

**Die Rolle von Plasmin in der Regulation der VEGF
Aktivität während der Wundheilung:
Untersuchungen im db/db Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Detlev Roth

aus Hermannstadt

Hundt Druck GmbH, Köln

2005

Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Leptin
Prof. Dr. T. Krieg

Tag der mündlichen Prüfung:

03.02.2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Regeneration und Reparatur von Geweben	1
1.2. Aufbau und Struktur der Haut	3
1.3. Phasen der kutanen Wundheilung	5
1.3.1. Hämostase	5
1.3.2. Entzündungsphase	6
1.3.3. Proliferationsphase	7
1.3.4. Narbenumbau	8
1.4. Die Regulation der Angiogenese in der kutanen Wundheilung	9
1.5. VEGF	12
1.5.1. Die Rolle von VEGF in der Angiogenese	12
1.5.2. Die Rolle von VEGF in der Wundheilung	15
1.5.3. VEGF Rezeptoren	17
1.6. Störungen der Wundheilung	20
1.7. Das db/db Mausmodell	21
1.7.1. Die db/db Maus	21
1.7.2. Leptin und seine Rezeptoren	22
1.7.3. Ursachen für Wundheilungsstörungen in der db/db Maus	25
1.7.4. Die Rolle von VEGF in der db/db Maus	26
1.8. Fragestellung	28

2. Material und Methoden

2.1. Material	
2.1.1. Geräte	29
2.1.2. Materialien	
2.1.2.1. Zellkulturmaterial, Medien und Zusätze	30
2.1.2.2. Chemikalien und Reagenzien	30
2.1.3. Biologisches Material	32
2.1.3.1. Eukaryotische Zellen	32
2.1.3.2. Bakterienstämme	32
2.1.3.3. Vektoren	32
2.1.3.4. Mäuse	33
2.1.3.5. Antikörper	33
2.2. Methoden	
2.2.1. Zellkultur	
2.2.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen	34
2.2.1.2. Kultivierung der COS-1 Zelllinie	34
2.2.2. Biochemische Methoden	35

2.2.2.1. Proteinbestimmung	35
2.2.2.2. Western Blot	36
2.2.2.2.1. SDS-Elektrophorese	36
2.2.2.2.2. Proteintransfer auf Cellulosemembran	37
2.2.2.2.3. Immunoblotting	39
2.2.2.3. Immunhistochemie	40
2.2.2.4. TUNEL Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von Apoptose	41
2.2.2.5. Semiquantitative Analyse der histologischen Untersuchungen	42
2.2.2.6. β -Galactosidase Färbung	44
2.2.2.7. Herstellung von Gewebelysaten	44
2.2.2.8. Bestimmung der Plasminaktivität in Gewebelysaten	45
2.2.2.9. Herstellung von rekombinantem Protein	45
2.2.2.9.1. Transfektion von COS-1 Zellen mit VEGF-Expressions-Konstrukten	45
2.2.2.9.2. VEGF-Protein Aufreinigung und Entsalzung	46
2.2.2.10. VEGF-Elisa	46
2.2.2.11. Charakterisierung der Stabilität von rekombinantem VEGF ₁₆₅ Protein in murinen Wundlysaten	47
2.2.3. Molekularbiologische Methoden	47
2.2.3.1. Herstellung kompetenter Bakterien	47
2.2.3.2. Transformation	48
2.2.3.3. Bakterienkulturen für Plasmidisolierung	48
2.2.3.4. Isolation von Nukleinsäuren	48
2.2.3.4.1. Isolation von Plasmid-DNA aus E. coli	48
2.2.3.4.2. Plasmidpräparation in größerem Maßstab	49
2.2.3.4.3. Gesamt-RNA-Isolierung aus Maushaut	50
2.2.3.5. Spektrometrische Bestimmung der RNA oder DNA Menge	50
2.2.3.6. Restriktionsspaltung von DNA	51
2.2.3.7. Auftrennung von DNA auf Agarosegelen	51
2.2.3.8. Nukleinsäuretransfer auf Cellulosemembran	52
2.2.3.9. Radioaktive Markierung von DNA	52
2.2.3.10. Hybridisierung mit DNA-Sonden	52
2.2.3.11. Reverse Transkription von mRNA zu cDNA	53
2.2.3.12. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
2.2.4. Mausexperimente	56
2.2.4.1. Mauszucht	56
2.2.4.2. Genotypisierung der Mäuse	56
2.2.4.3. Kutaner Gentransfer mittels Partikelbombardment	58
2.2.4.3.1. Herstellung beschichteter Teflon-Schlauchstücke für Partikelbombardment	58
2.2.4.3.2. Kutaner <i>in vivo</i> Gentransfer in der Maus	59
2.2.4.4. Wundsetzung	60
2.2.4.5. Planimetrie der Wunden	61
2.2.4.6. Quantifizierung der Granulationsgewebsbildung	61

2.2.4.6. Bestimmung der Reepithelialisierung	61
2.2.5. Berechnung der statistischen Signifikanz	62
3. Ergebnisse	
3.1. db/db Mausmodell: Zucht und Typisierung	63
3.2. Charakterisierung des db/db Mausmodells: Blutzucker und Körpergewicht	64
3.3. Ermittlung optimaler Transfektionsbedingungen mittels Partikelbombardment im Mausmodell	65
3.4. Bestimmung der Expressionsdauer nach Partikelbombardment	67
3.5. Wundheilungsuntersuchungen nach VEGF ₁₆₅ -Behandlung	68
3.5.1. Wundschlussuntersuchungen nach VEGF ₁₆₅ -Behandlung	68
3.5.2. Quantifizierung der Reepithelialisierung der Wunden	71
3.5.3. Quantifizierung der Granulationsgewebsbildung in den Wunden	72
3.6. Charakterisierung der Angiogenese in den VEGF ₁₆₅ behandelten Wunden	74
3.6.1. Färbungen für den Endothelzellmarker PECAM-1	74
3.6.2. Färbungen für den Endothelzellmarker VEGFR-2	80
3.7. Untersuchung der Plasminaktivität im Wundgewebe von db/db Mäusen	84
3.8. Proteinaufreinigung von VEGF ₁₆₅ -Wildtyp und VEGF ₁₆₅ -Mutante mittels Heparin-Sepharose	86
3.9. Untersuchung der Stabilität von VEGF ₁₆₅ -Wildtyp und VEGF ₁₆₅ -Mutante Protein in Wundlysaten von db/db Mäusen	87
3.10. Untersuchung der Apoptose in VEGF ₁₆₅ -Wildtyp und VEGF ₁₆₅ -Mutante behandelten Wunden	89
4. Diskussion	
4.1. Wirkung von VEGF auf die Wundheilung der db/db Maus	92
4.1.1. Die lokale Verabreichung von VEGF ₁₆₅ beschleunigt den Wundschluss im db/db Mausmodell	92
4.1.2. VEGF ₁₆₅ stimuliert die Angiogenese	94
4.2. Vergleich der lokalen Applikation von VEGF ₁₆₅ im Wundbereich der db/db Mäuse: rekombinantes humanes VEGF ₁₆₅ Protein vs. Transfektion mit CMV-hVEGF ₁₆₅ Plasmid-DNA	95
4.3. Regulation der VEGF ₁₆₅ -Aktivität in der Wundheilung durch Plasmin	97
4.4. Therapeutische Ansätze und Aussichten für eine pro-angiogene Therapie in chronischen Wundheilungsstörungen	104
5. Zusammenfassung	107
6. Literaturverzeichnis	108

7. Anhang

7.1. Abkürzungen	130
7.2. Aminosäuren	132

Danksagung	133
-------------------	-----

Erklärung	134
------------------	-----

Teilpublikationen	135
--------------------------	-----

Lebenslauf	136
-------------------	-----

1. Einleitung

1.1. Regeneration und Reparatur von Geweben

Um einen Gewebedefekt zu beseitigen existieren zwei mögliche Mechanismen, die so das Überleben einer Vielzahl von Lebewesen ermöglichen. Die **reparative Regeneration** stellt hierbei die bestmögliche Behebung eines Gewebedefektes dar, da die ursprüngliche Form und Funktion des Ausgangsgewebes vollständig wiederhergestellt wird. Man findet Regeneration in allen Lebewesen, allerdings schränkt sich das Ausmaß der Regenerationsfähigkeit mit zunehmender evolutionärer Entwicklung der Lebensformen immer mehr ein. So können evolutionär als primitiv bezeichnete Lebensformen wie beispielsweise Plattwürmer (*Plathelminthes*) mittels bidirektionaler Regeneration Körperhälften neu bilden. Diese sehr ausgeprägte Regenerationsfähigkeit besitzen ebenfalls die Gruppen der Hohltiere (*Coelenterata*), Ringelwürmer (*Annelida*) und Stachelhäuter (*Echinodermata*). Eine weniger ausgeprägte Regeneration besitzen die Schwanzlurche (*Urodela*) aus dem Tierstamm der Amphibien. Sie sind in der Lage Körpergliedmaßen, wie Beine oder den Schwanz, sowie Kiefer und Augengewebe nach einer Verletzung oder dem Verlust durch Neubildung zu ersetzen. Untersuchungen am Wassermolch (*Tylototriton verrucosus*) haben gezeigt, dass der Entfernung einer Gliedmaße zunächst der schnelle Verschluss der Wunde durch epitheliale Zellen folgt. Danach kommt es in dem darunter liegenden Mesenchym zu einer lokalen Umkehr im Differenzierungsstatus der Zellen und zur Ausbildung eines Regenerationsblastems, das sich von den anderen mesenchymalen Zellen und von der vorherrschenden Zellpopulation während der Entwicklung der Gliedmaßen unterscheidet. Die Zellen des Regenerationsblastems proliferieren und bilden eine konische Ansammlung von Zellen, die nach und nach den Zellzyklus verlassen und in Knochen, Stützgewebe und Muskeln differenzieren (Kintner *et al.*, 1985; Fekete *et al.*, 1987; Ferretti *et al.*, 1991). Bei diesem Prozess spielt die lokale Umgebung eine wichtige Rolle. Zellen die beispielsweise aus der Iris in das Blastem einer Gliedmaße transplantiert werden, bilden dort eine Linse aus (Brockes *et al.*, 2002). Die genauen Mechanismen für die Initiation sind noch nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass durch die Wunde und den unmittelbaren Wundschluss Signale für die Dedifferenzierung ausgelöst werden. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Thrombin-Aktivität in dem frühen Regenerationsblastem erhöht ist, und dass Thrombin *in vitro* myotubuläre Zellen des Molchs zum Wiedereintritt in den Zellzyklus bringen kann (Tanaka *et al.*, 1999). Des weiteren ergaben Untersuchungen, dass die Ausbildung eines Blastems

einhergeht mit der Induzierung von proteolytischer Aktivität im betroffenen Mesenchym, die vermutlich mit der Migration und Proliferation zusammenhängt (Yang *et al.*, 1994). Für die proximodistale Ausrichtung (von Schulter zu Fingerspitze) werden zum einen die Expression verschiedener Hox Gene in einem determinierenden Gradienten (Gradiner *et al.*, 1995) und durch RA (Retinoic Acid) ausgelöste Signaltransduktion, die an der Ausrichtung und Bildung von neuronalen Strukturen beteiligt ist (Pecorino *et al.*, 1996; Brockes, 1997), verantwortlich gemacht.

Bei den Säugetieren sind die Regenerationsfähigkeiten stärker eingeschränkt. Hier sind nur noch wenige Gewebe zu einer reparativen Neubildung fähig. Zu diesen Geweben gehören die Leber, die Knochen und Nervenzellen. Die Leber kann beispielsweise den Verlust von bis zu zweidritteln ihrer Masse erfolgreich regenerieren. Neben den Hepatozyten nehmen auch die anderen in der Leber vorkommenden Zellen, wie Endothelzellen, biliäre Epithelzellen, Kupfferzellen und Itozellen an der Reparatur über Proliferation und Differenzierung teil. Dabei nehmen die hepatischen Zellen eine besondere Rolle ein, da sie neben einer stark erhöhten Proliferation noch weiterhin die Funktion der Leber aufrecht erhalten. Bei der Leberregeneration spielen die Wachstumsfaktoren und Zytokinen HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epidermal growth factor), TGF-alpha (transforming growth factor), Interleukin-6, TNF-alpha (tumor necrosis factor), Insulin und Norepinephrin eine entscheidende Rolle, da sie an der Regulation der komplexen Vorgänge während der Neubildung des Gewebes beteiligt sind (Michalopoulos *et al.*, 1997; Taub, 2004). Für die Einstellung der Leberregeneration sind SOCS (suppressors of cytokine signaling) und Mitglieder der TGF-beta Familie vor kurzem identifiziert worden (Campbell *et al.*, 2001; Derynck *et al.*, 2003).

Bei den Knochen wird die Regeneration nach einem Bruch durch eine Population von Stammzellen bewerkstelligt, die im gesunden Knochen in einem Ruhezustand vorliegen, erst durch den Bruch aktiviert werden und letztendlich zu Osteoblasten differenzieren. Darüber hinaus können noch mesenchymale Stammzellen, die zu Osteoblasten differenzieren an der Regeneration beteiligt sein (Stutzmann *et al.*, 1982; Conolly, 1995 & 1998). Es existieren eine Reihe von Stammzellen im adulten Menschen, die in beinahe jeden Zelltyp differenzieren können und Forschungsgegenstand vieler aktueller Untersuchungen sind. Man hofft diese Zellen für die Regeneration von Geweben einsetzen zu können (Bianco *et al.*, 2001).

Den anderen, im Säugetier weit verbreiteten Mechanismus zur Behebung von Gewebeschäden stellt die **Reparatur** dar. Hier wird keine vollständige Wiederherstellung der Funktion und Form erreicht, sondern vielmehr nur eine Behebung des unmittelbaren Schadens, die zwar zum Teil die grundsätzliche Funktion aufrecht erhält, aber meist eine Verschlechterung

gegenüber dem Ursprungszustand darstellt. Als Beispiel sei hier der Muskelfaserriss genannt, dessen Behebung zu einer Vernarbung des Muskels führt. Im reparierten Muskel ist zwar die Belastbarkeit wieder weitestgehend hergestellt, allerdings geht dies mit einem Verlust an Elastizität des Muskels einher. Die adulte Wundheilung der Haut stellt ebenfalls eine Reparatur dar. Mit den komplexen Vorgängen der kutanen Wundheilung befasst sich die vorliegende Arbeit und die folgenden Kapitel werden näher auf die Struktur der Haut und die Behebung von Verletzungen eingehen. Bemerkenswert ist, dass die Wundheilung im Embryonalstadium der Säugetiere einer Regeneration entspricht und erst im adulten Lebewesen lediglich eine Reparatur im zuvor beschriebenen Sinne darstellt. Die genaueren Mechanismen, die für diesen Unterschied verantwortlich sind, bleiben vorerst unbekannt, allerdings scheint die bei der adulten Wundheilung vorkommende Narbenbildung mit einer erhöhten TGF-beta 1 Expression und der während der Wundheilung stattfindenden Entzündung, die unter anderem durch COX-2 vermittelt wird, zusammenzuhängen (Hopkinson-Woolley *et al.*, 1994; Frank *et al.*, 1996; Wilgus *et al.*, 2004).

1.2. Aufbau und Struktur der Haut

Die Haut bildet die äußere Körperoberfläche des Menschen. Sie ist beim Erwachsenen ein ca. 1,6 m² großes Organ welches aufgrund seiner vielfältigen Funktionen und Aufgaben lebensnotwendig ist. Der Körper und seine inneren Organe werden durch sie vor mechanischen, chemischen und thermischen Schäden geschützt. Zudem stellt sie eine Barriere gegenüber Krankheitserregern dar und bewahrt den Organismus vor Flüssigkeitsverlust. Eine weitere Funktion ist die Temperaturregulierung, die durch Veränderung der Hautdurchblutung wie auch durch Wasserabgabe über die Schweißdrüsen zustande kommt. Sie stellt auch ein Sinnesorgan dar, welches mechanische, thermische sowie Schmerzreize vermitteln kann.

Die Haut läßt sich in die Oberhaut (Epidermis) und die darunterliegende Lederhaut (Dermis) unterteilen. Die Dermis bildet die Hauptmasse der Haut und besteht vorwiegend aus einem dichten Kollagenfasergeflecht, durchsetzt von elastischen Netzen, welche der Haut Reißfestigkeit und reversibel Verformbarkeit verleihen. In der Dermis liegen die Hautanhangsgebilde, die zum größten Teil von der Epidermis abstammen, sowie die für die Versorgung der Dermis und der darüberliegenden Epidermis notwendigen Blut und Lymphgefäße, Nerven aufzweigungen und Nervenendkörperchen. Weitere Zellen der Dermis

sind die Fibroblasten und zahlreichen Zellen des Immunsystems, wie Histozyten und Mastzellen (Leonhardt, 1990).

Die Epidermis stellt die eigentliche Abgrenzung des Organismus zur Umwelt dar und ist ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel, das bei Menschen je nach Alter, Lokalisation und Geschlecht zwischen 30 und 300 µm dick ist und von den Keratinozyten gebildet wird (Moll, 1995). Weitere Bestandteile der Epidermis sind die Melanozyten (für die Pigmentierung verantwortlich) und die Langerhanszellen (akzessorische Zellen des Immunsystems).

Histologisch setzt sich die Epidermis aus vier Schichten zusammen: dem zuunterst liegenden *Stratum basale*, dem *Stratum spinosum*, dem *Stratum granulosum* und dem außenliegenden *Stratum corneum*.

Die Keratinozyten der Epidermis zeigen eine große Regenerationsleistung, wobei Zellteilungen hauptsächlich in der untersten Zellschicht, dem *Stratum basale*, ablaufen. Aus einer dieser Mitosen gehen zwei Tochterzellen hervor, von denen eine die Teilungsfähigkeit behält und weiter mit der Basalmembran verbunden bleibt, während die andere die Proliferationszellschicht verläßt um in einem etwa 30 Tage währenden Prozeß terminal zu differenzieren und dabei zur Oberfläche zu wandern. In der folgenden Schicht, dem *Stratum spinosum*, deren Name sich von den zwischen den Keratinozyten ausbildenden stachelartigen Interzellularbrücken ableitet, beginnt die Differenzierung der Keratinozyten. Eine deutliche Zunahme des Zytoplasmavolumen und der Zahl der Organellen (rauhes endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen und Mitochondrien) weisen dabei auf eine intensive Synthesetätigkeit der Keratinozyten hin. Im weiteren Verlauf der Differenzierung treten im schmalen *Stratum granulosum* innerhalb der Zellen Keratohyalingranulae auf, die aus Proteinen bestehen, deren wichtigste Vertreter das Filaggrin sowie das Loricrin sind (Fuchs, 1990 & 1993). In der Epidermis durchlaufen die Keratinozyten die terminale Differenzierung im *Stratum corneum*, welches sich aus flachen, kernlosen Zellhüllen zusammensetzt, die mit Tonofibrillen gefüllt und durch Lipide fest miteinander verbacken sind. Die in dieser Schicht enthaltenen Keratinozyten sind apoptotisch. So stellt sie eine unlösliche und schwerdurchdringbare Barriere dar. Die apoptotischen Keratinozyten werden schließlich als Hornschuppen an der Hautoberfläche abgestoßen.

1.3. Phasen der kutanen Wundheilung

Die Wundheilung dient der Wiederherstellung der schützenden und stabilisierenden Funktion der Haut. Wundheilungsprozesse sind auch in anderen Geweben möglich, wobei beim adulten Menschen die Regeneration nur im Bereich der Epithelien vollständig möglich ist. In parenchymatösen Organen erfolgt die Wiederherstellung eines Gewebedefekts durch Elemente des Bindegewebes und wird als Vernarbung bezeichnet (zur Übersicht: Clark, 1996).

Die physiologische Wundheilung umfasst eine Reihe sich zeitlich und räumlich überlappender und teilweise parallel ablaufender Prozesse. Um die komplexen zellbiologischen Abläufe im Verlauf der Wundheilung zu veranschaulichen, werden vier Phasen der Wundheilung voneinander abgrenzt: Hämostase, Entzündung, Proliferation und Narbenumbau.

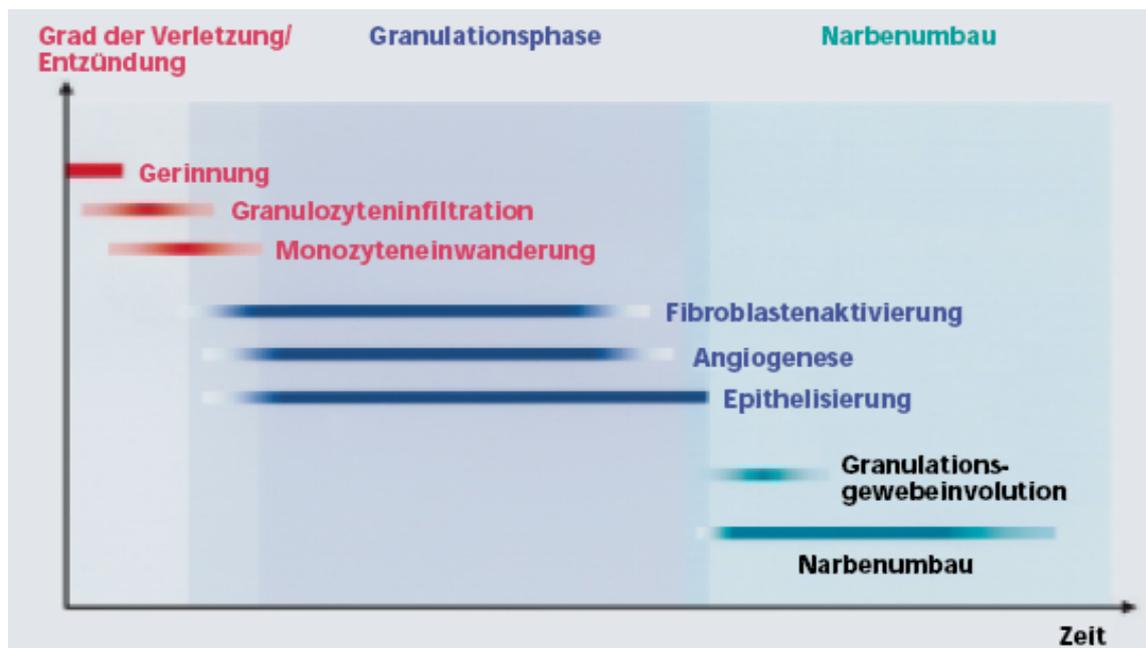


Abbildung 1: Phasen der Wundheilung (Smola *et al.*, 2001)

1.3.1. Hämostase

Eine Verletzung der Haut kann ausschließlich die Epidermis, oder auch Dermis und Subkutis umfassen. Bei einer Verwundung über die Epidermis hinaus werden auch Blutgefäße durchtrennt. Unmittelbar nach der Verwundung erfolgt die Blutstillung im Zusammenspiel

von Gefäßwand, Gewebe, Thrombozyten und Blutgerinnung. Hierbei kommt es zunächst zu einer Vasokonstriktion der Gefäße um die weitere Blutung zu minimieren und später, wenn die Blutung gestoppt ist, zu einer Vasodilatation und einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität, die einen Austritt von Blutplasma und darin enthaltenen Zellen und Faktoren zur Folge hat. Der Kontakt von im Blut vorhandenen Thrombozyten mit Kollagenfasern, Mikrofibrillen, Basalmembran- und Zelltrümmern führt zu einer Aggregation der Thrombozyten. Es kommt zu einer Aktivierung der Thrombozyten, die wiederum eine Ausschüttung einer Vielzahl von Faktoren zur Folge hat. Hierzu zählen für die Aggregation wichtige Mediatoren wie Thrombospondin, Fibronectin, Fibrinogen und der von-Willebrandt-Faktor. Zusätzlich werden durch die Thrombozyten eine Reihe biologisch aktiver Faktoren wie z.B. PDGF (platelet derived growth factor) und TGF (transforming growth factor) freigesetzt, die eine wichtige Rolle für den weiteren Verlauf der Wundheilung spielen (Martin, 1997; Clark, 1996). Zeitgleich wird die Gerinnungskaskade eingeleitet, welche über eine Reihe von Interaktionen verschiedener Faktoren dazu führt, daß das lösliche Fibrinogen des Blutes durch das aktivierte Thrombin in unlösliches Fibrin umgewandelt wird. Die einzelnen Fibrinmoleküle aggregieren zu einem Netzwerk und bilden u.a. mit Fibronectin eine provisorische Matrix. Aus diesen Interaktionen entsteht der sogenannte Thrombus, welcher für die Anheftung und Einwanderung von Entzündungszellen eine temporäre Matrix liefert.

1.3.2. Entzündungsphase

In der Entzündungsphase wandern neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Leukozyten und T-Lymphozyten in das Wundgebiet ein. Bereits früh während der Entzündung wandern, Interleukin-8 vermittelt, die neutrophilen Granulozyten ein, deren Funktion im wesentlichen darin besteht, bakterielle Kontaminationen durch Phagozytose und Ausschüttung proteolytischer Enzyme zu beseitigen. Darüberhinaus helfen proteolytische Enzyme wie neutrophile Elastase, Metalloproteinase (MMP-8 und MMP-13), Cathepsin G und Proteinase 3 auch bei dem Abbau von Zell- und Gewebstrümmern (Owen und Campbell, 1999).

Im weiteren Verlauf der Entzündungsphase nimmt die Zahl der infiltrierenden Monozyten zu, die in der späten Phase den überwiegenden Zelltyp darstellen. Im Wundgebiet differenzieren die Monozyten zu Makrophagen, die wie die Neutrophilen zur bakteriellen Bekämpfung und der Beseitigung von Gewebstrümmern dienen. Darüberhinaus sezernieren die Makrophagen viele Faktoren, die für die Einleitung der Proliferationsphase eine wichtige Rolle spielen. Zu den freigesetzten Mediatoren gehören u.a. bFGF (basic fibroblast growth factor), PDGF,

TGF- α und TGF- β (transforming growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor). Diese Faktoren wirken mitogen, chemotaktisch und stimulieren die Synthese von Faktoren, die für die Wundheilung essentiell sind, wie z.B. Wachstumsfaktoren, Proteasen und Komponenten der extrazellulären Matrix (Martin, 1997). Durch das Zusammenwirken dieser Faktoren wird die Granulationsphase eingeleitet.

1.3.3. Proliferationsphase

Die Bildung des Granulationsgewebes beginnt etwa 4 Tage nach der Verletzung. Ohne sie kann der mesenchymale und epidermale Gewebedefekt nicht wieder ersetzt werden. Die Bezeichnung rührt von der Bildung hellroter, glasig-transparenter Körnchen (Granula) her, die man auf der Oberfläche des Gewebes erkennen kann.

Im Vordergrund der nun ablaufenden Prozesse stehen zum einen die Neubildung von Kapillargefäßen zwecks Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen und Zellinfiltration sowie die Ausschüttung chemotaktischer Faktoren, welche hauptsächlich durch die Makrophagen erfolgt. Sie führt zum Einwandern von Fibroblasten und Aussprossung von Blutgefäßen in das Wundbett. Die Fibroblasten verwenden beim Einwandern die bei der Blutgerinnung entstandene provisorische extrazelluläre Matrix und beginnen mit der Synthese und dem Einbau von Kollagenfasern und hexosaminhaltigen sauren Mucopolysacchariden. Letztere tragen als Grundsubstanz für den Zusammenhalt des Granulationsgewebes bei. Angiogene Faktoren wie VEGF, bFGF, TGF- α und PDGF sind für die Einsprossung von Kapillaren verantwortlich (Folkman und Klagsbrun, 1987). Sie liefern ein chemotaktisches Signal, welches an bereits existierenden Blutgefäßen zu einer Aussprossung von neuen Kapillaren führt. Dies ermöglicht nun die Versorgung der Wundregion mit Sauerstoff und den Austausch von Abbau- und Syntheseprodukten.

Nicht nur auf der dermalen Ebene schreitet der Neuaufbau von Gewebe voran, auch die Epidermis hat Anteil an dem Wundschluß indem sie bereits 24 Stunden nach der Verwundung mit der Reepithelialisierung beginnt. Basale Keratinozyten aus dem Wundrand oder aus verbliebenen Haarfolikeln beginnen zu proliferieren und bilden eine Zellfront, welche langsam von den Wundrändern aus über die Wunde migriert und sie so verschließt. Für die Migration ist eine Lösung der interzellulären Desmosomen und eine Retraktion intrazellulärer Tonofilamente notwendig. Es kommt anschließend zu einer Ausbildung zytoplasmatischer Aktinfilamente und zur amöboiden Migration der Zellen. Die Keratinozyten benötigen spezielle Adhäsionsmoleküle um über die provisorische Wundmatrix migrieren zu können.

Insbesondere Intergrin $\alpha_v\beta_5$, welches als Vitronektin-Rezeptor fungiert, und Intergrin $\alpha_5\beta_1$, welches als Rezeptor für Fibronektin dient, scheinen hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen, da sie sich gut an der Wanderungsfront der Keratinozyten nachweisen lassen (Martin, 1997).

Die vermehrte Expression von Proteasen am Epithelrand, insbesondere von dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA), dessen Rezeptor uPAR (urokinase plasminogen activator receptor) und verschiedener Matrixmetalloproteinasen (MMPs) ist essentiell für die Zellmigration. Eine Reihe von Faktoren ist während der Reepithelialisierung für die Keratinozytenproliferation verantwortlich, die sowohl autokrin wie z.B. TGF- α oder parakrin wie z.B. KGF (keratinocyte growth factor), IGF (insulin-like growth factor) und EGF (epidermal growth factor) wirken können (Martin, 1997).

Nach Abschluß der Reepithelialisierung kehren die Keratinozyten wieder in ihren „Ruhezustand“ zurück. Es kommt zur Ausbildung von Desmosomen und Hemidesmosomen und somit wieder zu einer Verankerung der Keratinozyten mit der Basalmembran, welche bestimmend für die Stabilität der geschlossenen Wunde ist.

1.3.4. Narbenaufbau

Dies ist die letzte und am längsten andauernde Phase der Wundheilung. Hierbei wird aus dem zellreichen und matrixarmen späten Granulationsgewebe ein zellarmes und matrixreiches Narbengewebe gebildet. Einige Fibroblasten differenzieren zu Myofibroblasten, die für eine Kontraktion der Wunde sorgen (Skalli *et al.*, 1987). Das in der provisorischen Matrix vorherrschende Kollagen III wird durch Kollagen I ersetzt. Ebenso wird der Gehalt von Fibrin, Fibronektin und Glykosaminoglykanen stark reduziert und es entsteht eine dauerhafte Matrix. Es folgt eine Vernetzung der Kollagenfibrillen, die zu einer erhöhten Reißfestigkeit der ehemaligen Wunde führt. Das Endresultat des Wundheilungsprozesses stellt das Narbengewebe dar.

Der Wundheilungsprozess der Maus läuft grundsätzlich ähnlich zu dem im humanen System ab. Ein wesentlicher Unterschied zur humanen Wundheilung stellt der Hautmuskel der Maus dar, welcher in den tieferen Schichten der Dermis lokalisiert ist. Während beim Menschen der Wundschluss im Wesentlichen durch Granulationsgewebsbildung und Reepithelialisierung erfolgt, trägt in der Maus die Wundkontraktion entscheidend zum Wundschluss bei.

1.4. Die Regulation der Angiogenese in der kutanen Wundheilung

Die Bildung von neuen Blutgefäßen aus bereits existierenden bezeichnet man als Angiogenese oder Neovaskularisation. Im Gegensatz dazu steht die Vaskulogenese, welche die Neubildung von Gefäßen aus Vorläuferzellen während der Emryonalentwicklung beschreibt.

Bei Erwachsenen findet, außer im weiblichen Reproduktionstrakt und während der Wundheilung, keine Angiogenese und auch lediglich eine sehr geringe Proliferation von Endothelzellen statt. Es gibt aber pathologische Situationen wie beispielsweise Tumorangioenese oder diabetische Retinopathie wo die Endothelproliferation und die Neubildung von Gefäßen außer Kontrolle geraten sind (Plate, 1993).

Das Wachstum neuer Gefäße geht sowohl unter physiologischen wie auch unter pathogenen Bedingungen von bestehenden Kapillaren aus. Einer der Hauptauslöser der Angiogenese ist Hypoxie, die zur Expression von Hypoxie-sensitiven Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α , HIF-2 α und HIF-3 α ("Hypoxia Inducible Factor") führt, welche ihrerseits die Expression anderer angiogener Wachstumsfaktoren, wie z.B. "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF), "Hepatocyte Growth Factor" (HGF) und "Platelet Derived Growth Factor" (PDGF-B), sowie anderer angiogen wirksamer Faktoren (Chemokine, Zytokine und Proteasen) und die Rekrutierung von periendothelialen Zellen (Pericyten) und Leukozyten stimulieren (Harris, 2002). So wurde gezeigt, dass HIF-1 Expression die Ausbildung von reifen Gefäßen und die Stabilisierung der Gefäße, insbesondere im Hinblick auf deren Permeabilität und Plasmaaustritt bewirkt (Elson *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2000).

Als erster Prozess in der Angiogenese lösen sich periendotheliale Zellen von den Kapillaren; dies führt zu einer Destabilisierung des Gefäßes. Durch die endotheliale Expression der Proteasen uPA (urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) und MMP-1 und MMP-9 (Matrix Metallo Proteinasen) kommt es zur Auflösung der Basalmembran (Glaser *et al.*, 1983; Mignatti *et al.*, 1996). Hierbei wird nicht einfach die das Gefäß umgebende extrazelluläre Matrix aufgebrochen, sondern vielmehr eine Durchlässigkeit für die auswandernden Endothelzellen ermöglicht. Zusätzlich bildet sich eine provisorische Matrix aus Fibronectin, Fibrin und anderen Komponenten, welche die Migration der Zellen erleichtert. Die Endothelzellen bilden Pseudopodien aus, die sich durch die entstandenen Lücken der Basalmembran stülpen und die Migration der Zellen in den perivaskulären Raum einleiten. Bei der Migration spielen Zelladhäsionsproteine wie Integrin $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ eine große Rolle, da sie als Rezeptoren für extrazelluläre Proteine fungieren und Zell-Matrix Interaktionen

mediieren (Leavesley *et al.*, 1993; Varner, 1997). Darüber hinaus werden durch die Degradation der extrazellulären Matrix eine Vielzahl matrixgebundener angiogener Aktivatoren, wie “basic Fibroblast Growth Factor“ (bFGF), VEGF, “Transforming Growth Factor“- β (TGF- β) und HGF freigesetzt und durch die Proteolyse aktivierte angiogene Chemokine, wie Interleukin 1 (IL-1 β) aktiviert (Bergers *et al.*, 2000). Insgesamt spielt die Regulation der gezielten Proteolyse der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle, da fehlerhafte Degradation zur Ausbildung pathogener Zustände führen kann. So konnte gezeigt werden, dass Angiogenese in MMP-9 defizienten Mäusen gestört war (Itoh *et al.*, 1998), während Überexpression von MT-MMP1 in Mäusen zur Ausbildung von hochvaskularisierten Tumoren führte (Suonni *et al.*, 2002).

Ein weiterer Schritt in der Ausbildung eines neuen Gefäßes stellt die Lumenbildung dar, bei der die Kapillarsprossen Vakuolen bilden. Durch die weitere Aussprossung der Endothelzellen findet durch Anschluss an bereits bestehende oder ebenfalls neu entstandene Gefäße eine Vernetzung statt. Sobald der aktive Teil der Endothelzellproliferation und –migration beendet ist, liefert die Ausschüttung von PDGF durch die Endothelzellen ein chemotaktisches Signal für periendotheliale Zellen, die eine Bindung an und Interaktion mit dem neu gebildeten Endothel eingehen. Diese Interaktion stärkt und schützt das Endothel vor äußeren Einflüssen. Hier spielt auch die Expression von Angiopoietin-1 durch periendotheliale Zellen eine wichtige Rolle; durch Ang-1 kommt es zur Ausbildung von Zell-Zellbrücken zwischen den Endothelzellen untereinander und auch zu den Perizyten. Dieser über Ang-1 vermittelte Effekt beruht auf einer erhöhten Expression der Adhäsionsmoleküle PECAM, VE-Cadherin und Occludin (Gamble *et al.*, 2000; Thurston *et al.*, 2000).

Eine Reihe von löslichen Faktoren mit positivem Effekt auf die Angiogenese wurden aus aktivierten Makrophagen und aus kutanen Wunden gewonnen. 1987 zeigten Folkmann und Klagsbrun, dass ein Teil der Angiogenese stimulierenden Wirkung von acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) und bFGF ausgeht. Mittlerweile sind eine Reihe weiterer Moleküle mit pro-angiogenen Eigenschaften hinzugekommen, wie VEGF (Keck *et al.*, 1989), TGF- β (Yang und Moses, 1990), PDGF-B (Carmeliet, 2000), Angiogenin (Vallee und Riordan, 1997) und Angiopoietin (Suri *et al.*, 1996). Auf VEGF und die Angiopoietine wird in den nachfolgenden Kapiteln noch eingegangen. TGF- β 1 spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, da es in niedriger Dosierung zur Hochregulierung von anderen angiogenen Mediatoren (u.a. VEGF und uPA) beiträgt. In höheren Konzentrationen trägt TGF- β 1 zur Beendigung von Angiogenese bei, da es Endothelzellproliferation und -migration unterbindet, die Ausbildung einer Basalmembran fördert und über die Hochregulierung der PDGF-B Expression die

Rekrutierung von mesenchymalen Zellen und deren Differenzierung zu glatten Muskelzellen bewirkt (Carmeliet, 2003).

Zusätzlich beeinflussen noch eine Reihe von Chemokinen und Koagulationsfaktoren die Angiogenese. Durch die Rekrutierung von Leukozyten zu entzündeten oder ischämischen Geweben und deren Freisetzung von Chemokinen, kann Vorort über Signaltransduktion der auf Endothelzellen vorhandenen Chemokinrezeptoren CXCR sowohl ein pro-angiogener als auch ein anti-angiogener Effekt zum Tragen kommen. So wirken alle CXCR2 und CXCR4 bindenden Faktoren angiogen (u.a. IL-8 und "Macrophage Chemoattractant Protein 1"; MCP-1) während an CXCR3 bindende Chemokine (u.a. "Platelet Factor 4"(PF-4) und "B-cell attracting chemokine 1";BCA-1) angiostatisch wirken (Bernardini *et al.*, 2003).

Neben positiv wirkenden Molekülen existieren eine Reihe von negativen Regulatoren der Angiogenese. Das Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Regulatoren ist ausschlaggebend für den physiologischen Ablauf der Angiogenese (Folkmann, 1995). Dabei handelt es sich z.B. um Thrombospondin-1 und 2, welche die Proliferation und Migration der Endothelzellen inhibieren (Tolsma *et al.*, 1993; Bagavandoss *et al.*, 1993; Volpert *et al.*, 1995). Interferon α verringert die Expression von bFGF. Interferon γ reduziert die Bindung von aFGF an die Zelloberfläche von Endothelzellen und inhibiert die Lumenbildung (Maheshwari, 1991). Des weiteren verhindern Protease-Inhibitoren wie die Plasminogen-Aktivator Inhibitoren-1 und 2 (PAI-1 und 2) und gewebespezifische Inhibitoren der Metalloproteasen den Abbau der Basalmembran und somit den initialen Schritt der Gefäßsprossung (Bacharach *et al.*, 1992; Soff *et al.*, 1995; Moses und Langer, 1991; Takigawa *et al.*, 1990; Folkmann, 1995). Auch proteolytische Spaltprodukte von Plasminogen bzw. Collagen XVIII, die man als Angiostatin bzw. Endostatin bezeichnet wirken sich negativ auf die Proliferation von Endothelzellen aus (O'Reilly *et al.*, 1994 und 1997). Darüber hinaus existieren noch lösliche Rezeptoren von Tie-2 und VEGFR-1, die ebenfalls eine angiostatische Wirkung besitzen (Aiello *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 2003; Shirakawa *et al.*, 2002).

In neueren Studien wird der Anteil von Stammzellen an der Neubildung von Blutgefäßen diskutiert. Hier existieren je nach Gewebe und Untersuchung sehr unterschiedliche Angaben zum Anteil von endothelen Vorläuferzellen ("Endothelial progenitor cells; EPCs) an der Neubildung von Gefäßen (De Palma *et al.*, 2003; Orlic *et al.*, 2001). Die EPCs wurden 1997 erstmals aus peripherem Blut isoliert und anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle (AC133), die nicht auf reifen Endothelzellen exprimiert werden, identifiziert (Asahara *et al.*, 1997; Peichev *et al.*, 2000). Die EPCs sind hochproliferativ,

werden im Knochenmark gebildet und können bei der Gefäßneubildung in Endothelzellen differenzieren. Ihre Rolle in der Angiogenese ist zur Zeit noch schwer einzuschätzen und bedarf weiterer Erforschung, allerdings bieten sie eine vielversprechende Aussicht auf die Zukunft pro-angiogener Therapien.

1.5. VEGF

1.5.1. Die Rolle von VEGF in der Angiogenese

VEGF ist ein wichtiger Faktor für die Koordinierung der Vaskulogenese im frühen Embryonalstadium und für die Angiogenese im adulten Lebewesen (für eine Übersicht: Ferrara und Keyt 1997; Neufeld *et al.*, 1999; Ferrara *et al.*, 2003). Knock-Out Studien mit transgenen Mäusen zeigten, dass VEGF eine essentielle Rolle bei der Vaskulogenese spielt. So waren sowohl die homozygoten als auch die heterozygoten Mäuse (bei denen nur ein VEGF-Allel deletiert wurde) nicht lebensfähig und starben in utero infolge schwerer Defekte in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems (Ferrara *et al.*, 1996; Carmeliet *et al.*, 1996). Die Expression von VEGF und seiner Rezeptoren wurde in verschiedenen Zellen und Geweben bei physiologischen, aber auch bei pathogenen Angiogenese Prozessen beschrieben. Ursprünglich entdeckt wurde VEGF in Tumorzellen von Meerschweinchen (Dvorak *et al.*, 1979; Senger *et al.*, 1983) als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF, vascular permeability factor).

Später konnte gezeigt werden, dass es sich hier um ein hochkonserviertes homodimeres Glykoprotein handelt, welches ein Molekulargewicht von 35-45 kDa in verschiedenen Spezies wie Meerschweinchen, Maus, Ratte, Rind und Mensch aufweist (Keck *et al.*, 1989; Leung *et al.*, 1989; Conn *et al.*, 1990; Berse *et al.*, 1992; Claffey *et al.*, 1992).

VEGF gehört zur gleichen Proteinfamilie wie PDGF (platelet derived growth factor) und PlGF (placenta growth factor). Neben dem ursprünglich beschriebenen VEGF-A wurden weitere Wachstumsfaktoren mit einer hohen Homologie zueinander isoliert. Sie werden als VEGF-B bis E bezeichnet und bilden zusammen mit PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB und PlGF (placenta growth factor) eine Proteinfamilie. Die Proteine der VEGF-Familie bilden Dimere welche ein Motiv aus 8 Cysteinen aufweisen und einen positiven Effekt auf Angiogenese bzw. Lymphogenese besitzen. Da in dieser Arbeit nur mit dem zuerst beschriebenen VEGF (VEGF-A) gearbeitet wurde, soll an dieser Stelle nicht näher auf die anderen Wachstumsfaktoren eingegangen werden.

Es existieren mindestens sechs verschiedenen Isoformen von VEGF-A in menschlichen Zellen, welche für Proteine mit einer Länge von 121, 145, 165, 183, 189 und 206 Aminosäuren kodieren (Leung *et al.*, 1989; Poltorak *et al.*, 1997; Jingjing *et al.*, 1999). Sie gehen aus einem einzigen Gen durch alternatives Spleißen hervor (Tisher *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1993 ; siehe auch Abbildung 2). Zahlreiche Organe exprimieren VEGF₁₂₁ und VEGF₁₆₅. VEGF₁₄₅ wird zeitlich und räumlich begrenzt exprimiert und zwar in den Zellen der Reproduktionsorgane (Chamrock-Jones *et al.*, 1993; Cheung *et al.*, 1995). Lediglich in fötalen Leberzellen wurde bisher VEGF₂₀₆ nachgewiesen (Houck *et al.*, 1991). Expression von VEGF₁₈₃ wurde im Gehirn, Milz, Herz und in sehr geringen Mengen in Leber, Niere und Muskelgewebe gefunden (Lei *et al.*, 1998; Jingjing *et al.*, 1999).

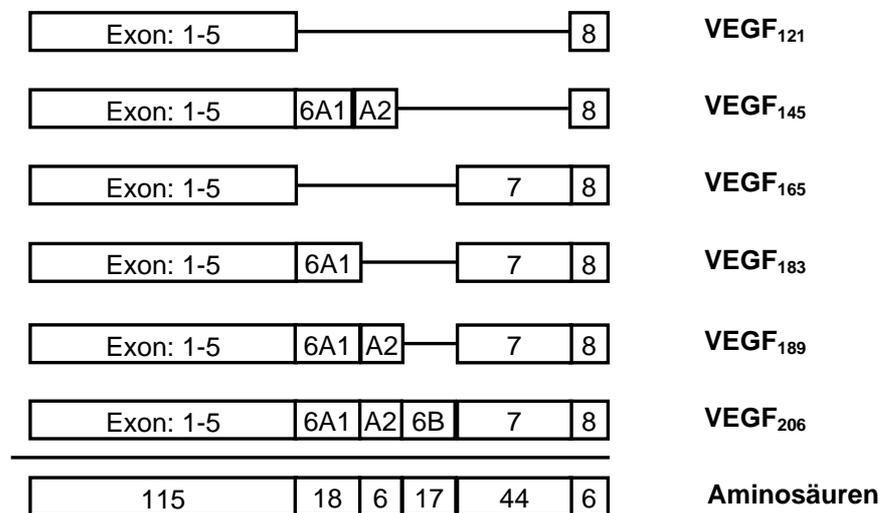


Abbildung 2: Aufbau der verschiedenen Spleißvarianten mit den jeweils transkribierten Exons.

Der größte Unterschied zwischen den einzelnen Spleißvarianten besteht in ihrer Fähigkeit an Heparin zu binden. Hierfür ist das Vorhandensein der Exons 6A1, 6A2 und/oder 7 entscheidend, da sich hier die heparinbindenden Motive befinden (Houck *et al.*, 1991 und 1992). VEGF₁₂₁ stellt somit eine lösliche Isoform dar, die nicht in der Lage ist an Heparin, Heparansulfate oder die extrazelluläre Matrix zu binden. VEGF₁₆₅ weist intermediäre Eigenschaften auf, da es sowohl sezerniert wird, als auch über Exon 7 an extrazelluläre Matrix oder Zelloberflächen gebunden vorliegen kann. Über Exon 7 wird zudem eine spezifische Bindung von VEGF₁₆₅ an den neben den beiden Hauptrezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 existierenden Co-Rezeptor Neuropilin-1 ermöglicht.

Man geht davon aus, dass die an extrazelluläre Matrix gebundenen Varianten als Depot dienen, welche durch proteolytische Spaltung mit Plasmin oder Urokinase als verkürztes Peptid freigesetzt und aktiviert werden (Houck *et al.*, 1992; Plouet *et al.*, 1997; Park *et al.*,

1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von VEGF₁₆₅ mit einem Verlust an biologischer Aktivität einhergeht (Keyt *et al.*, 1996). In der gleichen Publikation wurde der Einfluss von verschiedenen Proteasen auf die Stabilität und Aktivität von VEGF₁₆₅ untersucht. Es stellte sich heraus, dass VEGF₁₆₅ von Proteasen mit niedriger Spezifität wie Pronase, Proteinase K und Thermolysin fast vollständig degradiert wurde. Diese Proteasen sind aber ausschließlich in Bakterien und Pilzen zu finden. Nur Plasmin, Trypsin und Chymotrypsin waren in der Lage definierte Proteinfragmente zu erzeugen, während Thrombin, Kollagenase, Pepsin und Elastase nicht in der Lage waren VEGF zu spalten. Die Bedeutung der heparinbindenden Isoformen wurde durch transgene Mausmodelle gezeigt, bei denen etwa 50 Prozent der Tiere, welche nur VEGF₁₂₀ (Maus-VEGF ist um eine Aminosäure verkürzt) exprimierten, unmittelbar nach der Geburt verstarben, während die übrigen 50% Prozent nach etwa 14 Tagen verstarben. Es konnte durch Untersuchung der Tiere gezeigt werden, dass ein Defekt bei der vaskulären Verzweigung dieser Tiere vorlag (Carmeliet *et al.*, 1999; Ruhrberg *et al.*, 2002). Die Bioaktivität von VEGF₁₆₅ auf die Endothelzellproliferation ist im direkten Vergleich zu den anderen Isoformen, insbesondere den löslichen VEGF₁₂₁ und VEGF₁₁₀ (Spaltprodukt nach Plasminverdau), um 50 bis 100-fach erhöht (Keyt *et al.*, 1996). Es wurde zudem gezeigt, dass VEGF durch oxidativen Stress in seiner Proteinstruktur verändert und in seiner Bioaktivität beeinträchtigt wird. Ist allerdings eine heparin-bindende Domäne vorhanden, können zellgebundene Heparansulfate (Glypican) als Chaperon-ähnliche Proteine fungieren und die oxidative Schädigung wieder umkehren (Gengrinovitch *et al.*, 1999). Da bei den löslichen Formen nur VEGF₁₆₅ diese Bindestelle aufweist, wäre durch die mögliche Stabilisierung eine erhöhte Bioaktivität in einem durch oxidative Prozesse gekennzeichneten Milieu erklärbar (Neufeld *et al.*, 1999). Darüber hinaus wird die durch das Exon 7 vermittelte spezifische Bindung von VEGF₁₆₅ an den Rezeptor Neuropilin-1 als ein weiterer Faktor für die Wirkverstärkung dieser Isoform angesehen (genauer folgt im Abschnitt zu den Rezeptoren).

Neben der bereits beschriebenen Fähigkeit VEGFs die Gefäßpermeabilität zu erhöhen (Senger *et al.*, 1983), besitzt VEGF eine starke mitogene Aktivität auf Endothelzellen *in vitro* (Ferrara und Henzel, 1989; Gospodarowicz *et al.*, 1989) und führt *in vivo* zur Angiogenese (Pepper *et al.*, 1992; Connolly *et al.*, 1989; Leung *et al.*, 1989; Phillips *et al.*, 1993). Darüberhinaus reguliert VEGF die Expression verschiedener Proteasen, wie Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) und Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA) sowie der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) (Pepper *et al.*, 1991). Auch die Bildung des Urokinase-Rezeptors (uPAR) wird induziert (Mandriota *et al.*, 1995). Darüber hinaus produzieren

Endothelzellen nach Zugabe von VEGF die interstitielle Kollagenase (MMP-1) (Unemori *et al.*, 1992).

In unterschiedlichen experimentellen Modellen konnte gezeigt werden, dass VEGF eine starke anti-apoptotische Wirkung auf Endothelzellen hat, da es unter anderem die Bildung anti-apoptotischer Proteine wie z.B. Bcl-2 induziert und somit das Absterben der Endothelzellen verhindert (Gerber *et al.*, 1998).

An der Regulation der VEGF Genexpression sind eine Reihe von Wachstumsfaktoren beteiligt. Diese umfassen PDGF-BB (Finkenzeller *et al.*, 1997), KGF, EGF (Frank *et al.*, 1995), FGF-4 (Deroanne *et al.*, 1997), TGF- β 1 (Pertovaara *et al.*, 1994), IGF-1 (Goad *et al.*, 1996) sowie Interleukin 1 β und Interleukin 6 (Li *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1996).

Ein weiterer Auslöser für die VEGF-Synthese stellt Sauerstoffmangel dar, wobei es zur Expression von HIF-1 (hypoxia-inducible factor) kommt, der sich als Transkriptionsfaktor stimulierend auf die VEGF Expression auswirkt (Levy *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995). Zusätzlich wurde gezeigt, dass bei niedrigem Sauerstoffdruck im Gewebe neben einer gesteigerten VEGF-Synthese auch eine erhöhte Stabilität des VEGF-mRNA Transkripts nachweisbar ist (Levy *et al.*, 1995 und 1998). Daran sind mehrere Proteine beteiligt, die an die 3' untranslatierte Region der mRNA von VEGF binden und so die VEGF-RNA vor Degradation schützen (Levy 1998; Onesto *et al.*, 2004).

VEGF spielt zudem eine wichtige Rolle bei einer Reihe von pathologischen Prozessen wie z.B. der Tumorangiogenese oder der diabetischen Retinopathie. In den meisten Tumorgeweben ist die Expression von VEGF stark erhöht, wobei die Expression von den Tumorzellen und nicht vom Endothel ausgeht. Dies spricht für einen parakrinen Wirkmechanismus (Ferrara und Keyt 1997). Die Induktion der VEGF Expression beruht wahrscheinlich unter anderem auf einer durch die starken Stoffwechselaktivität des Tumorgewebes ausgelöste Sauerstoffunterversorgung des Gewebes (Plate *et al.*, 1992; Shweiki *et al.*, 1992). So können neue Gefäße entstehen, die den Tumor versorgen und somit ein weiteres Wachstum ermöglichen.

1.5.2. Die Rolle von VEGF in der Wundheilung

Unmittelbar nach der Hämostase und der sich anschließenden Entzündungsphase setzt die proliferative Phase der Wundheilung ein. Während dieser Phase werden Keratinozyten an den Wundrändern durch das in der Proliferationsphase ausgeschüttete KGF zu einer erhöhten

Proliferation und Migration angeregt, die damit die Reepithelialisierung einleiten. Keratinozyten sind eine wesentliche Quelle für das während der Wundheilung exprimierte VEGF (Brown *et al.*, 1992; Frank *et al.*, 1995). Im Wundgrund setzen zudem Makrophagen VEGF frei. Ein erhöhtes Vorkommen von Wasserstoffperoxid, welches von den einwandernden neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird induziert VEGF Expression in Keratinozyten (Brauchle *et al.*, 1996). Darüber hinaus tragen die Unterversorgung des Wundgewebes mit Sauerstoff (Hypoxie) und die dadurch ausgelösten Signalwege zur Hochregulierung der Expression von VEGF und seinen Rezeptoren maßgeblich bei (Detmar *et al.*, 1997). So entsteht eine lokal erhöhte VEGF-Konzentration in der Wunde, die ein chemotaktisches Signal für Endothelzellen und Makrophagen liefert.

Ein Zusammenhang zwischen den Wundheilungsstörungen und einer Störung der VEGF-Expression konnte erstmals in Wundheilungs-Experimenten mit diabetischen Mäusen (siehe 1.6. die db/db-Maus) gezeigt werden (Frank *et al.*, 1995). In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass ein verzögerter Wundschluss mit einer verminderten Angiogenese und reduzierter VEGF-A Expression korreliert. 2001 gelang es der Gruppe um Howdieshell die negativen Auswirkung von VEGF neutralisierenden Antikörpern auf die Bildung von Granulationsgewebe im Mausmodell zu zeigen. Sowohl die Angiogenese als auch die Ausbildung eines Granulationsgewebes waren durch die Neutralisierung von VEGF unterbunden, wodurch eine signifikante Wundheilungsverzögerung eintrat. In einer sehr aktuellen Veröffentlichung wurde eine konditionaler VEGF Knock-Out von Keratin 5 exprimierendem Gewebe hergestellt. Dabei zeigte sich, dass die Embryonalentwicklung nicht gestört war, jedoch Wundheilung in den adulten Tieren stark verzögert stattfand und sich ein weitgehend Blutgefäß-freies Gewebe unterhalb der neu gebildeten Epidermis ausbildete (Rossiter *et al.*, 2004).

Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass VEGF bei chronischen Wunden zwar in erhöhtem Maße exprimiert wird, in dem inflammatorischen Wundgewebe aber eine proteolytische Inaktivierung des VEGFs stattfindet (Lauer *et al.*, 2000). Untersuchungen von Wundflüssigkeiten chronischer Wunden zeigten, dass VEGF proteolytisch degradiert wird. Plasmin konnte als eine Protease identifiziert werden, welche für die Spaltung und somit eine Reduktion der biologischen Aktivität von VEGF verantwortlich ist. Nachdem die Aminosäuresequenz der Restriktionsstelle identifiziert war, wurde eine nicht spaltbare Mutante von VEGF₁₆₅ generiert. Es gelang durch den Austausch der Aminosäure Alanin 111 durch Prolin (siehe Abb. 3) eine Variante herzustellen, die weiterhin in der Lage war *in vitro*

eine Endothelzellproliferation auszulösen und gleichzeitig stabil gegenüber einer Spaltung durch Plasmin war (Lauer *et al.*, 2002).

Wildtyp VEGF ₁₆₅										
106	107	108	109	110	111	112	113	Aminosäure-Nummer		
GA	CCA	AAG	AAA	GAT	AGA	GCA	AGA	CAA	G	Base
Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg	Gln			Aminosäure
Mutante VEGF ₁₆₅ Mut _{Pro}										
106	107	108	109	110	111	112	113	Aminosäure-Nummer		
GA	CCA	AAG	AAA	GAT	AGG	CCA	AGA	CAA	G	Base
Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Pro	Arg	Gln			Aminosäure

Abbildung 3: Aminosäure- und Basensequenz von VEGF₁₆₅ Wildtyp und der VEGF₁₆₅ Mutante Pro₁₁₁. Der eingerahmten Aminosäuren/Basen stellen die Plasmin-Schnittstelle dar. Die Mutationen auf Basen- und Aminosäureenebene sind rot markiert (modifiziert nach Lauer *et al.*, 2002).

Es ist somit denkbar, dass sowohl eine gestörte Expression und Freisetzung von VEGF als auch eine erhöhte proteolytische Degradation von VEGF zur eingeschränkten biologischen Aktivität führen. Dies wiederum könnte zu einer verzögerten und reduzierten Ausbildung des Granulationsgewebes und dadurch zu einer Störung der physiologischen Angiogenese und Wundheilung führen.

1.5.3. VEGF Rezeptoren

VEGF vermittelt seine Effekte durch Bindung an zwei Rezeptor Tyrosin Kinasen, VEGFR-1 (auch FLT-1) oder VEGFR-2 (KDR beim Mensch bzw. FLK-1 in der Maus). Beide werden vor allem von Endothelzellen exprimiert (Shibuya *et al.*, 1990; Terman *et al.*, 1991) und besitzen 7 Immunoglobulin-ähnliche (IgG) Domänen in dem extrazellulären Bereich mit den Bindestellen für VEGF, eine einzelne transmembrane Region und eine konsensus Tyrosin Kinase Domäne, die durch eine Kinase-Insertions Domäne unterbrochen wird (Shibuya *et al.*, 1991; Devries *et al.*, 1992). Neben der Expression in Endothelzellen wurde VEGFR-1 in einer Reihe anderer Zellen nachgewiesen; dazu zählen trophoblaste Zellen (Charnock-Jones *et al.*, 1994), Monozyten, insbesondere Makrophagen (Barleon *et al.*, 1996) und renale mesangiale

Zellen (Takahashi *et al.*, 1995). In hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozyten und retinalen Vorläuferzellen konnte die Expression von VEGFR-2 nachgewiesen werden (Kato *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996). Darüber hinaus konnten beide Rezeptoren auf verschiedenen Tumorzellen wie z.B. malignen Melanomen gefunden werden (Gitay-Goren *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1995). Wie für VEGF gezeigt, spielen auch die beiden Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Embryonalentwicklung, wie Untersuchungen mit Knockout Mäusen zeigten. Die heterozygoten Knockouts bei VEGFR-1 waren lebensfähig, während für VEGFR-1 oder VEGFR-2 homozygote Knockouts im Embryonalstadium verstarben. Es zeigte sich, dass das kardiovaskuläre System ausgebildet wurde, aber die Morphologie der Endothelzellen und der Gefäßwände gestört war. Es entstanden Akkumulationen von Endothelzellen in den Blutgefäßen, welche möglicherweise durch ein unkontrolliertes Wachstum der Zellen herbeigeführt wurden (Fong *et al.*, 1995). Dies deutet auf eine Rolle von VEGFR-1 als VEGF Inhibitor hin.

Untersuchungen der Knockouts des VEGFR-2 Gens zeigten, dass hier die Differenzierung der Endothelzellen nicht korrekt erfolgte und infolge dessen die Tiere zu einem sehr frühen Zeitpunkt *intrauterin* verstarben (Shalaby *et al.*, 1995).

Auf Monozyten wird durch Aktivierung von VEGFR-1 Chemotaxis und Migration ausgelöst, während bei Trophoblasten über die Bindung von VEGF an den Rezeptor, die Freisetzung von NO und somit u.a. Vasodilatation induziert wird (Clauss, 1998; Ahmed *et al.*, 1997).

Die Expression beider Rezeptoren wird hauptsächlich über VEGF reguliert. Eine erhöhte VEGF-Expression führt somit auch zu einer Erhöhung der Synthese seiner Rezeptoren. Es wurde zudem gezeigt, dass Hypoxie einen positiven Einfluss insbesondere auf die Expression von VEGFR-2 hat (Gerber *et al.*, 1997).

VEGFR-1 weist eine höhere Affinität für VEGF auf, hat aber eine eher niedrige Tyrosinphosphorylierungsaktivität, wohingegen VEGFR-2 eine geringere Affinität für VEGF aber im Gegenzug eine höhere Tyrosinphosphorylierungsaktivität besitzt (Seetharam *et al.*, 1995).

VEGFR-1 weist darüber hinaus eine Affinität für PlGF und VEGF-B auf, die beide nicht an VEGFR-2 binden (Park *et al.*, 1994; Olofsson *et al.*, 1998).

Beide Rezeptoren müssen dimerisieren, um eine Signalkaskade auszulösen, wobei jeder Rezeptor einen anderen Signalweg auslöst, wodurch auch die unterschiedlichen biologischen Effekte erklärt werden können (Davis-Smyth *et al.*, 1996; Wiesman *et al.*, 1997; Fuh *et al.*, 1998). Für VEGFR-2 ist bekannt, dass eine Bindung von VEGF zu der Phosphorylierung der PI-3 Kinase, Ras GTPase-activating Protein und der Src Familie führt, und eine Aktivierung

von MAP-Kinasen stattfindet (Guo *et al.*, 1995; Kroll und Waltenberg, 1997; Eliceiri *et al.*, 1999). VEGF induziert das Wachstum von Endothelzellen über die Aktivierung des Raf-Mek-Erk Signalwegs, wobei Protein Kinase C essentiell ist (Takahashi *et al.*, 1999). Bei einer Bindung von VEGF an VEGFR-1 kommt es hingegen nicht zu einer Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs (Seetharam *et al.*, 1995). Bei Neuropilin-1, einem 130 kDa transmembranösem Glykoprotein ohne Tyrosinkinaseaktivität, handelt es sich um einen weiteren VEGF-bindenden Rezeptor, der allerdings nur VEGF₁₆₅ bindet. Während die Bindungseigenschaften von VEGF an VEGFR-1 und VEGFR-2 über Exon 3 und Exon 4 bestimmt werden, besitzt Exon 7 eine kritische Bedeutung in der Interaktion von VEGF₁₆₅ mit Neuropilin-1 (Soker *et al.*, 1997). Es gelang für Neuropilin-1 eine Rolle in der Potenzierung des mitogenen Effekts von VEGF auf Endothelzellen zu zeigen (Soker *et al.*, 1997 und 1998). Dabei scheint die Interaktion von Neuropilin-1 mit VEGFR-1 bedeutsam, da die alleinige Bindung von VEGF an Neuropilin-1 keine Signalwirkung ausübt (Whitaker *et al.*, 2001, Soker *et al.*, 1998). Erst vor kurzem wurde eine Beteiligung von Neuropilin-1 an der kutanen Wundheilung gezeigt (Matthies *et al.*, 2002). Als Epitop für Neuropilin-1 wurde die Heparin-bindende Domäne von VEGF₁₆₅ identifiziert (Soker *et al.*, 1997).

Durch alternatives Spleißen von VEGFR-1 entsteht eine verkürzte lösliche Rezeptorvariante, die als sVEGFR-1 (sFLT-1) bezeichnet wird (Kendall *et al.*, 1996). sVEGFR-1 scheint eine Rolle bei der Regulation der VEGF-Aktivität zu spielen, da es eine ähnliche Affinität wie VEGFR-1 besitzt, aber durch das Fehlen der Tyrosin Kinase Domäne eine Bindung von VEGF nicht zu einer Aktivierung der Signalkaskade führt. Vielmehr wird eine Dimerisierung der beiden VEGF-Rezeptoren verhindert. Somit wird sVEGFR-1 als ein endogener VEGF₁₆₅ Inhibitor angesehen.

Während der Schwangerschaft konnte sVEGFR-1 in erhöhten Mengen in der Amnionflüssigkeit und im Serum nachgewiesen werden (Banks *et al.*, 1998; Hornig *et al.*, 1999). Die Bildung des löslichen Rezeptors während der Schwangerschaft im Plazenta-Gewebe und seine Freisetzung ins Blut lassen vermuten, dass die biologische Verfügbarkeit von VEGF auf diesem Weg reguliert wird und so eine Rolle bei der Vaskulogenese in der Embryonalentwicklung vermutet werden kann (Hornig und Weich, 1999). Hierfür spricht auch die Untersuchung eines Mausmodells, bei dem die Tyrosin Kinase Domäne im Gen von VEGFR-1 entfernt wurde. Im Gegensatz zu den homozygoten VEGFR-1 Knockout Mäusen waren diese Tiere lebensfähig und zeigten ein normal entwickeltes Kreislaufsystem und eine unbeeinträchtigte Angiogenese. Allerdings ging durch die Deletion der Tyrosin Kinase Domäne die Chemotaxis der Makrophagen verloren (Hiratsuka *et al.*, 1998). Dies lässt die Vermutung

zu, dass die Signaltransduktion bei der Embryonalentwicklung keine bedeutende Rolle spielt, aber im adulten Lebewesen später Probleme entstehen können, da bei den Makrophagen beispielsweise eine chemotaktische Funktion verloren wurde. In diesen Tieren gelang auch der Nachweis der löslichen Form des Rezeptors, die unabhängig von der fehlenden Kinase Domäne exprimiert wurde.

1.6. Störungen der Wundheilung

Komplikationen der primären Heilung von Hautwunden zeigen sich klinisch durch Wundinfektion, Serumbildung, Bildung von Fremdkörpergranulomen, hypertrophische Narbenbildung, Keloidbildung, Narbeninstabilität und Kontrakturen (Riede *et al.*, 1995; Böcker *et al.*, 1997).

Eine besondere Form von Wundheilungsstörungen stellen chronische, nicht heilende Wunden dar. Chronische Ulzera entstehen als Folge trophischer Gewebsstörungen häufig auf dem Boden von arteriosklerotischen oder diabetischen Gefäßveränderungen oder einer chronisch-venösen Insuffizienz (CVI). Etwa 1,5 bis 2 Millionen Bundesbürger leiden unter einem venös bedingten, schwer therapierbaren Unterschenkelgeschwür. Diese Zahl verdeutlicht die soziale und sozioökonomische Relevanz dieses Leidens. Die CVI ist charakterisiert durch eine venöse Hypertonie bei der sich hauptsächlich in den unteren Extremitäten sog. Beinulcerationen (Ulcus curis) bilden. Hier wird häufig aufgrund von Beinvenenverschlüssen (Thrombosen) nicht mehr ausreichend Blut aus dem Gewebe abgeschöpft, wodurch der intravasale ambulatorische Druck steigt. Durch diese Druckbelastung entsteht häufig eine Insuffizienz der Perforansvenen, welche das oberflächliche mit dem tiefen Beinvenensystem verbinden. Als Folge kommt es zu sekundären Schädigungen der Gefäße sowie zum Austritt von zellulären und nichtzellulären Plasmabestandteilen. Durch den Blutrückstau können die betroffenen Gewebe nicht mehr ausreichend Stoffwechselprodukte austauschen. So können chronische mechanische oder entzündliche Reize zur Ausbildung tiefer Wunden führen, die oft schwer therapierbar sind (Kremer und Berger, 1999). Die Ursachen chronischer Beinulceren bei der CVI sind unklar. Bei chronisch venösen Ulzera persistiert die Entzündungsphase der Wundheilung wodurch die nachfolgenden Phasen der Granulation und Reepithelialisierung gestört werden. Der prooxidative und proteolytisch aggressive Charakter des chronischen Wundmilieus scheint auf einer pathologischen Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zu beruhen. Diese sind für die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und Proteasen verantwortlich.

Chronische Wunden bilden typischerweise Wundsekret oder Wundflüssigkeit, welches sich aus Serum und sezernierten Substanzen der an der Wundheilung beteiligten Zellen zusammensetzt. Die Wundflüssigkeit spiegelt somit den aktuellen Zustand der Wundheilung wider. So konnten einige Studien zeigen, dass es deutliche Unterschiede zwischen Wundsekret aus chronisch nicht heilenden und heilenden Wunden gibt. Untersuchungen der Auswirkungen von Wundflüssigkeiten auf das Proliferationsvermögen unterschiedlicher Zellpopulationen zeigten beim Sekret heilender Wunden einen positiven Effekt auf die Proliferation von Keratinozyten und Fibroblasten, während chronische Wundflüssigkeit inhibitorisch auf diese Zelltypen wirkte (Bucalo *et al.*, 1989; Harris *et al.*, 1993; Shakespeare *et al.*, 1991). Untersuchungen verschiedener Proteasen zeigten eine Erhöhung von Matrix-Metalloproteasen Typ 1, 2 und 9 (Saarilho-Kere, 1998; Wysocki *et al.* 1993) sowie der Serinproteasen Elastase und Plasmin in dem Sekret chronischer Wunden (Rao *et al.*, 1995; Grinell und Zhu, 1996; Palolathi *et al.*, 1993). Hinzu kommt hier eine Reduktion der physiologischen Inhibitoren α_2 -Makroglobulin und TIMP's (tissue inhibitors of metalloproteases) (Grinell und Zhu, 1996; Rao *et al.*, 1995). Diese vorliegenden Veränderungen im chronischen Wundmilieu führen zu einer erhöhten proteolytischen Degradation von Strukturproteinen (Latijnhouwres *et al.*, 1998) und Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF, dessen Degradation in chronischer Wundflüssigkeit durch Serinproteasen gezeigt wurde (Wlaschek *et al.*, 1997; He *et al.*, 1999).

Bis heute ist wenig über die lokalen zellularen und molekularen Mechanismen bekannt, welche eine geregelte Wundheilung unterbinden. Es scheint aber, dass für eine funktionierende Wundheilung ein sensibles Gleichgewicht von Matrixbildung und -degradation, Proliferation und Migration sowie Ausschüttung und Aktivierung stimulierender Faktoren und deren direkte und indirekte Inhibition notwendig sind.

1.7. Das db/db Mausmodell

1.7.1. Die db/db Maus

Um die Rolle von VEGF während der Wundheilung zu untersuchen haben wir uns für das Tiermodell der diabetischen Maus C57BLKS/J-m $+/+$ Lepr^{db} (db/db Maus) entschieden.

In der db/db Maus führt eine Punktmutation im db Genlocus (kodiert den Leptin-Rezeptor) durch Deletion einer Base zum vorzeitigen Abbruch der Translation und damit zu einer trunkeierten, verkürzten intrazellulären Domäne. Dadurch ist der Ob-Rb (Leptin-)Rezeptor

nicht zur Signaltransduktion fähig. Homozygote db/db Mäuse entwickeln ab der vierten Lebenswoche einen adipösen (siehe Abb. 4 und Ergebnisse Abb .10), hyperglykämischen und hyperinsulinämischen Phänotyp (Coleman *et al.*, 1982).

Die Mäuse weisen eine signifikante Verzögerung im Wundheilungsprozess auf, die durch eine verminderte Entzündungs- und Proliferationsphase gekennzeichnet ist. In der Folge ist die Ausbildung eines Granulationsgewebes und die Reepithelialisierung stark vermindert (Goova *et al.* 2001, Frank *et al.* 2000). Die Ursachen der Wundheilungsstörungen in diesem Modell sind letztendlich nicht geklärt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sowohl direkte, durch den Leptinrezeptordefekt verursachte, wie auch indirekte, durch die Hyperglykämie bedingte Pathomechanismen relevant sind.

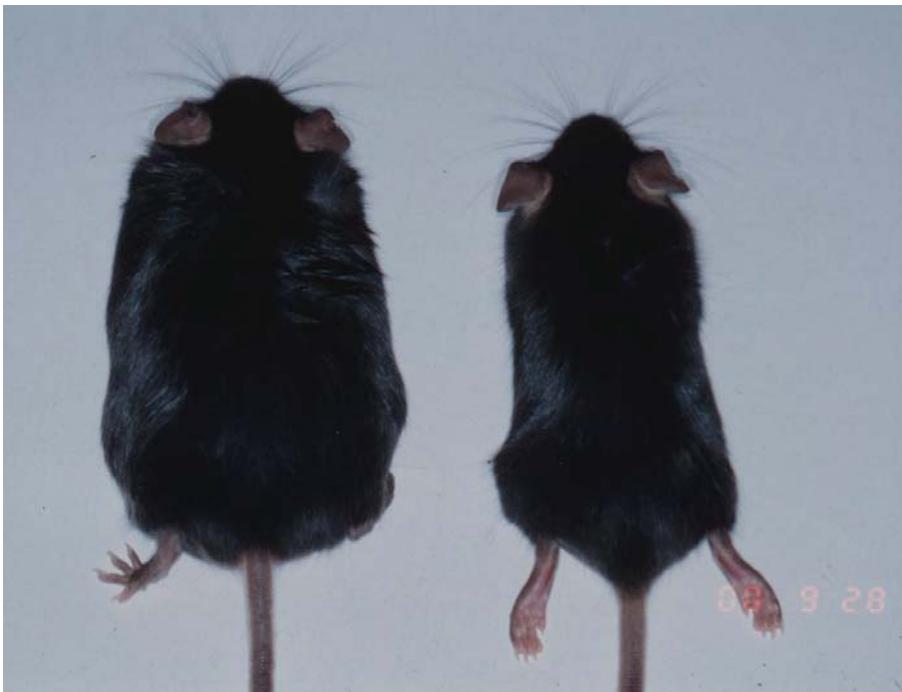


Abbildung 4: Phänotypischer Vergleich homozygoter db/db (links) mit heterozygoter db/+ Maus.
Beide Tiere sind 10 Wochen alt.

1.7.2. Leptin und seine Rezeptoren

Leptin ist ein 16 kDa Protein, das von Adipozyten synthetisiert wird, über die Blutbahn ins zentrale Nervensystem gelangt und als Sättigungsfaktor über den Hypothalamus die Homöostase des Lipidstoffwechsels reguliert (Coleman, 1973; Zhang *et al.*, 1994; Meister, 2000). Eine Störung des ob-Gens (Leptingen; ob steht für obese) hat die gleichen Auswirkungen wie ein Defekt des Leptin-Rezeptors. In beiden Fällen konnte der Phänotyp entweder durch systemische Gabe von Leptin bei Leptin-defizienten Mäusen (Ring *et al.*,

2000; Frank *et al.*, 2000) oder durch Einbringen eines transgenen Leptin-Rezeptors in Leptin-Rezeptor defiziente Mäuse (Kowalksi *et al.*, 2001) gerettet bzw. umgekehrt werden.

Der Leptin-Rezeptor (Ob-R) gehört zur Klasse I der Zytokinrezeptor-Superfamilie. Das Ob-R Gen kodiert für 5 verschieden lange Rezeptorisoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen (siehe Abbildung 5). Sie werden als Ob-Ra bis Ob-Re bezeichnet und unterscheiden sich hauptsächlich in der Länge des intrazellulären C-Terminus, während der ligandbindende N-Terminus identisch ist (Lee *et al.*, 1996; Fiedman und Halaas, 1998).

Die Funktion der einzelnen Ob-R Spleißvarianten sind noch nicht geklärt, jedoch weisen erste Untersuchungen darauf hin, dass Ob-Ra den Transport von Leptin über die Bluthirnschranke reguliert, während Ob-Rc und Ob-Rd die Leptin-Clearance kontrollieren, und Ob-Re, der keine transmembranöse und intrazelluläre Domäne besitzt, ein löslicher Rezeptor ist (siehe Übersichtsarbeit Meister 2000). Im Gegensatz dazu besitzt Ob-Rb die längste intrazelluläre Domäne, die für eine Signaltransduktion essentiell ist (Tartiglia *et al.*, 1995). Ob-Rb wird somit als der wesentliche Rezeptor für Leptin-vermittelte Effekte angesehen. Studien zur Aufklärung der Signaltransduktionswege von Ob-R zeigten, dass die intrazelluläre Domäne von Ob-Rb Bindungsmotive enthält, die für die Aktivierung der Tyrosinkinase der Janus Kinasefamilie (JAKs) notwendig sind (White *et al.*, 1997). Die Bindung von Leptin an ein Ob-Rb Homodimer löst die Phosphorylierung von JAK2 und die Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten aus. Die Aktivierung der JAKs führt zur Phosphorylierung von „signal transducers and activators of transcription“ (STATs). In vivo erfolgt die Aktivierung von Ob-R insbesondere durch eine Phosphorylierung von STAT3 (White *et al.*, 1997); phosphoryliertes STAT3 verlagert sich in den Nukleus und induziert die Genexpression.

Die Mutation im db/db Gen – bei der es sich um eine Basendeletion handelt - führt zu einem neuen Spleiß Donor der nur die kurzen Isoformen zulässt wodurch das Ob-Rb Produkt in diesen Tieren fehlt (Chen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996).

Ob-Rb wird sowohl in verschiedenen Regionen des Zentralnervensystems exprimiert (insbesondere im Hypothalamus), als auch in einer Vielzahl peripherer Gewebe und Zellen, wie z.B. Endothelzellen (Sierra-Honigmann *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001), Zellen der Hinrhangsdrüsen (Shimon *et al.*, 1998), Ovarzellen (Karlsson *et al.*, 1997), Nieren- und Nebennierenrindenzellen (Hoggard *et al.*, 1997), Keratinozyten (Frank *et al.*, 2000; Stallmeyer *et al.*, 2001) und Fibroblasten (Glasow *et al.*, 2001). So konnte für Leptin eine Rolle in der Regulation der Reproduktion (Castellucci *et al.*, 2000), der Hämatopoese (Gainsford *et al.*, 1996) und der proinflammatorischen Immunantwort (Fantuzzi *et al.*, 2000)

beschrieben werden. Darüber hinaus wurde für Leptin in T-Zellen und Pankreas-Inselzellen ein anti-apoptotischer Effekt nachgewiesen (Howard *et al.*, 1999; Okuya *et al.*, 2001). In jüngster Zeit konnte für Leptin ein mitogener und die Zellmigration fördernder Effekt auf Endothelzellen und Keratinozyten *in vitro*, sowie ein pro-angiogener Effekt *in vivo* nachgewiesen werden (Sierra Honigmann *et al.*, 1998; Stallmeyer *et al.*, 2001). Ferner reguliert Leptin die Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Park *et al.*, 2001). Morphologische Untersuchungen im Wundgewebe weisen auf eine stark erhöhte Expression von Leptin, insbesondere in dermalen Zellen hin (Murad *et al.*, 2003).

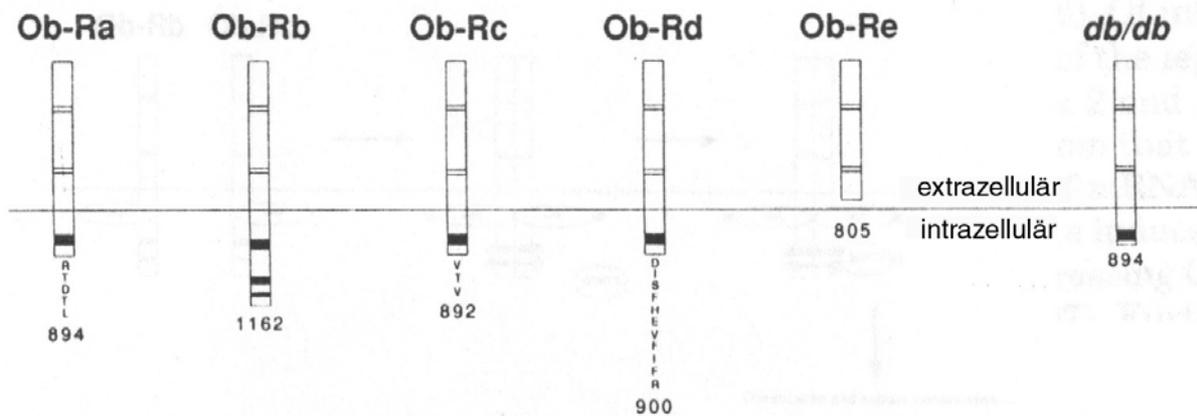


Abbildung 5: Schematische Darstellung der 5 Leptin-Rezeptor-Isoformen und des db/db Rezeptors.

Nur Ob-Rb besitzt in seinem c-Terminus alle 3 JAK-STAT Box-Motive und ist damit in der Lage den JAK-STAT Signalweg zu aktivieren. Aminosäuren, die sich im C-Terminus der einzelnen Isoformen unterscheiden sind hier dargestellt. Der db/db Rezeptor entsteht durch einen Basenaustausch, der einen neuen Spleiß Donor generiert und so zu einem alternativen Spleißen führt. (modifiziert nach Meister, 2000)

1.7.3. Ursachen für Wundheilungsstörungen in der db/db Maus

Die Ursachen für die Wundheilungsstörungen in der db/db Maus sind unklar. Es liegen jedoch Untersuchungen vor, die darauf hinweisen, dass der Wundheilungsprozess sowohl durch eine Störung der Leptin-vermittelten Effekte aufgrund des fehlenden Ob-Rb (direkt), als auch durch Zellfunktionsstörungen verursacht durch die Hyperglykämie (indirekt) verzögert ist. In der folgenden Tabelle sind die direkten und indirekten Effekte aufgelistet.

direkte Effekte	Quelle
Endothelzell Proliferation durch Leptin und in vivo Auslöser von Angiogenese	Sierra Honigmann <i>et al.</i> , Science 1998
Leptin ist mitogener Stimulus für HaCaT und primäre humane Keratinozyten	Frank <i>et al.</i> , JCI 2000
Leptin hat proliferative und anti-apoptotische Wirkung auf T Lymphozyten, Leukämiezellen und hematopoetische Vorläuferzellen	Fantuzzi <i>et al.</i> , J Leukoc Biol 2000

indirekte Effekte	Quelle
reduzierte Expression von KGF während der Wundheilung	Werner <i>et al.</i> , JID 1994
reduzierte Expression von VEGF während der Wundheilung	Frank <i>et al.</i> , JBC 1995
verminderte Expression von VEGF während der Wundheilung durch Hyperglykämie	Benjamin, AJP 2001
erhöhte Expression von Ang-2 während der Wundheilung	Kämpfer <i>et al.</i> , Lab Invest 2001
verminderte Freisetzung von VEGF-Protein durch gestörten intrazellulären Transport	Ozawa <i>et al.</i> , JCI 2001
erhöhte Expression von MIP-2 und MCP-1 führt zu längerer Persistenz von Neutrophilen und Makrophagen	Wetzler <i>et al.</i> , JID 2000
erhöhte Glykosilierung und dadurch Entstehen von AGEs (advanced glycation endproducts)	Goova <i>et al.</i> , AJP 2001
AGEs dafür verantwortlich, dass eine verzögerte Infiltration mit mononukleären Zellen aufgrund von Interaktionen mit dem in der ECM vorkommenden Rezeptor (RAGE) während der frühen Phase der Wundheilung stattfindet	Goova <i>et al.</i> , AJP 2001
AGEs dafür verantwortlich, dass in der späten Phase der Wundheilung eine erhöhte Persistenz von inflammatorischen Zellen in der Wunde gegeben ist, da via RAGE-vermittelten Signaling kontinuierliche Ausschüttung von Cytokinen erfolgt	Goova <i>et al.</i> , AJP 2001
RAGE-Signaling auch für erhöhtes und verlängertes proteolytisches Milieu während der Wundheilung verantwortlich; insbesondere MMP-2 und MMP-9	Goova <i>et al.</i> , AJP 2001
verminderte Migrationsfähigkeit von Fibroblasten isoliert aus der adulten nicht jedoch der neugeborenen db/db Maus	Lerman <i>et al.</i> , AJP 2003

Tabelle 1 : direkte und indirekte Effekte die zu der Wundheilungsstörung der db/db Maus führen

1.7.4. Die Rolle von VEGF in der db/db Maus

1995 konnte von Stefan Frank *et al.* eine Störung der VEGF-Expression während der Wundheilung der db/db Mäuse gezeigt werden. Es zeigte sich, dass ab Tag 3 der Wundheilung eine deutliche Reduktion der VEGF Transkripte messbar war und zu späteren Zeitpunkten VEGF mRNA nicht mehr nachweisbar war.

Zuvor war im db/db Mausmodell gezeigt worden, dass KGF, ein Mediator der VEGF Expression, ebenfalls während der Wundheilung reduziert und verzögert exprimiert wird (Werner *et al.*, 1994). In jüngster Zeit konnte eine Schädigung des intrazellulären Transports von VEGF bei den db/db Mäusen gezeigt werden, so dass zusätzlich zu der verminderten Expression auch die verminderte Freisetzung des VEGF Proteins für die gestörte Angiogenese in diesen Tieren verantwortlich sein könnte (Ozawa *et al.*, 2001).

Bereits 1994 wurde in den db/db Tieren eine verminderte und verspätete Ausbildung von Granulationsgewebe beschrieben (Brown *et al.*, 1994). Eine aktuellere Studie konnte zeigen, dass die Blockierung von VEGF durch Antikörper die Ausbildung eines Granulationsgewebes verhindert (Howdieshell *et al.*, 2001), so dass das fehlende VEGF auch für diesen Defekt in der db/db Maus verantwortlich sein könnte.

Untersuchungen mit Schwerpunkt auf Angiogenese und damit verbundenen Wachstumsfaktoren in der diabetischen Maus zeigten, dass in den db/db Mäusen die Expression von Angiopoietin-2 im Vergleich zu normaler Wundheilung erhöht ist und auf einem hohen Niveau bis Tag 13 bleibt, während die anderen untersuchten Gene (Ang-1 und die Rezeptoren Tie-1 und Tie-2) keinen signifikanten Unterschied zur Heilung bei Wildtyp Mäusen zeigten (Kämpfer *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang könnte das Fehlen von VEGF während der Wundheilung eine entscheidende Rolle spielen, da vermutet wird, dass die Interaktion von VEGF und den Angiopoietinen das Schicksal eines sich neu bildenden Gefäßes festlegt. Ang-1 stabilisiert durch Bindung an den Tie-2 Rezeptor Gefäße, indem es die Zell-Zell-Interaktionen der Endothelzellen verstärkt und zusätzlich eine Rekrutierung von periendothelialen Zellen auslöst. Diese periendothelialen Zellen beginnen das Gefäß zu bedecken und verhindern so die direkte Interaktion von Endothelzellen mit dem sie umgebenden Gewebe. So können sie in diesem Zustand nur sehr eingeschränkt durch endogene Faktoren beeinflusst werden. Ang-2 hingegen bindet zwar ebenfalls an Tie-2, aber durch die Bindung wird keine Signalkaskade ausgelöst. Das ausbleibende Signal führt zu einer Destabilisierung des Gefäßes indem die periendothelialen Zellen sich von dem Gefäß lösen und auch die Bindungen zu der umgebenden Matrix gelöst werden. Des Weiteren werden die Zell-Zell-Bindungen zwischen den Endothelzellen gelockert. Diese Vorgänge

1. Einleitung

spielen für das Aussprossen neuer Gefäße eine entscheidende Rolle. Allerdings kommt es nur dann zur Ausbildung eines neuen Gefäßes, wenn auch VEGF exprimiert wird, da sonst den destabilisierten Gefäßzellen das anti-apoptotische, proliferationsfördernde und chemotaktische Signal fehlt. Bleibt das VEGF vermittelte Signal aus kommt es zur Einleitung der Regression des Gefäßes (Hanahan, 1997; siehe auch Abbildung 6). Es ist anzunehmen, dass dieses Szenario in der db/db Maus während der Wundheilung vorliegt. Hohe Expressionslevel von Angiopoietin-2 und verminderte Expression von VEGF könnten in der frühen Phase der Wundheilung zu einem Niedergang von Gefäßen statt zur Einleitung von Angiogenese führen.

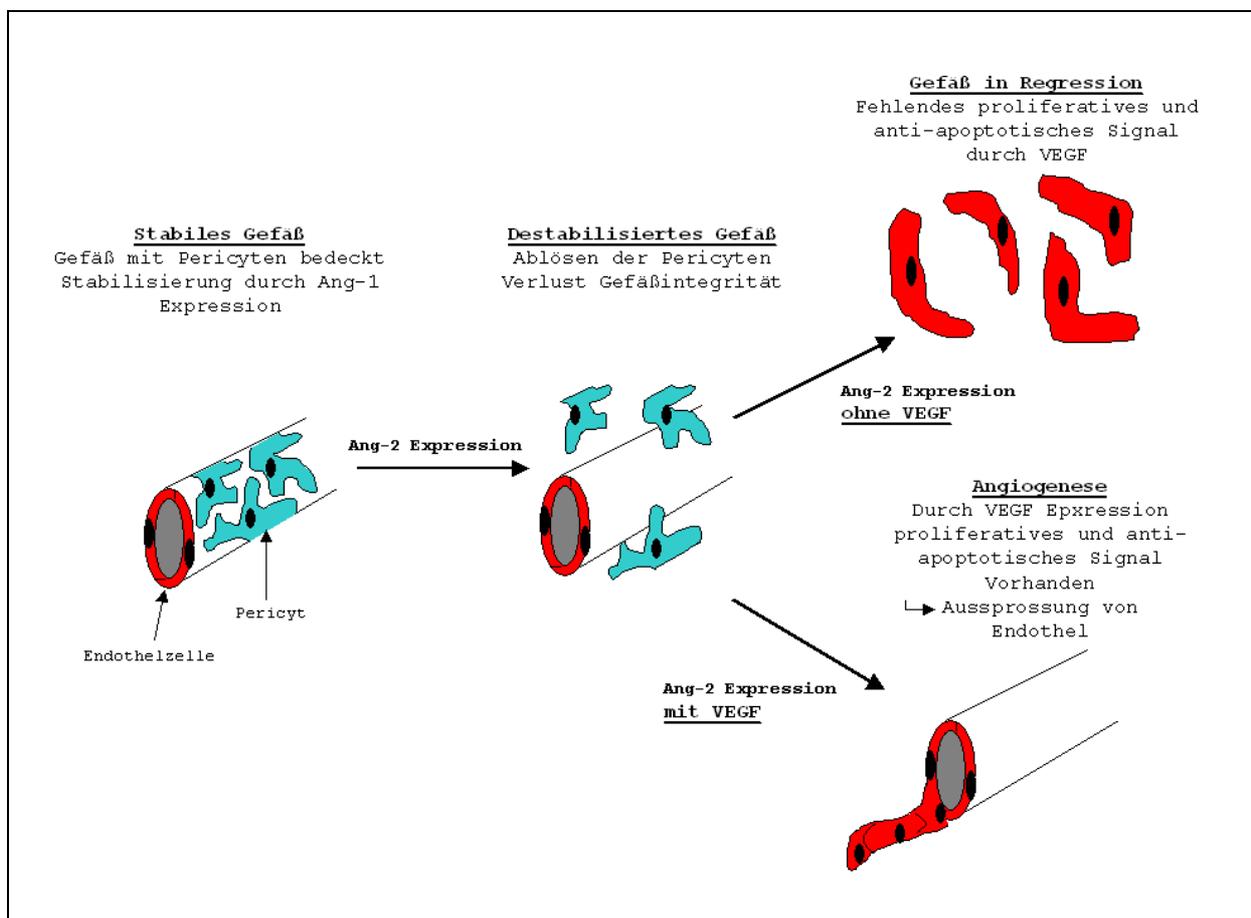


Abbildung 6: Modell der Interaktion von VEGF und den Angiopoietinen. Hier dargestellt sind die Phasen der Gefäßaussprossung und die determinierenden Faktoren (modifiziert nach Hanahan, 1997).

Ein weiteres Problem während der Wundheilung der db/db Tiere stellt die erhöhte und verlängerte Persistenz von Neutrophilen und Makrophagen dar, die dazu führt, dass die Entzündungsphase länger andauert und somit eine Einleitung der Umbauphase verzögert wird (Wetzler *et al.*, 2000).

1.8. Fragestellung

Ein wichtiges Stadium der kutanen Wundheilung ist die Ausbildung eines Granulationsgewebes. Eng mit letzterem verbunden ist die Einwanderung neu gebildeter Gefäße durch Aussprossung bereits bestehender Blutgefäße (Angiogenese). Der “Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) stellt einen Schlüsselmediator der Angiogenese dar. In der chronischen nicht-heilenden Wunde sind die physiologischen Abläufe der Granulationsgewebsbildung nachhaltig gestört; die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Pathomechanismen sind bisher noch wenig verstanden.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass im chronischen Wundmilieu die VEGF vermittelte Angiogenese durch eine funktionelle Inaktivierung des VEGF Proteins durch eine Serinproteasen-katalysierte Degradation eingeschränkt ist. *In vitro* Proteaseinhibitionsanalysen weisen darauf hin, dass Plasmin eine der Serinproteasen darstellt, die für den Degradationsprozess von VEGF wesentlich verantwortlich ist. Derzeit liegen keine Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung einer VEGF₁₆₅-Proteasen-Interaktion in der *in vivo* Situation vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es den Ursache-Wirkungszusammenhang zwischen eingeschränkter VEGF₁₆₅ Aktivität und der gestörten kutanen Wundheilung herauszuarbeiten. Diese Untersuchungen sollen dazu beitragen Erklärungsansätze für die verminderte Granulation der chronischen Wunden zu finden. Letztlich schaffen diese Untersuchungen eine Grundlage für einen möglichen Einsatz von VEGF in der Therapie chronischer Wundheilungsstörungen.

In einem ersten Teil der Arbeit ist in einem Tiermodell zunächst zu klären, ob die lokale Applikation von VEGF₁₆₅ die gestörte Wundheilung verbessern kann. Als Applikationsmethode sollen die topische Gabe von VEGF₁₆₅ als rekombinantes Protein und die kutane *in vivo* Transfektion von Plasmid DNA mittels Partikelbombardment untersucht werden. Die Studien erfolgen in der db/db Maus. Hierbei handelt es sich um ein Mausmodell, in dem in Analogie zur chronischen Wunde im Humansystem die gestörte Wundheilung mit einer eingeschränkten Angiogenese und verminderter VEGF Verfügbarkeit einhergeht. Die Wundangiogenese soll morphologisch mittels immunhistochemischer Färbungen, welche die VEGF vermittelte Angiogenese charakterisieren, untersucht werden (PECAM-1, VEGFR-2, Apoptose). In einem zweiten Teil der Arbeit wird der Frage nachgegangen, welche Rolle die Plasmin-vermittelte Degradation von VEGF₁₆₅ in der Wundangiogenese zukommt. Zur Klärung dieser Frage wird die Wundheilung im db/db Mausmodell nach topischer Applikation von VEGF₁₆₅ Wildtyp und einer plasminresistenten VEGF₁₆₅ Mutante verglichen. Die Wundangiogenese soll wie im ersten Teil morphologisch charakterisiert werden. Der Einfluss des Wundmilieus auf die Stabilität der VEGF₁₆₅ Varianten wird mittels Proteaseinhibitionsanalysen und Proteaseaktivitätsbestimmungen charakterisiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1. Geräte

Bakterienschüttler (Ceromat R)	Braun, Melsungen
Brutschrank (CO ₂ -Auto-Zero)	Heraeus, Düsseldorf
Cryostat (Cryocut 1800)	Leica, Heidelberg
Cryostat (Cryostar HM 560 MV)	Microm, Walldorf
Densitometer Imagefluor mit Software ImageQuant	BioRad, München
Elisa-Reader (Intermed ImmunoReader NJ-2000)	Nunc, Wiesbaden
Feinwaage (Explorer)	OHaus, Schweiz
FPLC	Pharmacia, Freiburg
Gene-Gun (Helios)	BioRad, München
Höfer Tankblotkammer (TE Series)	Pharmacia, Freiburg
Immunofluoreszenz Reader (Spectra Fluor) mit Software Magellan V2.5	Tecan, Crailsheim
Magnetrührer (Ikamag)	Janke & Kunkel, Staufen
<u>Mikroskope:</u>	
Lichtmikroskop (Dialux 20 EB)	Leitz, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop)	Zeiss, Oberschleißheim
Fluoreszenzmikroskop (Eclipse 800E) mit Fluoreszenzaufsatz, Digitalkamera DXM1200 F und Imaging Software Lucia G 4.80	Nikon, Düsseldorf
Leica Laser Scanning Microscope	Laboratory Imaging, CZ Leica, Heidelberg
PCR-Thermocycler (Trio-Thermoblock)	Biometra, Göttingen
Peristaltische Pumpe (LKB Pump P 1)	Pharmacia, Freiburg
pH Meter (pH 537)	WTW, Weilheim
Photometer (Ultraspec 2000, 3000)	Pharmacia, Freiburg
Rasierer Ermila Magnum Handy	Ermila, Unterkirnach
Szintillationszähler (LS6500)	Beckmann, München
Thermomixer für 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallsonde UP200 S	Dr. Hielscher, Teltow
Ultrathorax (Ika T25 basic)	Janke & Kunkel, Staufen
UV-Crosslinker (Stratalinker)	Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator (4000)	Stratagene, Heidelberg
UV-Visulaisierung (Eagle Eye)	Stratagene, Heidelberg
Vertikal 10 Doppелеlektrophoresekammer	Roth, Karlsruhe
Vortex (Vortex Genie 2)	Scientific Industries, USA
Waage (SBA 53)	Scaltec, Heiligenstadt
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg Sorvall-DuPont, USA Beckmann, München

2.1.2 Materialien

2.1.2.1 Zellkulturmaterial, Medien und Zusätze

Zellkulturmaterial wurde von den Firmen Greiner (Solingen) und Renner (Dannstadt) bezogen.

Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)	Gibco, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Österreich
IST (Insulin Transferrin Selenit)	Gibco, Eggenstein
L-Glutamin	Biochrom, Berlin

2.1.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad verwandt und von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze) oder Life Technologies (Eggenstein) bezogen. Darüber hinaus verwendete Materialien, Chemikalien und weitere Systeme wurden von folgenden Firmen bezogen:

Escherichia coli-Kultur:

Agar	Life Technologies, Eggenstein
Ampicillin	Sigma, Deisenhof
Hefeextrakt	Life Technologies, Eggenstein
IPTG	Sigma, Deisenhof
Pepton	Life Technologies, Eggenstein
X-Gal	Sigma, Deisenhof

SDS-Elektrophorese und Proteindetektion:

Acrylamid (rotiphorese –Gel 30)	Roth, Karlsruhe
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
ECL Western Blot Detection Reagent	Amersham, Braunschweig
Western Lightning Chemiluminiscence Reagent	Perkin Elmer, USA
Molekulargewichtsstandards:	
Multi Color Standard	Novex, Frankfurt
Peqgold Proteinmarker II	PeqLab, Erlangen
Multicolor Protein Ladder	BioRad, München
Rekombinantes VEGF ₁₆₅	R & D Systems, Wiesbaden
Tween 20	Merck, Darmstadt
VEGF-Elisa	R & D Systems, Wiesbaden

Membranen und Filme:

Hybond C	Amersham, Braunschweig
Hybond-N	Amersham, Braunschweig

2. Material und Methoden

Röntgenfilm (X-Omat AR)
Hyperfilm ECL

Kodak, USA
Amersham, Braunschweig

Nukleinsäure-Isolation und Reinigung:

Quiaex II (Gelextraction Kit)
Qiaprep Spin Miniprep Kit
Qiaprep Plasmin Midikit
Quantum Prep Plasmin Maxiprep
RNeasy Mini Kit
E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit

Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
BioRad, München
Qiagen, Hilden
Peqlab, Erlangen

Immunhistochemie:

3-Amino-9-Ethylcarbazol
DAB Kit
Haematoxylin
Neufuchsin
Polysine Objektträger

Sigma, Deisenhof
Dako, Hamburg
Thermo Shandon, USA
Chroma-Gesellschaft, Köngen
Menzel Gläser, Braunschweig

Proteingewinnung:

Heparinsepharose
Entsalzungssäulen

Pharmacia, Freiburg
Pharmacia, Freiburg

Sonstige Systeme und Chemikalien:

Agarose
ABI Prism Big Dye Terminator cycle
Sequencing Ready Reaction Kit
Peggold Taq-DNA-Polymerase
Plasmin (human)
 α 2-Antiplasmin
PVP (Polyvinylpolyethylen)-Pulver und -Schlauch
Superscript First Strand Synthesis Kit
Synthetische Oligonucleotide
Goldbeads für Particle Bombardment
DeadEnd Fluorometric TUNEL System

Life Technologies, Eggenstein
PE Applied Biosystems, Langen
Peqlab, Erlangen
Roche, Eppstein
Sigma, Deisenhof
BioRad, München
Life Technologies, Eggenstein
MWG-Biotech, Ebersberg
BioRad, München
Promega, Mannheim

Radiochemikalien:

α ³²P-dCTP

ICN, Eschwege

Mausfutter:

Zuchtfutter (1314; 3000 Kcal/Kg)
Haltungsfutter (1324; 2000 Kcal/Kg)

Altromin, Lage
Altromin, Lage

Verwendete Chemikalien und Substanzen für Mausexperimente:

Keatnest S (25mg/ml)	Park Davies, USA
Rompun 2%	Bayer, Leverkusen
Veet Sensitive Plus Enthaarungscreme	Reckitt & Colman, Hamburg
Bepanthen Roche Augen- und Nasensalbe	Roche, Eppstein
Biopsiestanzen (5-8 mm)	Stiefel, Offenbach

Dokumentation der Mausexperimente:

Dental Eye mit Diafilm von Kodak	Olympus, Japan
Sony Digicam DSC-707	Sony, Japan

2.1.3. Biologisches Material

2.1.3.1. Eukaryotische Zellen

COS-1 Zellen: eukaryotische Zellen von *Cercopithecus aethiops*, (Grüne Meerkatze), aus der Niere; immortalisiert durch Integration von SV40-DNA

2.1.3.2. Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α (Life Technologies, Eggenstein)

Genotyp: F⁻, Φ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZY A-argF*), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

Escherichia coli Top 10F['] (Invitrogen, Niederlande)

Genotyp: F['] {*lacI*^q Tn10 (Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacZYA-argF* U 169 λ^-

2.1.3.3. Vektoren

Ausgangsvektoren:

pcDNA 3 (Invitrogen, Niederlande) : Expressionsvektor, CMV-Promotor, SP 6- und T 7-Promotor, Ampicillin und Neomycin Resistenz

pcDNA 3.1 : (Invitrogen, Niederlande) : Expressionsvektor, CMV-Promotor, Ampicillin und Neomycin Resistenz

Vektoren mit Inserts:

pcDNA 3.1 VEGF₁₆₅ : Die VEGF₁₆₅-cDNA (Dr. Weich, GBF, Braunschweig) wurde zwischen Bam HI und Eco RI-Schnittstelle kloniert. Der Vektor wurde für die Transfektionen mittels Particle Bombardment verwendet

pcDNA 3.1 Lac Z: Die LacZ-cDNA wurde in den Expressionsvektor kloniert. Dieser Vektor diente als Kontrolle für die Transfektionen mittels Particle Bombardement

pcDNA 3.1 VEGF₁₆₅ Mut 5.3: Mutierte VEGF₁₆₅-cDNA mit erhöhter Plasmin-Stabilität (Arg 110 > Lys; Ala 111 > Pro) wurde in den Expressions-vektor kloniert. Auch dieser Vektor wurde für die Transfektion mittels Particle Bombardment verwendet.

2.1.3.4. Mäuse

B6.Cg-*m* *+/+* *Lep^r^{db}* : (alte Nomenklatur: C57BL/6J-*m* *+/+* *Lep^r^{db}*) „Black Six“-Hintergrund mit einer spontanen homozygoten Mutation in dem Leptin-Rezeptor; dadurch bedingte Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Diabetes. Die Tiere wurden sowohl als homo- als auch als heterozygote Tiere (letztere für die eigene Zucht) von Jackson Laboratory (USA) bezogen. Die eigene Zucht wurde im SPF-Tierstall (SPF = spezifiziert pathogenfrei) der Pathologie/ ZMMK durchgeführt.

BALB/cJ: weiße Albino-Kontrolltiere aus Inzuchthaltung des Physiologischen Institutes der Uniklinik Köln

2.1.3.5. Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Bezugsquelle
Anti-mouse PECAM-1	Ratte (monoklonal)	Pharmingen, Heidelberg
Anti-mouse Flk-1	Ratte (monoklonal)	Pharmingen, Heidelberg
Anti-human VEGF (A20)	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz, Heidelberg
Sekundärantikörper		
Anti-Ratte IgG HRP	Ziege (polyklonal)	Southern Biotechnologies, USA
Anti-Kaninchen IgG HRP	Schwein (polyklonal)	Dako Diagnostic, Hamburg
Anti-Ratte Alexa 594	Ziege (polyklonal)	Molecular Probes, USA

2.2 METHODEN

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Experimente, die die Kultivierung eukaryotischer Zellen beinhaltet, wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Lösungen und Medien, die zum Einsatz kamen waren entweder autoklaviert oder steril filtriert. Alle verwendeten Materialien und Geräte waren ebenfalls steril um eine Kontamination der Zellen mit Bakterien und Pilzen zu verhindern. Vor Benutzung wurden die verwendeten Lösungen und Medien auf RT oder 37°C gebracht, um einen Kälteschock und den damit verbundenen Vitalitätsverlust der Zellen zu vermeiden. In der Zellkultur wurden folgende Lösungen verwendet.

PBS (pH 7,4)

162 mM	NaCl
3 mM	KCl
8 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mN	KH ₂ PO ₄

Trypsin-EDTA-Lösung

0,05 % (v/v)	Trypsin (110 U/mg)
0,02 % (v/v)	EDTA

2.2.1.2. Kultivierung von COS-1 Zelllinien

Vollmedium

100µg/ml	Streptomycin
100 U/ml	Penicillin
2 mM	Glutamin
10 %	FCS
in DMEM	

serumfreies Medium

100µg/ml Streptomycin

100 U/ml Penicillin

2 mM Glutamin

1/100 ITS (100x)

in DMEM

Bei der COS-1-Zelllinie handelt es sich um Fibroblasten, die aus der Niere der grünen Meerkatze stammen. Sie wurden immortalisiert und tragen eine Insertion mit dem großen T-Antigen des SV-40 Virus. Dadurch werden Vektoren mit einem SV-40 Promotor in dieser Zelllinie amplifiziert, wodurch eine besonders hohe transiente Expressionsrate möglich ist.

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5% in einem Brutschrank. Die Zellen wurden zu Beginn mit Vollmedium kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von über 80% passagiert. Dabei wurden die COS-1 Zellen in einer Zelldichte von 4000-6000 Zellen pro cm² ausgesät.

Zur Gewinnung von rekombinantem VEGF-Protein erfolgte die Kultivierung der Zellen in serumfreiem Medium.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Biuret-Methode, bei der Cu²⁺ zu Cu¹⁺ in einem alkalischen Medium reduziert wird. Das verwendete BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford USA) detektiert das Cu¹⁺ durch eine Chelationsreaktion von zwei Molekülen BCA mit einem Kupferion. Diese Reaktion liefert ein lilafarbenes Reaktionsprodukt mit einer maximalen Absorption bei 562nm.

Das Reaktionsreagenz wurde in einem 1:50 Verhältnis (bichionische Säure Lösung zu Kupfer Sulfat Lösung) angesetzt. 10 µl einer BSA-Verdünnungsreihe oder 10 µl des zu bestimmenden Lysates wurden in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 200 µl des Reaktionsreagenz hinzupipettiert. Nach kurzem Schütteln der Mikrotiterplatte wurde diese für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte

photometrisch bei einer Wellenlänge von 578nm. Die Proteinkonzentrationen der Lysate wurde mit einer BSA-Standardreihe errechnet (5µg/ml – 10ng/ml).

2.2.2.2. Western Blot

2.2.2.2.1. SDS-Elektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Methode der SDS-Elektrophorese nach Laemmli (1970) gewählt.

Der Standardansatz für ein Tris-Glycin-Acrylamid-Gel mit 8% Trenngel und 4% Sammelgel wurde wie folgt angesetzt:

15ml Trenngel (8%)

Acrylamid/BisAcrylamid (30%/0,8%)	2,4 ml
H ₂ O	9,2 ml
3M Tris-HCl Puffer pH 8,5	1,88 ml
Glycerol	1,5 ml
Temed	7,5 µl
APS (20%)	30 µl

10 ml Sammelgel (4%)

Acrylamid/BisAcrylamid (30%/0,8%)	0,8 ml
H ₂ O	8,8 ml
3M Tris-HCl Puffer pH 8,5	0,42 ml
Temed	7 µl
APS (20%)	30 µl

Laufpuffer SDS-Gelelektrophorese (Tris-Glycin-Gel)

25 mM	Tris
380 mM	Glycin
0,1%	SDS

Laufpuffer SDS-Gelelektrophorese (Tris-Tricine-Gel)

100 mM	Tris
100 mM	Tricine
0,3%	SDS

Probenpuffer

250 mM	Tris/HCl pH 8,5
10 %	SDS
0,1%	Bromphenolblau
25%	Glycerol

Zunächst wurden die zwei Glasplatten der Gelkammer in die Gießvorrichtung eingespannt und als erstes das Trenngel in die Gelkammer pipettiert. Unmittelbar danach wurde das Sammelgel vorsichtig über das Trenngel geschichtet. Nach etwa 30 Minuten war das Acrylamid auspolimerisiert. Nun wurde die Gelkammer in die Laufkammer gegeben und mit dem Laufpuffer und die Proteinproben mit Probenpuffer versehen.

Nach einer 5 minütigen Denaturierung der Proteine bei 95°C wurden diese auf das Gel aufgetragen und mit einer Stromstärke von 25-50mA und maximal 10 Watt aufgetrennt.

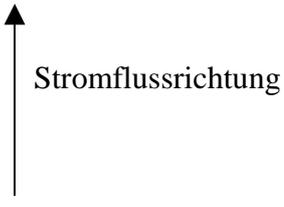
Bei späteren SDS-Elektrophoresen wurden Fertig-Gele (Tris-Tricine Gele mit 10%) der Firma Anamed verwendet, die ein durch eine andere Salzzusammensetzung (u.a. höhere Salzkonzentration) besser für die Auftrennung unserer Wundlysate geeignet war (Probenpuffer identisch wie bei den Tris-Glycin-Gelen) .

2.2.2.2.2. Proteintransfer auf Cellulosemembran

Tankblot

Der Transfer der Proteine vom Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte über Nacht in einer Höfer Tankblotkammer (BioRad, München). Hierfür wurde das Gel zunächst für 5 Minuten in eiskalten Blotpuffer gegeben. In der Größe des Gels wurde ein Stück Nitrocellulose (Hybond C, Amersham) ausgeschnitten und für mindestens 30 Minuten in dem kalten Blotpuffer inkubiert. Das Gel und die Membran wurden dann in folgender Reihenfolge in eine Blotkassette gegeben:

2 Stücke mit Blotpuffer getränktes Whatmann Papier
die Nitrocellulosemembran
das Gel
2 Stücke mit Blotpuffer getränktes Whatmann Papier



↑
Stromflussrichtung

Anschließend wurde die Blotkassette in die Kammer gegeben und diese mit Blotpuffer bis zur Markierung befüllt. Das Methanol im Blotpuffer ändert die Oberflächenspannung der Membran und erleichtert so die nichtkovalente Bindung der Proteine an die Nitrocellulose. Das Blotten erfolgte bei 4° C mit einer Stromstärke von etwa 100mA über Nacht.

Am folgende Tag wurde die Nitrocellulosemembran mit Poinseau S gefärbt und fixiert.

Nun konnte der Erfolg des Transfers beurteilt und der Proteingrößenmarker auf der Membran markiert werden.

Mittels Immunoblotting konnten nun die gesuchten Proteine nachgewiesen werden.

Blotpuffer

50 mM	Borsäure (pH 8,8)
10%	Methanol

Semidry-Blot

Bei diesem Transferverfahren wurde das Polyacrylamidgel nach dem Lauf zunächst für 15 Minuten in Kathodenpuffer gelegt. Derweil lag die Membran für die gleiche Zeit in Anodenpuffer 2.

Anschließend wurden 8 Whatman Papiere, welche alle an den Seiten etwa 1 cm größer als das Gel bzw. die Membran waren mit Anodenpuffer 1 getränkt und übereinander auf die Anodenseite der Semidry-Kammer (Peqlab, Erlangen) gelegt. Nun wurden 5 Whatman Papiere mit Anodenpuffer 2 getränkt und übereinander auf die bereits mit Anodenpuffer 1 durchzogenen Whatman Papiere gelegt. Darauf wurde mittig die Membran plziert und auf dieser wiederum das Gel. Hierbei war es wichtig darauf zuachten, daß sich keine Luftblasen zwischen Membran und Gel bildeten. Zuletzt wurden 8 Whatman Papiere mit Kathodenpuffer getränkt und auf das Gel gelegt. Die Apparatur wurde geschlossen und für 1 Stunde und 20 Minuten eine Spannung angelegt, die der Fläche der Whatman Papiere entsprach (z.B. 9cm x 9cm = 81cm somit 81mA). Der weitere Verlauf des Western Blots entspricht dem Tankblot-Verfahren (Poinseau S Färbung und Immunoblotting).

Anodenpuffer 1

0,3 M Tris pH 10,4

20% Methanol

Anodenpuffer 2

25 mM Tris pH 10,4

20% Methanol

Kathodenpuffer

40 mM 6-Aminohexansäure pH 7,6

20% Methanol

2.2.2.2.3. Immunoblotting

Zunächst wurden bei der zuvor mit Poinseau S fixierten Nitrocellulosemembran die unspezifischen Bindestellen mit einer 5%igen Milchpulverlösung in PBS + 0,1% Tween 20 für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde der Primärantikörper in einer 2,5%igen Milchpulverlösung in PBS + 0,1% Tween zu der Membran gegeben. Die verwendete Verdünnung für den humanen VEGF Antikörper lag bei 1:1000. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken.

Am folgenden Tag wurde die Membran 4 mal für 15 Minuten mit PBS + 0,1% Tween 20 gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG HRP) in einer 2,5%igen Milchpulverlösung in PBS + 0,1% Tween 20 angesetzt (Verdünnung 1:2000) und für 2 Stunden bei Raumtemperatur zu der Membran gegeben. Wie zuvor wurde 4 mal für 15 Minuten mit PBS + 0,1% Tween 20 gewaschen und anschließend der Blot mit einer Chemilumineszenz-Lösung (Western Lightning, Perkin Elmer) für 2 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde dann eingeschweißt und mit einem speziellen Chemilumineszenzfilm für einige Minuten entwickelt. Die Expositionszeit variierte zwischen 2 – 45 Minuten. Die Nachweisgrenze von VEGF lag bei diesem Verfahren bei etwa 3 ng

2.2.2.3. Immunhistochemie auf Kryogewebschnitten

Mausgewebe wurden in Tissue Tec® (Sakura, Netherlands) eingebettet und Gewebeschnitte angefertigt (6-10 µm). Die Lagerung der Präparate und Schnitte erfolgte bei -80° C.

Für die Anfärbung wurden die Schnitte zunächst in eiskaltem Aceton für 3 Minuten fixiert und anschließend für weitere 3 Minuten an der Luft getrocknet. Für die **Peroxidasefärbung**, wurde das Gewebe nach der Acetonfixierung zunächst rehydriert und die endogenen Peroxidase durch 20-minütige Inkubation der Schnitte in einer H₂O₂ – Lösung (2% in PBS) gehemmt. Anschließend wurde 3 mal 5 Minuten mit PBS gewaschen, gefolgt von der Blockierung unspezifischer Bindestellen mit 10% fötalem Kälberserum oder 10% des Serums des Tieres aus welchem der Sekundärantikörper gewonnen wurde in PBS. Der Primärantikörper wurde währenddessen in einer geeigneten Verdünnung in 1% igem BSA in PBS Lösung angesetzt, für 5 Minuten bei 10000g abzentrifugiert und nach dem Entfernen der Blockierungslösung auf die Schnitte pipettiert. Der PECAM-1 Antikörper (Ratte-anti-Maus, 1:1000 Verdünnung) wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur und der Flk-1 Antikörper (Ratte-anti-Maus, 1:10 Verdünnung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 4 mal 15 Minuten mit PBS gewaschen und mit einer 1:500 Verdünnung des Ziege-anti-Ratte Sekundärantikörpers, welcher mit Meerrettichperoxidase gekoppelt war, in einer PBS-Lösung mit 1% BSA für eine Stunde inkubiert. Nach einem Waschschrift (4x15 min) wurden die Schnitte mit einer 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol-Lösung (AEC) in 0,1 M Acetatpuffer für 5-15 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Das AEC-Substrat wird von der Peroxidase umgesetzt und als Resultat entsteht eine rote Färbung. Die Reaktion wurde durch Spülen mit Leitungswasser gestoppt und nach einer Kerngegenfärbung mit Hämalaun wurden die Gewebe mit Kaisers Gylceringelatine eingedeckelt.

Desweiteren wurden **Immunfluoreszenz**-Färbungen durchgeführt. Hierbei wurde entweder ein direkt fluoreszenzmarkierter Primärantikörper (Ratte-anti-Maus PECAM-1, 1:500) oder ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Sekundärantikörper (Ziege-anti-Ratte Alexa594, 1:500), welcher den Primärantikörper erkennt verwendet. Die Zwischenschritte mit dem Blockieren und Waschen sind identisch mit der Peroxidasefärbung, allerdings wurde hier darauf geachtet die Schnitte nach Zugabe der fluoreszierenden Antikörper dunkel zu halten, da sonst ein Ausbleichen des Farbstoffs erfolgt wäre. Eine Kernfärbung erfolgte entweder mit DAPI (Sigma; 10µg/ml) oder mit

Propidiumiodid (Sigma; 2µg/ml). Das Eindeckeln wurde mit Vectrashield®-Eindeckmedium (Vector Laboratories, USA) oder Kaisers-Glycerin-Gelatine mit 0,1% DABCO durchgeführt und die Schnitte wurden dunkel und bei 4°C gelagert.

10x PBS (pH 7,4)

NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	26,8g
KH ₂ PO ₄	2,4g
H ₂ O	ad. 1 L

AEC-Lösung

AEC-Stammlösung	15ml
(0,4 % in Dimethylformamid/DMF)	
Acetatpuffer (0,1M pH 5,2)	150ml auf 37°C vorgewärmt
H ₂ O ₂	70 µl

10x Tris-Puffer (pH 7,6)

Tris-Base	60,50g
H ₂ O	90 ml und pH mit 25% HCl auf 7,6 einstellen
NaCl	99g
H ₂ O	ad. 1 L

2.2.2.4. T.U.N.E.L Immunfluoreszenzfärbung zur Detektion von Apoptose

Für die Untersuchung von Apoptose der Endothelzellen nach dem Wundschluss wurde von uns eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Dead End[®] T.U.N.E.L. Kit der Firma Promega, bei dem die Fragmentierung der DNA während der Apoptose mittels Einbau von Fluorescein-12-dUTP gemessen wird, und unserem PECAM-1 Antikörper durchgeführt. Hierbei erfolgte an Kryogewebschnitten zunächst, gemäß dem Protokoll der Firma Promega, die T.U.N.E.L. Färbung und anschließend wie zuvor beschrieben eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem PECAM-1 Antikörper.

Zur späteren quantitativen Auswertung wurden doppelt angefärbte Strukturen von mindestens 3 Gesichtsfeldern mit 200-facher Vergrößerung pro Wunde ausgezählt.

2.2.2.5. Quantifizierung der Immunhistochemischen Ergebnisse

Die Quantifizierung der immunhistochemischen Gewebeschnitte erfolgte mit Hilfe eines Digitalmikroskops (Nikon, Düsseldorf) und der dazugehörigen Software Lucia Imaging (Laboratory Imaging Ltd., Tschechien). Wie in Abbildung 7 dargestellt, wurde an den postoperativen Tagen 3, 5, 8, 11, 12 und 18 jeweils eine Fläche des Wundbereiches festgelegt. Innerhalb diesen definierten Wundbereiches erfolgte die Ausmessung der Fläche des Granulationsgewebes, sowie der Fläche des Farbsignals der immunhistochemischen Färbungen. Die Ausmessungen erfolgten von mindestens 3 Serienschnitten pro Wunde.

Das Ausmaß der Granulationsgewebsbildung in dem beschriebenen Bereich wurde mit Hilfe eines über die Bilder projizierten Rasters mit definierter Fläche berechnet. Die Quantifizierung erfolgt anhand der gefärbten Fläche pro Fläche des Granulationsgewebes in Prozent.

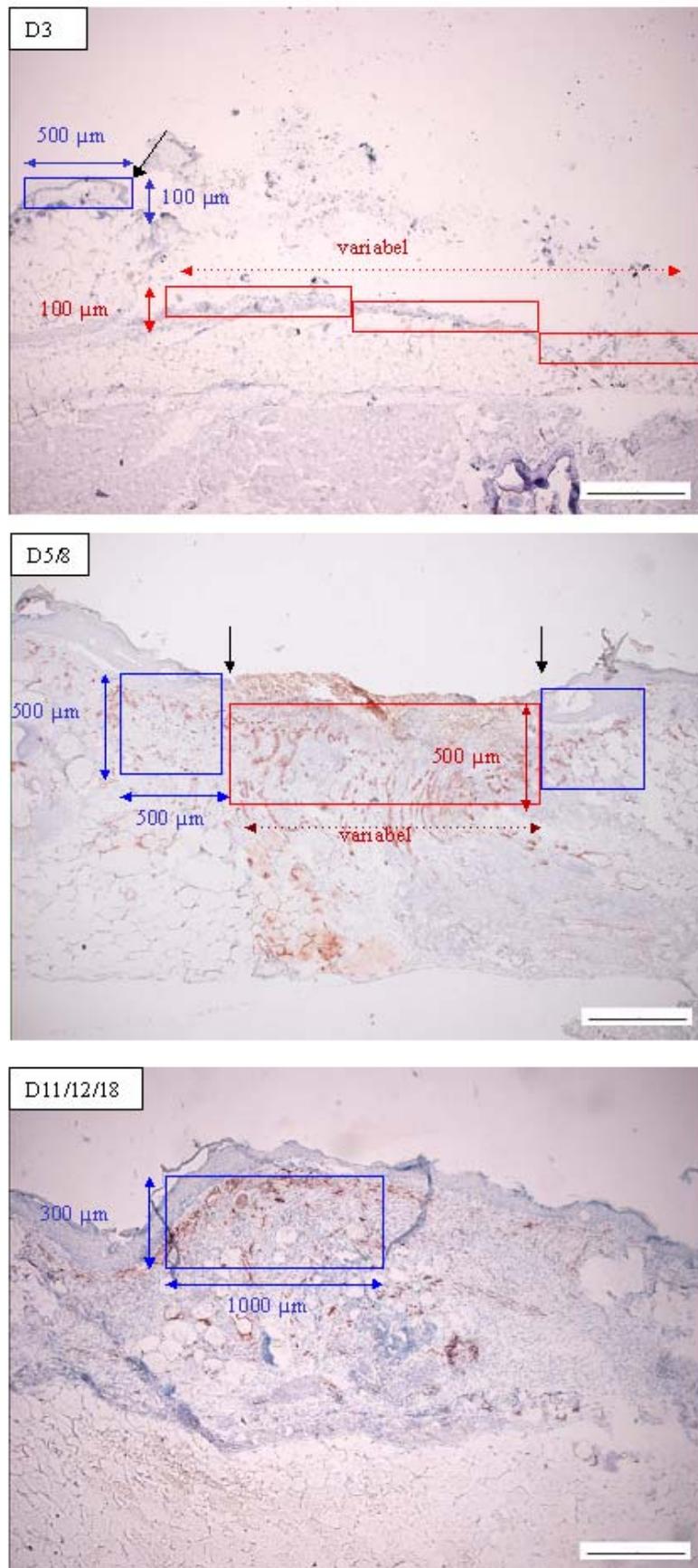


Abbildung 7: Festlegung der Fläche des Wundbereichs an unterschiedlichen postoperativen Tagen
Die blau umrandeten Bereiche stellen den Wundrand (D3, D5/8) bzw. das Narbengewebe (D11/12/18) dar.
Die rot umrandeten Bereiche markieren den Wundgrund (40x Vergrößerung; Balken entspricht 500 μm).

2.2.2.6. β -Galaktosidase Färbung

Zur Evaluierung der Transfektionseffizienz mittels Partikelbombardment erfolgte die in vivo Transfektion muriner Haut mit dem Plasmid CMV-Lac Z. Zur in situ Darstellung der β -Galaktosidase-Expression wurden Kryoschnitte ($8\mu\text{m}$) der mit dem CMV-Lac Z transfizierten Maushaut hergestellt. Die Fixierung der Schnitte erfolgte mit 1% Glutaraldehyd in PBS für 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Schnitte wurden über Nacht mit frisch angesetzter BCIG-Lösung bei 37°C inkubiert, am folgenden Tag kurz (5 min.) mit PBS gewaschen, mit Kernechtrot gegengefärbt und mit Glyceringelatine eingedeckelt.

BCIG-Lösung: (frisch ansetzen)

20mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

20mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$

1,5mM MgSO_4

in PBS lösen, pH auf 8 einstellen und sterilfiltrieren

1% BCIG-Stocklösung (50mg/ml in DMF) hinzufügen

2.2.2.7. Herstellung von Gewebelysaten

Um Protein aus Wundgewebe zu gewinnen wurde das Gewebe zunächst in Tissue Tec (Sakura, Netherlands) Einbettmedium gegeben und langsam auf Trockeneis eingefroren.

Um Gewebe zu gewinnen wurden 8-10 $20\mu\text{m}$ Schnitte mit einem Kryostaten von dem Gewebe geschnitten und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Zur Lyse des Gewebes wurde Lysispuffer (50 mM Tris pH 7,8) zugegeben, dem wahlweise ein Detergenz wie SDS (0,1-2% Endkonz.) hinzugefügt wurde. SDS wurde verwendet, wenn die nachfolgenden Untersuchungen nicht SDS sensitiv waren, wie z.B. eine Elektrophorese. Sollte jedoch beispielsweise die Plasminaktivität in dem Lysat bestimmt werden, wurde auf SDS verzichtet um die enzymatische Reaktion nicht zu beeinträchtigen. Die Homogenisierung erfolgte durch intensive Pipettierung mit dem Lysispuffer und durch Sonifizierung mit einer Ultraschallsonde. Nach Zentrifugation mit 8000g bei 4°C für 10 Minuten wurde der Überstand bei -80°C gelagert.

2.2.2.8. Bestimmung der Plasminaktivität in Gewebelysaten

Es wurden wie unter 2.2.2.7 beschrieben Gewebelysate aus murinen Wunden hergestellt. 100µl Lysat wurde das Substrat mit einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. Bei dem Substrat handelt es sich um ein fluorogenische Peptid H-D-Val-Leu-Lys-AMC (Bachem, Heidelberg) welches eine plasmin-spezifische Schnittstelle (Smith *et al.*, 1980) besitzt. Die Inkubation erfolgte für 3 Stunden bei 37°C abgedunkelt.

Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 360nm und einer Absorptionswellenlänge von 465nm in einem Immunofluoreszenzreader (Tecan). Die Plasminaktivität wurde anhand einer Standardkurve mit humanem Plasmin (Roche, Mannheim) ermittelt und zu der Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Proben normalisiert.

Plasminpuffer (für Plasminstandardkurve verwendet)

10mM	KH ₂ PO ₄
70mM	Na ₂ HPO ₄
100mM	Lysin

auf pH 7,5 eingestellt

2.2.2.9. Herstellung von rekombinantem Protein

2.2.2.9.1 Transfektion von COS-1 Zellen mit VEGF-Expressions-Konstrukten

Zur Herstellung rekombinanten humanen VEGF₁₆₅-Proteins (Wildtyp und Mutante) wurden COS-1 Zellen mit den Expressions-Konstrukten transfiziert. Die Transfektion erfolgte bei einer 70-80%igen Konfluenz der COS-1 Zellen in 10cm Zellkulturschalen. Die Zellen wurden mittels Lipofektion mit dem Superfect[®]-Reagenz (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Manuals transfiziert. Über einen Zeitraum von 2-3 Wochen wurden im Abstand von 2-3 Tagen die serumfreien Überstände der Zellen gesammelt und für spätere Analysen bei -80° C gelagert. Es wurden etwa 250ml Überstände über einen Zeitraum von einem Monat gesammelt.

2.2.2.9.2 VEGF-Protein Aufreinigung und Entsalzung

Die gesammelten Überstände wurden mit Western Blots auf ihren Gehalt an VEGF-Protein untersucht. Nach der Vereinigung der Überstände in denen VEGF-Protein detektierbar war, wurden diese mit einer peristaltischen Pumpe über Nacht bei 4° C über eine Heparin Sepharose-Säule zirkuliert. Durch die Heparinbindestelle des VEGF konnte so eine Bindung des Proteins an die Heparin-Sepharose erreicht werden. Nach der Zirkulation wurde die Überstände verworfen. Die Säule wurde am nächsten Tag zunächst mit 30 ml 0,1 M NaCl –Lösung in 50mM TrisHCl pH 8 gewaschen um die Reste des Mediums und einen Großteil unspezifischer Proteine zu entfernen. Anschließend wurde die Säule an einen FPLC-Chromatographen (Pharmacia, München) angeschlossen und mit langsam steigenden Salzkonzentrationen (0,1 M – 1 M NaCl-Lösung in 50mM TrisHCl pH 8) das gebundene VEGF von der Säule eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 1 ml gesammelt und dabei gleich mittels spektrometrischer Analyse der Proteingehalt abgeschätzt. Diese Fraktionen wurden später mit Western Blots auf ihren VEGF-Gehalt getestet. Die VEGF-enthaltenden Fraktionen wurden zu 2 Teilfraktionen vereinigt und über Sephadex-Entsalzersäulen (Amersham, München) entsalzt. Hier spielt die Porengröße der Sephadex-Matrix eine entscheidende Rolle, da die salzhaltige Lösung der Fraktionen schneller durch die Poren durchfließt als die größeren Protein-Moleküle. So können die entsalzten Proteine mit einer niedrig konzentrierten Tris-Lösung (50mM Tris-HCl pH 8) leicht verzögert eluiert werden. Die entsalzten VEGF-Lösungen wurden nun zu je 1ml lyophilisiert und bei –80° C gelagert. Für Experimente wurden die Lyophilisate mit 50mM Tris + 0,05% BSA gelöst und ein Elisa zur Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

2.2.2.10. VEGF-Elisa

Zur Bestimmung der VEGF-Konzentration wurde ein „Sandwich“-ELISA-System der Firma R&D-Systems (Wiesbaden) verwendet. Die Proben wurden als Doppelbestimmung gemäß des Protokolls des Herstellers in entsprechenden Verdünnungen eingesetzt.

2.2.2.11. Charakterisierung der Stabilität von rekombinantem VEGF₁₆₅ Protein in murinen Wundlysaten

Es wurden wie unter 2.2.2.7 beschrieben Wundlysate hergestellt. 5ng VEGF Protein (Wildtyp oder Mutante) wurden zusammen mit 15µl des Wundlysates für 2, 4 und 6 Stunden bei 37° C inkubiert. Zur Inhibition von Plasmin wurde zunächst der Plasmin-Inhibitor alpha-2-Antiplasmin in einer Konzentration von 0,7 IU/ml (Sigma) dem Wundlysate zugefügt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 5 ng VEGF-Protein hinzugegeben und für 6 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Stabilität des VEGF Proteins wurde mittels Western Blot dargestellt. Die densitometrische Auswertung der Blots erfolgte mit einem Filmdokumentationsgerät und der dazugehörigen Software der Firma BioRad (München).

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden die E.coli Bakterienzellen durch Behandlung mit CaCl₂ für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht (Cohen *et al.*, 1972). Bakterien aus einer 2 ml Übernachtskultur wurden zu 50 ml LB-Medium gegeben, so daß eine OD₆₀₀ von 0,03-0,04 erreicht wurde. Der Ansatz wurde bei 37⁰C inkubiert und zunächst stündlich, später alle 30 Minuten die Absorption der Zellsuspension bei 600 nm gemessen. Bei einem Wert von 0,3-0,4 wurden die Zellen geerntet (5 min bei 3000 g, 4⁰C). Das Pellet wurde in 1 ml kalter CaCl₂-Lösung (50mM) resuspendiert, auf das halbe Ausgangsvolumen mit kaltem CaCl₂ (50mM) aufgefüllt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert, in 1/10 des Ausgangsvolumens kaltem CaCl₂ (50mM) resuspendiert und aliquotiert. Nach zwei Stunden auf Eis konnten die Zellen transformiert werden. Zur Langzeitlagerung von kompetenten Zellen, wurden diese nach der zweiten Zentrifugation in 1/10 des Ausgangsvolumens CaCl₂ (50 mM) / Glycerin (20%) aufgenommen, aliquotiert und nach 2 Stunden auf Eis in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80⁰C.

2.2.3.2. Transformation

Bei -80°C gelagerte kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Danach wurde die zu transformierende DNA mit $100\mu\text{l}$ der Bakterien vorsichtig gemischt und der Ansatz weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, fünf Minuten auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von $900\mu\text{l}$ vorgewärmten LB-Medium (ohne Antibiotika) eine Stunde lang bei 37°C geschüttelt. Geeignete Aliquots dieser Ansätze wurden auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im 37°C -Brutschrank inkubiert.

2.2.3.3. Bakterienkulturen für Plasmidisolierungen

Der *E.coli* Stamm DH5 α dient zur Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmide. Da die verwendeten Konstrukte ein Ampicillin-Resistenzgen trugen, wurden alle plasmidhaltigen Bakterienstämme auf LB-Agarplatten bzw. in LB-Medium mit einem Zusatz von $100\mu\text{g/ml}$ Ampicillin kultiviert. 5 ml Übernachtskulturen wurden für analytische Plasmidpräparationen oder zum Animpfen von Kulturen mit einem Volumen von 100ml LB-Medium für Plasmidmididpräparationen verwendet, die über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurden.

2.2.3.4. Isolation von Nukleinsäuren

2.2.3.4.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmidminipräparation wurde mit dem „Qiaprep® Spin Miniprep Kit“ (QIAGEN, Hilden) durchgeführt und basiert auf der alkalischen Extraktionsmethode nach Brinboim und Doly (1979), wobei die DNA an Anionenaustauschersäulchen bindet.

5 ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Bakterienklon angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Kulturen wurden am folgenden Tag zunächst für zehn Minuten zentrifugiert und das Pellet in $250\mu\text{l}$ Puffer 1 (Resuspensionspuffer: neutraler Tris-Puffer mit RNase) resuspendiert. Um die Bakterien zu lysieren wurden $250\mu\text{l}$ Puffer 2 (Lysispuffer mit SDS) hinzugefügt und der Ansatz durch vorsichtiges Schwenken des Reaktionsgefäßes gemischt. Dieser Puffer enthält SDS um die bakteriellen Proteine zu denaturieren. So werden die Zellwände und andere Proteine lysiert und die Plasmid-DNA

freigesetzt. Vorsichtiges Mischen führte dazu, daß das Bakterienchromosom an der Zellwand hängenblieb und in den folgenden Schritten nicht zusammen mit Zelltrümmern und Proteinen präzipitierte und damit abgetrennt werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei RT wurde das Gemisch mit 500µl Puffer 3 (Proteinfällungspuffer: hohe Salzkonzentration; 3M KCl) neutralisiert und erneut vorsichtig geschwenkt. Durch diesen Puffer wurde das Lysat neutralisiert und die erhöhte Salzkonzentration bewirkte, daß denaturierte Proteine, Zelltrümmer und SDS ausfielen, während die Plasmid-DNA im Überstand verblieb. Dieser Überstand wurde nun auf eine QIAprep 8 Membran gegeben und die Säule mit der Membran wurde mit 1 ml Puffer PB und zweimal je 1 ml Puffer PE (beides sind Waschpuffer mit hoher Ethanolkonzentration) gewaschen. Anschließend wurde sie mit 100µl EB Puffer (niedrig molarer Tris-Puffer mit neutralem pH) eluiert, mit Ethanol gefällt und das DNA Pellet in der gewünschten Menge Wasser aufgenommen.

2.2.3.4.2. Plasmidpräparation in größerem Maßstab

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das „Qiagen® Plasmid Midi Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. 100 ml Kulturen von Bakterienklonen wurden über Nacht bei 37⁰C geschüttelt. Am folgenden Tag wurden die Bakterien durch zehnminütiges Zentrifugieren mit 3000 g geerntet und das Bakterienpellet in 4 ml Puffer 1 (Puffer wie bei 2.2.2.4) resuspendiert. Es wurden 4 ml Puffer 2 (Puffer wie bei 2.2.2.4) zugegeben, vorsichtig gemischt und fünf Minuten bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde mit 4 ml Puffer 3 (Puffer wie bei 2.2.2.4) neutralisiert und für 15 Minuten auf Eis belassen. Anschließend wurde bei 4⁰C für 30 Minuten zentrifugiert (20000 g) und der Überstand auf die zuvor mit 4 ml Puffer QBT (Salzhaltige Ethanollösung zum waschen und aufquellen der Säulenmatrix) equilibrierte Qiagentip 100 Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 10 ml Puffer QC (Waschpuffer mit hohem Ethanolanteil) gewaschen und die DNA schließlich mit 5 ml Puffer QF (Elutionspuffer s.o.) eluiert. Die DNA wurde zuerst mit Isopropanol und anschließend einmal mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in der gewünschten Menge Wasser aufgenommen. Die Ausbeute dieser Präparation lag bei ca. 1µg DNA /ml Kulturvolumen.

2.2.3.4.3. Gesamt-RNA-Isolierung aus Maushaut

Die Gesamt-RNA-Isolierung aus Maushaut erfolgte nach der Methode von Chomcynski (1987). Zunächst wurde die Maushaut auf Trockeneis mittels eines frischen Skalpels so klein wie möglich geschnitten. Anschließend wurden diese Gewebstücke in GTC-Puffer aufgenommen, mit β -Mercapto-Ethanol versehen und auf Eis mittels eines Ultra-Thorax (Janke & Kunkel) homogenisiert. Danach wurde die RNA mittels Phenol/Chloroform-Fällung präzipitiert und über Nacht mit Isopropanol gefällt. Es folgte ein DNase-Verdau mit anschließender Phenol-Fällung. Nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration und einem Kontrolllauf auf einem Agarosegel zur Qualitätsbestimmung, konnte die RNA zur Herstellung einer cDNA verwendet werden

GTC-Puffer (4°C, dunkel)

4M	Guanidinium thiocyanat
25mM	Na-Citrat pH 7
10 %	Sarcosyl (N-Lauroylsarcosine)

2.2.3.5. Spektrometrische Bestimmung der RNA oder DNA Menge

Da RNA und DNA in Lösung ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm hat, kann man durch die Bestimmung der Absorption im UV-Spektralphotometer die Konzentration dieser Nukleinsäure errechnen. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Nukleinsäure. Da Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben, kann man durch Bestimmung des Quotienten $\text{Absorption}_{260} / \text{Absorption}_{280}$ die Reinheit der DNA-Präparation bestimmen. Eine saubere Nukleinsäure-Präparation sollte einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 haben.

Um die Qualität der DNA zu überprüfen, wurden verschiedene Verdünnungen der Nukleinsäure-Probe neben einem Mengenstandard (z.B. λ -DNA mit *HindIII* geschnitten) auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach dem Gellauf konnten die durch Einlagerung von Ehtidiumbromid mit UV-Licht sichtbar gemachten Banden ausgewertet werden.

2.2.3.6. Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsspaltungen von DNA wurden zu analytischen (z.B. Maustypisierung) oder präparativen Zwecken (z.B. Umklonierung in ein anderes Plasmid) mit Restriktionsendonukleasen unter den angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Ein 25 µl Standardansatz setzte sich wie folgt zusammen:

100-500 ng	DNA
2,5 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	Enzym (5-10 U)
ggf. 1/100 Vol.	100x BSA

ad. Aqua bidest. 25 µl

Der Ansatz wurde bei der für das Enzym optimalen Temperatur für mindestens zwei Stunden inkubiert. Die Spaltung wurde anschließend auf einem Agarosegel überprüft.

2.2.3.7. Auftrennung von DNA auf Agarosegelen

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren wurden 1%ige Agarosegele verwendet, die eine gute Auflösung von Fragmenten im Bereich von ca. 500-10000 bp gewährleisten. Um Längenunterschiede von 10-30 bp sichtbar zu machen, wurden 3%ige Gele benutzt. Die Gele wurden mit 3-5 µl Ethidiumbromid versetzt um die aufgetrennten DNA-Banden im UV-Licht sichtbar zu machen.

Es konnte auch die Qualität von isolierter Plasmid-DNA untersucht werden, da diese je nach Zustand (supercoiled, „nicked“ oder linearisiert) ein unterschiedliches Laufverhalten aufweist. Die aufzutrennenden Nukleinsäureproben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragslösung (5-fach: Bromphenolblau-Lösung (0,001%) mit Glycerin (30%) in 50 mM EDTA) in die Geltaschen pipettiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard diente eine 1 Kb-Leiter, die DNA-Fragmente definierter Größe enthält und als Mengenstandard wurde mit *HindIII* geschnittene λ -DNA verwendet oder eine 100 bp Leiter der Firma New England Biolabs.

2.2.3.8. Nukleinsäuretransfer auf Cellulosemembran (Southern-Blot)

Nach elektrophoretischer Auftrennung in Agarosegelen wurde die DNA mit Hilfe des Southern Blots (Southern, 1975) auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Das Gel wurde zunächst 20 min in 250 mM HCl-Lösung geschwenkt, einige Male mit Wasser gespült und dann weitere 30 min in Alkali-Transfer-Lösung (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl) geschwenkt. Der Transfer auf die Membran erfolgte über Nacht durch die Kapillarwirkung von Whatmanpapier und Papiertüchern mit Alkali-Transfer-Lösung. Die Membran wurde anschließend zur Fixierung der DNA im „UV-Crosslinker“ (Stratagene, Heidelberg) bestrahlt und anschließend konnte sie hybridisiert werden.

2.2.3.9. Radioaktive Markierung von DNA

Zur radioaktiven Markierung von doppelsträngiger DNA für die GAPDH-Sonde wurde das „LaddermanTM Labeling Kit“ von Takara benutzt, das auf dem von Feinberg und Vogelstein (1983) vorgestellten Prinzip des *Random Priming* basiert. Es wurden 20 ng doppelsträngiger Plasmid-DNA (für GAPDH) eingesetzt, die durch Restriktion und anschließender Auftrennung über eine Agarosegel gewonnen wurde. Die Markierung erfolgte durch die Zugabe von 1.87 Mbq [α -³²P]dCTP (spezifische Aktivität > 111 TBq/mmol; ICN, Eschwege) nach der Vorschrift des Herstellers.

Zur Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide wurde die markierte DNA über eine Sephadex-G50-Säule („Probe QuantTM G-50 Micro Columns“, Amersham Pharmacia) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Alternativ wurden für die VEGF-Sonde spezifische Primer verwendet, welche mittels Terminaler Transferase (Roche, Mannheim) an ihrem 3'-Ende mit [α -³²P]dCTP markiert und anschließend durch eine EtOH-Fällung aufgereinigt wurden.

Ein Aliquot des Eluats wurde im β -Zerfallszähler (Beckman) gemessen um den Erfolg der Markierung abzuschätzen.

2.2.3.10. Hybridisierung mit DNA-Sonden

Die zu hybridisierende Membranen wurden zunächst in Prähybridisierungs-Lösung (4xSSC, 0,4 % [w/v] Milchpulver, 4 % [w/v] SDS, 0,3 mg/ml ssDNA) bei 65 °C für mindestens 1 h vorhybridisiert. Im Anschluß wurde Hybridisierungs-Lösung (4xSSC,

0,4 % [w/v] Milchpulver, 4 % [w/v] SDS, 20 % [w/v] Dextransulfat, 0,3 mg/ml ssDNA) verwendet und über Nacht bei 65 °C mit der denaturierten Sonde hybridisiert. Am folgenden Tag wurde zunächst 20 min bei 65 °C mit 2 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen, dann bei gleicher Temperatur 30 min mit 0,1 x SSC / 0,1 % SDS. Auf die Membranen wurden Filme bei -80 °C in Röntgenkassetten exponiert.

Sollten die Filter mit einer weiteren Probe hybridisiert werden, wurden sie zum Entfernen der alten Sonde zweimal je 30 min bei 80 °C mit 0,1 x SSC / 0,1 % SDS gewaschen

2.2.3.11. Reverse Transkription von mRNA zu cDNA

Die reverse Transkription erfolgte mit dem „Superscript First Stand Synthesis System for RT-PCR“ der Firma Life Technologies . Hierbei wird unter Verwendung von Oligo (dT)s, welche an den PolyA-Schwanz der mRNA binden, und einer MLV Reversen Transkriptase aus mRNA die komplementäre cDNA generiert. Es wurde gemäß dem Protokoll vorgegangen.

Ansatz Erststrangsynthese

1 bis 2 µg	gesamt RNA
1µl	Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (0,5µg/µl)

Inkubation für 10 Minuten bei 70°C und anschließend für 1 Minute auf Eis.

Hinzugabe folgender Komponenten:

2µl	10x PCR-Puffer
2µl	25mM MgCl ₂
1µl	10mM nNTP-Mix
2µl	0,1 M DTT

Der Ansatz wurde kurz gemischt, herunterzentrifugiert und für 6 min bei 42° C inkubiert. Für die eigentliche cDNA-Synthese wurde 1µl „SuperScript II“ reverse Transkriptase zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 42° C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch 15 minütige Erwärmung auf 70° C gestoppt. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wurde dem Ansatz 1µl RNase H-Lösung zugefügt und das Ganze für 20 min bei 37° C inkubiert um RNA-Reste zu entfernen.

Die so generierte cDNA wurde für eine anschließende Polymerase-Kettenreaktion verwendet um das gesuchte Transkript zu amplifizieren.

2.2.3.12. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA Sequenzen, die durch die Bindung zweier Primer an eine DNA-Matrize begrenzt werden (Mullis und Fallona, 1987). Die Primer werden so gewählt, daß sie den zu amplifizierenden Bereich einrahmen und jeweils in 5'-3'-Richtung an einen der beiden DNA-Stränge hybridisieren. Ein PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Template-DNA/RT-Ansatz	10-20 ng
Primer forward	200 nM
Primer backward	200 nM
dNTPs	200 µM
10x Polymerase-Puffer	10 µl
Polymerase	1-2 U
MgCl ₂	1-2 mM
Wasser	ad 100 µl

Die in dieser Doktorarbeit benutzten Polymerasen waren die *Taq*- und die *Pfu*-Polymerase. Die *Pfu*-Polymerase besitzt eine 3'-5' Exonukleaseaktivität und erzeugt am PCR-Amplifikat nur glatte Enden, während die *Taq*-Polymerase überstehende Enden liefert. Die Ansätze wurden in einem PCR-Thermoblock inkubiert. Die Amplifikationsreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

VEGF, GAPDH:

95° C 3 min

95° C	45 s	}	35 Zyklen
62° C	45 s		
70° C	45 s		

70° C 5 min

Zur Analyse der Amplifikation wurde nach der PCR ein Zehntel des Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen.

Verwendete Primer

* **VEGF**

forward

5'-GAG TCC AAC ATC ACC ATG CAG-3'

backward

5'-TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA A-3'

***GAPDH**

forward

5'-TCA TGA CCA CAG TCC ATG CCA TCA C-3'

backward

5'-GCC AAA TTC GTT GTC ATA CCA GGA AAT GA-3'

2.2.4. Mausexperimente

2.2.4.1. Mauszucht

Zur Zucht von homozygoten Leptinrezeptor-defizienten Mäusen (C57 BLKS / J-m $+/+$ $Lepr^{db}$) dienten 1:1 oder 2:1 Verpaarungen (weiblich : männlich) heterozygoter Tiere. Nach 3 bis 4 Wochen sollte sich bei den weiblichen Tieren eine Trächtigkeit eingestellt haben, ansonsten wurden die Tiere mit anderen Partnern zusammengesetzt. Sobald die weiblichen Tiere eindeutig trächtig waren wurden sie von den männlichen getrennt. Nach dem Wurf wurden die Jungtiere für 3 Wochen bei der Mutter belassen und anschließend nach männlich und weiblich getrennt und typisiert.

2.2.4.2. Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung der db/db Mäuse erfolgte in etwa 3 Wochen alten Nachkommen mittels genomischer DNA, welche aus einem Stück Mausschwanz gewonnen wurde. Etwa 1 cm Mausschwanz wurde mit 500 μ l Lysispuffer + 10 μ l Proteinase K (20mg/ml von Peqlab, Erlangen) über Nacht unter Schütteln bei 55°C gelöst. Am folgenden Tag wurden die Lysate 8 Min. bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein mit 1000 μ l absoluten Ethanol gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzem Schütteln fiel die genomische DNA aus und wurde mit einer zugeschweißten Pasteurpipette aus der Lösung genommen. Die DNA wurde dann in ein mit 750 μ l 70%igen Ethanol gefülltes Eppendorfgefäß gegeben und nach 3 Minuten Inkubation wieder entnommen und an der Luft für 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die DNA in ein mit 150 μ l TE-Puffer gefülltes Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei 50°C unter Schütteln gelöst.

Am nächsten Tag wurde mit 3 μ l der gelösten DNA eine PCR durchgeführt und das PCR-Produkt mit RSA I geschnitten um eine eindeutige Identifizierung des Genotyps zu ermöglichen. Die Primer sind hierbei so gewählt, dass sie das Stück genomischer DNA amplifizieren, welches die Punktmutation aufweist. Diese Mutation führt zum Verlust einer Base, was zu einer Verschiebung des Leserasters und zum Verlust der Splice-Stelle an der Exon-Intron-Grenze von Exon 12 führt, sowie zum anderen eine Rsa I Schnittstelle generiert, welche eine Identifizierung der Mutation mit Hilfe einer Restriktionsanalyse ermöglicht.

Lysispuffer (zur Isolation von genomischer DNA aus Mausschwänzen)

Tris pH 7,8	50mM
EDTA	50mM
NaCl	100mM
DTT	5mM
Spermidin	0,5mM
SDS	2%

PCR-Bedingungen (nach Protokoll Jackson Laboratories, USA)

5 Min.	95°C] 35 Zyklen
30 sec	95°C	
30 sec	52°C	
30 sec	72°C	
5 Min.	72°C	

*Primer für Genotyp PCR

forward

5'-AGAACGGACACTCTTTGAAGTCTC-3'

backward

5'-CATCAAACCATAGTTTAGGTTTGTGT-3'

Banden nach RSA I Restriktion im Agarosegel

WT mit intaktem Leptin-Rezeptor:	135 bp
Heterozygote Tiere:	135 bp & 108 + 27 bp
Homozygote Tiere:	108 + 27 bp

2.2.4.3. Kutaner Gentransfer mittels Partikelbombardment

Bei dem Partikelbombardment handelt es sich um eine physikalische Gentransfermethode, welche sich insbesondere für den *in vivo* Gentransfer eignet. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Plasmid-DNA an einen Mikrocarrier (Gold) gebunden und mittels hohem Heliumdruck beschleunigt wird, so dass die mit Plasmid-DNA beladenen Partikel in die geeignete Zielzelle eindringen können. Dabei kann der Transfer des Transgens in die geeignete Zielzelle durch die Wahl des entsprechenden Heliumdrucks kontrolliert werden. Die Transfektionseffizienz wird bestimmt durch Heliumdruck, „Microcarrier Loading Quantity“ (MLQ; pro Transfektion applizierte Menge des Carriers) und „DNA Loading Ratio“ (DLR; pro Transfektion applizierte Menge an DNA).

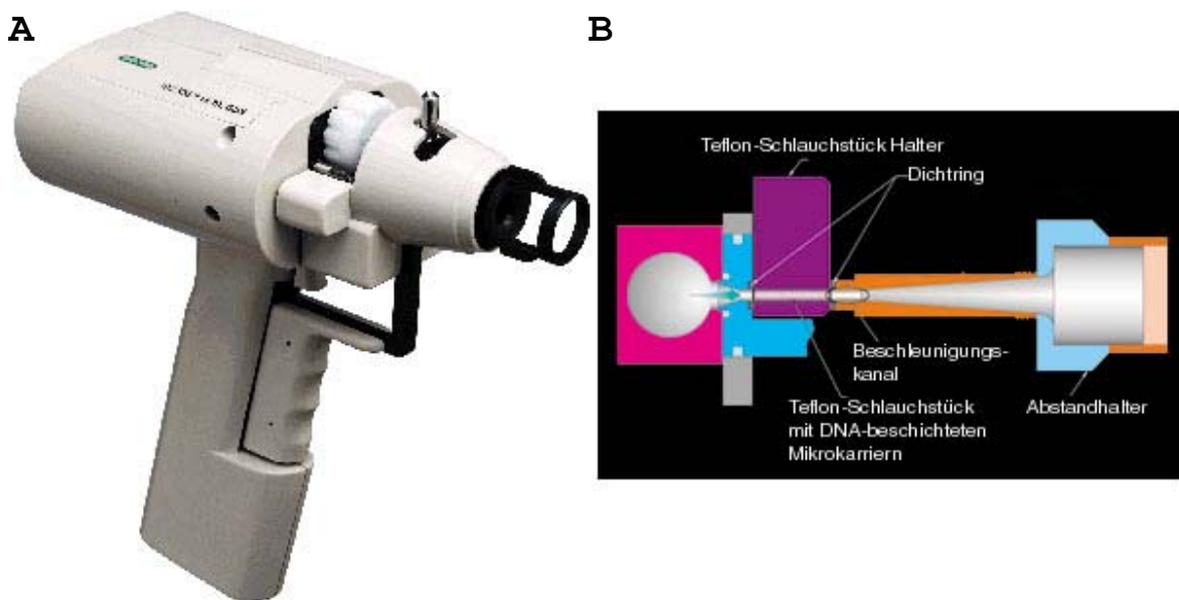


Abbildung 8: A) Helios Gene-Gun (BioRad, München). B) Ansicht des vorderen Teil des Gerätes im Querschnitt. Durch die im Revolver (Teflon-Schlauchstück Halter) platzierten Teflon-Schlauchstücke, welche mit Expressions-Plasmid assoziiertem Mikrocarrier beschichtet sind wird kurz hoher Heliumdruck geleitet. Dabei lösen sich die Mikrocarrier und werden durch den Beschleunigungskanal direkt in das Gewebe und die darin liegenden Zellen geschossen. Hier kommt es nun zur transienten Expression der an den Mikrocarrier gebundenen DNA.

2.2.4.3.1. Herstellung beschichteter Teflon-Schlauchstücke für Partikelbombardment

Zunächst werden die Goldpartikel mit einem Durchmesser von $1\mu\text{m}$ abgewogen und die gewünschte DNA-Menge in einem Eppendorfgefäß vorgelegt. Die Goldpartikel dienen als Mikrocarrier für die DNA. Entsprechend des Volumens der gelösten Plasmid-DNA wird zu den Goldpartikel 0,05M Spermidin gegeben; dieses Gemisch wird kurz gevortext und anschließend für 5 Sekunden mittels Ultraschall-Behandlung ein Verklumpen der

Goldpartikel vermieden. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe der DNA und das Gemisch wird für 5 Sekunden gevortext und sonifiziert. Zur Präzipitation der DNA auf den Goldpartikeln wird bei geringer Geschwindigkeit auf dem Vortexer das gleiche Volumen 0,5 M CaCl₂ langsam hinzugefügt. Das Gold-DNA-Gemisch wird nun für 10 Minuten bei Raumtemperatur präzipitiert. Es folgt eine Zentrifugation (15 sec) nach der der Überstand verworfen wird und das Pellet mit 1 ml absolutem Ethanol resuspendiert und gewaschen wird. Erneut wird 5 sec. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml absolutem Ethanol resuspendiert. Dieser Waschschritt wird 3 mal wiederholt. Schließlich wird das Pellet mit 3,5 ml wasserfreiem Ethanol + PVP (0,1mg/ml) gelöst und in den Teflon-Schlauch aufgezogen.

Der befüllte Schlauch wird in die Beschichtungsapparatur eingespannt und innerhalb von 2 Minuten setzen sich die Goldpartikel ab. Mit einer peristaltischen Pumpe wird anschließend die flüssige Phase des Ethanol-Goldgemisches abgesaugt (4-6 ml/min). Der Schlauch wird nun für 4 Minuten in der Apparatur rotiert. Zum Trocknen wird nach Ablauf der Zeit Stickstoff (0,35-0,4 LPM Durchfluss) durch den Schlauch geleitet, während dieser für weitere 6 Minuten rotiert. Abschließend werden die gleichmäßig beschichteten Schlauchstücke in 1,27 cm lange Stücke zerschnitten und mit Siliciagel bei 4°C gelagert.

2.2.4.3.2. Kutaner *in vivo* Gentransfer in der Maus

Die Transfektion mittels Partikelbombardment wurde unter Narkose (Ketanest 4,75mg/ml; Rompun 0,01%) durchgeführt. Die Tiere wurden rasiert und um das Stratum Corneum zu entfernen wurde die Haut zusätzlich mit Veet Sensitive[®] behandelt (1 min Einwirkdauer und anschließend gründliche Entfernung mit sterilem Wasser und Tupfer). Vor der Transfektion wurde die Haut mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

Die Transfektionseffizienz stellt sich als eine Funktion aus Heliumdruck, Zahl der Mikrokarrier („Microcarrier Loading Quantity“ : MLQ) und Menge an Plasmid-DNA („DNA Loading Ratio“ : DLR) dar. In Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen für unsere Fragestellung ermittelt.

Die Transfektion wurde mit einem Heliumdruck von 300 Psi (~ 21 bar), einer MLQ von 25 mg Goldpartikel und einer DLR von 3-5 µg Plasmid-DNA durchgeführt; der Lauf der Apparatur wurde auf die gewünschte Stelle aufgesetzt und der Abzug betätigt. Es wurden pro Wunde 2 überlappende Bereiche transfiziert (jeweils ca. 1 cm Durchmesser) und in

deren Schnittstelle die Wunde gesetzt, so dass die Wunde von einem ca. 0,5 cm breiten Rand transfizierten Gewebes umgeben war.

2.2.4.4. Wundsetzung

Die Wundsetzung erfolgte mit Biopsiestanzen (Stiefel, Offenbach) der Größe 6 mm. Die Mäuse wurden mit Ketanest/Rompun-Narkose betäubt, enthaart, je nach experimentellem Ansatz transfiziert und dann mit der Biopsiestanze eine Exzisionswunde gesetzt. Um eine gleichmäßige und runde Wunde zu erzeugen wurde die Stanze auf die Haut gesetzt und unter leichtem Druck gedreht. Diese Wunden umfassten die Epidermis, die Dermis, das subkutane Fettgewebe und den murinen Hautmuskel bis zur Körperfaszie.

Die in der Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden anhand von 4 zeitlich voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. Es wurden maximal 4 Wunden auf den Rücken einer Maus gesetzt. Die Positionen von Kontroll- und experimentellen Wunden wurden rotiert um einen Positionseffekt auszuschließen. Die Wunden wurden täglich inspiziert, Verschmutzungen vorsichtig aus den Wunden entfernt und regelmäßig fotografisch dokumentiert.

Experiment 1:

Vergleich der Wundheilung von Balb/c und db/db Mäusen; Analyse des Wundschlusses durch Planimetrie an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 21.

(Balb/C n=10 ; db/db n=10)

Experiment 2:

Die Wundbehandlung von db/db Mäusen erfolgte mit Methylcellulose (Kontrolle), rekombinatem humanen VEGF₁₆₅ Protein (rhVEGF₁₆₅) in Methylcellulose (1µg Protein täglich für 7 Tage ab Tag 1 post op), Transfektion mit CMV-hVEGF₁₆₅ oder CMV-Lac Z (Kontrolle) Plasmid-DNA (MLQ:25 mg ; DLR: 5 µg ; 300 Psi). Analyse des Wundschlusses durch Planimetrie an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15 und 18. An den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 8, 11 und 18 wurde Wundgewebe zur Untersuchung entnommen; an jedem Zeitpunkt n=10 Wunden pro Behandlungstyp.

Experiment 3 und 4 (zwei im Aufbau gleiche, zeitlich voneinander unabhängige Experimente):

Die Wundbehandlung von db/db Mäusen erfolgte mit Transfektion von CMV- Lac Z, CMV-hVEGF₁₆₅ Wildtyp oder CMV-hVEGF₁₆₅ Mutante

(MLQ:25 mg ; DLR: 5 µg ; 300 Psi)

Analyse des Wundschlusses durch Planimetrie an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15 und 18. An den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 8, 12, 18 wurde Wundgewebe zur Untersuchung entnommen; an jedem Zeitpunkt n=10 Wunden pro Behandlungstyp

2.2.4.5. Planimetrie der Wunden

Die Wunddokumentation erfolgte durch Fotografieren der Wunden zusammen mit einem Größenstandard an definierten Tagen nach Wundsetzung mit dem Dental Eye (Olympus, Japan) Die Verwendung einer festen Brennweite sowie der Größenstandard ermöglichten später einen Vergleich der Wundfläche. Zur Erreichung der Wundgröße wurden die Fotos eingescannt und die Wundgröße mittels Adobe Photoshop (Adobe, USA) ermittelt.

2.2.4.6. Quantifizierung der Granulationsgewebsbildung

Anhand immunhistochemischer PECAM-1 Färbungen wurde die Bildung von Granulationsgewebe semiquantitativ bestimmt. Hierbei wurde wie unter 2.2.2.7 beschrieben über eine definierte Fläche mit Hilfe eines digitalen Mikroskops ein Raster bekannter Größe gelegt. Innerhalb dieses definierten Areals wurde durch das Raster die Fläche des Granulationsgewebes berechnet und als Prozent der Gesamtfläche dargestellt. Die Messungen erfolgten an Wundgeweben der postoperativen Tage 1, 3, 5, 8 und 12.

2.2.4.7. Bestimmung der Reepithelialisierung

Anhand immunhistochemischer PECAM-1 und FLK-1 Färbungen wurde der Abstand der Ränder des bei der Wundsetzung durchtrennten murinen Hautmuskels in Relation zu dem Abstand der epithelialen Wundränder gesetzt. Dies wurde für Wundgewebe aus dem Zentrum der Wunde an den postoperativen Tagen 1, 3, 5, 8 und 12 durchgeführt.

Das Ausmaß der Reepithelialisierung wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Reepithelialisierung (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Abstand epithelialer Wundrand}}{\text{Abstand Hautmuskel}} * 100 \right)$$

2.2.5. Berechnung der statistischen Signifikanz

Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurden die ermittelten Werte mit der SPSS Software (SPSS GmbH, München) zunächst auf ihre Normalverteilung überprüft und dementsprechend ein “paired“ (bei gegebener Normalverteilung) oder ein “unpaired“ (keine Normalverteilung) Student’s t-Test durchgeführt. Signifikanz war gegeben bei einem p-Wert von weniger als 0,05.

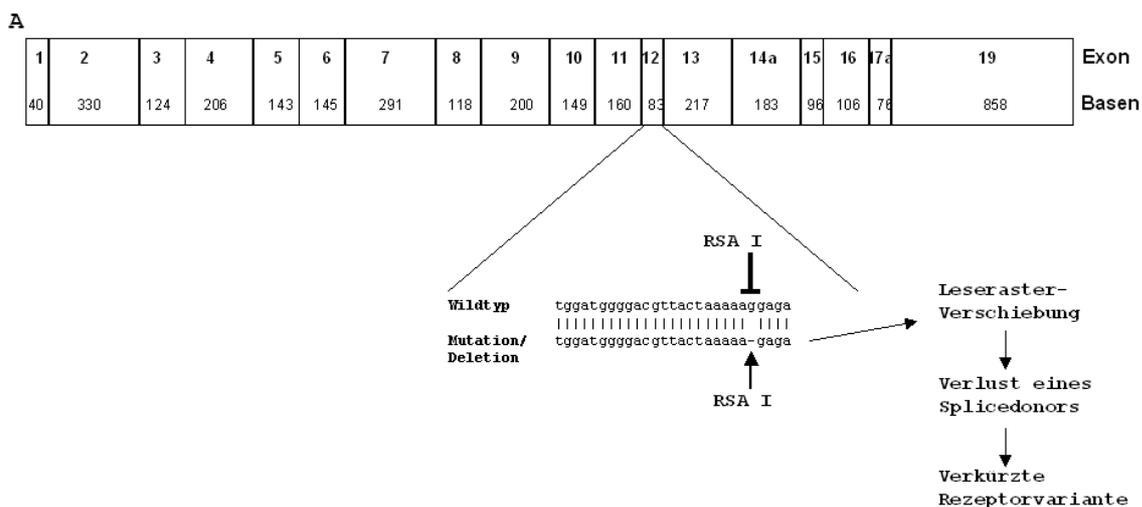
3. Ergebnisse

3.1. db/db Mausmodell: Zucht und Typisierung

Um in ausreichenden Mengen und unabhängig von dem Zulieferer diabetische Mäuse zur Verfügung zu haben entschlossen wir uns selber db/db Mäuse zu züchten. Da die homozygoten Tiere infertil sind, ist eine Zucht über die Verpaarung von heterozygoten db/+ Tieren mit einer anschließenden Typisierung und Selektionierung möglich.

Die Zucht sollte nach Mendel etwa 25% db/db Tiere, 25 % Wildtyp und die Hälfte heterozygote Tiere liefern. Unsere Zucht zeigte uns, dass das Verhältnis db/db zu Wildtyp deutlich in Richtung Wildtyp verschoben war.

Für die Typisierung wurden die Tiere nummeriert und eine Schwanzbiopsie entnommen. Aus dieser wurde genomische DNA isoliert und mittels einer spezifischen PCR der Bereich in dem die Mutation liegt amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass sich ein PCR Fragment von 130 Basen ergibt. Die mutierte Sequenz des Leptinrezeptors ist in Abbildung 9 A dargestellt. Durch einen Restriktionsverdau des PCR-Produktes konnten alle drei möglichen Allelkombinationen (homozygot Wildtyp, homozygot Mutante und heterozygot Wildtyp/Mutante) durch Auftrennung auf einem Agarosegel eindeutig bestimmt werden. Die Wildtyp-Form besitzt 2 Allele welche sich nicht schneiden lassen, während die heterozygote Form ein gesundes und ein mutiertes Gen aufweist und somit eine Doppelbande liefert. Die db/db Form hingegen besitzt nur das mutierte Gen und liefert somit nur die schneidbare Variante des PCR-Produktes, welche im Agarosegel schneller/niedriger läuft als das ungeschnittene „gesunde“ PCR-Produkt (exemplarisches Bild eines Agarosegels in Abbildung 9 B).



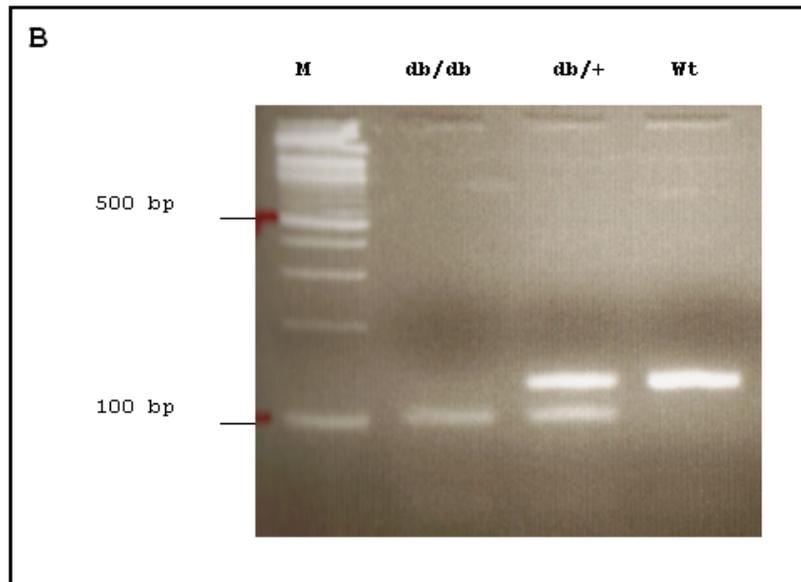


Abbildung 9: Typisierung der homozygoten db/db Mäuse über PCR und Restriktion. A) Exonstruktur des Leptinrezeptorgens. Bei der db/db Maus existiert eine Deletion, in Exon 12 die zu einer Verschiebung des Leserasters und so zu einem verkürzten Rezeptor führt. Darüber hinaus generiert die Deletion eine RSA I Restriktions-schnittstelle, welche zur Typisierung verwendet wird. **B)** Foto eines mit Etidiumbromid gefärbten Agarosegels mit den drei möglichen Genotyp-Varianten. db/db beide Allele mit Deletion, somit nur eine niedrig laufende Bande. db/+ sowohl ein Allel mit Deletion als auch eines ohne, deshalb 2 Banden. Wildtyp (Wt) keine Deletion und somit keine Restriktion mit RSA I, folglich auch nur eine weiter oben laufende Bande.

3.2. Charakterisierung des db/db Mausmodells: Blutzucker und Körpergewicht

Zur Charakterisierung der db/db Mäuse wurden Blutzucker und Gewicht der Tiere zwischen der 4. und 16. Lebenswoche bestimmt und zum Vergleich 8-10 Wochen alten heterozygoten Tieren gegenüber gestellt. Der Blutzucker war in den db/db Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu den db/+ Mäusen (siehe Abb. 10 A). Wie bereits am Phänotyp erkennbar waren die homozygoten Tiere beinahe doppelt so schwer wie die gleichalten heterozygoten Mäuse (siehe Abb. 10 B).

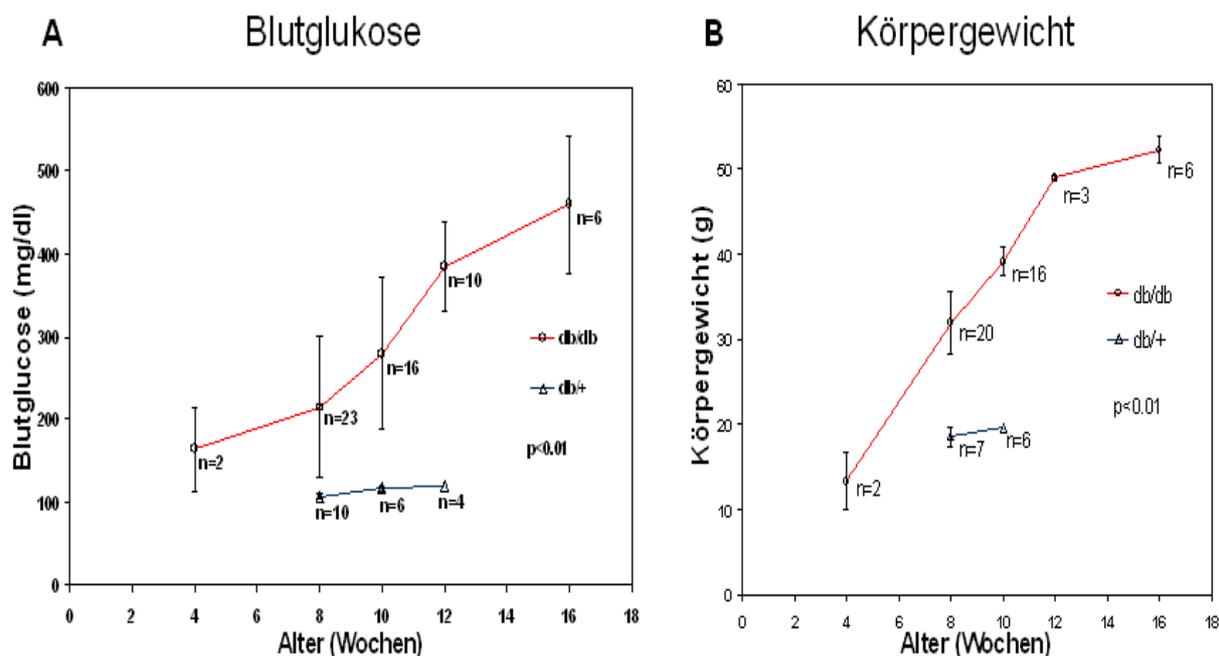


Abbildung 10: Serum Blutzucker-Bestimmung (A) und Körpergewicht (B) von db/db und db/+ Mäusen verschiedenen Alters. Es besteht an allen verfügbaren Zeitpunkten eine Signifikanz zwischen den heterozygoten und den homozygoten Mäusen ($p < 0,01$; n Zahl variabel und jeweils angegeben).

3.3. Ermittlung optimaler Transfektionsbedingungen mittels Partikelbombardment im Mausmodell

Initiale Versuche zur Etablierung der Transfektion von Maushaut erfolgten in C57 Bl/6 Mäusen mit einem CMV-Lac Z Expressionsplasmid. Die Transfektionseffizienz wird bestimmt durch die Faktoren Heliumdruck, „Microcarrier Loading Quantity“ (Menge der Mikrokarrier; MLQ), die Größe der Mikrokarrier (konstant $1\mu\text{m}$ Durchmesser) und „DNA Loading Ration“ (Menge der DNA; DLR). Anhand unserer Ergebnisse konnten folgende Parameter für eine optimale Transfektion ermittelt werden (siehe hierfür auch repräsentative Bilder unserer Vorversuchen in Abbildung 11):

Druck 300 Psi, Goldmenge 25 mg ($\varnothing 1\mu\text{m}$) / Transfektion und 5 μg Plasmid-DNA / Transf .

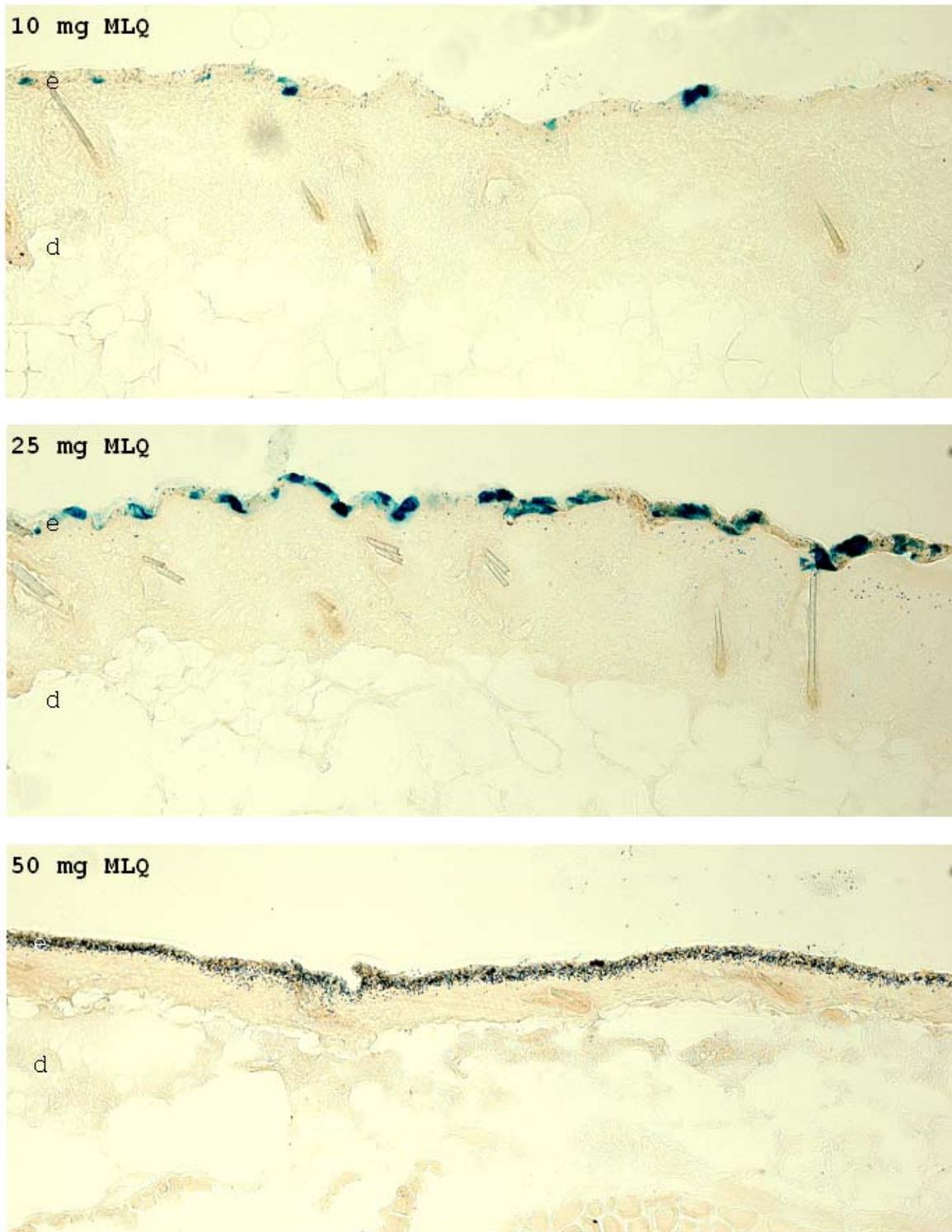


Abbildung 11: Kutaner in vivo Gentransfer mittels Partikelbombardment mit unterschiedlichen MLQs. Alle Transfektionen erfolgten mit dem CMV-Lac Z Konstrukt mit einer DLR von $1\mu\text{g}$ Plasmid-DNA , 300 Psi Heliumdruck und einer MikrokarriergroÙe von $1\mu\text{m}$. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Tiere getötet, Haut entnommen und zur Anfertigung von Kryoschnitte verwendet. Die Goldpartikel sind lokalisiert in der Epidermis und der oberen Dermis. Die Gewebeschnitte der transfizierten Haut wurden dann mit X-Gal gefärbt (blaue Färbung). Abgebildet sind Transfektionen mit MLQ von 10mg, 25mg und 50mg Goldpartikel. (100x Vergrößerung; e= Epidermis; d= Dermis).

3.4. Bestimmung der Expressionsdauer nach Partikelbombardment

Für die Untersuchung der Expressionsdauer wurden Mäuse mit dem CMV-hVEGF₁₆₅ Plasmid transfiziert und an definierten Tagen nach der Transfektion getötet. Die transfizierten Hautbereiche wurden zur RNA-Isolierung verwendet und mit der aufgereinigten RNA eine reverse Transkription durchgeführt. Aus der entstandenen cDNA wurde anschließend mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) die VEGF-Transkripte selektiert und amplifiziert. Die Primer erkannten sowohl die endogene murine Form als auch die transfizierte humane Form, so daß beide Formen amplifiziert wurden. Die Unterscheidung der beiden Formen erfolgte durch die Spaltung des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym Dde I welches die humane Form schneidet, jedoch nicht die murine (siehe Abbildung 12 A). Zur Veranschaulichung wurden die so behandelten Proben für einen Southern Blot verwendet, der in Abbildung 12 B zu sehen ist. Die Expression des Transgens war bis zu 7 Tage nach Transfektion erkennbar. Somit konnten wir eine transiente Transfektion des Transgens in Maushaut nachweisen.

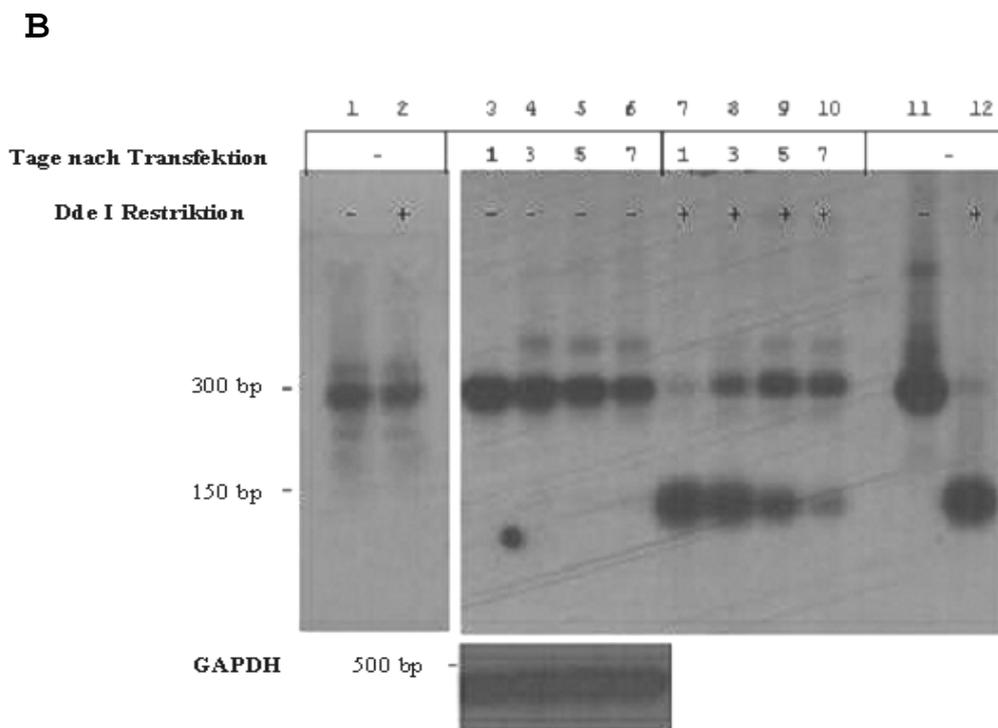
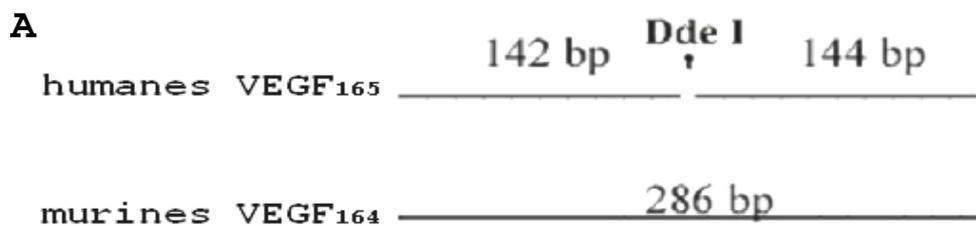


Abbildung 12: Bestimmung der Transfektionsdauer. A) Restriktionsschema für RT-PCR-Produkte aus mit CMV-hVEGF₁₆₅ transfizierter Maushaut. Das humane Amplikon kann von Dde I geschnitten werden, das murine PCR-Produkt nicht.

B) Southern Blot der RT-PCR-Produkten an verschiedenen Tagen nach Transfektion, mit und ohne Dde I Restriktion. Bahn 1 und 2: untransfizierte Maushaut mit (2) und ohne (1) Dde I Behandlung. Bahn 3-6: transfizierte Maushaut der Tage 1, 3, 5 und 7 ohne Dde I Restriktion. Bahn 7-10: transfizierte Maushaut der Tage 1, 3, 5 und 7 mit Dde I Restriktion. Bahn 11 und 12: PCR von CMV-hVEGF₁₆₅ Plasmid mit (12) und ohne (11) Dde I Behandlung. Untere Bahn 3-6: GAPDH Kontrolle für identische Mengen eingesetzter mRNA.

3.5. Wundheilungsuntersuchung nach VEGF₁₆₅ –Behandlung

3.5.1. Wundschlussuntersuchungen nach VEGF₁₆₅ –Behandlung

Wundheilungsexperimente mit VEGF-Behandlung erfolgten in einem SPF- Tierstall mit zwei verschiedenen Ansätzen. Zum einen wurde rekombinantes humanes VEGF₁₆₅-Protein in einer Dosierung von 1µg/Wunde pro Tag über einen Zeitraum von 7 Tagen nach Wundsetzung in einem Hydrogel appliziert. Zum anderen wurde mit dem CMV-hVEGF₁₆₅ Konstrukt einmalig vor Wundsetzung transfiziert (5µg DNA, 25mg Gold, 300 Psi). Als Kontrollen dienten auf der gleichen Maus zwei weitere Wunden, von denen eine mit dem Hydrogel ohne Zusatz behandelt und die andere mit dem CMV-Lac Z Konstrukt transfiziert wurde. Die Wundsetzung erfolgte mit einer 6mm Stanze um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen.

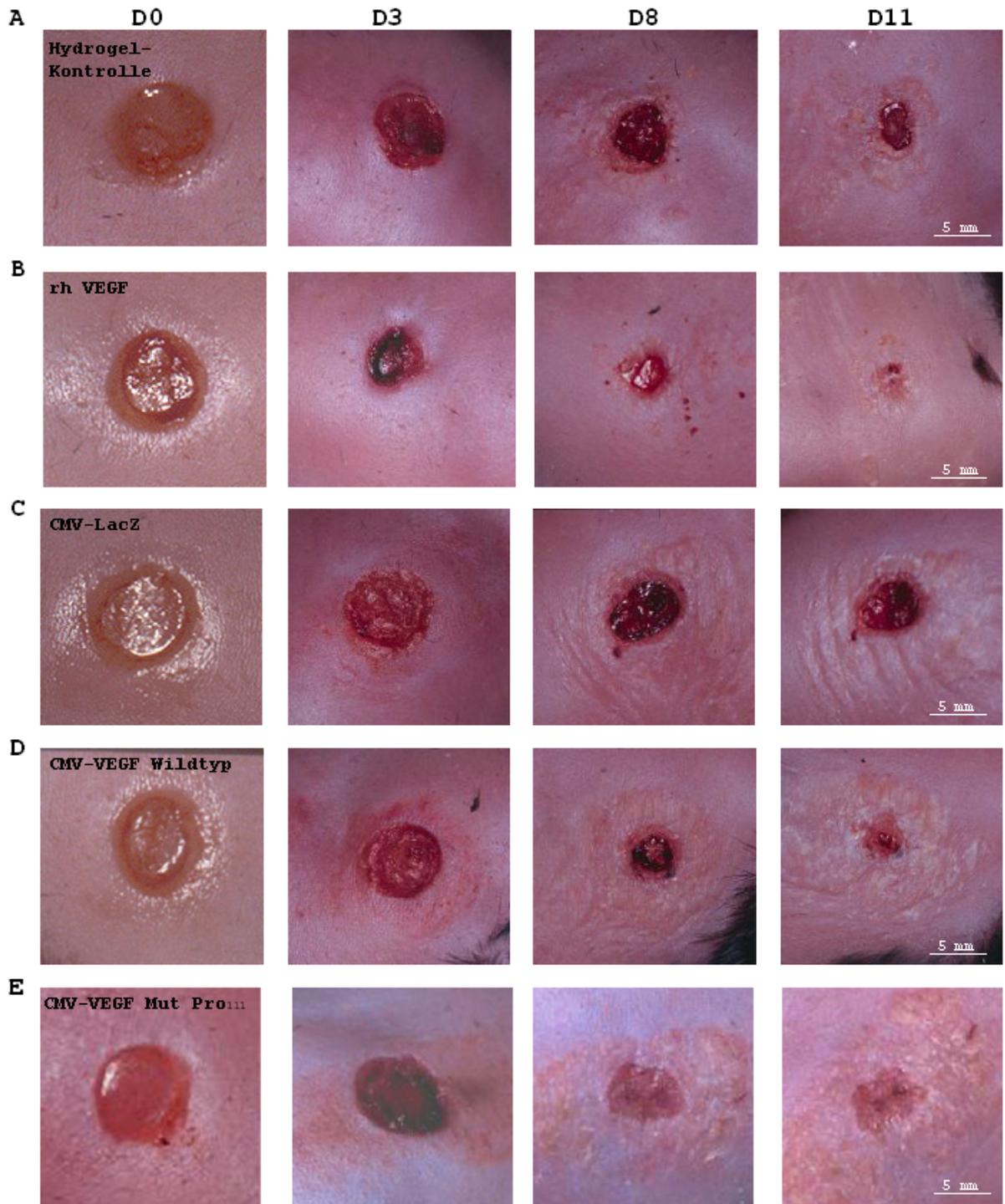
In einem zweiten Versuchsansatz wurde neben der Transfektion mit CMV-hVEGF₁₆₅ Wildtyp auch eine Transfektion mit der plasminresistenten VEGF-Mutante (CMV-hVEGF₁₆₅ Mut Pro₁₁₁), welche sich in dem identischen Expressionsvektor befand durchgeführt.

Die Wunden wurden täglich kontrolliert sowie in regelmässigen Abständen fotografiert. An definierten Tagen wurde ein Teil der Tiere getötet und das Wundgewebe für die Herstellung von Kryoschnitten entnommen. Der Verlauf des Wundschlusses wurde durch Planimetrie sowie durch späteres Ausmessen der Wunden anhand der Gewebeschnitte ermittelt. Wie auf den Abbildungen 13 A und B zu erkennen ist, beschleunigt die Behandlung der Wunden mit rekombinantem VEGF₁₆₅ Protein den Wundschluss im Vergleich zu den Hydrogel-Kontrollwunden. Ein Vergleich von den Abbildungen 13 C und D zeigt auch nach Transfektion mit dem CMV-VEGF₁₆₅ Wildtyp Konstrukt einen beschleunigten Wundschluss im Vergleich zu der CMV-Lac Z Kontrolle. In Abbildung 13 E kann festgestellt werden, dass auch die Behandlung mit dem CMV-VEGF₁₆₅ Mutante Konstrukt den Wundschluss verbessert, und zwar in einem vergleichbaren Maß wie der Wildtyp. Im Vergleich zur Wundheilung der Balb/C Tiere fiel auf, daß bei den Balb/C Mäusen eine Kontraktion der Wunde im Verlauf der normalen Wundheilung stattfindet. Diese Kontraktion führt zu einem

schnellen Verschluss der Wunde. Bei den diabetischen Mäusen hingegen hat man den Eindruck, dass kaum Wundkontraktion erkennbar ist. Wie auf den Abbildungen der Wunden von Tag 8 anhand des blasrosanen Saums am Wundrand sichtbar findet bei den db/db Mäusen der Wundschluss vermutlich hauptsächlich über Reepithelialisierung und Ausbildung eines Granulationsgewebes statt. Bei den VEGF-behandelten Wunden von Tag 11 ist zu erkennen, dass hier die Reepithelialisierung anscheinend schneller verläuft als bei den beiden Kontrollen.

Diese Beobachtung wurde durch die planimetrische Auswertung der makroskopischen Bilder und das spätere Vermessung der Gewebeschnitte bestätigt. Hierbei wurde gezeigt, dass eine signifikante Beschleunigung des Wundschlusses an den Tagen 3, 5, 7, 9 und 11 für die mit rekombinantem VEGF₁₆₅ Protein behandelten Wunden (n=8, p<0,001) im Vergleich zu den jeweiligen Hydrogel-Kontrolle vorlag (Abbildung 13 F). Für die Transfektionen mit VEGF₁₆₅ Wildtyp (n=8, p<0,002) und Mutante (n=8, p<0,004) konnte ebenfalls an den Tagen 5, 7, 9, 11 und 13 ein signifikant beschleunigter Wundschluss im Vergleich zu der Kontroll-Transfektion mit Lac Z gezeigt werden (Abb. 13 G). Zwischen den drei VEGF-Behandlungsarten gab es keinen signifikanten Unterschied, da sie in gleichem Maße in der Lage waren den Wundschluss zu beschleunigen. Hier wird somit gezeigt, dass die Transfektion mit VEGF₁₆₅ in dieser Untersuchung vergleichbar effektiv ist, wie die Behandlung mit rekombinantem VEGF₁₆₅ Protein, und dass die plasminrestistente VEGF₁₆₅ Mutante in gleichem Maß den Wundschluss beschleunigt wie der VEGF₁₆₅ Wildtyp.

3. Ergebnisse



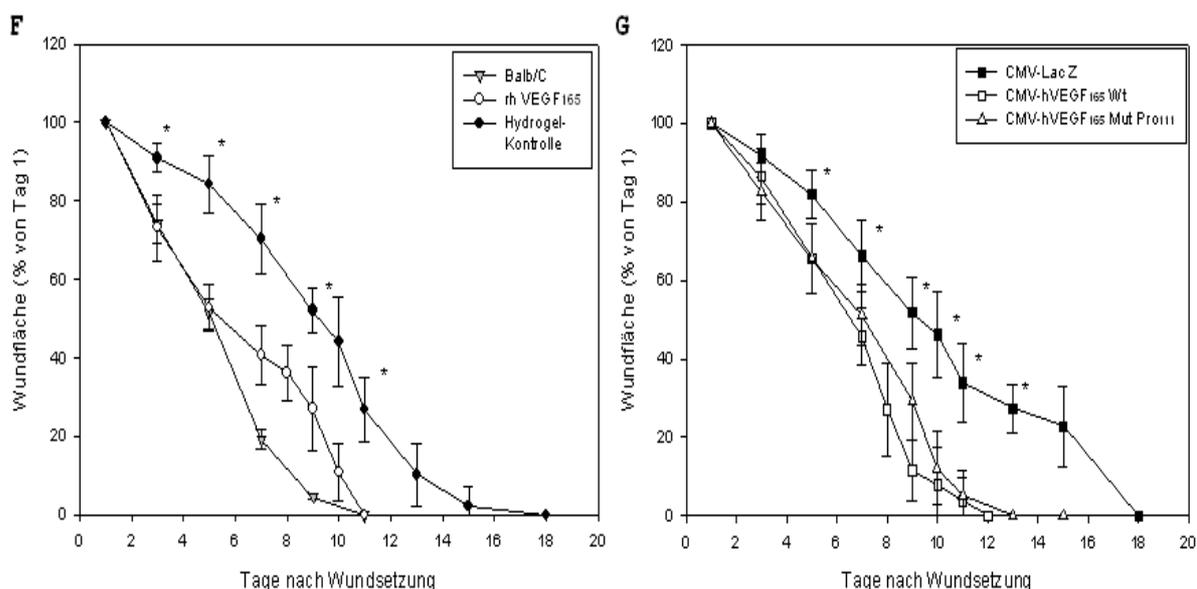


Abbildung 13: Vergleich des Wundschluß nach verschiedenen Behandlungsmethoden. A-E) Makroskopische Aufnahmen von Wunden an den Tagen 0, 3, 8 und 11 nach Wundsetzung (Balken unten rechts entspricht 5mm). **A)** Kontrolle, welche nur mit Hydrogel behandelt wurde. **B)** Mit rekombinantem humanen VEGF165 behandelte Wunden (1µg VEGF in Hydrogel täglich ab Tag 1 für 7 Tage auf Wunde appliziert). **C)** Mit CMV-Lac Z Kontroll Konstrukt transfiziert (einmalig, vor Wundsetzung MLQ 25mg, DLR 3µg Plasmid-DNA, 300 Psi). **D)** Mit CMV-hVEGF165 transfizierte Wunde (einmalig appliziert, vor Wundsetzung MLQ 25mg, DLR 5µg Plasmid-DNA, 300 Psi). **E)** Mit CMV-hVEGF165 Mut Pro111 transfizierte Wunde (einmalig, vor Wundsetzung MLQ 25mg, DLR 5µg Plasmid-DNA, 300 Psi). Alle Aufnahmen mit gleicher Brennweite mit einem Dental Eye (Olympus) aufgenommen und Dias eingescannt. Diese Aufnahmen wurden für Planimetrie verwendet. **F)** Vergleich Wundschluß von Balb/C Kontrollmäusen (grauer Dreieck), mit rekombinantem humanen VEGF165 (weißer Kreis) und der Hydrogel-Kontrollwunde (schwarzer Kreis). Dargestellt ist die Wundfläche in Prozent von der Ausgangswundgröße von Tag 1, welche durch Planimetrie der makroskopischen Bilder ermittelt wurde. n=8 Wunden pro Tag und Behandlungsmodalität * p<0,001 an den markierten Tagen. **G)** Vergleich Wundschluß der transfizierten Wunden. Dargestellt sind der Wundschluß von CMV-Lac Z (schwarzes Quadrat), CMV-hVEGF165 Wildtyp (weißes Quadrat) und CMV-hVEGF165 Mut Pro111 (weißes Dreieck). n=8 Wunden pro Tag und Behandlungsmodalität * p<0,004 für CMV-Lac Z vs. CMV-hVEGF165 Wildtyp und CMV-Lac Z vs. CMV-hVEGF165 Mut Pro111 an den markierten Tagen.

3.5.2. Quantifizierung der Reepithelialisierung der Wunden

Um der Frage nachzugehen welche zellulären Mechanismen zum beschleunigten Wundschluss in VEGF behandelten Wunden beitragen, wurde zunächst die Reepithelialisierung anhand von Histologien bestimmt. Kryoschnitte aus dem Zentrum der Wunden wurden unter dem Mikroskop vermessen. Dabei wurde im ersten Schritt der Abstand zwischen den Rändern des sich im Wundgrund befindlichen Hautmuskels der Maus ausgemessen und im zweiten Schritt wurde dann der Abstand zwischen den beiden Wundrändern ermittelt. Da der Hautmuskel während der Reepithelialisierung nicht einem Reparaturprozess unterliegt, tritt hier auch keine Veränderung gegenüber dem Ausgangszustand der Wunden ein. Somit hat man eine Momentaufnahme der ursprünglichen Wundgröße, anhand derer nun die aktive Reepithelialisierung gemessen werden kann. Zu

jedem Zeitpunkt wurden 8 verschiedene Wunden pro Behandlung ausgemessen und die Reepithelialisierung als Prozent der Ursprungswunde in Abbildung 14 dargestellt.

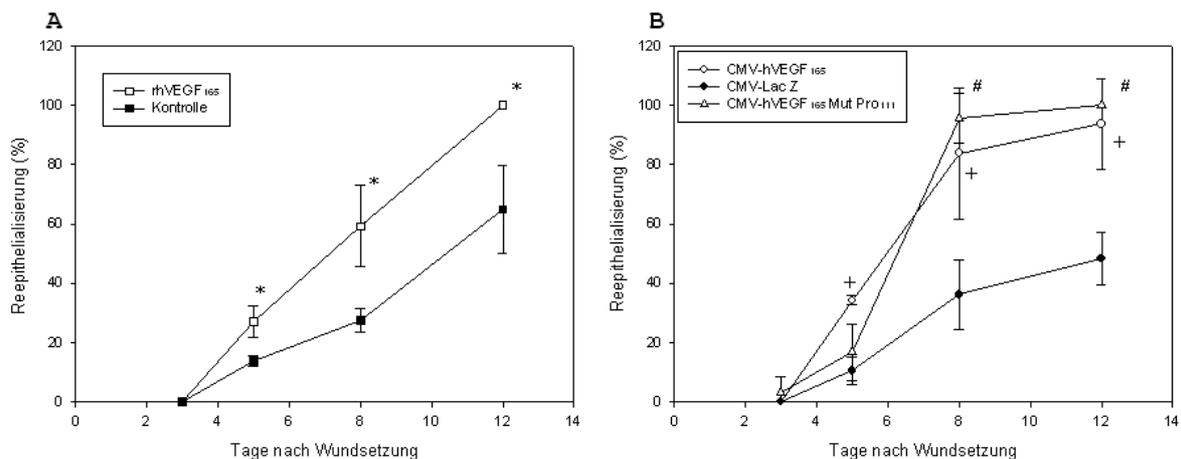


Abbildung 14: Reepithelialisierung gemessen anhand von histologischen Gefrierschnitten aus dem Zentrum der Wunden. Zum Messen der Reepithelialisierung wurde zunächst die Distanz zwischen den beiden Enden des durchtrennten Hautmuskels (ursprüngliche Wundgröße) ermittelt. Anschließend wurde die Distanz, die die Epidermis vom ursprünglichen Wundrand bis zum momentanen Wundrand geschlossen hat gemessen und als Prozent der Ursprungsgröße dargestellt. **A)** Vergleichende Darstellung der Reepithelialisierung im Verlauf der Wundheilung von Hydrogel-Kontrollwunden und den mit rekombinatem humanen VEGF₁₆₅ Protein behandelten Wunden. n=8 Wunden pro Tag und Wundbehandlung * p<0,015. **B)** Vergleich der Reepithelialisierung zwischen den Transfektionen mit CMV-hVEGF₁₆₅ Wildtyp, CMV-Lac Z und CMV-hVEGF₁₆₅ Mut Pro₁₁₁. n=8 Wunden pro Tag und Wundbehandlung + p<0,005 Lac Z vs. Wildtyp, # p<0,01 Lac Z vs. Mutante.

Nach Behandlung mit rekombinatem VEGF kann an den Tagen 5, 8 und 12 eine signifikant stärkere Reepithelialisierung im Vergleich zu der Hydrogel Kontrolle festgestellt werden (n=8, p<0,015). Gleiches gilt ebenfalls für die beiden VEGF-Transfektionen (Wildtyp und Mutante), die im Vergleich zu der Lac Z Kontrolltransfektion eine beschleunigte Reepithelialisierung auslösen (Lac Z vs. Wildtyp n=8, p<0,005 an den Tagen 5, 8 und 12; Lac Z vs. Mutante n=8, p<0,01 an den Tagen 8 und 12). Der Vergleich zwischen den beiden VEGF-Transfektionen liefert keinen signifikanten Unterschied, so dass auch hier die VEGF-Mutante in gleichem Maß wirksam ist wie der Wildtyp. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die verbesserte Reepithelialisierung einen Mechanismus des beschleunigten Wundschlusses in VEGF behandelten Wunden darstellt.

3.5.3. Quantifizierung der Granulationsgewebsbildung in den Wunden

In einer Reihe von Publikationen wurde der Mangel an Granulationsgewebe bei der Wundheilung der diabetischen Mäuse beschrieben (Frank *et al.*, 1995; Werner *et al.*, 1994; Goova *et al.*, 2001; Ozawa *et al.*, 2001). Um zu klären, ob VEGF die Ausbildung von

3. Ergebnisse

Granulationsgewebe stimuliert, wurden Gewebeschnitte mit einem digitalen Mikroskop fotografiert und mit einem Raster mit definierter Fläche versehen. Innerhalb des definierten Wundbereichs wurde die Fläche des Granulationsgewebes bestimmt. Das Granulationsgewebe wurde in Prozent der definierten Wundfläche angegeben (siehe Abb. 15). Zu jedem Zeitpunkt wurden fünf verschiedene Wunden pro Behandlung ausgemessen.

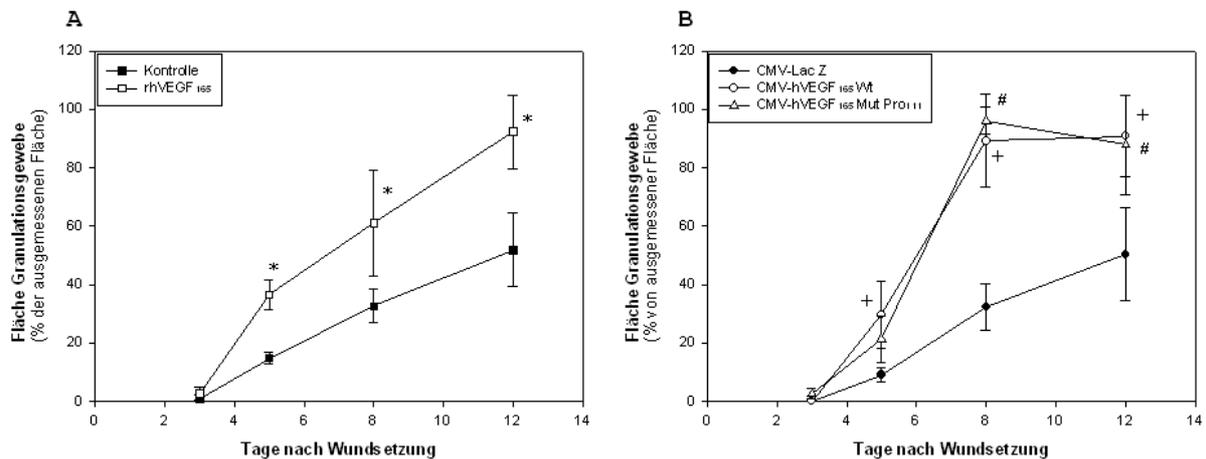


Abbildung 15: Bildung von Granulationsgewebe. Die Fläche des Granulationsgewebes ist angegeben in % der Gesamtfläche in der die Messung durchgeführt wurde **A)** Vergleichende Darstellung der Fläche des Granulationsgewebes im Verlauf der Wundheilung von Hydrogel-Kontrollwunden und den mit rekombinantem humanem VEGF₁₆₅ Protein behandelten Wunden. n=8 Wunden pro Tag und Wundbehandlung * p<0,027 an den Tagen 5, 8 und 12 **B)** Vergleich der Granulationsgewebsbildung zwischen den Transfektionen mit CMV-hVEGF₁₆₅ Wildtyp, CMV-Lac Z und CMV-hVEGF₁₆₅ Mut Pro111. n=8 Wunden pro Tag und Wundbehandlung + p<0,024 für Lac Z vs. Wildtyp an den Tagen 5, 8 und 12; # p<0,036 für Lac Z vs. Mutante an den Tagen 8 und 12.

In Abbildung 15 A) kann man erkennen, dass an den Tagen 5, 8 und 12 durch die Behandlung mit rekombinantem VEGF₁₆₅ Protein im Vergleich zu der Hydrogel Kontrolle die Ausbildung eines Granulationsgewebes schneller und ausgeprägter vollzogen wird (n=8 Wunden pro Tag p<0,027). Nach der Transfektion mit VEGF (sowohl Wildtyp als auch Mutante) kann man in Abbildung 15 B ebenfalls eine ausgeprägtere und beschleunigte Granulationsgewebsbildung im Vergleich zu der Lac Z Transfektion beobachten, wobei beim Vergleich der beiden VEGF-Transfektionen erneut die Wirksamkeit von Mutante und Wildtyp nahezu identisch sind (n=8 Wunden pro Tag p<0,024 für Lac Z vs. Wildtyp an den Tagen 5, 8 und 12 und p<0,036 für Lac Z vs. Mutante an den Tagen 8 und 12). Demnach führen neben einer beschleunigten Reepithelialisierung auch eine Stimulation der Granulationsgewebsbildung zur Beschleunigung des Wundschlusses nach VEGF-Behandlung.

3.6. Charakterisierung der Angiogenese in VEGF behandelten Wunden

3.6.1. Färbungen für den Endothelzellmarker PECAM-1

Es wurden Kryoschnitte von den entnommenen Wundgeweben auf die Auswirkungen der VEGF-Behandlung auf Zellebene untersucht. Zunächst wurde der proangiogene Effekt der VEGF-Behandlung mittels eines endothelspezifischen Antikörpers für PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) dargestellt. Es handelt sich hierbei um einen Oberflächenrezeptor (auch als CD-31 bekannt) der hauptsächlich auf Endothelzellen zu finden ist und einen vielfach beschriebenen Marker für den vaskulären Status des Gewebes bzw. für die Angiogenese darstellt. Es wurden Gewebeschnitte der Tage 3, 5, 8, 12 und 18 nach Wundsetzung untersucht. In Abbildung 16 sind repräsentative Histologien der Wunden am postoperativen Tag 8 dargestellt und Abbildung 17 zeigt exemplarische PECAM-1 Färbungen der Tage 12 und 18 nach Wundsetzung.

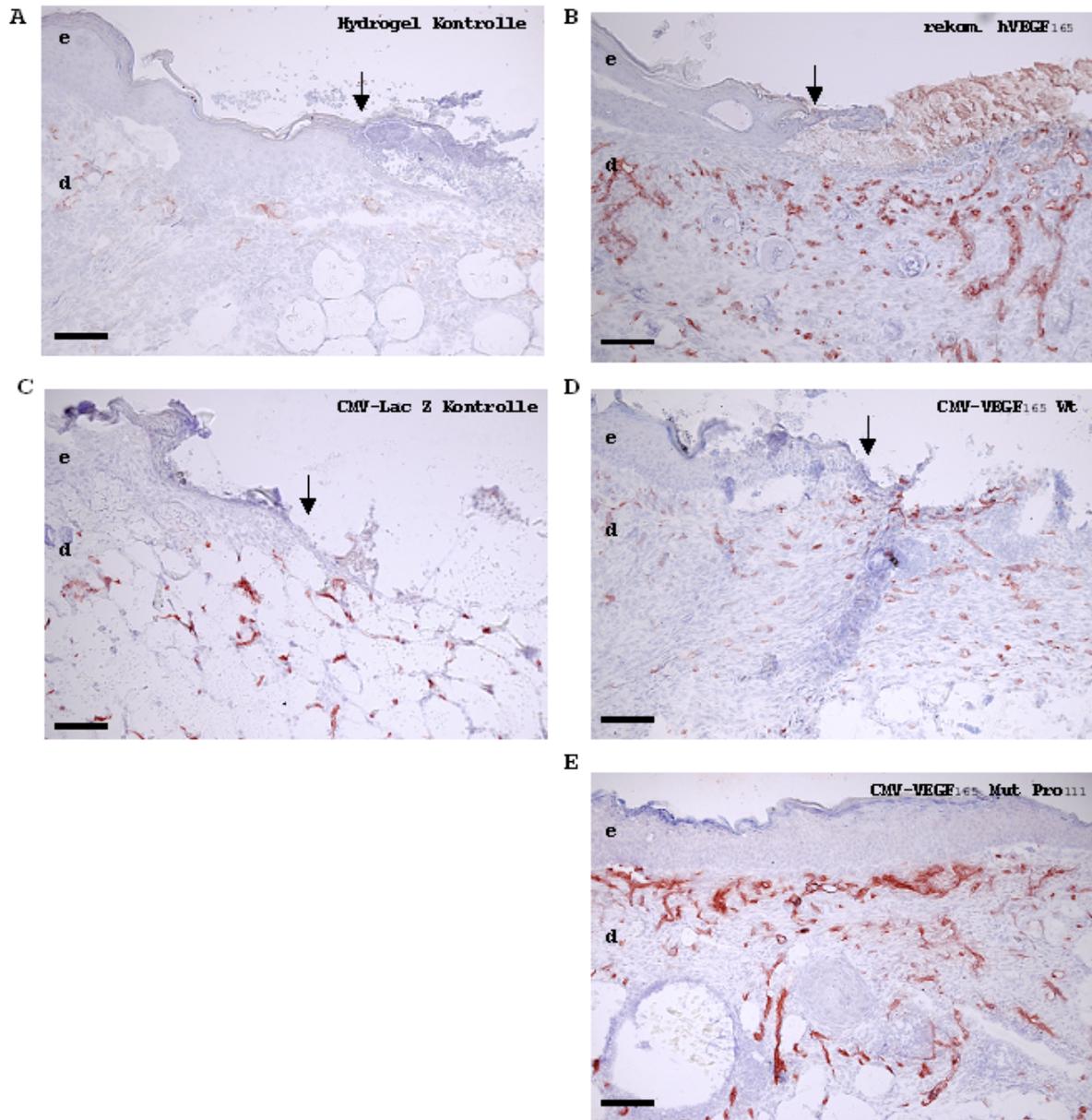


Abbildung 16: Die lokale Applikation von VEGF stimuliert die Einsprossung von Kapillaren und induziert die Ausbildung eines Granulationsgewebes. Die Wunden wurden wie angezeigt behandelt, an definierten Zeitpunkten nach Wundsetzung entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und einsprossende Kapillaren mittels eines anti-Maus PECAM-1 Antikörpers (rot) dargestellt (Gegenfärbung mit Hämalaun). Hier dargestellt (A-E) sind repräsentative Färbungen am postoperativen Tag 8 (Balken unten links entspricht 100µm; Symbole & Abkürzungen: ↓ = Wundrand, e = Epidermis, d = Dermis).

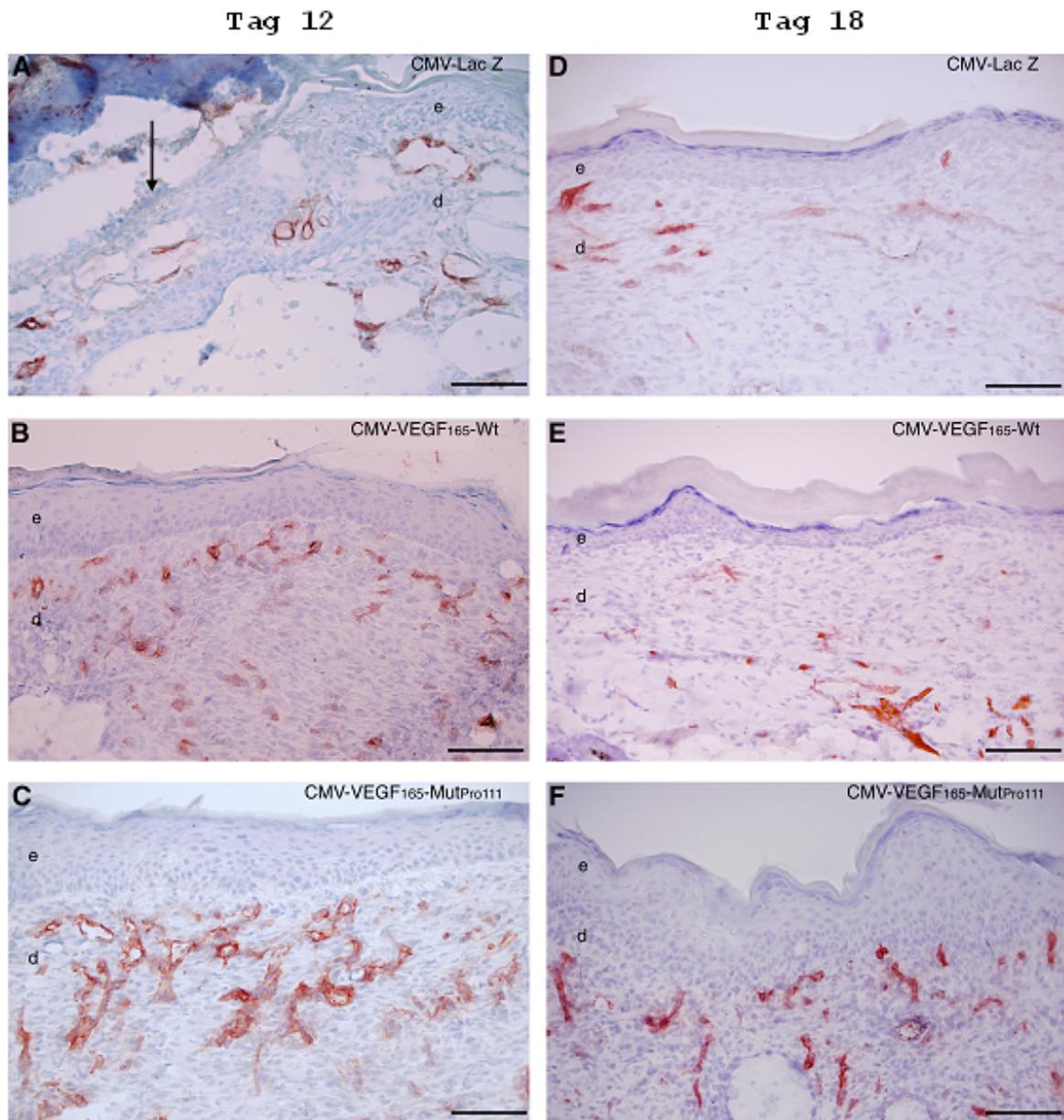


Abbildung 17: PECAM-1 Färbungen an Tag 12 und 18 nach Wundsetzung.

Die Wunden wurden wie angezeigt behandelt, an definierten Zeitpunkten nach Wundsetzung entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und einsprossende Kapillaren mittels eines anti-Maus PECAM-1 Antikörpers (rot) dargestellt (Gegenfärbung mit Hämalaun). Hier dargestellt sind repräsentative Färbungen an postoperativen Tagen 12 (A-C) und 18 (D-F).

Die Bilder wurden mit 200x Vergrößerung aufgenommen; die rechts unten abgebildeten Balken entsprechen 50 µm. (Symbole & Abkürzungen: ↓ = Wundrand, e = Epidermis, d = Dermis)

Die Wunden stellen sich in den Gewebeschnitten wie folgt dar:

An den Wundrändern (Pfeil) erkennt man eine hyperproliferative verdickte Epidermis (e) und unterhalb dieser ein Gewebe mit erhöhter Zelldichte – das Granulationsgewebe. Im Wundgrund befindet sich noch ein Teil der Fibrin-reichen temporären Matrix. Tiefer gelegen in der Dermis (d) kann man deutlich die großen Fettsepten erkennen. Für uns interessante

Gefäßstrukturen kann man in dem neu gebildeten Granulationsgewebe finden. Hauptsächlich in diesem Bereich findet die von uns untersuchte Angiogenese während der Wundheilung statt.

Kontrollwunden, die mit Hydrogel behandelt oder mit CMV-Lac Z Plasmid transfiziert wurden, wiesen bis zum fünften postoperativen Tag ein geringes und endothelzellarmes Granulationsgewebe auf. Das Epithel am Wundrand war flach und zeigte keine Zeichen der Proliferation. Erst am achten postoperativen Tag wurde das Granulationsgewebe zellreicher und die Anzahl der PECAM-1 positiven Zellen nahm zu (Abb. 16 A & C). Zeitgleich imponierte ein hyperplastischer, epithelialer Wundrand und die Migration der Epithelzunge schien weiter vorangeschritten. Im Gegensatz zu den Kontrollwunden nahm sowohl in VEGF₁₆₅ Protein behandelten Wunden, als auch in CMV-VEGF₁₆₅ Wt und CMV-VEGF₁₆₅ Mut Pro₁₁₁ Plasmid transfizierten Wunden am Tag 5 und deutlicher am Tag 8 nach Wundsetzung die Zelldichte und insbesondere die Anzahl PECAM-1 positiver Zellen im Granulationsgewebe zu. Insbesondere am achten postoperativen Tag spross in VEGF behandelten Wunden ein zell- und kapillarreiches Granulationsgewebe vom Wundrand und Wundgrund in die Wunde ein (Abb. 16 B, D & E). Mit der Zunahme des Granulationsgewebes verdickte sich das Epithel am Wundrand und wirkte hyperproliferativ. Bis zum postoperativen Tag 8 schien die Steigerung der angiogenetischen Antwort in VEGF₁₆₅ Protein, CMV-VEGF₁₆₅ Wt oder CMV-VEGF₁₆₅ Mut Pro₁₁₁ transfizierten Wunden vergleichbar.

Von besonderem Interesse war die unterschiedliche Entwicklung der angiogenetischen Antwort in VEGF Wt und VEGF Mut Pro₁₁₁ transfizierten Wunden nach epithelalem Wundschluss am postoperativen Tag 12 und 18. Am postoperativen Tag 12 ist der Wundschluss sowohl in CMV-VEGF Wt, wie auch in CMV-VEGF Mut Pro₁₁₁ transfizierten Wunden durch das geschlossene Epithel sichtbar; dabei zeigt das geschlossene Epithel weiterhin einen hyperproliferativen Phänotyp (Abb. 17 B & C). An Tag 12 scheint in den VEGF Wt transfizierten Wunde die Anzahl der PECAM-1 positiven Zellen in der darunterliegenden Dermis im Vergleich zum achten postoperativen Tag reduziert und nimmt bis zum Tag 18 weiterhin ab. Am achtzehnten postoperativen Tag wird ein gefäß- und zellarmes sowie matrixreiches Narbengewebe sichtbar (Abb. 17 B & E). Im Gegensatz zu der stetig abnehmenden Gefäßdichte in VEGF Wt transfizierten Wunden nach Epithelschluss an den Tagen 12 und 18 nach Wundsetzung, zeigte sich in VEGF Mut Pro₁₁₁ transfizierten Wunden eine verzögerte Abnahme der Gefäßdichte.

Um eine semiquantitative Aussage bezüglich der Dichte an positiv gefärbten Endothelstrukturen treffen zu können, wurden die histologischen Schnitte mittels eines digitalen Mikroskops aufgenommen. Eine Software ermöglichte es die für PECAM-1 positiv gefärbten Bereiche in den Wundschnitten als Fläche zu erfassen. Es wurden die Flächen innerhalb des Granulationsgewebes gemessen und diese dann als Prozent der Gesamtfläche des Granulationsgewebes dargestellt (siehe Abbildung 18). Ab Tag 5 zeigten sich eine signifikant erhöhte Anzahl von Endothelzellen im Granulationsgewebe nach Behandlung mit VEGF Protein, VEGF Wt und VEGF Mut Pro₁₁₁. Dabei besteht kein Unterschied zwischen der Proteinbehandlung und der Transfektion mit dem VEGF Wildtyp. Hingegen war ein signifikanter Unterschied zwischen VEGF Protein Behandlung und der Hydrogel Kontrolle ab Tag 5 (Signifikanz: n=5 ; p < 0,01) und Tag 8 (n=5; p < 0,0001), sowie zwischen der VEGF Wildtyp Transfektion und der Lac Z Kontroll Transfektion an Tag 5 (Signifikanz: n=5 ; p < 0,01) und Tag 8 (n=5; p < 0,0001) messbar. Nach Wundschluss folgt die Abnahme der gefärbten Endothelzellen in dem Narbengewebe. Da die Kontrollwunden (sowohl Hydrogel Kontrolle als auch Lac Z Kontrolle) an Tag 12 noch nicht geschlossen waren, ist hier keine Abnahme erkennbar. Durch die semiquantitative Auswertung war es uns möglich bei einem Vergleich des VEGF-Wildtyps mit der plasmin-resistenten Mutante einen signifikanten Unterschied bezüglich der Gefäßdichte zwischen den beiden Behandlungsmethoden an den Tagen 12 (Signifikanz: n=5 ; p < 0,002) und 18 (Signifikanz: n=5 ; p < 0,0004) nach Wundsetzung zu zeigen (Abb. 18 B).

Somit liegt bei der Behandlung mit CMV-VEGF₁₆₅ Mut Pro₁₁₁ bezüglich des Wundschlusses kein Unterschied zum Wildtyp vor. Allerdings kann nach Wundschluss ein signifikanter Unterschied in der Abnahme der Gefäßdichte im Granulationsgewebe festgestellt werden. In beiden Fällen nimmt die Dichte nach Tag 8 zwar ab, aber die Abnahme in den Wunden welche mit CMV-VEGF₁₆₅ Mut Pro₁₁₁ behandelt wurden ist weniger ausgeprägt.

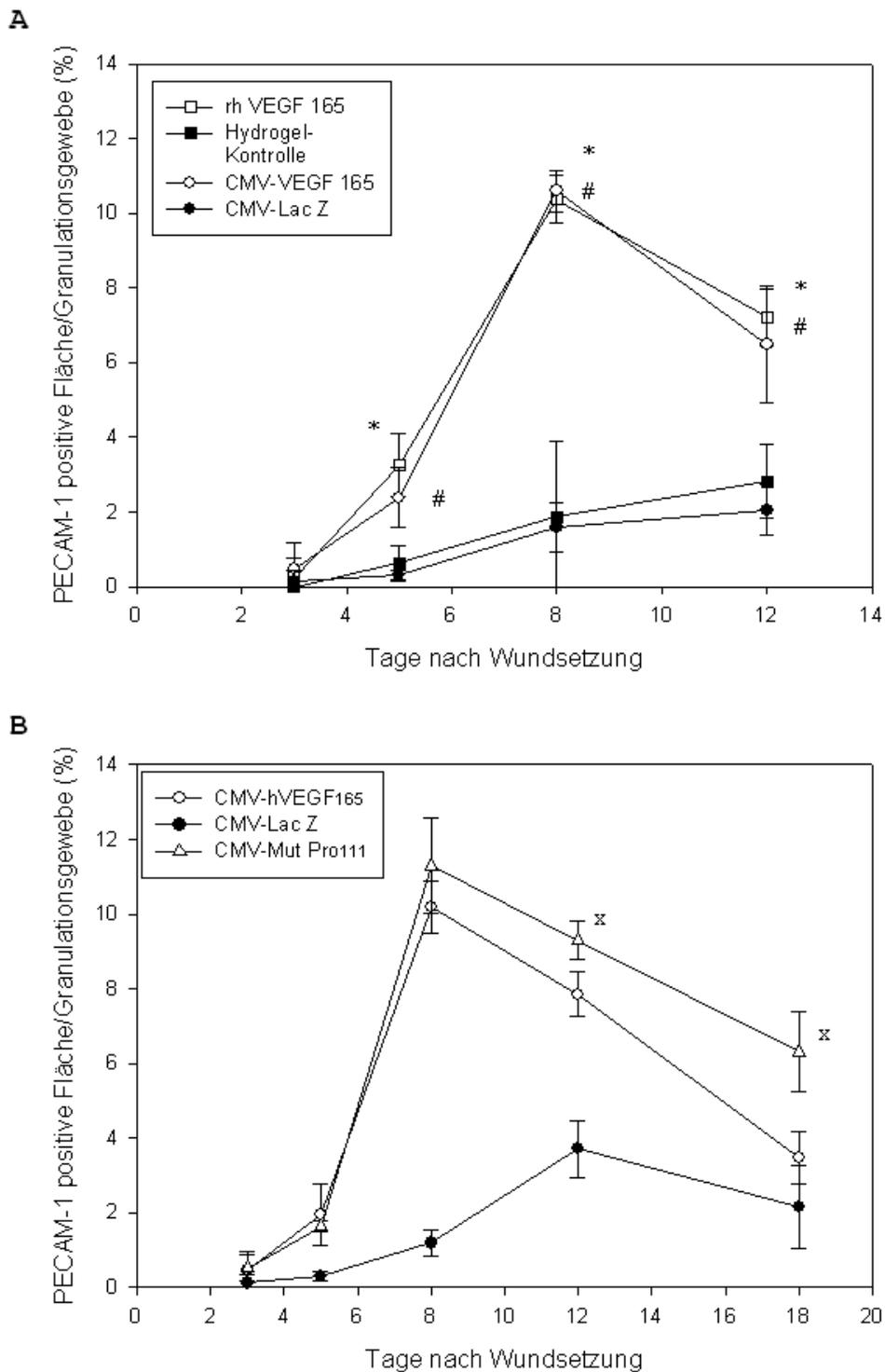


Abbildung 18: Quantitative Auswertung der PECAM-1 Färbungen histologischer Wundschnitte von db/db Mäusen nach Behandlung.

A) Vergleich Hydrogel-Kontrolle und Behandlung mit rekombinantem humanen VEGF₁₆₅ Protein sowie Vergleich CMV-Lac Z Transfektion und CMV-hVEGF₁₆₅ Transfektion bis Tag 12. n=5 Wunden pro Tag und Wundbehandlung * Hydrogel-Kontrolle vs. VEGF₁₆₅ Protein p<0,01 an den Tagen 5, 8 und 12; # Lac Z vs Wildtyp p<0,01 an den Tagen 5, 8 und 12.

B) Vergleich CMV-hVEGF₁₆₅ Wildtyp Transfektion mit CMV-hVEGF₁₆₅ Mut Pro111 Transfektion; CMV-Lac Z noch als Kontrolle. n=5 Wunden pro Tag und Wundbehandlung x Wildtyp vs. Mutante p<0,002 an den Tagen 12 und 18.

3.6.2. Färbungen für den Endothelzellmarker VEGFR-2

Im folgenden Schritt wurde untersucht, ob die Zunahme der Angiogenese und des Granulationsgewebes im Wundbereich von db/db Mäusen einen VEGF-vermittelten Effekt darstellt. Zu diesem Zweck wurde der zeitliche Verlauf der Expression des VEGF Rezeptors VEGFR-2 (auch Flk-1 im murinen und KDR im humanen System), welcher fast ausschließlich auf Endothelzellen zu finden ist, während der Wundheilung mittels eines spezifischen anti-Maus-Flk-1 Antikörpers untersucht. In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass die Expression dieses Rezeptor durch VEGF hochreguliert wird (Millauer *et al.*, 1993; Kremer *et al.*, 1997), und dass VEGFR-2 vorwiegend auf proliferierenden und an der Einsprossung von Kapillaren beteiligten Endothelzellen gefunden werden kann, während PECAM-1 auch auf metabolisch ruhenden Endothelzellen nachweisbar ist. Dieser Rezeptor dient somit als Indikator der VEGF-vermittelten Angiogenese. Wie bereits für PECAM-1 beschrieben wurde auch für VEGFR-2 eine semiquantitative Messung der angefärbten Endothelzellen bezogen auf die Wundfläche durchgeführt (Abb. 21).

In Kontrollwunden, die mit Hydrogel oder CMV-Lac Z Plasmid behandelt wurden, zeigten sich am 3. und 5. postoperativen Tag im spärlich ausgebildeten Granulationsgewebe nur sehr vereinzelt VEGFR-2 positive Zellen. Erst mit zunehmender Einsprossung des Granulationsgewebes an Tag 8 und 11 stieg die Zahl von VEGFR-2 positiven Zellen im Granulationsgewebe an (Abb. 19 und 20). Im Gegensatz dazu wies das Granulationsgewebe von VEGF₁₆₅ Protein behandelte oder mit CMV-VEGF Wt oder CMV-VEGF Mut Pro₁₁₁ transfizierter Wunden schon am Tag 5 nach Verwundung eine deutliche Zunahme von VEGFR-2 exprimierenden Zellen auf (Signifikanz für VEGF₁₆₅ Behandlung n=5 und p<0,05). Die Zahl der VEGFR-2 positiven Zellen nahm bis zum Tag 8 nach Wundsetzung deutlich zu und war im Vergleich zu den Kontrollwunden zu diesem Zeitpunkt signifikant (Signifikanz: n=5 ;p < 0,001) erhöht (siehe Abb. 21 A & B). Mit zunehmender Reepithelialisierung nahm die Anzahl VEGFR-2 positiver Zellen in VEGF₁₆₅ Protein behandelte und CMV-VEGF₁₆₅ Wt transfizierten Wunden nach dem achten postoperativen Tag ab. Im Gegensatz zu den VEGF₁₆₅ Wt transfizierten Wunden zeigten die VEGF₁₆₅ Mut Pro₁₁₁ transfizierten Wunden eine verzögerte Rückbildung VEGFR-2 positiver Endothelzellen, so dass die Dichte der VEGFR-2 positiven Zellen in VEGF Mut Pro₁₁₁ transfizierten Wunden am postoperativen Tag 12 und 18 gegenüber Wildtyp transfizierten Wunden signifikant erhöht war (Signifikanz: n=5 pro Zeitpunkt ; Tag 12 p < 0,05 und Tag 18 p< 0,01) (siehe Abb. 21 B).

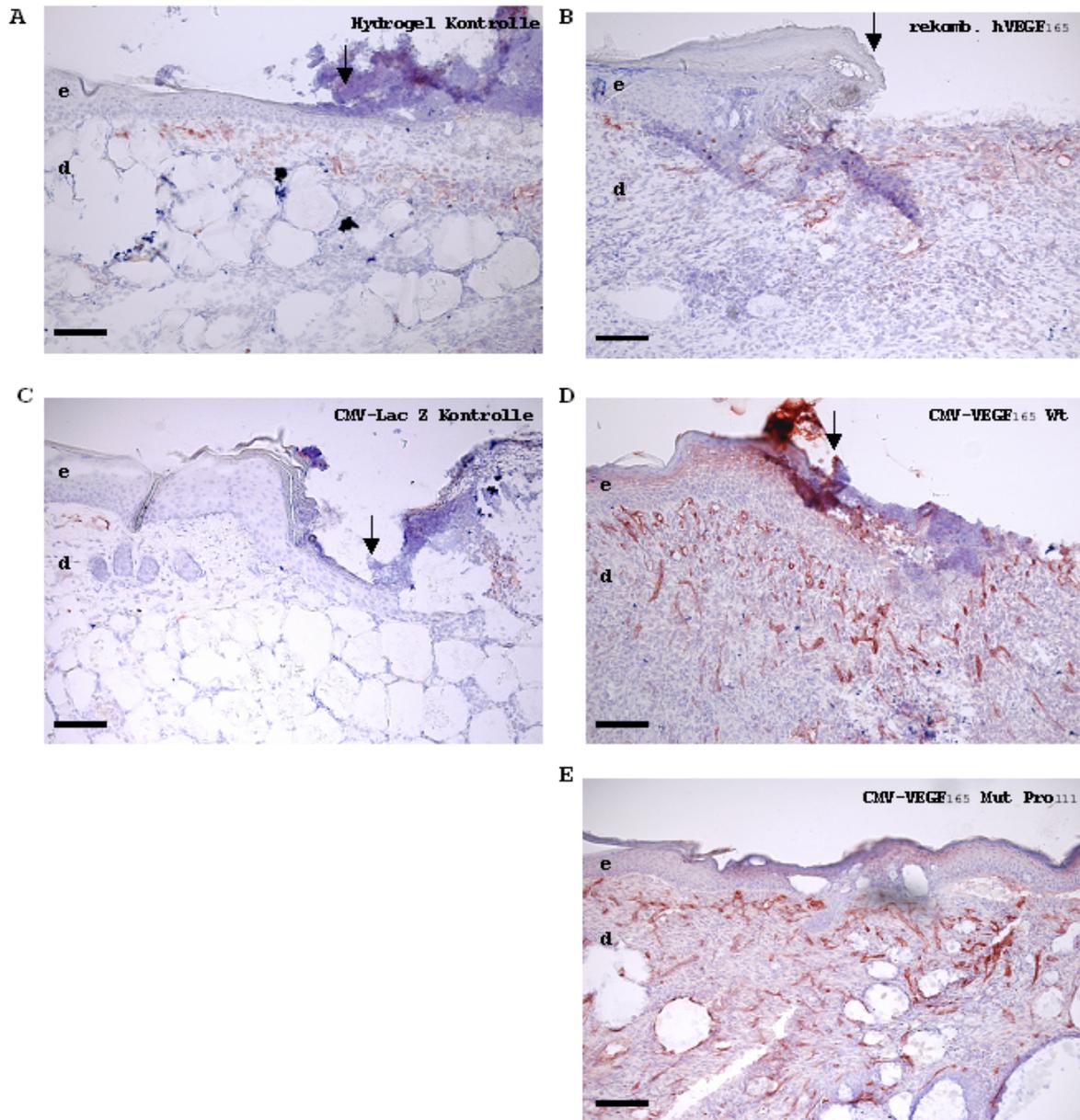


Abbildung 19: Untersuchung der VEGF vermittelten Angiogenese mit VEGFR-2 Färbungen. Die Wunden wurden wie angezeigt behandelt, an definierten Zeitpunkten nach Wundsetzung entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und mit einem spezifischen Antikörper gegen VEGFR-2 gefärbt (rot). Alle Schnitte wurden mit Hämalun gegengefärbt. Bei den Geweben handelt es sich um Wunden vom postoperativen Tag 8 (100x Vergrößerung; der schwarze Balken unten links entspricht 100µm; Abkürzungen und Symbole: ↓ = Wundrand ; e = Epidermis und d = Dermis).

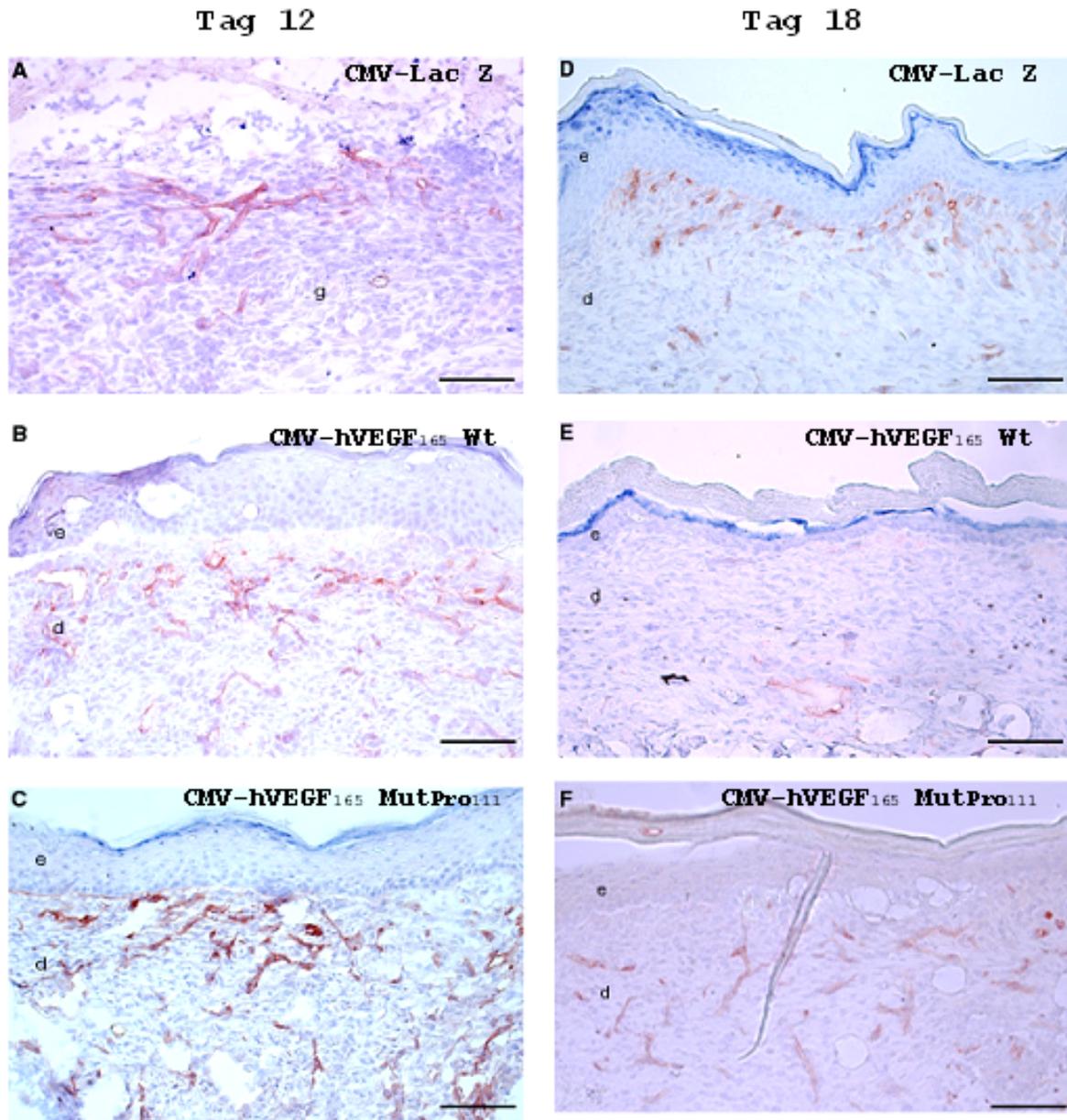


Abbildung 20: Untersuchung der VEGF vermittelten Angiogenese mit VEGFR-2 Färbungen an den postoperativen Tagen 12 und 18. Die Gewebe wurden wie zuvor gewonnen, mit einem VEGFR-2 spezifischen Antikörper angefärbt (rot) und mit Hämalaun gegengefärbt. Die Bilder wurden mit 200x Vergrößerung aufgenommen; die rechts unten abgebildeten Balken entsprechen 50 µm. (Abkürzungen: e = Epidermis, d = Dermis)

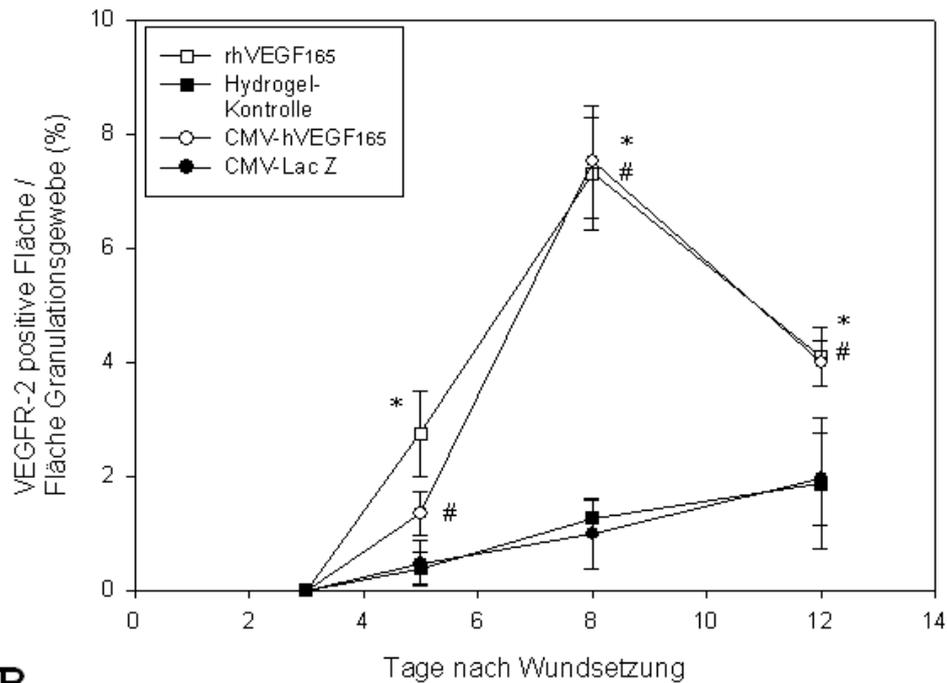
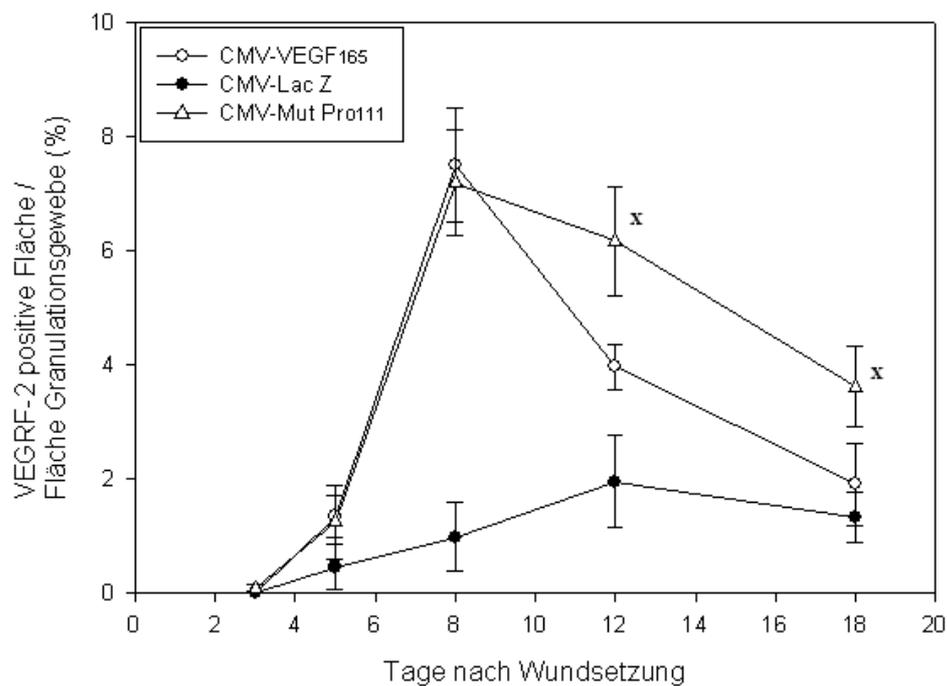
A**B**

Abbildung 21: Quantitative Auswertung der VEGFR-2 Färbungen histologischer Wundschnitte von db/db Mäusen. Dargestellt sind die positiv gefärbten Flächen des Granulationsgewebes in %.

A) Vergleich der VEGFR-2 positiven Flächen der Hydrogel-Kontrolle und der Behandlung mit rekombinantem humanen VEGF165 Protein sowie der Vergleich der CMV-Lac Z Transfektion und der CMV-hVEGF165 Transfektion bis Tag 12. n=5 Wunden pro Tag und Wundbehandlung * Hydrogel-Kontrolle vs. Protein $p < 0,02$ an den Tagen 5, 8 und 12; # Lac Z vs. Wildtyp $p < 0,003$ an den Tagen 5, 8 und 12.

B) Vergleich CMV-hVEGF165 Wildtyp Transfektion mit CMV-hVEGF165 Mut Pro111 Transfektion; CMV-Lac Z noch als Kontrolle; bis zu Tag 18. n=5 Wunden pro Tag und Wundbehandlung x Wildtyp vs. Mutante $p < 0,05$ an den Tagen 12 und 18.

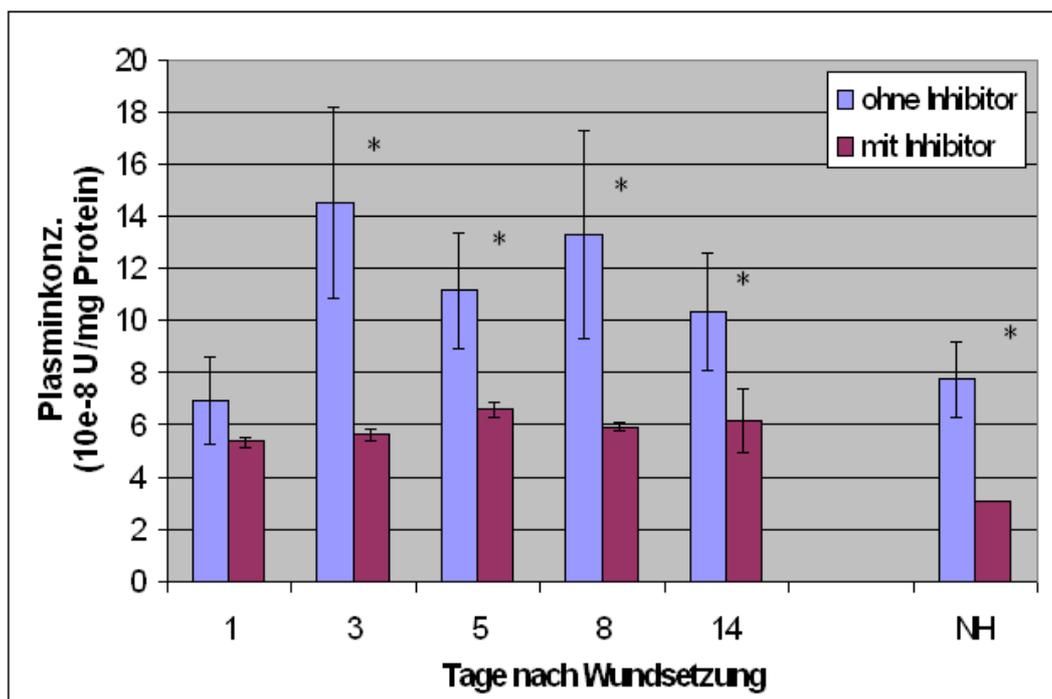
3.7. Untersuchung der Plasminaktivität in Wundgeweben von db/db Mäusen

Die Untersuchungen zeigen, dass es nach dem Wundschluss zu Unterschieden in der Ausprägung der angiogenetischen Antwort in VEGF-Wt und VEGF-Mutante transfizierten Wunden kommt. Während die Gefäßdichte nach Wundschluss in VEGF-Wt transfizierten Wunden nach Tag 8 deutlich rückläufig war, zeigte sich in VEGF-Mutante transfizierten Wunden eine prolongierte erhöhte Gefäßdichte, die erst nach dem zwölften postoperativen Tag eine deutliche Reduktion zeigte. Es ist anzunehmen, dass diese Unterschiede eine Folge der erhöhten proteolytischen Stabilität und damit möglicherweise verlängerten Aktivität und Verfügbarkeit der VEGF-Mutante im Wundbereich darstellen. Aus diesem Grund schien uns eine Bestimmung der Plasminaktivität in den db/db Mäusen während ihrer Wundheilung sinnvoll. Es wurden db/db Mäuse verwundet, an den Tagen 3, 5, 8 und 14 nach Wundsetzung getötet und das Wundgewebe zur Herstellung von Wundlysaten verwendet. Die Lysate wurden mit dem plasmin-spezifischen fluorogenen Peptid H-D-Val-Leu-Lys-AMC (Firma Bachem) inkubiert. Die Aktivität wurde durch die Freisetzung des fluoreszierenden Substrates in Vergleich zu einer Plasmin-Standardreihe bestimmt und zum Gesamtproteingehalt normalisiert.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung sind in Abbildung 22 A dargestellt. Hier kann man deutlich erkennen, daß es zu einer starken Zunahme der Plasmin-Aktivität ab Tag 3 nach Wundsetzung kommt, die sich bis hin zu Tag 14 auf einem erhöhten Niveau im Vergleich zu Tag 1 bzw. unverwundeter Normalhaut hält. Die Spezifität der Plasminaktivität wurde durch Inkubation mit dem spezifischen Inhibitor alpha-2-anti Plasmin (Sigma, Deisenhofen) bestätigt.

Wir haben zusätzlich zur Überprüfung des Inhibitors definierte Mengen unseres Standards (0,1 U/ml) mit verschiedenen Konzentrationen von alpha-2-anti Plasmin inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 B dargestellt.

A



B

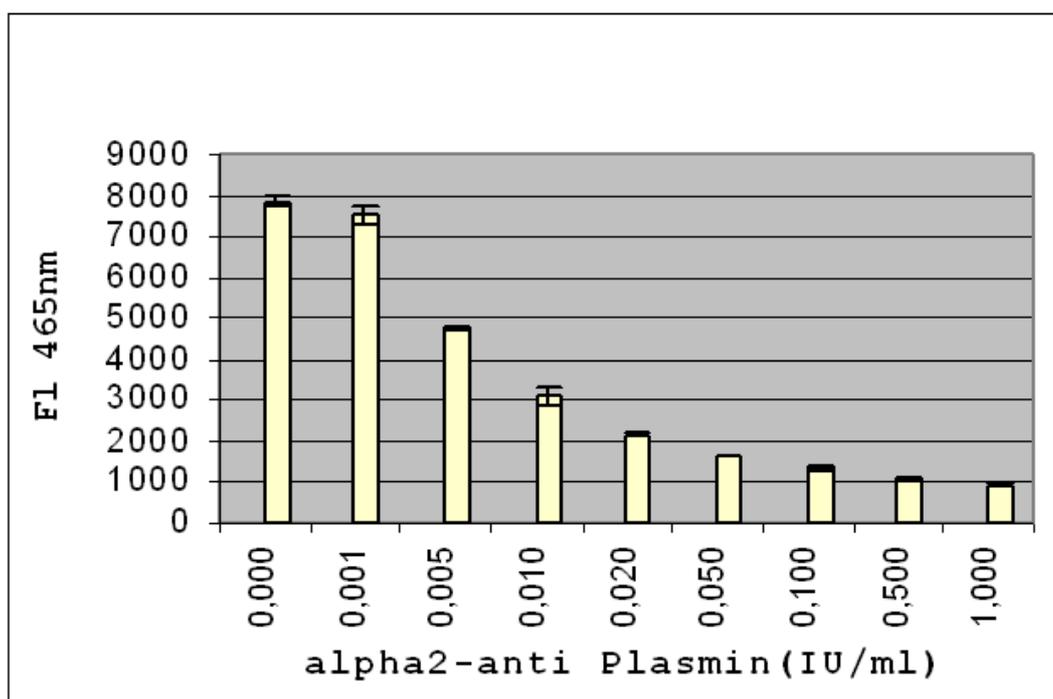


Abbildung 21: Plasminaktivitätsmessung in Wundlysaten

A) Plasminaktivität in Wundlysaten von db/db Mäusen an den Tagen 1, 3, 5, 8 und 14 nach Wundsetzung. Es wurde das fluorogene Peptid H-D-Val-Leu-Lys-AMC (Bachem) eingesetzt, das spezifisch von Plasmin gespalten wird und so AMC freisetzt. Dieses fluoresziert nach Anregung bei 360nm auf der von uns gemessenen Wellenlänge von 465nm. Nach vorheriger Erstellung einer Standardkurve mit käuflichem Plasmin ließ sich anhand der Fluoreszenz bei 465nm die vorhandene Plasminmenge normiert auf den Gesamtproteingehalt unserer Lysate bestimmen. Zusätzlich wurde noch der plasmin-spezifischen Inhibitor α -2-anti-Plasmin (0,1 IU/ml) verwendet um die Spaltung des fluorogenen Peptids zu verhindern.

Es wurden 5 verschiedene Wundlysate für die Ermittlung der Plasminkonzentration pro Zeitpunkt verwendet. (Zeichenerklärung: * = statistische Signifikanz mit $p < 0,05$ für db/db Lysat mit Inhibitor vs. ohne Inhibitor).

B) Inhibition der Plasminaktivität (0,1 U/ml) durch den Inhibitor α -2-anti-Plasmin

3.8. Proteinaufreinigung von VEGF₁₆₅-Wildtyp und VEGF₁₆₅-Mutante mittels Heparin-Sepahrose

Zur Gewinnung der für Stabilitätsuntersuchungen in Wundlysaten benötigten VEGF-Proteine wurden transiente Transfektionen von COS-1 Zellen mit VEGF-Wildtyp oder VEGF-Mutante Pro₁₁₁ – Expressionskonstrukten durchgeführt, die Überstände der Zellen gesammelt, mittels Western Blot auf ihren VEGF-Gehalt geprüft und eingefroren.

Die Aufreinigung erfolgte mittels FPLC (Fast performance liquid chromatography) über eine Heparin-Sepahrose-Säule, an die zunächst das VEGF₁₆₅-Protein mit seiner Heparin-Bindestelle band. Nachdem die unerwünschten Proteine des Überstandes mittels niedrig molarer Salzlösung von der Säule gewaschen waren, erfolgte die Elution des VEGF-Proteins durch Erhöhung der Salzkonzentration. Um anschließend möglichst sauberes und hochkonzentriertes Protein zu erhalten, wurde mit Hilfe eines Fraktionierers das Eluat in kleine Volumina aufgeteilt. Die so gewonnenen Fraktionen konnten mittels Western Blot auf ihren VEGF-Gehalt untersucht werden, um anschließend die Fraktionen mit dem stärksten VEGF-Signal zu vereinigen (siehe hierzu auch Abbildung 22). Die vereinigten Fraktionen wurden schließlich mittels Sephadex-Säulen entsalzt, lyophilisiert und bei – 80° C gelagert. Nach Rekonstitution mit H₂O (mit 0,01% BSA) wurde die VEGF-Menge mit einem Sandwich-Elisa (R&D, Heidelberg) bestimmt.

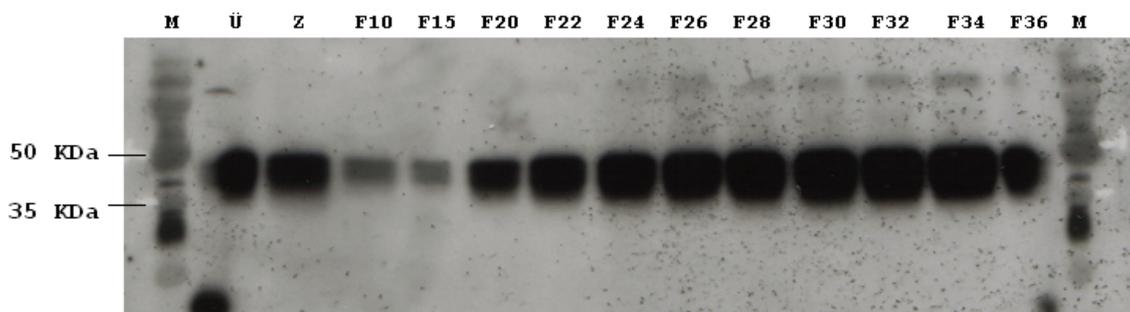


Abbildung 22: Western Blot nach der Aufreinigung von VEGF-Mut Pro₁₁₁ Protein: Hier dargestellt ist ein Immunoblot, der mit einem VEGF-Antikörper behandelt wurde. Aufgetragen wurden die verschiedenen Fraktionen (F10-F36) der Aufreinigung, sowie der vereinigte Zellüberstand vor der Beladung der Heparin-Sepahrose Säule (Ü) und der Zellüberstand nachdem er 16 Stunden mehrfach über die Säule zirkuliert ist (Z). Jeweils ganz außen wurde ein Proteinstandard zur Größenbestimmung aufgetragen (M). Die Fraktionen mit dem höchsten VEGF-Gehalt (F20-F36) wurden vereinigt und anschließend entsalzt, lyophilisiert und eingefroren.

3.9. Untersuchung der Stabilität von VEGF₁₆₅-Wildtyp und VEGF₁₆₅-Mutante Protein in Wundlysaten von db/db Mäusen

Um die Stabilität von VEGF-Wildtyp und VEGF-Mutante Pro₁₁₁ Protein zu untersuchen wurden 5ng der Proteine in Wundlysaten der Tage 3, 5, 8 und 14 nach Wundsetzung für 2, 4 und 6 Stunden bei 37° C inkubiert und mittels Western Blot auf ihre Degradation untersucht. Aus eukaryotischen Zellen isoliertes VEGF Protein kann auf dem Western Blot als Doppelbande (aufgrund verschiedener Glykosylierung) bei etwa 42/45 KDa detektiert werden. Die Degradation durch Plasmin führt zu einer Abspaltung eines 55 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Fragments. Von uns wurde nach der Spaltung durch Plasmin ein etwa 38 KDa großer Rest des N-Terminus im Immunoblot detektiert.

In dem Ansatz wurde als Kontrolle des plasminspezifischen Abbaus eine zusätzliche 6 Stunden Inkubation mit alpha-2-Antiplasmin versetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 A dargestellt. Hier ist deutlich zu erkennen, daß bereits an Tag 3 zu allen 3 Inkubationszeitpunkten (2, 4 und 6h) eine Degradation der Wildtyp-Form stattfindet, während kaum Degradation bei den Inkubationen der Wildtyp-Form mit Inhibitor bzw. der Mutante erkennbar ist. Bei der 6h Inkubation von VEGF-Wt ist nur noch ein sehr schwacher Proteinschleier unterhalb von 42 KDa erkennbar, während bei einer sechs stündigen Inkubation in Wundlysate das mutierte Proteins kaum Degradation aufweist. An den Tagen 5 und 8 nach Wundsetzung ist der Abbau des Wildtyp Proteins noch deutlicher, da die Bandenintensität auf dem Western Blot auch schon bei 2 und 4 Stunden Inkubation mit Wundlysate deutlich abnimmt und nach 6 Stunden das Wildtyp-VEGF fast vollständig degradiert vorliegt. Auch hier ist eine deutliche Stabilisierung der plasminresistenten VEGF Variante erkennbar, da wiederum nur minimale Degradation detektiert wird. An Tag 14 scheint die Plasminaktivität auf ähnlichem Niveau wie an Tag 3, da hier ebenfalls nach 6 Stunden Inkubation des Wildtyps mit Wundlysate noch ein Proteinschleier unterhalb von 42 KDa erkennbar ist. An allen 4 Zeitpunkten ist alpha-2-anti Plasmin in der Lage die Degradation des Wildtyps sehr stark einzuschränken. Das mutierte VEGF Protein wird an keinem dieser 4 Zeitpunkte nach 6 Stunden Inkubation mit Wundlysate deutlich abgebaut. Eine densitometrische Auswertung der Western Blots bestätigt das Ergebnis (siehe Abb. 24 B).

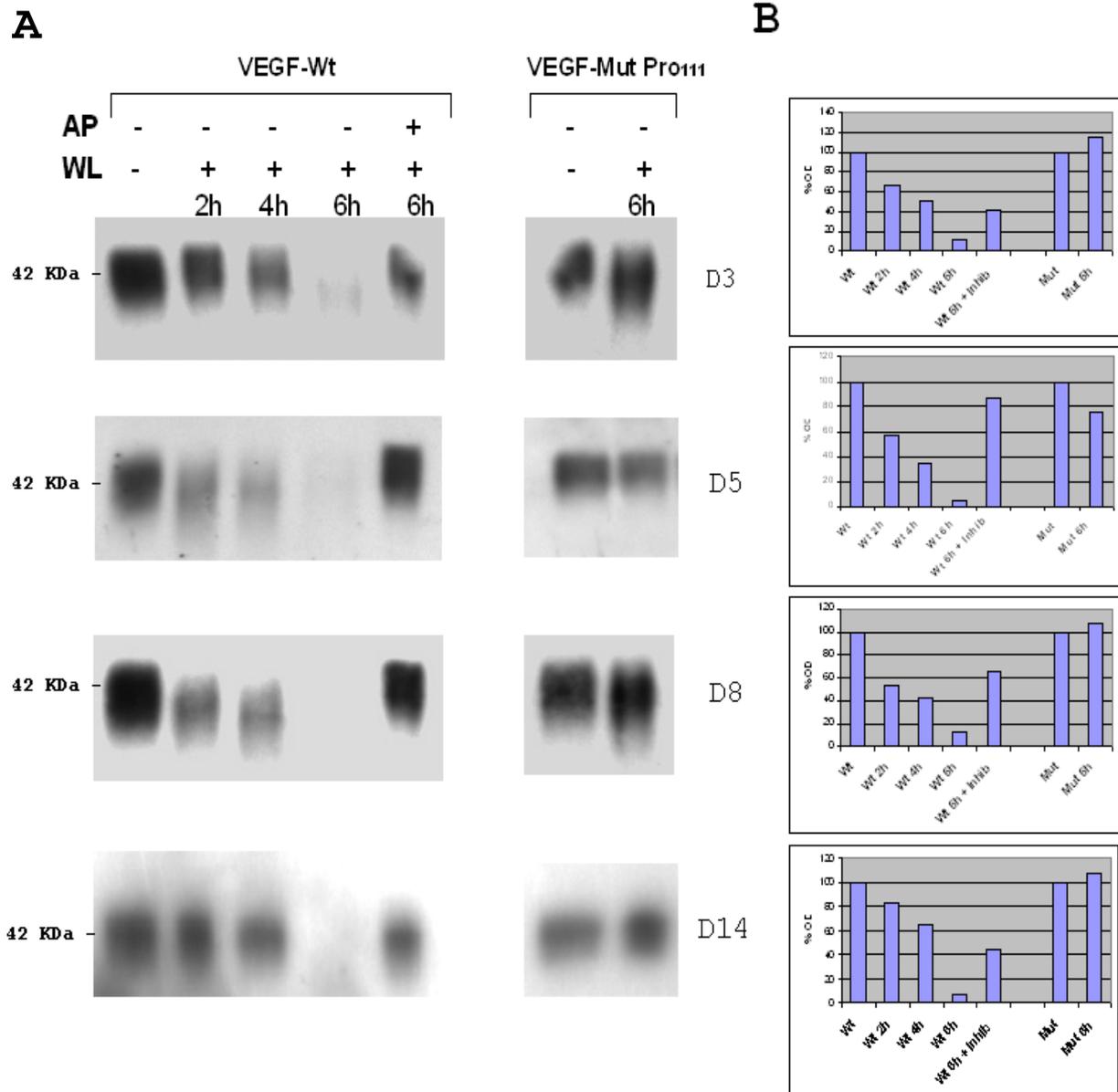


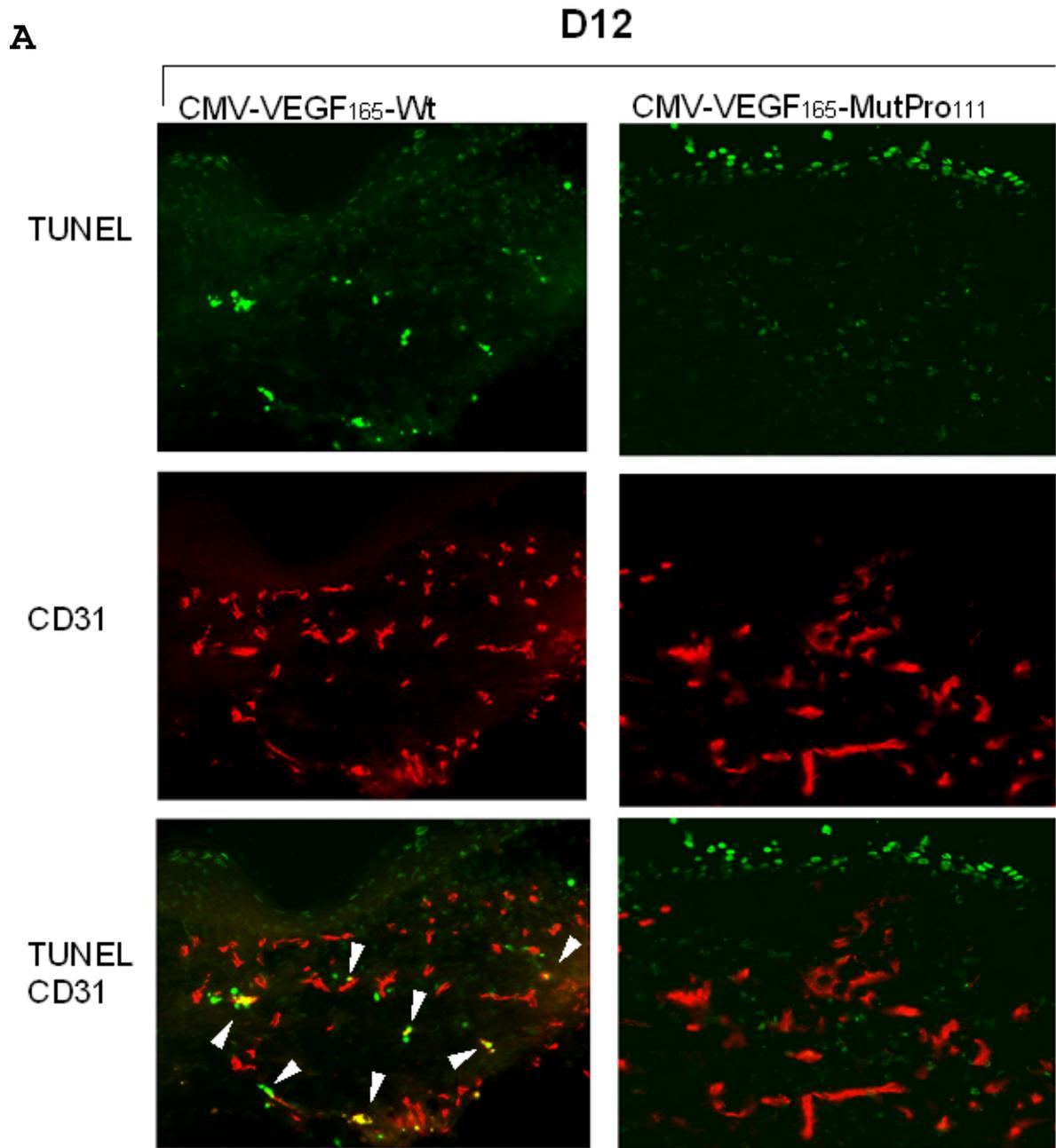
Abbildung 24: Degradation von VEGF. A) Untersuchung der Degradation von rekombinantem VEGF-Wildtyp und VEGF-Mutante Protein durch Wundlysate von db/db Mauswunden der Tage 3, 5, 8 und 14 nach Wundsetzung dargestellt im Western Blot Verfahren. Von links nach rechts wurden auf den Immunoblot jeweils aufgetragen: Wildtyp-VEGF ohne Wundlysate, Wt-VEGF inkubiert für 2h mit Wundlysate, für 4h, für 6h und für 6h mit Zusatz von Plasmin-Inhibitor α -2-anti-Plasmin (7 IU/ml), sowie VEGF-Mutante ohne Lysate und inkubiert für 6h mit Wundlysate. Es wurden gleiche Mengen der beiden rekombinanten VEGF eingesetzt, die zuvor mit Hilfe eines VEGF-Elisa bestimmt wurden.

B) Densitometrische Auswertung der Immunoblots aus 17 A. Dargestellt ist die Abnahme des densitometrischen Signals im Bereich von 42/45 KDa in % ausgehend von dem Ursprungssignal (nicht inkubiertes VEGF-Wt oder VEGF-Mut Pro₁₁₁ Protein).

3.10. Untersuchung der Apoptose in VEGF₁₆₅-Wildtyp und VEGF₁₆₅-Mutante behandelten Wunden

Ein möglicher Grund für das verlängerte Vorhandensein von Endothelzellen während der späten Phase der Wundheilung nach Behandlung mit VEGF-Mut Pro₁₁₁ im Vergleich zu dem VEGF-Wildtyp könnte eine andauernde Bioaktivität der Mutante aufgrund von verlängerter Halbwertszeit sein. Diese verlängerte Bioverfügbarkeit von funktionalem VEGF wiederum könnte dazu führen, daß über einen längeren Zeitraum anti-apoptotische Signale für Endothelzellen verfügbar sind. Um dies zu überprüfen wurden Kryoschnitte von Tag 12 nach Wundsetzung mit einer Fluoreszenz-Doppelfärbung mit PECAM-1 und der TUNEL-Methode untersucht. Hierbei wurde zunächst die TUNEL-Färbung (grüner Fluoreszenzfarbstoff) durchgeführt, bei der es sich um eine Nachweismethode für DNA-Strangbrüche handelt, welche während der Apoptose entstehen. Im Anschluss daran folgte eine PECAM-1 Immunfärbung, bei der an den Sekundäntikörper ein roter Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. In Abbildung 24 A sind repräsentative Bilder der Doppelfärbung an Tag 12 dargestellt. Bei Tag 12 nach Wundsetzung erkennt man bei den mit CMV-VEGF₁₆₅ Wt transfizierten Wunden deutlich doppelt markierte Zellen, während bei der Mutante kaum Doppelmarkierungen detektierbar sind. Ein Auszählen der positiven Doppelfärbungen, bei denen jeweils 3 Ausschnitte von 4 verschiedenen Geweben untersucht wurden, lieferten einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Mutante mit der Wildtyp-Form an Tag 12 (siehe Abbildung 24 B). Es findet demnach verstärkt Apoptose in den mit VEGF-Wildtyp transfizierten Wunden an Tag 12 statt (Signifikanz: n=4 ;p < 0,002).

Hingegen ist kaum Apoptose in den mit VEGF-Mutante transfizierten Wunden an Tag 12 detektierbar. An Tag 18 kann in den Narben beider Wundbehandlungen Apoptose in vergleichbarem Umfang beobachtet werden (aufgrund zu geringer Gewebezahl hier nicht dargestellt).



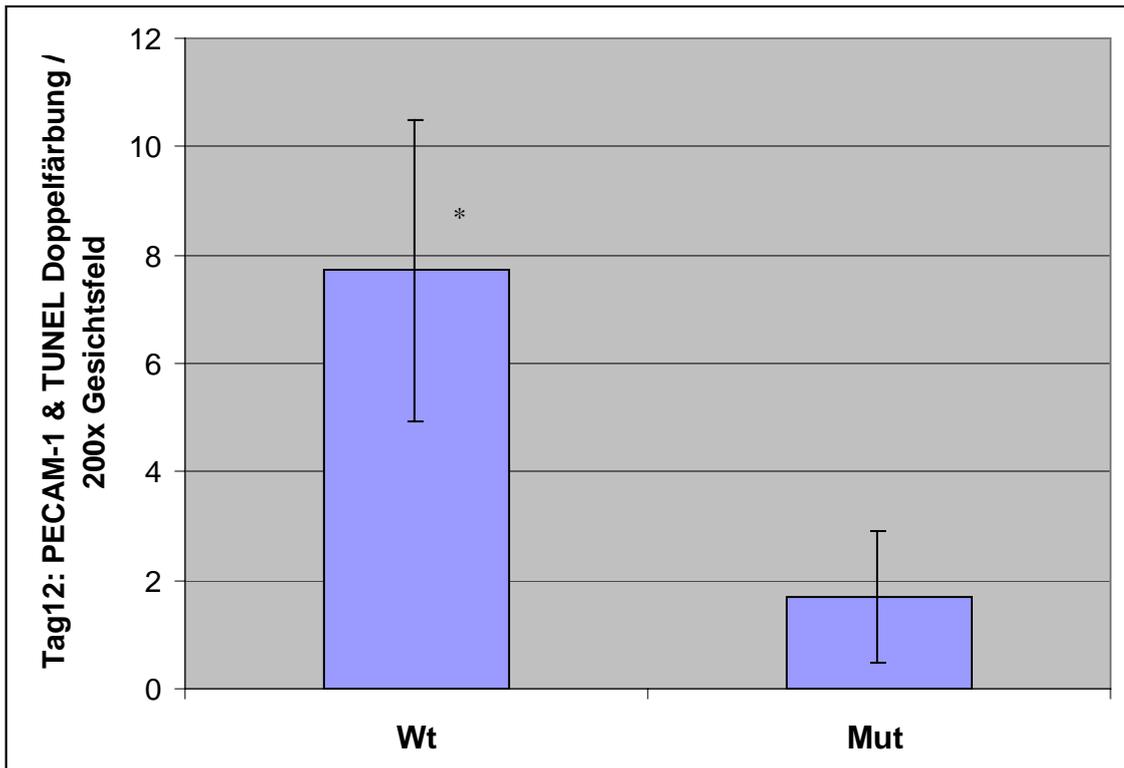
B

Abbildung 24: Doppelfärbung TUNEL und PECAM-1. A) Exemplarische Bilder für Wunden an Tag 12 nach Wundsetzung, die mit CMV-hVEGF165 Wildtyp (links) oder mit CMV-hVEGF165 Mut Pro111 (rechts) transfiziert wurden. Im oberen Teil sind die Apoptosefärbungen (TUNEL) allein, in der Mitte die Endothelfärbungen (PECAM-1) allein und unten beide Färbungen zusammen dargestellt. Die Bilder wurden mit 200x Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (weiße Pfeile zeigen doppelt markierte Endothelstrukturen).

B) Ergebnis der Auszählung von Doppelfärbungen für TUNEL und PECAM-1 von 3 verschiedenen Aufnahmen (200x) pro Wunde von jeweils 4 verschiedenen Tieren (n=4; * = Signifikanz $p < 0,05$).

4. Diskussion

4.1. Wirkung von VEGF auf die Wundheilung der db/db Maus

4.1.1. Die lokale Verabreichung von VEGF₁₆₅ beschleunigt den Wundschluss im db/db Mausmodell

Wir haben zunächst rekombinantes humanes VEGF₁₆₅ Protein, welches topisch in einem Hydrogel appliziert wurde, auf die Wunden gegeben und die Wundheilung sowohl makroskopisch als auch histologisch untersucht. Als Kontrolle diente eine weitere Wunde auf der gleichen Maus, die nur mit dem Hydrogel ohne VEGF analog behandelt wurde.

Makroskopisch konnten wir einen beschleunigten Wundschluss beobachten, der nach histologischer Untersuchung auf einer verstärkten Ausbildung eines Granulationsgewebes und einer beschleunigten Reepithelialisierung beruhte.

In den histologischen Färbungen mit PECAM-1 und VEGFR-2 der Wunden fällt ab Tag 5 deutlich auf, dass die VEGF-Behandlung zur Induktion eines gefäßreichen und zellreichen Granulationsgewebes an den Wundrändern und im Wundgrund führt. Die Ausbildung eines funktionalen Granulationsgewebes ist die Grundlage für eine erfolgreiche Reparatur.

Als Erklärung für den verbesserten Wundschluss nach VEGF-Behandlung kommen zum einen direkte von VEGF vermittelte Effekte, als auch indirekte durch die Ausbildung eines funktionalen Granulationsgewebes und die erhöhte Angiogenese ausgelöste Mechanismen in Frage. VEGF hat primär einen stimulierenden Effekt auf Endothelzellen, die durch Proliferation und Migration zur vermehrten Ausbildung von Gefäßen führen. Diese Gefäße wiederum können ihrerseits die Einwanderung von im Blut enthaltenen mononukleären und inflammatorischen Zellen in die Wunde erleichtern. Darüber hinaus steigert VEGF die Permeabilität von Gefäßen, wodurch Plasmaproteine und Serumbestandteile wie Fibrinogen, Plasminogen, Fibronectin und Vitronectin austreten und zur Bildung einer temporären Matrix führen. Diese temporäre Matrix erleichtert die Migration und Infiltration von inflammatorischen Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten in die Wunde. Ein weiterer direkter Effekt von VEGF ist zudem die chemotaktische Wirkung auf Makrophagen über VEGFR-1, die zusätzlich zum Einwandern dieser Zellen in die Wunde führt. Die eingewanderten Zellen (Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen) sind ein wichtiger Bestandteil des Granulationsgewebes, da sie durch die Expression von Wachstumsfaktoren wie KGF, HGF und IGF die Migration und Proliferation der Keratinozyten regulieren (Rubin *et al.*, 1989; Finch *et al.*, 1989). Darüber hinaus exprimieren Makrophagen FGF und VEGF,

die chemotaktische Signale für Fibroblasten und Endothelzellen liefern (Folkman & Klagsbrun, 1987).

Die Beschleunigung der Reepithelialisierung zeigt, dass ein funktionales Granulationsgewebe vorliegt, da das Granulationsgewebe neben den Wachstumsfaktoren auch eine temporäre Matrix für die Migration der Keratinozyten, die für die Reepithelialisierung zwingend erforderlich ist, zur Verfügung stellt (Kubo *et al.*, 2001; Kirfel *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Eine direkte Wirkung von VEGF auf die Keratinozyten ist aufgrund der nicht vorhandenen VEGF-Rezeptoren auszuschliessen, so dass man von einem indirekten, durch das Granulationsgewebe vermittelten Effekt ausgehen kann.

Richtet man seine Aufmerksamkeit auf die Keratinozyten an den Wundrändern, kann man hier ab Tag 3-5 eine deutliche hyperproliferative Epidermis erkennen. Im Gegensatz zu den unbehandelten Wunden wird um Tag 4-5 nach Applikation von VEGF eine Epithelzunge sichtbar, die sich vom Wundrand langsam über das Granulationsgewebe in Richtung Wundmitte ausbreitet und so die Wunde schließt. Dieser Vorgang findet bei den unbehandelten Wunden in weit geringerem Maße und auch deutlich später – so etwa ab Tag 7 beginnend - statt. Wie bereits beschrieben ist ein funktionales Granulationsgewebe für den Ablauf der Reepithelialisierung unbedingt notwendig, da es den Untergrund mit den für die Migration der Keratinozyten notwendigen Adhäsionsmoleküle liefert und zudem notwendige Wachstumsfaktoren zur Verfügung stellt. Die direkten und indirekten Auswirkungen der VEGF-Behandlung sind in einem Modell veranschaulicht (siehe Abb. 26).

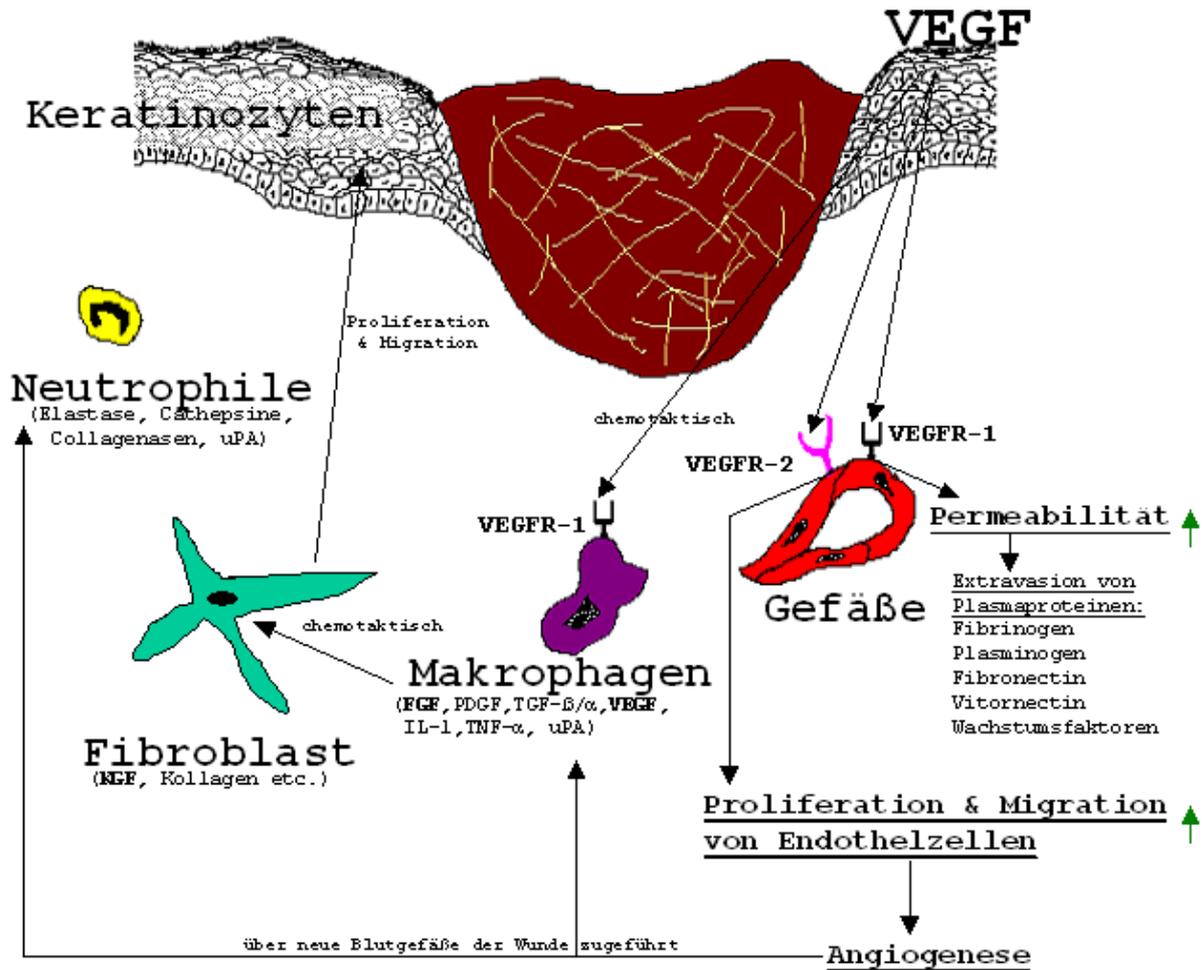


Abbildung 26: Modell für Wirkmechanismen des beschleunigten Wundschlusses nach VEGF-Behandlung. VEGF ist in der Lage über seine Rezeptoren auf Gefäßzellen einerseits über den Flt-1 Rezeptor eine Erhöhung der Permeabilität und andererseits über den VEGFR-2 Rezeptor Proliferation und Migration von Endothelzellen und somit Angiogenese auszulösen. Die erhöhte Permeabilität führt zum Austritt von Plasmaproteinen, Blutplättchen und Neutrophilen. Die Plasmaproteine wie Fibrinogen, Plasminogen, Fibronectin und Vitronectin vernetzen und führen zur Bildung einer temporären Matrix, über die Zellen, die in die Wunde einwandern, besser migrieren können. Die Blutplättchen sorgen für die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF, PDGF usw. und liefern somit chemotaktische Signale für eine Reihe weiterer Zelltypen. Makrophagen werden durch das von uns eingebrachte VEGF chemotaktisch, über eine Bindung an VEGFR-1 in die Wundregion geleitet. Dort exprimieren sie eine Reihe weiterer Faktoren (FGF, KGF, HGF, VEGF etc.), die wiederum auf u.a. chemotaktisch auf Fibroblasten und Endothelzellen wirken. Die eingewanderten Fibroblasten exprimieren ihrerseits Matrixbestandteile (Kollagen etc.) und Wachstumsfaktoren wie KGF, der bei den Keratinozyten Proliferation und Migration auslöst und so die Reepithelialisierung fördert.

4.1.2. VEGF₁₆₅ stimuliert die Angiogenese

Bei Betrachtung der gefärbten Endothelzellmarker PECAM-1 und VEGFR-2 kann man noch deutlicher den durch VEGF ausgelösten Effekt auf diese Wunden erkennen. Nach VEGF Applikation findet man ab Tag 5 die Ausbildung eines zellichten Granulationsgewebes und eine deutlich höhere Gefäßdichte darin im Vergleich zu dem kaum vorhandenen Granulationsgewebe bei den unbehandelten Wunden. Diese neu gebildeten Gefäße können

nun - wie bereits beschrieben - zum einen neue mononukleäre Zellen dem Wundgebiet zuführen und sorgen gleichzeitig für die Versorgung mit Stoffwechselprodukten und Sauerstoff. Die PECAM-1 Färbungen zeigen eine erhöhte Gefäßdichte nach VEGF-Behandlung und die positiven VEGFR-2 Färbungen deuten auf einen direkten VEGF-vermittelten Effekt hin, da VEGF einer der wesentlichen Auslöser für die VEGFR-2 und VEGFR-1 Expression ist (Kremer *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1998; Wange *et al.*, 2000; Arbiser *et al.*, 2000). Darüber hinaus sind auch indirekte Effekte für die stimulierte Angiogenese denkbar. Wie bereits beschrieben kommt es aufgrund der erhöhten Permeabilität zum Austritt von nichtzellulären Plasmabestandteilen (Fibronectin, Vitronectin etc.), die eine provisorische Matrix bilden und somit das Einwandern von Endothelzellen unterstützen. Auch die durch das chemotaktische VEGF-Signal einwandernden Makrophagen setzen Mediatoren frei, die direkt über FGF aber auch indirekt über PDGF Angiogenese fördern können. Zudem werden vorhandene Endothelzellen durch das VEGF-Signal vor Apoptose in regressivem Granulationsgewebe geschützt.

4.2. Vergleich der lokalen Applikation von VEGF₁₆₅ im Wundbereich der db/db Mäuse: Rekombinantes humanes VEGF₁₆₅ Protein vs. Transfektion mit CMV-hVEGF₁₆₅ Plasmid-DNA

Im ersten Ansatz wurde versucht das lokale Wundmilieu durch lokale Applikation von rekombinantem VEGF₁₆₅ Protein zu beeinflussen. Die lokale Applikation rekombinanter Mediatoren wird bereits seit mehreren Jahren in verschiedenen experimentellen DNA-Modellen und klinischen Ansätzen untersucht. Der Einsatz von rekombinantem Protein in der Wundheilung ist jedoch nicht ganz unproblematisch, da bei der Applikation hohe Dosen und eine mehrmalige Gabe notwendig sind um eine ausreichende Aktivität zu gewährleisten. Darüber hinaus stellt der Wundschorf nicht nur für Pathogene eine Barriere dar, sondern auch applizierte Faktoren können ihn nur teilweise durchdringen. Des Weiteren liegt in der Wunde ein proteolytisch aggressives Milieu vor, das ebenfalls zu einer Einschränkung der Bioaktivität und Bioverfügbarkeit durch Degradation der Proteine beiträgt. Zusätzlich ist es denkbar, dass in der Wunde inhibierende Moleküle exprimiert werden, die auch direkt das eingebrachte Protein oder indirekt die von ihm aktivierten Signalwege inhibieren können (Eming *et al.*, 2004). Einen weiteren Nachteil der Proteinapplikation stellen die entstehenden Unkosten für den Kauf bzw. der Zeitaufwand für die Herstellung und Aufreinigung des Proteins dar.

Demgegenüber bietet die Verabreichung von Wachstumsfaktoren in der Wunde mittels kutanem Gentransfer Vorteile. Es existieren virale (Adenoviren, Retroviren und AAV) und nicht-virale (Partikelbombardment, Lipofektionen u.a.) Methoden des kutanen Gentransfers, die bereits erfolgreich von unserer Arbeitsgruppe und anderen Forschern eingesetzt wurden (Benn *et al.*, 1996; Eming *et al.*, 1999). Durch die konstante Expression des eingebrachten Gens wird lokal in einem limitierten Zeitfenster eine konstante Expression des Transgens erreicht. Dies führt zu einer guten Bioverfügbarkeit und Bioaktivität, auch wenn die Proteinkonzentration insgesamt wahrscheinlich niedriger ist als bei topischer Applikation von rekombinantem Protein. Dieser Umstand der niedrigeren Konzentration muss jedoch nicht unbedingt negativ sein. So wurde erst vor kurzem gezeigt, dass nicht eine hohe Gesamtdosis von VEGF, sondern vielmehr eine konstant niedrige VEGF Konzentration im lokalen Mikromilieu darüber entscheidet, ob VEGF zu physiologischer Angiogenese mit normalen funktionalen Gefäßen führt, oder ob es zur Bildung abnormaler Gefäße und Hemangionomen kommt (Ozawa *et al.*, 2004). Darüber hinaus können durch die geringe Dosierung auch toxische Wirkungen verringert werden. Zudem ist in gewissem Umfang eine Regulierung der Expression über die Expressionsstärke des verwendeten Promotors für das Transgen möglich. Da das Transgen von körpereigenen Zellen exprimiert wird, ist auch die Wahrscheinlichkeit von Immunreaktionen sehr gering. Zudem liegt das transgene Protein in einer nativen, dem Umfeld des Expressionsortes entsprechenden Form vor, was bei einer Proteinbehandlung nicht unbedingt gewährleistet ist. Ein weiterer Vorteil der *in vivo* Transfektion sind die langfristig gesehen geringen Kosten und die einfache Handhabung der DNA.

Aus diesen Gründen wurde zusätzlich auf den gleichen Mäusen eine Transfektion via Partikelbombardment mit CMV-hVEGF₁₆₅ Konstrukt durchgeführt, und als Kontrolle auf der gleichen Maus ein weiteres Rückenareal mit CMV-Lac Z Plasmid transfiziert. Unmittelbar nach der Transfektion wurde im Zentrum der beschossenen Haut analog zu vorher eine Wunde gesetzt. So war es möglich einen direkten Vergleich mit der Protein-Behandlung auf der gleichen Maus vornehmen zu können.

Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wundschluss, der Induktion eines gefäßreichen Granulationsgewebes und der Reepithelialisierung zwischen den mit VEGF-Protein oder Plasmid behandelten Wunden vor. Beide waren in gleichem Maße dazu in der Lage einen signifikant beschleunigten Wundschluss im Vergleich zu den beiden Kontrollen herbei zu führen.

In der Arbeitsgruppe um Davidson konnte gezeigt werden, dass nach kutaner Transfektion mit Partikelbombardment etwa 15ng transgenes Protein gebildet wird (Benn *et al.*, 1996; Eming *et*

al., 1999). Dies erscheint zunächst im Vergleich zu der Konzentration von verabreichtem rekombinantem Protein gering. Jedoch ist bei der Behandlung mit rekombinantem Protein davon auszugehen, dass nicht die gesamte applizierte Proteinmenge wirksam ist bzw. ihre Zielzellen erreicht. Zudem ist die geringe lokale Proteinkonzentration nicht zwingend von Nachteil, da wie bereits erwähnt im Fall von VEGF die Reduzierung der lokalen Konzentration des Proteins zur Ausbildung eines funktionalen Gefäßsystems geführt hat, während eine höhere Dosierung zu Missbildungen der Endothelstrukturen führte (Ozawa *et al.*, 2004).

So scheint es, dass in unserem Modell bereits kleine, relativ konstante Mengen von VEGF während der frühen Phase der Wundheilung einen vergleichbar positiven Effekt auf die von uns gemessenen Wundparameter haben wie eine mehrfache hochdosierte Gabe von rekombinantem Protein.

So konnten wir zeigen, dass das Partikelbombardment mit einem VEGF Expressionsplasmid erfolgreich zur Erhöhung der biologischen Aktivität von VEGF im Wundbereich eingesetzt wurde. Die Transfektion war hierbei transient und umfasste im Wesentlichen nur die Epidermis. Die markoskopischen und histologischen Untersuchungen zeigten eine Stimulierung der Angiogenese und einen beschleunigten Wundschluss. Daraus kann abgeleitet werden, dass geringe lokale VEGF Proteinkonzentrationen bereits zu einem Erfolg bei der Verbesserung der Wundeheilung führen.

4.3. Regulation der VEGF₁₆₅ -Aktivität in der Wundheilung durch Plasmin

Die VEGF Aktivität wird unterschiedlich reguliert. Zum einen kann auf der Expressionsebene durch Hypoxie oder andere Wachstumsfaktoren die Expression von VEGF angeregt werden. Auf mRNA-Ebene existieren darüber hinaus Mechanismen, die z.B. bei Hypoxie zu einer Stabilisierung der RNA durch Bindung von Molekülen an die 3'-untranslatierte Region führen (Levy, 1998; Onesto *et al.*, 2004). Zum anderen kann Regulation der VEGF-Aktivität durch alternatives Spleißen der mRNA erfolgen. Die Spleißvarianten unterscheiden sich strukturell im wesentlichen durch das Vorhandensein einer Heparinbindungsdomäne. Neuere Untersuchungen weisen auf eine wichtige Funktion der Heparinbindungsdomäne für VEGF₁₆₅ hin. So wurde gezeigt, dass die Heparin-Bindestelle für eine erhöhte Affinität zu den Rezeptoren verantwortlich ist. Hierbei spielt der Co-Rezeptor Neuropilin-1 eine wichtige Rolle (Soker *et al.*, 1998). Durch die Heparinbindungsdomäne vermittelte Bindung von VEGF₁₆₅ an die extrazelluläre Matrix, kann die Bioverfügbarkeit gesteigert werden, da

gezeigt wurde, dass auch das matrix-assoziierte VEGF₁₆₅ biologisch aktiv ist (Park *et al.*, 1993; Ortega *et al.*, 1998). Durch die Bindung von VEGF₁₆₅ an Endothelzellen kann zudem eine über die Heparinbindungsdomäne vermittelte Interaktion mit Integrinen die Migration der Endothelzellen erleichtern (Hutchings *et al.*, 2003). Hier spielen die Interaktion von Integrin $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ mit matrix-assoziiertem VEGF eine entscheidende Rolle, wobei die Migration der Endothelzellen unabhängig von den VEGF-Rezeptoren stattfindet. Die Heparin-Bindestelle hat zudem eine Schutzfunktion für das Protein, da durch Bindung Chaperon-ähnlicher Moleküle eine durch oxidativen Stress verursachte Schädigung leichter repariert wird (Gitay-Goren *et al.*, 1996).

Einen weiteren Mechanismus der Regulation der VEGF-Aktivität stellt die lösliche VEGFR-1 Variante (sVEGFR-1), die durch alternatives Spleißen entsteht, dar (Kendall *et al.*, 1993; Shibuya *et al.*, 2001). Vor kurzem wurde zudem gezeigt, dass für die Freisetzung von VEGF aus einer Matrix neben einer proteolytischen Abspaltung auch eine Freisetzung durch die Veränderung des lokalen pH-Wertes möglich ist. So blieb VEGF bei einem pH-Wert von 5,5-7 an eine Fibronectin-Matrix gebunden, doch als der pH-Wert auf über 7 erhöht wurde, kam es zu einer Freisetzung von aktivem VEGF (Goerges *et al.*, 2003 & 2004).

In einer aktuellen Untersuchung wurde gezeigt, dass die Metalloproteinase ADAMTS1 an VEGF bindet und eine antiangiogene Wirkung herbeiführt. Die Heparin-bindende Domäne spielt hier für die Interaktion mit der Metalloproteinase eine entscheidende Rolle, da ADAMTS1 im C-terminalen Bereich des Proteins bindet (Luque *et al.*, 2003). Somit könnte ADAMTS1 einen weiteren Modulator der VEGF Bioverfügbarkeit darstellen.

Unsere Arbeitsgruppe machte die Beobachtung, dass auch Proteolyse die VEGF-Aktivität reguliert. Dabei fand man heraus, dass Plasmin VEGF₁₆₅ spaltet, wodurch die Heparinbindungsdomäne verloren geht. Dies stellt einen entscheidenden Eingriff in die biologische Aktivität von VEGF₁₆₅ dar. Allerdings wurden diese Beobachtungen bislang nur *in vitro* gemacht. Um die Hypothese zu untersuchen, ob die VEGF Aktivität auch *in vivo* während des Wundprozesses über Plasmin reguliert wird, haben wir die Wundheilung von Transfektionen mit VEGF₁₆₅ Wildtyp mit denen der plasminresistenten VEGF₁₆₅ Mutante verglichen. Diese Untersuchungen zeigten, dass der Wundschluss, die Granulationsgewebsbildung und die Reepithelialisierung der mit der Mutante behandelten Wunden vergleichbar war mit denen des Wildtyps. In den histologischen Färbungen für PECAM-1 und VEGFR-2 gab es an den frühen Zeitpunkten von Tag 3, 5 und 8 ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp. Erst nach Wundschluss konnten wir eine

verlängerte Persistenz von positiv PECAM-1 und VEGFR-2 gefärbten Endothelstrukturen in der VEGF-Mutante erkennen und messen, während im Wildtyp die Gefäßdichte deutlich abnahm. Dies beruht vermutlich auf der erhöhten Stabilität der Mutante gegenüber proteolytischer Degradation, die zu einer anhaltenden proliferationsfördernden und anti-apoptischen Wirkung/Aktivität führt.

Es gibt Hinweise dafür, dass in den Wunden dieser Tiere ein proteasereiches Milieu zu finden ist. So konnte man in verschiedenen Untersuchungen zeigen, dass die Entzündungsphase während der Wundheilung bei diesen Tieren signifikant länger andauert und eine Reihe von Chemokinen, die chemotaktisch auf Neutrophile und Monozyten wirken, ebenfalls länger und in erhöhtem Maße exprimiert werden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2), welches Neutrophile in die Wunde zieht, und Macrophage Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), welches u.a. für die Einwanderung von Monozyten verantwortlich ist, stärker und länger als bei normal heilenden Tieren exprimiert werden (Wetzler *et al.*, 2000). Auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass MIP-2 deutlich in höherem Maße detektiert wird wie MCP-1. Dies führt zu einer längeren Verweildauer insbesondere von Neutrophilen und inflammatorischen Makrophagen, was auch eine erhöhte Detektion von IL-1 β und TNF- α bis zu Tag 13 nach Wundsetzung widerspiegeln. Des weiteren haben Studien gezeigt, dass es aufgrund der hier vorliegenden Hyperglykämie zur Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGE; hauptsächlich Carboxy (Methyl) Lysine (CML) Edukte) und EN-RAGE (Mitglieder der S100/Calgranulin Familie von proinflammatorischen Cytokinen) kommt. In diesem Zusammenhang wurde eine zunächst verzögerte Infiltration von Neutrophilen und Monozyten beobachtet, die jedoch nach Abschluss der Infiltration zu einer verlängerten Persistenz dieser Zellen in der Wunde und somit zu einer längeren Entzündungsphase führte. Die Autoren dieser Publikation erklären diesen Zustand mit der Tatsache, dass der Rezeptor für AGE (RAGE) auf einer Vielzahl von Zellen, unter anderem auch auf Endothelzellen, Fibroblasten und mononukleären phagozytotischen Zellen (zu denen auch Makrophagen gehören), zu finden ist. Wenn sich nun aufgrund der Hyperglykämie AGEs zum Teil in der extrazellulären Matrix ansammeln und einlagern werden diese RAGE exprimierenden Zellen durch temporäre Bindung an AGEs bei ihrer Migration zur Wunde hin aufgehalten. Später dann in der Wunde selbst bewirken die durch Bindung an RAGE ausgelösten Signale eine erhöhte Expression von TNF- α und anderen Cytokinen sowie einer Reihe von Matrixmetalloproteinasen, die nun für ein proteolytisch aggressives Milieu sorgen und weitere Fortschritte bei der Wundheilung erschweren. Des weiteren wurde auch gezeigt, dass AGE-Bindung an Fibroblasten zu einer

verminderten Kollagenbildung führt, was sich negativ auf die Bildung eines Granulationsgewebes und auch auf die spätere Umbauphase während der Wundheilung auswirken dürfte (Neeley *et al.*, 2000; Goova *et al.*, 2001).

Es sind unterschiedliche Mechanismen denkbar über die VEGF zu einer verlängerten Persistenz der Endothelzellen in den bereits geschlossenen Wunden führt. Es wurde gezeigt, dass VEGF ein wichtiger Überlebensfaktor für Endothelzellen ist (Gerber *et al.*, 1998; Benjamin *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 1996). Entzug von VEGF war in einer Reihe von Untersuchungen für das Absterben von Endothelzellen verantwortlich, während Zugabe von VEGF die Apoptose unterband und die vaskulären Strukturen erhielt. Die anti-apoptotische Wirkung wird über VEGFR-2 vermittelt (Yilmaz *et al.*, 2003; Sweeney *et al.*, 2002). Während der späten Phase der Wundheilung zeigen Endothelzellen Veränderungen, die der Apoptose ähneln und die Vermutung nahe legen, dass der programmierte Zelltod an der Umwandlung von stark verzweigten vaskulären Strukturen des Granulationsgewebes hin zum avaskulären Narbengewebe beteiligt ist (Desmouliere, 1995). Möglicherweise spielt bei diesem Prozess der Entzug von Wachstumsfaktoren eine Rolle. Unsere Untersuchungen bezüglich der Apoptose von Endothelzellen an Tag 12 nach Wundsetzung zeigten, dass in signifikant geringerem Ausmaß doppelt angefärbte apoptotische Endothelzellen in den mit der plasminresistenten Mutante transfizierten Wunde verglichen mit dem VEGF Wildtyp detektierbar waren. So ist es denkbar, dass die verlängerte Halbwertszeit des stabilen VEGFs nach Schluss der Wunde die Apoptose der Endothelzellen (Kane & Greenhalgh, 2000) unterbindet und es so zu einer verlängerten Persistenz der Gefäße nach dem Wundschluss kommt.

In der Abbildung 27 haben wir unsere Hypothese bezüglich der Wirkung der VEGF-Mutante grafisch dargestellt.

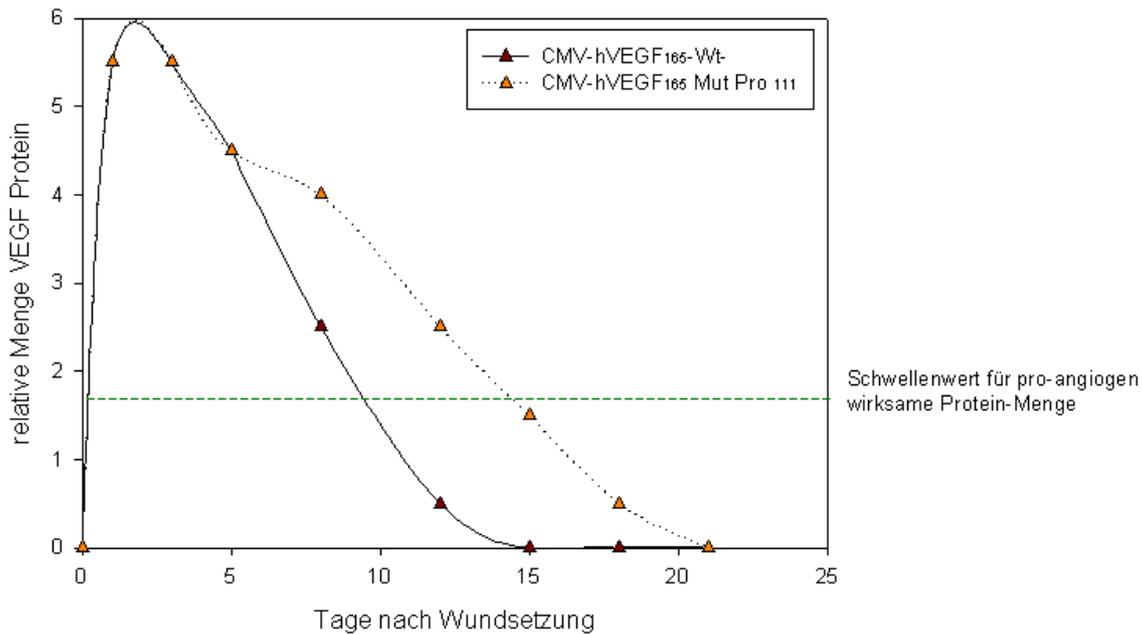


Abbildung 27: Grafische Darstellung unserer Hypothese der verlängerten Stabilität der plasminresistenten VEGF-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nach transients Transfektion mit der Gene-Gun.

Wie lässt sich die erhöhte/verlängerte Aktivität der VEGF Mutante erklären? Untersuchungen haben gezeigt, dass die Heparin-bindende Domäne von VEGF₁₆₅ eine kritische Rolle für die Funktion des Proteins spielt. So wäre es vorstellbar, dass in unserer plasminresistenten VEGF Mutante die Integrität dieser Domäne unter proteolytischen Bedingungen im Wundmilieu der db/db Maus geschützt ist. Die Heparinbindungsdomäne stellt darüber hinaus eine wichtige Determinante für die Affinität der Bindung von VEGF an seine Rezeptoren dar. Ein Großteil der funktionellen Signale von VEGF ist mediiert über die Bindung an VEGFR-2. Allerdings können die mitogenen, proliferativen und anti-apoptotischen Signale durch die Bindung an den Co-Rezeptor Neuropilin-1 erleichtert und zum Teil auch verstärkt werden (Soker *et al.*, 1997 & 1998, Whitaker *et al.*, 2001). Für die Bindung von VEGF an den Neuropilin-Rezeptor wurde die Heparin-bindende Domäne als determinierendes Epitope identifiziert (Soker *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Heparinbindungsdomäne eine kritische Rolle bei der Erhöhung der Bindungsaffinität von VEGF an VEGFR-2 über zelloberflächenassoziierte Heparin-verwandte Moleküle zukommt (Gitay-Goren *et al.*, 1992). Zusätzlich konnte diese Gruppe später zeigen, dass die Fähigkeit von VEGF₁₆₅ Heparin zu binden, es ermöglicht oxidative Schäden an dem VEGF Molekül zu beheben über die Stabilisierung von VEGF mittels eines Chaperon-ähnlichen Moleküls (Gitay-Goren *et al.*, 1996). In chronischen, nicht heilenden Wunden konnten vermehrt oxidative Moleküle und

freie Radikale nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wäre eine Stabilisierung der Heparin-bindenden Domäne entscheidend für die Behebung von oxidativem Stress.

Darüber hinaus ist die Heparinbindungsdomäne auch eine Determinante bezüglich der freien Löslichkeit bzw. der Assoziation von VEGF mit Komponenten der extrazellulären Matrix oder Plasmamembranproteinen. Während VEGF₁₂₁ eine Isoform ohne die Heparin-bindende Domäne ist, deswegen nicht an Heparansulfate bindet und frei diffundieren kann, stellt VEGF₁₈₉ mit beiden Heparin-bindenden Domänen eine Form des Proteins dar, die primär an die Zellmembran oder die extrazelluläre Matrix gebunden vorliegt. VEGF₁₆₅ hingegen ist in der Lage sowohl zell- bzw. matrixassoziiert als auch frei diffundierend vorzuliegen. Ursprünglich ging man davon aus, dass gebundenes VEGF₁₆₅ als Reservoir dient. Mittlerweile wurde jedoch auch gezeigt, dass zell- bzw. matrixassoziiertes VEGF₁₆₅ auch biologisch aktiv ist (Park *et al.*, 1993; Ortega *et al.*, 1998). Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass die immobilisierten VEGF-Isoformen mit einer Heparin-bindenden Domäne die über die Integrine $\alpha\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$ vermittelten Adhäsions-, Migrations- und Überlebenssignale unterstützen (Hutchings *et al.*, 2003). In unserem Modell läge die Spekulation nahe, dass die Inaktivierung der Plasminschnittstelle den Anteil an matrix-assoziiertem VEGF₁₆₅ erhöht und dadurch VEGF₁₆₅ vermittelte Prozesse erleichtert. Veränderte VEGF-Rezeptor Affinität und/oder matrix-bindende Eigenschaften könnten separat und/oder gemeinsam die Aktivität der plasminresistenten VEGF₁₆₅ Mutante im Wundmilieu der db/db Maus bestimmen.

In Abbildung 28 ist eine Hypothese bezüglich der andauernden Bioaktivität und der Bedeutung der Heparinbindungsdomäne des VEGF₁₆₅ Mut Pro₁₁₁ Proteins durch Vergleich mit dem VEGF-Wildtyp Protein und den wahrscheinlichen Vorgängen während der Wundheilung in unserem Tiermodell veranschaulicht.

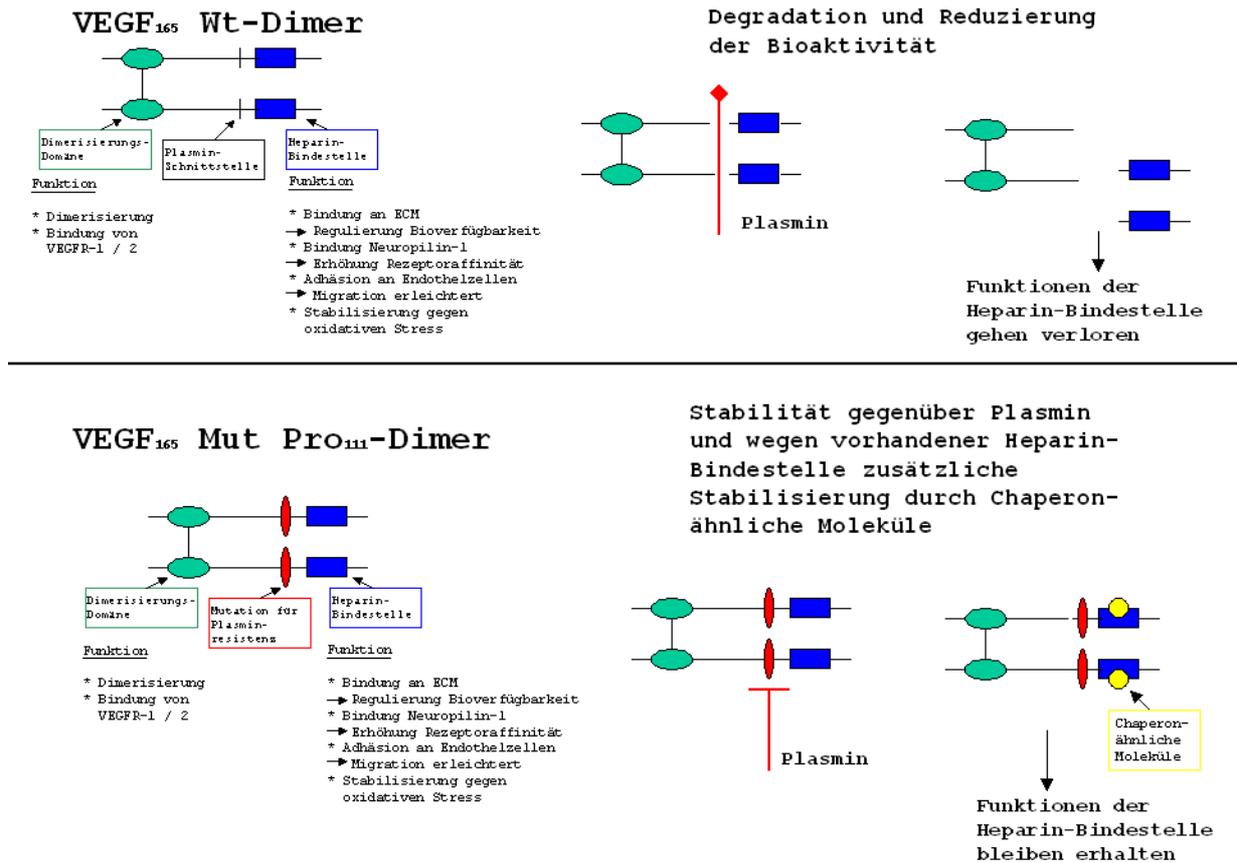


Abbildung 27: Hypothese der erhöhten Stabilität des VEGF-Mut Pro Proteins im Vergleich zu dem Wildtyp Protein in den Wunden der db/db Mäuse. Im oberen Teil der Abbildung kann die Plasminschnittstelle bei der Wildtypform degradiert werden und es kommt so zum Verlust der Heparin-Bindestelle. Dies resultiert in einer signifikant verminderten Bioaktivität des VEGF-Spaltproduktes. Im unteren Teil der Abbildung ist das VEGF-Mut Pro Protein dargestellt. Das Protein kann aufgrund der vorliegenden Mutation nicht von Plasmin geschnitten werden. Aus diesem Grund ist das VEGF-Mut Pro Protein weitgehend stabil gegenüber dem proteolytischen Milieu in der Wunde der db/db Maus. Zusätzlich erfolgt durch Bindung von Chaperon-ähnlichen Molekülen an die Heparinbindungsdomäne eine weitere Stabilisierung des Proteins gegenüber oxidativem Stress, welcher während der Wundheilung – aufgrund der Ausschüttung reaktiver Sauerstoff-Spezies durch Neutrophile – präsent ist.

Warum kann die VEGF-Mutante die Wundheilung nicht weiter gegenüber dem Wildtyp beschleunigen? Hier sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Zum einen könnte bereits durch die Transfektion mit dem Wildtyp ein Überschuss an Protein vorhanden sein, so dass eine proteolytische Degradation von VEGF nicht in dem Maße zum tragen kommt. Letzendlich kann eine Inaktivierung des mutierten VEGFs durch eine immunspezifische Reaktion nicht ausgeschlossen werden. Andererseits kann möglicherweise auch unser System aufgrund der von uns gewählten Wundgröße mit VEGF-Wildtyp bereits den bestmöglichen Heilungsverlauf haben, so dass hier eventuell eine schwierigere Aufgabe für unsere System – beispielsweise durch eine größere Wunde oder durch eine Reduzierung der DNA-Menge bei

der Transfektion – erforderlich ist um einen Vorteil zugunsten der VEGF-Mutante zu ergeben. Festzuhalten bleibt zunächst, dass die Bioaktivität der Mutante während der Wundheilung in unserem Modell mit der des Wildtyps vergleichbar ist. Der Unterschied der Bioaktivität tritt erst nach Abschluss der Heilung auf, wenn es zu einer verlängerten Persistenz von Endothel im Narbengewebe nach VEGF-Mutante Behandlung kommt, die auf einer verminderten Apoptose nach Wundschluss beruht.

4.4. Therapeutische Ansätze und Aussichten für eine pro-angiogene Therapie in chronischen Wundheilungsstörungen

Die dargestellten Untersuchungen haben neben zellbiologischen Aspekten auch eine klinische Relevanz. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF in dem db/db Tiermodell in der Lage ist den Wundschluss, die Ausbildung von Granulationsgewebe und die Angiogenese signifikant zu verbessern. Somit wäre der Einsatz von VEGF bei Wundheilungsstörungen die erste Indikation. Andere Gruppen haben bereits VEGF klinisch getestet und anfänglich gute Ergebnisse erzielt, jedoch führte der Einsatz von VEGF bei chronischen Wunden neben einer verbesserten Vaskularisierung auch zu einer erhöhten Ödembildung (Suri *et al.*, 1998; Baumgartner *et al.*, 2000). Dies ist auf die Erhöhung der vaskulären Permeabilität zurück zu führen (Dvorak *et al.*, 1995). So erschien zuerst eine Monotherapie nur mit VEGF wenig sinnvoll. Allerdings stellte sich vor kurzem heraus das die lokale VEGF Konzentration entscheidend für die Wirksamkeit und die Ausbildung eines funktionalen Gefäßsystems ist (Ozawa *et al.*, 2004). So wurde gezeigt, dass VEGF in sehr geringen Mengen lokal exprimiert zur Ausbildung von normalen und funktionalen Gefäßen ohne Missbildungen und Ödemen führen kann. Eine Kombinationstherapie mit Angiopoietin-1 erscheint ebenfalls sinnvoll, da Ang-1 Gefäße stabilisiert und deren Permeabilität deutlich reduziert (Thurston *et al.*, 1999; Jain & Munn, 2000; Thurston *et al.*, 2000; Gamble *et al.*, 2000). Erste Experimente einer Kombinationstherapie am ischämischen Myokard zeigten eine deutliche Steigerung der kapillaren Dichte und somit eine verbesserte Perfusion im Vergleich zu einer Behandlung mit VEGF oder Ang-1 alleine (Siddiqui *et al.*, 2003). Eine Erklärung für die verbesserte Stabilität der neu gebildeten Gefäße im Zusammenhang mit Ang-1 Expression wurde von Metheny-Barlwo *et al.* in diesem Jahr erbracht. Man entdeckte, dass Ang-1 in Präsenz von VEGF in der Lage ist mesenchymale Zellen über Chemotaxis zu einem entstehenden Gefäß zu führen, die vor Ort zu periendothelialen Zellen differenzieren und somit Stabilisierung herbeiführen.

Ein anderer Ansatz, bei dem VEGF an eine Polyethylenglykol-Matrix assoziiert verabreicht wurde, konnte veranschaulichen, dass die durch das zelluläre Umfeld kontrollierte Freisetzung von VEGF aus der Matrix durchaus die Bildung von stabilen und funktionalen Gefäßen herbeiführen konnte (Zisch *et al.*, 2003). Weitere Experimente mit anderen Matrices (u.a. Fibrin-Matrix) bestätigten die in der ersten Untersuchung gefunden Ergebnisse (Ehrbar *et al.*, 2004; Seliktar *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse zeigen, dass die lokale Konzentration von VEGF entscheidend für die korrekte und funktionale Ausbildung von neuen Gefäßen ist, und dass an eine Matrix assoziiertes VEGF eine Art Depotfunktion besitzt und durch das zelluläre Umfeld eine Aktivierung erfahren kann.

Die Anwendung einer plasminresistenten VEGF Mutante ist insbesondere für chronische Wunden mit erhöhten proteolytischen Wundmilieu interessant. Diese Situation finden wir u.a. in chronischen nicht-heilenden Wunden im humanen System vor. Hier wurde mehrfach eine erhöhte proteolytische Aktivität in Wunden und deren sezernierter Wundflüssigkeit nachgewiesen. Insbesondere waren die Level an Metalloproteinasen, neutrophiler Elastase und Plasmin im Vergleich zu akuten/heilenden Wunden erhöht (Palolahti *et al.*, 1993; Weckroth *et al.*, 1996; Yager *et al.*, 1996; Vaalamo *et al.*, 1997). Es gelang mehreren Gruppen zu zeigen, dass durch diese erhöhte proteolytische Aktivität wichtige regulatorische Faktoren wie Fibronectin, Vitronectin und Plasminogen gespalten werden und so einen Teil ihrer Bioaktivität/Funktion einbüßen (Grinnell *et al.*, 1992; Wlaschek *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 1998).

Darüber hinaus existieren weitere interessante Angiogenesefaktoren, welche die Angiogenese in der Wundheilung beeinflussen und sich als therapeutische Ziele anbieten würden. Eine neuere Untersuchung einem Mausmodell, das HIF-1 in der Epidermis überexprimiert, hat eine erhöhte Vaskularisierung verbunden mit sehr stabilen und undurchlässigen Gefäßen erbracht (Elson *et al.*, 2001). HIF-1 induziert neben VEGF auch weiterer Faktoren, die die Angiogenese regulieren. Untersuchungen der Expression der Angiopoietine zeigten keine Veränderung, so dass die Stabilisierung der Gefäße durch andere Faktoren begründet zu sein scheint (Elson *et al.*, 2001). So wäre es denkbar, dass in naher Zukunft Wundheilungsstörungen und ischämische Erkrankungen via Aktivierung übergeordneter Signalwege wie beispielsweise des Transkriptionsfaktors HIF-1 oder des vor kurzem entdeckten, teilweise HIF-1 homologen Transkriptionsfaktors EPAS1 (Takeda *et al.*, 2004) behandelt werden. Auf diese Weise würden die unerwünschten Effekte von VEGF-Monotherapien wie beispielsweise die Ödembildung reduziert oder ganz ausbleiben, da auf diesem Wege eine reguliertere Aktivierung von Agonisten und Antagonisten stattfände.

Ein weiterer interessanter Faktor scheint Placental Growth Facotr (PlGF), da gezeigt wurde, dass PlGF über VEGFR-1 in der Lage ist in Endothelzellen pro-angiogene Effekte auszulösen (Autiero *et al.*, 2003). Man konnte durch Knockout und Inhibitionsstudien mit blockierenden Antikörpern verdeutlichen, dass PlGF allein und auch zusammen mit VEGF, Angiogenese mit der Ausbildung von stabilen Gefäßen auslösen kann. Hierbei werden unter anderem Heterodimere von VEGF und PlGF gebildet, die an VEGFR-1 binden und wiederum zu einer Dimerisierung von VEGFR-1 und VEGFR-2 führen können. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung des pro-angiogenen Signals. Darüber hinaus ist PlGF über den Rezeptor VEGFR-1 in der Lage auch glatte Muskelzellen, Monozyten und eine Reihe von Vorläuferzellen aus Blut und Knochenmark zu aktivieren und so eine weitere Verstärkung der Angiogenese herbei zu führen. Es wurde auch postuliert, dass PlGF und VEGFR-1 eine Art Schalter für Angiogenese sind, da beide normalerweise konstitutiv in geringen Menge vorhanden sind und erst bei aktiver Angiogenese und insbesondere in pathogenen Situationen der Angiogenese in deutlich erhöhten Mengen exprimiert werden (Luttun *et al.*, 2002; Autiero *et al.*, 2003).

Neben der Verbesserung der Wundheilung wäre natürlich die in der Einleitung erwähnte Regeneration als optimale Wiederherstellung des verletzten Gewebes erstrebenswert. Allerdings erschließt sich erst langsam das Verständnis an dem Phänomen, dass manche Gewebe im adulten Säugetierorganismus in der Lage sind sich zu regenerieren, während andere lediglich auf reparative Mechanismen zur Behebung von Gewebeschäden zurückgreifen können. Die Erforschung von Stammzellen und Vorläuferzellen scheint hier ein vielversprechender Ansatz und aktuell wird die Forschung auf diesem Gebiet stark vorangetrieben (van Bekkum, 2004). Auch auf dem Gebiet der Angiogenese und der Behebung von Gewebeunterversorgung (mit Schwerpunkt auf den kardiovaskulären Bereich) gibt es einige interessante neue Entwicklungen, die zu neuen Behandlungsmethoden dieser pathogenen Zustände führen könnten (Abobott *et al.*, 2003; Asahara *et al.*, 2004). Zudem könnte ein besseres Verständnis der Heilung im Embryonalstadium dazu beitragen, dass Wunden im adulten Lebewesen eines Tages ohne Narben verheilen können.

Schlussendlich besitzen unsere Untersuchungen neben einer zellbiologischen Bedeutung auch eine therapeutischer Relevanz; es ist denkbar, dass eine plasminresistente VEGF₁₆₅ Mutante dem Wildtypprotein bezüglich ihrer angiogenen Wirkung überlegen ist.

5. Zusammenfassung

Ein funktionelles und koordiniertes Gefäßsystem ist essentiell in der Erhaltung der Integrität und Barrierefunktion der Haut. In der Wundheilung spielt eine ausgewogene Regulation stimulierender und inhibierender Faktoren eine entscheidende Rolle für die Wiederherstellung eines funktionellen Gefäßsystems. Eine Störung der Angiogeneseregulation scheint eine wichtige Ursache für die Entstehung und Unterhaltung von Wundheilungsstörungen zu sein. Die zellulären und molekularen Mechanismen der gestörten Angiogenese in chronischen Wunden sind unklar und Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Der "vascular endothelial growth factor" (VEGF) ist ein hochwirksamer endothelzellspezifischer Mediator, der ein Schlüsselmolekül in der Wundheilung darstellt. Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe im Humansystem deuten darauf hin, dass im chronischen Wundmilieu die VEGF vermittelte Angiogenese durch eine funktionelle Inaktivierung des VEGF₁₆₅ Proteins durch eine serinproteasenkatalysierte Degradation eingeschränkt ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszuarbeiten, ob die topische Applikation von VEGF₁₆₅ einen gestörten Wundheilungsphänotyp normalisieren kann. In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von Plasmin in der Regulation der VEGF₁₆₅ -Aktivität in der gestörten Wundheilung untersucht. Bei den Untersuchungen kam das db/db Mausmodell zum Einsatz, in dem in Analogie zur chronischen Wunde im Humansystem, die gestörte Wundheilung mit einer verzögerten Angiogenese und verminderter VEGF Verfügbarkeit einhergeht.

Unsere makroskopischen und histologischen Untersuchungen zeigten, dass die topische Applikation von VEGF₁₆₅ in Form von rekombinantem Protein oder Plasmid DNA, den Wundschluss in einem gestörten Wundprozess mit reduzierter Angiogenese beschleunigen kann. Der beschleunigte Wundschluss ist sowohl durch die Induktion eines gefäßreichen Granulationsgewebes wie auch durch eine beschleunigte Reepithelialisierung zu erklären. Die Stabilisierung von VEGF₁₆₅ gegen eine plasminkatalysierte Degradation verlängert die angiogenetische Antwort, die sich in VEGF₁₆₅-MutPro₁₁₁ transfizierten Wunden durch eine verzögerte Regression der Endothelzellstrukturen im späten Granulationsgewebe zeigte. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtung ist eine Verlängerung der anti-apoptischen Wirkung der plasminresistenten VEGF₁₆₅ Variante. Untersuchungen der Proteinstabilität von VEGF₁₆₅ Wildtyp und VEGF₁₆₅ Mutante in Wundlysaten der db/db Maus zeigten eine erhöhte Stabilität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp und unterstützen somit die Beobachtungen einer verlängerten VEGF₁₆₅ Aktivität der VEGF₁₆₅ Mutante.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit unterstützen somit frühere im Humansystem gewonnenen Erkenntnisse über die Bedeutung eines durch Proteolyse vermittelten Aktivitätsverlustes von VEGF₁₆₅ in der Pathogenese der gestörten Wundheilung. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine Stabilisierung der Integrität des VEGF₁₆₅ Moleküls, insbesondere in einem proteasereichen Milieu der chronischen Wunde, zu einer Steigerung des angiogenetischen Potentials von VEGF₁₆₅ führt. Die Arbeiten unterstreichen somit das therapeutische Potential der plasminresistenten VEGF₁₆₅ Mutante bei chronischen Wundheilungsstörungen.

6. Literaturverzeichnis

Abbott JD, Giordano FJ. Stem cells and cardiovascular disease. *J Nucl Cardiol.* 2003 Jul-Aug;10(4):403-12.

Ahmed A, Dunk C, Kniss D, Wilkes M; Role of VEGF receptor-1 (flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and mimiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Lab Invest* 1997; 76: 779-791

Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE. Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Nov 7;92(23):10457-61.

Arbiser JL, Larsson H, Claesson-Welsh L, Bai X, LaMontagne K, Weiss SW, Soker S, Flynn E, Brown LF. Overexpression of VEGF 121 in immortalized endothelial cells causes conversion to slowly growing angiosarcoma and high level expression of the VEGF receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in vivo. *Am J Pathol.* 2000 Apr;156(4):1469-76.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997 Feb 14;275(5302):964-7.

Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Sep;287(3):C572-9.

Autiero M, Luttun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost.* 2003 Jul;1(7):1356-70.

Bacharach, E., Itin, A., Keshet, E. In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992, 89: 10686-10690.

Bacic M, Edwards NA, Merrill M; Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues: *Growth factors* 1995; 12: 11-15

Bagavandoss, P., Kaytes, P., Vogeli, G., Wells, P. A., Wilks, J. W. Recombinant truncated thrombospondin-1 monomer modulates endothelial cell plasminogen activator inhibitor 1 accumulation and proliferation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993, 192: 325-332.

Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation.* 1994 May;89(5):2183-9.

Banks RE, Forbes MA, Searles J, Pappin D, Canas B, Rahman D, Kaufmann S, Walters CE, Jackson A, Eves P, Linton G, Walker JJ, Shelby PJ; Evidence for the existence of a novel pregnancy-associated soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor : Flt-1. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 377-386

- Barleon B**, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D; Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336-3343
- Baumgartner I**, Rauh G, Pieczek A, Wuensch D, Magner M, Kearney M, Schainfeld R, Isner JM. Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor. *Ann Intern Med.* 2000 Jun 6;132(11):880-4.
- Benjamin LE**, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest.* 1999 Jan;103(2):159-65.
- Benjamin LE**, Glucose, VEGF-A, and diabetic complications. *Am J Pathol.* 2001 Apr;158(4):1181-4.
- Benn SI**, Whitsitt JS, Broadley KN, Nanney LB, Perkins D, He L, Patel M, Morgan JR, Swain WF, Davidson JM. Particle-mediated gene transfer with transforming growth factor-beta1 cDNAs enhances wound repair in rat skin. *J Clin Invest.* 1996 Dec 15;98(12):2894-902.
- Bergers G**, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol.* 2000 Oct;2(10):737-44.
- Bernardini G**, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, Capogrossi MC, Napolitano M. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods.* 2003 Feb;273(1-2):83-101.
- Berse B**, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell.* 1992 Feb;3(2):211-20.
- Bianco P**, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):118-21.
- Birnboim HC**, Doly J; A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Ac Res* 1979; 7: 1513-1523
- Blair**, R. J., Meng, H., Marchese, M. J., Ren, S., Schwartz, L. B., Tonnesen, M. G., Gruber, B. L. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. *J Clin Invest.* 1997 99(11): 2691-700.
- Böcker**, W., Denk, H., Heitz, P. U. Pathologie, 1997 Urban und Schwarzenberg Verlag München: 93-96.
- Brauchle M**, Funk JO, Kind P Werner S; Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 21793-21797
- Brockes JP**. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):81-7.

- Brockes JP**, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Aug;3(8):566-74.
- Brown LF**, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, Van de Water L; Expression of VEGF by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992; 176: 1375-1379
- Brown RL**, Breeden MP, Greenhalgh DG. PDGF and TGF-alpha act synergistically to improve wound healing in the genetically diabetic mouse. *J Surg Res.* 1994 Jun;56(6):562-70.
- Bucalo, B.**, Eaglestein, W.H., Falanga, V. The effect of chronic wound fluid on cell proliferation in vitro. *J Invest Dermatol.* 1989, 92: 408
- Campbell JS**, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, Argast GM, Heinrich PC, Fausto N. Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin Invest.* 2001 May;107(10):1285-92.
- 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: 435-439.
- Carmeliet P**, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkav VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med.* 1999 May;5(5):495-502.
- Carmeliet P.** Developmental biology. One cell, two fates. *Nature.* 2000 Nov 2;408(6808):43, 45.
- Carmeliet P.** Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):653-60.
- Castellucci M**, De Matteis R, Meisser A, Canello R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod.* 2000 Oct;6(10):951-8.
- Charnock-Jones S**, Sharkey A, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield J, Fountain S, Boocock CA, Smith SK; Identification and localization of alternative spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod* 1993; 48 : 1120-1128
- Charnock-Jones S**, Sharkey AM, Boocock C, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, Smith SK; Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod* 1994; 51: 524-530
- Chen H**, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell.* 1996 Feb 9;84(3):491-5.

- Cheresh DA**, Berliner SA, Vincente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 1989; 58:945-53.
- Cheung CY**, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA; Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 753-759
- Chomczynski P** und Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- Claffey KP**, Wilkison WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem*. 1992 Aug 15;267(23):16317-22.
- Clark, R. A. F.** *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (second edition). 1996 Plenum Press, New York
- Clark RAF**, Tonnesen MG, Gailit J, Cheresh DA: Transient functional expression of $\alpha_v\beta_3$ on vascular cells during wound repair. *Am J Pathol*. 1996; 148:1407-21.
- Clauss M**; Functions of the VEGF receptor-1 (FLT-1) in the vasculature. *TCM* 1998; 8: 241-245
- Cohen SN**, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972 Aug;69(8):2110-4.
- Cohen T**, Gitay-Goren H, Sharon R, Shibuya M, Halaban R, Levi B, Neufeld G; VEGF₁₂₁, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell surface heparan sulfates for efficient binding to VEGF receptors of human melanoma cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 11322-11326
- Cohen T**, Nahari D, Cerem-Weiss L, Neufeld G, Levi B; Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 736-741
- Coleman DL**. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*. 1973 Aug;9(4):294-8.
- Coleman DL**. Thermogenesis in diabetes-obesity syndromes in mutant mice. *Diabetologia*. 1982 Mar;22(3):205-11.
- Conn G**, Bayne ML, Soderman D, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA; Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990a; 87: 2628-2632
- Conn G**, Soderman D, Schaeffer MT, Wile M, Hatcher VB, Thomas KA; Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990b; 87: 1323-1327
- Connolly DT**, Heuvelmann DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL; Delfino JJ; Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J; Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989; 84: 1470-1478

- Connolly JF.** Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop.* 1995 Apr;(313):8-18.
- Connolly JF.** Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop.* 1998 Oct;(355 Suppl):S257-66.
- Darnell JE Jr.** STATs and gene regulation. *Science.* 1997 Sep 12;277(5332):1630-5.
- Davidson JM, Krieg T, Eming SA.** Particle-mediated gene therapy of wounds. *Wound Repair Regen.* 2000 Nov-Dec;8(6):452-9.
- Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N;** The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal cascade. *EMBO* 1996; 15: 4919-4927
- De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L.** Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):789-95.
- Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM;** Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 1997; 57: 5590-5597
- Derynck R, Zhang YE.** Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003 Oct 9;425(6958):577-84.
- Desmouliere A.** Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int.* 1995 May;19(5):471-6.
- Detmar M, Brown LF, Berse B, Jackman RW, Elicker BM, Dvorak HF, Claffey KP;** Hypoxia regulates the expression of VPF/VEGF and its receptors in human skin. *J Invest Dermatol* 1997; 108:263-268
- Detmar M, Brown LF, Schön MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L, Fukumura D, Monsky W, Claffey KP, Jain RK;** Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 1-6
- Devries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT;** The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; 255: 989-991
- Dvorak HF, Dvorak AM, Manseau EJ, Wiberg L, Churchill WH;** Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst* 1979a; 62: 1459-1472
- Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, Feder J, Blitzler AM, Rypse J, Giovinco P;** Induction of a fibrin-gel investment: An early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J Immunol* 1979b; 122: 166-174

- Dvorak HF**, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995 May;146(5):1029-39.
- Ehrbar M**, Djonov VG, Schnell C, Tschanz SA, Martiny-Baron G, Schenk U, Wood J, Burri PH, Hubbell JA, Zisch AH. Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res.* 2004 Apr 30;94(8):1124-32. Epub 2004 Mar 25.
- Eliceiri BP**, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell.* 1999 Dec;4(6):915-24.
- Elson DA**, Thurston G, Huang LE, Ginzinger DG, McDonald DM, Johnson RS, Arbeit JM. Induction of hypervascularity without leakage or inflammation in transgenic mice overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Genes Dev.* 2001 Oct 1;15(19):2520-32.
- Eming SA**, Whitsitt JS, He L, Krieg T, Morgan JR, Davidson JM. Particle-mediated gene transfer of PDGF isoforms promotes wound repair. *J Invest Dermatol.* 1999 Mar;112(3):297-302.
- Eming SA**, Lauer G, Cole M, Jurk S, Christ H, Hornig C, Krieg T, Welch HA. Increased levels of the soluble variant of the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-1 are associated with a poor prognosis in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2004 Oct;123(4):799-802.
- Fantuzzi G**, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000 Oct;68(4):437-46.
- Fekete DM**, Brockes JP. A monoclonal antibody detects a difference in the cellular composition of developing and regenerating limbs of newts. *Development.* 1987 Apr;99(4):589-602.
- Ferrara N**, Henzel WJ; Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Commun* 1989; 161: 851-858
- Ferrara N**, Carvermoore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powellbraxton L, Hillan KJ, Moore MW; Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442
- Ferrara N**, Keyt B; Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. *EXS* 1997; 79: 209-232
- Ferrara N**, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):669-76.
- Ferretti P**, Brockes JP. Cell origin and identity in limb regeneration and development. *Glia.* 1991;4(2):214-24.

- Finch PW**, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science*. 1989 Aug 18;245(4919):752-5.
- Finkenzeller G**, Sparacio A, Technau A, Marme D, Siemeister G; Sp-1 recognition sites in the proximal promotor of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor induced gene expression. *Oncogen* 1997; 15: 669-676
- Folkman, J.** und Klagsbrun, M. Angiogenic factors. *Science*, 1987; 235: 442-447.
- Folkmann, J.** (1995) Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *New Engl J Med*. 1995; 333: 1757-1763.
- Fong GH**, Rassant J, Gertzenstein M, Bretman M; Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulation of assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376: 66-70
- Frank S**, Hübner G, Breier G, Longaker M, Greenhalgh D, Wener S; Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes - implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995; 270: 12607-12613
- Frank S**, Madlener M, Werner S. Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*. 1996 Apr 26;271(17):10188-93.
- Frank S**, Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest*. 2000 Aug;106(4):501-9.
- Friedman JM und Halaas JL.** Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998 Oct 22;395(6704):763-70.
- Fuchs, E.** Epidermal differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 1990; 2: 1028-1035
- Fuchs, E.** Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl*. 1993; 17: 197-208.
- Fuh G**, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA; Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1998; 273: 11197-11204
- Gainsford T**, Willson TA, Metcalf D, Handman E, McFarlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14564-8.
- 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 Sep 29;87(7):603-7.
- Gardiner DM**, Blumberg B, Komine Y, Bryant SV. Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Development*. 1995 Jun;121(6):1731-41.

- Gengrinovitch S**, Berman B, David G, Witte L, Neufeld G, Ron D; Glypican-1 is a VEGF₁₆₅ binding Proteoglycan that acts as an extracellular chaperone for VEGF₁₆₅. *J Biol Chem* 1999; 274: 10816-10822
- Gerber HP**, Condorelli F, Park J, Ferrara N; Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes, flt-1 but not flk-1/kdr, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272: 23659-23667
- Gerber HP**, Dixit V, Ferrara N; Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic Proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 13313-13316
- Gitay-Goren H**, Soker S, Vlodavsky I, Neufeld G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J Biol Chem*. 1992 Mar 25;267(9):6093-8.
- Gitay-Goren H**, Halaban R, Neufeld G; Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190: 702-709
- Gitay-Goren H**, Cohen T, Tessler S, Soker S, Gengrinovitch S, Rockwell P, Klagsbrun M, Levi BZ, Neufeld G. Selective binding of VEGF₁₂₁ to one of the three vascular endothelial growth factor receptors of vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996 Mar 8;271(10):5519-23.
- Glaser BM**, Kalebic T, Garbisa S, Connor TB Jr, Liotta LA. Degradation of basement membrane components by vascular endothelial cells: role in neovascularization. *Ciba Found Symp*. 1983;100:150-62.
- Glasow A**, Kiess W, Anderegg U, Berthold A, Bottner A, Kratzsch J. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Sep;86(9):4472-9.
- Goad DL**, Rubin J, Wang H, Tashjian AH, Patterson C; Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor 1. *Endocrinology* 1996; 137: 2262-2268
- Goerges AL**, Nugent MA. Regulation of vascular endothelial growth factor binding and activity by extracellular pH. *J Biol Chem*. 2003 May 23;278(21):19518-25.
- Goerges AL**, Nugent MA. pH regulates vascular endothelial growth factor binding to fibronectin: a mechanism for control of extracellular matrix storage and release. *J Biol Chem*. 2004 Jan 16;279(3):2307-15.
- Goova MT**, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrad S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol*. 2001 Aug;159(2):513-25.

Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J; Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculostellate cells. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 7311-7315

Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. Am J Pathol. 1990 Jun;136(6):1235-46.

Grinnell F, Ho CH, Wysocki A. Degradation of fibronectin and vitronectin in chronic wound fluid: analysis by cell blotting, immunoblotting, and cell adhesion assays. J Invest Dermatol. 1992 Apr;98(4):410-6.

Grinnell, F. und Zhu, M. Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, α_1 -proteinase and α_2 -macroglobulin. J Invest Dermatol. 1996; 106: 335-341

Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. J Biol Chem. 1995 Mar 24;270(12):6729-33.

Hanahan D; Signaling vascular morphogenesis and maintenance. Science 1997; 277: 48-50

Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. Nat Rev Cancer. 2002 Jan;2(1):38-47.

Harris IR., Wood, E. J., Yee, K.C., Cunliffe, W. J., Dziewulski, P., Kearney, J. N. Effect of chronic wound fluid from leg ulcers on dermal fibroblast proliferation in vitro. J Invest Dermatol. 1993; 100: 552

Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 1998 Aug;18(8):887-95.

He, C., Hughes, M. A., Cherry, G. W., Arnold, F. Effects of chronic wound fluid on the bioactivity of platelet-derived growth factor in serum-free medium and its direct effect on fibroblast growth. Wound Repair Regen. 1999; 7: 87-105

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J; Noda T, Shibuya M; FLT-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 9349-9454

Hoffman R, Starkey S, Coad J. Wound fluid from venous leg ulcers degrades plasminogen and reduces plasmin generation by keratinocytes. J Invest Dermatol. 1998 Dec;111(6):1140-4.

Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Trayhurn P, Williams LM. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. Biochem Biophys Res Commun. 1997 Mar 17;232(2):383-7.

Hopkinson-Woolley J, Hughes D, Gordon S, Martin P. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. J Cell Sci. 1994 May;107 (Pt 5):1159-67.

Hornig C, Behn T; Bartsch W, Weich HA; Detection and Quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J Immunol Meth* 1999; 226:169-177

Hornig C, Weich HA; Soluble VEGF receptors; *Angiogenesis* 1999; 3: 33-39

Houck KA, Leung DW, Rowland AM, , Winer J, Ferrara N; Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 1992; 267: 26031-26037

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW; The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*; 1991; 5: 1806-1814

Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom SR. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest.* 1999 Oct;104(8):1051-9.

Howdieshell TR, Callaway D, Webb WL, Gaines MD, Procter CD Jr, Sathyanarayana, Pollock JS, Brock TL, McNeil PL. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. *J Surg Res.* 2001 Apr;96(2):173-82.

Hudlicka, O., Tyler, K. R. *Angiogenesis. The growth of the vascular system.* 1986 Academic Press, London

Hutchings H, Ortega N, Plouet J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB J.* 2003 Aug;17(11):1520-2. Epub 2003 Apr 22.

Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res.* 1998 Mar 1;58(5):1048-51.

Jain RK und Munn LL. Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med.* 2000 Feb;6(2):131-2.

Jingjing L, Xue Y, Neeraj A, Roque RS; Human Müller cells express VEGF183 a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 752-759

Kämpfer H, Pfeilschifter J, Frank S. Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair. *Lab Invest.* 2001 Mar;81(3):361-73.

Kalka C, Takahashi T, Masuda H, Asahara T, Isner JM. Vascular endothelial factor (VEGF): therapeutic angiogenesis and vasculogenesis in the treatment of cardiovascular disease *Med Klin (Munich).* 1999 Apr 15;94(4):193-201.

Kane CD und Greenhalgh DG. Expression and localization of p53 and bcl-2 in healing wounds in diabetic and nondiabetic mice. *Wound Repair Regen.* 2000 Jan-Feb;8(1):45-58.

Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Dec;82(12):4144-8.

Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y; Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* 1995; 55: 5687-5692

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

Kendall, R. L. und Thomas, K. A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90, 10705-10709.

Kendall RL, Wang G, Thomas KA; Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1 and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 324-328

Keyt B, Berleau L.T, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandle R, Ferrara N; The carboxyl-terminal domain (111-165) of VEGF is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996a; 271: 7788-7795

Keyt B, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N; Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors – generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1996b; 271: 5638-5646

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 Apr 29;362(6423):841-4.

Kintner CR, Brockes JP. Monoclonal antibodies to the cells of a regenerating limb. *J Embryol Exp Morphol.* 1985 Oct;89:37-55.

Kirfel G, Rigort A, Borm B, Schulte C, Herzog V. Structural and compositional analysis of the keratinocyte migration track. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2003 May;55(1):1-13.

Kowalski TJ, Liu SM, Leibel RL, Chua SC Jr. Transgenic complementation of leptin-receptor deficiency. I. Rescue of the obesity/diabetes phenotype of LEPR-null mice expressing a LEPR-B transgene. *Diabetes.* 2001 Feb;50(2):425-35.

Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res.* 1997 Sep 1;57(17):3852-9.

Kremer, M. und Berger, A. (1999) Plastisch-chirurgische Therapie beckennaher Dekubitalulzera. *Chirurg* 1999; 70(6): 726-740

- Kroll J**, Waltenberger J; The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 32521-32527
- Kubo M**, Van de Water L, Plantefaber LC, Mosesson MW, Simon M, Tonnesen MG, Taichman L, Clark RA. Fibrinogen and fibrin are anti-adhesive for keratinocytes: a mechanism for fibrin eschar slough during wound repair. *J Invest Dermatol.* 2001 Dec;117(6):1369-81.
- Laemmli**, U. K. Most common used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature* 1970; 227: 680-685
- Latijnhouwers**, M., Bergers, M., Veenhuis, R. T., Beekman, B., Ankersmit-Terhorst, M., Schalkwijk, J. Tenascin-C degradation in chronic wound is dependent on serine proteinase activity. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290:490-496
- Lauer G**, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Sturzebecher J, Mann K, Krieg T, Eming SA. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol.* 2000 Jul;115(1):12-8.
- Lauer G**, Sollberg S, Cole M, Krieg T, Eming SA. Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165 variant by a site-directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site. *FEBS Lett.* 2002 Nov 6;531(2):309-13.
- Leavesley**, D. I., Schwartz, M. A., Rosenfeld, M., Cheresh, D.A. Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *J Cell Biol.* 1993; 121(1):163-70.
- Lee GH**, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 1996 Feb 15;379(6566):632-5.
- Lei J**, Jiang A, Pei D; Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1443: 400-406
- Leonhardt**, H. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.* 1990 Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York: 342-349.
- Lerman OZ**, Galiano RD, Armour M, Levine JP, Gurtner GC. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast: impairment in migration, vascular endothelial growth factor production, and response to hypoxia. *Am J Pathol.* 2003 Jan;162(1):303-12.
- Leung D**, Cachianes G, Kuang W, Goeddel D, Ferrara N; Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-1309
- Levy AP**, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA; Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995a; 270: 13333-13340
- Levy AP**, Levy NS, Goldberg MA; Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 1995b; 271: 2746-2753

- Levy NS**, Chung S, Furneaux H, Levy AP; Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 1998; 273: 6417-6423
- Li W**, Henry G, Fan J, Bandyopadhyay B, Pang K, Garner W, Chen M, Woodley DT. Signals that initiate, augment, and provide directionality for human keratinocyte motility. *J Invest Dermatol.* 2004 Oct;123(4):622-33.
- Liu YX**, Cox SR, Morita T, Kourembanas S; Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells – identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995; 77: 638-645
- Luque A**, Carpizo DR, Iruela-Arispe ML. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J Biol Chem.* 2003 Jun 27;278(26):23656-65. Epub 2003 Apr 25.
- Luttun A**, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor (PlGF) and its receptor Flt-1 (VEGFR-1): novel therapeutic targets for angiogenic disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Dec;979:80-93.
- Madri, J. A.**, Graesser, D., Haas, T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration *Biochem Cell Biol.* 1996; 74(6): 749-57.
- Maheswari, R. K.**, Srikatan, V., Bhartiya, D., Kleinman, H. K., Grant, D. Differential effects of interferon gamma and alpha on in vitro model of angiogenesis. *J Cell Physiol.* 1991; 146: 164-169.
- Mandriota S**, Montesano R, Orci L, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Mignatti P, Pepper MS; Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 9709-9716
- Martin, P.** Wound healing – Aiming for the perfect skin regeneration. *Science* 1997; 276: 75-81.
- Matthies AM**, Low QE, Lingen MW, DiPietro LA. Neuropilin-1 participates in wound angiogenesis. *Am J Pathol.* 2002 Jan;160(1):289-96.
- Meister B.** Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus. *Vitam Horm.* 2000;59:265-304
- Metheny-Barlow LJ**, Tian S, Hayes AJ, Li LY. Direct chemotactic action of angiopoietin-1 on mesenchymal cells in the presence of VEGF. *Microvasc Res.* 2004 Nov;68(3):221-30.
- Michalopoulos GK**, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):60-6.
- Mignatti P**, Rifkin DB. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein.* 1996;49(1-3):117-37.
- Moll, I.** Unsere dynamische Haut. Duale Reihe Dermatologie (E: G. Jung, Herausgeber), 1995 Hippokrates Verlag, Stuttgart: 19-32.

- Moses, M. A.,** Langer, R. A metalloproteinase inhibitor as an inhibitor of neovascularization. *J Cell Biochem.* 1991; 47: 239-235.
- Mullis KB,** Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
- Murad A,** Nath AK, Cha ST, Demir E, Flores-Riveros J, Sierra-Honigmann MR. Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J.* 2003 Oct;17(13):1895-7. Epub 2003 Aug 15.
- Neufeld, G.,** Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999; 13: 9-22
- O'Reilly, M. S.,** Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., Folkman, J. Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.
- O'Reilly, M. S.,** Boehm, T., Shing, Y., Fukal, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., Folkman, J. Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell,* 1997; 88: 277-285.
- Okuya S,** Tanabe K, Tanizawa Y, Oka Y. Leptin increases the viability of isolated rat pancreatic islets by suppressing apoptosis. *Endocrinology.* 2001 Nov;142(11):4827-30.
- Olofsson B,** Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 29;95(20):11709-14.
- Onesto C,** Berra E, Grepin R, Pages G. Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem.* 2004 Aug 13;279(33):34217-26.
- Orlic D,** Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001 Apr 5;410(6829):701-5.
- Ortega N,** L'Faqihi FE, Plouet J. Control of vascular endothelial growth factor angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biol Cell.* 1998 Sep;90(5):381-90.
- Owen, C. A.** und Campbell, E. J. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol.* 1999; 65: 137-150.
- Ozawa K,** Kondo T, Hori O, Kitao Y, Stern DM, Eisenmenger W, Ogawa S, Ohshima T. Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(1):41-50.
- Ozawa CR,** Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest.* 2004 Feb;113(4):516-27.

Palolahti, M., Lauharanta, J., Stephens, R. W., Kuusela, P., Vaheri, A. Proteolytic activity in leg exudate. *Exp Dermatol.* 1993; 2: 29-37.

Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med.* 2001 Jun 30;33(2):95-102.

Park JE, Keller GA, Ferrara N; The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: Differential deposition into subepithelial extracellular matrix and bioactivity of ECM-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317-1326

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 Oct 14;269(41):25646-54.

Pecorino LT, Entwistle A, Brockes JP. Activation of a single retinoic acid receptor isoform mediates proximodistal respecification. *Curr Biol.* 1996 May 1;6(5):563-9.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000 Feb 1;95(3):952-8.

Pepper MS, Ferrara N, Orci K, Montesano R; Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor type 1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 902-908

Pepper MS, Ferrara N, Orci K, Montesano R; Potent synergism between vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 824-831

Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K; Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem.* 1995; 269: 6271-6274

Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR; Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 1993; 8: 961-965

Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W; Vascular endothelial growth factor is a potent tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359: 845-848

Plate, K. H. Angiogenese und Anti-Angiogenese. *Dtsch Arztebl.* 1993; 90: C2006-2010

Plouet J, Moro F, Bertagnolli S, Coldeboef N, Mazarguil H, Clamens S, Bayard F; Extracellular cleavage of vascular endothelial growth factor 189 amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* 1997; 272: 13390-13396.

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodayvsky I, Keshet E, Neufeld G; VEGF₁₄₅: a secreted VEGF form that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997; 272: 7151-7158

Rao, C. N., Ladin, D. A., Ying, Y. L., Chilukuri, K., Zheng, Z. H., Woodley, D. T. α_1 -antitrypsin is degraded and non-functional in chronic wounds but intact in acute wounds: the inhibitor protects fibronectin from degradation by chronic wound fluid enzymes. *J Invest Dermatol.* 1995; 105: 572-578

Riede, U-N., Wiestler, O. D., Müller, H. J. *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 4. Auflage, 1995 Georg Thieme Verlag Stuttgart: 338.

Ring BD, Scully S, Davis CR, Baker MB, Cullen MJ, Pelleymounter MA, Danilenko DM. Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. *Endocrinology.* 2000 Jan;141(1):446-9.

Rosner K, Ross C, Karlsmark T, Petersen AA, Gottrup F, Vejlsgaard GL. Immunohistochemical characterization of the cutaneous cellular infiltrate in different areas of chronic leg ulcers. *APMIS.* 1995 Apr;103(4):293-9.

Rossiter H, Barresi C, Pammer J, Rendl M, Haigh J, Wagner EF, Tschachler E. Loss of vascular endothelial growth factor activity in murine epidermal keratinocytes delays wound healing and inhibits tumor formation. *Cancer Res.* 2004 May 15;64(10):3508-16.

Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Feb;86(3):802-6.

Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 2002 Oct 15;16(20):2684-98.

Saarialho-Kere, U. K. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290: S47-S54

Schägger, H., von Jagow, G. Tricin-Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analyt Biochem.* 1979; 166: 368-379.

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

Seliktar D, Zisch AH, Lutolf MP, Wrana JL, Hubbell JA. MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. *J Biomed Mater Res.* 2004 Mar 15;68A(4):704-16.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Peruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF; Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985

- Shakespeare, V.**, Shakespeare, P. Effects of granulation-tissue-conditioned medium on the growth of human keratinocytes in vitro. *Br J Plast Surg.* 1991; 44: 219-223
- Shalaby F**, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertenstein M, Wu XF, Breitmann ML, Schuh AC; Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* 1995; 376: 62-66
- Shen BQ**, Lee DY, Gerber HP, Keyt BA, Ferrara N, Zioncheck TF. Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J Biol Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29979-85.
- Shibuya M**, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M; Nucleotide sequenz and expression of a novel human receptor type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990; 5: 519-524
- Shibuya M.** Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol.* 2001 Apr;33(4):409-20.
- Shimon I**, Yan X, Magoffin DA, Friedman TC, Melmed S. Intact leptin receptor is selectively expressed in human fetal pituitary and pituitary adenomas and signals human fetal pituitary growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Nov;83(11):4059-64.
- Shirakawa K**, Shibuya M, Heike Y, Takashima S, Watanabe I, Konishi F, Kasumi F, Goldman CK, Thomas KA, Bett A, Terada M, Wakasugi H. Tumor-infiltrating endothelial cells and endothelial precursor cells in inflammatory breast cancer. *Int J Cancer.* 2002 May 20;99(3):344-51.
- Shweiki D**, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ulrich A; Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845
- Siddiqui AJ**, Blomberg P, Wardell E, Hellgren I, Eskandarpour M, Islam KB, Sylven C. Combination of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor gene therapy enhances arteriogenesis in the ischemic myocardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 24;310(3):1002-9.
- Sierra-Honigmann MR**, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science.* 1998 Sep 11;281(5383):1683-6.
- Skalli, O.**, Vandekerckhove, J., Gabbiani, G. Actin-isoform pattern as a marker of normal or pathological smooth-muscle and fibroblastic tissues. *Differentiation* 1987; 33: 232-238
- Smith RE**, Bissell ER, Mitchell AR, Pearson KW. Direct photometric or fluorometric assay of proteinases using substrates containing 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin. *Thromb Res.* 1980 Feb 1-15;17(3-4):393-402.
- Smola, H.**, Eming, S. A., Hess, S., Werner, S., Krieg, T. Wundheilung und Wundheilungsstörungen. *Deutsches Ärzteblatt* 2001; 98, 43: A2802-2809.

Soff, G. A., Sanderowitz, J., Gately, S., Verrusio, E., Weiss, I., Brem, S., Kwaan, H. C. Expression of plasminogen activator inhibitor 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2593-2600.

Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler H, Charnahelli H, Klagsbrun M. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem.* 1997 Dec 12;272(50):31582-8.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998 Mar 20;92(6):735-45.

Sounni NE, Devy L, Hajitou A, Franken F, Munaut C, Gilles C, Deroanne C, Thompson EW, Foidart JM, Noel A. MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J.* 2002 Apr;16(6):555-64.

Stallmeyer B, Kampfer H, Podda M, Kaufmann R, Pfeilschifter J, Frank S. A novel keratinocyte mitogen: regulation of leptin and its functional receptor in skin repair. *J Invest Dermatol.* 2001 Jul;117(1):98-105.

Stutzmann JJ, Petrovic AG. Bone cell histogenesis: the skeletoblast as a stem-cell for preosteoblasts and for secondary-type prechondroblasts. *Prog Clin Biol Res.* 1982;101:29-43.

Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996; 87(7):1171-80.

Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, Sato TN, Yancopoulos GD. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 1998 Oct 16;282(5388):468-71.

Sweeney P, Karashima T, Kim SJ, Kedar D, Mian B, Huang S, Baker C, Fan Z, Hicklin DJ, Pettaway CA, Dinney CP. Anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody reduces tumorigenicity and metastasis in orthotopic prostate cancer xenografts via induction of endothelial cell apoptosis and reduction of endothelial cell matrix metalloproteinase type 9 production. *Clin Cancer Res.* 2002 Aug;8(8):2714-24.

Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Maruyama N, Kasahara N, Kawamura T, Matsumura O, Mitarai T, Sakai O; Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: FLT-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 209: 218-226

Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene.* 1999 Apr 1;18(13):2221-30.

Takeda N, Maemura K, Imai Y, Harada T, Kawanami D, Nojiri T, Manabe I, Nagai R. Endothelial PAS domain protein 1 gene promotes angiogenesis through the transactivation of both vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1. *Circ Res.* 2004 Jul 23;95(2):146-53.

Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K., Hayakawa, T. Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membranes by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 171: 1264-1271.

Tanaka EM, Drechsel DN, Brockes JP. Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes. *Curr Biol.* 1999 Jul 29-Aug 12;9(15):792-9.

Tanaka S, Sugimachi K, Yamashita Y, Shirabe K, Shimada M, Wands JR, Sugimachi K. Angiogenic switch as a molecular target of malignant tumors. *J Gastroenterol.* 2003 Mar;38 Suppl 15:93-7.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995 Dec 29;83(7):1263-71

Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, Senderoff D, Nhat PD, Phelps R, Urken ML, Silver L, Weinberg H. Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Nov;102(6):2033-9.

Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 Oct;5(10):836-47.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P; Identification of the KDR tyrosine as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 187: 1579-1586

Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 1999 Dec 24;286(5449):2511-4.

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 Apr;6(4):460-3.

Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, Abraham J; The human gene for vascular endothelial Growth factor. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954

Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Hood, D. J., Frazier, W. A., Polverini, P. J., Bouck, N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin -1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol.* 1993; 122: 497-511.

Unemori E, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP; Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 153: 557-562

- Vaalamo M**, Matilla L, Johansson N, Kariiniemi A, Karjalainen-Lindsberg M, Kähäri VM, Saarihalo-Kere U; Distinct populations of stromal cells express MMP-13 and MMP-1 in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 96-101
- Vallee**, B. L., Riordan, J. F. Organogenesis and angiogenin. *Cell Mol Life Sci.* 1997; 53(10): 803-15.
- van Bekkum DW**. Phylogenetic aspects of tissue regeneration: role of stem cells. A concise overview. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Jan-Feb;32(1):11-6.
- Varner**, J.A. The role of vascular cell integrins alpha V beta 3 and alpha V beta 5 in angiogenesis. *EXS* 1997; 79: 361-390.
- Vincent KA**, Shyu KG, Luo Y, Magner M, Tio RA, Jiang C, Goldberg MA, Akita GY, Gregory RJ, Isner JM. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1alpha/VP16 hybrid transcription factor. *Circulation.* 2000 Oct 31;102(18):2255-61.
- Volpert**, O. V., Tolsma, S. S., Pellerin, S., Feige, J. J., Chen, H., Mosher, D. F., Bouck, N. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 217: 326-332.
- Waltenberger J**, Claesson-Welch L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH; Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26988-26995
- Wang D**, Donner DB, Warren RS. Homeostatic modulation of cell surface KDR and Flt1 expression and expression of the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) receptor mRNAs by VEGF. *J Biol Chem.* 2000 May 26;275(21):15905-11.
- Warren RS**, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N; Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995; 95: 1789-1797
- Weckroth M**, Vaheri A, Lauharanta J, Sorsa T, Kontinen YT; Matrixmetalloproteinases, Gelatinase and Collagenase, in chronic leg ulcers. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 1119-1124
- Weiss**, R.A., Eichner, R. and Sun, T.T. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-Kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J Cell Biol.* 1984; 98: 1397-1406.
- Werner S**, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT; The function of KGF is morphogenesis of epithelium and reepitheliazation of wounds. *Science* 1994; 266: 819-822.
- Wetzler C**, Kampfer H, Stallmeyer B, Pfeilschifter J, Frank S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. *J Invest Dermatol.* 2000 Aug;115(2):245-53.

- Whitaker GB**, Limberg BJ, Rosenbaum JS. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem.* 2001 Jul 6;276(27):25520-31. Epub 2001 May 01.
- White DW**, Wang DW, Chua SC Jr, Morgenstern JP, Leibel RL, Baumann H, Tartaglia LA. Constitutive and impaired signaling of leptin receptors containing the Gln --> Pro extracellular domain fatty mutation *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 30;94(20):10657-62.
- Wiesmann C**, Fuh C, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, Devos AM; Crystal structure at 1.7 angstrom resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 1997; 91: 695-704
- Wilgus TA**, Bergdall VK, Tober KL, Hill KJ, Mitra S, Flavahan NA, Oberyszyn TM. The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing. *Am J Pathol.* 2004 Sep;165(3):753-61.
- Wlaschek**, M., Peus, D., Achterberg, V., Meyer-Ingold, W., Scharfetter-Kochanek, K. Protease inhibitors protect growth factor activity in chronic wounds. *Br J Derm.* 1997; 137: 646
- Wysocki**, A. B., Staiano-Coico, L., Grinell, F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol.* 1993; 101: 64-68
- Yager DR**, Zhang LY, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK; Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 743-738
- Yang EV**, Bryant SV. Developmental regulation of a matrix metalloproteinase during regeneration of axolotl appendages. *Dev Biol.* 1994 Dec;166(2):696-703.
- Yang EY**, Moses, H. L. Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J Cell Biol.* 1990; 111(2):731-41.
- Yang XJ**, Cepko CL; Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells. *J Neurosci* 1996; 16: 6089-6099.
- Yilmaz A**, Kliche S, Mayr-Beyrle U, Fellbrich G, Waltenberger J. p38 MAPK inhibition is critically involved in VEGFR-2-mediated endothelial cell survival. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jul 4;306(3):730-6.
- Yuan F**, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14765-70.
- Zhang Y**, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):425-32.

Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M, Raeber GP, Rizzi SC, Davies N, Schmokel H, Bezuidenhout D, Djonov V, Zilla P, Hubbell JA. Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *FASEB J.* 2003 Dec;17(15):2260-2. Epub 2003 Oct 16.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

%	Prozent
Ø	Durchschnitt
AS	Aminosäure
AK	Antikörper
Ang-1/2	Angiopoietin-1 / Angiopoietin-2
AP	α_2 -Antiplasmin
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor; basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
bp	Basenpaar(e)
Bq	Becquerel
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cm ²	Quadratcentimeter
CTP	Cytosintriphosphat
CVI	chronisch venöse Insuffizienz
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
ddNTP	Di-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
db/db	homozygote diabetische Maus (Lepr ^{db})
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor; epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay; Festphasenimmunoassay
FCS	fötale Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor; Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FLT-1	fms-like-tyrosine kinase-1, VEGF Rezeptor-1
FLK-1	fetal liver kinase-1, VEGF Rezeptor-2, Maus
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	Humane Nabelschnur-Endothelzellen
IGF-1	insulin like growth factor, Insulin Wachstumsfaktor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KDa	Kilodalton
KDR	kinase domain region, VEGF Rezipetor-2, Mensch

l	Liter
M	Mol, Stoffmengenkonzentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MM	Millimol
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	N-Morpholinopropansulfansäure als Natrium-Salz
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektroskopie
MW	Mittelwert
m	Milli-
μ	Mikro-
n	Nano-
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI	plasminogen activator inhibitor; Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor; Plättchen-Wachstumsfaktor
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii
PIGF	placenta growth factor, Plazenta-Wachstumsfaktor
PL-1	Na ₂ -naphthylsulfonyl-3-amidino-(D,L)-phenylalanyl-nipecotinsäure-thiophen-2-methylamid-hydrochlorid), Protease-Inhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD-MS	Post source decay-Massenspektroskopie
PTS	Post thrombotisches Syndrom
RIA	Radio-Immunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SSC	Natriumcitrat/Natriumchlorid-Gemisch
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sFLT-1	soluble FLT-1, löslicher VEGF-Rezeptor-1
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA
TBS	tris buffered saline, Tris gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N', N'-Tetramethyldiamin
TGF α	transforming growth factor α; transformierender Wachstumsfaktor α
TGF β	transforming growth factor β; transformierender Wachstumsfaktor β
Tie-1/2	Tie-1/2 Rezeptor
TLCK	L-1-Chloro-3-[4-tosylamido]-7-amino-2-heptanon-HCL, Protease-Inhibitor
TNF α	tumor necrosis factor α; Tumornekrosefaktor α
tPA	tissue plasminogen activator; Gewebe Plasminogen-Aktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	unit = Enzymeinheit
üN	über Nacht
uPA	urokinase plasminogen activator; Urokinase Plasminogen-Aktivator

uPAR	urokinase plasminogen activator receptor; Urokinase Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor; vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vol	Volumen
VPF	vascular permeability factor, vaskulärer Permeabilitätsfaktor
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin Köln

7.2. Aminosäuren

Buchstabensymbol	Abkürzung	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln sowie für die Übernahme des Koreferats und die konstruktive Diskussion der Arbeit.

Frau Prof. Dr. M. Leptin danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens, die Betreuung der Arbeit und für Ihre stets freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. S. Eming und für die Überlassung des Themas, Ihr stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und insbesondere für die Zeit und Mühe die Sie investiert hat.

Ein besonderes Dankeschön geht auch an Michael Piekarek, ohne dessen Engagement und Fleiß diese Arbeit ganz anders ausgesehen hätte.

Weiterhin bedanke ich mich besonders bei den anderen Mitstreitern aus dem Wundheilungslabor, Sandra Jurk, Doris Hirche, Stefan Nieland und Carmen Berns, die mich stets fachlich und menschlich unterstützt haben und viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Paulsson und seinen Mitarbeitern aus der Biochemie für Ihre fachliche und praktische Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern und Kollegen in den Laboren der Hautklinik, die es durch Ihre Hilfsbereitschaft und die gute und offene Arbeitsatmosphäre erlaubten, daß ich mich wohl gefühlt habe.

Auch meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen danken, dafür dass sie mich all die Jahre menschlich und finanziell unterstütz haben und immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Claudia dafür bedanken, daß sie die letzten Jahre mit mir durchgestanden hat, obwohl dies sicher nicht immer leicht war.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Forschergruppe „Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktionen in der Haut“ angefertigt.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Professor Dr. Leptin und Herrn Professor Dr. Krieg betreut worden.

Köln, den 14.12.2004

Detlev Roth

Teilpublikationen :

Teile der vorliegenden Arbeit sind auf folgenden Kongressen referiert worden :

Poster

”Design of a novel proteolysis resistant VEGF variant”

Detlev Roth, Gereon Lauer, Thomas Krieg, Sabine A Eming

Gordon Conference: Tissue Repair & Regeneration

Il Giocco, Italien Juni 2003

Detlev Roth
Ahrstrasse 26a
51371 Leverkusen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Roth, Detlev
Geburtsdatum	03.08.1971
Geburtsort	Hermannstadt
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung:

Von 1978-1982	Grundschule Am Büscherhof in Leichlingen
Von 1982-1988	Gymnasium Marienschule in Leverkusen/Opladen Abschluß: Mittlere Reife
Von 1988-1991	Gymnasium Landrat Lucas in Leverkusen/Opladen Abschluß: Abitur

Zivildienst:

Von 08/1991- 10/1992	„Mittagstisch auf Rädern“ bei der Caritas Leverkusen
----------------------	--

Studium:

Von 1992-1999	Biologie an der Universität zu Köln Abschluß: Diplom-Biologe (Fachrichtung Genetik/Virologie)
Von 2000-2004	Promotion im Fach Genetik an der Universität zu Köln Promotions-Arbeiten durchgeführt in der Uniklinik zu Köln, Abteilung Dermatologie, Labor Prof. Krieg