AdhAng1-behandelten Mäusen, 12 Stunden nach LPS-Gabe. Mittelwert±SEM von 6 Experimenten. * $P < 0.05$ versus LPS-behandelte AdGFP-Mäuse; # $P < 0.01$ relativ zu Ausgangswerten.

Angiopietin-1 verbessert die Überlebenswahrscheinlichkeit beim LPS-induzierten septischen Schock

Die LPS-behandelten Mäuse entwickelten innerhalb weniger Stunden Anzeichen einer schweren Sepsis, wie reduzierte Beweglichkeit, Apathie, Konjunktivitis, Diarrhoe und struppiges Fell. Die AdhAng1/LPS-behandelten Mäuse wiesen hierbei weniger ausgeprägte Krankheitsanzeichen auf im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen. Um festzustellen, ob durch den Gentransfer mit Ang1 auch die Überlebensrate im LPS-induzierten septischen Schock verbessert wird, verfolgten wir die Mortalitätsrate der Mäuse über einen Zeitraum von 3 Tagen. 24 Stunden nach LPS Injektion waren 62% der LPS-behandelten Kontroll-Mäuse gestorben, im Gegensatz zu nur 35% bei den AdhAng1/LPS-behandelten Mäusen. Innerhalb von 60 Stunden nach LPS-Injektion waren 91% der Kontroll-Mäuse, aber nur 60% der AdhAng1-Mäuse in diesem Zeitraum gestorben. Die Kaplan-Meier Überlebenskurven beider Gruppen sind in Abbildung 7.7 dargestellt. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass eine adenovirale Überexpression von hAng1 die Überlebenswahrscheinlichkeit beim LPS-induzierten septischen Schock in Mäusen signifikant verbessern kann ($P < 0.05$).

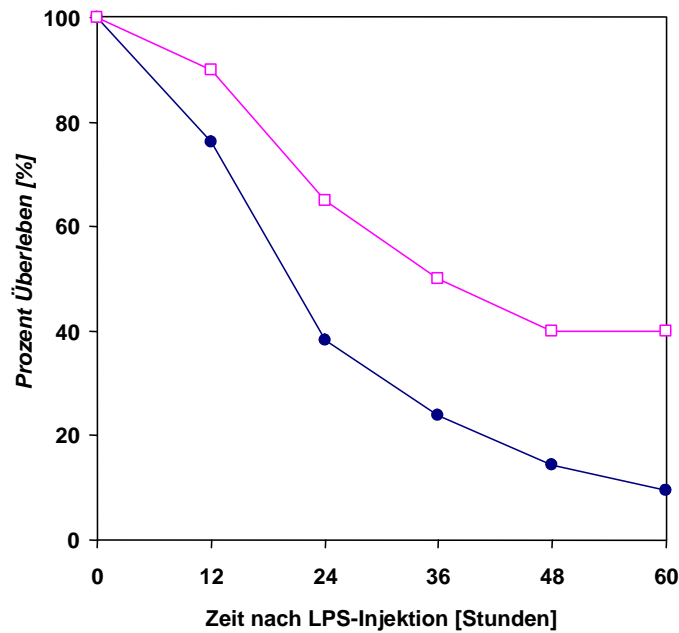


Abb. 7.7: Kaplan-Meier Überlebenskurven zeigen, dass Ang1 das Überleben von Mäusen mit sublethaler Sepsis verbessert. Kontroll-Mäuse oder intravenös mit Ad-Ang1 (1.0×10^9 pfu) injizierte Mäuse wurde 80 mg/kg LPS verabreicht. Die Mortalität der Mäuse (21 Kontrolle/LPS, 20 AdhAng1/LPS) wurde über einen Zeitraum von 60 Stunden verfolgt. Die Überlebensunterschiede zwischen LPS- und AdhAng1/LPS-behandelten Mäusen sind statistisch signifikant ($P < 0.05$).

7.4. Diskussion

Aus Experimenten mit Knock-out Mäusen ist ursprünglich bekannt, dass Ang1, ebenso wie VEGF, eine wesentliche Rolle in der Gefäßentwicklung während der Embryogenese spielt.¹³ Auf der anderen Seite resultierte eine transgene Überexpression von Ang1 in der Haut von Mäusen in einer verstärkten dermalen Vaskularisierung.¹⁵ Mittlerweile ist klar geworden, dass Ang1 in der Lage ist, eine größere Anzahl an biologischen Effekten zu vermitteln. So kann es die Integrität der endothelialen Zellschicht gegen eine Vielzahl an schädlichen Einwirkungen verstärken.¹⁷ In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Ang1 in der Lage ist, den Permeabilitätseffekt von Serotonin, Platelet Activating Factor (PAF), VEGF und Senföl zu blockieren.¹⁶ Darüberhinaus erzielte Ang1 anti-inflammatorische Eigenschaften auf Endothelzellen, indem es günstige Effekte auf Zell-Adhäsionsmoleküle und Zell-Verbindungen (cell junctions) bewirkte, was die Frage aufwarf, ob es bei entzündlichen Erkrankungen therapeutisch nützlich sein könnte.⁶ Die Zielsetzung dieses Arbeitsteils war daher die Frage, ob Ang 1 beim Endotoxin-induzierten Schock, also einem Zustand systemischer vaskulärer Inflammation und Hyperpermeabilität, günstige Effekte aufweisen könnte. Die vorliegenden Untersuchungen demonstrieren in der Tat, dass Mäuse, welche Ang1 überexprimieren, im Endotoxin-induzierten septischen Schock resistenter im Vergleich zu Kontrolltieren sind. Da nun Ang1 in der Lage ist, multiple biologische Effekte auf Endothelzellen zu vermitteln, gibt es verschiedene mögliche Erklärungsmechanismen für diese verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit.

Zum einen könnte die verbesserte hämodynamische und pulmonale Funktion der septischen Mäuse auf einen direkten Effekt von Ang1 auf die Kapillaren zurückzuführen sein, indem diese vor einer generellen Durchlässigkeit geschützt werden. In der Tat war das Ausmaß der Wasseransammlung in den Lungen der Ang1-behandelten septischen Mäuse eindeutig vermindert, und die Anschwellung der interstitiellen Räume und der Alveolarwände deutlich reduziert. Zum zweiten führte wie gezeigt eine Überexpression von Ang1 zu einer deutlichen Abnahme der Expression der endothelialen Zell-Adhäsionsmarker ICAM-1, VCAM-1 and E-Selektin in den Lungen der LPS-behandelten Mäuse. Diese Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Leukozyten-Invasion durch das Gefäßendothel und sie sind insbesondere involviert in die ersten Schritte der entzündlichen Reaktionskaskade der Gefäßwand.²⁶⁸ Eine geringere Expression dieser Adhäsionsmarker sollte zu einer geringeren Anheftung von Leukozyten an das Endothel und damit konsequenterweise zu einer geringeren Gewebsinfiltration durch Leukozyten führen. In der Tat konnten wir nachweisen, dass die Leukozyteninfiltration in die Lungenalveolen in den Ang1-exprimierenden Mäusen reduziert war, wie man anhand der Histologie sehen konnte und wie sich anhand einer reduzierten MPO-Aktivität messen ließ. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit vorausgegangenen publizierten *in vitro*-Daten, welche zeigten, dass Ang1 die Leukozytenadhäsion an endotheliale Zellen durch eine Verringerung der Expression endothelialer Adhäsionsmarker reduzieren kann.²³⁸ Darüberhinaus führte in einem Rattenmodell mit diabetischer Retinopathie Ang1-Behandlung zu einer 50%igen Reduktion der Permeabilität aufgrund einer Ang1-induzierten Abnahme des Expressionslevels von ICAM-1 in den retinalen Gefäßen.²⁶⁹

Es war bereits gezeigt worden, dass LPS bestimmte Zytokine wie Interleukine und TNF- α induzieren kann.²⁴⁶ Diese Zytokine stimulieren die Expression von Adhäsionsmolekülen und bewirken daher höchstwahrscheinlich die entzündlichen Veränderungen in der Lunge, was zu einem Neutrophilen-abhängigen Lungenödem führt.²⁷⁰ Da publiziert worden ist, dass Ang1 in der Lage ist, direkt die TNF- α -induzierte Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch endotheliale Zelleinzelschichten zu hemmen,⁶ ist es wahrscheinlich, dass Ang1 seinen protektiven Effekt gegenüber einer entzündlichen Leukozyteninfiltration zusätzlich durch eine Stärkung der endothelialen Zellverbindungen („cell junctions“) ausübt. Zusammengefaßt könnte diese Abnahme der Leukozyteninfiltration ein Grund für die beobachtete Abschwächung der Lungenschäden in den Ang1-überexprimierenden LPS-behandelten Mäusen sein. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass die Lunge beim Erwachsenen einen der höchsten Expressionslevel des Ang1-Rezeptors Tie-2 aller Organe aufweist.²⁰²

In einer vorausgegangenen Untersuchung führte ein Zell-basierter Gentransfer von Ang1 in die Lungen von Ratten zu einer ausgeprägten Hochregulation der Genexpression der endothelialen Stickoxyd-Synthase (eNOS) in einem Tiermodell pulmonaler Hypertension.⁵ Andererseits resultierte transgene Überexpression von eNOS im Endothel von Mäusen in einer erhöhten Resistenz gegenüber

einem LPS-induzierten Endotoxin-Schock.²⁶¹ In dieser Arbeit war das Ausmaß der VCAM-1 and ICAM-1-Expression in LPS-behandelten eNOS-überexprimierenden transgenen Mäusen geringer als in LPS-behandelten Kontroll-Mäusen. In einer kürzlichen Arbeit war die Ang1-induzierte Angiogenese in subkutan eingebrachten Matrigel-Implantaten abhängig von der Verfügbarkeit an endothelial gebildetem Stickoxyd (NO).²⁷¹ Es kann daher gut sein, dass der vorteilhafte Effekt von Ang1 in unserem Modell des septischen Schocks zumindest teilweise durch eNOS-gebildetes NO mediiert wird, und nachfolgende Experimente müssen diese Hypothese überprüfen.

Es gibt gut belegte Hinweise, dass Ang1 als ein Überlebensfaktor für Endothelzellen wirkt,^{14, 272} was einer Ang1-abhängigen Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI-3K) und des *Akt*-Stoffwechselweges zugeschrieben wird.^{273, 274} Apoptosis, ebenso wie Inflammation, bildet ein wesentliches Charakteristikum des septischen Schocks.²⁷⁵ LPS induziert Apoptose in Lymphozyten und gastrointestinalen epithelialen Zellen,²⁷⁶ glomerulär-endothelialen Zellen^{277, 278} und im Herzen.²⁷⁹ Obwohl nicht allgemein akzeptiert,²⁸⁰ war berichtet worden, dass LPS eine disseminierte Endothelzell-Apoptose in einem Maus-Modell induziert.²⁸¹ Darüberhinaus schwächte eine Aktivierung des PI-3K/*Akt*-Stoffwechselweges durch einen Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP)-Inhibitor die Sepsis-induzierten schädlichen Veränderungen in Modellen mit Mäusen²⁸² und Schweinen²⁸³ deutlich ab, und Mäuse, welchen PARP fehlte, stellten sich beim LPS-induzierten septischen Schock als resistenter heraus.²⁸⁴ Es ist daher möglich, dass die anti-apoptotische Aktivität von Ang1 über eine *Akt*-Aktivierung zu dem beobachteten vorteilhaften Effekt von Ang1 in unserem Sepsis-Modell beiträgt.

Unsere Ergebnisse zeigen eine verbesserte Überlebensrate von Ang1-behandelten Mäusen im LPS-induzierten Schock. Da die Therapie des septischen Schocks in Patienten nach wie vor unbefriedigend ist, bestehen unverändert Anstrengungen in der Erforschung neuer und effektiver Therapieansätze, um die inflammatorische Reaktion, die Koagulationskaskade oder andere Aspekte des septischen Zustands zu modifizieren. Aufgrund seiner breiten biologischen Funktionen hat Ang1 den theoretischen Vorteil, dass es nicht nur eine, sondern vielerlei Facetten der septischen Kaskade beeinflussen kann. Prinzipiell könnte daher Ang1 als zusätzliche Behandlungsmodalität beim septischen Schock nützlich sein, obwohl die hier gezeigten Ergebnisse erst in anderen, klinisch noch relevanteren Tiermodellen bestätigt werden müssen.

7.5. Zusammenfassung

Angiopietin-1 (Ang1) spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der embryonalen Gefäßstrukturen, schützt die ausgereiften Gefäße vor Durchlässigkeit und hat anti-inflammatorische Eigenschaften. Da der Endotoxin-induzierte septische Schock ein Zustand erhöhter mikrovaskulärer Undichtigkeit ist, welcher aus einem entzündlichen Prozess resultiert, untersuchten wir den möglichen

therapeutischen Vorteil von Ang1 in einem Tiermodell mit Mäusen, in welchen mittels LPS ein septischer Schock induziert wurde.

Zur Induktion eines septischen Schocks wurde LPS intraperitoneal in Mäuse injiziert. Die eine Hälfte der Mäuse erhielt eine intravenöse Applikation von 1.0×10^9 pfu eines adenoviralen Konstrukts, welches humanes Ang1 (AdhAng1) exprimiert, während in der anderen Hälfte AdGFP als Kontrolle injiziert wurde. In den AdhAng1-behandelten Mäusen wurde eine hepatische Transfektion und eine hohe Expression von Ang1-Protein beobachtet. Während in den LPS-behandelten Kontrollmäusen die hämodynamische Funktion 12 Stunden nach LPS-Injektion schwer beeinträchtigt war (Abnahme des Blutdrucks von 91 ± 3 auf 49 ± 7 mmHg, dP/dt_{\max} von $7,284 \pm 550$ auf $2,699 \pm 233$ mmHg/sec, Cardiac Output von 11.3 ± 1.2 auf 2.8 ± 0.8 ml/min, $p < 0.0005$), fiel in den LPS-behandelten AdhAng1-Mäusen der Blutdruck nur auf 76 ± 3 mmHg, dP/dt_{\max} auf $5,091 \pm 489$ mmHg/sec, und Cardiac Output auf 6.7 ± 1.4 ml/min ($p < 0.05$). Diese erhöhte Resistenz gegenüber LPS-induzierten hämodynamischen Veränderungen führte zu einer deutlich verbesserten Kaplan-Meier-Überlebensrate der AdhAng1-behandelten Mäuse. Eine histologische Aufarbeitung der Lungen zeigte, dass die schweren Lungenveränderungen nach LPS-Injektion in den AdhAng1-Mäusen deutlich weniger ausgeprägt waren. Zusätzlich war der LPS-inuzierte Anstieg im Lungenwasser-Gehalt und der pulmonalen Myeloperoxidase-Aktivität signifikant reduziert. Schließlich war der LPS-induzierte Anstieg in den Proteinexpressions-Leveln der Zelladhäsionsmoleküle Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1), Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und E-Selectin protein, in the Lungen der AdhAng1-Mäuse deutlich geringer als in Kontroll-Mäusen.

Diese Untersuchungen demonstrieren eine verbesserte Mortalitätsrate in septischen Mäusen, welche mit einem adenoviralen Konstrukt kodierend für Ang1 behandelt wurden. Diese durch Ang1 verbesserte Überlebensrate war begleitet von einer Verbesserung der hämodynamischen Funktion, verringerten Lungenschäden und einer niedrigeren Expression von inflammatorischen Adhäsionsmolekülen in den Lungengefäßen. Ang1 könnte somit als zusätzliche Therapiemodalität in der Behandlung des septischen Schocks nützlich sein.

8. Diskussion

8.1. Klinische Studien zur therapeutische Angio- und Arteriogenese – Übersicht

Ungenügendes Wachstum von Kollateralgefäßen ist ein wesentliches klinisches Problem bei atherosklerotisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen mit chronischer Ischämie. Idealerweise ist hierzu eine Stimulation von beiden Prozesse, sowohl Angio- als auch Arteriogenese, erforderlich, um eine Verbesserung der Perfusion des Herzmuskels oder der Skelettmuskulatur zu erreichen.^{130, 285, 286} Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten präklinischen Daten mit den beiden angiogenetischen Faktoren VEGF-C/VEGF-2 sowie FGF-1 führten zur Initiierung von klinischen Studien, und zwar für VEGF-C bei Patienten mit chronischer Myokardischämie, und für FGF-1 bei Patienten mit pAVK-Stadium IV. Beide Studien werden in den folgenden Unterkapiteln noch im Detail dargestellt.

Bezüglich der laufenden und bereits abgeschlossenen klinischen Studien mit angiogenetischen Faktoren ist festzuhalten, dass bisher drei verschiedene Phasen von Angiogenese-Studien unterschieden werden können. Die erste Serie von klinischen Studien bestand in erster Linie aus Pionierarbeiten mit dem Ziel, die Möglichkeit dieser Therapieform grundsätzlich zu testen. Hierzu wurden angiogenetische Faktoren entweder in Form rekombinanten Proteins²⁸⁷ oder durch Gentherapie mittels nackter Plasmid-DNA^{64, 111, 133, 288} oder Adenoviren^{132, 289, 290} eingesetzt. Die zweite Phase beinhaltete mehrere meistens kleine, unkontrollierte Studien mit häufig positiven Resultaten.²⁹¹⁻³⁰⁰ Diese Studien ergaben keine offensichtlichen Sicherheitsprobleme in den Patienten, welchen allen das Vorhandensein einer schweren generalisierten Gefäßkrankheit gemeinsam war. Während dieser Studien wurde aber auch klar, dass es für die Dokumentation eines möglichen klinischen Vorteils eventuell notwendig ist, Patienten zu behandeln, die noch nicht komplett in das Endstadium der Gefäßkrankheit vorgerückt sind, und dass es andererseits essentiell ist, vordefinierte und klinisch bedeutsame Endpunkte zu benutzen. Es wurde darüberhinaus offensichtlich, dass für die behandelten Patienten Placebo-Effekte eine bedeutsame Rolle spielen, wahrscheinlich aufgrund vielfältiger Ursachen wie frühere und verbesserte Mobilisation, veränderte hämodynamische Parameter und eine insgesamt bessere Betreuung und Pflege.³⁰¹ Erst vor kurzem wurde mit der dritten Serie von Studien begonnen, welche das Potential der angiogenetischen Therapie realistisch austesten, und zwar in vergleichbarer Methodik wie bei den Protokollen, welche für die Testung in der pharmazeutischen Medikamentenentwicklung zur Anwendung kommen. Diese randomisierten, kontrollierten und verblindeten Studien schließen eine größere Anzahl an Patienten ein, und prädefinieren primäre und sekundäre Endpunkte innerhalb vernünftiger klinischer Umgebungsbedingungen (Tabelle 8.1).³⁰²⁻³¹⁰

Studie	Faktor	Krankh.	n	Endpunkt	Ergebnis ^a
VIVA ³⁰²	Rekomb. VEGF Protein i.c.	KHK	178	ETT ^b nach 60 Tagen	Negativ
FIRST ³⁰³	Rekomb. FGF-2 Protein i.c.	KHK	337	ETT nach 90 Tagen	Negativ
TRAFFIC ³⁰⁴	Rekomb. FGF-2 Protein	pAVK	190	ETT nach 90 Tagen	Positiv
GM-CSF ³⁰⁵	Rekomb. GM-CSF Protein i.c.	KHK	21	Invasiver Kollateralfuß-Index nach 2 Wochen	Positiv
AGENT ³⁰⁶	Adeno-FGF4 i.c.	KHK	79	ETT nach 4 Wochen	Positiv ^c
VEGF PAD ³⁰⁷	Adeno-VEGF ₁₆₅ Plasmid/Liposom VEGF ₁₆₅	pAVK	54	Angiographisch verstärkte Vaskularisierung nach 3 Monaten	Positiv
KAT ³¹⁰	Adeno-VEGF ₁₆₅ Plasmid/Liposom VEGF ₁₆₅	KHK	103	Verbesserte Myokardperfusion nach 6 Monaten	Positiv Negativ
REVASC (Biobypass-CAD)	Adeno-VEGF ₁₂₁ intramyokardial	KHK	67	ST-Senkung bei ETT nach 26 Wochen	Positiv
RAVE ³⁰⁹ (Biobypass-PAD)	Adeno-VEGF ₁₂₁ i.m.	pAVK	105	Gehstrecke nach 12 Wochen	Negativ
Euroinject One	Plasmid VEGF ₁₆₅ intramyokardial	KHK	74	Verbesserte Myokardperfusion nach 3 Monaten	Negativ ^d

Tabelle 8.1: Phase II und III Angiogenese-Studien.²⁸⁶ ^aEffektivität, gemessen am gemäß Studienprotokoll-definierten primären oder sekundären Endpunkt. ^bETT, Exercise Toleranz-Test. ^cNur eine Dosis-Gruppe wies positive Resultate auf. ^dPositive Ergebnisse wurden erzielt nach Ausschluß von zwei von insgesamt sechs Studienzentren, in welchen die Patientenrekrutierung möglicherweise fehlerhaft verlief.

Bis jetzt sind vier große randomisierte Plazebo-kontrollierte Studien zur koronaren Angiogenese publiziert. In der **VIVA**-Studie (VEGF in Ischemia for Vascular Angiogenesis) wurden 178 Patienten mit reversiblen Perfusionsausfällen in der Myokardszintigraphie (SPECT) mit einer einmaligen intrakoronaren Dosis von VEGF-A Protein, gefolgt von drei intravenösen Dosen VEGF oder Plazzebo über jeweils 4 Stunden behandelt.³⁰² Nach 60 Tagen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im primären Endpunkt, nämlich in der Belastungszeit oder in der Angina-Klasseneinteilung. Nach 120 Tagen fand sich jedoch eine signifikante Verbesserung in der Angina-Klasseneinteilung in der VEGF-Hochdosisgruppe. Obwohl die Patienten hierbei weniger häufig Angina-pektoris-Symptome hatten, fand sich keine objektivierbare Verbesserung in der nuklearmedizinischen oder angiographischen Perfusion. In die **FIRST**-Studie (FGF-2 Initiating Revascularization Support Trial) wurden 337 Patienten mit chronischer Angina pectoris eingeschlossen, welche ungeeignet waren für eine mechanische oder operative Revaskularisation.³⁰³ Die Randomisierung erfolgte zu drei Dosen von

intrakoronarem FGF-2 (=bFGF) Protein versus Plazebo. Nach 90 Tagen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der primären Endpunkte Belastungszeit, nuklearmedizinische Perfusionsausfälle oder Lebensqualität, obwohl eine post hoc-Analyse eine signifikante Verbesserung in der Belastungszeit bei Patienten über 65 Jahren mit schwerer Angina pectoris nahelegte. Die Untersucher der **AGENT**-Studie (Angiogenic Gene Therapy) randomisierten 79 Patienten mit chronisch-stabiler Angina pectoris-Symptomatik zu einer Therapie mit einer einmaligen intrakoronaren Gabe einer Dosis von Replikations-defizientem Adenovirus, welcher das FGF4-Gene enthält (Ad5-FGF4).³⁰⁶ Die intrakoronaren Injektionen wurden gut vertragen ohne unmittelbare Nebenwirkungen, obwohl bei zwei Patienten eine transiente asymptomatische Erhöhung von Leberenzymen und bei drei Patienten Fieber mit einer Dauer von unter einem Tag auftrat. Nach 4 und 12 Wochen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Belastungszeiten im Exercise Treadmill Test (ETT) zwischen den Behandlungsgruppen, lediglich nach 4 Wochen in einer Dosis-Gruppe. Eine im Protokoll präspezifizierte Subgruppenanalyse ergab allerdings eine signifikante Verbesserung in der Belastungszeit in den Patienten, welche eine zum Ausgangszeitpunkt unter 10 Minuten eingeschränkte Belastungszeit aufwiesen und Ad5-FGF4 erhalten hatten. Die **REVASC**-Studie (Randomized Evaluation of VEGF for Angiogenesis in Severe Coronary Disease), welche allerdings bisher nur in Abstrakt-Form publiziert ist, ist die erste randomisierte große Gentherapie-Studie, welche einen anhaltenden klinischen Benefit von Patienten mit schwerer koronarer Herzerkrankung nahelegt.³¹¹ In der Studie wurden 71 Patienten mit fortgeschrittener Angina pectoris und fehlenden Optionen für eine konventionelle Revaskularisationstherapie randomisiert zur Gabe von entweder Replikations-defizientem Adenovirus, welcher das VEGF₁₂₁-Gen enthält (Ad-VEGF₁₂₁), oder Fortführung einer optimalen medikamentösen Therapie. Ad-VEGF₁₂₁ wurde hierbei mittels 30 direkter intramuskulärer Injektionen durch die freie Wand des linken Ventrikels via einer Mini-Thorakotomie verabreicht. Da dieses Studiendesign nicht verblindet werden konnte, wurde für die Primäranalyse als objektiver Mess-Parameter für eine Belastungs-induzierte Myokardischämie die Belastungszeit bis zum Auftreten einer ST-Senkung um zusätzlich 1 mm benutzt. Dieser Messparameter zeigte sich in der Ad-VEGF₁₂₁-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nach 26 Wochen, nicht aber nach 12 Wochen, signifikant verbessert. Zusätzlich zeigten die Belastungszeit bis zum Auftreten von Angina pectoris, die maximale Belastungszeit und die Canadian Cardiovascular Class (CCS) als Maß für Angina pectoris im Alltagsleben jeweils eine signifikante Verbesserung nach 12 und 26 Wochen. In ähnlicher Weise fanden sich in allen fünf Fragebogen-Unterabschnitten des Seattle Angina Questionnaire signifikante Verbesserungen nach 12 und 26 Wochen. Da in dieser Studie keine „echte“ Kontrollgruppe (Minithorakotomie mit Plazebo-Injektionen) vorhanden ist, muß allerdings für sämtliche letzteren Parameter von hohen Plazebo-Effekten ausgegangen werden. Hinsichtlich der Nebenwirkungshäufigkeiten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Ernsthafte kardiale Ereignisse traten in 4 Patienten im Zusammenhang mit der chirurgischen Mini-Thorakotomie zur Verabreichung der Ad-VEGF₁₂₁-Injektionen. Diese Studie legte

somit unter der angegebenen Einschränkung eine anhaltende und kontinuierliche klinische Verbesserung innerhalb von drei bis sechs Monaten nahe und dient als eine prinzipielle Machbarkeitsstudie für die myokardiale Verabreichung eines angiogenetisch wirksamen Faktors als Genprodukt in Patienten mit schwerer koronarer Herzerkrankung. Unter Berücksichtigung der Risiken, die mit der Mini-Thorakotomie zwangsläufig assoziiert sind, sollten neuere Kathetergestützte Verfahren zur intramyokardialen Verabreichung von Genvektoren dieses Risiko deutlich vermindern und ein strikteres Studiendesign mit einem echten Placebo-Kontrollarm erlauben.

In einer weiteren, allerdings monozentrischen Phase II-Studie, der **KAT-Studie** (Kuopio Angiogenesis Trial), wurden 103 Patienten mit chronischer Myokardischämie und CCS-Klasse II-III eingeschlossen und mittels lokaler intrakoronarer Verabreichung mittels eines Perfusions-Infusions-Katheters von entweder adenoviralem VEGF₁₆₅ (n=37) oder einem Liposomen/VEGF-Plasmid-Gemisch (n=28) behandelt.³¹⁰ 38 Patienten in der Kontrollgruppe erhielten hierbei Placebo (Ringer-Laktat-Lösung). Bezüglich des intrakoronaren Gentransfers wurden keine Nebenwirkungen beobachtet. Nach 6 Monaten fand sich angiographisch auch keine erhöhte Restenoserate oder Progression der Atherosklerose. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Verbesserung in der Myokardperfusion nach 6 Monaten in den mit Ad-VEGF behandelten KHK-Patienten. In einer anderen monozentrischen Untersuchung verbesserte die intrakoronare Gabe von rekombinantem **GM-CSF** Protein die Myokardperfusion, gemessen an einem invasiv bestimmten Kollateralfuß-Index zu einem Zeitpunkt zwei Wochen nach Therapie.³⁰⁵ Die NOGA-Katheter-vermittelte intramyokardiale Gabe eines VEGF₁₆₅-Plasmids (**Euroinject One Trial**) war hinsichtlich der Verbesserung der Myokardperfusion zum Zeitpunkt drei Monate nach Therapie unwirksam, wobei positive Ergebnisse in einer nachfolgenden Subgruppen-Analyse berichtet wurden.

Aufgrund der Sicherheitsaspekte, die insbesondere bei viralen Genterapie-Studien beachtet werden müssen,^{312, 313} stellt sich die Frage, ob die Gabe eines angiogenetischen Faktors in Form von rekombinantem Protein gleich wirksam ist wie in Form eines adenoviralen Genvektors. Vom theoretischen Ansatz her erscheint die intrakoronare Applikation von rekombinantem Protein a priori nicht erfolversprechend: So besitzen Faktoren wie VEGF oder FGF-2 eine sehr kurze intravasale Halbwertszeit von wenigen Minuten. Desweiteren dürfte für eine optimale Wirkung eines angiogenetischen Faktors ein Konzentrationsgradient zwischen dem Ort der Applikation und dem ischämischen Gewebeareal notwendig sein, was im Falle einer intrakoronaren Verabreichung nicht gewährleistet ist. Dementsprechend fielen die Studien mit der intrakoronaren Gabe von rekombinantem Protein (Prototyp VIVA-Studie) durchweg negativ aus, was aufgrund der theoretischen Erwägungen nicht überraschend erscheint. Die prinzipiell möglichen Applikationswege und Transportvehikel für die myokardiale Angiogenese-Therapie sind in der Tabelle **8.2** dargestellt.

Applikationsweg	Vehikel	Transfektionseffizienz/Wirksamkeit
intravenös	rekomb. Protein DNA-Plasmid adenoviraler Vektor	∅ (first-pass-Effekt) ∅ (fehlende Aufnahme) ∅ (first-pass-Effekt)
intrakoronar	rekomb. Protein DNA-Plasmid adenoviraler Vektor	(+) (kurze Halbwertszeit) ∅ (fehlende Aufnahme) +
intramyokardial	rekomb. Protein DNA-Plasmid adenoviraler Vektor	+ + +++

Tabelle 8.2: Myokardiale Transfektionseffizienz in Abhängigkeit vom Applikationsweg und vom Transportvehikel.

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, ist eine relevante myokardiale Transfektionseffizienz bei intrakoronarer Applikation nur für adenovirale Vektoren zu erwarten. Von einer nicht unerheblichen systemischen Disseminierung („Spill over“) ist hierbei allerdings auszugehen. Die beste Transfektionseffizienz ist sicherlich bei direkter intramyokardialer Injektion von adenoviralem Vektor zu erreichen. Durchaus effektiv sind allerdings ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße, Injektionen von nackter Plasmid-DNA oder rekombinantem Protein.

Hinsichtlich der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) im fortgeschrittenen Stadium gibt es derzeit drei große Phase II und III Angiogenese-Studien. In die **TRAFFIC**-Studie (Therapeutic Angiogenesis with Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 for Intermittent Claudication) wurden 190 Patienten mit pAVK Stadium III aufgrund infra-inguinaler fortgeschrittener Atherosklerose eingeschlossen.³⁰⁴ Diese Patienten wurden 1:1:1 randomisiert zu bilateraler intraarterieller Infusion von Placebo an den Tagen 1 und 30 (n=63), rFGF-2 (30 µg/kg) an Tag 1 und Placebo an Tag 30 (einfache Dosis, n=66) oder rFGF-2 (30 µg/kg) an den Tagen 1 und 30 (zweifache Dosis, n=61). Der primäre Endpunkt hierbei war die maximale Gehstrecke nach 90 Tagen. Sekundäre Endpunkte waren Knöchel-Arm-Index und Sicherheit. Nach 90 Tagen konnten 174 Patienten ausgewertet werden, sechs Patienten mußten zwischenzeitlich eine periphere Revaskularisation erhalten, und 10 Patienten schieden aus der Analyse aufgrund fehlender Daten oder aus eigenem Antrieb aus. Die maximale Gehstrecke nach 90 Tagen stieg mit Placebo um 0.60 Minuten an, mit einfacher Dosis um 1.77 Minuten und mit zweifacher Dosis um 1.54 Minuten. Mittels ANOVA-Analyse war der Unterschied zwischen den Gruppen mit p=0.075 signifikant. Paarweise Vergleiche zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen Placebo und einfacher Dosis (p=0.026), aber Placebo und zweifache Dosis unterschieden sich nicht wesentlich (p=0.45). Die Häufigkeit schwerwiegender Nebenwirkungen (SAE's) war vergleichbar in allen Behandlungsgruppen. Die intraarterielle Gabe von rFGF-2 resultierte somit in einem signifikanten Anstieg in der maximalen

Gehstrecke nach 90 Tagen, wobei eine weitere Infusion nach 30 Tagen nicht besser war als eine einmalige Infusion. In einer finnischen monozentrischen Studie, in welche 54 Patienten mit schwerer pAVK eingeschlossen wurden, zeigte eine adenovirale und Plasmid/Liposomen-medierte Verabreichung von VEGF₁₆₅ während perkutanen Angioplastien eine verbesserte Vaskularisierung der behandelten Extremitäten nach drei Monaten.³⁰⁷ Die **RAVE**-Studie (Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor) war die erste größere Phase II, randomisierte doppelblinde, Plazebo-kontrollierte Studie mit intramuskulärer Verabreichung von Ad-VEGF₁₂₁, ein Replikationsdefizienter Adenovirus kodierend für die 121-Aminosäuren-Isoform von VEGF, in die untere Extremität von Patienten mit unilateraler schwerer pAVK.^{308, 309} Insgesamt wurden 105 pAVK-Patienten mit einer zwischen einer und zehn Minuten eingeschränkten Gehstrecke zu niedriger Dosis (4×10^9 PFU) Ad-VEGF₁₂₁, hoher Dosis (4×10^{10} PFU) Ad-VEGF₁₂₁, oder Plazebo randomisiert, und die Dosen mittels 20 intramuskulären Injektionen in das betreffende Bein innerhalb einer Behandlung verabreicht. Der primäre Endpunkt, nämlich die Änderung in der maximalen Gehstrecke nach 12 Wochen unterschied sich nicht signifikant zwischen Plazebo-Gruppe (1.8+/-3.2 Minuten), niedriger Ad-VEGF₁₂₁-Dosis-Gruppe (1.6+/-1.9 Minuten), und hoher Ad-VEGF₁₂₁-Dosis-Gruppe (1.5+/-3.1 Minuten). Sekundäre Meßparameter wie Knöchel-Arm-Index, Beginn der Claudicatio-Symptomatik und standardisierte Fragebögen zur Lebensqualität waren ebenfalls zwischen den Gruppen nach 12 und 16 Wochen nicht unterschiedlich. Die Gabe von Ad-VEGF₁₂₁ war hierbei assoziiert mit einem gehäuften Auftreten von peripheren Ödemen. Die Ergebnisse dieser Studie sprechen somit gegen eine therapeutische Effektivität einer einmaligen lokalen intramuskulären Verabreichung von Ad-VEGF₁₂₁ zur Therapie der pAVK im Stadium II-III.

Obwohl zusammenfassend mehrere Studien in der Tabelle **8.1** hinsichtlich der im Studienprotokoll vordefinierten primären oder sekundären Endpunkte positiv beurteilt wurden, muß festgehalten werden, dass diese positiven Resultate nicht immer direkt in einen eindeutigen klinischen Benefit transferiert werden können. So ist der individuelle Nutzen einer im Mittel im Vergleich zu Plazebo um 1.17 Minuten verbesserten Gehstrecke (TRAFFIC-Studie) möglicherweise wenig bedeutsam. Andererseits ist unklar, warum das gleiche adenovirale VEGF₁₂₁-Konstrukt im Myokard positive Ergebnisse ergab (REVASC-Studie), während es in der Studie mit pAVK ineffektiv blieb (RAVE-Studie).³⁰⁹ Derzeit ist die optimale Dosis, der optimale Faktor oder die beste Applikationsform für die therapeutische Angiogenese, myokardial oder peripher, nicht bekannt. Ferner benutzen die bisherigen Studien überwiegend Surrogat-Endpunkte, wohingegen notwendige harte klinische Endpunkte wie Mortalität, Myokardinfarkt, Notwendigkeit der Revaskularisation oder Amputation bisher nicht mit einbezogen wurden. Darüberhinaus fehlen Langzeit-Ergebnisse, teilweise aufgrund der in einige Studien eingeschlossenen schwerkranken Patienten im Endstadium ihrer vaskulären Erkrankung.

Durchweg alle erwähnten Phase II-Studien zur Angiogenese-Förderung ergaben keine größeren Probleme hinsichtlich der Sicherheit der Therapie. Keine der möglichen Nebenwirkungen, welche Experimente mit Knock-Out- oder transgenen Tiermodellen vermuten ließen, wie Verschlechterung der Atherosklerose oder proliferativer Retinopathie, waren in den klinischen Studien trotz genauem Monitoring und strengen Auflagen aufgetreten. Die Inzidenz für Karzinome war in den Patienten, welche in eine angiogenetische Gentherapie-Studie eingeschlossen worden waren, die gleiche oder aufgrund des vor Studieneinschluß erfolgtem sorgfältigen Screening sogar niedriger als in der Allgemeinbevölkerung gleichen Alters.^{306, 307, 310} Andererseits liegt auf der Hand, dass größere Patientenzahlen und längere Verlaufszeiten notwendig sind, bevor die Sicherheit von genbasierten Behandlungen somatischer Krankheiten einerseits und die Effektivität einer Wachstumsfaktor-basierten Durchblutungsförderung andererseits eindeutiger beurteilt werden kann.

8.2. Klinische Studien mit Vascular Endothelial Growth Factor-C (VEGF-C/VEGF-2)

Aufgrund der in Abschnitt 2. erhaltenen präklinischen Daten zur Förderung der Angiogenese mit VEGF-C/VEGF-2 wurden bereits klinische Phase I und II-Studien mit diesem Wachstumsfaktor bei Patienten mit schwerer KHK und fehlenden anderweitigen Therapieoptionen durchgeführt.

In einer ersten Pilotstudie erfolgte eine perkutane intramyokardiale Verabreichung eines DNA-Plasmids, kodierend für VEGF-C, mittels eines steuerbaren Nadelinjektionskatheters, kombiniert mit dem elektromechanischen NOGA-Mappingverfahren,³¹⁴ in sechs Patienten mit koronarer Mehrgefäßerkrankung, reversibler Ischämie in der SPECT-Sesamibi-Myokardszintigraphie und chronischer Angina pectoris CCS-Klasse 3 oder 4 trotz maximaler medikamentöser Therapie.²⁹⁴ Dieses Injektionsverfahren war in vorausgehenden Untersuchungen hinsichtlich Patientensicherheit und Durchführbarkeit evaluiert worden.^{315, 316} Wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens im Vergleich zu einer Injektion nach Minithorakotomie ist die Vermeidung jeglichen operativen Eingriffs mit den damit verbundenen Narkoserisiken und die Möglichkeit der weitgehend ortsspezifischen Applikation. Die Kombination des Nadel-Injektionskatheters mit dem NOGA-Mapping erlaubt die Differenzierung zwischen vitalen, normalen Gewebe einerseits und vitalen, ischämischen („hibernating“) oder infarzierten, vernarbten Gewebe andererseits.^{292, 317} Diese Pilotstudie zeigte zunächst die Sicherheit und Anwendbarkeit der intramyokardialen VEGF-C Gentherapie und ergab Hinweise, dass es nach einem Jahr, gemessen an Nitrat-Verbrauch und Ischämienachweis mittels NOGA-Mapping und SPECT-Sestamibi Myokardszintigraphie, zu einer Perfusionsverbesserung bei dieser limitierten Patientenzahl gekommen war.²⁹⁴

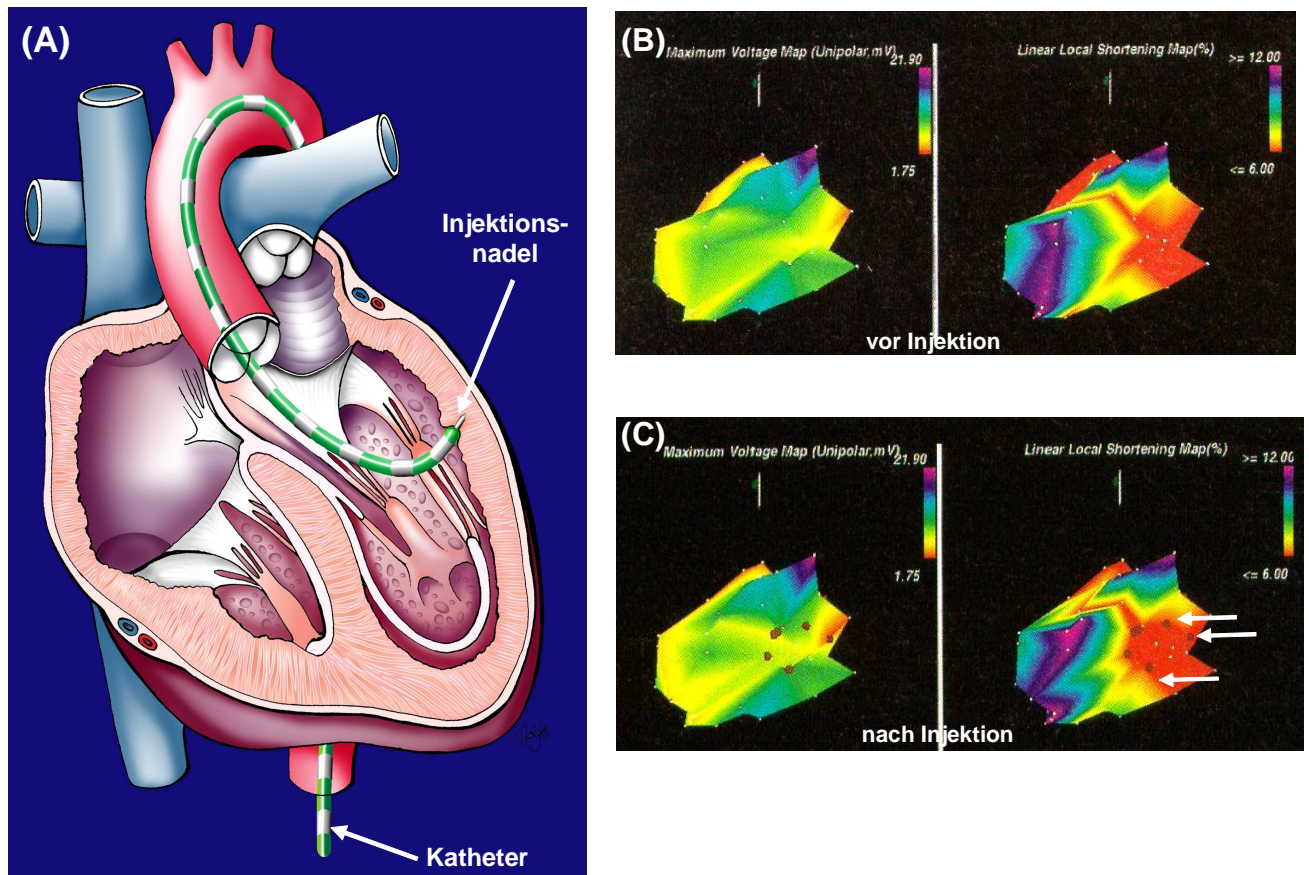


Abb. 8.1: (A) Perkutaner myokardialer Mapping-Nadel-Injektionskatheter zur intramyokardialen Applikation von Plasmid-DNA oder adenoviralen Genkonstrukten (Gentransfer). Die Elektrode an der distalen Katheterspitze erlaubt die Erstellung einer elektromechanischen Oberflächenkontur des linken Ventrikels und die Dokumentation der Injektionsstellen. Eine 27G-Nadel kann aus der distalen Katheterspitze in voreingestellter Tiefe (4-6 mm) zur intramyokardialen Injektion ausgefahren werden. (B) Elektromechanische NOGA™-Karten des linken Ventrikels in links-lateraler Projektion, welche mit einem endokardialen Mapping-Katheter erstellt wurden. Die farbkodierte elektrische Spannungs-Karte (Maximum Voltage Map) auf der linken Seite zeigt, dass die myokardiale Vitalität im Bereich der lateralen Wand erhalten ist. Die lineare lokale Verkürzungs-Karte (Shortening Map) auf der rechten Seite läßt erkennen, dass die mechanische Funktion des basalen Abschnitts der lateralen Wand eingeschränkt ist (rot-orange Farbe). Das Kartenpaar läßt somit ein Areal von „hibernating“ Myokard im lateralen Wandabschnitt vermuten.³¹⁴ (C) Das gleiche elektromechanische NOGA-Kartenpaar nach sechs Injektionen von nackter Plasmid-DNA, kodierend für VEGF-C/VEGF-2. Die Injektionsstellen (dunkelrote Punkte) wurden erfolgreich an den Randzonen des ischämischen Myokards plaziert.³¹⁴

In der nachfolgenden Phase 1/2 Placebo-kontrollierten, doppelblinden Studie wurden 19 Patienten eingeschlossen und mit 200 (n=6) oder 800 (n=6) µg VEGF-C versus Placebo (n=7) wie in der Pilotstudie beschrieben behandelt. Nach 12 Wochen kam es in den phVEGF-C behandelten Patienten zu einer signifikanten Verbesserung in der Angina-pektoris CCS-Klasse, in der maximalen Belastungszeit und im Seattle Angina-Fragebogen im Vergleich zu den Placebo-behandelten Patienten. Hinsichtlich des elektromechanischen Mappings kam es im Gegensatz zu den Placebo-behandelten Patienten zu einer Verbesserung der Perfusion in den VEGF-C behandelten ischämischen

Arealen, was sich ebenfalls in der myokardszintigraphischen SPECT-Perfusion nachweisen ließ (Abbildung 8.2 und 8.3). Allerdings müssen doppelt verblindete Phase 2/3 Studien mit größeren Fallzahlen diese positiven Trends erst bestätigen.

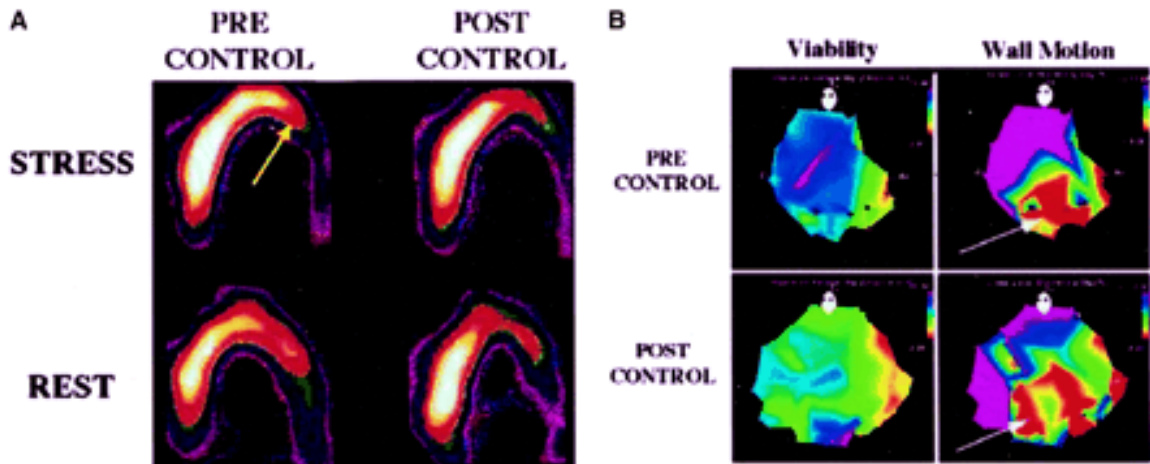


Abb. 8.2: SPECT-myokardszintigraphische Ergebnisse und NOGA-elektromechanisches Mapping eines Placebo-behandelten Patienten. (A) Vor Studieneinschluß (linke Hälfte) zeigt sich in der ^{99}Tc -Sestamibi SPECT-Untersuchung ein anterolateraler Perfusionsdefekt, welcher sich nach medikamentöser Belastung mit Dipyridamol als Hinweis auf teilweise reversible Ischämie partiell noch verstärkt (gelber Pfeil). 12 Wochen nach Placebo-Behandlung sind die Bilder der Ruhe- und Belastungsphase (rechte Seite) praktisch unverändert zum Ausgangsbefund. (B) NOGA-Karten des gleichen Patienten bestätigen die unveränderte anterolaterale Ischämie (mit Pfeil markierte Zonen) vor (oben) und nach (unten) Placebo-Behandlung.²⁹⁹

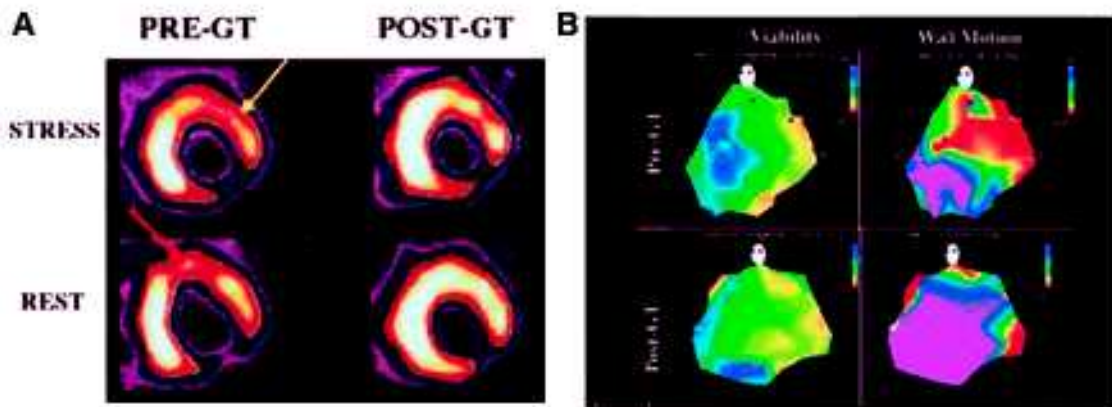


Abb. 8.3: SPECT-myokardszintigraphische Ergebnisse und NOGA-elektromechanisches Mapping eines mit phVEGF-2/VEGF-C transfizierten Patienten. (A) Vor Gentherapie (linke Hälfte, pre-GT) zeigt sich in der ^{99}Tc -Sestamibi SPECT-Untersuchung ein anterolateraler Perfusionsdefekt in Ruhe (roter Pfeil), welcher sich nach medikamentöser Belastung mit Dipyridamol als Hinweis auf teilweise reversible Ischämie partiell noch verstärkt (gelber Pfeil). 12 Wochen nach Gentherapie mit phVEGF-C/VEGF-2 (post-GT) stellt sich der Perfusionsdefekt in Ruhe („rest“, unten) nicht mehr dar, während der Belastungs-induzierte Defekt („stress“, oben) weniger stark ausgeprägt ist. (B) NOGA-Karten des gleichen Patienten bestätigen, dass sich die anterolaterale Ischämie vor Gentherapie (oben rechts, rote Zone) nach der Gentherapie fast nicht mehr nachweisen läßt (unten rechts).²⁹⁹

In einem alternativen Therapieansatz wurde bei Patienten mit chronischer Angina pectoris der CCS-Klasse 3 und 4 aufgrund fortgeschrittener koronarer Herzerkrankung und fehlenden Therapieoptionen („no-option patients“) VEGF-C/VEGF-2 Plasmid-DNA nach chirurgischer Thorakotomie unter Sicht in ischämische Myokardareale injiziert.³¹⁸ In dieser prospektiven, unverblindeten Phase 1 Studie mit eskalierender Dosierung des Plasmids zeigten sich einerseits keine mit der Prozedur zusammenhängenden Komplikationen, andererseits im follow-up nach einem Jahr eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der subjektiven Beschwerden. Da diese klinische Verbesserung jedoch nicht durch eine angiographisch nachweisbare Perfusionsverbesserung begleitet war, ist möglicherweise von einem nicht unerheblichen Plazebo-Effekt in diesen Patienten auszugehen. Aus diesem Grund wird derzeit eine Phase 3-Studie durchgeführt, um in dieser Patientengruppe den möglichen positiven Effekt dieser Therapieform abschließend beurteilen zu können.

8.3. Klinische Studien mit Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1/aFGF)

Aus den in Abschnitt 3. erzielten Ergebnissen mit FGF-1 *in vitro* und im präklinischen Modell resultierte ebenfalls unmittelbar eine Umsetzung in eine klinische Phase 1-Studie mit Patienten mit schwerer, chirurgisch oder interventionell nicht rekonstruierbarer peripherer arterieller Verschlusskrankheit im Endstadium (pAVK III-IV).²⁹⁸ Primärer Endpunkt dieser Studie war, die Sicherheit und Verträglichkeit von ansteigenden, einmaligen oder wiederholten (n=2) Dosen von intramuskulär verabreichter Plasmid-DNA kodierend für FGF-1 (NV1FGF) in diesen Patienten zu evaluieren. Sekundäre Endpunkte waren, die biologische Aktivität von NV1FGF auf hämodynamische und klinische Parameter zu untersuchen, welche mit einer verbesserten Perfusion assoziiert sind. Hierzu wurden 51 Patienten mit nicht-rekonstruierbarer pAVK mit Ruhe-Schmerz oder Gewebnekrosen mit intramuskulär NV1FGF behandelt. Die in die ischämische Waden- und Oberschenkelmuskulatur verabreichten Dosen an Plasmid-DNA sind in der Tabelle 8.3 aufgeführt.

NV1FGF-Gesamtdosis (μg)	Patienten-Anzahl	
	Einfach-Gabe	Wiederholte Gabe
500	3	-
1000	3	3 (2 x 500 μg)
2000	3	3 (2 x 1000 μg)
4000	6	6 (2 x 2000 μg)
8000	6	6 (2 x 4000 μg)
16000	6	6 (2 x 8000 μg)

Tab. 8.3: Patienten-Einschluß nach NV1FGF-Dosis.

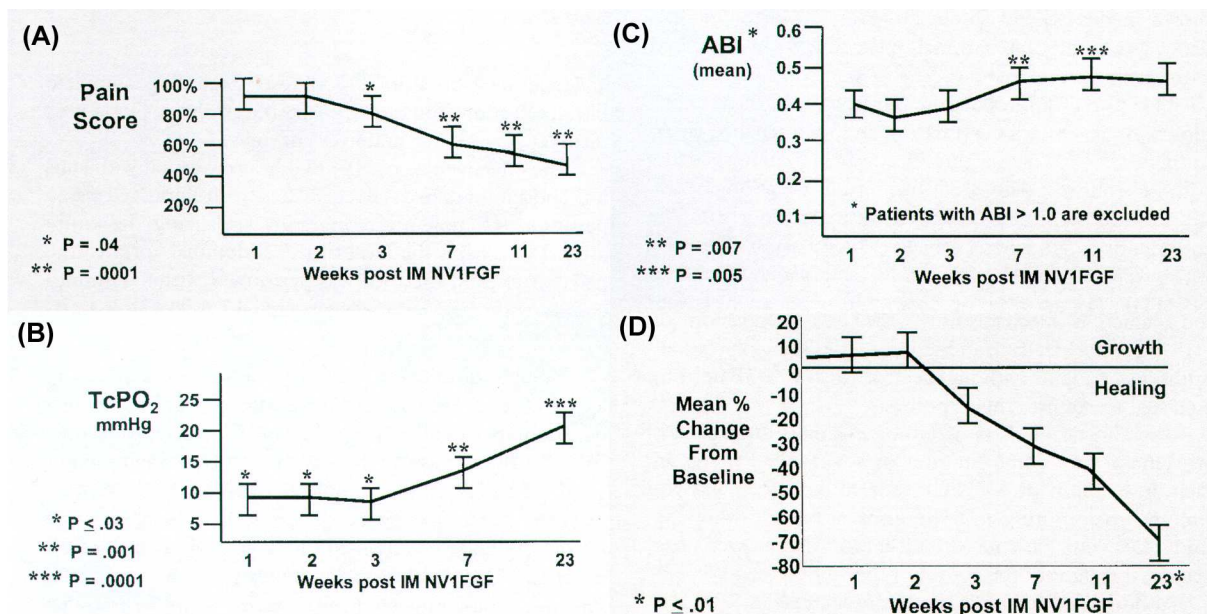


Abb. 8.4: (A) Abschätzung der Schmerzempfindung mittels einer visuellen Analog-Skala („Pain Score“) nach intramuskulärer NV1FGF-Applikation (Ausgangswert = 100%). (B) Mittlerer transkutaner Sauerstoff-Partialdruck im Fuß (TcPO₂ in mmHg) nach intramuskulärer NV1FGF-Applikation. (C) Mittlerer Knöchel-Arm-Index (ABI) und (D) Abnahme der Ulcus-Größe als Ausdruck der Heilungstendenz nach intramuskulärer Applikation von NV1FGF-Plasmid.²⁹⁸

In dieser Studie wurden keine mit NV1FGF in Zusammenhang stehenden Nebenwirkungen oder Ereignisse beobachtet, was zunächst die Sicherheit und Verträglichkeit dieser Therapieform dokumentiert. Andererseits fand sich nach 6 Monaten eine signifikante Reduktion im Schmerzempfinden ($p < 0.001$; Abbildung 8.4A) und in der kumulativen Ulcus-Größe ($p < 0.01$; Abbildung 8.4B). Diese Veränderungen gingen einher mit einem Anstieg des transkutanen Sauerstoffdrucks ($p < 0.01$) sowie des Knöchel-Arm-Index ($p < 0.01$) (Abbildung 8.4C und D).²⁹⁸ Die Ergebnisse legten somit eine verbesserte Gewebsperfusion durch die Therapie mit NV1FGF nahe und bildeten den Ausgangspunkt für die Durchführung einer Phase 2-Studie mit NV1FGF.

Diese multizentrische doppelblinde, Plazebo-kontrollierte Studie trägt den Namen **TALISMAN** und wird derzeit europaweit in 30 Zentren durchgeführt. Hierbei sollen insgesamt 112 Patienten eingeschlossen werden. Unser Zentrum ist hieran auch beteiligt und hat bisher zwei Patienten eingeschlossen. Einschlußkriterien sind Patienten mit schwerer pAVK Stadium IV im Alter ≥ 45 Jahre mit ein oder mehreren Ulzera ohne Heilungstendenz über mehr als zwei Wochen vor der Medikamentengabe, dabei objektivierbarer Nachweis eines Knöchel-Blutdrucks ≤ 50 mmHg und/oder Zehen-Blutdrucks ≤ 30 mmHg und/oder flache oder kaum pulsatile Puls-Volumen-Kurve in der erkrankten Extremität an zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen im Abstand von mindestens einer Woche. Zusätzlich muß ein Verschuß von einer oder mehreren Arterien (A. iliaca, femoralis superficialis, poplitea und/oder eine oder mehrere infrapopliteale Arterien) mittels Angiographie oder

Doppler-Ultraschall innerhalb der vergangenen 6 Monate dokumentiert sein. Die Patienten dürfen hierbei keine geeigneten Kandidaten für Revaskularisationsmaßnahmen sein, aufgrund fehlendem oder ungeeignetem autologen Venenmaterial, oder wenn die Revaskularisation nur eine inkomplette Perfusion des Beines/Fußes bewirken würde, oder wenn die Patienten ein sehr hohes Amputationsrisiko eingehen würden oder aufgrund von Begleiterkrankungen ein sehr hohes Operationsrisiko besteht. Nach einer zwei- bis achtwöchigen Screening-Phase werden die Patienten dann im Verhältnis 1:1 zur Therapie mit NV1FGF oder Plazebo (Kochsalz) randomisiert. Primärer Endpunkt ist die Änderung der Ulkusgröße des behandelten Beines nach 6 Monaten. Sekundäre Endpunkte sind die Änderung des Schmerzausmaßes im Bein, hämodynamische Parameter wie Knöchel-Arm-Index, Großzehen-Arm-Index und transkutaner Sauerstoffpartialdruck, die Zeit bis zu Amputationen, Verschwinden von Ruheschmerz und komplette Ulkusabheilung. Aufgrund des Sicherheitsaspektes erfolgt zusätzlich zu spezifischen Labortests eine insgesamt dreimalige ophthalmologische Untersuchung zum Ausschluß einer proliferativen Retinopathie, bei welcher bekanntlich angiogenetische Prozesse involviert sind. Ausschlußkriterien sind aus Sicherheitsgründen u.a. eben das Vorhandensein einer aktiven proliferativen Retinopathie, eine vorausgegangene oder der Verdacht auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung (u.a. positiver Hämocult-Test, erhöhte PSA, erhöhtes α -Fetoprotein, verdächtige Mammographie), positive HIV-Serologie, vorausgegangene erfolgreiche Revaskularisationsmaßnahmen (Bypass, Angioplastie) innerhalb von drei Monaten, geplante Amputation innerhalb eines Monats, Niereninsuffizienz (Creatinin >2.0 mg/dl) und Hämodialyse.

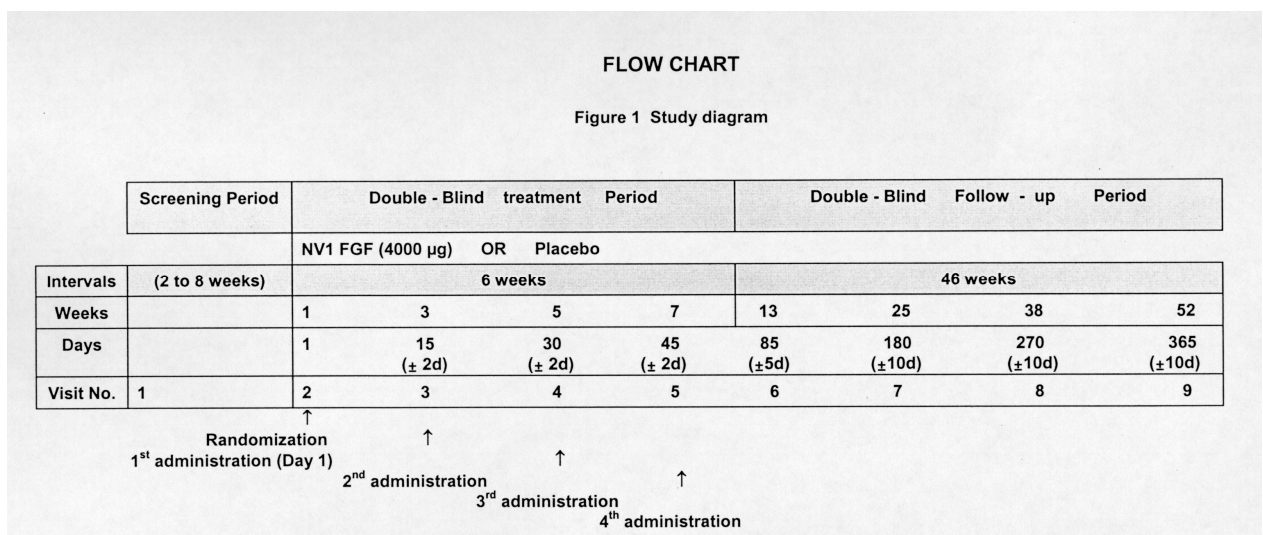


Abb. 8.5: Studienablauf („Flow Chart“) der TALISMAN-Studie. Patienten mit pAVK im Stadium IV werden doppel-blind mit viermaligen Injektionen von jeweils 4.000 µg Plasmid NV1FGF (insgesamt 16.000 µg) oder Plazebo (Kochsalz) in die ischämische Beinmuskulatur in Abständen von 2 Wochen behandelt. Die Nachbeobachtungsphase („Follow-Up Period“) erstreckt sich über ein Jahr.

Der Studienablauf ist in Abbildung 8.6 dargestellt. Die Patienten mit pAVK im Stadium IV werden doppelblind mit viermaligen Injektionen von jeweils 4.000 µg Plasmid NV1FGF (insgesamt 16.000 µg) oder Plazebo (Kochsalz) in die ischämische Beinmuskulatur in Abständen von 2 Wochen behandelt. Die Nachbeobachtungsphase erstreckt sich über ein Jahr und beinhaltet insgesamt 9 Visits, bei denen die o.a. Parameter systematisch erfaßt werden.

Die ischämisch bedingten Ulzerationen vor und nach Therapie mit NV1FGF-Plasmid bzw. Plazebo (Kochsalz) zweier in unserem Studienzentrum eingeschlossener Patienten im Verlauf von sechs Monaten sind in Abbildung 8.7 abgebildet. Die Studie ist noch nicht abgeschlossen, eine endgültige Beurteilung der gentherapeutischen Behandlung von Patienten mit pAVK IV mittels FGF1-Plasmid ist somit derzeit nicht möglich. Die TALISMAN-Studie wird sicherlich wichtige Erkenntnisse liefern, ob diese Therapieform für dieses schwerkranken Patientenkollektiv eine sinnvolle Alternative darstellt.

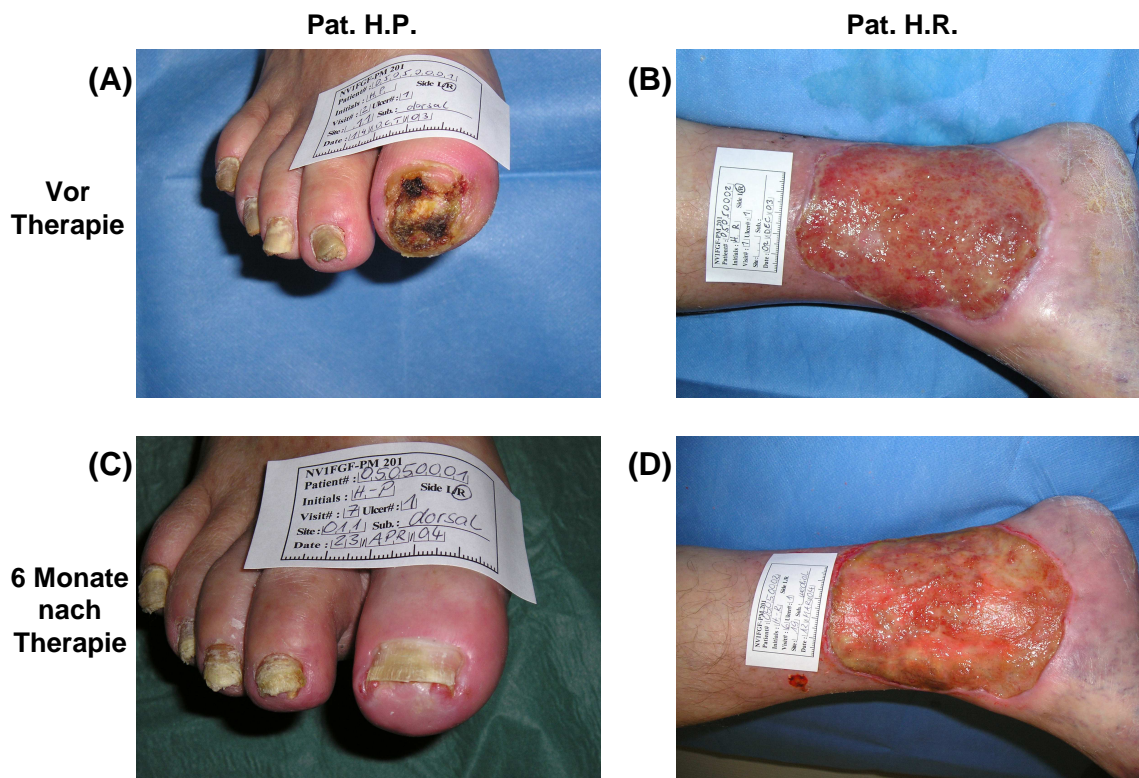


Abb. 8.7: Beispiele zweier in unserem Zentrum in die TALISMAN-Studie eingeschlossenen pAVK IV-Patienten mit chronischen ischämisch bedingten Ulzera. (A) und (B) über mindestens 2 Wochen konstanter Ausgangsbefund vor angiogenetischer Therapie. (C) und (D) 6 Monate nach Gentransfer mit Plasmid NV1FGF versus Plazebo. Während es bei Pat. H.P. (linke Photos) zu einer fast vollständigen Abheilung der Gangrän gekommen ist, besteht bei Pat. H.R. nach 6 Monaten ein praktisch unveränderter Befund.

8.4. Potentielle klinische Anwendung von Angiopoietin-1

Während der embryonalen Gefäßentwicklung modifiziert Angiopoietin-1 die durch VEGF induzierte Angiogenese, indem es die Gefäßreifung und –stabilisierung beeinflusst.²⁰⁸ Ein therapeutischer Einsatz von Angiopoietin-1 im erwachsenen Organismus zeichnet sich in dieser Hinsicht bisher nicht ab. Eine Überexpression von Angiopoietin-1 alleine im gesunden Organismus führt zu keiner Gefäßneubildung.¹⁷ Möglicherweise kann die kombinierte Gabe von Angiopoietin-1 mit VEGF („Gen-Cocktail“), eventuell in sequentieller, zeitlich getrennter Abfolge die Gefäßneubildung in ischämischen Gewebebezirken verbessern,^{319, 320} wenngleich die Rolle von Angiopoietin-1 ebenso wie -2 in der therapeutischen Anwendung bei ischämischen Erkrankungen bisher unklar ist. Obwohl VEGF und Angiopoietin-1 während der Embryogenese zweifellos im wesentlichen angiogenetisch wirksame Substanzen sind, erfordert eine entsprechende Manifestation im adulten Gefäßsystem möglicherweise längere Behandlungszeiträume oder eine Art „Trigger“, welcher die ansonsten sich in Ruhe befindliche Gefäßwand destabilisiert oder anderweitig aktiviert. Im Unterschied hierzu trat der Permeabilitäts-abdichtende Effekt von Angiopoietin-1 im ausgewachsenen Tierorganismus in der Abwesenheit von jeglichen merkbaren Effekten auf das Mikrogefäß-Remodeling oder Angiogenese auf. Die Regulation der vaskulären Permeabilität könnte somit der unmittelbarste und potenteste biologische Effekt von Angiopoietin-1 (ebenso wie möglicherweise von VEGF) beim Erwachsenen sein. Die Fähigkeit von Angiopoietin-1, die Plasmadurchlässigkeit zu blockieren, ohne dabei seine angiogenetischen Effekt zu manifestieren, könnte somit therapeutisch vorteilhaft sein in Situationen, bei welchen verstärktes extravasales Austreten von Plasma mit der Folge der Ödembildung problematisch und gleichzeitig Angiogenese nicht wünschenswert ist. Da der Endotoxin-induzierte septische Schock ein Zustand erhöhter mikrovaskulärer Undichtigkeit ist, welcher aus einem entzündlichen Prozess resultiert, war naheliegend, den möglichen therapeutischen Vorteil von Ang1 in einem Tiermodell mit Mäusen, in welchen mittels LPS ein septischer Schock induziert wurde, zu untersuchen. Die präsentierten Ergebnisse in diesem Modell mit einer verbesserten Mortalität in septischen Mäusen, welche mit einem adenoviralen Konstrukt kodierend für Angiopoietin-1 behandelt wurden, legen nahe, dass Angiopoietin-1 als zusätzliche Therapiemodalität in der Behandlung des septischen Schocks nützlich sein könnte. Selbstverständlich müssen diese Ergebnisse in einem anderen Sepsis-Tiermodell mit noch stärkerer klinischer Relevanz reproduziert werden. Als nächster Schritt ist hierzu ein Tiermodell mit Schweinen geplant, in welchen durch Infusion von Endotoxin ein septischer Schock induziert wird. Dieses Tiermodell ist relativ gut etabliert im Hinblick darauf, eine septische Situation beim Menschen zu simulieren. Zielparameter hierbei sind eine potentiell günstige Beeinflussung der durch Endotoxin-ausgelösten hämodynamischen Veränderungen und der Mortalitätsrate durch eine gleichzeitige Verabreichung von Angiopoietin-1. Im positiven Falle wäre dann aufgrund fehlender anderweitiger etablierter Therapieformen eine experimentelle Anwendung von Angiopoietin-1 als rekombinantes Protein beim Patienten im schweren septischen Schock prinzipiell denkbar.

9. Zusammenfassung und Perspektive

Eine Verbesserung pharmakologischer Maßnahmen für Krankheiten, welche durch eine unzureichende Gewebepfusion charakterisiert sind, ist als Alternative zu chirurgischen Maßnahmen wünschenswert und immer dann unbedingt erforderlich, wenn chirurgische Rekonstruktionen nicht mehr möglich sind. Wie in dieser Arbeit gezeigt, sind verschiedene angiogenetische Faktoren in verschiedenen Tiermodellen wie der Extremitäten-Ischämie wirksam. Aufgrund dieser präklinischen Daten wurden einige Faktoren (VEGF-A, VEGF-C, FGF-1) in Patienten mit myokardialer oder peripher Ischämie getestet. Obwohl sich zunächst viel versprechende Ergebnisse in kleineren Open-Label-Studien ergaben, haben bisher keine der Plazebo-kontrollierten Studien, die bisher durchgeführt wurden und deren Ergebnisse bekannt sind, überzeugende positive Resultate liefern können. Dabei ergaben sich in diesen Studien erhebliche Plazebo-Effekte, welche viel ausgeprägter waren als initial vermutet. Es ist vorstellbar, dass junge und ansonsten gesunde Tiere in der Lage sind, mit einer effektiven angio- bzw. arteriogenetischen Antwort auf einen Gefäßschaden zu reagieren, welche durch exogene Maßnahmen noch weiter verbessert werden kann. Im Unterschied hierzu könnten Endothelzellen von Patienten mit extensiven atherosklerotischen Gefäßveränderungen teilweise refraktär für angiogenetische Faktoren sein. Möglicherweise könnten daher Therapieformen, die einen genetischen „Hauptschalter“ wie beispielsweise Hypoxia-inducible Factor (HIF) beeinflussen, Vorteile gegenüber einer Therapie mit einem einzelnen angiogenetischen Faktor aufweisen. Eine länger anhaltende Exposition gegenüber angiogenetischen Faktoren im Vergleich zu der, welche in den ersten Studien verwendet wurde, könnte ebenfalls zu wirkungsvolleren Resultaten führen.

Als eine Alternative zur Gabe einzelner angiogenetischer Faktoren hat die Transplantation angiogenetischer Zellen aus dem Knochenmark oder peripherer Blutzellen signifikantes Interesse erzeugt. Hierzu wurden bereits verschiedene Strategien eingesetzt, einschließlich der Verwendung von Knochenmarkszellen und entweder gesamten peripheren mononukleären Zellen oder gereinigten CD34⁺-Zellen, nach Knochenmark-Stimulation mit Zytokinen wie GM-CSF. Aus Tierversuchen mit Zellmarkierungs-Experimenten ist hierbei klar geworden, dass die aus den Knochenmark stammenden Zellen zwar tatsächlich zu ischämischen Arealen rekrutiert werden, hier jedoch perivaskulär anzufinden sind und an einer Gewebevaskularisierung durch Produktion von parakrinen Faktoren, nämlich eben den bekannten angiogenetisch wirksamen Faktoren teilnehmen. Doppel-blinde Plazebo-kontrollierte Studien zum Wirksamkeitsnachweis fehlen jedoch auch hier.

Angiopoietin-1 wurde ursprünglich nur als ein in Zusammenhang mit Angiogenese stehender Faktor identifiziert, was sich auch in der Nomenklatur widerspiegelt. Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit mit diesem Faktor erzielt wurden, lenkt das Augenmerk auf ein neues Einsatzgebiet, nämlich dem als anti-inflammatorischen Faktor, welcher als neue Therapieform bei Sepsis eingesetzt werden könnte.³²¹ Angiopoietin-1 hatte diverse modulatorische Effekte auf das Immunsystem: Es hemmte inflammatorische Adhäsionsmoleküle und es ist mittlerweile aufgrund weiterführender

Untersuchungen klar geworden, dass die induzierbare NOS-Expression ebenfalls in diesem Sepsis-Tiermodell gehemmt wird. Dabei wurde die Herabregulierung der protektiven endothelialen NOS, die typischerweise bei der Sepsis auftritt, verhindert.²³² Da Angiopoetin-1 somit nicht nur einzelne proinflammatorische Mediatoren hemmt, sondern multiple Stoffwechselwege beeinflusst, ist es sehr nahe liegend, diesen endogenen Faktor mit inhärenten antiinflammatorischen und gegenregulierenden Eigenschaften einem System mit überschießender Inflammation zuzuführen, wie es bei der Sepsis auftritt. Dies sollte auch nebenwirkungsärmer sein, als nur einzelne Signalwege zu beeinflussen. Hierzu sind weitere präklinische Tiermodelle erforderlich, in welchen Sepsis mit lebenden Bakterien erzeugt werden muss, und, um eine der klinischen Realität etwas näher stehende Situation zu simulieren, die Gabe von Angiopoetin-1 auch zu einem späteren Zeitpunkt, wenn das Vollbild der Sepsis bereits eingetreten ist, erfolgen muss, da die inflammatorische Antwort in der klinischen Realität nicht prophylaktisch unterdrückt werden kann. Insgesamt eröffnen somit die in dieser Arbeit erzielten Untersuchungsergebnisse ein neues und weites Forschungsfeld mit der Frage, ob sich Angiopoetin-1, ein zweifellos zunächst in die embryonale Angiogenese involvierter Faktor, als inflammatorisches Agens therapeutisch wirksam bei der Sepsis einsetzen lässt, und ob diese Fragestellung in eine klinische Studie überführt werden kann.

10. Literaturverzeichnis

1. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438:967-974.
2. Semenza GL. Therapeutic angiogenesis: another passing phase? *Circ Res*. 2006;98:1115-1116.
3. Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation*. 2005;111:1556-1566.
4. Jones PF. Not just angiogenesis--wider roles for the angiopoietins. *J Pathol*. 2003;201:515-527.
5. Zhao YD, Campbell AI, Robb M, Ng D, Stewart DJ. Protective role of angiopoietin-1 in experimental pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2003;92:984-991.
6. Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, Rudge J, Yancopoulos G, Vadas MA. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res*. 2000;87:603-607.
7. Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science*. 1994;264:569-571.
8. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of α_v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest*. 1999;103:1227-1230.
9. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct α_v integrins. *Science*. 1995;270:1500-1502.
10. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267:10931-10934.
11. Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell*. 1996;87:1153-1155.
12. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Med*. 1971;285:1182-1186.
13. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996;87:1171-1180.
14. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest*. 1999;79:213-223.
15. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon E, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing Angiopoietin-1. *Science*. 1998;282:468-471.
16. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain H, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing Angiopoietin-1. *Science*. 1999;286:2511-2514.
17. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med*. 2000;6:460-463.
18. Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol*. 1998;141:805-814.
19. D'Amore PA, Thompson RW. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol*. 1987;49:453-464.
20. D'Amore P, Smith SR. Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey. *Growth Factors*. 1993;8:61-75.

21. Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA. An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:4544-4548.
22. Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA. Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res*. 1999;84:298-305.
23. Schaper W, Ito W. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res*. 1996;79:911-919.
24. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*. 1997;101:40-50.
25. Bernotat-Danielowski S, Sharma HS, Schott RJ, Schaper W. Generation and localisation of monoclonal antibodies against fibroblast growth factors in ischaemic collateralised porcine myocardium. *Cardiovasc Res*. 1990;27:1220-1228.
26. Fernandez B, Buehler A, Wolfram S, Kostin S, Espanion G, Franz WM, Niemann H, Doevendans PA, Schaper W, Zimmermann R. Transgenic myocardial overexpression of fibroblast growth factor-1 increases coronary artery density and branching. *Circ Res*. 2000;87:207-213.
27. Lindner V, Maciag T. The putative convergent and divergent natures of angiogenesis and arteriogenesis. *Circ Res*. 2001;89:747-749.
28. Takeshita S, Pu LQ, Zheng LP, Ferrara N, Stein LA, Sniderman AD, Isner JM, Symes J. Vascular endothelial growth factor induces dose-dependent revascularization in a rabbit model of persistent limb ischemia. *Circulation*. 1994;90:II-228-II-234.
29. Witzenbichler B, Asahara T, Murohara T, Silver M, Spyridopoulos I, Magner M, Principe N, Kearney M, Hu J-S, Isner JM. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol*. 1998;153:381-394.
30. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO*. 1996;15:290-298.
31. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:2576-2581.
32. Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res*. 1998;83:233-240.
33. Shyu K-G, Manor O, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Direct intramuscular injection of plasmid DNA encoding Angiopoietin-1 but not Angiopoietin-2 augments revascularization in the rabbit ischemic hindlimb. *Circulation*. 1998;98:2081-2087.
34. Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg*. 1992;16:181-191.
35. Giordano FJ, Ping P, McKirnan D, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, Mathieu-Costello O, Hammond HK. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med*. 1996;2:534-539.
36. van Belle E, Witzenbichler B, Chen D, Silver M, Chang L, Schwall R, Isner JM. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: The case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation*. 1998;97:381-390.

37. Bussolino F, DiRenzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell mobility and growth. *J Cell Biol.* 1992;119:629-641.
38. van Royen N, Hoefler I, Buschmann I, Kostin S, Voskuil M, Bode C, Schaper W, Piek JJ. Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovasc Res.* 2003;57:178-185.
39. van Royen N, Hoefler I, Buschmann I, Heil M, Kostin S, Deindl E, Vogel S, Korff T, Augustin H, Bode C, Piek JJ, Schaper W. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J.* 2002;16:432-434.
40. Buschmann IR, Hoefler IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis.* 2001;159:343-356.
41. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Roeckl W, Waltenberger J, Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor flt-1 mediates biological activities. Implication for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1996;271:17629-17634.
42. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995;146:1029-1039.
43. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997;18:4-25.
44. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996;87:1161-1169.
45. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000;407:242-248.
46. Sholley MM, Ferguson GP, Seibel HR, Montour JL, Wilson JD. Mechanisms for Neovascularization. Vascular Sprouting Can Occur without Proliferation of Endothelial Cells. *Lab Invest.* 1984;51:624-634.
47. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M. Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:13612-13617.
48. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the $\alpha_v\beta_3$ integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol.* 1996;149:293-305.
49. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, Plow EF. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell.* 2000;6:851-860.
50. Leung DW, Cachlanes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989;246:1306-1309.
51. Connolly DT, Hewelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest.* 1989;84:1470-1478.
52. Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 1989;8:3801-3806.

53. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985.
54. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 1992:521.
55. Drake CJ, Little CD. Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7657.
56. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996;380:435.
57. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea K, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380:439.
58. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Med*. 1995:1024.
59. Peters KG, deVries C, Williams T. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:8915-8919.
60. Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzendichler B, Kearney M, Couffinhal T, Isner JM. Reciprocal Relationship between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nature Med*. 1997;3:879-886.
61. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis: A single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *J Clin Invest*. 1994;93:662-670.
62. Pearlman JD, Hibberd MG, Chuang ML, Harada K, Lopez JF, Gladstone SR, et al. Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat Med*. 1995;1:1085-1089.
63. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*. 1994;89.
64. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis following arterial gene transfer of phVEGF₁₆₅ in patient with ischaemic limb. *Lancet*. 1996;348:370-374.
65. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med*. 1995;1:27-31.
66. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*. 1992:845.
67. Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 1993:5822.
68. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993;362:841-844.

69. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;92:67-9271.
70. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, Del Vecchio S, Lei KJ, Chou JY, Persico MG. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene*. 1993;8:925-931.
71. Hauser S, Weich HA. A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors*. 1993;9:259-268.
72. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial matrix and bioactivity of extracellular matrix bound-VEGF. *Mol Cell Biol*. 1993;13:17-1326.
73. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta Growth Factor: potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. 1994;269:25646-25654.
74. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi TM, Sullivan KA, Thomas KA. Purification and Characterization of a Naturally Occurring Vascular Endothelial Growth Factor . Placenta Growth Factor Heterodimer. *J Biol Chem*. 1995;270:7717-7723.
75. Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. In Vivo Angiogenic Activity and Hypoxia Induction of Heterodimers of Placenta Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor. *J Clin Invest*. 1996;98:2507-2511.
76. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang L-K, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Lik-Shing Tsagn M. Heterodimers of Placenta Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor. *J Biol Chem*. 1996;271:3154-3162.
77. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Science*. 1992;359:843-845.
78. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*. 1994;90:649-652.
79. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh S-M, Avraham H, Wood WI. Vascular endothelial growth factor-related protein: A ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor FLT4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:1988-1992.
80. Pajusola K, Aprelikova O, Pelicci G, Weich H, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Signaling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. *Oncogene*. 1994;3545-3555.
81. Couffinhal T, Kearney M, Witzensbichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, Symes J, Isner JM. Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) in Normal and Atherosclerotic Human Arteries. *Am J Pathol*. 1997;150:1673-1685.
82. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF- C transgenic mice. *Science*. 1997;276:1423-1425.
83. Leibovich SJ, Polverini PJ, Fong TW, Harlow LA, Koch AE. Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:4190-4194.
84. Asahara T, Bauters C, Wu T, Zheng LP, Symes J, Isner JM. Nitric oxide precursor augments angiogenesis and attenuates endothelial dysfunction in collateral circulation in rabbit ischemic hindlimb in vivo. *FASEB J*. 1996;10:A545.

85. Morbidelli L, Chang C-H, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol.* 1996;270:H411-H415.
86. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Granger HJ, Geppetti P, Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest.* 1994;94:2036-2044.
87. Hu J-S, Hastings GA, Cherry S, Gentz R, Ruben S, Coleman TA. A novel regulatory function of proteolytically cleaved VEGF-2 for vascular endothelial and smooth muscle cells. *FASEB J.* 1997;11:498-504.
88. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest.* 1973;52:2745-2756.
89. Schlingemann RO, Domgjan GM, Emeis JJ, Blok J, Warnaar SO, Ruiten DJ. Monoclonal antibody PAL-E specific for endothelium. *Lab Invest.* 1985;52:71-76.
90. Buttke TM, McCubrey JA, Owen TC. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J Immunol Meth.* 1993;157:233-240.
91. Falk W, Goodwin RHJ, Leonard EJ. A 48 well micro chemotaxis assembly for rapid and accurate measurement of leukocyte migration. *J Immunol Meth.* 1980;33:239-247.
92. Weyrich AS, Ma X-I, Buerke M, Murohara T, Armstead VE, Nicolas JM, Lefer AM, Thomas AP, Lefer DJ, Viinten-Johansen J. Physiological concentrations of nitric oxide do not elicit an acute negative inotropic effect in unstimulated cardiac muscle. *Circ Res.* 1994;75:692-700.
93. Miles AA, Miles EM. Vascular reactions to histamine, histamine liberators or leukotoxins in the skin of the guinea pig. *J Physiol.* 1952;118:228-257.
94. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
95. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
96. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KG, Ehrlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239:487-491.
97. Hewett PW, Murray JC. Coexpression of *flt-1*, *flt-4* and *KDR* in freshly isolated and cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com.* 1996;221:697-702.
98. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Physiologic assessment of augmented vascularity induced by vascular endothelial growth factor in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol.* 1994:H1263-H1271.
99. Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, Arekat Z, Graham AM, Lisbona R, Brassard R, Carpenter S, Symes JF. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit. *J Invest Surg.* 1994;7:49-60.
100. Walter DH, Hink U, Asahara T, Van Belle E, Horowitz J, Tsurumi Y, Vandlen R, Heinsohn H, Keyt B, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. The in vivo bioactivity of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is independent of N-linked glycosylation. *Lab Invest.* 1996;74:546-556.
101. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol.* 1993;265:H586-H592.
102. Doucette JW, Corl PD, Payne HM, Flynn AE, Goto M, Nassi M, Segal J. Validation of a Doppler wire for intravascular measurements of coronary artery flow velocity. *Circulation.* 1992;85:1899-1911.

103. Ziada AM, Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJ. The effect of long-term vasodilation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res.* 1984;18:724-732.
104. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, Isner JM. Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF) augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation.* 1997;95:1030-1037.
105. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VWM, Fang G-H, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92:3566-3570.
106. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinhal T, Asahara T, Bauters C, Symes JF, Ferrara N, Isner JM. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest.* 1996;75:487-502.
107. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang H-T, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest.* 1997;99:2625-2634.
108. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* 1998;101:2567-2578.
109. Murohata T, Horowitz J, Silver M, Tsurumi Y, Sullivan A, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation.* 1998;97:99-107.
110. Paavonen K, Horelli-Kuitunen N, Chilow D, Kukk E, Pennanen S, Kallioniemi O-P, Pajusola K, Olofsson B, Eriksson U, Joukov V, Palotie A, Alitalo K. Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. *Circulation.* 1996;93:1079-1082.
111. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF₁₆₅ following intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation.* 1998;97:1114-1123.
112. Takeshita S, Weir L, Chen D, Zheng LP, Riessen R, Bauters C, Symes JF, Ferrara N, Isner JM. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochemical and Biophysical Res Communications.* 1997.
113. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGF-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development.* 1996;122:3829-3837.
114. Brogi E, Schattmann G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B, Isner JM. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest.* 1996;97:469-476.
115. Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation.* 1996;94:1647-1654.
116. Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takeshita S, Lowry J, Rosenfield K, Weir L, Brogi E, Juraj D. Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Human Gene Therapy.* 1996;7:959-988.
117. Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:217-239.
118. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407:249-257.
119. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386:671-674.

120. Lopez JJ, Edelman ER, Stamler A, Hibberd MG, Prasad P, Thomas KA, DiSalvo J, Caputo RP, Carrozza JP, Douglas PS, Selke FW, Simons M. Angiogenic potential of perivascularly delivered aFGF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol.* 1998;274:H930-H936.
121. Harada K, Grossman W, Friedman M, Edelman ER, Prasad PV, Keighley CS, Manning WJ, Sellke FW, Simons M. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine heart. *J Clin Invest.* 1994;94:623-630.
122. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam S, Hunsberger S, Robinson WGJ, Stiber JA, Correa R, Epstein SE. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation.* 1995;91:145-153.
123. Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M, Correa R, Klingbeil C, Epstein SE. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol.* 1994;266:H1588-H1595.
124. Spirito P, Fu Y-M, Zu ZX, Epstein SE, Casscells W. Immunohistochemical localization of basic and acidic fibroblast growth factors in the developing rat heart. *Circulation.* 1991;84:322-332.
125. Engelmann GL, Dionne CA, Jaye MC. Acidic fibroblast growth factor and heart development. Role in myocyte proliferation and capillary angiogenesis. *Circ Res.* 1993;72:7-19.
126. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999;103:1231-1236.
127. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* 1999;5:1359-1364.
128. Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular diseases. *Science.* 1996;272:689-693.
129. Finkel T, Epstein SE. Gene therapy for vascular disease. *FASEB J.* 1995;9:843-851.
130. Ylä-Herttuala S, Martin JF. Cardiovascular gene therapy. *Lancet.* 2000;355:213-222.
131. Soubrier F, Cameron B, Manse B, Somarriba S, Dubertret C, Jaslin G, Jung G, Le Caer C, Dang D, Mouvault JM, Scherman D, Mayaux JF, Crouzet J. pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Therapy.* 1999;6:1482-1488.
132. Laitinen M, Makinen K, Manninen H, Matsi P, Kossila M, Agrawal RW, Pakkanen T, Luoma JS, Viita H, Hartikainen J, Alhava E, Laakso M, Ylä-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer to lower limb artery of patients with chronic critical leg ischemia. *Human Gene Therapy.* 1998;9:1481-1486.
133. Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation.* 1998;98:2800-2804.
134. Tsurumi Z, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, Horowitz JR, Symes JF, Isner JM. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation.* 1996;94:3281-3290.
135. Jaye M, Howk R, Burgess W, Ricca GA, Chiu I-M, Ravera MW, O'Brien SJ, Modi WS, Maciag T, Drohan WN. Human endothelial cell growth factor: Cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization. *Science.* 1986;233:541-545.
136. Burgess WH, Mehlman T, Marshak DR, Fraser BA, Maciag T. Structural evidence that endothelial cell growth factor β is the precursor of both endothelial cell growth factor α and acidic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:7216-7220.

137. Jouanneau J, Gavrilovic J, Caruelle D, Jaye M, Moens G, Caruelle J-P, Thiery J-P. Secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor produced by transfected epithelial cells influence cell morphology, motility and invasive potential. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:2893-2897.
138. Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA. Direct gene transfer into skeletal muscle *in vivo*: Factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Human Gene Therapy*. 1993;4:151-159.
139. Couffinhal T, Kearney M, Sullivan A, Silver M, Tsurumi Y, Isner JM. Histochemical staining following LacZ gene transfer underestimates transfection efficiency. *Human Gene Therapy*. 1997;8:929-934.
140. Leclerc G, Gal D, Takeshita S, Nikol S, Weir L, Isner JM. Percutaneous arterial gene transfer in a rabbit model: efficiency in normal and balloon-dilated atherosclerotic arteries. *J Clin Invest*. 1992;1992:936-944.
141. Hartikka J, Sawdey M, Cornefert-Jensen F, Margalith M, Barnhart K, Nolasco M, Vahlsing HL, Meek J, Marquet M, Hobart P, Norman J, Manthorpe M. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle. *Human Gene Therapy*. 1996;7:1205-1217.
142. Miller G, Steinbrecher RA, Murdock PJ, Tuddenham EGD, Lee CA, Pasi KJ, Goldspink G. Expression of factor VII by muscle cells *in vitro* and *in vivo* following direct gene transfer: modelling gene therapy for haemophilia. *Gene Therapy*. 1995;2:736-742.
143. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*. 1997;273:H1255-H1265.
144. Muehlhauser J, Pili R, Merrill MJ, Maeda H, Passaniti A, Crystal RG, Capogrossi MC. *In vivo* angiogenesis induced by recombinant adenovirus vectors coding either for secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor. *Human Gene Therapy*. 1995;6:1457-1465.
145. Landgren E, Eriksson A, Wennstroem S, Kanda S, Claesson-Welsh L. Induction of fibroblast growth factor receptor-1 mRNA and protein by platelet-derived growth factor BB. *Exp Cell Res*. 1996;223:405-411.
146. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*. 1990;247:1465-1468.
147. Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*. 1992;1:363-369.
148. Tabata H, Silver M, Isner JM. Arterial gene transfer of acidic fibroblast growth factor for therapeutic angiogenesis *in vivo*: critical role of secretion signal in use of naked DNA. *Cardiovasc Res*. 1997;35:470-479.
149. Mignatti P, Rifkin DB. Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: A trivial phenomenon or a novel secretion mechanism? *J Cell Biochem*. 1991;47:201-207.
150. Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-golgi complex. *J Cell Physiol*. 1992;151:81-93.
151. Neufeld G, Gospodarowicz D. Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *J Biol Chem*. 1986;261:5631-5637.
152. Hariawala M, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Chaudhry GM, Desai V, Keyt V, Isner JM, Symes JF. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res*. 1996;63:77-82.

153. Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A, Pearlman JD, Bunting S, Kaplan A, Carrozza JP, Sellke FW, Simons M. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res.* 1998;40:272-281.
154. Losordo DW, Vale PR, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am Heart J.* 1999;138:S132-S141.
155. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Esakof DD, Isner JM. Percutaneous Myocardial Gene Transfer of phVEGF-2. *Circulation.* 1999;100:2462-2463.
156. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Scki T, Shimonishi A, Suimura A, Tashiro K, Schimizu S. Modular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature.* 1989;342:440-443.
157. Gherardi E, Stoker M. Hepatocyte growth factor-scatter factor: mitogen, motogen and met. *Cancer Cell.* 1991;3:227-232.
158. Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol.* 1993;123:223-235.
159. Jennische E, Ekberg S, Matejka GI. Expression of hepatocyte growth factor in growing and regenerating rat skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1993;265:C122-C128.
160. Igawa T, Matsumoto K, Saito Y, Nakamura T. Hepatocyte growth factor may act as a renotropic factor for regeneration in rats with acute renal injury. *Am J Physiol.* 1993;265:F61-F69.
161. Grant SD, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nicholoff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:1937-1941.
162. Morimoto A, Okamura K, Hamanaka R, Sato Y, Shima N, Higashio K, Kuwano M. Hepatocyte growth factor modulates migration and proliferation of human microvascular endothelial cells in culture. *Biochem Biophys Res Com.* 1991;179:1042-1049.
163. Sato Y, Okamura K, Morimoto A, Hanamaka R, Hamanaguchi K, Shimado T, Ono M, Kohno K, Sakata T, Kuwano M. Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependent tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro. *Exp Cell Res.* 1993;204:223-229.
164. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation.* 1997;95:2552-2558.
165. Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R. Biphasic effect of transforming growth factor- β 1 on in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res.* 1993;204:356-363.
166. Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, Kida I, Aoki M, Moriguchi A, Yamada K, Hayashi S, Yo Y, Matsumoto K, Nakamura T, Ogihara T. Expression of local hepatocyte growth factor system in vascular tissues. *Biochem Biophys Res Com.* 1995;215:483-488.
167. Naka D, Ishii T, Yoshiyama Y, Miyazawa K, Hara H, Hishida T, Kidamura N. Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J Biol Chem.* 1992;267:20114-20119.
168. Zioncheck TF, Richardson L, Liu J, Chang L, King KL, Bennett GL, Fugedi P, Chamow SM, Schwall RH, Stack RH. Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J Biol Chem.* 1995;270:16871-16878.
169. Ferrara N, Leung DW, Cachianes G, Winer J, Henzel WJ. Purification and cloning of vascular endothelial growth factor secreted by pituitary folliculostellate cells. *Methods Enzymol.* 1991;198:391-404.

170. Pickering JG, Weir L, Rosenfield K, Stetz J, Jekanowski J, Isner JM. Smooth muscle cell outgrowth from human atherosclerotic plaque: implications for the assessment of lesion biology. *J Am Coll Cardiol*. 1992;20:1430-1439.
171. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1991;266:11947-11954.
172. Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:9717-9721.
173. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
174. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Site-specific therapeutic angiogenesis following systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg*. 1995;21:314-325.
175. Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Paffhausen W, Gross R, Heusch G. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation*. 1991;83:974-982.
176. Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W. The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol*. 1993;121:145-154.
177. Silvagno F, Follenzi A, Arese M, Prat M, Giraudo E, Gaudino G, Camussi G, Comoglio PM, Bussolino F. In vivo activation of met tyrosine kinase by heterodimeric hepatocyte growth factor molecule promotes angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1857-1865.
178. Webber EM, Godowski PJ, Fausto N. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology*. 1994;14:489-497.
179. Fujiwara K, Nagoshi S, Ohno A, Hirata K, Ohta Y, Mochida S, Tomiya T, Highashio K, Kurokawa K. Stimulation of liver growth by exogenous human hepatocyte growth factor in normal and partially hepatectomized rats. *Hepatology*. 1993;18:1443-1449.
180. Roos F, Ryan AM, Chamow SM, Bennett GL, Schwall RH. Induction of liver growth in normal mice by infusion of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Am J Physiol*. 1995;268:G380-G386.
181. Hayashi S, Morishita R, Higaki J, Aoki M, Moriguchi A, Kida I, Yoshiki S, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Autocrine-paracrine effects of overexpression of hepatocyte growth factor gene on growth of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com*. 1996;220:539-545.
182. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61:203-212.
183. Schlessinger J, Ullrich A. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*. 1992;9:383-391.
184. Marschall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 1995;80:179-185.
185. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J*. 1995;9:926-933.
186. Mustonen T, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol*. 1995;129:895-898.
187. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995;376:66-70.

188. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu CF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376:62-66.
189. Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL. *tie-1* and *tie-2* define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:9355-9358.
190. Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD, Gao G. Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. *Oncogene*. 1993;8:1631-1637.
191. Dumont DJ, Fong G-H, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of *flk-1*, *tek*, *tie*, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn*. 1995;203:80-92.
192. Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. *tek*, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene*. 1992;7:1471-1480.
193. Schnurch H, Risau W. Expression of *tie-2*, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development*. 1993;119:957-968.
194. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fuhiiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 1995;376:70-74.
195. Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J*. 1995;14:5884-5891.
196. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong G-H, Puri MC, Gerstenstein M, Auerbach A, Breitman ML. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, *tek*, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev*. 1994;8:1897-1909.
197. Vikkula M, Boon LM, Carraway III KL, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, Pasyk KA, Marchuk DA, Warman ML, Cantley LC, Mulliken JB, Olsen BR. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell*. 1996;87:1181-1190.
198. Maisonpierre PC, Suri S, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277:55-60.
199. Mader SL. Influence of animal age on the β -adrenergic system in cultured rat aortic and mesenteric artery smooth muscle cells. *J Gerontol Biol Sci*. 1992;47:B32-36.
200. Grotendorst CR, Chang T, Seppa HEJ, Kleinman HK, Martin GR. Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 1982;113:261-266.
201. Glass DJ, Nye SH, Hantzopoulos P, Macchi MJ, Squinto SP, Goldfarb M, Yancopoulos GD. TrkB mediates BDNF/NT-3-dependent survival and proliferation in fibroblasts lacking the low affinity NGF receptor. *Cell*. 1991;66:405-413.
202. Wong AL, Haroon ZA, Werner S, Dewhirst MW, Greenberg CS, Peters KG. Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res*. 1997;81:567-574.
203. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*. 1995;270:13333-13340.
204. Enholm B, Paavonen K, Ristimaeki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U, Alitalo K. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*. 1997;14:2475-2483.

205. Kaipainen, A., Vlaykova T, Hatva E, Boehling T, Jekunen A, Pyrhoenen S, Alitalo K. Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase messenger RNA in the vascular endothelium of metastatic melanomas. *Cancer Res.* 1994;54:6571-6577.
206. Korhonen J, Partanen J, Armstrong E, Vaahtokari A, Elenius K, Jalkanen M, Alitalo K. Enhanced expression of the tie receptor tyrosine kinase in endothelial cells during neovascularization. *Blood.* 1992;80:2548-2555.
207. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem.* 1996;271:603-606.
208. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* 1997;277:48-50.
209. Eliceiri BP. Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res.* 2001;89:1104-1110.
210. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69:11-24.
211. Serini G, Valdembri D, Bussolino F. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp Cell Res.* 2006;312:651-658.
212. Clark RAF, Tonnesen MG, Gailit J, Cheresch DA. Transient functional expression of $\alpha_v\beta_3$ on vascular cells during wound repair. *Am J Pathol.* 1996;148:1407-1421.
213. Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, Taverna D, Robinson SD, Huang X, Sheppard D, Hynes RO, Hodivala-Dilke KM. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β_3 integrin or β_3 and β_5 integrins. *Nat Med.* 2002;8:27-34.
214. Carmeliet P. Integrin indecision. *Nat Med.* 2002;8:14-16.
215. Sepp NT, Li LJ, Lee KH, Brown EJ, Caughman SW, Lawley TJ, Swerlick RA. Basic fibroblast growth factor increases expression of the $\alpha_v\beta_3$ integrin complex on human microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol.* 1994;103:295-299.
216. Cowden Dahl KD, Robertson SE, Weaver VM, Simon MC. Hypoxia-inducible factor regulates alphavbeta3 integrin cell surface expression. *Mol Biol Cell.* 2005;16:1901-1912.
217. Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Ando M, Bertotti A, Comoglio PM, Boccaccio C. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. *FASEB J.* 2000;14:1629-1640.
218. Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, Mrksich M, Morla AO. Direct Cell Adhesion to the Angiopoietins Mediated by Integrins. *J Biol Chem.* 2001;276:26516-26525.
219. Cascone I, Napione L, Maniero F, Serini G, Bussolino F. Stable interaction between alpha5beta1 integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *J Cell Biol.* 2005;170:993-1004.
220. Dallabrida SM, Ismail N, Oberle JR, Himes BE, Rupnick MA. Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins. *Circ Res.* 2005;96:e8-24.
221. Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture. *J Cell Biol.* 1974;60:673-684.
222. Witzensbichler B, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic Properties of Angiopoietin-1 and -2, Ligands for the Endothelial-Specific Receptor Tyrosine Kinase Tie2. *J Biol Chem.* 1998;273:18514-18521.
223. McHugh KP, Kitazawa S, Teitelbaum SL, Ross FP. Cloning and characterization of the murine beta(3) integrin gene promoter: identification of an interleukin-4 responsive element and regulation by STAT-6. *J Cell Biochem.* 2001;81:320-332.
224. Feng X, Teitelbaum SL, Quiroz ME, Towler DA, Ross FP. Cloning of the murine beta5 integrin subunit promoter. Identification of a novel sequence mediating granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor-dependent repression of beta5 integrin gene transcription. *J Biol Chem.* 1999;274:1366-1374.
225. Henthorn P, Zervos P, Raducha M, Harris H, Kadesch T. Expression of a human placental alkaline phosphatase gene in transfected cells: use as a reporter for studies of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:6342-6346.
 226. Becker TC, Noel RJ, Coats WS, Gomez-Foix AM, Alam T, Gerard RD, Newgard CB. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol.* 1994;43:161-189.
 227. Witzenbichler B, Kureishi Y, Luo Z, Le Roux A, Branellec D, Walsh K. Regulation of smooth muscle cell migration and integrin expression by the Gax transcription factor. *J Clin Invest.* 1999;104:1469-1480.
 228. Harfouche R, Hassessian HM, Guo Y, Faivre V, Srikant CB, Yancopoulos GD, Hussain SNA. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of Angiopoietin-1 on endothelial cells. *Microvascular Research.* 2002;64:135-147.
 229. Fujikawa K, Scherpenseel IA, Jain SK, Presman E, Varticovski L. Role of PI 3-kinase in Angiopoietin-1-mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1999;253:663-672.
 230. Zhu HJ, Ross FP, Cao X, Teitelbaum SL. Phorbol myristate acetate transactivates the avian beta 3 integrin gene and induces alpha v beta 3 integrin expression. *J Cell Biochem.* 1996;61:420-429.
 231. Villa-Garcia M, Li L, Riely G, Bray PF. Isolation and characterization of a TATA-less promoter for the human beta 3 integrin gene. *Blood.* 1994;83:668-676.
 232. Witzenbichler B, Westermann D, Knueppel S, Schultheiss HP, Tschöpe C. Protective role of angiopoietin-1 in endotoxic shock. *Circulation.* 2005;111:97-105.
 233. Bader BL, Rayburn H, Crowley D, Hynes RO. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell.* 1998;95:507-519.
 234. Walton HL, Corjay MH, Mohamed SN, Mousa SA, Santomena LD, Reilly TM. Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(vbeta3) and alpha(vbeta5) in cultured human endothelial cells. *J Cell Biochem.* 2000;78:674-680.
 235. Hoshiga M, Alpers CE, Smith LL, Giachelli CM, Schwartz SM. Alpha-v beta-3 integrin expression in normal and atherosclerotic artery. *Circ Res.* 1995;77:1129-1135.
 236. Rupp PA, Little CD. Integrins in vascular development. *Circ Res.* 2001;89:566-572.
 237. Hughes DP, Marron MB, Brindle NP. The antiinflammatory endothelial tyrosine kinase Tie2 interacts with a novel nuclear factor-kappaB inhibitor ABIN-2. *Circ Res.* 2003;92:630-636.
 238. Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res.* 2001;89:477-479.
 239. Kim I, Oh J-L, Ryu YS, So J-N, Sessa WC, Walsh K, Koh GY. Angiopoietin-1 negatively regulates expression and activity of tissue factor in endothelial cells. *FASEB J.* 2002;16:126-128.
 240. Bates DO, Lodwick D, Williams B. Vascular endothelial growth factor and microvascular permeability. *Microcirculation.* 1999;6:83-96.
 241. Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, Takagi H, Newsome WP, Jirousek MR, King GL. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest.* 1996;98:2018-2026.

242. Wang Y, Pampou S, Fujikawa K, Varticovski L. Opposing effect of angiopoietin-1 on VEGF-mediated disruption of endothelial cell-cell interactions requires activation of PKC beta. *J Cell Physiol.* 2004;198:53-61.
243. Weber CC, Cai H, Ehrbar M, Kubota H, Martiny-Baron G, Weber W, Djonov V, Weber E, Mallik AS, Fussenegger M, Frei K, Hubbell JA, Zisch AH. Effects of protein and gene transfer of the angiopoietin-1 fibrinogen-like receptor-binding domain on endothelial and vessel organization. *J Biol Chem.* 2005;280:22445-22453.
244. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 1999;13:1055-1066.
245. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet.* 1991;338:732-736.
246. Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol.* 1997;66:101-195.
247. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003;348:138-150.
248. Patel GP, Gurka DP, Balk RA. New treatment strategies for severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care.* 2003;9:390-396.
249. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29:1303-1310.
250. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344:699-709.
251. Eichacker PQ, Parent C, Kalil A, Esposito C, Cui X, Banks SM, Gerstenberger EP, Fitz Y, Danner RL, Natanson C. Risk and the efficacy of antiinflammatory agents: retrospective and confirmatory studies of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:1197-1205.
252. Vincent JL, Sun Q, Dubois MJ. Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin Infect Dis.* 2002;34:1084-1093.
253. Opal SM, Gluck T. Endotoxin as a drug target. *Crit Care Med.* 2003;31:S57-64.
254. Sharma VK, Dellinger RP. Recent developments in the treatment of sepsis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2003;12:139-152.
255. Gutierrez-Ramos JC, Bluethmann H. Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol Today.* 1997;18:329-334.
256. He T-C, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:2509-2514.
257. Nyberg-Hoffman C, Aguilar-Cordova E. Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat Med.* 1999;5:955-957.
258. Georgakopoulos D, Mitzner WA, Chen CH, Byrne BJ, Millar HD, Hare JM, Kass DA. In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *Am J Physiol.* 1998;274:H1416-1422.
259. Feldman MD, Erikson JM, Mao Y, Korcarz CE, Lang RM, Freeman GL. Validation of a mouse conductance system to determine LV volume: comparison to echocardiography and crystals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H1698-1707.
260. Steendijk P, Baan J. Comparison of intravenous and pulmonary artery injections of hypertonic saline for the assessment of conductance catheter parallel conductance. *Cardiovasc Res.* 2000;46:82-89.

261. Yamashita T, Kawashima S, Ohashi Y, Ozaki M, Ueyama T, Ishida T, Inoue N, Hirata K, Akita H, Yokoyama M. Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2000;101:931-937.
262. Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol*. 1985;59:1978-1985.
263. Pearce ML, Yamashita J, Beazell J. Measurement of pulmonary edema. *Circ Res*. 1965;16:482-488.
264. Herz J, Gerard RD. Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:2812-2816.
265. Willnow TE, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science*. 1994;264:1471-1474.
266. Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC, Woo SL. Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14804-14808.
267. Zhang ZG, Zhang L, Croll SD, Chopp M. Angiopoietin-1 reduces cerebral blood vessel leakage and ischemic lesion volume after focal cerebral embolic ischemia in mice. *Neuroscience*. 2002;113:683-687.
268. Zhou MY, Lo SK, Bergenfeldt M, Tirupathi C, Jaffe A, Xu N, Malik AB. In vivo expression of neutrophil inhibitory factor via gene transfer prevents lipopolysaccharide-induced lung neutrophil infiltration and injury by a beta2 integrin-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 1998;101:2427-2437.
269. Joussen AM, Poulaki V, Tsujikawa A, Qin W, Qaum T, Xu Q, Moromizato Y, Bursell SE, Wiegand SJ, Rudge J, Ioffe E, Yancopoulos GD, Adamis AP. Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1. *Am J Pathol*. 2002;160:1683-1693.
270. Horgan MJ, Palace GP, Everitt JE, Malik AB. TNF-alpha release in endotoxemia contributes to neutrophil-dependent pulmonary edema. *Am J Physiol*. 1993;264:H1161-1165.
271. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Zhang Q, Jones N, Dumont DJ, Stewart DJ. Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am J Pathol*. 2003;162:1927-1936.
272. Kwak HJ, So J-N, Lee SJ, Kim I, Koh GY. Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Letters*. 1999;448:249-253.
273. Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res*. 2000;86:24-29.
274. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F, Altieri DC, Sessa WC. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem*. 2000;275:9102-9105.
275. Joshi VD, Kalvakolanu DV, Cross AS. Simultaneous activation of apoptosis and inflammation in pathogenesis of septic shock: a hypothesis. *FEBS Lett*. 2003;555:180-184.
276. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*. 1999;27:1230-1251.
277. Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. Basic fibroblast growth factor selectively enhances TNF-alpha-induced apoptotic cell death in glomerular endothelial cells: effects on apoptotic signaling pathways. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:2199-2211.

278. Messmer UK, Briner VA, Pfeilschifter J. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* 1999;55:2322-2337.
279. McDonald TE, Grinman MN, Carthy CM, Walley KR. Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H2053-2061.
280. Hotchkiss RS, Karl IE. Endothelial cell apoptosis in sepsis: a case of habeas corpus? *Crit Care Med.* 2004;32:901-902.
281. Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, Edwards CK, 3rd, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med.* 1997;186:1831-1841.
282. Veres B, Gallyas F, Jr., Varbiro G, Berente Z, Osz E, Szekeres G, Szabo C, Sumegi B. Decrease of the inflammatory response and induction of the Akt/protein kinase B pathway by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 inhibitor in endotoxin-induced septic shock. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:1373-1382.
283. Goldfarb RD, Marton A, Szabo E, Virag L, Salzman AL, Glock D, Akhter I, McCarthy R, Parrillo JE, Szabo C. Protective effect of a novel, potent inhibitor of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase in a porcine model of severe bacterial sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30:974-980.
284. Soriano FG, Liaudet L, Szabo E, Virag L, Mabley JG, Pacher P, Szabo C. Resistance to acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase-1-deficient mice. *Shock.* 2002;17:286-292.
285. Isner JM. Tissue responses to ischemia: local and remote responses for preserving perfusion of ischemic muscle. *J Clin Invest.* 2000;106:615-619.
286. Ylä-Herttua S, Alitalo K. Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med.* 2003;9:694-701.
287. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation.* 1998;97:645-650.
288. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg.* 1998;28:964-973; discussion 973-965.
289. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation.* 1999;100:468-474.
290. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Kligfield PD, Okin PM, Hackett NR, Isom OW, Crystal RG. Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA. *Ann Surg.* 1999;230:466-470; discussion 470-462.
291. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, Isner JM. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg.* 1999;68:830-836; discussion 836-837.

292. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, Isner JM. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2000;102:965-974.
293. Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, Eranen J, Kiviniemi M, Narvanen O, Makinen K, Manninen H, Syvanne M, Martin JF, Laakso M, Yla-Herttuala S. Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum Gene Ther*. 2000;11:263-270.
294. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, McDonald MC, Gravelin LM, Curry CM, Esakof DD, Maysky M, Symes JF, Isner JM. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103:2138-2143.
295. Rajagopalan S, Shah M, Luciano A, Crystal R, Nabel EG. Adenovirus-mediated gene transfer of VEGF(121) improves lower-extremity endothelial function and flow reserve. *Circulation*. 2001;104:753-755.
296. Rajagopalan S, Trachtenberg J, Mohler E, Olin J, McBride S, Pak R, Rasmussen H, Crystal R. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the vascular endothelial growth factor cDNA (CI-1023) to patients with claudication. *Am J Cardiol*. 2002;90:512-516.
297. Sarkar N, Ruck A, Kallner G, S YH, Blomberg P, Islam KB, van der Linden J, Lindblom D, Nygren AT, Lind B, Brodin LA, Drvota V, Sylven C. Effects of intramyocardial injection of phVEGF-A165 as sole therapy in patients with refractory coronary artery disease--12-month follow-up: angiogenic gene therapy. *J Intern Med*. 2001;250:373-381.
298. Comerota AJ, Throm RC, Miller KA, Henry T, Chronos N, Laird J, Sequeira R, Kent CK, Bacchetta M, Goldman C, Salenius JP, Schmieder FA, Pilsudski R. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg*. 2002;35:930-936.
299. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, Milliken CE, Fortuin FD, Cummings N, Schatz RA, Asahara T, Isner JM, Kuntz RE. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2002;105:2012-2018.
300. Shyu KG, Chang H, Wang BW, Kuan P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am J Med*. 2003;114:85-92.
301. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE, Rosengart TK. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*. 2000;102:E73-86.
302. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*. 2003;107:1359-1365.
303. Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation*. 2002;105:788-793.
304. Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermler JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*. 2002;359:2053-2058.

305. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*. 2001;104:2012-2017.
306. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*. 2002;105:1291-1297.
307. Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, Yla-Herttuala S. Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther*. 2002;6:127-133.
308. Rajagopalan S, Mohler E, 3rd, Lederman RJ, Saucedo J, Mendelsohn FO, Olin J, Blebea J, Goldman C, Trachtenberg JD, Pressler M, Rasmussen H, Annex BH, Hirsch AT. Regional Angiogenesis with Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in peripheral arterial disease: Design of the RAVE trial. *Am Heart J*. 2003;145:1114-1118.
309. Rajagopalan S, Mohler ER, 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS, Annex BH. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*. 2003;108:1933-1938.
310. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M, Stjernvall J, Hedman A, Kivela A, Vanninen E, Mussalo H, Kauppila E, Simula S, Narvanen O, Rantala A, Peuhkurinen K, Nieminen MS, Laakso M, Yla-Herttuala S. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation*. 2003;107:2677-2683.
311. Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation*. 2003;108:2613-2618.
312. Marshall E. Gene therapy. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science*. 2003;299:320.
313. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature*. 1999;401:517-518.
314. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Esakof DD, Isner JM. Images in Cardiovascular Medicine: Percutaneous myocardial gene transfer of phVEGF-2. *Circulation*. 1999;100:2462-2463.
315. Vale PR, Losordo DW, Tkebuchava T, Chen D, Milliken CE, Isner JM. Catheter-based myocardial gene transfer utilizing nonfluoroscopic electromechanical left ventricular mapping. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:246-254.
316. Kornowski R, Leon MB, Fuchs S, Vodovotz Y, Flynn MA, Gordon DA, Pierre A, Kovesdi I, Keiser JA, Epstein SE. Electromagnetic guidance for catheter-based transendocardial injection: a platform for intramyocardial angiogenesis therapy. Results in normal and ischemic porcine models. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:1031-1039.
317. Kornowski R, Hong MK, Gepstein L, Goldstein S, Ellahham S, Ben-Haim SA, Leon MB. Preliminary animal and clinical experiences using an electromechanical endocardial mapping procedure to distinguish infarcted from healthy myocardium. *Circulation*. 1998;98:1116-1124.
318. Fortuin FD, Vale P, Losordo DW, Symes J, DeLaria GA, Tyner JJ, Schaer GL, March R, Snell RJ, Henry TD, Van Camp J, Lopez JJ, Richenbacher W, Isner JM, Schatz RA. One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol*. 2003;92:436-439.

319. Arsic N, Zentilin L, Zacchigna S, Santoro D, Stanta G, Salvi A, Sinagra G, Giacca M. Induction of functional neovascularization by combined VEGF and angiopoietin-1 gene transfer using AAV vectors. *Mol Ther.* 2003;7:450-459.
320. Chae JK, Kim I, Lim ST, Chung MJ, Kim WH, Kim HG, Ko JK, Koh GY. Coadministration of Angiopoietin-1 and Vascular Endothelial Groth Factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2573-2578.
321. Gilroy DW, Vallance P. Resolution for sepsis? *Circulation.* 2005;111:2-4.

11. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. H.-P. Schultheiß für die Gewährleistung der wissenschaftlichen Freiräume, die für die Durchführung dieser Arbeit erforderlich waren.

Daneben bedanke ich mich bei Frau S. Knüppel für die akribische Durchführung zahlreicher molekularbiologischer und immunhistologischer Experimente.

Mein Andenken gilt ferner Herrn Prof. Dr. J. Isner, in dessen Forschungslabor in Boston ich von 1995-1998 als Post-Doc arbeiten konnte und der leider 2001 unerwartet verstorben ist.

12.

Eidesstattliche Erklärung

§4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift