

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

Der Einfluss vaskulär-adventitieller Makrophagen auf
Gefäßwand-residente Stammzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von
Georg Ludwig Eckner
aus Memmingen
Würzburg, Oktober 2019

Referent bzw. Referentin: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2020

Der Promovend ist Zahnarzt

Publikation

Mekala, S., Wörsdörfer, P., Bauer, J., Stoll, O., Wagner, N., Reeh, L., Loew, C., Eckner, G., Keong Kwok, C., Wischmeyer, E., Dickinson, M., Schulze, H., Stegner, D., Benndorf, A., Edenhofer, F., Pfeiffer, V., Kuerten, S., Frantz, S., Ergün, S. **Generation of Cardiomyocytes From Vascular Adventitia-Resident Stem Cells.** *Circulation Research*, 2018;DOI:10.1161/CIRCRESAHA.117.312526

Meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung	1
1.1 Entwicklung des Blutgefäßsystems	1
1.1.1 Embryonale/pränatale Vaskulogenese	2
1.1.2 Postnatale Vaskulogenese	3
1.1.3 Angiogenese	4
1.1.4 Angiogenetische Sprouting	5
1.1.5 Gefäßneubildung	7
1.1.6 Anpassung an lokal metabolische Faktoren	7
1.1.7 Gefäßstabilisierung	8
1.1.8 Arteriogenese	9
1.2 VEGF als proangiogenetischer Faktor	10
1.2.1 VEGF-A	11
1.2.2 Lenvatinib (E7080)	12
1.3 Stamm- und Progenitorzellen	14
1.4 Aortic Ring Assay (ARA)	15
1.4.1 Geschichtliches	15
1.4.2 Allgemeine Anatomie von Gefäßen	15
1.4.3 Stammzellen im Aortic Ring Assay / Vaskulogene Zone	18
1.5 Makrophagen	22
1.5.1 Allgemeines	22
1.5.2 Makrophagenherkunft und ihre Subtypen	23
1.5.3 Funktion von Zytokinen / Chemokinen	25
1.6 Makrophagendepletion durch liposomales Clodronat	26
1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Verwendete Materialien	29
2.1.1 Instrumente und Geräte	29
2.1.2 Chemikalien	31
2.1.3 Kits	33
2.1.4 Software	34
2.1.5 Versuchstiere	34
2.1.6 Antikörper	35
2.2 Lösungen und Puffer	37
2.3 Methoden	39
2.3.1 Aortic Ring Assay	39
2.3.2 Fixierung und Paraffineinbettung	43
2.3.3 Entparaffinierung und Präparation der Objektträger	44
2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	44
2.3.5 Kernechtrot	46
2.3.6 Immunhistochemische Färbemethoden	47
2.3.7 DAB-Färbung	51
2.3.8 Fluoreszenz-Färbung	52
2.3.9 Fluoreszenzmikroskopie	52
2.3.10 Antikörper	53
2.3.11 Färbeprotokolle	56

2.3.12 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	59
2.4 Auswertung	60
2.4.1 Mikroskopie	60
2.4.2 Statistische Auswertung	60
3. Ergebnisse	63
3.1 Aussprossungsaktivität der Mausaorta	63
3.2 Stammzellmarker und Gefäßwand-residente Stammzellen	65
3.3 Expression vaskulärer Marker CD31 und α -SMA	67
3.4 Generierung von Makrophagen aus den Gefäßwand-residenten Stammzellen	69
3.5 Makrophagendepletion im aortalen „ <i>Sproutingassay</i> “	73
3.5.1 Die Wirkung der Makrophagendepletion auf das Zell-Sprouting und die Morphogenese Kapillar-ähnlicher Strukturen aus der Mausaorta	78
3.5.2 Einfluss der Clodronat-Behandlung auf das CD34(+)-Färbemuster der Aortenringe	79
3.5.3 Die Wirkung von Gefäßwandadventitia-abgeleiteten Makrophagen auf CD31(+)-Zellen	86
3.5.4 Die Wirkung von Makrophagen auf die Gefäßwand-residenten CD44(+)-Zellen	91
3.5.5 Die Wirkung von Makrophagen auf Gefäßwand-residenten CD45(+)-Zellen	97
3.5.6 Die Wirkung von Makrophagen auf Ki67(+)-Zellen in der Aortenwand, abhängig vom aortalen „ <i>Sproutingassay</i> “	102
3.5.7 Generierung von VEGF(+)-Zellen aus der aortalen Adventitia nach „ <i>Sproutingassay</i> “ in Relation zu den Gefäßwand-residenten Makrophagen	107
3.6 Inhibierung von VEGFR-1 und VEGFR-2 durch Lenvatinib (E7080)	114
3.6.1 Wirkung von E7080 auf F4/80(+)-Zellen im aortalen „ <i>Sprouting Assay</i> “	114
3.6.2 Wirkung von E7080 auf CD34(+)-Zellen im aortalen „ <i>Sprouting Assay</i> “	116
4. Diskussion	119
5. Zusammenfassung	134
6. Literaturverzeichnis	136
7. Abbildungsverzeichnis	149
8. Tabellenverzeichnis	151
9. Abkürzungsverzeichnis	152
10. Danksagung	155

1. Einleitung

1.1 Entwicklung des Blutgefäßsystems

Die Gefäßneubildung ist ein zentraler Prozess in vielen physiologischen und pathologischen Vorgängen. Als Beispiele hierfür seien der weibliche Reproduktionszyklus, die allgemeine Wundheilung, aber auch das Tumorwachstum genannt [1, 2]. In den vergangenen Jahren wurden diese Bereiche intensiv erforscht, da das therapeutische Potential auf diesem Gebiet enorm wichtig einzuschätzen ist. Gefäßneubildung kann durch Proliferation bereits existierender Endothelzellen, also über Angiogenese erfolgen, und/oder aus vaskulären Vorläufer- bzw. Stammzellen, also über Vaskulogenese, herbeigeführt werden [3-5]. Solche Vorläuferzellen wurden im Knochenmark, im peripheren Blut und Gewebe [6, 7], darunter auch in der Wand adulter Blutgefäße beschrieben. Hier werden sie Gefäßwand-residenten Stammzellen (VW-SCs) genannt [8-12]. Diese Stammzellen wiederum liefern nicht nur Endothelzellen oder glatte Muskelzellen, sondern auch Makrophagen unabhängig vom Knochenmark [9, 13, 14].

In der folgenden Arbeit soll speziell der Einfluss von Gefäßwand-abgeleiteten Makrophagen auf die VW-SCs selbst untersucht werden, da Makrophagen bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen, darunter auch bei der Angiogenese einen großen Einfluss besitzen [15]. So scheinen beispielsweise (bspw.) manche Subtypen von Makrophagen als zelluläre Chaperone zu agieren, welche vaskuläre Anastomosen bilden [16].

Das kardiovaskuläre System ist das erste funktionstüchtige System, welches im vertebraten Embryo entsteht. Generell werden drei unterschiedliche Mechanismen der Neovaskularisierung beschrieben: die Vaskulogenese, die Angiogenese und die Arteriogenese. Die Vaskulogenese tritt hauptsächlich während der embryonalen Entwicklung auf, wohingegen die Angiogenese eine wichtige Rolle im adulten Organismus spielt. Sie kann im weiblichen Reproduktionszyklus, der allgemeinen Wundheilung, in ischämischen Geweben, aber auch im Tumorwachstum beobachtet werden. Bis vor wenigen Jahren wurde allgemein anerkannt, dass neue Gefäße für die Vaskularisierung

von Tumorgewebe nur aus bestehenden Blutgefäßen generiert werden können. Somit zählt die Tumervaskularisierung zum Angiogeneseprozess[17-24]. Asahara und Mitarbeiter zeigten jedoch, dass im Blutkreislauf endotheliale Progenitorzellen(EPCs) existieren, welche für die Tumor-Neovaskularisierung rekrutiert werden. Hiermit gelang es erstmalig zu beweisen, dass die Formation neuer Blutgefäße im adulten Organismus auch durch Vaskulogenese zustande kommen kann. Dieser Prozess wird „postnatale“ oder „adulte“ Vaskulogenese genannt, um ihn von der embryonalen Vaskulogenese abzugrenzen [6].

Die Arteriogenese beschreibt das Wachstum von funktionellen Kollateralarterien aus bereits existierenden arterio-arteriolären Anastomosen [25].

1.1.1 Embryonale/pränatale Vaskulogenese

Unter Vaskulogenese versteht man die Bildung neuer Blutgefäße aus endothelialen Vorläuferzellen [3-5]. Die ersten und für die embryonale Gefäßbildung typischen Anlagen sind die sogenannten „Blut-Inseln“. Diese treten ca. in der 3. Woche der Embryonalentwicklung in der Wand des Dottersacks, in der Nabelschnuranlage und auch intraembryonal in der Splanchnopleura auf. Die „Blut-Inseln“ sind zusammengesetzt aus den Hämangioblasten, den mutmaßlichen Vorläufern von endothelialen Zellen und Zellen des hämatopoetischen Systems. Der Hämangioblast stellt eine Stammzelle des splanchnopleuralen Mesoderms dar [2].

Die Zellen aus den peripheren Anteilen der Hämangioblasten-Aggregate differenzieren sich zu Endothelzellen(Angioblasten), verbinden sich und bilden ein primitives Netzwerk aus Blutgefäßen, deren Wand zu diesem Zeitpunkt nur aus einer endothelialen Schicht besteht. Dieses Gefäßnetzwerk wird daher Kapillarplexus genannt. Die Wand dieser primitiven Gefäße wird jedoch sukzessive durch einsetzende Blutzirkulation weiter ausgebaut, wodurch die weitere Differenzierung der Gefäße in Arterien und Venen erfolgt. Aus den zentral gelegenen Hämangioblasten der „Blut-Inseln“ entstehen die hämatopoetischen Zellen [26].

Für die Aktivierung der Vaskulogenese sind bestimmte Wachstumsfaktoren als Stimulus nötig. Flamme und Mitarbeiter zeigten 1997 zum Beispiel (z.B.), dass der „*Fibroblast Growth Factor-2*“ (FGF-2) pluripotente Stammzellen induziert, den Vaskulogenese-Prozess zu beginnen. „*Vascular Endothelial Growth Factor*“ (VEGF) und seine Rezeptoren „*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*“ 1 und 2 (VEGFR-1 und -2) stellen während der Vaskulogenese die ersten endothelzellspezifischen Signaltransduktionen dar [27]. Neben diesem ist für die embryonale Gefäßentwicklung unter anderem das Rezeptor-Liganden-System aus Angiopoietin-1 und -2 sowie deren Rezeptoren Tie-1 und Tie-2 von großer Bedeutung [28].

Die Knochenmark-assoziierten, beziehungsweise gerade erst migrierten endothelialen Vorläuferzellen exprimieren unter anderem die Oberflächenmarker CD133, CD34 und VEGFR-2. Während des Differenzierungsprozesses zu Endothelzellen kann CD133 jedoch nicht mehr nachgewiesen werden, dafür beginnt zusätzlich die Expression von CD31, VE-Cadherin und des von-Willebrand-Faktors. Dieses Zusammenspiel könnte die beginnende Reifung der endothelialen Progenitorzellen darstellen [3, 29]. Beide Typen der endothelialen Vorläuferzellen werden neben reifen Endothelzellen auch in der Blutzirkulation des adulten Organismus gefunden, was auf eine postnatale physiologische Rolle der Vaskulogenese schließen lässt [5, 30]. VEGF ist ein für Endothelzellen spezifisches Mitogen und ein Angiogenese-induzierender Faktor [31, 32]. Die Expression von VEGF kann durch Hypoxie gesteigert werden. Diese Reaktion wird vermittelt über den Hypoxie-induzierten Faktor 1 α , welcher vermehrt in minderversorgten Gewebeabschnitten produziert wird. VEGF wiederum zeigt eine sehr hohe Affinität zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren Flt-1 (VEGFR-1) und Flk-1/KDR (VEGFR-2) [33, 34]. Die Wirkung von VEGF wird in Kapitel 1.2 beschrieben.

1.1.2 Postnatale Vaskulogenese

Asahara et al.[6] beschrieben bereits 1997, dass sich EPCs auch im Blutkreislauf von adulten Organismen detektieren lassen. Hier wurden Zellen

entdeckt, welche positiv für das Glykoprotein CD34, den Rezeptor KDR/Flk-1 (VEGFR-2) und den Angiopoietin-Rezeptor Tie-2 waren.

Dies sind Rezeptoren, die auf endothelialen Vorläuferzellen und hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), jedoch nicht auf reifen Zellen des hämatopoetischen Systems in dieser Konstellation detektiert werden können [35].

In der weiteren Differenzierung dieser Progenitorzellen zu Endothelzellen kommt es zur Expression endothelzellspezifischer Antigene wie CD31 (PECAM) und auch „*Vascular Endothelial (VE-) Cadherin*“. Eine Unterscheidung zwischen HSCs und EPCs ist damit möglich, dennoch gibt es auch unter bestimmten Umständen Überlappungen, die diese Unterscheidung erschweren. Aus diesen Untersuchungen lässt sich schließen, dass die EPCs ein Synonym für den embryonal vorkommenden Angioblasten darstellen könnten[35]. Damit scheint die Vaskulogenese nicht nur in der Embryologie, sondern neben der Angiogenese auch in der adulten Neovaskularisierung eine Rolle zu spielen [6, 36-39].

Im peripheren Blut machen die oben genannten Vorläuferzellen 0,1 bis 0,5% der mononukleären Zellen aus und können sich unter bestimmten Bedingungen zu Endothelzellen differenzieren. Ihre Oberflächenmoleküle ähneln denen der HSCs. Die Funktion dieser Zellen ist zum jetzigen Zeitpunkt noch Gegenstand intensiver Forschung, jedoch scheinen EPCs in ischämische Bezirke zu migrieren und dort an der Neubildung von Gefäßen beteiligt zu sein [40]. Stützen lässt sich diese These durch eine Arbeit von Asahara et al., wonach bei akuter Ischämie EPCs aus dem Knochenmark ausgeschwemmt werden [41]. Dieser Mechanismus wird durch den durch Hypoxie induzierten Transkriptionsfaktor-1 gesteuert, der wiederum über eine Erhöhung der VEGF-Expression/Bildung zur Migration der EPCs in diese Bereiche führt [42].

1.1.3 Angiogenese

Die Angiogenese beschreibt einen hoch komplexen und sehr fein regulierten Prozess, der eine wichtige Rolle in sowohl physiologischen als auch pathologischen Prozessen spielt. Als Beispiele seien der weibliche

Reproduktionszyklus, Entzündungsreaktionen oder Tumorwachstum genannt [1, 43]. Der Angiogenese-Prozess beschreibt den Vorgang der Gefäßneubildung durch Endothelzellen, die wiederum durch Proliferation aus bereits bestehenden, reifen, differenzierten Endothelzellen hervorgehen [44]. Neue Gefäße sprossen in das Gewebe ein, um die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sicher zu stellen. Während die molekularen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, können der Angiogenese vier verschiedene Abschnitte klar zugeordnet werden. Diese durchlaufen Teile des Gefäßendothels während und nach einer Gefäßneubildung:

1. Angiogenetische Aussprossung („*angiogenic sprouting*“)
2. Formation neuer unreifer Blutgefäße („*new vessel formation*“)
3. Anpassung an lokale metabolische Faktoren („*adaptation to tissue needs*“)
4. Gefäßstabilisierung („*vessel stabilization*“) [43, 45-49].

Verschiedene Zelltypen sind für den Ablauf dieser Phasen notwendig. Hierzu zählen Fibroblasten, Perizyten, immunkompetente Zellen und glatte Muskelzellen. Zusammen mit Gefäßendothelzellen reagieren diese auf bestimmte Wachstumsfaktoren, Zytokine, oxidativen Stress, extrazelluläre Matrixkomponenten, Matrix-Rezeptoren und Lipide, deren Vorhandensein unter anderem vom lokalen Bedarf an Metaboliten abhängt [43, 45-55].

1.1.4 Angiogenetische Sprouting

Die Angiogenese im adulten Organismus beginnt mit der Proliferation kleiner Abschnitte des Gefäßendothels. An diesen Stellen des Gefäßsystems werden durch die Anreicherung angiogener Stimuli insbesondere Mikrogefäße aktiviert. In Abwesenheit und/oder reduzierter Anwesenheit von pro-angiogenetischen Stimuli können Endothelzellen über Jahre hinweg in einem ruhenden, nicht proliferierenden Zustand überdauern. Das sogenannte „*Sprouting*“ setzt ein, wenn Endothelzellen erhöhten Mengen von pro-angiogenetischen Faktoren, wie bspw. VEGF, ausgesetzt werden [43, 56, 57]. Als Folge bilden sich sogenannte „*tip cells*“. Diese besitzen lange, bewegliche Filopodien, die sich in Richtung der pro-angiogenetischen Faktoren ausbreiten [58] [59, 60].

Diese Faktoren haben eine parakrine Wirkung auf Endothelzellen und werden freigesetzt durch bspw. einen ansteigenden Bedarf des umliegenden Gewebes an Sauerstoff und oder Nährstoffen. Ein weiterer Induktor könne Zellen sein, welche in verletzungsbedingt inflammatorische oder pathologische Prozesse, wie Tumorwachstum, involviert sind. Sehr potente Initiatoren für das Sprouting sind unter anderem VEGF, der FGF, Angiopoietin-1 und -2 sowie Hypoxie-induzierte Faktoren wie HIF-1 α [56].

Die „Knospe“ des aussprossenden Gefäßes besteht aus zwei unterschiedlichen Zelltypen: Den „*tip cells*“, wie oben erwähnt, welche die Fähigkeit zur Migration im umliegenden Gewebe haben und polarisiert sind und den „*stalk cells*“, welche zur Elongation der neuen Kapillare durch Proliferation beitragen [61].

Nach der angiogenetischen Aktivierung einer Kapillare kommt es zur Ablösung, Proliferation und Migration von Perizyten in das Interstitium. Perizyten sind den Endothelzellen der Blutkapillaren aufgelagerte Zellen und umspannen diese mit ihren Fortsätzen. Dadurch stabilisieren sie die Kapillarstruktur. Sie besitzen darüber hinaus kontraktile Eigenschaften, wodurch sie die Durchblutung von Gefäßen beeinflussen können. Die Perizyten wandern durch die Produktion von Matrix-Metalloproteasen (MMPs) durch die Basalmembran, auf der die Endothelzellen aufgelagert sind, in Richtung Interstitium [62]. Es wird auch diskutiert, ob die Perizyten als mesenchymale Stammzellen (MSCs) agieren können, sobald sie sich von den Endothelzellen abgelöst haben [63].

Diese Theorie wird gestützt durch durchflusszytometrische Daten, welche zeigen, dass CD34(+)/CD31(+)/CD144(-) Zellen, die aus Mikrogefäßen isoliert wurden, ebenfalls positiv sind für Perizyten- und MSC-Marker (CD140a/b, CD146, NG2, CD13, CD90) [63, 64].

Neben den Perizyten migrieren Fibroblasten in das Interstitium und bilden eine provisorische extrazelluläre Matrix, zusammengesetzt aus Kollagen, Fibronectin und Heparansulfaten für den wachsenden angiogenetischen Spross [43]. Verschiedene *in vitro* Experimente und Gefäßexplantat-Assays stützen die Vorstellung dieser Rolle von Fibroblasten und Perizyten in der Angiogenese. Die endotheliale Zellproliferation und Migration wird angestoßen

durch pro-angiogenetische Faktoren, welche jedoch nur lokal und sehr fein reguliert freigesetzt werden, um eine unkontrollierte Gefäßwucherung zu verhindern [43, 65-67]. Moleküle, die für die Initiierung der Angiogenese von großer Bedeutung sind, sind bspw. VEGF-A, die VEGF-Rezeptoren-1, -2 und -3, sowie die Notch-Signal-Rezeptoren [68-71].

1.1.5 Gefäßneubildung

Endotheliale Zellen bilden ein Lumen, sobald sie in eine geeignete Mikroumgebung (Stromazellen und Extrazellulärmatrix) außerhalb des Ursprungsgefäßes migriert sind. In diesem Prozess bilden endotheliale Zellen und *stalk*-Zellen Vakuolen via Pinozytose. Diese Vakuolen koaleszieren zu größeren, kontinuierlichen Lumina. Dieser Prozess der sogenannten endothelialen „*tube formation*“ wird durch Fibroblasten mit induziert, bzw. gefördert. Sie sezernieren Tubulogenese-stimulierende Faktoren und stellen geeignete Moleküle oder Komponenten der extrazellulären Matrix zur Verfügung, welche mit den *stalk*-Zellen kommunizieren [72, 73].

1.1.6 Anpassung an lokal metabolische Faktoren

Nachdem durch die Angiogenese ein Netzwerk von endothelialen Gefäßen entstanden ist, wird dieses einer vaskulären Regression, Umstrukturierung („*Remodeling*“) und der Gefäßstabilisierung unterzogen. Hierbei werden kleinere Gefäßabschnitte, die funktionell nicht weiter beansprucht werden, wieder abgebaut („*vascular regression*“) und die verbliebenen Gefäße modifiziert, sodass sie über lange Zeit im Organismus funktionieren und bestehen können. Unreife angiogenetische Sprosse gehen in diesem Schritt häufig zugrunde. Ein abruptes Fehlen an pro-angiogenetischen Faktoren, kombiniert mit einem verminderten Blutfluss, führt zur Apoptose der endothelialen Zellen und damit zur Regression der Gefäße [74].

Signale, welche zur Gefäßstabilisierung anregen, sind unter anderem VEGF, „*Platelet-Derived-Growth-Factor*“, Angiopoitin-1, Angiopoitin-2 und der Blutfluss. Der Effekt dieser Faktoren ist abhängig von der Gesamtzusammensetzung im

sauern Milieu. In diesem Zusammenhang stellt die gleichzeitige Präsenz von VEGF und Angiopoitin-2 in erhöhten Mengen eine der potentesten pro-angiogenetischen Faktorenkombination dar, während VEGF und Angiopoitin-1 zusammen einen wichtigen Induktor für die Stabilisierung neuformierter Blutgefäße bilden. Im Vergleich dazu führt die alleinige Anwesenheit von Angiopoitin-2 in hohen Mengen zu einer Gefäßregression [75].

1.1.7 Gefäßstabilisierung

Während der Gefäßstabilisierung wechselt das Endothel seinen pro-angiogenetischen, proliferierenden und invasiven Phänotyp in einen eher ruhenden, nicht invasiven und nicht-proliferativen Phänotyp. Anastomosen zwischen vaskulären Sprossen ermöglichen den Blutfluss zwischen benachbarten Kapillaren. „*Tight junctions*“ zwischen einander angrenzenden Endothelzellen werden ausgebildet. Perizyten und andere murale Zelltypen werden zu dem neuen Gefäß rekrutiert, die Matrix-Veränderung wird inhibiert und neue Matrix-Bestandteile werden angereichert, um eine neue Basalmembran für die Gefäße zu bilden. Angelagerte Perizyten und extrazelluläre Matrix-Proteine inhibieren eine weitere Endothelzellproliferation und -migration und sezernieren stabilisierende Signale an die Endothelzellen [16, 43, 76, 77].

Hämodynamische Kräfte durch den Blutfluss sollen ebenfalls eine stabilisierende Wirkung ausüben. Eine signifikante Rolle in der Stabilisierung der Gefäße spielen insbesondere Faktoren wie der „*Platelet Derived Growth Factor*“, Sphingosine-1, Angiopoitin-1 und der „*Transforming Growth Factor*“ [16, 43, 76, 77].

Die extrazelluläre Matrix hat ebenfalls eine dynamische Rolle in der Stabilisierung der angiogenetischen Aussprossung durch die Speicherung von angiogenetischen Signal-Molekülen. Diese werden freigesetzt, sobald die extrazelluläre Matrix durch Proteasen an bestimmten Stellen, z.B. an der Basalmembran der Gefäßwand abgebaut wird. Durch den Blutfluss entstehen Scherkräfte und eine Schubspannung, die ebenfalls von Bedeutung sind, da

sie intrazelluläre Signalwege beeinflussen und dabei z.B. die Wirkung von VEGF und Angiopoitin-1 oder Stickstoffmonoxid (NO) imitieren können [78, 79].

1.1.8 Arteriogenese

Die Arteriogenese beschreibt das Wachstum von funktionellen Kollateralarterien aus bereits existierenden arterio-arteriolen Anastomosen [25]. Die Reifung von so einem „natürlichen Bypass“ wird durch einen komplexen Mechanismus reguliert. Initial mit einem Anstieg der Scherspannung in Gefäßen, die aus pathologischen Gründen verschlossen sind. Als Reaktion auf diese Veränderung kommt es zur Induktion der Endothelzellproliferation, der Migration und zu „*Remodelling*“-Prozessen. Dieses positive „*outward remodelling*“ führt zur Bildung von Konduktanzgefäßen und damit zur Kompensation von okkludierten Blutgefäßen [80-82].

Ist die Regulierung der Neovaskularisierung beeinträchtigt, so kann das große Auswirkung auf die Gesundheit haben. Pathologische Prozesse, wie Tumorwachstum, Gewebeischämien oder entzündliche Erkrankungen gehen oft mit einer Verstärkung lokaler Angiogeneseprozesse einher [1, 19].

Ineffizientes Gefäßwachstum oder auch ein fehlregulierter Abbau von Gefäßen unterstützt Krankheitsbilder, wie arteriellen Bluthochdruck (arterielle Hypertonie), Osteoporose oder neurodegenerative Erkrankungen [1, 19].

1.2 VEGF als proangiogenetischer Faktor

Eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden sind in Prozesse der Neovaskularisierung involviert. Beispiele hierfür sind das VEGF/VEGFR-System, Angiopoietin/Tie-Rezeptor-System, PDGF/PDGFR-System und das EphrinB2/EphrinB4-System. Von all diesen sind jedoch VEGF und seine Rezeptoren die Schlüsselregulatoren, sowohl der Vaskulogenese als auch der Angiogenese [83-85].

VEGF ist ein endothelzellspezifisches Mitogen [85]. Die VEGF Familie besteht aus sieben verschiedenen Subtypen: VEGF Typ A, B, C, D, E, F und dem „*Placental Growth Factor*“ [86-89]. Alle Subtypen besitzen acht Cystein-Reste in der Tertiärstruktur als eine homologe Domäne. Die VEGF-Unterarten unterscheiden sich jedoch sowohl in physikalischen als auch biologischen Eigenschaften und reagieren über spezifische Tyrosinkinase-Rezeptoren (VEGFR-1, -2, -3) [90, 91]. Darüber hinaus interagiert VEGF mit verschiedenen Ko-Rezeptoren, wie Neuropilin-1 und -2 [92]. Das VEGF/VEGFR-1, -2-System ist eine Schlüsselkomponente im komplexen Prozess der Angiogenese. VEGFR-3 und seine Liganden VEGF-C und -D sind wichtige Regulatoren der Lymphangiogenese und PGF ist an die Arteriogenese gekoppelt [92-94].

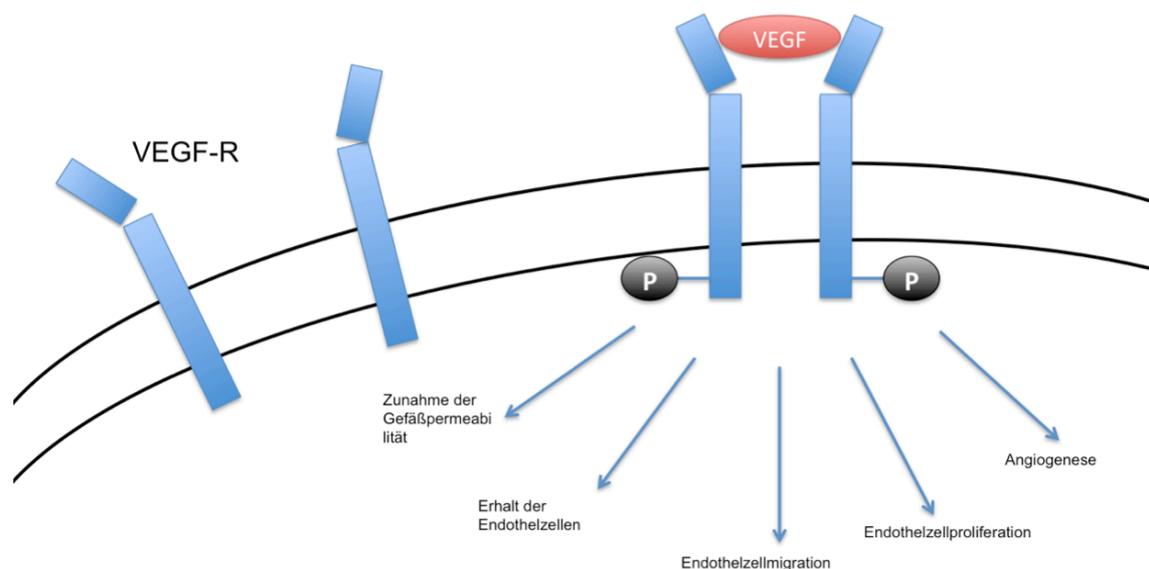


Abbildung 1. VEGF und seine Rezeptoren (modifiziert nach [95])

1.2.1 VEGF-A

VEGF-A ist eines der Schlüsselmoleküle sowohl der Angiogenese als auch der Vaskulogenese [1, 96]. Es induziert die Proliferation, das „*sprouting*“, die Migration und die „*tube formation*“ von Endothelzellen [86]. Neben diesen Funktionen ist VEGF-A auch ein „*survival factor*“ durch die Förderung der Expression von antiapoptotischen Proteinen [97]. Zusätzlich bewirkt VEGF-A eine Vasodilatation durch die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase, welche die vaskuläre Bioverfügbarkeit von NO reguliert [98].

Das VEGF-A-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert und wird von 8 Exons, die von 7 Introns unterbrochen werden, kodiert. Durch verschiedene Ansatzpunkte des Spleiß-Mechanismus entstehen vier verschiedene Isoformen des VEGF-A (VEGF 121, VEGF 165, VEGF 189 und VEGF 206) [99]. Die spezifische Nummerierung beschreibt die Anzahl der Aminosäuren, aus denen das Molekül aufgebaut ist. VEGF-A induziert die Angiogenese in einer Vielzahl sowohl physiologischer als auch pathologischer Prozesse, wie z. B. in der Embryogenese, der Bildung des Corpus luteum im ovarialen Zyklus, im Tumorwachstum, der Wundheilung und der kompensatorischen Angiogenese am Herzen. VEGF 165 stellt hierbei die dominierende Isoform des Moleküls dar. Seine Expression wurde bereits in verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen, wobei seine Wirkung zur Versorgung des Tumorgewebes mit Blutgefäßen und damit auch mit Nährstoffen und Sauerstoff beiträgt [100, 101]. VEGF-A vermittelt seine biologischen Effekte durch Interaktion mit den Zelloberflächen-Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1/KDR), welche bspw. auf Endothelzellen auftreten und Neuropilin-Rezeptoren (Nrp)-1 und Nrp-2, die ebenfalls auf Gefäßendothelien und auf Neuronen auftreten [92, 102].

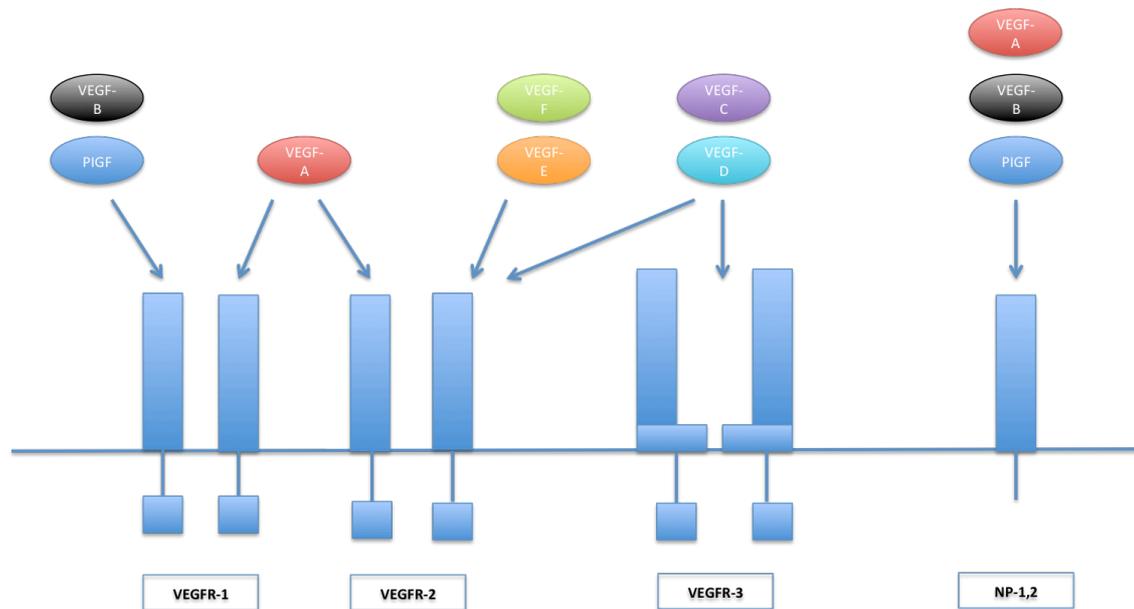


Abbildung 2. Interaktion von VEGF mit VEGFR-1, -2, -3 und Neupilin 1 und 2 (modifiziert nach [95])

Nach der Bindung von VEGF an die genannten Rezeptoren kommt es zu einer intrazellulären Signalkaskade. VEGFR-2 scheint der hauptverantwortliche Rezeptor für die Weiterleitung pro-angiogenetischer Reize durch VEGF-A zu sein [86, 102, 103].

In vivo wurde bereits gezeigt, dass VEGF-A einen signifikanten Einfluss auf die Angiogenese und die physiologische Vaskulogenese besitzt [32]. In tierexperimentellen Versuchen mit Mäusen führt die Deletion des für VEGF-A kodierenden Gens zum Tode. Selbst eine lokale Deletion führt zu schweren Gefäßschäden und kardiovaskulären Abnormitäten, die mit dem Leben kaum zu vereinbaren sind [27]. Einen Hauptproduzenten von VEGF stellt vor allem in entzündetem Gewebe der Zelltyp der Makrophagen dar. Kiriakidis und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Makrophagen durch die entzündungsbedingte Aktivierung beginnen, große Mengen von VEGF-A zu produzieren [104].

1.2.2 Lenvatinib (E7080)

Lenvatinib (E7080) ist ein Multi-Kinase-Inhibitor. Seine Spezifität richtet sich unter anderem gegen die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Diese Arbeit

fokussiert sich vor allem auf VEGFR-2, da dieser Rezeptor für angiogenetische Prozesse von besonders großer Bedeutung ist [1, 96, 105].

Durch die außerordentliche Bedeutung der Angiogenese auf Tumorwachstum und Metastasierung stand die Beeinflussung der Angiogenese über die letzten Jahrzehnte im Mittelpunkt vieler Forschungsprojekte [20, 106, 107]. Erste Ansätze bestanden darin, einen Antikörper zu entwickeln, der direkt gegen den Wachstumsfaktor VEGF gerichtet ist [108]. Ein Beispiel für diese Art der Medikation von Tumoren stellt das Medikament Bevacizumab dar [109, 110].

Auch benigne Erkrankungen nehmen in der Gefäßproliferation ihren Ursprung. Die altersbedingte exsudative Makuladegeneration hängt direkt von dem Einfluss von VEGF ab und die Pathogenese ist maßgeblich von einer übermäßigen Neubildung von Blutgefäßen geprägt. In diesem Zusammenhang ist die Anti-VEGF-Therapie eine effektive Form, um die unkontrollierte Wucherung von neuen Gefäßen zu regulieren, beziehungsweise zu bremsen [111]. Weitere Versuche die Angiogenese zu beeinflussen zielten auf kleine Moleküle ab, welche mit den Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 interagieren. So ist E7080 ein Inhibitor für verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen, dabei insbesondere speziell der VEGF-Rezeptoren (VEGFR1-3), FGF-Rezeptoren (FGFR1-4), und PDGF-R α [112, 113].

Die Behandlung mit diesem spezifischen Tyrosinkinaseinhibitor ermöglicht an den Zielorten durch Verminderung bzw. Aufhebung der VEGF-Wirkung unterschiedliche Effekte. So zeigt er Wirkung gegen progressives Tumorwachstum, speziell bei kleinzelligen Lungentumoren und auf Angiogenese basierendem Brustkrebs [113]. Auch wurde ein anti-angiogenetischer Effekt auf Kolorektalkarzinome gezeigt [114].

1.3 Stamm- und Progenitorzellen

Als Stammzellen bezeichnet man undifferenzierte Zellen, welche in lebenden Organismen die Fähigkeit besitzen, durch asymmetrische Zellteilung zwei unterschiedliche Tochterzellen auszubilden. Eine der beiden Zellen besitzt exakt die Eigenschaften der Mutterzelle (Selbsterneuerung), die andere hingegen besitzt die Möglichkeit sich weiter zu differenzieren. Dieser zweite Typus der Tochterzelle verliert die Fähigkeit der Selbsterneuerung und differenziert sich zu einem bestimmten reifen Zelltyp [115].

Stammzellen unterteilt man grundsätzlich in toti-, pluri- und multipotente Stammzellen [116]. Die embryonalen Stammzellen sind in der Lage sich in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm und Mesoderm) zu differenzieren (totipotent). Auch die keimbahnassoziierten Zellen gehen aus den embryonalen Stammzellen hervor. Diese Art der Stammzellen werden als pluripotent bezeichnet [117]. Die post-embryonalen Stammzellen oder auch adulten Stammzellen umfassen alle Arten, die nach der embryonalen Entwicklung im vertebraten Organismus vorhanden sind. Der große Unterschied zu embryonalen Stammzellen liegt in der Differenzierungskapazität. Im Gegensatz zu den pluripotenten embryonalen Stammzellen können sich die adulten Stammzellen nur in genetisch determiniertes Gewebe ausdifferenzieren bspw. in Zellen des hämatopoetischen Systems. Dementsprechend spricht man bei dieser Art der Zellen von multipotenten Stammzellen [118]. Als Progenitorzellen oder auch Vorläuferzellen werden Tochterzellen der multipotenten Stammzellen bezeichnet. Das Differenzierungspotential von Progenitorzellen ist unipotent, was bedeutet, dass ihre weitere Reifung vorbestimmt ist.

1.4 Aortic Ring Assay (ARA)

1.4.1 Geschichtliches

1982 wurden erstmals angiogenetische Prozesse an Rattengefäßen beobachtet und durch Nicosia und Mitarbeiter dokumentiert. Diese Beobachtungen stellen den Ursprung des Aortic Ring Assays (ARA) dar [119]. Das ARA schlägt eine Brücke zwischen *in vivo*- und *in vitro*- Versuchen. Bei dieser Art des Versuches wird ein Abschnitt der Aorta in kleine (1-3 mm dicke) Gefäßringe geschnitten, in ein Kollagen-Gel eingebettet und kultiviert. Das Kollagen-Gel dient als Grundlage für die Bildung endothelialer Kanäle („*tube formation*“). Durch die Verwendung eines intakten Gefäß-Explantats, eingebettet in Kollagen, wird die Umgebung der natürlich vorkommenden Angiogenese sehr genau simuliert. Mit diesem Versuchsaufbau kann man die Länge, Anzahl und Vernetzungen der aussprossenden Zellen erkennen und dokumentieren. Auch ist die Behandlung und der damit verbundene Effekt von verschiedenen Wachstumsfaktoren, Medikamenten etc. sehr gut zu beurteilen [120-122].

1.4.2 Allgemeine Anatomie von Gefäßen

Die kleinsten Gefäße (Kapillaren) bestehen aus zwei unterschiedlichen Zellschichten. Die Endothelzellen säumen das Lumen dieser Gefäße. Perizyten stellen eine u.a. kontraktile Zellart dar, welche die endotheliale Zellschicht von außen nicht kontinuierlich ummanteln. Sowohl Perizyten als auch Endothelzellen sind dabei von einer gemeinsamen Basallamina umgeben. Arteriolen und Venolen gehören ebenfalls zu den Mikrogefäßen. Im Unterschied zu den Kapillaren besteht ihre Wand anstelle von Perizyten aus mindestens einer Schicht glatter Muskelzellen, die eine konzentrisch um das Endothel organisierte Schicht bilden. Allen Mikrogefäßen gemeinsam ist eine dünne, bindegewebige Schicht, welche die Gefäße mit dem umliegenden perivaskulären Gewebe verbindet bzw. sie in das umgebende Gewebe intergriert und sie somit in ihrer topographischen Lage fixiert. Der histologische

Aufbau von großen Gefäßen kann strukturell in drei konzentrisch angeordnete Schichten unterteilt werden:

- Die Tunica intima als innerste Schicht, welche in allen Blutgefäßen von den Endothelzellen und in großen Gefäßen noch von einer sub-endothelialen Zone gebildet wird.
- Die Tunica media, welche hauptsächlich von den glatten Muskelzellen gebildet wird.
- Die Tunica adventitia, bestehend aus Fibroblasten, Fibrozyten und Bindegewebe. Diese Schicht bildet die Verbindung des Gefäßes zum umliegenden Gewebe. Die Adventitia der großen Blutgefäße enthält zudem Vasa vasorum und Nerven.

Im Gegensatz zu den größeren Gefäßen wird die Wand von Kapillaren und kleineren Arterien und Venen über Konvektion und Diffusion ernährt und mit Sauerstoff versorgt. Bei den großen Arterien und Venen treten sogenannte Vasa vasorum auf, welche in der Adventitia angelegt sind und die Nährstoffversorgung der äußeren Gefäßschichten gewährleisten. Wie bereits oben beschrieben sind die Bestandteile der Gefäße die meiste Zeit in einem ruhenden Modus. In bestimmten physiologischen, aber auch pathologischen Prozessen kann es jedoch zu einer Aktivierung und damit verbundenen Zellproliferation kommen [65, 123, 124].

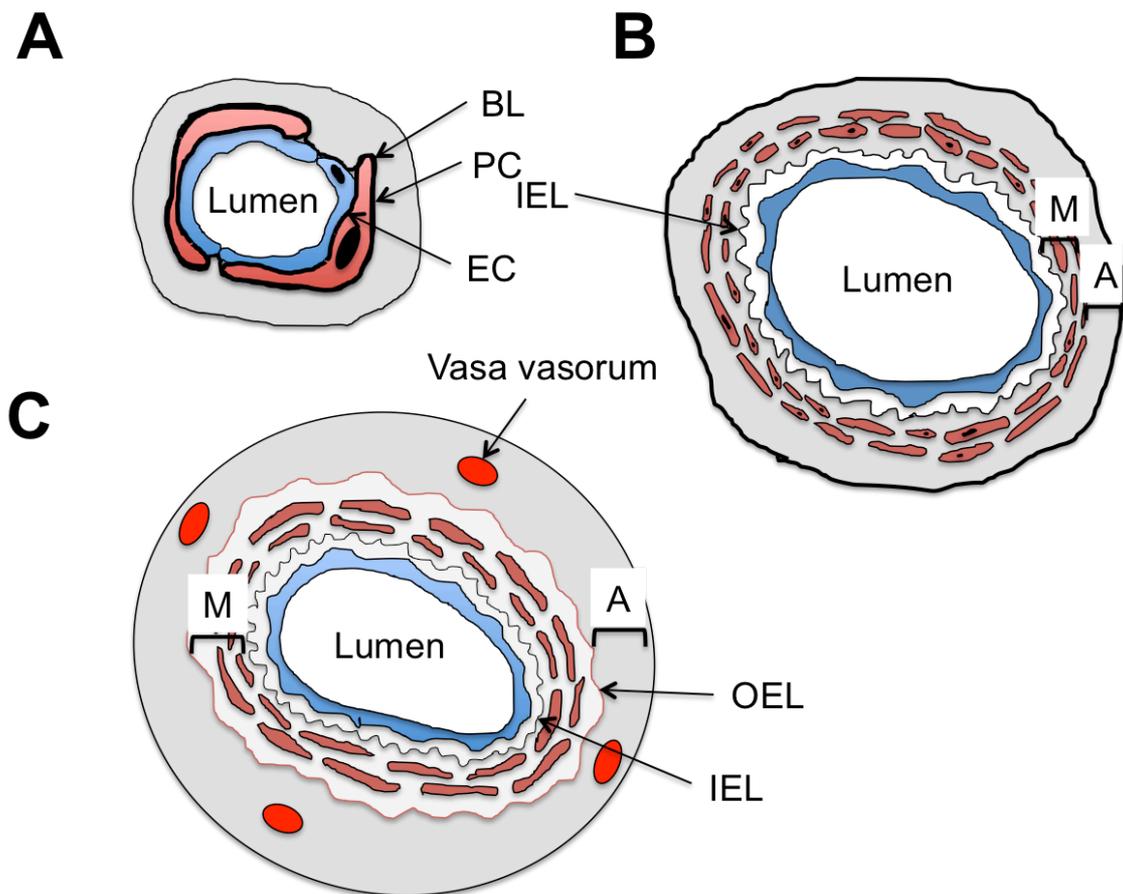


Abbildung 3. Grundstrukturen der Gefäßwand (modifiziert nach [125])

Zu Abbildung (Abb.) 3:

(A): Kapillaren sind aus Endothelzellen (ECs) und Perizyten (PCs) aufgebaut. Die Endothelzellen kleiden das Lumen des Gefäßes aus und die Perizyten ummanteln die Endothelzellen. Beide Zelltypen liegen der Basallamina (BL) auf.

(B): Mittelgroße Gefäße mit einer inneren, elastischen Membran (IEL) an der Grenze zwischen Intima und Media (M). Die Media wird extraluminal begrenzt von der Adventitia (A)

(C): Intima, Media, Adventitia und Vasa vasorum sind feste Bestandteile der Gefäßwand großer Arterien und Venen. Die Grenze zwischen Media und Adventitia ist festgelegt mit der äußeren elastischen Membran (OEL)

1.4.3 Stammzellen im Aortic Ring Assay / Vaskulogene Zone

Bis vor wenigen Jahren hatte man von der Adventitia noch angenommen, dass sie eine Bindegewebeschicht sei, welche die Gefäßwand in die Umgebung integriert, der jedoch ansonsten keine besondere Aufgabe zufällt und somit auch im Angiogenese- oder Vaskulogenese-Prozess keine essentielle Rolle spielt. Jedoch zeigten verschiedene Experimente in den letzten Jahren, dass genau diese Zone der Gefäßwand sowohl in embryonalem, als auch in adultem Gewebe eine Nische für verschiedene Typen von Stamm- und Progenitorzellen darstellt [8-12].

Es wurde gezeigt, dass diese Nische der sogenannten VW-SCs EPCs, Vorläuferzellen für glatte Muskelzellen, MSCs, HSCs, mesangiale Zellen, welche sowohl endotheliale als auch myogene Marker exprimieren, neurale- und Keimbahn-assoziierte Stammzellen beinhaltet [126-130]. Crisan et al. zeigten, dass murale Zellen ursprünglich die MSC-Marker CD44, CD90, CD73 und CD105 exprimieren [63]. In der Vergangenheit wurde häufig postuliert, dass „*adipose tissue derived stem cells*“, welche MSC-Marker exprimieren, von Perizyten abstammen. In neuesten Studien wurde gezeigt, dass es Gefäßwand-residente MSCs in direkter Nachbarschaft zu Perizyten gibt [131, 132].

In weiteren Experimenten konnte bewiesen werden, dass aus der Gefäßwand isolierte CD34(+)-Zellen MSC-Marker besitzen, jedoch keine Perizyten-spezifischen Oberflächenantigene [133]. Alles in allem weisen diese Erkenntnisse auf die Anwesenheit von VW-SCs, auch in der Wand von Mikrogefäßen in enger Nachbarschaft zu Perizyten, hin.

In vielen Publikationen werden mittlerweile zwei Zonen in der Gefäßwand beschrieben, in denen Stamm- und Progenitorzellen vorkommen, in der subendothelialen Zone der Tunica intima und in der Tunica Adventitia. Letztere wird auch als vaskulogene Zone bezeichnet [9, 10, 134-139].

In Kapillaren, deren Wand aus Endothelzellen und meistens noch Perizyten besteht, entspricht die subendotheliale Zone der adventitiellen Zone von großen Gefäßen, da sie die äußere Begrenzung der Gefäßwand darstellen [9, 136, 139, 140].

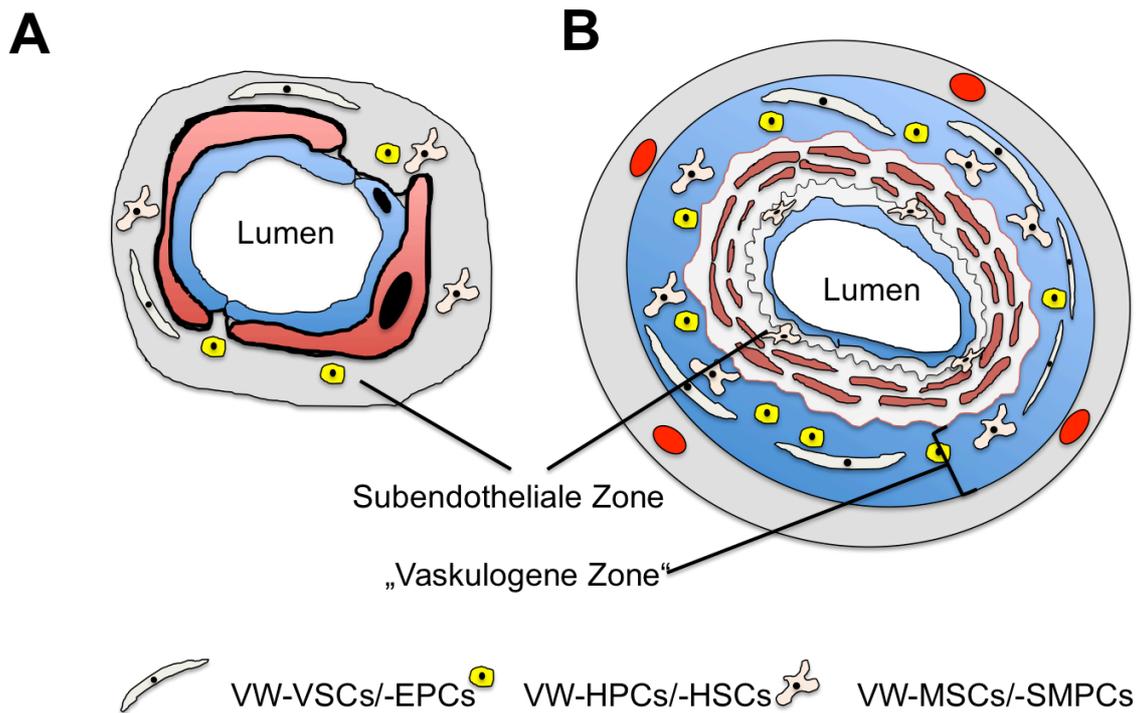


Abbildung 4. Gefäßwand- residente Nischen für Stamm- und Progenitorzellen (Abgeändert nach [125])

Zu Abb.4:

(A): In kleinen Gefäßen sind Gefäßwand-residente endotheliale Progenitorzellen (VW-EPCs), hämatopoetische Stammzellen (VW-HSCs) und mesenchymale Stammzellen (VW-MSCs), in der subendothelialen Zone eventuell zwischen Perizyten (rot) gelagert, lokalisiert. Diese umgeben somit das Endothel (blau).

(B): In mittleren und großen Gefäßen mit einer klar definierten Adventitia befinden sich die Stamm- und Progenitorzellen hauptsächlich in der sogenannten vaskulogenen Zone. Diese befindet sich am Übergang zwischen Adventitia und Media.

Im Gegensatz zu den Mikrogefäßen, welche meistens nur eine unvollständige Schicht von kontraktile Zellen (Perizyten oder glatte Muskelzellen) besitzen, ist die Wand von mittelgroßen und großen Gefäßen, wie in Kapitel 1.4.2

beschrieben, aufgebaut. In diesen Gefäßen wurden CD44(+), CD90(+), CD73(+), CD34(-), VEGFR-2(-)-MSCs, VEGFR-2(+), CD34(+), CD31(-)-EPCs und CD133(+), CD45(+) hämatopoetische Progenitorzellen in der sogenannten vaskulogenen Zone innerhalb der Adventitia beschrieben [9, 136, 139, 140].

Nachforschungen haben die Existenz sowohl von multipotenten MSCs und HSCs als auch von „*unipotent lineage committed progenitors*“ bewiesen bzw. bestätigt [141].

Ganz allgemein ist die Adventitia von Gefäßen aus Bindegewebe mit Fibroblasten und Fibrozyten aufgebaut und beinhaltet ab einer gewissen Größe ein Gefäßnetzwerk, welches auch als „Vasa vasorum“ bezeichnet wird. Dieses Gefäßnetzwerk hat nun einerseits die Aufgabe die äußeren Wandabschnitte von großen Gefäßen mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen und zum anderen scheinen die Vasa vasorum eine signifikante Rolle in der Entstehung von Gefäßerkrankungen zu spielen [142]. Neben diesen Funktionen ermöglicht es dieses Netzwerk Zellen aus dem zirkulierenden Blut in die Gefäßwand zu transmigrieren [143].

Zusammenfassend ermöglichen es die Vasa vasorum, Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark in die Adventitia von Gefäßen einzuwandern und damit vermutlich zur Bildung und Erhaltung des Stammzell-Pools bis zu einem gewissen Grad beizutragen [143-145]. Die eigentlichen VW-SCs sind jedoch unabhängig vom Knochenmark und können sich offensichtlich selbst erneuern [9, 14]. Hierbei wurde postuliert, dass die Stammzellen der VW-SC-Population dort seit der embryonalen Vaskulogenese vorhanden sind und bei Bedarf durch physiologische, sowie pathologische Prozesse aktiviert werden können [4, 44].

Zwei fundamentale Funktionen können der Gefäßwand zugeschrieben werden. Zum einen stellt sie die Verbindungsstrecke/Barriere zwischen Blut und umliegendem Gewebe dar. Dies ist von klinischer Bedeutung, nicht nur wegen der Entdeckung von Stamm- und Progenitorzellen in der Adventitia, sondern auch durch Forschungen, die gezeigt haben, dass es in pulmonalen Gefäßen unter Hypoxie zu einem intensiven „*remodelling*“ von adventitiellen Zellen kommt [146]. Zum anderen induziert weißes Fettgewebe, welches die

Adventitia von Gefäßen umgibt, die Zellproliferation und inflammatorische Prozesse in der Adventitia [147].

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde der sogenannte „*outside-in-effect*“ der Gefäßwand als Reaktion auf arteriosklerotische Einflüsse beschrieben, neben dem konventionellen „*inside-out-effect*“ [148]. Bei dem „*inside-out-effect*“ geht man von der Adhäsion/Invasion von Entzündungszellen in subendotheliale Regionen der Gefäßwand aus, hervorgerufen durch eine Verletzung des intimalen Endothels. Weiter wächst die atherosklerotische Plaque durch die Akkumulation von Entzündungszellen, Lipiden und die Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäße [149, 150].

Eine mögliche Erklärung für die Herkunft der VW-SCs könnte sein, dass sie einen Teil der Knochenmark-assoziierten Stammzellen darstellen, welche in subendotheliale Bereiche von Gefäßen eindringen und durch direkte Transmigration durch die Gefäßwand oder durch Transmigration durch die Gefäßwand der Vasa vasorum und anschließende Wanderung durch die Adventitia postnatal in der vaskulogenen Zone zum Liegen kommen. Obwohl die Transmigration von Knochenmark-assoziierten Stammzellen sowohl durch die Adventitia, als auch durch den perivaskulären Raum beschrieben wurde [144], ist dieser Mechanismus nur eine Hypothese, weil eine solche immer wiederkehrende Repopulation der VW-SCs durch Knochenmark-abgeleiteten Zellen bisher experimentell nicht gezeigt wurde. Interessanterweise wurde jedoch eine Transmigration von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark in die Adventitia von pulmonalen Arterien bei Mäusen mit Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertension beobachtet [143]. Neben der Extravasation von aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen wurde eine Erhöhung der Permeabilität der Vasa vasorum beschrieben. Neu gebildete Gefäße ermöglichen somit vermutlich eine höhere Transmigration von zirkulierenden Zellen in das Gewebe [144].

Eine andere Erklärung könnte sein, dass die VW-SCs während der Embryogenese initial im periendothelialen Raum der embryonalen Gefäße abgelagert werden und dort bis ins erwachsene Alter verweilen. In der initialen

Stufe und während der ersten Woche der kardiovaskulären Entwicklung besteht die Aorta aus nur einer Schicht von Endothelzellen [4, 44]. Sowohl Stamm- als auch Progenitorzellen befinden sich in der engen Umgebung dieser Endothelien. Die Ablagerung von extrazellulären Matrix-Komponenten, wie Laminin und die Akkumulation von Progenitorzellen im peri-endothelialen Raum gibt Anstoß zur Bildung von Perizyten und glatten Muskelzellen. Ein Teil dieser Stammzellen behält jedoch den Stammzell-Charakter über diese Differenzierung und weiteren Gefäßumbau hinweg bis in das Erwachsenenalter und könnten somit die Grundlage für die vaskulogene Zone bilden [151]. Die vaskulogene Zone setzt sich zusammen aus CD34(+), VEGFR-2(+), Tie-2(+), CD31(-) und VE-Cadherin(-)-Zellen. Diese sind in der Adventitia von großen und mittelgroßen Blutgefäßen lokalisiert [9] (siehe Abb.4).

1.5 Makrophagen

1.5.1 Allgemeines

Makrophagen wurden das erste Mal von Ilya Metchnikoff vor mehr als 100 Jahren beschrieben. Seine Erläuterung der Phagozytose wurde im Jahr 1908 mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigt [152].

Makrophagen stellen eine Subgruppe der myeloischen Zelllinie und der Leukozyten dar. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen körperfremde Oberflächenproteine von z.B. Viren und Bakterien über Pattern-Recognition-Rezeptoren und nehmen sie dann mittels der Phagozytose auf. Dabei können sie Zytokine freisetzen, die weitere Entzündungszellen anlocken und somit einen lokalen inflammatorischen Prozess auslösen. Makrophagen können gewebeschädigende Prozesse verstärken, können aber auch regenerative Heilungsmechanismen aktivieren. Die durch Phagozytose aufgenommenen Partikel werden intrazellulär prozessiert und die somit entstandenen Bestandteile an der Zelloberfläche der Makrophagen transferiert und dort mittels der MHC-II-Moleküle gebunden. Dies dient der Antigenpräsentation, wodurch die Zellen des erworbenen Immunsystems aktiviert werden [153]. Durch diese unterschiedlichen Funktionen und damit

unterschiedlichen Transkriptionsprofilen sind Makrophagen unerlässlich für die Aufrechterhaltung der Homöostase [15].

1.5.2 Makrophagenherkunft und ihre Subtypen

Makrophagen kommen in nahezu allen Geweben vor. Sie differenzieren sich aus zirkulierenden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (Monozyten). Diese verlassen nach ein- bis dreitägiger Zirkulationszeit das Gefäßsystem und differenzieren sich zu gewebspezifischen Makrophagen (mononukleäre Phagozyten). Die Ursprungszellen der Makrophagen können ebenfalls als Vorläuferzellen für andere Zelltypen fungieren. Hierzu zählen neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, dendritische Zellen und Mastzellen [154].

Weiter konnte gezeigt werden, dass im peripheren Gewebe auch Makrophagen zu finden sind, die bereits während der embryonalen Entwicklung aus dem Dottersack in entsprechende Organe (z.B. Mikroglia des Gehirns) und Gewebe einwandern und dort zeitlebens verbleiben. Solche Dottersack-abgeleiteten Makrophagen wandern auch in die Wände der Blutgefäße und tragen somit zum Gewebe-residenten Makrophagenpool bei. Zudem können auch CX3CR1+ Zellen aus dem Knochenmark in die Gefäßwand einwandern [155].

Monozyten differenzieren sich aus myeloischen Progenitorzellen des Knochenmarks. Von dort aus werden sie in den peripheren Blutstrom ausgeschwemmt. Monozyten haben eine besondere Bedeutung für die immunologische Homöostase. Sie leiten pro- und anti-inflammatorische Reaktionen ein und können überschießende Immunantworten verhindern. Nach ein bis drei Tagen Zirkulationszeit wandern sie in peripheres Gewebe ein und differenzieren sich unter verschiedenen Einflüssen wie pro-inflammatorischen Zytokinen zu Makrophagen oder dendritischen Zellen [154].

Makrophagen besitzen eine Schlüsselfunktion in der Beseitigung und Vernichtung von Bakterien, Viren und Protozoen, können jedoch auch einen negativen Effekt auf die Pathogenese der Inflammation ausüben [156, 157]. In funktioneller Hinsicht werden Makrophagen weiteren Unterteilungen unterzogen. Die am weitesten verbreitete und geläufigste Unterteilung ist die

Gruppierung der Makrophagen in M1- und M2-Subtypen, die jedoch im Wesentlichen auf den aus *in vitro* Versuchen erhobenen Daten basiert. Hierbei wurde den Makrophagen vom Typ M1 eine pro-inflammatorische und den Makrophagen vom Typ M2 eine anti-inflammatorische Rolle zugeschrieben[156, 157]. Neuere Arbeiten lassen jedoch darauf schließen, dass diese Einteilung für *in vivo* vermutlich nicht zutrifft bzw. nicht geeignet ist, die Funktion der Makrophagen genau zu beschreiben[15, 158].

M1- und M2-Makrophagen wurden ursprünglich unterschieden anhand der Expression bestimmter Faktoren wie z.B. der Anwesenheit der „*inducible NO synthase*“ [159] für M1 oder der Arginase für M2. Beide Zelltypen führen zu einer T-Zell vermittelten Immunantwort [160]. Entstehende Stoffe, die mit der M1-Makrophagenantwort assoziiert werden, sind in erster Linie das durch iNOS generierte NO, die gesteigerte Produktion von Interleukin(IL)-12 und IL-8 sowie die vermehrte Expression von MHC II Molekülen und eine Zunahme an CC-Chemokinligand-2. Bei der M2-assoziierten Makrophagenantwort kommt es zu einer erhöhten Bildung von Ornithin durch die Zunahme der Arginaseaktivität, einer gesteigerten Freisetzung von „*Epidermal Growth Factor*“ (EGF), VEGF und „*Transforming Growth Factor*“ (TGF)- β sowie zu einer vermehrten Expression von Mannose-Rezeptoren. Andere Stoffe wie IL-6, Tumor Nekrose Faktor (TNF), IL-1 und IL-10 werden ebenfalls mit der Antwort von M1- oder M2-Makrophagen in Verbindung gebracht, da diese Zytokine in der Immunantwort von beiden Subtypen erkannt wurden [160-164].

Wie zuvor angemerkt sind diese Einteilung und die damit verbundenen funktionellen Eigenschaften der Makrophagen nur unter spezifischen *in vitro* Bedingungen definiert worden und spiegeln daher kaum oder gar nicht die *in vivo* Situation, insbesondere unter pathologischen Bedingungen wieder. Zumal können solche Prozesse im menschlichen Körper nicht überprüft werden. Die Klassifizierung in M1- und M2-Makrophagen stellt somit ein sehr vereinfachtes Bild der Makrophagenfunktion dar und ist daher eher kritisch zu betrachten. So konnte gezeigt werden, dass Makrophagen, welche den M2-spezifischen Marker CD301b exprimierten, entgegen der Erwartung einer anti-inflammatorischen Wirkung, zu einer Gewichtszunahme und Glukoseintoleranz

fürten, die eher mit einem pro-inflammatorischen Effekt verbunden war [165] [166].

Makrophagen stellen darüber hinaus einen erheblichen Teil der Leukozytenpopulation bei Tumorerkrankungen dar [167] und werden unter der Bezeichnung der „tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs)“ zusammengefasst. Sie tragen zum Tumorwachstum und Vaskularisierung bei, sind wesentlich an der in die anschwellende Immunreaktion bei Krebserkrankungen involviert [168] und scheinen somit eines der Hauptmerkmale für solche Erkrankung darzustellen [169].

1.5.3 Funktion von Zytokinen / Chemokinen

Zytokine sind kleine Moleküle (8-40 kDa), die als lösliche Botenstoffe („*soluble messengers*“) für die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen verantwortlich sind. Auch wird das gesamte Immunsystem des menschlichen Organismus über Zytokine reguliert und fein eingestellt. Makrophagen und Granulozyten setzen Zytokine bspw. frei, um in Entzündungsprozessen neue Zellen zu rekrutieren und/oder zu aktivieren [170, 171].

Über die Aktivierung von „*pattern recognition receptors*“ werden bspw. Zellen wie Makrophagen stimuliert, Zytokine zu produzieren und zu sezernieren. Während der Geweberegeneration, der Entzündung oder des Tumorwachstums können Zytokine destruktive oder aber auch reparative Wirkung auf andere Zellen ausüben [172, 173]. Nach der Aktivierung durch Lipopolysaccharide synthetisieren und sezernieren Makrophagen zunächst pro-inflammatorische Zytokine wie den TNF und IL-6 [174]. In der darauffolgenden Phase werden anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, IL-4 und TGF- β sezerniert. Diese haben die Funktion, das weitere Ansteigen von pro-inflammatorischen Zytokinen zu verhindern und damit ein Überschießen der Immunreaktion zu vermeiden [175]. Neben diesen Zytokinen produzieren Makrophagen bspw. IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ , sowie verschiedene Kolonie-stimulierende Faktoren (CSFs) [176].

Es wurde gezeigt, dass Makrophagen eine signifikante Rolle in sowohl physiologischen als auch pathologischen Angiogeneseprozessen spielen [177-

179]. Aus der Wand menschlicher Gefäße, wie z.B. der Arteria thoracica interna konnten ebenfalls im „*Sprouting-assay*“ Makrophagen generiert werden [9]. Gelati und Mitarbeiter bestätigten diesen Befund und zeigten, dass Makrophagen aus Gefäßexplantaten generiert werden können [180]. Durch den pro-angiogenetischen Einfluss der Makrophagen rücken diese in den Mittelpunkt dieser Arbeit. Im Fokus steht hierbei der Einfluss der Makrophagen auf die vaskulogene Zone großer Gefäße.

1.6 Makrophagendepletion durch liposomales Clodronat

Clodronat (Cl₂MDP, Dichlormethylen-Disphosphonat) zählt zur Stoffgruppe der Bisphosphonate, welche wiederum synthetische Analoga des Pyrophosphates sind. Bisphosphonate zeigen eine sehr hohe Affinität zum Hydroxylapatit des Knochens und inhibieren dadurch die Osteoklastenaktivität. Dies wiederum erklärt den therapeutischen Einsatz von Bisphosphonaten bei Erkrankungen des Knochenstoffwechsels, wie z. B. Osteoporose [181-183].

Des Weiteren ist freies Clodronat lipophob und negativ geladen, was eine geringe Zellmembrangängigkeit bewirkt und eine rasche Elimination begünstigt. Um das freie Clodronat intrazellulär anreichern zu können, muss der Wirkstoff in eine liposomale Kapsel eingebracht werden. Diese Clodronat-haltigen Kapseln werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen und intrazellulär durch lysosomale Enzyme verstoffwechselt. Dies führt zu einem Konzentrationsanstieg von Clodronat im Inneren der Zelle und löst damit die Apoptose aus [184, 185]. Clodronat-haltige Liposomen zeigen jedoch nur eine Wirkung auf Makrophagen. Andere phagozytierende Zellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten oder Endothelzellen, und nicht phagozytierende Zellen, wie z.B. T- und B-Lymphozyten, bleiben von Clodronat unbeeinflusst [186-188].

Die genaue Wirkung von Clodronat ist noch nicht vollständig aufgedeckt, einige Erkenntnisse gelten jedoch als gesichert. Clodronat ist ein Analogon des Pyrophosphats. Diese Pyrophosphatderivate werden in spezifische Adenosintriphosphat(ATP)-Formen (AppCp-Typ) eingebaut. Das auf diese Weise veränderte ATP ist in der Zelle nicht hydrolysierbar und blockiert auf

diesem Weg zahlreiche Enzyme und Metabolisierungswege. Hierdurch wird die Funktion der Makrophage eingeschränkt und somit die Apoptose eingeleitet [189, 190].

1.7 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Der Prozess der Angiogenese und der Neovaskularisierung wird seit einigen Jahrzehnten intensiv erforscht. Einige Mechanismen, die diese Prozesse steuern, sind jedoch bis heute immer noch nicht genau verstanden. Diesen Mechanismen kommt jedoch in vielen physiologischen wie auch pathologischen Prozessen eine zentrale Bedeutung zu. In der Tumorforschung wird die Anti-Angiogenese bereits als ein zentraler therapeutischer Ansatzpunkt gesehen, um eine Progression und Metastasierung zu verhindern. In einigen Tumorentitäten werden heute anti-angiogenetische Substanzen in der Therapie verwendet. Daher ist es unerlässlich, zu klären, welche Zelltypen mit welcher Gewebelokalisation unter pathologischen Bedingungen zur Gefäßneubildung beitragen und von welchen Faktoren bzw. Zelltypen sie gesteuert werden. In diesem Zusammenhang rücken VW-SCs in den Fokus aktueller Forschungen, nicht nur, weil sie lokal zur Gefäßneubildung beitragen, sondern sich offensichtlich auch zu Makrophagen differenzieren und somit die Prozesse der Gefäßneubildung beeinflussen. Dabei ist es wichtig zu klären, welche Einflüsse VW-SCs auf angiogenetische Prozesse haben, welche Rolle hierbei die in der Adventitia der Gefäßwand lokalisierte vaskulogene Zone spielt und wie diese Zone selbst während solcher Prozesse moduliert wird. Da Makrophagen in vielen physiologischen und pathologischen Abläufen eine zentrale Rolle spielen, soll hier ihr Einfluss auf das Gefäßremodeling und die Differenzierungskapazität von VW-SCs, sowie deren Nische (vaskulogene Zone) untersucht werden.

Aus diesen Gründen wurde in der folgenden Arbeit der experimentelle Ansatz des ARA gewählt. Es ist ein *ex vivo* Assay und stellt quasi eine Kombination aus *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen dar. Bei diesem Assay werden Geweberinge einer Arterie, wie z.B. der Mousaorta präpariert, die eine intakte Gefäßwand mit allen dazu gehörigen Zellen aufweisen. Diese werden in eine

Matrix eingebracht und zur Aussprossung von Zellen und Kapillar-ähnlichen Strukturen aktiviert. Damit bringt dieses Assay sehr gute Voraussetzungen mit, um den Prozess der Angiogenese und die vaskulogene Zone genauer zu studieren. Da hierbei insbesondere der Einfluss von Makrophagen genauer untersucht werden sollte, wurde der ARA-Ansatz modifiziert wie im Abschnitte Material und Methoden dieser Arbeit beschrieben. Durch die Depletion der Makrophagen mittels Zugabe von Clodronat-Liposomen sollte der Einfluss der Gefäßwand- oder VWSC-abgeleiteten Makrophagen auf die Angiogenese manipuliert und studiert werden. Dabei sollte auch die Auswirkung solcher Prozesse auf die adventitiellen VW-SCs innerhalb der vaskulogenen Zone untersucht werden. Als weiterer Ansatz sollte die Wirkung von VEGF-Signalwegen in diesem Prozess studiert werden. Hierzu wurden die Ringe mit dem VEGFR-2-Blocker Lenvatinib behandelt.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Instrumente und Geräte

Die Tabellen 1, 2, 3 und 4 zeigen eine tabellarische Auflistung der bei den Versuchen verwendeten oder im Text erwähnten Chemikalien/Materialien, technischen Geräten und Abkürzungen, sowie die jeweiligen Zulieferer- oder Herstellerfirmen.

Tabelle 5 zeigt die verwendete Software, die bei der Dokumentation und Auswertung eingesetzt wurde.

Material	Firma/ Sitz
MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc. / Carlsbad, Kalifornien, USA
DMEM + 10% FCS	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc. / Carlsbad, Kalifornien, USA
Destilliertes Wasser	Fa. Braun® Melsungen AG / Melsungen
Vollentsalztes Wasser	Hergestellt und abgefüllt im Institut für Anatomie u. Zellbiologie / Würzburg
Petri- Schale	Sarstedt / Nümbrecht
Filter 0,2 µm Porengröße	Fa. Scheller / Euerbach
Objektträger „Superfrost® Plus“	Gerhard Menzel GmbH / Braunschweig
Eindeckgläser, 24x50 mm	A. Hartenstein / Würzburg
Einmal-Skalpellklingen #24	Fa. Scheller / Euerbach
50 ml Falcon Blue Max Tube	Sarstedt / Nümbrecht
Mikrochirurgisches Besteck	FA. Scheller / Euerbach
Pipetten	Eppendorf / Hamburg

Tabelle 1: Allgemeine Materialien

Gerät	Firma/ Sitz
Mikrotom Leica® SM2010 R Nr. 1007	Leica Microsystems GmbH / Wetzlar
Mikrotom Leica® SM2000 R Nr. 790	Leica Microsystems GmbH / Wetzlar
Mikroskop Leica® DFC 3000 G	Leica Microsystems GmbH / Wetzlar
Keyence® BZ9000	Biorevo / Neu-Isenburg
CO ₂ - Inkubator	Memmert/ Schwabach
Tissue Processor 20	Leica Microsystems GmbH / Wetzlar
Digitale Präzisionswaage	Kern PLJ / Balingen
Vakuum-Pumpe	A. Hartenstein / Würzburg
Vortexer	VWR/ Darmstadt
Wasserbad 45° C	MEDOX Nager GmbH
pH-Meter	VWR/ Darmstadt
-20° C Tiefkühlschrank	Siemens AG / München
4° C Kühlschrank	Siemens AG / München
Einbettautomat	Leica Microsystems GmbH / Wetzlar
Einbettkasseten	Sarstedt / Nümbrecht
Eppendorf Reaktionsgefäße	Sarstedt / Nümbrecht
Reagenz-Schwenker	A. Hartenstein / Würzburg
Heizschrank	Memmert / Schwabach
Mikrowelle	Panasonic / Kadoma
Durchlicht- Mikroskop	Carl Zeiss 43119126

Tabelle 2: Geräte

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Abkürzung	Firma
Minimum Essential Medium	MEM	Sigma- Aldrich Chemie GmbH / München
L-Glutamin	L-Glut	Sigma- Aldrich Chemie GmbH / München
Natrium-Pyruvat	Na-P	Life Technologies Thermo Fisher Scientific Inc. /Carlsbad, Kalifornien USA
Purecol	-	Cell-SYSTEMS® / Troisdorf
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH / München
Penicillin / Streptomycin	P/S	Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc. / Carlsbad, Kalifornien, USA
Natriumhydroxid pH 7,4-7,5	NaOH	Applichem® GmbH / Darmstadt
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH / München
Levantinib (E7080)	E7080	Sigma-Aldrich Chemie GmbH / München
Normales Ziegen Serum	NGS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH / München
Normales Ratten Serum	NRS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH / München
Normales Esel Serum	NDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH / München
„Bovines Serum Albumin“	BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH / München

10% D-Glukose wasserfrei		Applichem® GmbH / Darmstadt
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	FLUKA® Sigma-Aldrich Chemie GmbH / München
Nickel(II)Sulfat-Hexahydrat	NiSO ₄ x 7H ₂ O	VWR Merck / Darmstadt
Glukoseoxidase Typ VII (1,2 mg/ml dest. H ₂ O)	GOD Typ VII	Sigma- Aldrich Chemie GmbH / München
3,3-Diaminobenzidin- tetrahydrochlorid (22,5 mg/ml)	DAB	Sigma- Aldrich Chemie GmbH / München
Kernecht-rot		VWR Merck / Darmstadt
Ammoniumsulfat	(NH ₄) ₂ SO ₄	FLUKA / St. Gallen
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	Applichem® GmbH / Darmstadt
Aluminiumsulfat-Oktahydrat	Al ₂ (SO ₄) ₃	Sigma- Aldrich Chemie GmbH / München
Essigsäure 100%		Carl Roth / Karlsruhe
Nickel-II-Sulfat-Hexahydrat	NiSO ₄ x6 H ₂ O	VWR Merck / Darmstadt
Paraplast, Histosec® Pastillen	Paraffin	VWR Merck / Darmstadt
Phosphate Buffered Saline	PBS	Selbst-Mischung
Natriumchlorid	NaCl	Applichem® GmbH / Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Applichem® GmbH / Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Applichem® GmbH / Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat wasserfrei	Na ₂ HPO ₄	Applichem® GmbH / Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Applichem® GmbH / Darmstadt

Zitronensäuremonophosphat	$C_2H_8O_7 \times H_2O$	Applichem® GmbH / Darmstadt
Natronlauge	NaOH	Applichem® GmbH / Darmstadt
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA	Carl Roth / Karlsruhe
Trisaminomethane-Ethylenediaminetetraacetic Acid	Tris-EDTA	Applichem® GmbH / Darmstadt
Trisaminomethan-Salzsäure	Tris-HCl	Applichem® GmbH / Darmstadt
Ethanol 99,9% 642	EtOH	Norbrand Nordhausen GmbH
Ethanol 96% 641	EtOH	Norbrand Nordhausen GmbH
Ethanol 70%, 80%	EtOH	Verdünnung aus 99,9% gem. Ethanol
Xylol		VWR Merck / Darmstadt
Paraformaldehyd	PFA	Carl Roth / Karlsruhe
Depex		Serva / Heidelberg
Hämatoxylin		Carl Roth / Karlsruhe
Phosphat-Puffer	PB	Eigenmischung
4',6-diamidi-2-phenylindol	DAPI	Roche / Mannheim
TRIS	$C_4H_{11}NO_3$	Applichem® GmbH / Darmstadt
NPG		

Tabelle 3: Chemikalien

2.1.3 Kits

Kits	Firma
ABC-Kit	Vectastatin

Tabelle 4: Kits

2.1.4 Software

Software	Hersteller	Verwendung
GIMP 2.8.10	GNU Image Manipulation Program	Bildbearbeitung
ImageJ 1.47	Wayne Rasband National Institute of Health / USA	Bildbearbeitung
BZ-II Bildanalyse- Software (BZ- H2AE)	Biorevo / Neu-Isenburg	Bildanalyse-Programm
Statistica	Statsoft / Hamburg	Statistische Auswertung

Tabelle 5: Software

2.1.5 Versuchstiere

Für alle Versuchsreihen wurden ausschließlich männliche wildtypische (wt) Labormäuse vom Typ C57BL/6J im Alter von mindestens acht Wochen verwendet. Die Versuchsreihe umfasste insgesamt 82 Tiere. Sie erhielten Futter und Wasser ad libitum und wuchsen unter natürlichen Tag-/Nachtbedingungen auf. Die C57BL/6J wt Mäuse wurden käuflich von der Firma Harlan erworben.

2.1.6 Antikörper

Erstantikörper	Seriennummer	Firma/ Ort
CD31	Santa Cruz sc-28188	Santa Cruz Biotechnology, Inc. / Dallas, USA
CD34	abcam® ab8158	abcam® / Cambridge, USA
CD44	Biolegend® 103002	Biolegend® / San Diego, USA
CD45	eBioscience 14-0451	eBioscience/ Frankfurt am Main
α-SMA	abcam® ab5694	abcam® / Cambridge, USA
F4/80	eBioscience 14-4801	eBioscience / Frankfurt am Main
VEGF	abcam® ab46154	abcam® / Cambridge, USA
Ki67	abcam® ab16667	abcam® / Cambridge, USA
iNOS	abcam® ab15323	abcam® / Cambridge, USA
Arginase	abcam® ab60176	abcam® / Cambridge, USA

Tabelle 6: Verwendete Erstantikörper

Zweitantikörper	Seriennummer	Firma/ Ort
Ziege α -Hamster syrisch biotinyliert	Dianova #107-065- 142	Dianova / Hamburg
Ziege α -Maus biotinyliert	Dianova #115-065- 100	Dianova / Hamburg
Ziege α -Kaninchen IgG biotinyliert	Vector #BA-1000	Vector Laboratories / California, USA
Ziege α -Ratte IgG biotinyliert	Vector #BA-9400	Vector Laboratories / California, USA
Ziege α -Maus Cy3	Dianova #115-165- 003	Dianova / Hamburg
Ziege α -Kaninchen Cy3	Dianova #111-165- 003	Dianova / Hamburg
Ziege α -Ratte Cy3	Dianova #112-165- 003	Dianova / Hamburg
Kaninchen α -Maus biotinyliert	DAKO #E0354	Dako Denmark A/S
Affe α -Schaf DyLight 650	abcam #ab96942	abcam® / Cambridge, USA
Esel α -Schaf biotinyliert	Dianova #713-065- 003	Dianova / Hamburg
Streptavidin-Alexa-555	Invitrogen #S21381	Thermo Fisher Scientific / Waltham, USA

Tabelle 7: Verwendete Zweitantikörper

2.2 Lösungen und Puffer

Substanz/ Menge/ pH	Zusammensetzung	
	Substanz	Menge
Phosphate Buffered Saline (PBS)/ 5 Liter/ 7,2-7,4	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O KH ₂ PO ₄ Dest. H ₂ O	40,03 g 1 g 8,5 g 1 g Auffüllen auf 5 Liter
0,1 M Phosphate Buffer / 2 Liter/ pH 7,4	KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O Dest. H ₂ O 5N HCl	4,9 g 29,2 g Auffüllen auf 2 Liter pH-Korrektur
10 mM Citrat- Puffer / 1 Liter/ pH 6,0	0,1M Zitronensäure 0,1M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat Dest. H ₂ O 1N NaOH	18 ml 82 ml Auffüllen auf 1 Liter pH-Korrektur
DAB-Entwicklungslösung	PB NiSO ₄ x 7H ₂ O (4°C) Glukose 10% (-20° C) NH ₄ Cl DAB (-20° C) GOD (-20° C)	67,5 ml 1350 µl 1350 µl 150 µl 1,5 ml 225 µl
Hämatoxylin nach Mayer	Hämatoxylin dd H ₂ O	1 g lösen in 1L

	Natriumjodat	0,2 g
	reines Kalialaun	50 g
	Chloralhydrat	50 g
	Zitronensäure	1 g
Eosin 0,1%	Eosin	0,1 g
	ddH ₂ O	100 ml
	Eisessig	25 µl
Tris-EDTA, pH 9.0	ddH ₂ O	90 ml
	1M Tris	10 ml
	EDTA pH 9,0	2 ml
NPG	N-Propylgallat	0,3 g
	PBS (flüssig)	8 g
	Glycerol	20 g
Proteinkinase K c=20mg/l	Proteinkinase K	0,2 g
	ddH ₂ O	10 ml
0,1%Kernechtrot in wässriger 5% Aluminiumsulfatlösung	Kernechtrot	0,2 g
	Aluminiumsulfat	200 ml
	0,5%	
5% Aluminiumsulfatlösung	Aluminiumsulfat	5 g
	ddH ₂ O	1000 ml

Tabelle 8: Lösungen und Puffer

2.3 Methoden

2.3.1 Aortic Ring Assay

Präparation

Die Versuchstiere wurden durch einen Genickbruch getötet, über Pins an den vier Pfoten fixiert und die oberflächliche Haut mit 70% EtOH desinfiziert. Danach wurde ein median-sagittal Schnitt im kaudalen Abdominalbereich zwischen Haut und Peritoneum gesetzt (mediale Laparotomie bis zum Sternum) und das Fell bis über die Regio cervicalis (Halsbereich) abgezogen. Im nächsten Schritt wurde das Peritoneum angeschnitten und ohne Verletzung der darunter liegenden abdominalen Organe entfernt. Nach Entfernung der ventralen Thoraxwand und vor Entfernung der Lungen wurde die Aorta im gesamten Verlauf dargestellt. Zur Spülung des intraluminalen Blutes aus der Aorta wurden nach Eröffnungsschnitt im Bereich der kaudalen Aorta abdominalis 5-10 ml PBS in den apex cordis injiziert.

Nach der Spülung wurden die abdominalen Organe im Paket abgetragen, um die Aorta sauber zu entfernen, zunächst mit anliegendem Herzmuskel, um sie dann schonend bis in den Bereich der Aorta abdominalis zu präparieren. Danach wurde die Aorta thoracalis von unterhalb des Aortenbogens bis zur Aufteilung in die Arteriae iliacae präpariert. Weiter wurde die so entnommene Aorta thoracalis und Aorta abdominalis mit anliegendem Fett- und Bindegewebe in eisgekühltes, autoklaviertes PBS überführt und unter auflichtmikroskopischer Sichtkontrolle mechanisch von anliegendem perivaskulärem und adventitiellem Fettgewebe frei präpariert. Hierbei wurde darauf geachtet, keine Abschnitte der Adventitia zu beschädigen. Während der Präparation befand sich das Gewebe durchgehend in PBS, um ein Austrocknen zu vermeiden. Des Weiteren wurde die Aorta mithilfe eines Einwegskalpells in 1 mm dicke Ringe geschnitten (Kontrolle durch ein angelegtes Lineal) und sofort wieder in Eis gekühltes PBS überführt.

Kollagengel und setzen der Aortenringe

In weiteren zwei Schritten wurden die Aortenringe auf eine 48-Well-Platte überführt und zwischen jeweils zwei 200 µl umfassende Schichten Kollagengel eingebettet.

45 ml Kollagengel beinhalten:

H ₂ O	15,75	ml
MEM	4,5	ml
L-Glutamin	450	µl
Na-Pyruvat	450	µl
Purcol	18	ml
Na-Bicarbonat	2,25	ml
NaOH	180	ml
Pen Strep	180	µl

Tabelle 9.: Zusammensetzung des Kollagengels

Die Chemikalien wurden unter Eiskühlung und Vakuum-Entgasung zusammengegeben, um eine vorzeitige Polymerisation und Blasenbildung zu vermeiden.

Zunächst wurden die Ringe auf die untere Collagen-Schicht gesetzt, nachdem diese teilweise im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ anpolymerisiert (Polymerisationsdauer zehn Minuten) und leicht mit einer Präparationssonde angedrückt worden waren, um ein Kippen oder Abschwimmen der Ringe während der Folgeschritte zu verhindern. Daraufhin wurde die zweite Schicht blasenfrei auf den Ring pipettiert und anschließend auspolymerisiert (siehe oben (s.o.)). Nachdem die Polymerisation abgeschlossen war (sichtbar an Konsistenz und Trübung des Kollagens), wurden, je nach Versuchsansatz, verschieden zusammengesetzte Medien auf das Kollagen gegeben.

Kultivierung und Dokumentation

Die Kultivierung der Aortenringe erfolgte unter verschiedenen Bedingungen. Als Basis für das Medium, welches im Überstand auf das Collagen gegeben wurde, dienten 300 µl DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin (zur Vereinfachung wird im folgenden Text die Abkürzung DMEM für diese Zusammensetzung verwendet). Dieser Basis wurde je nach Versuchsansatz hinzugefügt:

Versuchsgruppe	Hinzugefügte Substanz
1 Unbehandelt	DMEM
2 Clodronat-Liposomen	DMEM + Clodronat-Liposomen (100 µM)
3 PBS-Liposomen	DMEM + PBS-Liposomen (100 µM)
4 E7080	DMEM + E7080 (25 nM, 1 µM, 10 µM)
5 VEGF	DMEM + VEGF (20 ng/ml)
6 E7080 + VEGF	DMEM + E7080 (25 nM) + VEGF (20 ng/ml)

Tabelle 10.: Versuchsgruppen der ARA-Kultivierungen

Der Medienwechsel (Überstand auf dem Collagen-Gel) mit den darin enthaltenen (siehe Tabelle 10) Faktoren erfolgte alle drei Tage. Die Dokumentation des Zellwachstums wurde über ein Phasen-Kontrast-Mikroskop (Leica, Germany), ausgestattet mit einer Digitalkamera (Leica, Germany), täglich durchgeführt.

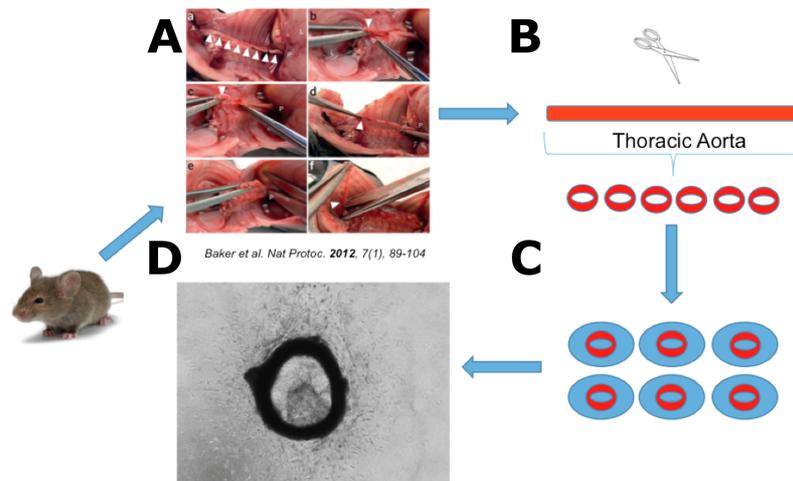


Abbildung 5: Präparationsschema ARA (modifiziert nach [191])

Zu Abb.5:

(A): Präparation der Mauseorta

(B): Schneiden der Ringe

(C): Einbettung in Kollagengel

(D): Phasen-Kontrast mikroskopische Aufnahme (10x), Kultivierung in Kollagengel

In einem ersten Versuchsdurchlauf wurden verschiedene Medien verwendet, um die optimalen Wachstumsbedingungen hinsichtlich Zellzahl und Sprouting festzulegen.

Hierzu zählten ECGM, DMEM, DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin.

Hierbei wurde die Versuchsdauer auf eine Zellkultur von elf Tagen festgelegt und das Nährmedium mit DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin angesetzt, da hier das maximale Wachstum zu erwarten war [192]. Die Auswahl wurde nach allgemeinen Kriterien hinsichtlich Wachstum, Vernetzungsgrad, Migrationsdistanz und Zellzahl im Gel getroffen.

2.3.2 Fixierung und Paraffineinbettung

Fixierung:

Nach elf Tagen Kultivierung wurde das überschüssige Medium auf den Aortenringen mit einem sterilen Sauger abgesaugt und die Zellen mit 4% neutral gepuffertem Paraformaldehyd (PFA) für 24 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Dieser Vorgang wird Immersionsfixierung genannt.

Paraffineinbettung:

Im nächsten Schritt wurde das PFA abgesaugt und die Kollagengele mitsamt den enthaltenen Aortenringen in beschriftete Einbett-Kassetten überführt. Die Kassetten standen über Nacht auf einem Rüttler in 70%-igem EtOH bei 4°C. Die Paraffineinbettung wurde mit einer Einbettmaschine, Tissue Processor 20, der Firma Leica Microsystems GmbH, durchgeführt. Die Kassetten wurden dabei für zwei Stunden in eine neue 70%-ige Alkohollösung eingelegt. Danach wurden die Präparate je zweimal 1,5 Stunden in eine 96%-ige Alkohollösung und anschließend dreimal 1,5 Stunden in eine 100%-ige Alkohollösung eingebracht. Darauf folgten zwei Gänge für eine Stunde und 1,5 Stunden in Xylol, um den Alkohol wieder auszuwaschen. Danach wurden die Kassetten zweimal für je drei Stunden in Paraffin eingelegt.

Herstellung von Gewebeschnitten:

Von den paraffinfixierten Geweben wurden 10 µm-Schnitte an einem Mikrotom (Leica SM2010R / Leica SM2000R) hergestellt. Jeweils drei Gewebeproben wurden auf einen silanisierten (Superfrost) Objektträger (OT) aufgezogen und über Nacht im Trockenschrank bei 30°C gelagert. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Objektträger in speziellen Kassetten mit entsprechender Beschriftung deponiert.

Zur Antigendetektion erfolgten Immunfluoreszenz- bzw. immunhistochemische Färbungen der entstandenen Paraffinschnitte. Die Auswahl der geeigneten Aortenringe für diese Färbungen erfolgte nach exemplarischen HE-Färbungen, um die Morphologie der Aortenexplantate zu untersuchen. Diese erlaubten eine erste Interpretation bezüglich der Gesamtheit des abgebildeten

Aortenrings und des „*sproutings*“ der aussprossenden Zellen in das umliegende Kollagengel.

2.3.3 Entparaffinierung und Präparation der Objektträger

Für den Entparaffinierungsprozess wurden die Objektträger in ein Sieb eingesetzt und für jeweils zweimal zehn Minuten in Xylol eingebracht, sodass die Gewebeschnitte komplett mit Xylol benetzt waren. Daraufhin wurden die Schnitte durch Einbringen in 100%-, 90%-, 80%-, 70%-igem EtOH und abschließend in Aqua dest. für jeweils fünf Minuten rehydriert.

Zur Markierung der Aortenringe wurden diese mit einem Diamantstift umrahmt, um das spätere Applizieren der Antikörper zu erleichtern.

In den nächsten Schritten fand die Epitop-Detektion nach dem jeweiligen Färbeprotokoll statt.

Die Schnitte wurden nach dem Färbeprozess mit Depex oder NPG eingedeckt und mit einem Deckglas versehen (Menzel-Gläser, 24x50mm).

2.3.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist die klassische Routinefärbung des histologischen Labors und dient unter anderem der Orientierung, Übersicht und ersten allgemeinen und morphologischen Analyse in mikrobiologischen Präparaten [193].

Hämatoxylin ist ein natürlich gewonnener Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Er muss zunächst zu Hämalan aufbereitet werden, um färbende Eigenschaften zu entwickeln. Saure/basophile Strukturen wie die in Zellkernen enthaltenen Nukleinsäuren werden durch Hämalan angefärbt. Hämatoxylin ist in der Histologie ein gebräuchlicher Kernfarbstoff [193].

Eosin ist ein synthetisch hergestellter, saurer Farbstoff. Basische/azidophile (eosinophile) Strukturen, wie Zellplasmaproteine werden durch Eosin rot angefärbt [193].

Paraffinschnitte müssen für die HE-Färbung zunächst entparaffiniert werden. Nach der Hämatoxylin-Färbung erscheinen die Zellkerne aufgrund des sauren pH-Wertes der Färbelösung zunächst rot-braun. Durch anschließendes Wässern mit Leitungswasser schlägt der Farbton durch die pH-Erhöhung zu dem für Hämatoxylin typischen blauviolett um. Nach der Hämatoxylin-Färbung folgt die zytoplasmatische Gegenfärbung durch Eosin. Nach weiteren Spülschritten unter Leitungswasser werden die Gewebeschnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert. Die Inkubation in einem organischen Lösungsmittel, wie Xylol, bewirkt die Klärung der Präparate. Schließlich können Gewebeproben mittels Entellan unter einem Deckglas konserviert werden. Die weitere Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur [193].

Färbeprotokoll:

Wie bereits beschrieben, wurden HE-Färbungen während dieser Arbeit zur Auswahl der Aortenringe für die folgenden Färbungen verwendet. Berücksichtigt wurden hierbei vor allem die strukturelle Erhaltung des Aortenrings und die Anzahl der im Kollagengel vorhandenen Zellen. Hierfür wurden vorrangig Aortenringe, welche denselben Kulturbedingungen bzw. Behandlungen unterlagen, untereinander verglichen, um repräsentatives Material zu verwenden.

Für die HE-Färbungen wurden murine Aortenexplantate (in Paraffin), mit einer Schichtdicke von 10µm, verwendet. Diese Präparate müssen vor Beginn des eigentlichen Färbeprozesses entparaffiniert werden. Hierzu wurden die Gewebepreparate über Xylol (2x für je zehn min.) in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-, 90%-, 80%-, 70%-iger EtOH) für jeweils fünf min. rehydriert. Anschließend erfolgte eine kurze Wässerung für ca. 5min. in dH₂O.

Für den Färbeprozess wurden die OT für zehn Minuten bei RT in Hämalaun nach Mayer eingelegt, folgend kurz mit dH₂O abgespült und dann für zehn Minuten unter fließendes Leitungswasser eingebracht. Eine anschließende Zwischenspülung erfolgte mit Aqua dest. Danach wurden die OT in eine wässrige 0,1%-ige Eosin-Lösung für zehn Minuten bei RT eingebracht. Daraufhin erfolgte kurzes Spülen mit dH₂O zum Abstoppen der Färbereaktion.

Anschließend folgte die Dehydrierung mit der aufsteigenden Alkoholreihe (70%-, 80%-, 90%-, 100%-iger EtOH) und zweimal zehn Minuten in Xylol, um den restlichen Alkohol auszuspülen. Zur Markierung der Aortenringe wurden diese mit einem Diamantstift umrahmt, um das spätere Pipettieren zu erleichtern. Die Gewebefixierung erfolgte mit Depex und die OT wurden mit einem Deckglas versehen (Menzel-Gläser, 24x50mm).

2.3.5 Kernechtrot

Kernechtrot färbt Zellkerne rot und wird bei der IHC-Färbung häufig als Hintergrundfärbung verwendet.

Für die Herstellung von Kernechtrot wurden 0,2 g Kernechtrot in 200 ml einer 5%igen Aluminiumsulfat-Lösung unter Rühren gelöst. Zur Herstellung der Aluminiumsulfat-Lösung wurden 50 g Aluminiumsulfat abgewogen und in 1000 ml dH₂O in einem Erlenmeyerkolben unter Rühren gelöst. Der Erlenmeyerkolben wurde mit einer Alufolie umwickelt und auf 56-60°C erhitzt. Daran anschließend wurde das Kernechtrot zur Lösung hinzugegeben. Die Lösung wurde mit Alufolie umwickelt und zum Abkühlen in einen Kühlschrank bei 4°C gestellt. Nach ca. zwei Wochen konnte die Lösung filtriert werden und war für ca. ein Jahr haltbar.

Für die Gebrauchslösung wurden 225ml Kernechtlösung abgemessen und mit 1-2 Tropfen Eisessig pro 100 ml angesäuert (1Tropfen entspricht ca. 25 µl).

Färbeprotokoll:

Kernechtrot-Färbungen erfolgten im Zuge der DAB-Färbung, um die Zellkerne darzustellen. Die 10 µm dicken murinen Aortaexplantat-Paraffinschnitte wurden nach der DAB-Färbung in PBS gestoppt und für ca. eine Minute in der Kernechtrot-Lösung gefärbt. Im nächsten Schritt wurden die Präparate für sieben Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert und nach der Dehydrierung (70% Ethanol 1min., 80% Ethanol 1min., 96% Ethanol 3min., 100% 2x 3min., Xylol 2x 5min) mit Depex eingedeckt und mit einem Deckglas versehen (Menzel-Gläser, 24x50mm).

2.3.6 Immunhistochemische Färbemethoden

Das grundlegende Prinzip bei der immunhistochemischen Färbung (IHC) beruht auf dem Mechanismus der Antigen-Antikörper-Reaktion. Verschiedene Zell-Typen oder pathologisch veränderte Zellen besitzen in der Regel sehr spezifische molekulare Oberflächenstrukturen, sogenannte Antigene. Diese bestehen bspw. aus Proteinen, Kohlenhydraten oder Lipiden. An bestimmte Anteile dieser Oberflächen, sogenannte Epitope, können ganz spezifische Primärantikörper binden. Bei der IHC-Färbung wird ein Primärantikörper mit besonders hoher Affinität zu dem zu untersuchenden Epitop verwendet. In einigen Fällen bindet dieser jedoch erst nach einer Vorbehandlung des Präparats (Demaskierung oder „*Antigen-Retrival*“). Die eigentliche Detektion erfolgt über einen mit einem Chromophor konjugierten Sekundärantikörper. Bei biotinylierten Sekundärantikörpern erfolgt der abschließende IHC-Schritt in Gegenwart eines entsprechend Enzym-gekoppelten Tertiärantikörpers. Eine solche Vorgehensweise wurde bei der DAB-Färbung angewendet.

Bei den verwendeten Antikörpern ist es wichtig, zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern zu unterscheiden. Um Antikörper für den Laborbedarf zu gewinnen, werden bspw. spezielle, nicht der jeweiligen Spezies angehörende Antigene in Tiere injiziert, die daraufhin, gegen das Antigen immunisiert, Antigen-spezifische Antikörper produzieren. Durch Blutentnahme und anschließende Aufreinigung kann der Antikörper für IHC-Untersuchungen genutzt werden. Man unterscheidet dabei zwischen monoklonalen und polyklonalen Antikörpern.

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, werden verschieden klassifiziert. Man unterscheidet IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. IgG stellt das am häufigsten im Menschen vorkommende Immunglobulin dar. Im Zuge der spezifischen Immunabwehr werden diese Antikörper von speziellen B-Lymphozyten (Plasmazellen) produziert und sezerniert. Sie werden gegen körperfremde Antigene gebildet und sind in der Lage ein Epitop der körperfremden Antigene zu erkennen und durch Bindung zu markieren (Opsonierung). Antikörper sind Glykoproteine und bestehen zum größten Teil aus Proteinen (82-96%) und zu

einem kleineren Teil aus Kohlenwasserstoffverbindungen (4-18%). In ihrer Grundstruktur setzen sich Antikörper aus zwei schweren und zwei leichten Polypeptidketten zusammen, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Schematisch dargestellt bildet ein Antikörper eine Y-ähnliche Form. Die leichten Ketten bilden zusammen mit Teilen der schweren Ketten das Fab-Fragment (Antigen bindendes Fragment) und stellen den verzweigten Teil des „Ypsilon“ dar. Innerhalb der Fab-Fragmente befindet sich eine Domäne, welche sich durch eine stark ausgeprägte Hypervariabilität auszeichnet (Antigen-bindende Region) und so zur Antikörpervielfalt beiträgt. Das untere Ende des „Ypsilon“ bildet das Fc-Fragment (kristallisierbares Fragment) und wird durch die schweren Ketten gebildet. Das Fc-Fragment vermittelt die biologische Aktivität des Antikörpers, z.B. durch Bindung an bestimmte Rezeptoren (Fc-Rezeptor an der Oberfläche von Makrophagen), durch Bindung von Komplement oder, wie in der vorliegenden Arbeit, durch Bindung von mit Chromophor- und Enzym-gekoppelten Zweitantikörpern.

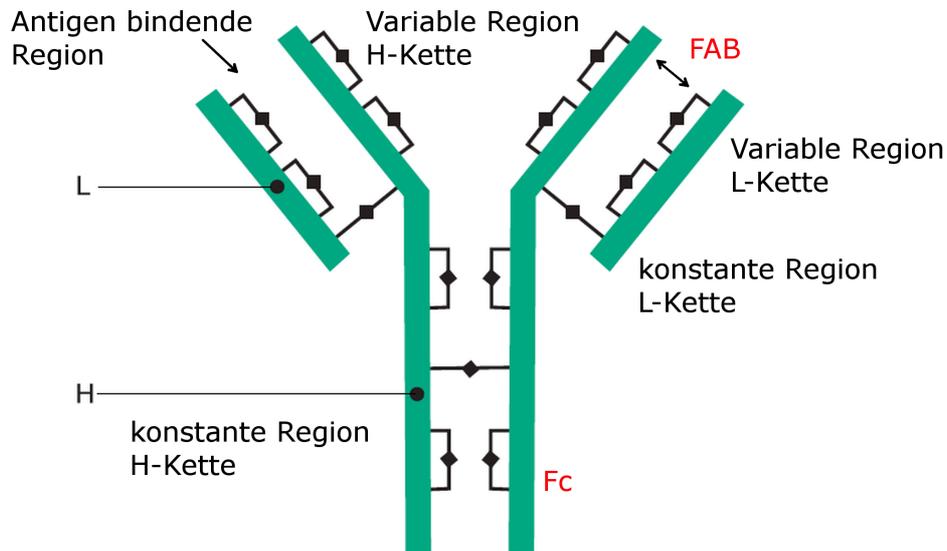


Abbildung 6: Schematische („Y-ähnliche“) Darstellung eines IgG-Antikörpers (Modifiziert nach [194])

Zu Abb.6:

Das FAB-Fragment bildet zusammen mit den Antigen-bindenden Regionen den oberen Anteil des Antikörpers, bestehend aus der variablen und konstanten Region der leichten Kette (L) und schweren Kette (H). Das Fc-Fragment stellt den unteren Anteil des Antikörpers dar, gebildet aus dem unteren Anteil der konstanten Region der schweren Kette (H). Die Ketten untereinander sind über Disulfidbrücken verbunden.

Polyklonale Antikörper sind gegen verschiedene Epitope des gleichen Antigens gerichtet. Sie werden durch Plasmazellen gebildet und besitzen eine geringere Antigen-spezifität als monoklonale Antikörper. Sie werden über Injektion von speziessfremden Antigenen in Tieren gewonnen.

Monoklonale Antikörper richten sich gegen ein spezifisches Epitop eines Antigens. Der monoklonale Antikörper entstammt nur einer Plasmazelle. Bei der Herstellung von monoklonalen Antikörpern wird eine solche Plasmazelle mit einer Myelomzelle fusioniert (Hybridom). Diese Hybridome werden kultiviert und zur Herstellung monoklonaler Antikörper genutzt.

Man unterscheidet zwei Methoden der IHC-Färbung. Bei der **direkten Methode** werden Antikörper direkt mit einem Enzym oder einem Fluorochrom gekoppelt. Für die Detektion fluoreszierender Antikörper wird ein Fluoreszenzmikroskop benötigt. Dabei wird das Gewebe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und so das Fluorochrom angeregt und infolge der daran anschließenden Lichtemission sichtbar gemacht.

Bei der **indirekten Methode** ist der sekundäre Antikörper gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet. Der Sekundärantikörper trägt das Chromophor oder das Enzym. Der Vorteil dieser Methode liegt in der besseren Intensität und Sensibilität der Färbung.

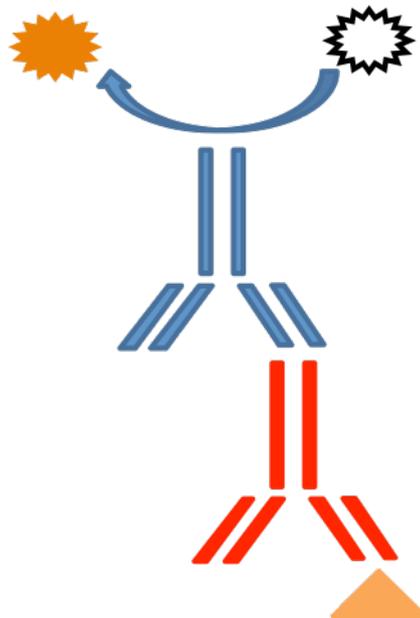


Abbildung 7: Indirekte Methode der IHC-Färbung (Modifiziert nach [195]).

Zu Abb.7:

Der Primärantikörper (**rot**) bindet an das gewebsspezifische Antigen (**orange**) [195] und ist über einen Sekundärantikörper (**blau**) an ein Chromophor (**schwarz**) gekoppelt. Durch Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wird das Chromophor zu einer Lichtemission angeregt. Diese Emission kann mikroskopisch sichtbar gemacht werden.

2.3.7 DAB-Färbung

3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) bildet ein in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln gelöstes braunes, unlösliches Reaktionsprodukt. Es war ursprünglich ein Substrat der Meerrettich-Peroxidase und bildet durch Oxidation ein braunes Präzipitat. Enzymatisch fungiert DAB in Gegenwart von H_2O_2 als Elektronendonator (R) gemäß der Reaktion $H_2O_2 + R \rightarrow 2H_2O + R$.

Um bei der DAB-Umsetzung in der IHC ein stärkeres Signal zu erhalten wurden in der vorliegenden Arbeit biotinylierte Sekundärantikörper (Biotinmoleküle/ Sekundärantikörper) verwendet (sog. ABC-Methode). Infolge der Biotinylierung interagieren so mehrere (max.4) Streptavidin-Peroxidase-Komplexe mit dem Sekundärantikörper (sog. Streptavidin-Biotin-Methode). So wurde eine verstärkte DAB-Umsetzung und damit Signalverstärkung des nachzuweisenden Antigens erreicht, mit gleichzeitiger Reduktion der Erst- und Zweitantikörper-Konzentration.

Diese Methoden nutzen die Affinität des Glykoproteins Avidin bzw. Streptavidin für Biotin aus. Das Avidin/Streptavidin ist seinerseits an ein Enzym gekoppelt, welches nach Zugabe eines chromogenen Substrats zu einem Farbumschlag führt. Ein häufig verwendetes Enzym ist die Meerrettich-Peroxidase nach der ABC-Methode. Bei der ABC-Methode wird ein biotinylierter Sekundärantikörper durch einen Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex markiert und der Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion schließlich durch das Chromogen 3,3-DAB braun dargestellt.

Das stabile Farbergebnis des Chromogens DAB ist ein unlösliches, stabiles, braunes Endprodukt am Ort der Reaktion und damit am Ort des Antigens [193].

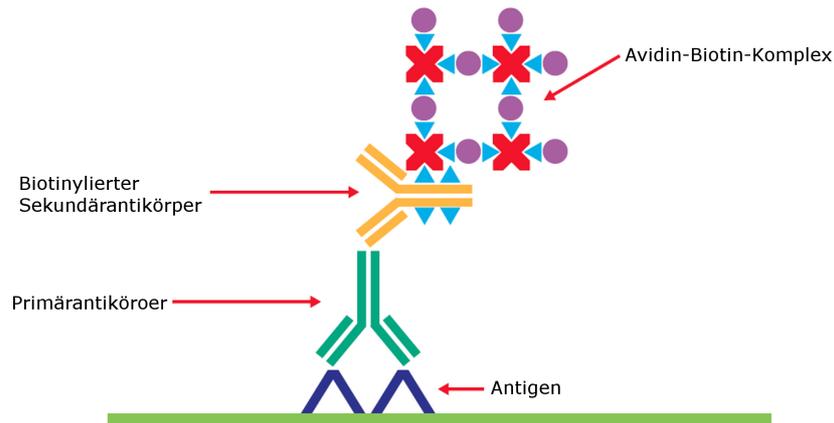


Abbildung 8: Indirekte Methode der DAB IHC-Färbung (Modifiziert nach [195]).

Zu Abb.8:

Der Primärantikörper (**grün**) bindet an das gewebsspezifische Antigen (**blau**) und ist über den biotinylierten Sekundärantikörper [159] mit dem Avidin-Biotin-Komplex (**lila/rot**) verbunden, an den letztlich das DAB bindet [194].

2.3.8 Fluoreszenz-Färbung

Neben der Immunhistochemischen- DAB-Färbung stellt die Immunfluoreszenz eine weitere Möglichkeit zur Detektion der Antigene/Epitope dar.

Hierbei dienen bestimmte Fluorochrome zur Markierung, sodass anschließend die Detektion unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich ist. Als Fluorochrom bezeichnet man ein spezielles Farbstoffmolekül, das eingestrahlte Energie in Form von Fluoreszenzlicht wieder abgibt und meist zur spezifischen Kontrastierung oder Markierung ausgewählter Einheiten in biologischen Objekten verwendet wird

2.3.9 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Immunfluoreszenz wird ein Fluorochrom über Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. In der Fluoreszenzmikroskopie erfolgt die Anregung durch Quecksilber- oder Halogendampflampen. Durch die Verwendung optischer Filter (Anregungsfilter) wird nur der Teil des Lichtes durchgelassen, der spezifisch für die Anregung des Fluorochroms ist. Der Wellenlängenbereich,

der vom Fluorochrom emittiert wird, wird vom Filter nicht durchgelassen. Ein Strahlenteller lenkt das gefilterte Licht auf das Präparat, das schließlich zur Fluoreszenz angeregt wird. Das vom Fluorochrom emittiert Licht wird über ein Okular dem Auge zugeleitet. Auch hier spielen spezifische Filter (Sperrfilter) eine wichtige Rolle. Insbesondere dann, wenn mehrere Fluorochrome zum Einsatz kommen. Für diese Arbeit wurde das Fluoreszenzmikroskop „Keyence BZ 9000“ mit verschiedenen optischen Filtern verwendet. Hierdurch war es möglich, Doppel-Immunfärbungen mit verschiedenen Fluorochromen zu analysieren.

Fluoreszenzfarbstoffe:

Indocarboncyanin (Cy3)	rot-fluoreszierend
Indocarboncyanin (Cy5)	rot-fluoreszierend (langwellig)
Streptavidin Alexa 488 (Cy2)	grünfluoreszierend

Tabelle 11: Fluoreszenzfarbstoffe

2.3.10 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Spezies	Reaktivität
CD31	abcam #ab28364	rb	m, rt, (h)
CD34	abcam #ab8158	rb	m
CD44	Biolegend #103002	rt	m, h
CD45	eBioscience #14-0451	rt	m
α SMA	abcam #ab5694	rb	m
F4/80	abcam #ab111101	rb	h, Nager
Oct-4	Millipore #AB3209	rb	m, h
Sox-2	abcam #ab79351	m	m, h
VEGF	abcam #ab46154	rb	m
Ki67	abcam #ab16667	rb	m
iNOS	abcam #ab15323	rb	m
Arginase	abcam #ab60176	gt	m
VEGFR-2	abcam #ab39256	rb	m

Tabelle 12: Antikörper, Spezies und Reaktivität

Antikörper	Konzentration 1. AK	Konzentration 2. AK	ABC- Komplex
CD31	1:200	1:250	1:250
CD34	1:50	1:250	1:250
CD44	1:400	1:250	1:250
CD45	1:100	1:250	1:250
α SMA	1:400	1:250	1:250
F4/80	1:100	1:250	1:250
Oct-4	1:400	1:250	1:250
Sox-2	1:200	1:250	1:250
VEGF	1:200	1:250	1:250
Ki67	1:50	1:250	1:250
iNOS	1:50	1:250	1:250
Arginase	1:100	1:250	1:250
VEGFR-2	1:200	1:250	1:250

Tabelle 13: Verwendete Antikörperkonzentrationen

Antikörper	PAP-Komplex	Entwicklungsdauer in Minuten	Demaskierungsmethode
CD31	nein	6	sauer
CD34	nein	11	sauer forciert
CD44	nein	10	sauer
CD45	nein	25	sauer forciert
α SMA	nein	10	sauer forciert
F4/80	nein	4	sauer
Oct-4	nein	11	-
Sox-2	nein	30	-
VEGF	nein	17	sauer
Ki67	1:250	25-30	sauer
iNOS	nein	10	sauer forciert
Arginase	nein	12	sauer forciert
VEGFR-2	nein	10	sauer forciert

Tabelle 14: PAP-Verstärkung, Entwicklungsdauer und „Antigen-Retrival“

2.3.11 Färbeprotokolle

1.Tag

1. Entparaffinierung
2. Blocken der endogenen Peroxidase (nur DAB)
3. Demaskierung und Blockierung
4. Primärantikörper

2.Tag

5. Sekundärantikörper
 - 5.1 Fluorochrom-konjugiert für anschließende Fluoreszenz-Färbung
 - 5.2 Biotinyliert für anschließende DAB-Färbung
6. Kernechtrot (DAB) oder DAPI (Fluoreszenz)
7. Eindecken in Depex (DAB) oder NPG (Fluoreszenz)

1. Tag

Bei der IHC-Färbung wurden die Objektträger zunächst mit einem Diamantstift markiert, um das spätere Pipettieren zu erleichtern. Nach der Entparaffinierung in zwei Xylol-Lösungen für jeweils zehn Minuten wurden die Schnitte in der absteigenden Alkohol-Reihe (zweimal für zehn min in Ethanol p.a., dann für jeweils fünf min in 96%-, 80%-, 70% Ethanol) rehydriert und im Anschluss in dH₂O für fünf Minuten gewaschen. Zur Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte anschließend in 3%-igem H₂O₂ für zehn Minuten bei RT auf dem Schüttler unter Lichtausschluss geblockt. Dies dient der Sättigung der Gewebeperoxidase durch Wasserstoffperoxid, die sonst eine Hintergrundfärbung verursachen könnte.

Der endogene Peroxidaseblock wurde nur bei der DAB-Färbung angewendet. Daraufhin wurden zwei weitere Waschschrte in Aqua dest. für jeweils fünf Minuten durchgeführt.

Zur Antigendemaskierung („*Antigen-Retrieval*“) erfolgten, jeweils abhängig vom verwendeten Primärantikörper, eine von zwei verschiedenen Kombinationen

aus thermischer und chemischer Demaskierung. Dies dient der Freilegung der Epitope, die nach einer Formalinfixierung verändert sein können (Maskierung). In der vorliegenden Arbeit wurden die Epitope nur sauer demaskiert.

Saure Demaskierung „normal“:

Schnitte in zehn mM Zitronensäure in Aqua dest. (pH 6,0) bei RT
Zitronensäure in der Mikrowelle zum Kochen bringen
Zweimal zehn Sekunden kochen, zwischen den kochende Schritten
20 Sekunden warten
30 Minuten in den vorgeheizten Brutschrank bei 97 C
zehn Minuten RT

Saure Demaskierung „forciert“:

Schnitte in zehn mM Zitronensäure in Aqua dest. (pH 6,0) bei RT
Zitronensäure in der Mikrowelle zum Kochen bringen
20 Sekunden kochen und im Anschluss eine Minute warten
Vorgang über sechs Minuten wiederholen und nach abgelaufener
Zeit
nochmals für 20 Sekunden aufkochen
20-30 Minuten bei RT abkühlen lassen

Im Anschluss an die Demaskierung wurde der Puffer fließend für fünf Minuten durch dH₂O ersetzt und dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die OT getrocknet und, ohne das Gewebe zu verletzen oder auszutrocknen, mit einem Fettstift umrandet, um ein Ineinanderfließen der Antikörper zu vermeiden.

Um unspezifische Reaktionen des Zweitantikörpers zu vermeiden, wurden die Schnitte mit einer 5%-igen Lösung (in PBS) des Serums des Zweitantikörpers für mindestens zwei Stunden bei RT geblockt. Nach dem Abziehen der Block-Lösung wurde über Nacht der Erstantikörper in Konzentrationen zwischen 1:50 und 1:500 aufgebracht. Verdünnungen wurden in einer 1%-igen Lösung des Serums des zweiten Antikörpers kombiniert mit 0,5%-igem BSA in PBS hergestellt. Die Inkubation des Antikörpers erfolgte über Nacht in einer feuchten Dunkelkammer bei 4 C. Das Kontrollgewebe zur Überprüfung

unspezifischer Reaktionen des zweiten AK wurde nochmals mit der Block-Lösung behandelt. Die Konzentrationen der Antikörper s.o..

2.Tag

Die Objektträger wurden zunächst mit einer PBS-Spritzflasche abgewaschen und anschließend für 3x5 Minuten in PBS auf der Rüttelplatte gewaschen. Währenddessen wurde der Avidin-Biotin-Komplex (ABC) in der gewünschten Konzentration (siehe Tabelle 13) angesetzt und unter Lichtausschluss in der Dunkelkammer zur Reaktion gebracht. Der Komplex wurde bei jedem Versuch so angesetzt, dass zeitlich mindestens 30 Minuten bis zum eigentlichen Gebrauch vorübergegangen sind, um die Komplex-Bildung zu gewährleisten.

Der AB-Komplex wurde nur für die DAB-Färbung benötigt.

Nach dem Waschvorgang wurde nun der **Sekundärantikörper** in 1%-igem Serum (Blockserum)/PBS verdünnt und für weitere 60 Minuten bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Reaktivität des Zweitantikörpers richtete sich gegen die Spezies des ersten Antikörpers. Die Konzentration des biotinylierten zweiten Antikörpers wurde zwischen 1:50 und 1:900 festgelegt. Nach der Inkubation wurde der nicht gebundene zweite Antikörper in drei Waschgängen für jeweils fünf Minuten in PBS abgewaschen.

Die **PAP-Methode** hat ihren Namen vom Peroxidase-Anti-Peroxidase Komplex und besteht aus zwei Antikörpern und drei Peroxidasemolekülen. Sie sorgt für eine Verstärkung der Antikörper. Die Inkubation mit PAP erfolgte nach der Inkubation der Sekundärantikörper für 60 Minuten bei RT. Nach der PAP-Verstärkung wurden die Gewebepreparate mit dem ABC für 30 Minuten in der feuchten Dunkelkammer inkubiert.

Im Anschluss wurde der überschüssige Komplex zweimal für fünf Minuten in PBS und zuletzt für fünf Minuten in PB-Puffer unter Lichtausschluss gewaschen, da PBS durch seine Salze die DAB-Reaktion behindern würde.

Während dem letzten Waschvorgang wurde die DAB-Entwicklungslösung in einer lichtundurchlässigen Hellendahl-Küvette angesetzt.

Um die Reaktion nicht zu früh zu starten, wurden erst kurz vor der Entwicklung 225 µl der Glukose-Oxidase hinzugegeben.

Die Entwicklungsreaktion lief maximal 30 Minuten ab und wurde unter einem Lichtmikroskop während der Reaktion überprüft.

Nach vollendeter Entwicklung wurden die OT in eine mit PBS gefüllten Küvette überführt und so die Reaktion abgestoppt.

Im Anschluss erfolgte eine Waschung in PBS für 3x5 Minuten, anschließend eine Waschung in dH₂O und Gegenfärbung der unspezifischen Strukturen für eine Minute in Kernechtrot oder fünf Minuten in Hämalaun. Anschließend wurden die Schnitte in dH₂O gewaschen.

Bevor die OT mit Depex eingedeckt wurden, fand eine Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96% für jeweils eine Minute, 2x 100% für jeweils drei Minuten) mit anschließendem Gang in Xylol (2x jeweils fünf Minuten) statt.

Im Anschluss an die abgeschlossene Färbung erfolgten die Dokumentation und Digitalisierung der Ergebnisse. Die Lagerung der OT erfolgte bei RT.

Immunfluoreszenz

Bei der Fluoreszenzfärbung wurden Sekundärantikörper verwendet, die direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt sind, oder biotinylierte Sekundärantikörper, die in einem weiteren Schritt mit einem Fluorochrom gekoppelt werden. Die Gewebeschnitte wurden bei einer Immunfluoreszenzfärbung nicht entwässert und deshalb nach einer DAPI-Kern-Gegenfärbung (5µl DAPI in der Verdünnung 1:5000) mit NPG eingedeckt. Um ein Austrocknen der Gewebe zu verhindern, wurden die Deckgläser mit Nagellack umrandet. Die Lagerung der Gewebeschnitte erfolgte im Dunkeln bei 4-8°C.

2.3.12 Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Bei den Doppel-Immunfärbungen wurden zwei Antigene auf einem Gewebeschnitt als Doppel-immunfluoreszenz-Färbung dargestellt.

2.4 Auswertung

2.4.1 Mikroskopie

Die auflichtmikroskopischen Auswertungen, sowie die Auswertungen der mehrfach mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Schnitten wurden mit Hilfe eines invertierten Fluoreszenz-/Phasenkontrastmikroskops (Keyence BZ-9000) durchgeführt. Dabei wurden die Objektive (Nikon) zur 10x-, 20x- und 40x-fachen Vergrößerung verwendet. Mehrfachfärbungen konnten mittels „BZ-Analyser II“ übereinander gelagert werden („merge“) und auf mögliche Kollokalisierungen überprüft werden.

2.4.2 Statistische Auswertung

Die Daten wurden semiquantitativ an DAB-gefärbten Schnitten erhoben und in Excel-Tabellen zusammengefasst. Hierbei werden im Folgenden Zellen, welche Färbungen der jeweiligen Marker zeigten, als „positiv“ (+) und solche ohne entsprechende Färbung als „negativ“ (-) bezeichnet.

Die Dokumentation umfasste das Verhältnis von gefärbten (positiven) zu nicht gefärbten (negativen) Zellen im Bereich des ursprünglichen Kollagengels. Weiterhin wurde das Verhältnis von gefärbten (positiven) Zellen in Endothel, Subendothel, Media und Adventitia zur Gesamtfläche der Media des jeweiligen Aortenrings bestimmt. Die allgemeine Zelldichte und Anzahl der ausgesprossenen Zellen, sowie die Entfernung der Zellen zum adventitiellen Gewebe des Gefäßes wurden ebenfalls erfasst. Der Ringumfang wurde mithilfe des Programmes *Image J* bestimmt. Hierbei wurde der Größenstandard mithilfe von Skalierungsbalken der Größe 100 µm festgelegt. Die Flächenmessung der Media erfolgte nun durch Nachziehen der äußeren und inneren Mediabegrenzung. Speicherung der Daten und Subtraktion der Flächen $\{(Aortenring + Aortenlumen) - Aortenlumen\}$ erfolgte mittels Excel-Tabellen.

Da einzelne „cell count“-Ergebnisse optisch mit den zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten nicht zu erfassen waren, wurden mit *Image J* über die Bearbeitung mittels *Threshold* durchgeführt und in genau definierten

Arealen die Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse wurden ebenfalls in Excel-Tabellen festgehalten.

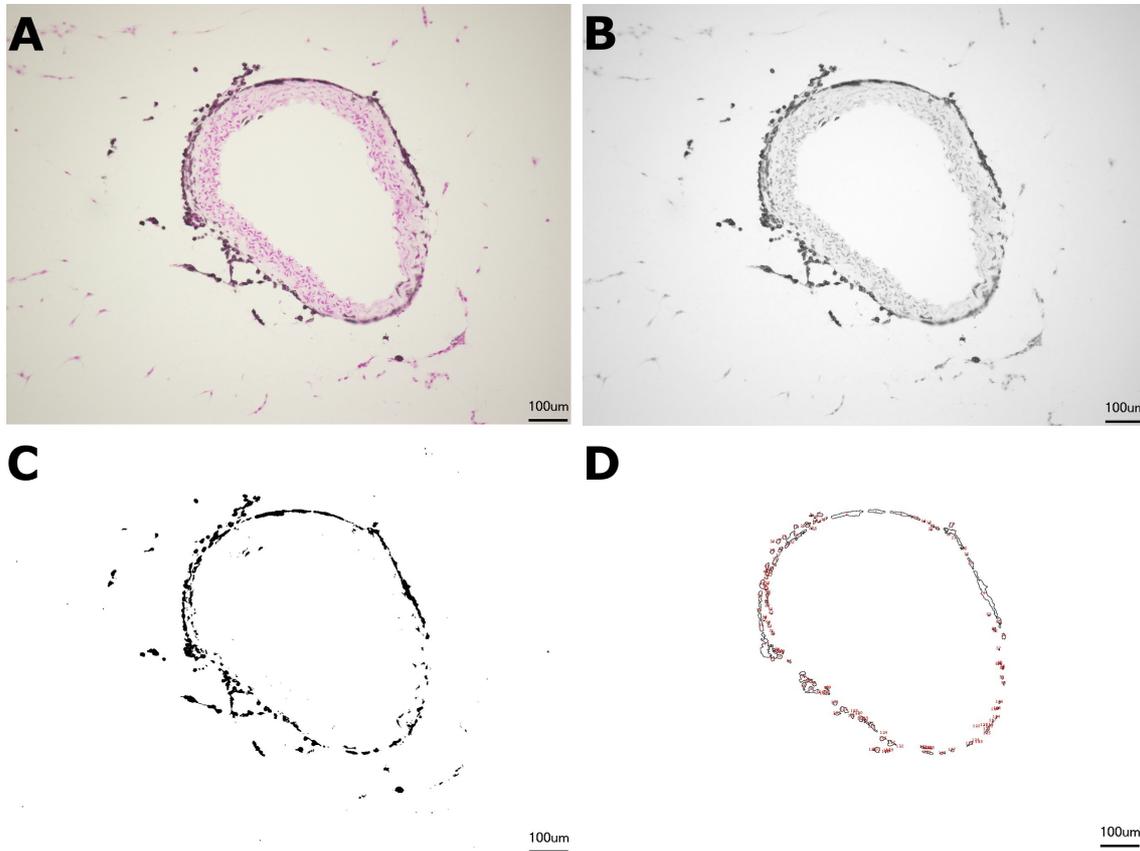


Abbildung 9: Bildbearbeitung mit der Threshold-Funktion des Programmes *Image J*.

Zu Abb.9:

(A): Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines Aortenrings nach elf Tagen Kultivierung

(B): Kontrasterhöhung durch Schwarz-Weiß-Färbung

(C): Kontrasterhöhung durch *Image J* zum Ausblenden der Hintergrundfärbung und isolierte Darstellung der immunhistochemisch detektierten Zellen.

(D): „Cell-Count“ durch das Programm *Image J*

Bei der statistischen Messung der positiven Zellen im intimalen Bereich wurden auf Grund der wiederholt feststellbaren Auflösung der Endothel-Struktur Streckenmessungen durchgeführt. Dies wurde ebenfalls mit *Image J*, nach

vorherigem Festlegen des Größenstandards, anhand der 100 µm-Skalierung erhoben. Als Relationswert wurde der innere Ringumfang der Media gemessen. Die Entfernungen zur Adventitia, der äußersten Ringkontur (Kontur der Mediagrenze), wurde mit Hilfe des Programmes *Gimp* (Gnu Image Manipulation Program, Copyright 1995-2013 Spencer Kimball, Peter Mattis) festgelegt. Hierbei wurden Ringe mit einer Entfernung zur Adventitia von 100, 200 und >200 µm festgelegt. In diesen Bereichen wurden im Folgenden die Zellzahlen ermittelt.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms *Statistica DE*. Bei dieser Auswertung wurden die entsprechenden Daten mittels Quantile-Quantile-Plot auf Normalverteilung getestet. Bei Normalverteilung wurde der t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, um auf signifikante Unterschiede zu testen.

Wurden die Daten als nicht normal verteilt klassifiziert, wurde der *Willcoxon*-Test für gepaarte Stichproben angewandt.

Ein signifikanter Unterschied wurde dann beschrieben, wenn ein p-Wert > 0,05 erzielt wurde.

Die graphischen Darstellungen wurden mit Hilfe des Programms *Prism 6 for Mac OS X* (Version 6.0f (Trial) August 5, 2014 Copyright 1994-2014 Graphpad Software, Inc. All rights reserved) erstellt.

3. Ergebnisse

Alle im Ergebnisteil aufgeführten Bilder zeigen ein repräsentatives Bild der durchgeführten Versuche. Jeder aufgeführte Antikörper wurde an unterschiedlichen Aortenexplantaten (Anzahl=n) von unterschiedlichen Versuchstieren angewendet. Die Bezeichnung ARA, ARA+CI-L, ARA+PBS-L, ARA+Len beschreibt ARA mit verschiedenen Behandlungsoptionen und in allen hier beschriebenen Versuchsvarianten beträgt die Versuchsdauer mit der Kultivierung vor aortalen Ringen über elf Tage. Die Abkürzung FIA steht für frischisolierte Aortenringe, die ohne weitere Kultivierung fixiert und für die Herstellung von Gewebeschnitten in Paraffin eingebettet wurden.

3.1 Aussprossungsaktivität der Mauseorta

Die Kultivierung der Aortenringexplantate im Kollagengel zeigte ein sehr gutes Wachstum der in das Kollagengel aussprossenden Zellen (Abbildung 10/B). Die hier durchgeführten Versuche zeigten, dass es nach dem elften Tag der Kultivierung zu keiner weiteren signifikanten Zunahme des Zellwachstums der in das Kollagen aussprossenden Zellen kam. Der Abstopzeitpunkt der Experimente wurde auf den Kulturtag elf der Versuchsreihen festgelegt, da die Kulturdauer von elf Tagen sich in Vorexperimenten als ausreichend erwies, um die Aussprossungsprozesse zu studieren bzw. *in vitro* zu modulieren.

Mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops wurde die Aussprossungsaktivität beobachtet (Abbildung 10/A, B), dokumentiert und später ausgewertet. Zudem wurden HE-Färbungen an Paraffinschnitten der Mauseorta vor und nach dem „Ringassay“ angefertigt (Abbildung 10/C, D), um die Zahl der ausgesprossenen Zellen und deren Vernetzung bzw. kapillarähnlichen „Tube“-Bildung beurteilen zu können.

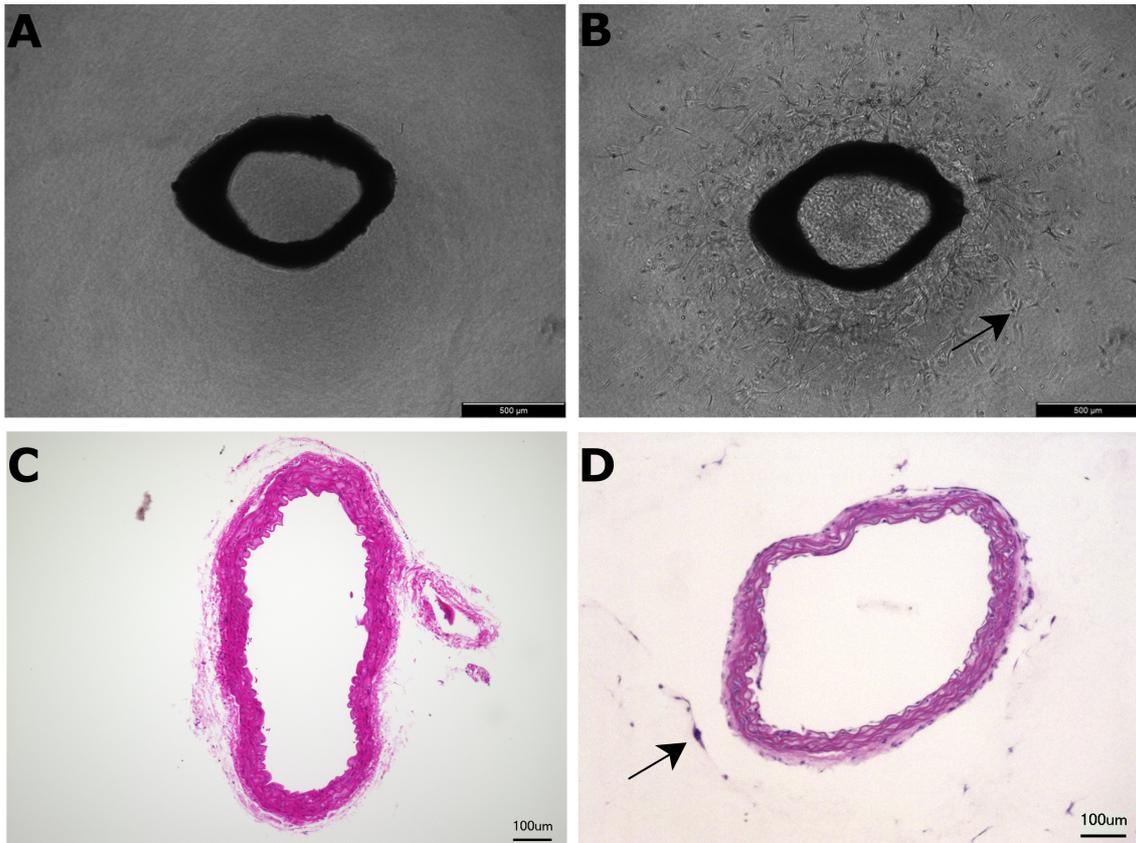


Abbildung 10: Aortales „*Sprouting-Assay*“ in Kultur ohne weitere Behandlung (A/B) und nach HE-Färbung, ohne weitere Behandlung (C/D)

Zu Abb.10:

Die schwarzen Pfeile markieren ausgesprossene Zellen nach der Kultivierung für elf Tage ohne weitere Behandlung (ARA)(B) und in HE-Färbung (D) nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung.

(A/B): Situation am ersten Kultivierungstag (A) und nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (B) unter Auflichtmikroskopie. Auf der extraluminalen Seite des murinen Aortenrings ist nach elf Tagen ein progressives Zellwachstum zu verzeichnen. Die extraluminalen Zellen (Pfeil) weisen starke Vernetzungen auf („*cord-like-structures*“). **Größenstandard=500µm.**

(C/D): Gegenüberstellung der HE-Färbungen an Aortenschnitten am ersten Kultivierungstag (C) zur Kultivierung für elf Tage (D). Bild D zeigt eine teilweise aufgelöste endotheliale Barriere. Der Pfeil weist auf eine extraluminal, ausgesprossene Zelle. **Größenstandard=100µm.**

3.2 Stammzellmarker und Gefäßwand-residente Stammzellen

Die Gefäßwand besteht, wie unter 1.4.2 beschrieben, aus drei Schichten. Der Tunica intima, der Tunica media und der äußersten Tunica adventitia. Zwischen den einzelnen Schichten wurden Nischen beschrieben, in denen Stamm- und Progenitorzellen vorhanden sind [8-12]. Basierend auf ihrem Protein-Expressionsmuster wurden unterschiedliche Populationen von VW-SCs nachgewiesen. Bspw. zählen CD34(+)-, VEGFR-2(+)-Zellen in der vaskulogenen Zone zu der Zellgruppe, die sich zu Endothelzellen und glatten Muskelzellen differenzieren können [133]. Diese Nischen wurden in dieser Arbeit an murinen „*fresh isolated*“-Aorten nachgewiesen.

Bei diesen Versuchen wurde ein deutlicher und klar definierter CD34(+)-Bereich registriert, der sich sowohl in der Adventitia großer (Aorta), als auch kleinerer Gefäße (Interkostalarterien) befindet (Abbildung 11/a). Der VEGFR-2(+)-Bereich konnte in den Gefäßen mit einem sehr ähnlichen Expressionsmuster wie für den Marker CD34 nachgewiesen werden (Abbildung 11/b).

Diese Zone wurde, in Übereinstimmung mit der bereits publizierten Arbeit von Zengin et al., in dieser Arbeit als „vaskulogene Zone“ festgelegt [196]. Die „*fresh isolated*“-Aorten wurden zunächst auf die Antigene Oct-4 und Sox-2 getestet, beides Transkriptionsfaktoren, welche für die embryonale Entwicklung wichtig sind und für potentielle Pluripotenz von Zellen herangezogen werden. Sox-2 ist hierbei der essentielle Transkriptionsfaktor, welcher für die Aufrechterhaltung von undifferenzierten, embryonalen Stammzellen nötig ist. In der Diskussion steht [197], dass Sox-2 die Expression von Oct-4 kontrolliert. Das Oct4-Gen codiert für den Transkriptionsfaktor, welcher in bestimmten Bereichen exprimiert wird, in denen sich später fötales Gewebe aufbaut. Die adulte Expression von Oct-4 wird nur in adulten Keimzellen beschrieben. Die immunhistochemischen DAB-Färbungen auf diese beiden Antigene waren für Oct-4 im sub-endothelialen und leicht im adventitiellen Bereich der Aortenwand positiv (Abbildung 11/d). Sox-2 zeigte hingegen eine intimale, wenn auch schwache Färbung (Abbildung 11/c). Während eine gewisse Kreuzreaktivität nicht absolut ausgeschlossen werden kann, könnten auch diese Befunde

daraufhin deuten, dass die Stammzellen in der vaskulären Adventitia aus der embryonalen Zeit herrühren können.

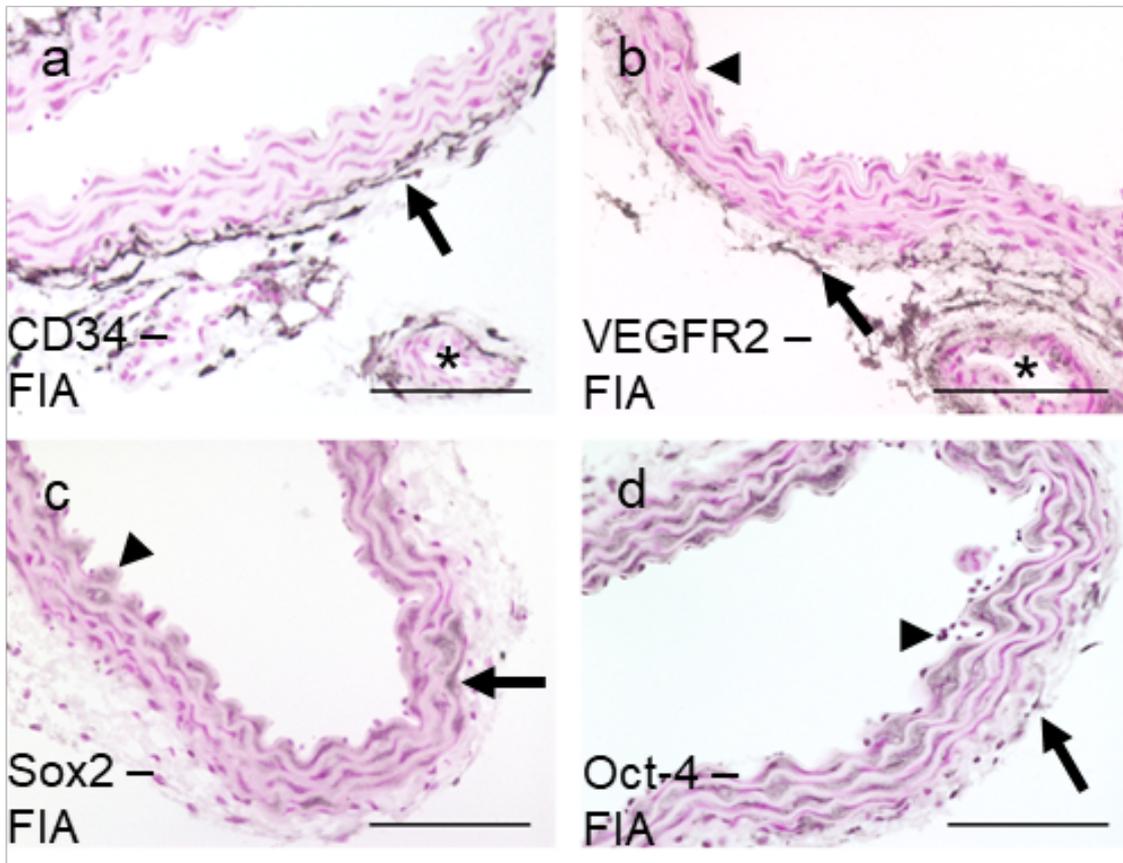


Abbildung 11: Färbeprofil gegen CD34 (a), VEGFR-2 (b), Sox-2 (c) und Oct-4 (d) an frisch isolierten Aortenexplantaten ohne weiterer Behandlung (FIA)

Zu Abb.11:

Die Pfeile zeigen auf positive Zellen im adventitiellen Bereich, die Pfeilköpfe auf positive Zellen im intimalen Bereich der Aortenringe.

(a) zeigt eine deutliche und klar definierte Färbung gegen das Antigen CD34 in der Adventitia der Mauseorta und der anliegenden Interkostalarterie (*). n=4 Wiederholungen

(b) zeigt ein sehr ähnliches Expressionsmuster gegen das Antigen VEGFR-2 wie a. n=3

(c) zeigt eine vergleichsweise schwache Färbung gegen das Antigen Sox-2. n=3

(d) zeigt ein zu (c) vergleichbares Färbeprofil gegen das Antigen Oct-4. n=3
Größenstandard =100µm

3.3 Expression vaskulärer Marker CD31 und α -SMA

Um die Differenzierungskapazität der Stammzellen zu überprüfen wurden die elf Tage kultivierten Aortenring-Explantate gegen den Endothelzellmarker CD31 und den glattmuskulären Marker α -SMA gefärbt und im Verhältnis mit FIA betrachtet. Im Vergleich zu FIA (Abbildung 12/a) zeigte die Intima der Aorta nach „Ringassay“ (Abbildung 12/b) eine stark aufgelockerte endotheliale Schicht mit deutlich weniger Endothelzellen. Es ist anzunehmen, dass ein Teil der Endothelzellen sich während des „Ringassays“ von der Wand abgelöst hat und in das Kollagengel im Lumen der Aorta eingewandert ist. Zudem wurden nach „Ringassay“ (Abbildung 12/b) CD31(+) Zellen auch in der äußeren Begrenzung der Aortenwand gefunden (Pfeilkopf). Die Immunfärbung für α -SMA zeigte, dass nach „Ringassay“ zahlreiche ausgesprossene Zellen für α -SMA positiv werden (Abbildung 12/d).

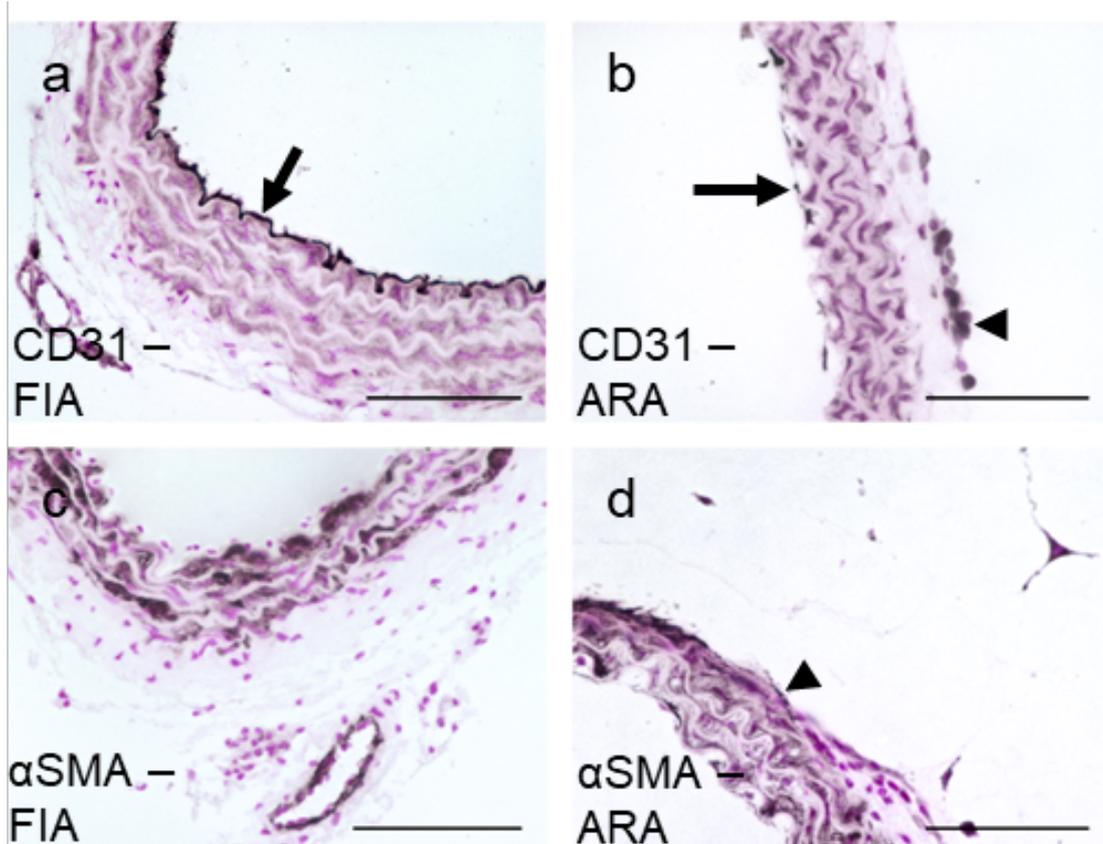


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung für CD31 und α -SMA nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen

Zu Abb.12:

Die Pfeile zeigen auf positiv gefärbte endotheliale Zellen, die Pfeilköpfe zeigen auf positiv gefärbte adventitielle Zellen.

(a/b): Gegenüberstellung des CD31(+) Färbeprofiles von frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**CD31-FIA/n=3**) zu Aortenringen nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**CD31-ARA/n=5**). In Bild b ist der endotheliale Verband teilweise von der Intima abgelöst. Zusätzlich erscheinen CD31(+) Zellen nun auch im adventitiellen Bereich.

(c/d): Gegenüberstellung des α -SMA(+) Färbeprofiles von frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**α -SMA-FIA/n=3**) zu Aortenringen nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**α -SMA-ARA/n=4**). Die Färbung für α -SMA in der Tunica media ist in Bild c und d nahezu identisch. In Bild d erkennt man zusätzlich α -SMA(+) Zellen außerhalb des Aortenringes im umliegenden Kollagengel.

Größenstandard =100 μ m.

3.4 Generierung von Makrophagen aus den Gefäßwand-residenten Stammzellen

Zu Beginn dieser Dissertationsarbeit war bekannt, dass aus den VW-SCs, Zellen vom nicht-vaskulären Typ, wie z.B. Makrophagen, generiert werden können [9, 11, 14, 125, 198]. Allerdings war bisher unbekannt, ob und gegebenenfalls welchen Einfluss solche Zellen auf die angiogenetische Aussprossungsaktivität der Gefäßringe ausüben können. In ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass Zellen, die für den Makrophagenmarker F4/80 positiv sind, aus der Wand der Mauseorta aussprossen (Abbildung 13/b). Da F4/80 ein Antigen auf der Oberfläche reifer phagozytierenden Makrophagen ist, wurden Zellen mit positivem Expressionsmuster für F4/80 als Makrophagen definiert.

Ein weiteres Ergebnis der immunhistochemischen Untersuchungen zeigte die Generierung von Zellen, die in der Immunfärbung unter Verwendung entsprechender Antikörper für die Antigene iNOS und Arginase-1 positiv werden (Abbildung 13/d,f). Speziell in adventitiellen und subendothelialen Zonen der Mauseortenwand wurde eine Vielzahl an F4/80(+) Makrophagen nachgewiesen (Abbildung 13/b). Dies war besonders auffällig, da bislang nur das Knochenmark als einzige Quelle für Monozyten und Makrophagen galt. Zudem zeigten Gewebsschnitte der FIA vereinzelt bis keine vorhandenen F4/80(+) Zellen, also reife Makrophagen in besagten Bereichen (Abbildung 13/a). Analysiert wurden die Makrophagen also insgesamt, mittels immunhistochemischer DAB-Färbungen unter Verwendung makrophagenspezifischer Antikörper wie F4/80 als allgemeinem Makrophagen-Marker, Arginase-1 für Typ M1- und iNOS für Typ M2-Makrophagen (Abbildung 13). Bei den Färbungen konnten sehr ähnliche Färbeprofile reproduziert werden. Die hierbei erhobenen Befunde deuten darauf hin, dass sowohl pro- [159] als auch anti-inflammatorischen Makrophagen während einem „Ringassay“ aus der Aortenwand generiert werden können.

Im weiteren Verlauf des Projektes und auf Grund der vielfältigen Wirkungen von Makrophagen auf ihre Umgebung in sowohl inflammatorischen als auch anti-inflammatorischen Prozessen wurde die Zielsetzung der Arbeit dahin

gehend ausgerichtet zu identifizieren, welche adventitiellen Stammzellen sich zu Makrophagen differenzieren und welchen Einfluss sie selber wiederum auf die vaskulogene Zone ausüben. Ein besonderer Aspekt sollte dabei auch auf die Rolle von VEGF, dem wichtigsten pro-angiogenetischen Faktor gelegt werden, der bekanntlich unter anderem von Makrophagen sezerniert wird. Um nun die genaue Wirkung von adventitiellen Makrophagen zu untersuchen, wurden in weiteren Experimenten die *ex-vivo* „*sprouting assays*“ mit Clodronat behandelt, das bekanntlich zu einer spezifischen Depletion von phagozytierenden Zellen führt (Kap.1.6).

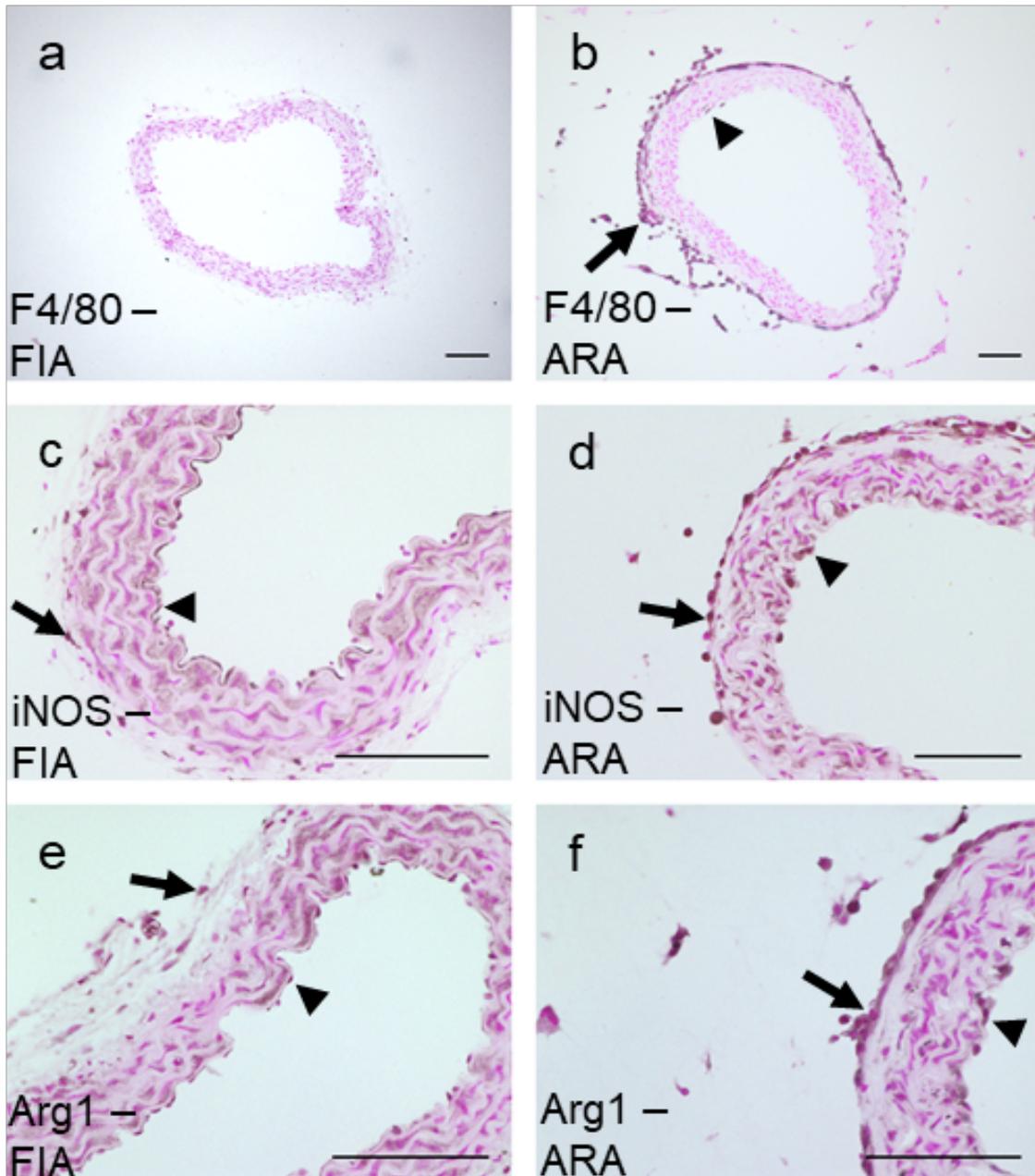


Abbildung 13: Generierung von Makrophagen im „Aortic Ring Assay“ (ARA)

Zu Abb.13:

Die schwarzen Pfeile zeigen auf positive Zellen im adventitiellen Bereich. Die schwarzen Pfeilköpfe zeigen auf positive Zellen im intimalen/ endothelialen Bereich.

(a/b): Gegenüberstellung der F4/80(+) Zellen an frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**F4/80-FIA/n=4**) zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne weitere Behandlung (**F4/80-ARA/n=4**).

(a): Keine F4/80(+) Zellen an FIA erkennbar

(b): Deutliches Expressionsmuster des F4/80 Antigens an adventitiellen und in das Kollagengel aussprossenden Zellen nach ARA.

(c/d): Gegenüberstellung der iNOS(+) Zellen an frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**iNOS-FIA/n=3**) zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne weitere Behandlung (**iNOS-ARA/n=3**).

(c): Vereinzelt positive Zellen für das Antigen iNOS in intimalen und adventitiellen Strukturen an FIA.

(d): Progression der iNOS(+) Zellen sowohl im adventitiellen Bereich als auch im intimalen Bereich nach ARA.

(e/f): Gegenüberstellung der Arginase-1(+) Zellen an frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**Arg1-FIA/n=1**) zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne weitere Behandlung (**Arg1-ARA/n=3**).

(e): Vereinzelt Arginase-1(+) Zellen in intimalen und adventitiellen Strukturen an FIA.

(f): Deutliches Expressionsmuster des Arginase-1 Antigens an adventitiellen, intimalen und in das Kollagengel aussprossenden Zellen nach ARA.

Größenstandard =100µm

3.5 Makrophagendepletion im aortalen „*Sproutingassay*“

Durch die Behandlung der im „*Sproutingassay*“ verwendeten Aorten-Explantate mit Clodronat konnten die neu entstehenden, phagozytierenden Zellen depletiert und damit ihr Einfluss auf die „*Sprouting-Aktivität*“ und die Morphologie kapillarähnlicher Aussprossung, sowie auf ihre zelluläre Zusammensetzung studiert werden. Um auszuschließen, dass die Liposomen, mittels derer das Clodronat appliziert wurde, an sich eine Wirkung auf die aussprossenden Zellen ausüben, wurde bei jedem Versuchsansatz als Negativkontrolle eine Gruppe von Aortenringen mit PBS gefüllten Liposomen behandelt.

Um die Depletion der F4/80(+)-Zellen im Hinblick auf Signifikanz zu überprüfen, wurde eine Statistik angefertigt, welche die Anzahl der F4/80(+)-Zellen in der jeweilig zu bestimmenden Zone (Endothel/ Subendothel/ Adventitia/ Kollagengel) im Verhältnis zum Gefäß-Ringumfang setzt. Die F4/80(+) Zellen im umliegenden Kollagengel wurden gezählt und mit der Gesamtzahl der ausgesprossenen Zellen in Verhältnis gesetzt. Es wurden alle Versuchsansätze miteinander verglichen und auf Signifikanz geprüft.

Mittels der statistischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass nahezu 100% der Makrophagen in der Adventitia und im umliegenden Kollagengel durch die Clodronat-Behandlung depletiert wurden (Abbildung 15/c, d).

Im subendothelialen Bereich zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen innerhalb des Aorten-„*Ringassays*“ (Abbildung 14/b, d; Abbildung 15/b). Dies könnte damit zusammenhängen, dass dieser Bereich, im Gegensatz zu der Adventitia nicht von einer ausreichenden Menge (jedenfalls nicht in einer ausreichend effizienten Menge) an Clodronat erreicht wurde. Die in das Kollagengel eingewanderten F4/80(+)-Zellen konnten ebenfalls depletiert werden und es zeigten sich nach der Kultivierung mit Clodronat-Liposomen keine F4/80(+) Zellen mehr um den Aortenring und im Kollagengel (Abbildung 14/d; Abbildung 15/c, d). Die Daten stammen von $n \geq 3$ Versuchen. Signifikante Ergebnisse wurden markiert (***) ab einem Wert von $p \leq 0,05$.

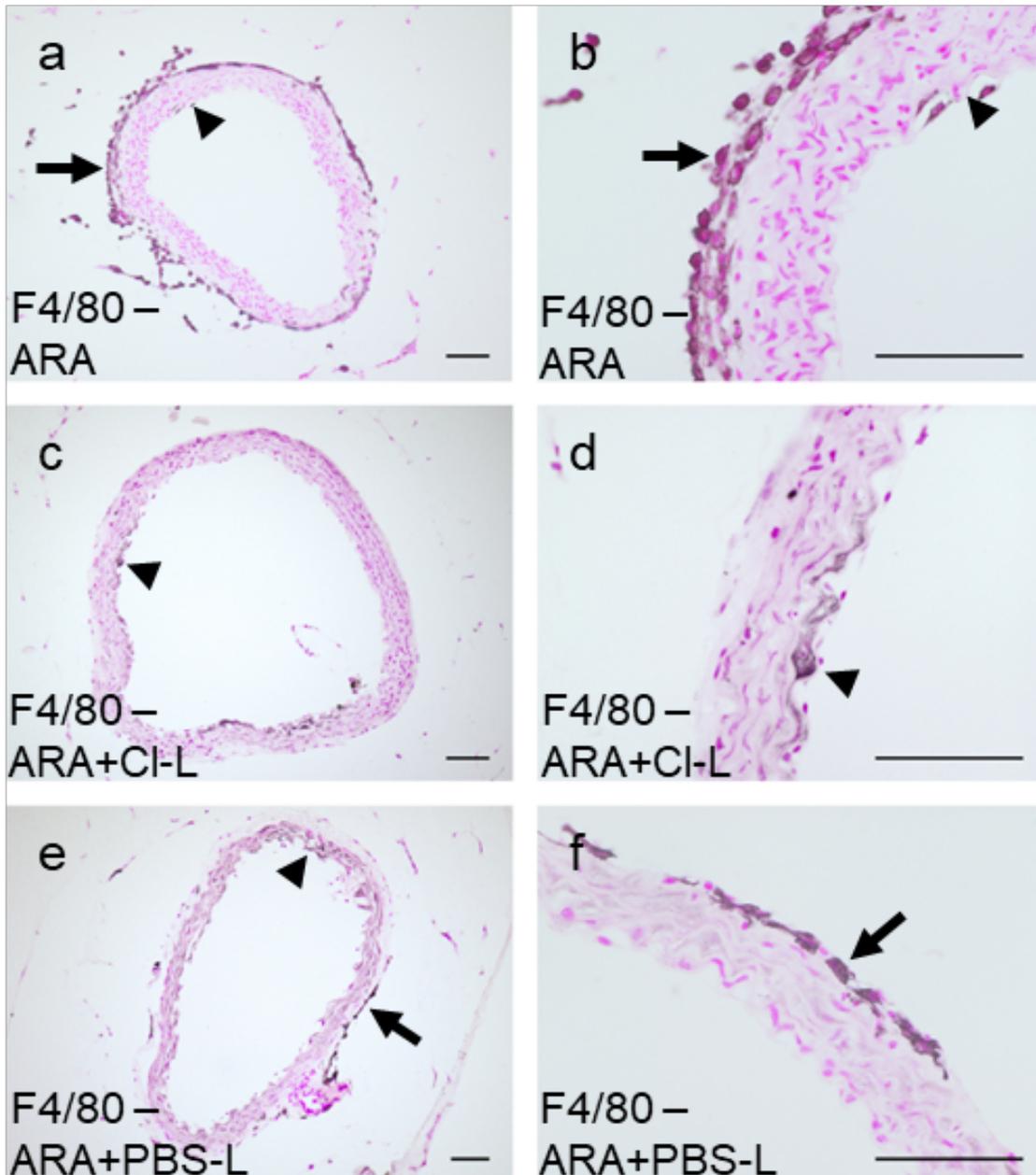


Abbildung 14: Makrophagendepletion via Clodronatliposomen

Zu Abb.14:

Die Pfeile zeigen auf adventitielle F4/80(+) Zellen, die Pfeilköpfe auf intimale/subendotheliale F4/80(+) Zellen.

(a/b): Expressionsmuster für das Antigen F4/80 nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**F4/80-ARA/n=4**). Ein deutliches Expressionsmuster für sowohl adventitielle, als auch intimale Zellen ist zu erkennen. Auch in das Kollagengel ausgesprossene Zellen sind positiv für F4/80.

(c/d): Expressionsmuster für das Antigen F4/80 nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**F4/80-ARA+Cl-L/n=4**). Es zeigt sich eine nahezu vollständige Depletion des F4/80 Färbeprofils. Vereinzelt F4/80(+) Zellen sind im subendothelialen Bereich zu erkennen.

(e/f): Expressionsmuster für das Antigen F4/80 nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**F4/80-ARA+PBS-L/n=5**). Es zeigt sich ein vergleichbares Färbeprofil wie nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung. Die Anzahl der F4/80(+) Zellen nimmt jedoch im Vergleich leicht ab.

Größenstandard =100µm

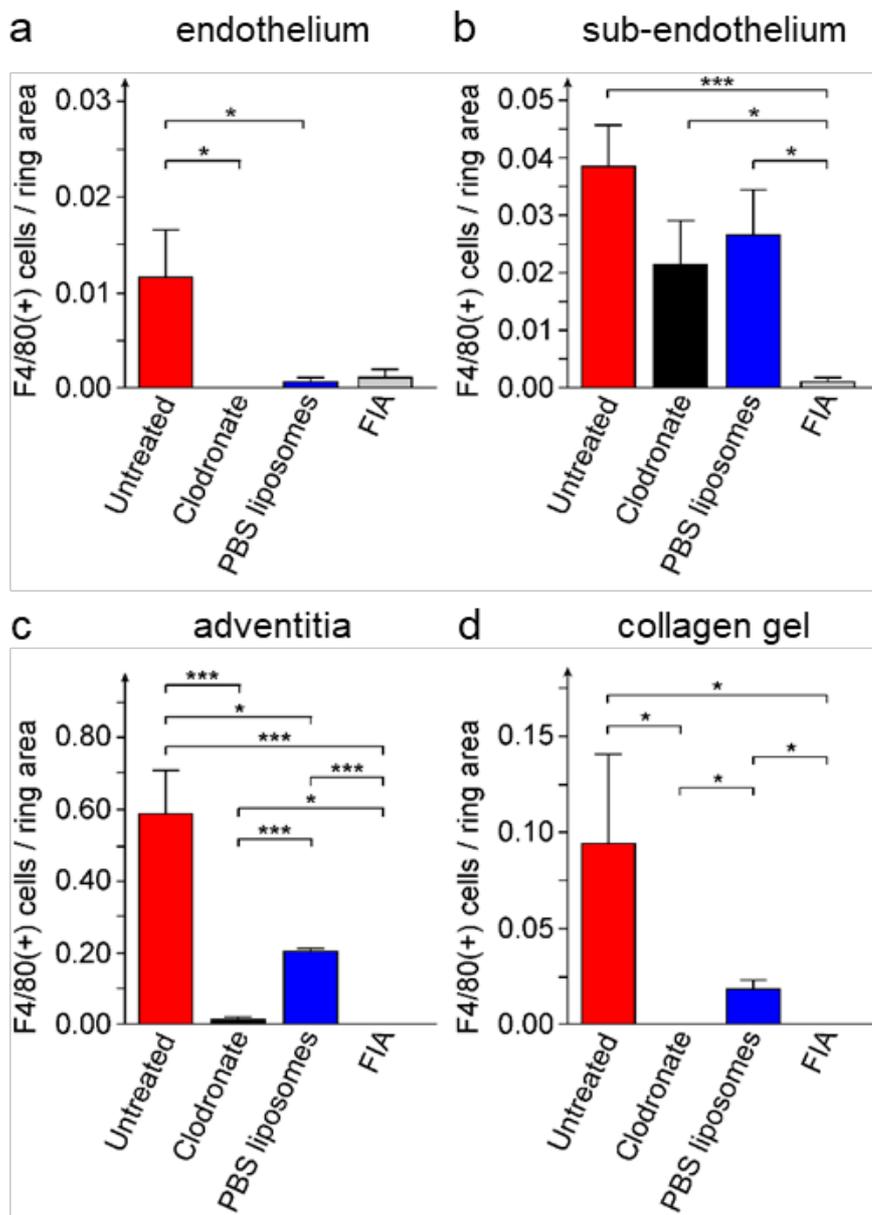


Abbildung 15: Statistische Auswertung der F4/80(+) Makrophagen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=4), PBS-Liposomen (PBS-liposomes/n=5), ohne weitere Behandlung (Untreated/n=4) und ohne Kultivierung (FIA/n=3)

Zu Abb.15:

(a): Endothel (*endothelium*)

Signifikante Abnahme der F4/80(+) Zellen im endothelialen Bereich nach Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (***Clodronate***), und mit PBS-Liposomen (***PBS-liposomes***) im Vergleich zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne Behandlung (***untreated***).

(b): Subendothel (*sub-endothelium*)

Keine Signifikante Abnahme der F4/80(+) Zellen im subendothelialen Bereich nach Kultivierung mit Clodronat-Liposomen über elf Tage (***Clodronate***) im Vergleich zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne weitere Behandlung (***untreated***).

Nach elf Tagen Kultivierung zeigt sich eine Zunahme der F4/80(+) Zellen, unabhängig von der Modulation der Kultivierung.

(c): Adventitia (*adventitia*)

Signifikante Abnahme der F4/80(+) Zellen im adventitiellen Bereich nach Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (***clodronate***) im Vergleich zu elf Tage kultivierten Aortenringen mit PBS-Liposomen Behandlung (***PBS liposomes***) und ohne weitere Behandlung (***untreated***).

(d): Kollagengel (*collagen gel*)

Signifikante Abnahme der F4/80(+) Zellen im umliegenden Kollagengel nach Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (***Clodronate***) im Vergleich zu elf Tage kultivierten Aortenringen mit PBS-Liposomen Behandlung (***PBS liposomes***) und ohne Behandlung (***untreated***).

3.5.1 Die Wirkung der Makrophagendepletion auf das Zell-Sprouting und die Morphogenese Kapillar-ähnlicher Strukturen aus der Mauseorta

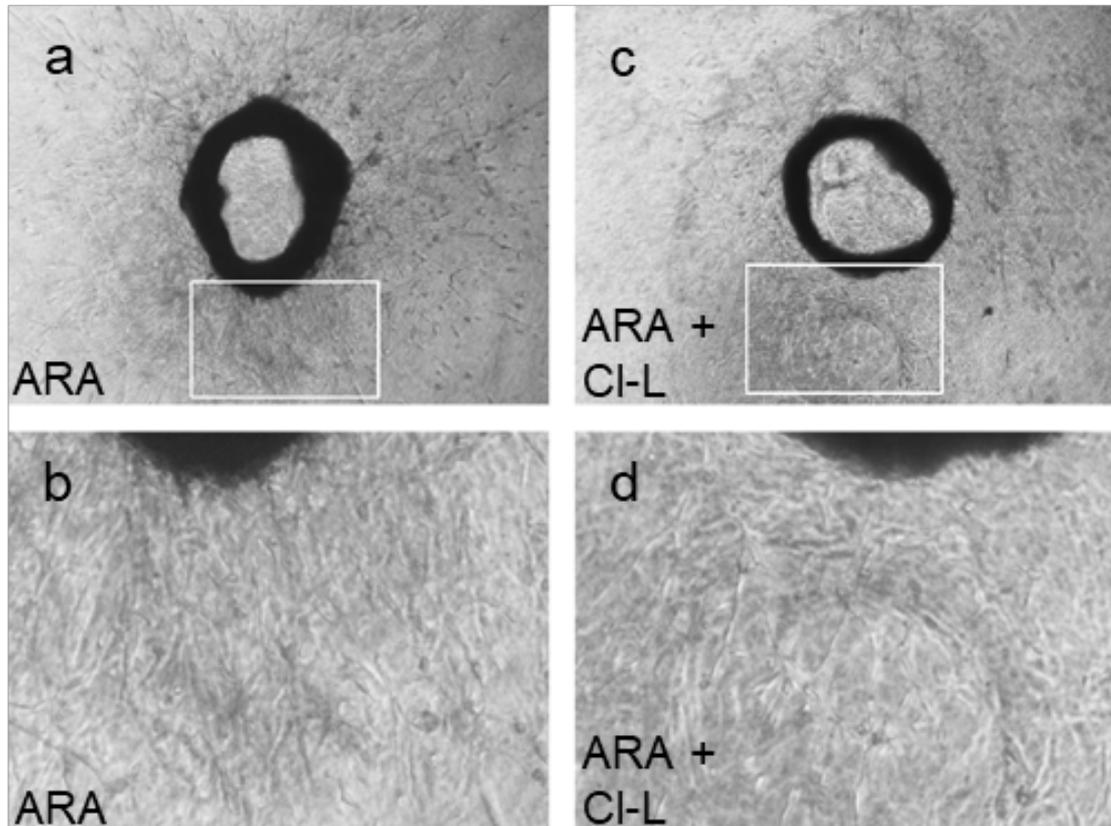


Abbildung 16: Lichtmikroskopischer Vergleich des Zellwachstums von elf Tage kultivierten Aortenringen ohne weitere Behandlung (ARA) (a/b) zu Clodronat elf Tage kultivierten Aortenringen mit Clodronat-Liposomen Behandlung (ARA+CI-L) (c/d)

Zu Abb.16:

(a/b): Hohe „*Sprouting*“-Aktivität und Zelldichte im den Aortenring umgebenden Kollagengel nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (ARA).

(b):(Vergrößerter Bereich aus Bild a): zeigt einen starken Vernetzungsgrad und Bildung von Kapillar-ähnlichen Mikrogefäßen, sogenannte „*Tube Formations*“.

(c/d): Eingeschränktes Zellwachstum begleitet von einer reduzierten Aussprossung der in das Kollagengel auswandernden Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat Liposomen (ARA+CI-L).

(d):(Vergrößerter Bereich aus Bild c): Deutliche Abnahme der Zelldichte und

„Cord-like-Structures“. „Tip-Cells“ strahlen weniger weit in die peripheren Areale des Kollagengels aus.

3.5.2 Einfluss der Clodronat-Behandlung auf das CD34(+)-Färbemuster der Aortenringe

Das nächste Ziel war nun herauszufinden, ob und welchen Einfluss die aus der vaskulären Adventitia im „Ringassay“ generierten Makrophagen auf die vaskulogene Zone ausüben. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen mittels DAB-Technik für das Antigen CD34 durchgeführt, weil a) aus den Voruntersuchungen bekannt war, dass CD34 in fast homogener Verteilung am stärksten in der gesamten Zirkumferenz der Adventitia der Mauseorta nachzuweisen war und b) CD34 im Allgemeinen als Marker für hämatopoetische und vaskuläre Vorläuferzellen gilt. Diese Färbungen wurden an Gewebeschnitten der Aortenringe nach elf Tagen Kultur mit und ohne Clodronat-Behandlung der Ringe durchgeführt.

Nach beendetem Sprouting-Assay der unbehandelten Aorten-Explantate kam es zu einem signifikanten Absinken der CD34(+) Zellmenge im Vergleich zu FIA-Schnitten (Abbildung 17/c, Abbildung 18/a-d, Abbildung 19/a-d). Dies indiziert eine Aktivierung und Remodelling der „Vaskulogenen Zone“ durch „Sprouting Assay“. Interessanterweise zeigte die Behandlung mit Clodronat-Liposomen ein mit der FIA vergleichbares Ausmaß der CD34(+) Zellen (Abbildung 17/c, Abbildung 18/a-d, Abbildung 19/a-b,e-f). Die CD34(+) Zellen der „Vaskulogenen Zone“ scheinen zu einem großen Teil durch die Behandlung mit Clodronat und somit Depletion von Makrophagen während des „Sprouting-Assays“ in ihrer Nische konserviert zu werden.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass über die Makrophagen-Depletion die Aktivierung und das Remodelling der „Vaskulogenen Zone“ in der Aorta und somit der in dieser Zone enthaltenen Stamm- und Vorläuferzellen beeinflusst werden. Um dieses rein visuelle Ergebnis untermauern zu können wurden quantitative Analysen mit anschließenden Statistiken angefertigt, welche die Anzahl positiv gefärbter Zellen in Relation zur Gesamtfläche des Gefäßrings setzten. Da die Färbungen in der Adventitia allein unter mikroskopischer

Beobachtung teilweise schwer zu quantifizieren waren und um Untersucherbedingte Bias auszuschließen, wurde für die quantitative Auswertung die *Threshold-Methode* mithilfe des Programmes *Image J* verwendet.

Die dabei erhobene Statistik zeigt, dass zwischen den Versuchsgruppen (elf Kultivierungstage) mit und denen (ebenfalls elf Kultivierungstage) ohne Clodronatbehandlung ein signifikanter Unterschied bezüglich der CD34(+) Zone in der aortalen Adventitia besteht (Abbildung 17/c). Somit wurde der visuelle Eindruck durch die statistische Auswertung bestätigt. Ein leichter, jedoch nicht signifikanter Abfall der CD34(+) Zellen in der aortalen Adventitia nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen im Vergleich zu FIA wurde ebenfalls verzeichnet (Abbildung 17/c). Dass die Liposomenbehandlung an sich keinen signifikanten Einfluss auf die Zelldifferenzierung ausübte, konnte in dieser Statistik ebenfalls gezeigt werden (Abbildung 17). Denn es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Ausmaß der CD34(+) Zone in der Adventitia zwischen PBS-Liposomen behandelten und unbehandelten Aortenringen nach elf Tagen in Kultur nachgewiesen werden, während die CD34(+) adventitielle Zone in mit PBS-Liposomen behandelten Aortenringen im Vergleich zu den Clodronat behandelten signifikant reduziert war (Abbildung 17/c). Zudem konnte interessanterweise, neben der Konservierung der vaskulogenen Zone in der Adventitia auch ein signifikanter Anstieg im CD34(+)-Färbeprofil in der subendothelialen/intimalen Zone der Aortenwand nach Clodronatbehandlung verzeichnet werden (Abbildung 17/a, Abbildung 19/d, f). Im Vergleich dazu wurde kaum eine CD34-Färbung (außer einer leichten Färbung in einzelnen Endothelabschnitten) in den genannten Zonen der frisch isolierten Aorta gefunden (Abbildung 17/a, Abbildung 19/a, b).

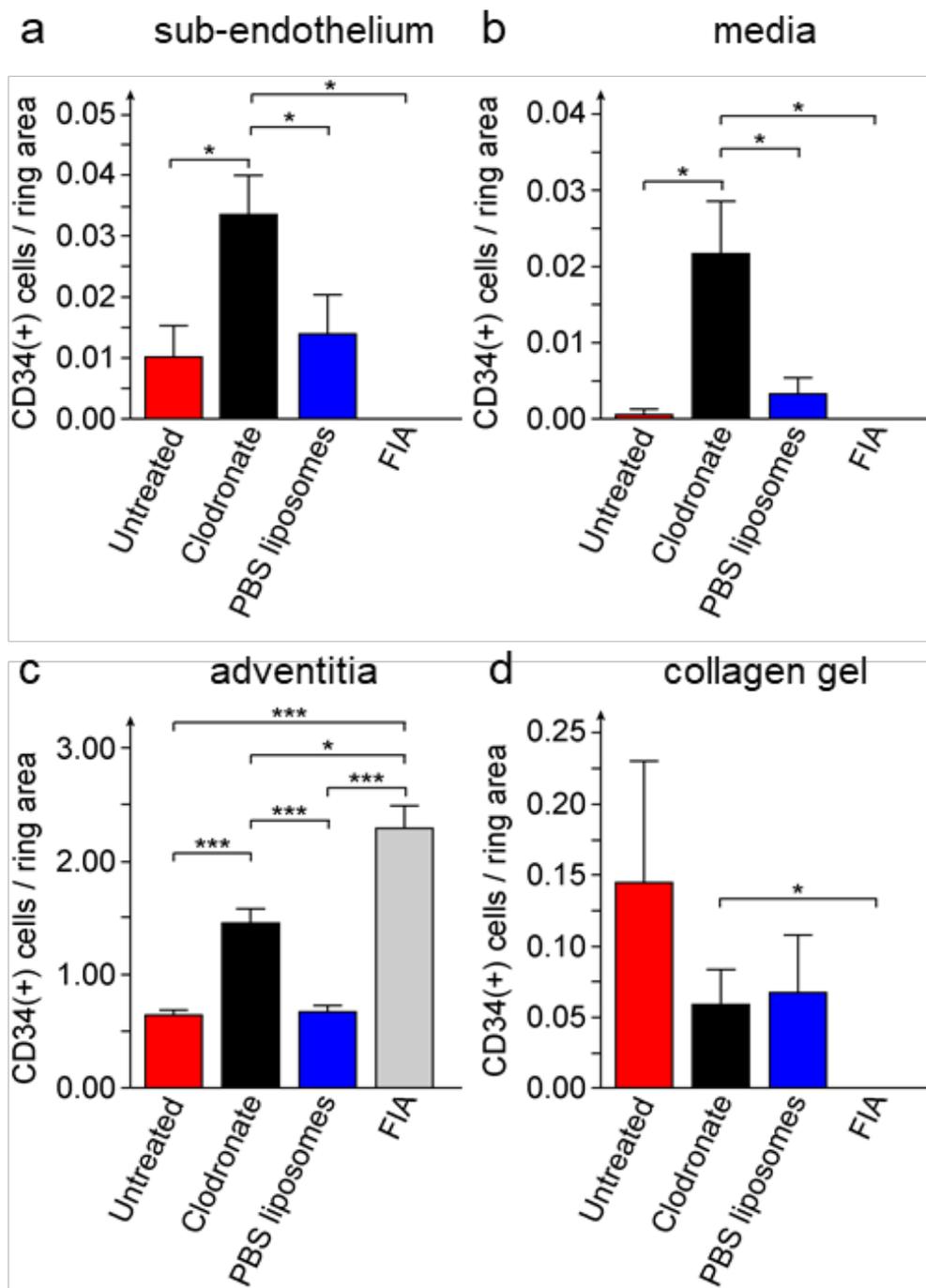


Abbildung 17: Statistische Auswertung der CD34(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen(Clodronate/n=6), PBS-Liposomen(PBS-liposomes/n=4), ohne Behandlung(Untreated/n=4) und ohne Kultivierung(FIA/n=3)

Zu Abb.17:

(a): Subendothel (*sub-endothelium*)

Signifikante Zunahme der CD34(+) Zellen im subendothelialen Bereich nach elf Tagen Clodronat-Behandlung (**Clodronate**) im Vergleich zu unbehandelten (**untreated**), mit PBS-Liposomen behandelten (**PBS liposomes**) und **FIA** Aortenringen.

(b): Media (*media*)

Signifikante Zunahme der CD34(+) Zellen im medialen Bereich nach elf Tagen Clodronat-Behandlung (**Clodronate**) im Vergleich zu unbehandelten (**untreated**), mit PBS-Liposomen behandelten (**PBS liposomes**) und **FIA** Aortenringen.

(c): Adventitia (*adventita*)

Hoch Signifikante Abnahme der CD34(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung der Aortenringe im adventiteillen Bereich („Vaskulogene Zone“) nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**untreated**) im Vergleich zu **FIA**.

Signifikant weniger CD34(+) Zellen nach Clodronat-Behandlung (**Clodronate**) im Vergleich zu **FIA**.

(d): Kollagengel (*collagen gel*)

Keine signifikante Veränderung der CD34(+) Zellen im Kollagengel zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

Zur weiteren Quantifizierung und um mögliche Fehlerquellen auszuschließen wurde die „Vaskulogene Zone“ im adventitiellen Bereich noch über zwei weitere Varianten quantifiziert und ausgewertet. Zum einen wurden die Distanzen, über welche sich die CD34(+)-Bereiche erstrecken, addiert und mit dem gesamten Umfang des Aortenrings in Relation gesetzt. Diese Technik wurde ausgeführt, um mögliche Fehlzählungen von einzelnen Zellen zu vermeiden. Da die Zellen im Dreidimensionalen die verschiedenen Schnittebenen überlappen, könnte es durch manuelle Auszählung zu einem ungewollten Unterschlagen von CD34(+)-Zellen kommen. Gefärbte Zellausläufer könnten hierbei fälschlicherweise nicht gezählt werden und somit das Ergebnis beeinflussen (Abbildung 18/c, d). Die dritte Variante der

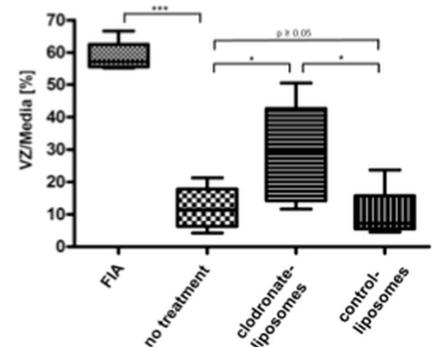
Quantifizierung wurde über Flächenmessungen vorgenommen. Bei dieser Zählung wurde die CD34(+)-Fläche mit dem gesamten Mediaumfang in Relation gesetzt. Die Tunica media wurde deswegen als Bezugsgröße ausgewählt, weil in allen Analysen die Dicke dieser Schicht im gesamten Umfang der Aorta sich kaum oder nur geringfügig geändert herausstellte (Abbildung 18/a, b).

In allen genannten Varianten der Quantifizierung wurden nahezu dieselben Ergebnisse erzielt wie durch die *Threshold*-Methode. Damit konnte ein systematischer Fehler in der quantitativen Auswertung der Ergebnisse ausgeschlossen werden.

A

FIA	no treatment	clodronate-liposomes	control-liposomes
55,2%	4,3%	50,5%	6,58%
66,6%	11,39%	34,47%	7,73%
58,4%	8,3%	34,75%	23,69%
55,98%	14,31%	11,66%	4,59%
	21,27%	24,54%	6,8%
		16,73%	7,71%

B



C

FIA	no treatment	clodronate-liposomes	control-liposomes
100%	14,3%	91,6%	47,26%
100%	18,49%	89,82%	27,46%
100%	19,68%	68,6%	48,66%
100%	39,48%	29,95%	10,31%
	27,99%	45,19%	23,98%
		39,28%	23,23%

D

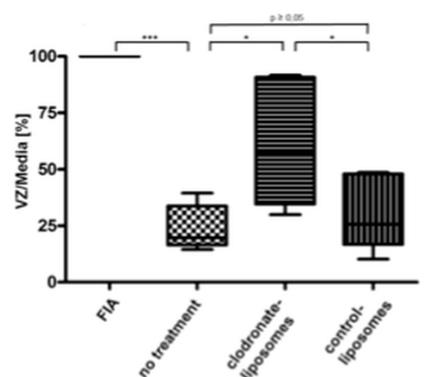


Abbildung 18: Statistische Auswertung der CD34(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung der Aortenringe mit Clodronat-Liposomen (clodronate-liposomes), PBS-Liposomen (control-liposomes), ohne Behandlung (no treatment) und ohne Kultivierung (FIA)

Zu Abb.18:

(A/B): Relation der Fläche der CD34(+) „Vaskulogenen Zone“ zur Fläche der Media des Gefäßexplantats in Prozent

Signifikante Abnahme der CD34(+) Fläche von **FIA(n=4)** zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne Behandlung (**no treatment/n=5**). Signifikante mehr CD34(+) Fläche von Aortenringen mit Clodronatbehandlung (**clodronate-liposomes/n=6**) zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne Behandlung (**no treatment**) und elf Tage kultivierten Aortenringen mit PBS-Liposomen Behandlung (**control-liposomes/n=6**)

(C/D): Relation der gemessenen Strecke der CD34(+) „vaskulogenen Zone“ zur gesamten Zirkumferenz der Media des Gefäßexplantats

Signifikante Abnahme der CD34(+) Strecke von **FIA(n=4)** zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne Behandlung (**no treatment/n=5**)

Signifikant längere CD34(+) Strecke von Aortenringen mit Clodronatbehandlung (**clodronate-liposomes/n=6**) zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne Behandlung (**no treatment/n=5**) und elf Tage kultivierten Aortenringen mit PBS-Liposomen-Behandlung (**control-liposomes/n=6**)

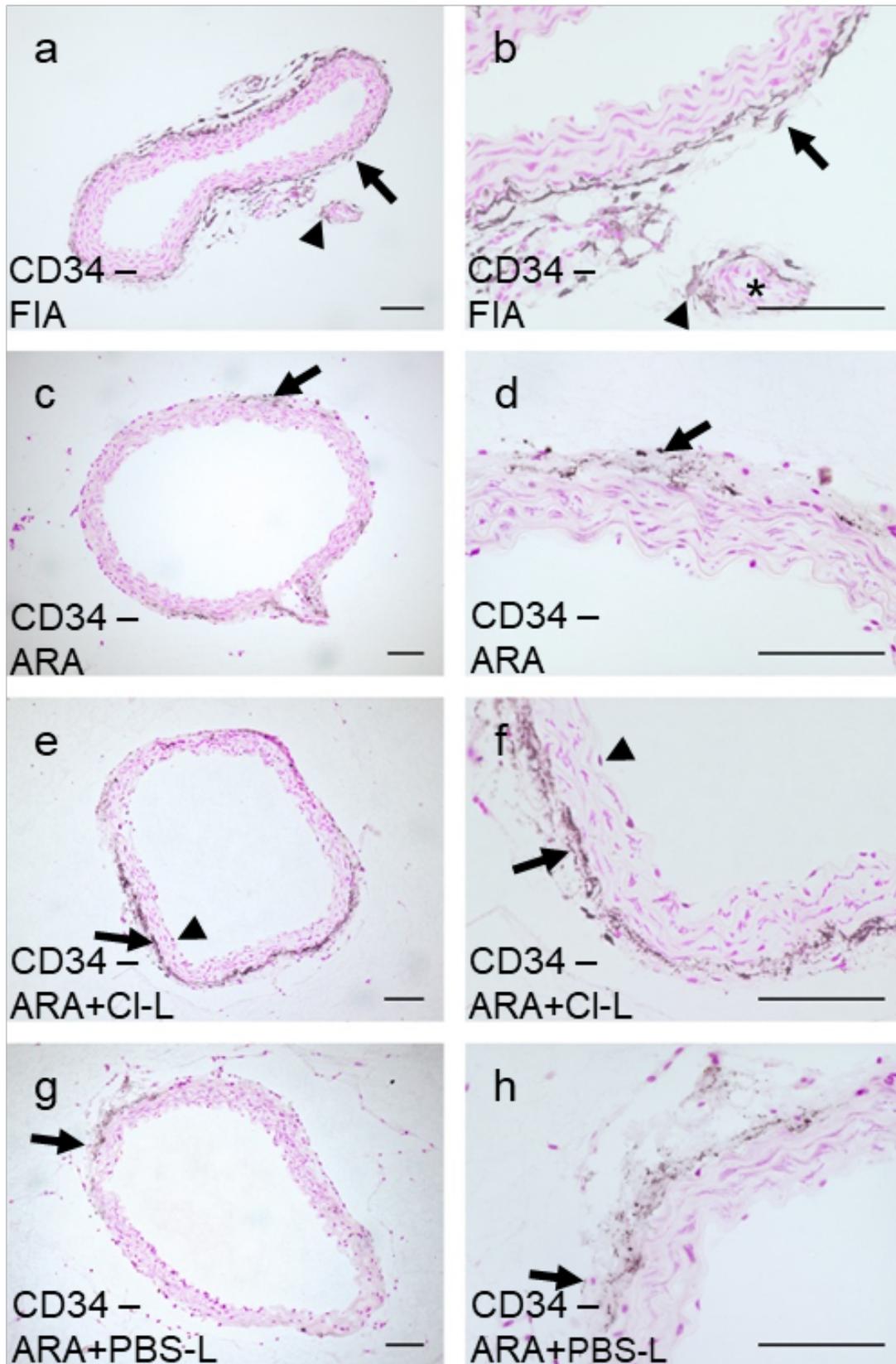


Abbildung 19: Immunhistochemische Färbungen für CD34 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen

Zu Abb.19:

Die Pfeile markieren CD34(+) adventitielle Zellen und die Pfeilköpfe CD34(+) subendotheliale/intimale Zellen.

(a/b): „Vaskulogene Zone“ an frisch isolierten Aortenringen ohne Kultivierung (**CD34-FIA/n=4**)

Es zeigt sich eine deutlich ausgeprägte und klar definierte CD34(+) Zone zwischen Media und Adventitia der Gefäßwand, sowohl großer (Pfeil) als auch kleiner Gefäße (Pfeilkopf).

(c/d): Nahezu vollständige Rückbildung der CD34(+) Zone nach elf Tagen Kultivierung ohne weiter Behandlung (**CD34-ARA/n=4**)

Es zeigen sich noch vereinzelte CD34(+) Zellen in adventitiellen (Pfeil), und in intimalen Bereichen (Pfeilkopf).

(e/f): Teilweise Konservierung der CD34(+) „Vaskulogenen Zone“ (Pfeil) und CD34(+) Zellen im subendothelialen Bereich (Pfeilkopf) nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**CD34-ARA+Cl-L/n=6**)

(g/h): Nahezu vollständige Rückbildung der CD34(+) Zone nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**CD34-ARA+PBS-L/n=6**)

Es zeigten sich noch vereinzelte CD34(+) Zellen in adventitiellen Bereichen (Pfeil).

Größenstandard =100µm

3.5.3 Die Wirkung von Gefäßwandadventitia-abgeleiteten Makrophagen auf CD31(+)-Zellen

Für die Angiogenese und auch postnatale Vaskulogenese ist die Entstehung neuer Endothelzellen unabdingbar. Der beste und am weitverbreitetsten verwendete Marker für den Nachweis der Endothelzellen ist CD31. Nach elf Tagen „*Sproutingassay*“ ohne Behandlung konnten in der Adventitia, im umliegenden Kollagengel und im subendothelialen Bereich der Aortenwand CD31(+)-Zellen durch immunhistochemische Färbungen detektiert werden (Abbildung 20/b-d; Abbildung 21/c, d). Die Depletion von Makrophagen führte zu einer signifikanten Abnahme von CD31(+)-Endothelzellen, sowohl in der Adventitia, als auch im peripheren Kollagengel um den Aortenring (Abbildung 20/c, d; Abbildung 21/e, f). Dies lässt annehmen, dass die aus der aortalen

Adventitia generierten Makrophagen die Aussprossung von CD31(+)-Zellen und damit Angiogenese und/ oder postnatale Vaskulogenese lokal beeinflussen können. Allerdings waren die Ergebnisse hier differenziert zu betrachten, denn es kam auch in den negativen Kontrollen, also unter Behandlung mit PBS-Liposomen zu einem deutlichen Abfall der Anzahl von CD31(+)-Zellen, insbesondere im Kollagengel (Abbildung 20/d; Abbildung 21/g, h). Im Bereich der Adventitia war immer noch ein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit Clodronat- versus PBS-Liposomen festzustellen (Abbildung 20/c), während die statistische Auswertung bezüglich der sub-endothelialen Zone trotz der deutlichen Tendenz keinen signifikanten Unterschied ergab (Abbildung 20/b).

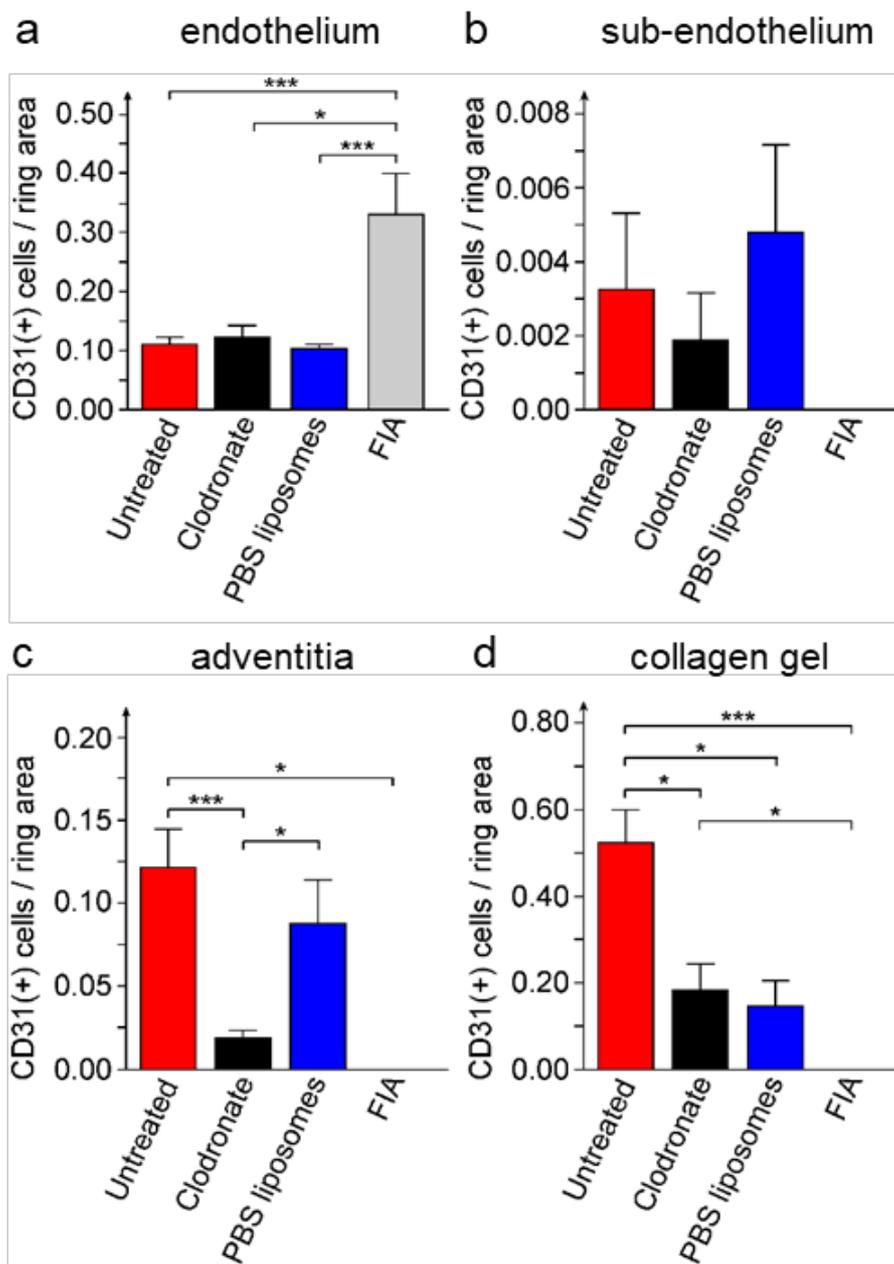


Abbildung 20: Statistische Auswertung der CD31(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=5), PBS-Liposomen (PBS-liposomes/n=4), ohne Behandlung (untreated/n=5) und ohne Kultivierung (FIA/n=3)

Zu Abb.20:

(a): Endothel (endothelium)

Hoch Signifikante Abnahme der CD31(+)-Zellen im Endothel nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) und nach Kultivierung ohne weitere Behandlung (**untreated**)

Es zeigte sich auch eine signifikante Abnahme der CD31(+)-Zellen nach Kultivierung über elf Tage mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**)

(b): Subendothel (sub-endothelium)

Keine signifikante Zunahme der CD31(+)-Zellen im subendothelialen Bereich nach elf Tagen Kultivierung aller Versuchsgruppen im Vergleich zu **FIA**

(c): Adventitia (adventitia)

Signifikante Zunahme der CD31(+)-Zellen in der Adventitia nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) und ohne weitere Behandlung (**untreated**) im Vergleich zu **FIA**

Signifikant weniger CD31(+) Zellen nach elft Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**)

(d): Kollagengel (collagen gel)

Signifikant mehr CD31(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung ohne Behandlung (**untreated**), mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) und mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) im Vergleich zu **FIA**

Signifikant mehr CD31(+)-Zellen nach elf Tage Kultivierung unbehandelt (**untreated**) im Vergleich zu Clodronat-Behandlung (**Clodronate**) und Behandlung mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**)

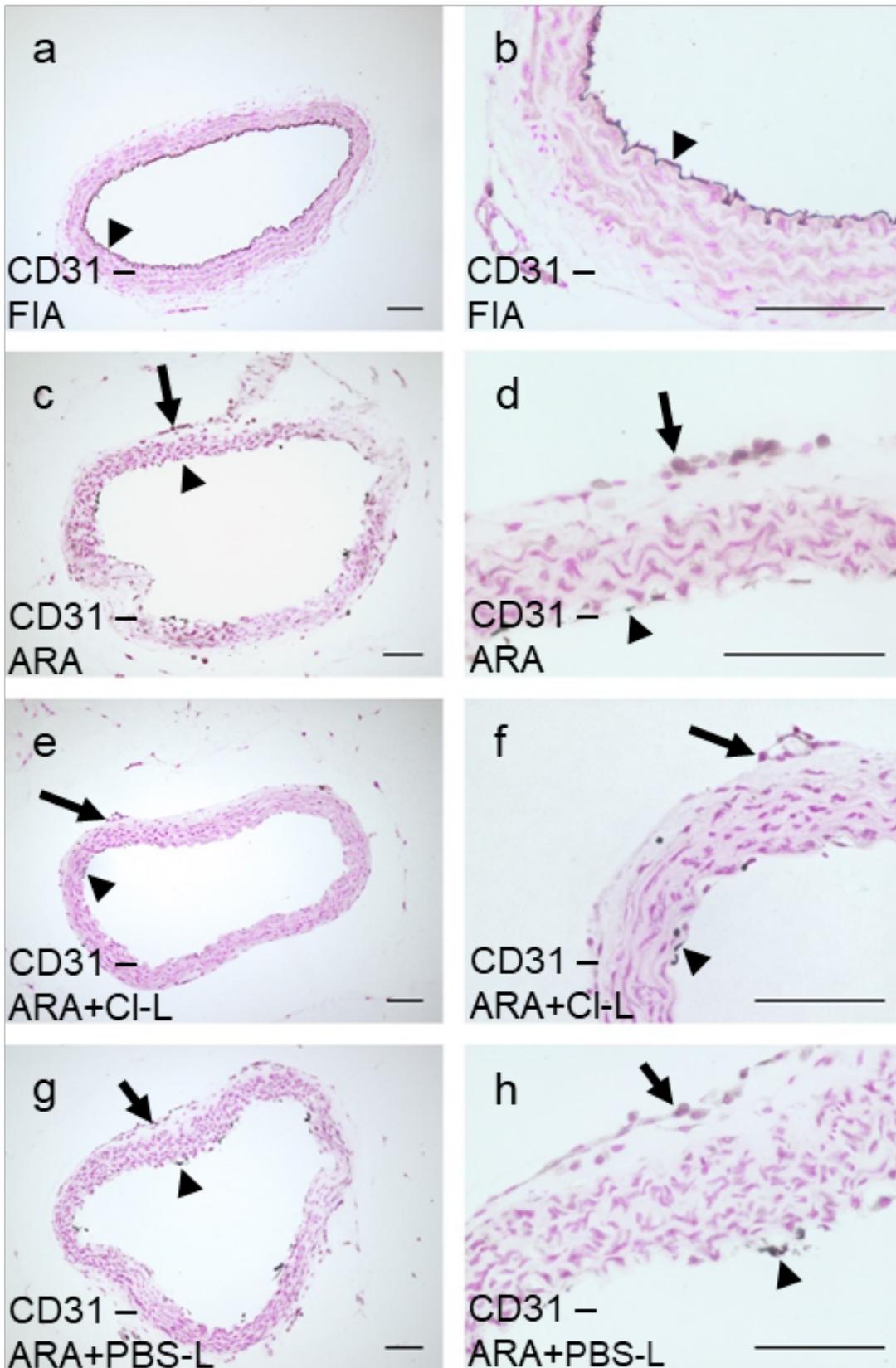


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung für CD31 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen

Zu Abb.21:

Die Pfeile zeigen auf CD31(+) adventitielle Zellen, die Pfeilköpfe auf CD31(+) intimale Zellen.

(a/b): Endotheliale Expression von CD31 (Pfeilkopf) an frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**CD31-FIA/n=3**)

(c/d): Rückgang der CD31(+)-Endothelzellen mit Auflösung des endothelialen Verbandes (Pfeilkopf) und Detektierung CD31(+) adventitieller Zellen (Pfeil) nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**CD31-ARA/n=5**)

(e/f): Rückgang der CD31(+)-Zellen in allen Bereichen der Gefäßwand und im umliegenden Kollagengel nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**CD31-ARA+Cl-L/n=5**).

(g/h): Rückgang der CD31(+)-Endothelzellen und Entstehung CD31(+) adventitieller Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**CD31-ARA+PBS-L/n=4**)

Größenstandard =100µm

3.5.4 Die Wirkung von Makrophagen auf die Gefäßwand-residenten CD44(+)-Zellen

Da in den vor wenigen Jahren publizierten Veröffentlichungen CD44 als ein Epitop für eine Subpopulation der VW-SCs identifiziert wurde, wurde der Einfluss der Makrophagen-Depletion auch auf die Aktivierung, Aussprossung und Differenzierung der CD44(+) Zellen untersucht. Hierbei fiel der deutliche Anstieg der Anzahl von CD44(+) Zellen in den beiden Stammzell-Nischen der Aortenwand nach elf Kulturtagen im Vergleich zu den FIA auf (Abbildung 22/a-d). Dies war in adventitiellen und subendothelialen Bereichen der Aortenwand deutlich zu verzeichnen und spiegelt sich in der angefertigten Statistik wider (Abbildung 23/a, b). Interessanterweise führte die Behandlung mit Clodronat im Gegensatz hierzu zu einem signifikanten Absinken der CD44(+) Zellbereiche (Abbildung 22/e, f; Abbildung 23/a-c). Nach der Clodronat-Behandlung war das Ausmaß der CD44(+) Färbung eher mit frisch isolierten Aortenexplantaten (FIA) zu vergleichen (Abbildung 22/a, b, g, h). Die Anzahl der sich zu CD44(+) Zellen differenzierenden, aussprossenden Zellen konnte durch die Wirkung von Clodronat ebenfalls signifikant gesenkt werden (Abbildung 22/e, f; Abbildung

23/c). Hierbei ist einschränkend zu erwähnen, dass es im Bereich der aortalen Adventitia und im umliegenden Kollagengel auch unter der Behandlung mit PBS-Liposomen zu einem deutlichen Abfall von CD44(+) Zellbereichen kam, nicht jedoch im subendothelialen Bereich der Aortenwand (Abbildung 23/a, b).

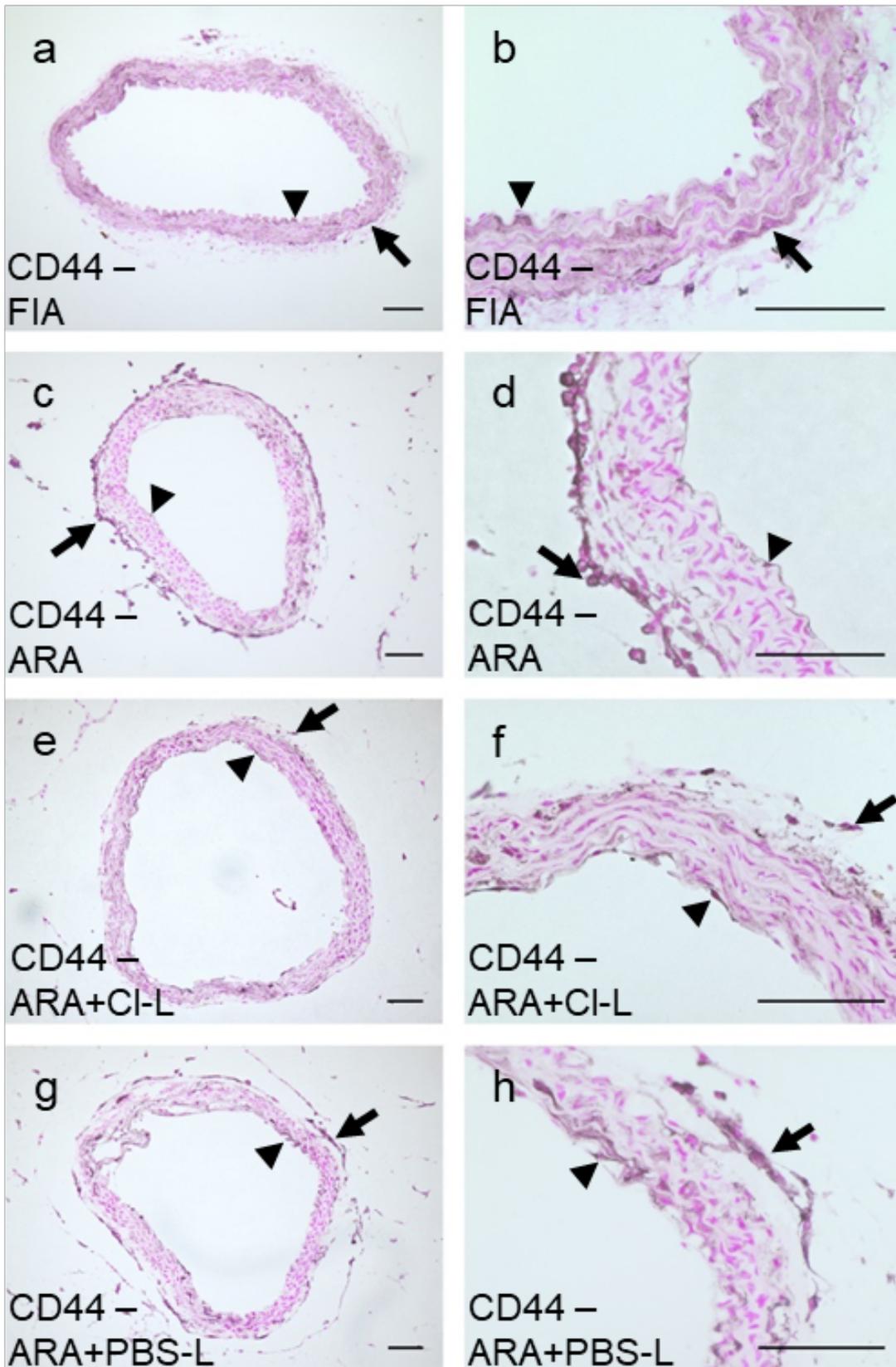


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung für CD44 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen

Zu Abb.22:

Die Pfeile zeigen auf CD44(+) adventitielle Zellen, die Pfeilköpfe auf CD44(+) intimale Zellen.

(a/b): Endotheliale und adventitielle Expression von CD44(+) Zellen an frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**CD44-FIA/n=5**)

(c/d): Zunahme der adventitellen Expression von CD44(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**CD44-ARA/n=4**)

(e/f): Endotheliale und adventitielle Expression von CD44(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**CD44-ARA+Cl-L/n=4**)

(g/h): Zunahme der adventitellen Expression der CD44(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**CD44-ARA+PBS-L/n=5**)

Größenstandard =100µm

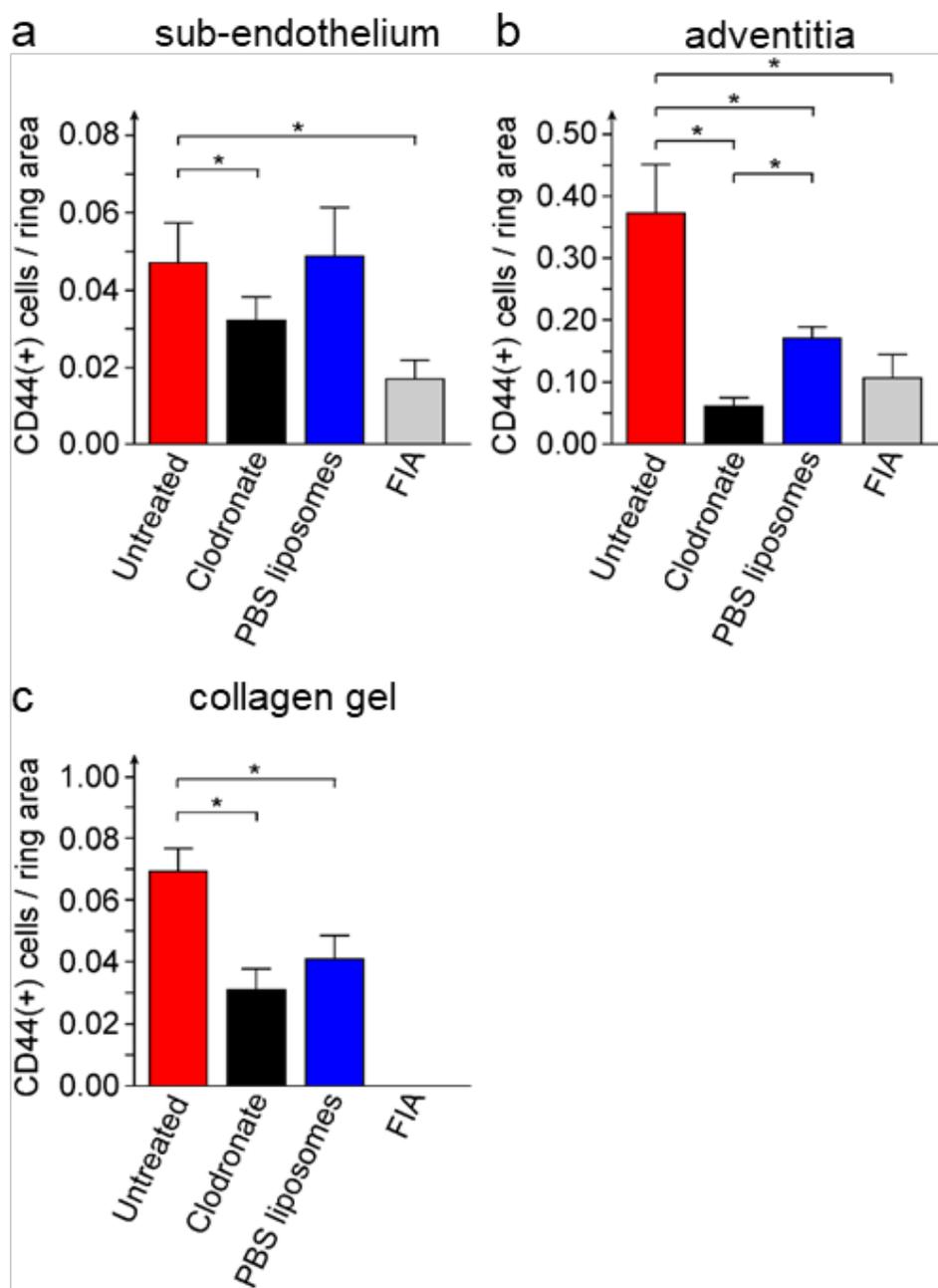


Abbildung 23: Statistische Auswertung der CD44(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=4), PBS-Liposomen (PBS-liposomes/n=5), ohne Behandlung (Untreated/n=4) und ohne Kultivierung (FIA/n=5)

Zu Abb.23:

(a): Subendothel (sub-endothelium):

Signifikante Zunahme der CD44(+)-Zellen im Subendothelialen Bereich nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**untreated**)

Signifikant weniger CD44(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**)

(b): Adventitia (adventitia):

Signifikante Zunahme der CD44(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**untreated**)

Signifikant weniger CD44(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) und mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) im Vergleich zu unbehandelten Aortenringen (**untreated**)

(c): Kollagen (collagen gel):

Signifikant weniger CD44(+)-Zellen im umliegenden Kollagengel nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat Liposomen (**Clodronate**) im Vergleich zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne weitere Behandlung (**untreated**)

Ebenfalls signifikant weniger CD44(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) im Vergleich zu elf Tage unbehandelten Aortenringen (**untreated**)

3.5.5 Die Wirkung von Makrophagen auf Gefäßwand-residenten CD45(+)-Zellen

CD45 gilt als Pan-Leukozytenmarker und ist auf der Oberfläche aller hämatopoetischen Zellen nachzuweisen. Auch HSCs werden mit diesem Marker nachgewiesen [199]. In dieser Arbeit wurde CD45 als Marker für den Nachweis von HSCs verwendet. Hierbei fiel eine deutliche Zunahme von CD45(+)-Zellen in der Adventitia nach Ringassay auf (Abbildung 24/c, d; Abbildung 25/c). Dies wurde bereits dokumentiert und dient als Reaktion des Gefäßes auf Entzündungsreize, bei diesem Versuch vermutlich verursacht durch die Präparation der Aorta aus ihrer Umgebung. Durch die Depletion von Makrophagen über Clodronat-Liposomen war es möglich, die Differenzierung zu hämatopoetischen Zellen zu hemmen (Abbildung 24/e, f; Abbildung 25). Aus dieser Behandlung resultierte eine signifikante Abnahme der CD45(+)-Zellen in der Adventitia (Abbildung 25/c).

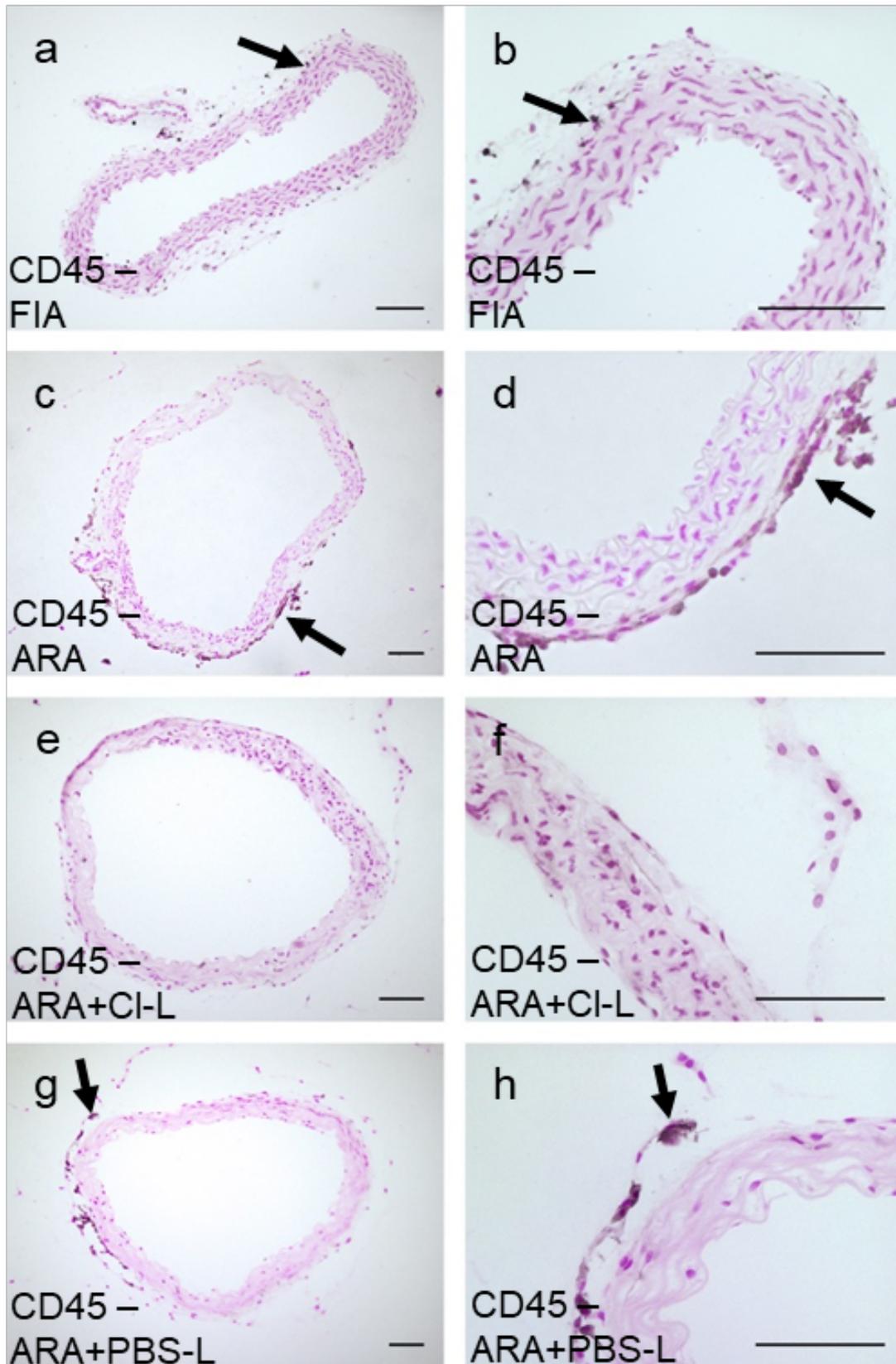


Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung für CD45 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen

Zu Abb.24:

Die Pfeile zeigen auf CD45(+) adventitielle Zellen.

(a/b): Keine Expression von CD45(+)-Zellen im intimalen Bereich und vereinzelt CD45(+)-Zellen im adventitiellen Bereich an frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**CD45-FIA/n=2**)

(c/d): Zunahme der CD45(+)-Zellen im adventitiellen Bereich (Pfeil) nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**CD45-ARA/n=4**)

(e/f): Keine Expression von CD45(+)-Zellen im intimalen und adventitiellen Bereich nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**CD45-ARA+Cl-L/n=4**)

(g/h): Zunahme der CD45(+)-Zellen im adventitiellen Bereich nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**CD45-ARA+PBS-L/n=4**)

Größenstandard =100µm

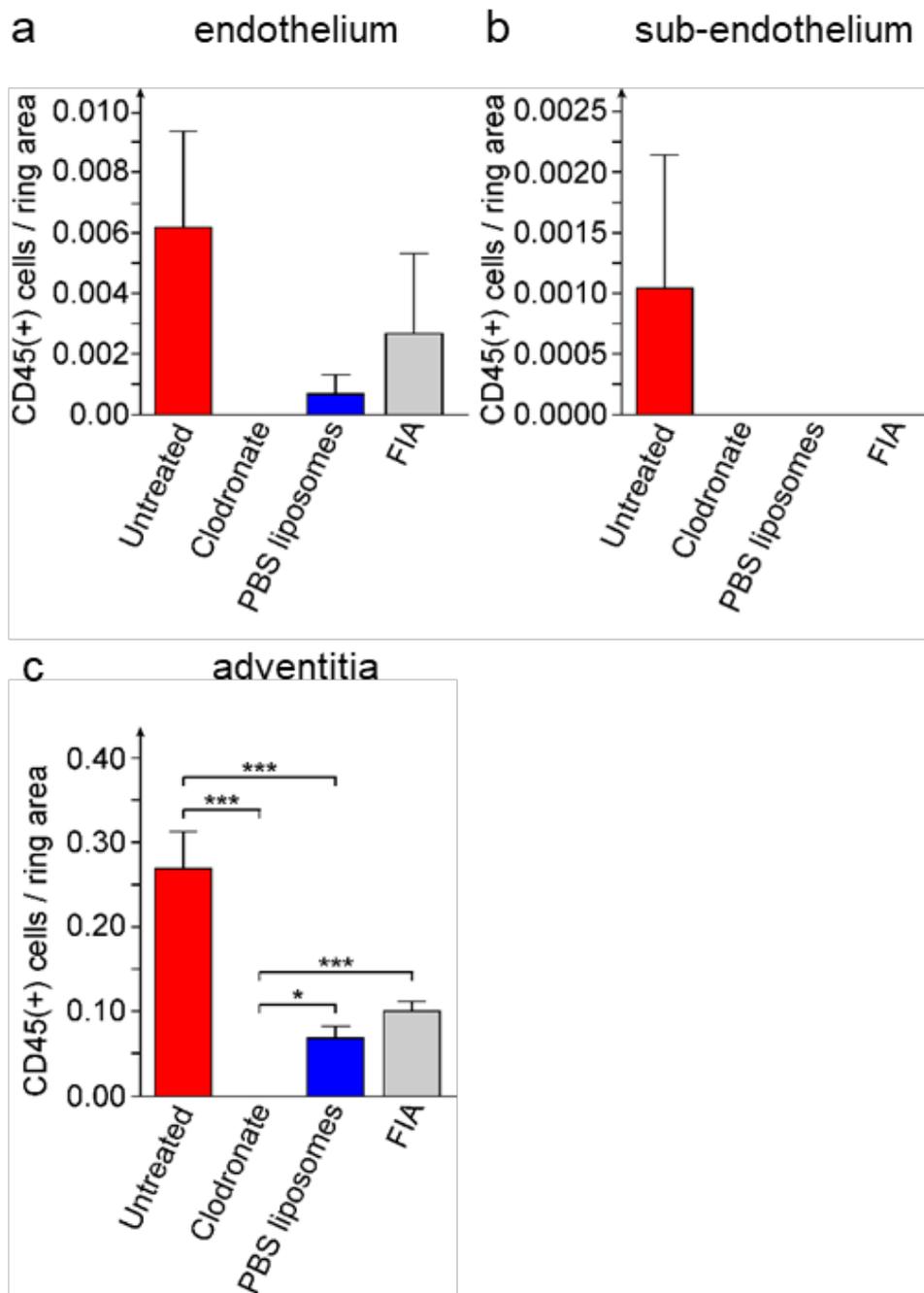


Abbildung 25. Statistische Auswertung der CD45(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=4), PBS-Liposomen (PBS-Liposomes/n=4), ohne Behandlung (Untreated/n=4) und ohne Kultivierung (FIA/n=2)

Zu Abb.25:

(a): Endothel (endothelium):

Zunahme der CD45(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung (**untreated**) im Vergleich zu **FIA**. Abnahme der CD45(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) und mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) im Vergleich zu **FIA**

(b): Subendothel (sub-endothelium):

Zunahme der CD45(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung ohne Behandlung (**untreated**) im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen

(c): Adventitia (adventitia):

Deutliche Zunahme der CD45(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung ohne Behandlung (**untreated**) im Vergleich zu **FIA**. Signifikant weniger CD45(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) und mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**)

3.5.6 Die Wirkung von Makrophagen auf Ki67(+)-Zellen in der Aortenwand, abhängig vom aortalen „Sproutingassay“

Um der Frage nachzugehen, welche Zelltypen der aortalen Stammzellnischen nach dem „*Sproutingassay*“ eine gesteigerte Proliferationsaktivität aufweisen und ob bzw. in welchem Ausmaß sie dabei von einer Clodronat-Behandlung, also Makrophagendepletion beeinflusst werden, wurden Immunfärbungen für den Proliferationsmarker Ki67 durchgeführt. Nach elf Tagen Kultur der Aortenringe konnte ein deutlicher Anstieg der Ki67(+)-Zellen im Vergleich zu den frisch isolierten Aorten-Explantaten festgestellt werden (Abbildung 26/c, d; Abbildung 27). Hierzu wurde die sensitive DAB-Färbemethode angewendet, um die Teilungsaktivität der vorhandenen Zellen in ausreichender Nachweissensitivität überprüfen zu können. Nach der Behandlung der Aortenringe mit Clodronat über einen Zeitraum von elf Tagen konnte ein deutlich vermindertes Färbeprofil, bzw. eine verminderte Anzahl der Ki67(+)-Zellen beobachtet werden (Abbildung 26/e, f; Abbildung 27). Hierbei konnte auch unter der Behandlung mit PBS-Liposomen eine tendenziell im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle reduzierte Anzahl der Ki67(+)-Zellen beobachtet werden (Abbildung 26/g, h; Abbildung 27), jedoch waren immer noch signifikant mehr Ki67(+)-Zellen nachweisbar als in den Versuchen mit der Makrophagendepletion durch Clodronat-Behandlung (Abbildung 27).

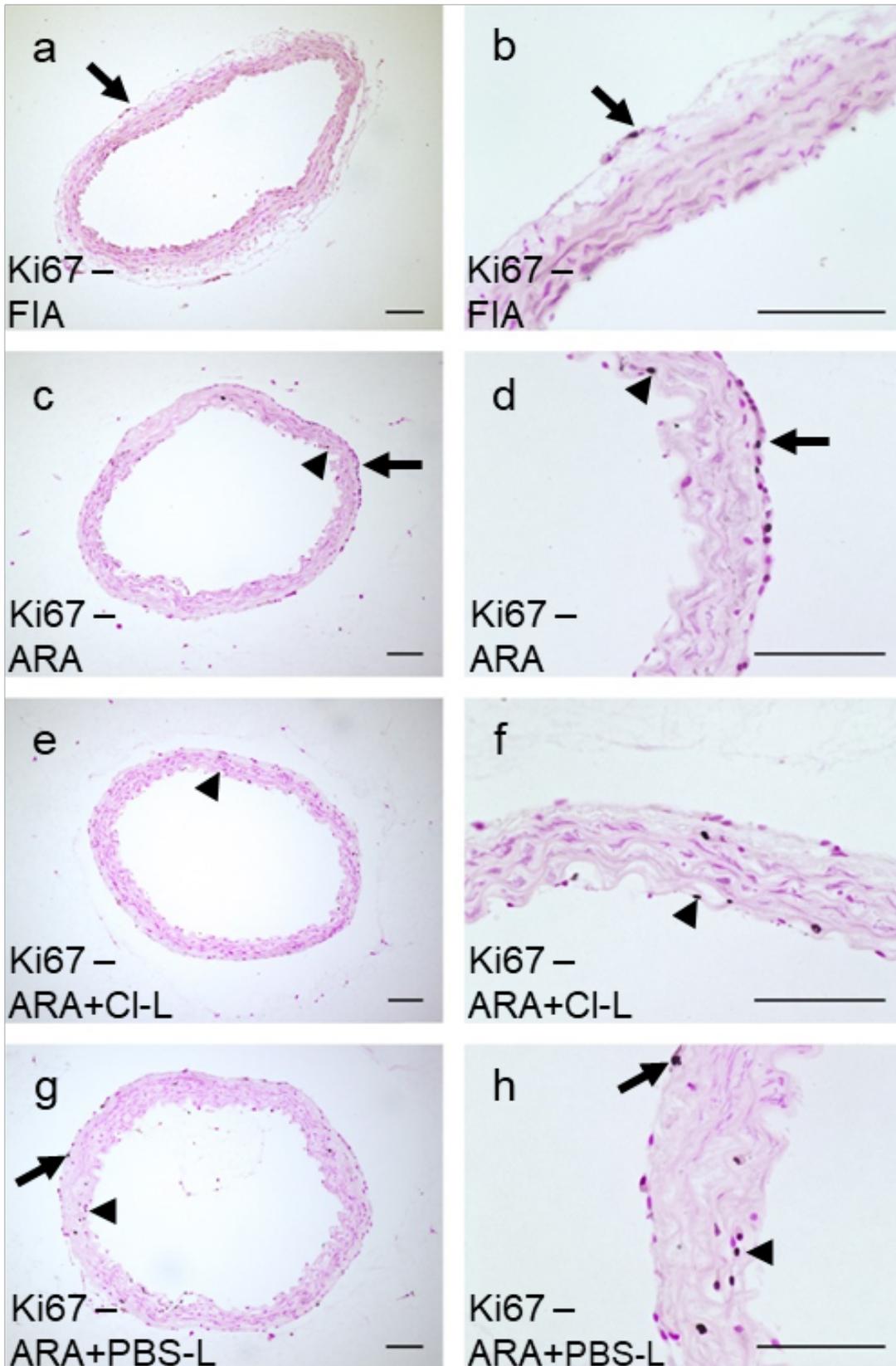


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung für Ki67 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen

Zu Abb.26:

Die Pfeile zeigen auf Ki67(+) adventitielle Zellen, die Pfeilköpfe zeigen auf Ki67(+) intimale Zellen.

(a/b): Endotheliale und adventitielle Expression von Ki67(+)-Zellen an frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**Ki67-FIA/n=3**)

(c/d): Zunahme der Ki67(+) adventitiellen Zellen nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**Ki67-ARA/n=4**)

(e/f): Keine adventitielle Expression von Ki67(+)-Zellen und wenig endotheliale Expression von Ki67(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Ki67-ARA+Cl-L/n=3**)

(g/h): Zunahme der adventitiellen Expression von Ki67(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**Ki67-ARA+PBS-L/n=4**)

Größenstandard =100µm

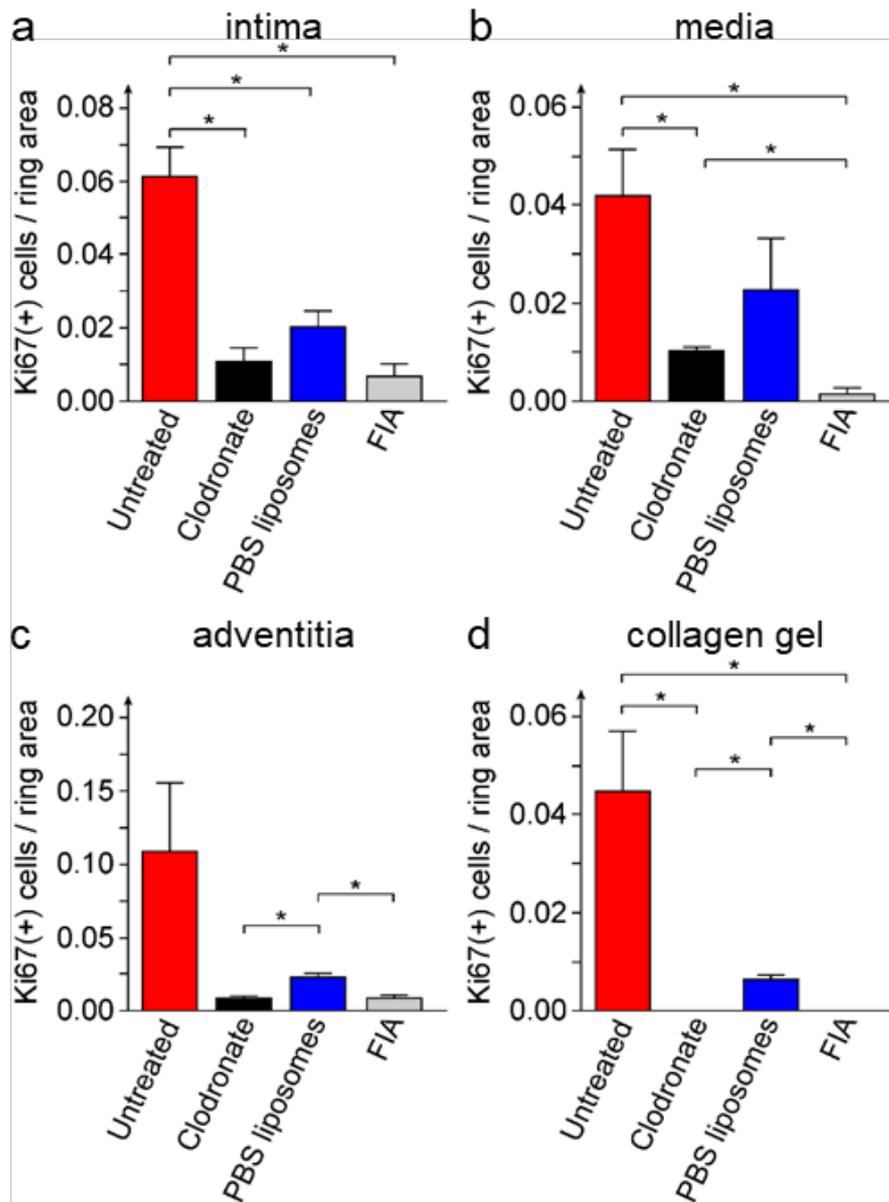


Abbildung 27: Statistische Auswertung der Ki67(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=3), PBS-Liposomen (PBS-Liposomes/n=4), ohne Behandlung (Untreated/n=4) und ohne Kultivierung (FIA/n=3)

Zu Abb.27:

(a) Intima (intima):

Signifikante Zunahme der Ki67(+) intimalen Zellen nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**untreated**) im Vergleich zu **FIA**

Signifikant weniger Ki67(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) und mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) im Vergleich zu **FIA**

Kein signifikanter Unterschied zwischen elf Tagen Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) Behandlung und **FIA**

(b) Media (media):

Signifikante Zunahme der Ki67(+) intimalen Zellen nach elf Tagen Kultivierung (**untreated**) im Vergleich zu **FIA**

Signifikant weniger Ki67(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) aber dennoch signifikant mehr Ki67(+)-Zellen im Vergleich zu **FIA**

(c) Adventitia (adventitia):

Deutliche Zunahme der Ki67(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung (**untreated**) im Vergleich zu **FIA**

Deutlich weniger Ki67(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) und mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**)

(d) Kollagengel (collagen gel):

Signifikante Zunahme der Ki67(+)-intimalen Zellen nach elf Tagen Kultivierung (**untreated**) und mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) im Vergleich zu **FIA** und zu **Clodronate**

Signifikant weniger Ki67(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) im Vergleich zu PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**).

3.5.7 Generierung von VEGF(+)-Zellen aus der aortalen Adventitia nach „*Sprotuingassay*“ in Relation zu den Gefäßwand-residenten Makrophagen

Um den molekularen Mechanismus hinter der Konservierung der „Vaskulogenen Zone“ nach Behandlung mit Clodronat genauer zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen VEGF durchgeführt, der als wichtiges *Signaling*-Molekül hierfür verantwortlich sein könnte. Da Makrophagen bekanntlich unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei der Angiogenese oder Atherosklerose erhöhte Mengen an VEGF-A bilden und sezernieren, sollte quantifiziert werden, ob aktivierte und sich zu Makrophagen differenzierende adventitielle Zellen als VEGF-Quelle dienen und somit Einfluss auf die Aussprossung aus der Mauseorta nehmen können.

An Schnitten von „*fresh isolated*“-Aorten konnte ein leichtes Expressionsmuster in intimalen Bereichen der Aortenwand gezeigt werden. Vereinzelt schwach VEGF-A(+)-Zellen waren darüber hinaus in der Adventitia zu registrieren (Abbildung 28/a, b). Im Vergleich dazu führte die Kultivierung von Aortenringen zu einer massiven Veränderung des VEGF(+)-Profils. Eine hohe Anzahl von stark VEGF(+)-Zellen konnte in der Adventitia nachgewiesen werden (Abbildung 28/c, d). Das Expressionsmuster war zu vergleichen mit den F4/80(+)-Zellen, welche nach elf Tagen Kultivierung entstanden, wie oben in dieser Arbeit gezeigt wurde. Auch die Morphologie war ähnlich zu Adventitia-abgeleiteten F4/80(+)-Makrophagen. Durch die Depletion dieser Makrophagen konnte ein ähnliches Färbeprofil wie bei den frisch isolierten Explantaten erzeugt werden (Abbildung 28/e, f). Durch dieses auffällige Färbeprofil wurden die Makrophagen als Hauptquelle des lokal gebildeten VEGF-A vermutet.

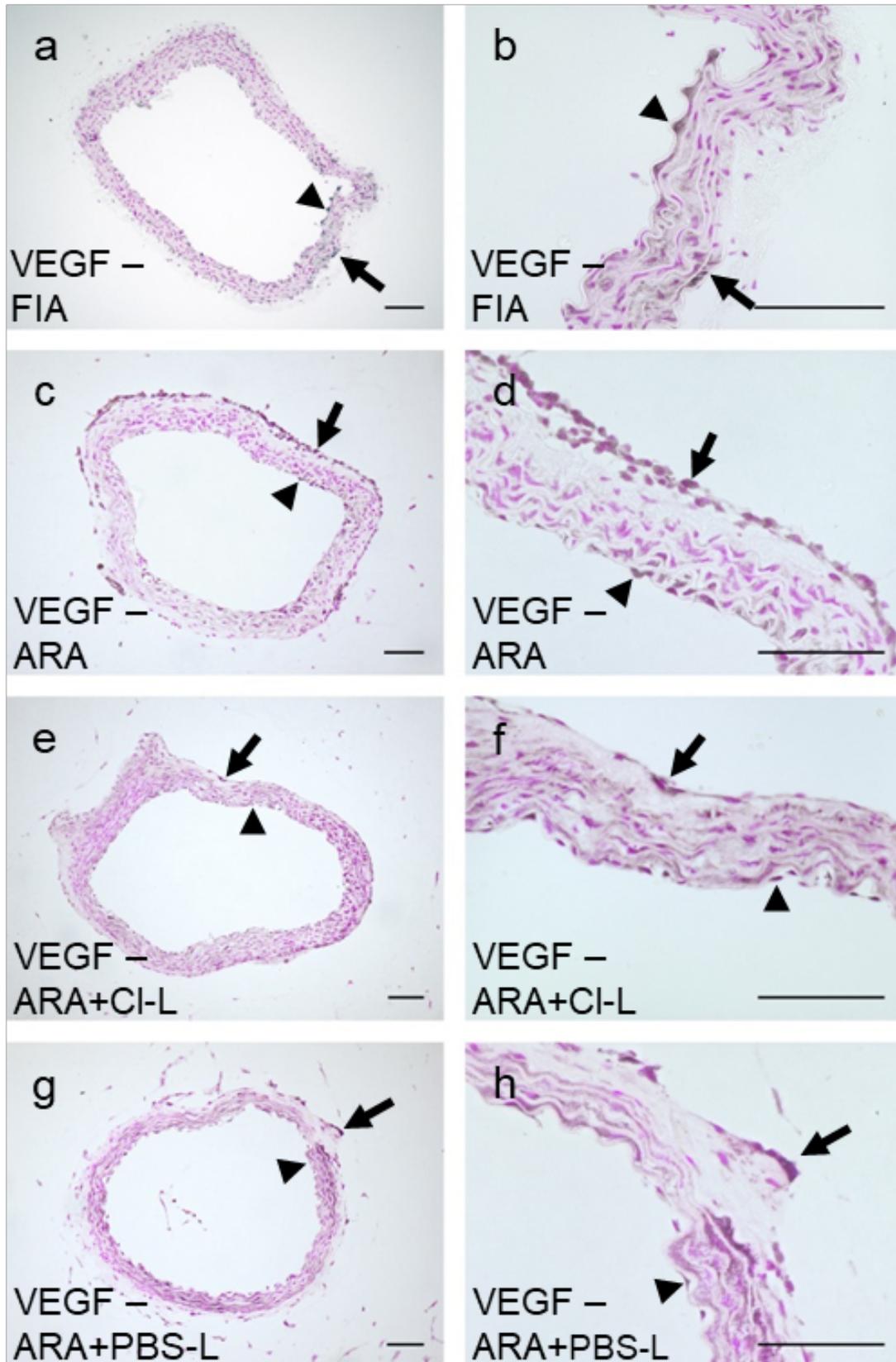


Abbildung 28: Immunhistochemische Färbung für VEGF nach elf Tagen Zellkultur unter verschiedenen Bedingungen

Zu Abb.28:

Die Pfeile zeigen auf VEGF(+) adventitielle Zellen, die Pfeilköpfe zeigen auf VEGF(+) intimale Zellen.

(a/b): Vereinzelt VEGF(+)-Zellen in intimalen und adventitiellen Bereichen an frisch isolierten Aortenringen ohne weitere Kultivierung (**VEGF-FIA/n=3**)

(c/d): Zunahme der VEGF(+)-Zellen in der Adventitia und Kollagen nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**VEGF-ARA/n=3**)

Auch endothelial ist eine Zunahme der VEGF(+)-Zellen zu beobachten.

(e/f): Abnahme der Expression von VEGF(+)-Zellen in subendothelialen und adventitiellen Bereichen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**VEGF-ARA+Cl-L/n=3**).

(g/h): Nach elf Tagen Kultivierung mit PBS-Liposomen (**VEGF-ARA+PBS-L/n=3**) zeigt sich ein vergleichbares Expressionsmuster wie nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**VEGF-ARA**) im sowohl endothelialen und adventitiellen Bereich, als auch im umliegenden Kollagen. Subendothelial ist eine verminderte Anzahl an VEGF(+)-Zellen zu verzeichnen im Vergleich zu VEGF-ARA.

Größenstandard =100µm

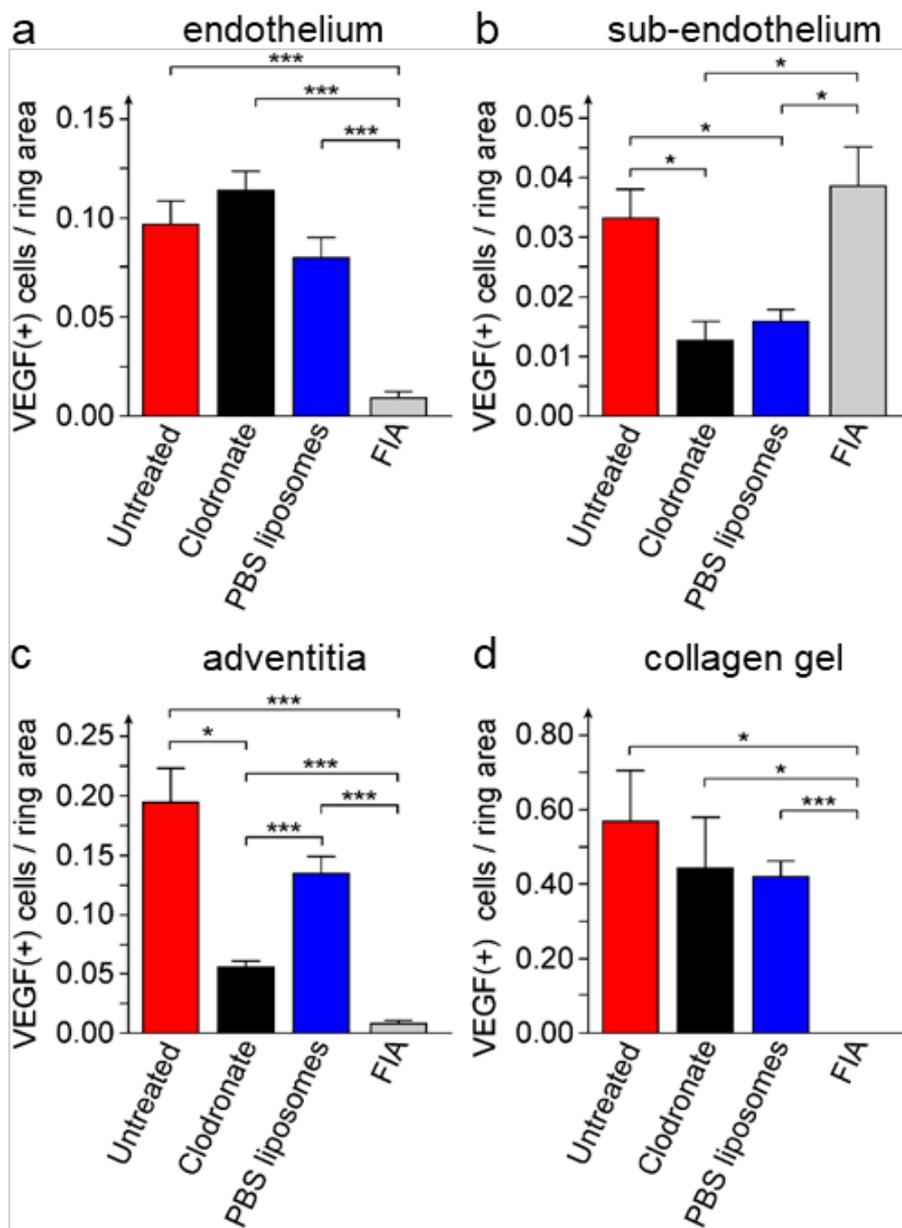


Abbildung 29: Statistische Auswertung der VEGF(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=3), PBS-Liposomen (PBS-Liposomes/n=3), ohne Behandlung (Untreated/n=3) und ohne Kultivierung (FIA/n=3)

Zu Abb.29:

(a): Endothel (endothelium):

Signifikante Zunahme der VEGF(+)-Zellen im endothelialen Bereich nach elf Tagen Kultivierung (**untreated**), mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) und mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) im Vergleich zu **FIA**

(b): Subendothel (sub-endothelium):

Keine signifikante Abnahme der VEGF(+) subendothelialen Zellen nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**untreated**), im Vergleich zu **FIA**
Signifikant weniger VEGF(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) im Vergleich zu **FIA** und zu **untreated**

(c): Adventitia (adventitia):

Signifikante Zunahme der VEGF(+) adventitiellen Zellen nach elf Tagen Kultivierung unbehandelt (**untreated**) und mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) im Vergleich zu **FIA**

Signifikant weniger VEGF(+)-Zellen nach elf Tagen Behandlung mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**).

(d) Kollagengel (collagen gel):

Signifikante Zunahme der VEGF(+)-Zellen im Kollagengel nach elf Tagen Kultivierung unbehandelt (**untreated**), mit Clodronat-Liposomen (**Clodronate**) und mit PBS-Liposomen (**PBS-liposomes**) im Vergleich zu **FIA**

Keine signifikanten Unterschiede der VEGF(+)-Zellen unter den verschiedenen Kultivierungen

Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen gegen die Antigene VEGF-A und F4/80 zeigten, dass der größte Teil der Makrophagen in der Intima, der Adventitia und den ausgesprossenen Zellen VEGF exprimiert. Auch war sehr auffällig, dass es neben Makrophagen wenige Zellen im adventitiellen Bereich gibt, welche positiv für VEGF-A sind. Somit wurde die Vermutung, dass beim Ringassay die aus der vaskulären Adventitia generierten Makrophagen die Hauptquelle für den lokal gebildeten VEGF-A darstellen, bestätigt (Abbildung 30). Da ein beachtlicher Anteil der adventitiellen Stamm- und Vorläuferzellen VEGFR-2(Flk1) exprimieren, könnten die Makrophagen durch ihren VEGF einen

starken Einfluss auf die Neovaskularisierung und vaskuläre Aussprossung ausüben.

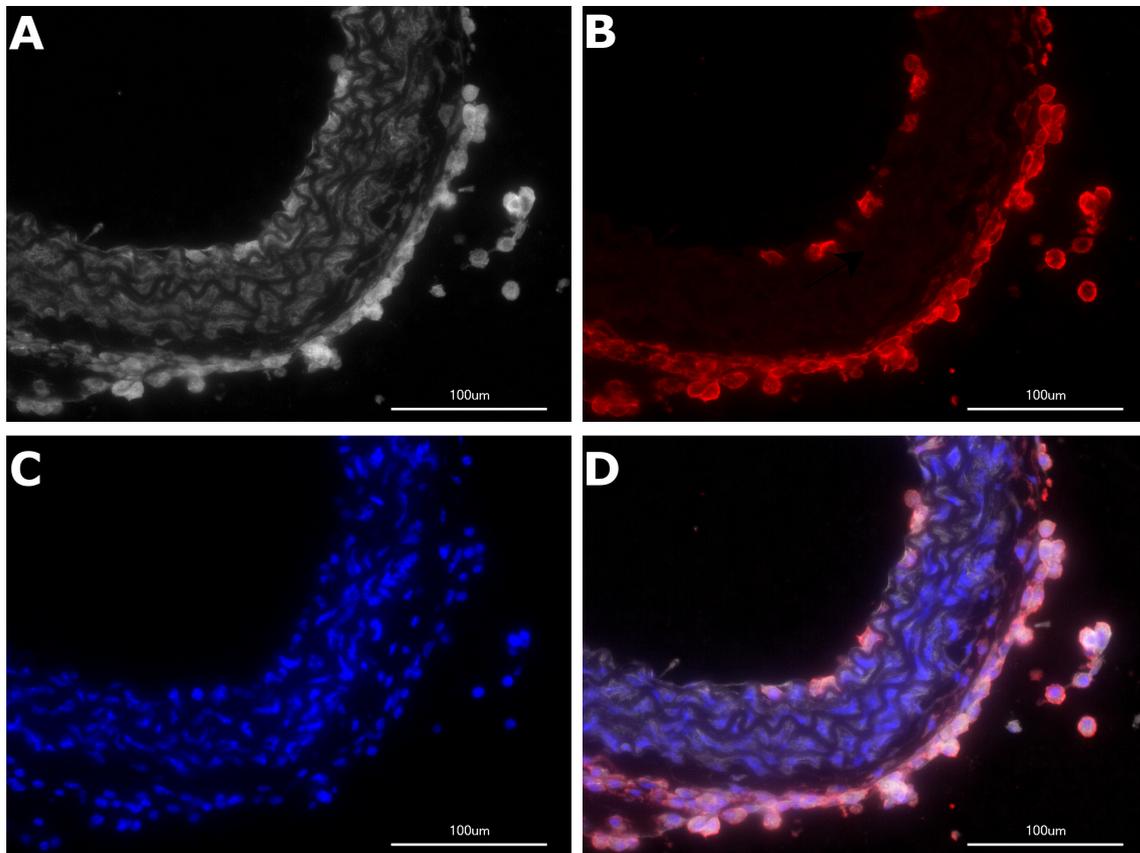


Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für VEGF-A und F4/80 nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (unbehandelt/n=7)

Zu Abb.30:

(A): VEGF(+)-Zellen Cy5: Deutliche detektierung VEGF(+)-Zellen sowohl im intimalen als auch im adventitiellen Bereich und im umliegenden Kollagengel

(B): F4/80(+) Zellen Cy3: Deutliche Detektierung F4/80(+)-Zellen sowohl im intimalen als auch im adventitiellen Bereich und im umliegenden Kollagengel

(C): DAPI: Färbung der vorhandenen Zellkerne

(D): Merge: Überlagerung der einzelnen Fluoreszenz-Färbungen

Deutlich erkennbare Koexpression von VEGF und F4/80

Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden statistische Auswertungen an DAB-Färbungen angefertigt (Abbildung 30), welche die VEGF(+)-Zellen in Relation zur Aortenringfläche setzen. Im Kollagen wurden die VEGF(+)-Zellen in Relation zur Gesamtzahl der ausgesprossenen Zellen gesetzt. Aus diesen Analysen ging besonders ein signifikanter Unterschied zwischen elf Tagen kultivierten Aortenringen mit und ohne Clodronat-Behandlung hervor. Im Falle der Clodronat-Behandlung war eine deutliche Abnahme der VEGF(+)-Zellen zu verzeichnen. In den Zellen, die in das umliegende Kollagengel migriert waren, nahm das VEGF-Färbeprofil nach Clodronat-behandlung ebenfalls deutlich ab (Abbildung 30).

3.6 Inhibierung von VEGFR-1 und VEGFR-2 durch Lenvatinib (E7080)

Um den Einfluss von durch Makrophagen gebildetem VEGF auf das Remodelling der „Vaskulogenen Zone“ zu untersuchen, bzw. die oben erhobenen Daten besser zu verifizieren, wurde der VEGF-Rezeptor Typ 2 (VEGFR-2), der hauptsächlich mit VEGF-A interagiert durch Zugabe eines Blockers inhibiert. Hierbei wurden die Aorten-Explantate in der Zellkultur mit Lenvatinib (E7080) behandelt. E7080 ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, welcher hauptsächlich mit VEGFR-1 und VEGFR-2 interagiert. Das Ziel dieses Experimentes war es zu belegen, dass der Einfluss des von Makrophagen gebildeten VEGF auf das Remodelling der „Vaskulogenen Zone“ mit dem von VEGF-induzierten „*Signaling*“ zusammenhängt. Hierbei wurden VEGF und Lenvatinib allein und auch in Kombination in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Methodenteil) appliziert.

3.6.1 Wirkung von E7080 auf F4/80(+)-Zellen im aortalen „*Sprouting-Assay*“

Die E7080-Behandlung resultierte in einer deutlichen Reduzierung der F4/80(+)-Makrophagen in intimalen, medialen und adventitiellen Strukturen im Vergleich zu elf Tage kultivierten Aortenringen ohne weitere Behandlung (Abbildung 31). Hinsichtlich der Morphologie der noch vorhandenen Makrophagen konnte eine deutliche Veränderung festgestellt werden. Die Ergebnisse waren im Bezug auf die F4/80(+)-Zellen nach Kultivierung mit E7080 mit denen der Makrophagendepletion, also der Clodronat-Behandlung, vergleichbar.

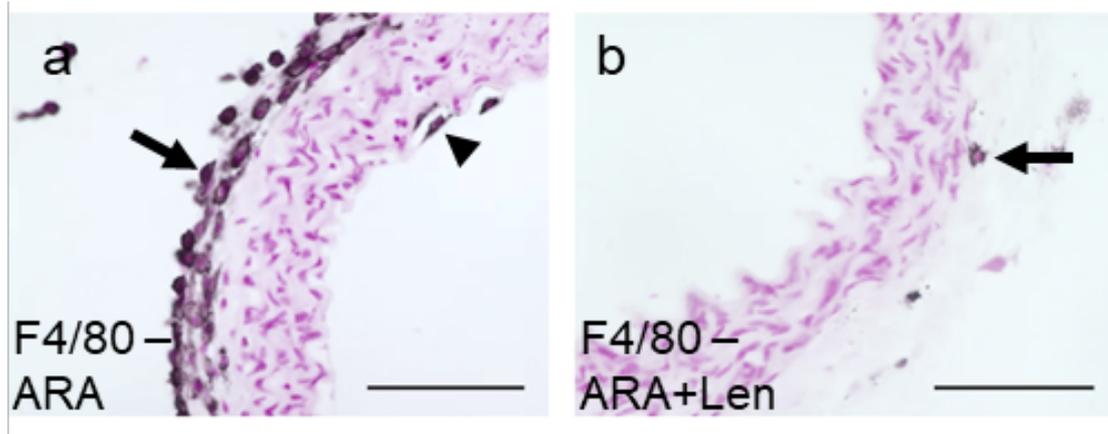


Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung für F4/80 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen

Zu Abb.31:

Die Pfeile zeigen auf VEGF(+) adventitielle Zellen, die Pfeilköpfe zeigen auf VEGF(+) intimale Zellen.

(a): Expressionsmuster für das Antigen F4/80 nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**F4/80-ARA/n=4**)

Es zeigt sich eine deutliche Expression des Antigens F4/80 an sowohl intimalen, als auch adventitiellen Zellen und im umliegenden Kollagengel.

(b): Expressionsmuster für das Antigen F4/80 nach elf Tagen Kultivierung mit E7080-Behandlung (10 μ M) (**F4/80-ARA+Len/n=4**)

Nahezu keine Expression von F4/80(+)-Zellen sowohl in intimalen, als auch adventitiellen Bereichen nach Behandlung mit Lenvatinib

Größenstandard =100 μ m

3.6.2 Wirkung von E7080 auf CD34(+)-Zellen im aortalen „Sprouting Assay“

Darüber hinaus konnte unter E7080-Behandlung die Konservierung der CD34(+) „Vaskulogenen Zone“ ebenfalls erreicht werden (Abbildung 32), wie unter Clodronat-Zugabe.

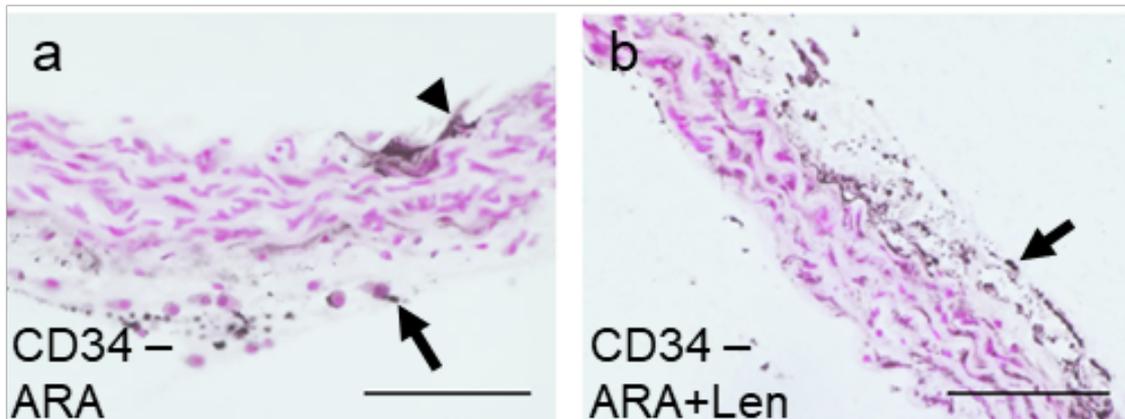


Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung für CD34 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen

Zu Abb.32:

Die Pfeile zeigen auf CD34(+) adventitielle Zellen, die Pfeilköpfe auf CD34(+) intimale Zellen.

(a): Expressionsmuster für das Antigen CD34 nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (**CD34-ARA/n=4**)

Vereinzelte CD34(+)-Zellen sowohl im intimalen, als auch im adventitiellen Bereich

(b): Expressionsmuster für das Antigen CD34 nach elf Tagen Kultivierung mit E7080-Behandlung (10 µM) (**CD34-ARA+Len/n=4**)

Deutliche Expression des Antigen CD34 an adventitiellen Zellen.

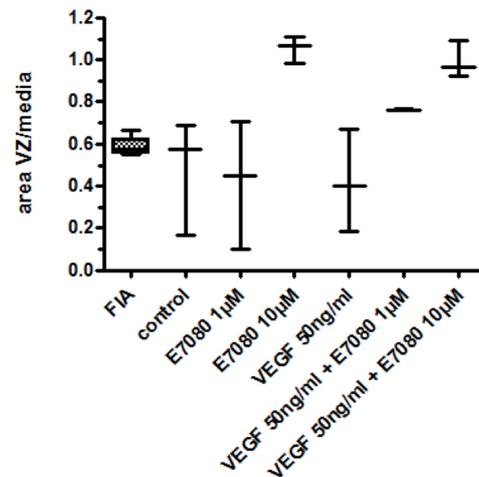
Größenstandard =100µm

Zur Beurteilung der Wirkung von E7080 auf die CD34(+) „Vaskulogene Zone“ wurden Statistiken angefertigt, welche zum einen die Fläche der CD34(+)-Bereiche in Relation zum gesamten Mediaumfang setzen, zum anderen wurde die Strecke der CD34(+)-Zone mit der gesamten Zirkumferenz des Aorten-Rings verglichen.

A

FIA	Kontrolle	E7080 1µM	E7080 10µM	VEGF 50ng/ml	VEGF 50ng/ml + E7080 1µM	VEGF 50ng/ml + E7080 10µM
0,552	0,1641	0,0987	1,1077	0,1839	0,7605	1,088
0,584	0,6877	0,4488	0,9805	0,6699	0,7635	0,9669
0,5598	0,5768	0,7045	1,0671	0,3988		0,925
0,66						

B



C

FIA	Kontrolle	E7080 1µM	E7080 10µM	VEGF 50ng/ml	VEGF 50ng/ml + E7080 1µM	VEGF 50ng/ml + E7080 10µM
1	0,167	0,0778	0,768	0,1093	0,5504	0,959
1	0,6501	0,3124	0,7323	0,531	0,4761	0,8752
1	0,574	0,3718	0,8337	0,2968		0,7093
1						

D

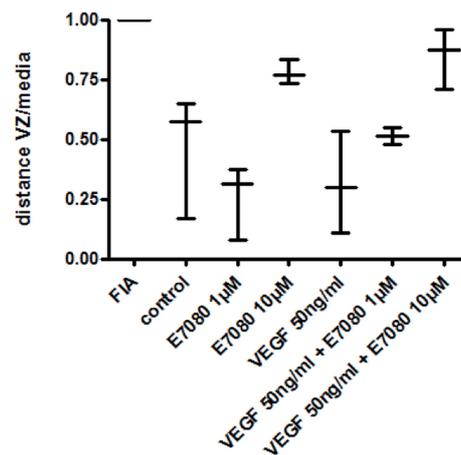


Abbildung 33: Statistische Auswertung der CD34(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit E7080 Behandlung in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Zugabe von VEGF sowie ohne Kultivierung (FIA)

Zu Abb.33:

(A/B): Relation der Fläche der CD34(+) „Vaskulogenen Zone“ zur Mediafläche

(C/D): Relation der Strecke der „Vaskulogenen Zone“ zum Mediaumfang

Durch diese Statistiken konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe einer 10 μM -Lösung von E7080 ein signifikanter Anstieg der CD34(+)-Zone erzielt werden konnte (Abbildung 33/B, D). Die Gabe von VEGF 50 ng/ml führte zu einer vermehrten Abnahme des CD34(+)-Färbeprofils (Abbildung 33/B, D). Diese Wirkung konnte jedoch durch die parallele Applikation von E7080 antagonisiert werden. Hierbei konnte ein größerer Effekt wiederum durch die Konzentration von 10 μM erzielt werden.

4. Diskussion

Bis vor wenigen Jahren war man noch der Auffassung, dass Blutgefäße ausschließlich aus ausdifferenzierten Zelltypen bestehen, die allenfalls mit einer geringen Erneuerungskapazität ausgestattet sind. Durch die Entdeckung der im peripheren Blut zirkulierenden, endothelialen Vorläuferzellen gelang es im Jahr 1997 erstmalig zu zeigen, dass auch beim Erwachsenen die Gefäßneubildung nicht nur durch reife Endothelzellen, sondern auch durch Vorläuferzellen erfolgen kann [6]. Weitere Arbeiten führten dann wenige Jahre später zu der Entdeckung Gefäßwand-residenter Stamm- und Progenitorzellen im subendothelialen Raum und in der sogenannten „Vaskulogenen Zone“ der Adventitia von Gefäßen, die ebenfalls zu der Aussprossung neuer Blutgefäße beitragen [9]. Des Weiteren zeigten Tang und Mitarbeiter, dass Perizyten, wenn sie sich von Ihren Endothelzellen abgelöst haben, als Stamm- und Progenitorzellen agieren können [200]. Damit war bewiesen, dass die adulte Gefäßwand viele verschiedene Vorläufer- und multipotente Stammzellen enthält. Diese sind in der Lage sich nicht nur im Sinne der Gefäßneubildung in Zellen des vaskulären Typs (Endothelzellen, Perizyten, glatte Muskelzellen) auszudifferenzieren, sondern auch Zellen vom nicht-vaskulären Typ, wie Makrophagen oder follikuläre, dendritische Zellen und mesenchymale Zellen (Adipozyten, Chondrozyten, Osteozyten) auszubilden [11, 14, 125, 196, 198]. Zusammenfassend belegten die vor Beginn dieser Arbeit publizierten Befunde, dass die Gefäßwand eine Quelle für einen heterogenen Pool an multipotenten Stammzellen bildet. In Anbetracht der Tatsache, dass ca. 80.000-100.000 km an Gefäßen im menschlichen Körper vorhanden sind und diese in allen Geweben vorkommen, bieten die VW-SCs ein enormes therapeutisches Potential, welches bis heute nur sehr wenig verstanden und kaum ausgeschöpft ist. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, die Differenzierungskapazität und die Möglichkeiten der Beeinflussung und Aktivierung von vaskulären Stammzellen zu erforschen und genauer zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden murine Aorta-Explantate in einem *ex vivo* „*sprouting assay*“ über elf Tage kultiviert, um die Differenzierungskapazität der VW-SCs genauer zu beurteilen und zu erforschen.

Die vorgelegte Arbeit zeigt hierbei erstmalig, dass F4/80(+)-Makrophagen, die aus der Adventitia der Mousaorta generiert werden, einen signifikanten Einfluss auf das angiogenetische „*sprouting*“ und die Gefäßwandstammzellnische, insbesondere die „Vaskulogene Zone“ innerhalb der Tunica adventitia haben. Hierzu wurden Aorta-Explantate von wildtypischen Mäusen über elf Tage kultiviert und die während der Kultivierung entstandenen Makrophagen via Clodronat-Liposomen wahlweise depletiert. Durch diesen Ansatz konnte der Einfluss von Makrophagen und speziell die Wirkung von VEGF, der durch Makrophagen gebildet und sezerniert wird, untersucht und bestimmt werden.

Das ARA schlägt eine Brücke zwischen *in vivo*- und *in vitro*- Versuchen. Bei dieser Art des Versuches wird ein ringförmiges Gewebestück (ca. 2-3 mm dick) der Aorta in ein Kollagengel eingebettet, welches anschließend als Matrix für die Bildung endothelialer Kanäle („*tube formation*“) und aussprossender Zellen dient. Durch die Verwendung eines intakten Gefäß-Explantats, eingebettet in Kollagen, wird die Umgebung der natürlich vorkommenden Angiogenese sehr genau simuliert. Durch diesen Aufbau kann man die Morphologie, Anzahl und Vernetzungen der aussprossenden Zellen erkennen und dokumentieren. Auch ist die Behandlung und der damit verbundene Effekt von verschiedenen Wachstumsfaktoren, Medikamenten etc. sehr gut zu beurteilen [120-122]. Dieser Versuchsansatz konnte in der vorliegenden Arbeit mit Erfolg an murinen Mousaorta- Explantaten durchgeführt und etabliert werden.

Zusammenfassend führen die in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Arbeiten zu folgenden neuen Erkenntnissen:

- Im Vergleich zu der sub-endothelialen Zone entstehen die F4/80(+)-Makrophagen hauptsächlich und in starkem Ausmaß in der aortalen Adventitia. Diese migrieren teilweise aus dieser Zone in das umliegende Kollagengel zusammen mit z.B. vaskulären Zellen.

- Die effiziente Depletion der F4/80(+)-Zellen aus der Adventitia durch Clodronat Liposomen deutet darauf hin, dass diese wie klassische Makrophagen zur Phagozytose befähigt sind.
- Die Adventitia-generierten Makrophagen bilden hohe Mengen an VEGF. Dieser kann lokal und parakrin Einfluss auf die weiteren Stamm- und Vorläuferzellen der Adventitia nehmen, die bekanntlich den VEGF-Rezeptor-2 (Flk1) exprimieren.
- Vermutlich können die Adventitia-generierten F4/80(+)-Zellen durch den von ihnen gebildeten VEGF parakrin die Aussprossung von Zellen und die Morphogenese Kapillar-ähnlicher Strukturen beeinflussen. Dies wird durch Ergebnisse aus den Analysen ihrer Depletion durch Clodronat-Behandlung der Aortenringe verdeutlicht.
- Da auch durch die Behandlung mit dem VEGF Rezeptor-Blocker E7080 die Generierung von adventitiellen Makrophagen supprimiert und gleichzeitig die vaskulogene Stammzellnische besser erhalten blieb (am Beispiel der Immunfärbung für CD34 evaluiert), also konserviert werden konnte, lässt sich das VEGF-VEGFR-2-System als wichtiger Modulator der adventitiellen „Vaskulogenen Zone“ identifizieren.

Im Folgenden möchte ich die Ergebnisse und oben kurz zusammengefassten neuen Erkenntnisse aus meiner Arbeit im Licht der aktuellen Literatur diskutieren.

Stammzellnischen in der adulten Gefäßwand und ihr Beitrag zu der Generierung von Makrophagen

Über sehr lange Zeit war man der Auffassung, dass das Knochenmark die einzige Quelle des menschlichen Körpers für monozytäre Zellen ist. Diese werden in die Zirkulation des peripheren Bluts abgegeben, migrieren bei Bedarf durch die Gefäßwand in das umliegende Gewebe und wandeln sich dann zu Makrophagen um. Hier tragen sie zu der lokalen Immunabwehr und der Modulation des Immunsystems bei. In den letzten Jahren häuften sich überzeugende Befunde darüber, dass auch im peripheren Gewebe Vorläuferzellen für Makrophagen oder Makrophagen-ähnlichen Zellen, wie z.B.

Kupfer-Sternzellen oder Mikroglia-Zellen residieren. Diese haben vermutlich mit den Stammzellen des Knochenmarks kaum etwas zu tun [201]. Tatsächlich führten *in vivo* Analysen anhand genetischer Mausmodelle zu dem Ergebnis, dass z.B. Vorläufer der Gewebe-residenten Makrophagen schon während der Embryogenese aus dem Dottersack in periphere Areale einwandern und dort zeitlebens zu einer Erneuerung der Makrophagen beitragen [202]. Neben klassischen peripheren Gewebe-residenten Makrophagen, wie z.B. Mikroglia- oder von Kupffer-Sternzellen konnten Analysen der letzten zehn Jahre belegen, dass Makrophagen, unabhängig vom Knochenmark, auch aus der Wand adulter Blutgefäße generiert werden können [9, 13, 14]. Nicht nur Makrophagen, sondern auch Gefäßwandzellen, wie z.B. Endothelzellen oder glatte Muskelzellen können aus den Gefäßwand-residenten Stamm- und Vorläuferzellen differenziert werden [9, 10, 203]. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass die Gefäßwand-residenten Stamm- und Vorläuferzellen hauptsächlich in einer Zone innerhalb der vaskulären Adventitia sitzen, die man als „Vaskulogene Zone“ bezeichnete [9]. Zu einem geringen Ausmaß waren diese Zellen auch in der sub-endothelialen Zone der Tunica intima zu finden. Des Weiteren wurde in der Literatur berichtet, dass Perizyten die Fähigkeit besitzen als Stamm- oder Progenitorzellen zu agieren, wenn diese aus der Gefäßwand isoliert werden [11, 63]. Es ist offensichtlich, dass dieser große und heterogen zusammengesetzte Pool an Stammzellen ein enormes therapeutisches Potential verspricht.

Ungeachtet der genauen Lokalisation der Gefäßwand-residenten Stamm- und Progenitorzellen zeigen die bisher publizierten Befunde überzeugend, dass diese sich nicht nur in Zellen des vaskulären Typs, also Endothel- und glatte Muskelzellen differenzieren. Ein Beispiel für nicht-vaskuläre Zellen sind Makrophagen. So beschrieben Zengin und Mitarbeiter unter Verwendung von Gefäßstücken der menschlichen Arteria thoracica interna Progenitorzellen für CD68(+)-Makrophagen, Psalits und Mitarbeiter unter Verwendung der Mauseorta Sca-1(+)-CD45(+)-Makrophagen-Progenitorzellen, sowie Zorzi und Mitarbeiter CD68(+)-CD163(-)-CD169(+) unreife Immunzellen [9, 11, 14, 125,

198]. Somit wurde die Gefäßwand als weitere Quelle für eine lokale Bildung von Makrophagen identifiziert.

In Anbetracht der Tatsache, dass Makrophagen eine wichtige Rolle in sowohl pathologischen als auch regenerativen Immunprozessen spielen, ist es von großem wissenschaftlichem und klinischem Interesse, die Mechanismen der Entstehung und die Rolle von Gefäßwand-abgeleiteten Makrophagen genauer zu erforschen. In der vorliegenden Arbeit konnte durch immunhistochemische Färbungen gezeigt werden, dass F4/80(+)-Makrophagen in einem *ex vivo* „*Sprouting Assay*“ aus der Maus-Aorta generiert werden können. Somit konnten die oben genannten Befunde früherer Publikationen mit diesem „*Assay*“ bestätigt werden. In den adventitiellen Gewebeabschnitten konnte hierbei ein sehr starkes und in den sub-endothelialen Bereichen ein moderates Differenzierungspotential festgestellt werden.

Eine Erklärung für das unterschiedliche Differenzierungspotential könnte die unterschiedliche Quantität der vorhandenen CD45(+)-Zellen darstellen. Die hier vorgelegten Befunde belegen, dass frisch isolierte Maus-Aortaexplantate bereits einen leichten CD45(+)-Bereich in der Adventitia zeigen, während keine solche Färbung in der sub-endothelialen Zone nachzuweisen war. Nach elf Tagen „*Sprouting Assay*“ unter Verwendung der Maus-Aorta nahm die Anzahl der CD45(+)-Zellen in der Adventitia deutlich zu. Subendothelial waren nach „*Sprouting-Assay*“ ebenfalls CD45(+)-Zellen vorhanden, jedoch signifikant weniger im Vergleich zur Anzahl der positiven Zellen in der Adventitia. Die Verteilung der CD45(+)-Zellen korrelierte sehr eng mit der Quantität der entstehenden F4/80(+)-Makrophagen. Psaltis und Mitarbeiter zeigten bereits, dass Sca-1(+)-CD45(+)-Makrophagen-Progenitorzellen in der aortalen Adventitia existieren. Diese stammen nicht aus dem Knochenmark, sondern residieren in der Adventitia der Gefäßwand [14].

Ein weiterer Erklärungsansatz für das Verteilungsgefälle der entstehenden Makrophagen wäre eine Stimulation durch das bei der Präparation gesetzte Trauma im Bereich der Adventitia. Da im Rahmen der scharfen Entfernung des perivaskulären Fettgewebes eine Entzündungsreaktion der adventitiellen Gewebe hervorgerufen wird, könnte dies zu einer vermehrten Freisetzung von

zytokinen Faktoren führen, welche die Differenzierung zu Makrophagen im Bereich der Adventitia begünstigen und eine Mobilisierung von Progenitorzellen aus den Tunica media-nahen Anteilen der Tunica Adventitia hin zum inflammatorischen Reiz in der Außenzone der Adventitia bewirken könnte. Die Erforschung dieses Sachverhalts ist Gegenstand aktueller Forschungen.

Makrophagen besitzen eine Schlüsselfunktion in der Beseitigung und Vernichtung von Bakterien, Viren und Protozoen, können jedoch auch einen negativen Effekt auf die Pathogenese der Inflammation ausüben [156]. Makrophagen, die sich aus Monozyten gebildet haben, werden seit wenigen Jahren mit dem Begriff infiltrative Makrophagen belegt und weiteren Unterteilungen unterzogen, die den funktionellen Zustand der Makrophagen besser beschreiben sollen. Die am weitesten verbreitete und geläufigste Unterteilung ist die Unterscheidung zwischen M1- und M2-Makrophagen. Der Typ M1 steht für pro-inflammatorische und der Typ M2 für anti-inflammatorische Zellen [160]. Die häufigsten Makrophagen-assoziierten Immunreaktionen sind eine Mischung von Immunantworten unter Beteiligung von M1/Th1- und M2/Th2-Zellen [204-206].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Makrophagen im Verlauf des „*Sprouting Assays*“ entstehen und aus der Gefäßwand auswandern. Die Zahl der anti-inflammatorischen M2-Makrophagen, detektiert mit einem Antikörper gegen Arginase-1 ist im Vergleich zu der Zahl der pro-inflammatorischen Makrophagen, detektiert mit einem Antikörper gegen iNOS sowohl im adventitiellen als auch im subendothelialen Bereich erhöht. Da die Makrophagen vom M2-Typ größere Mengen an VEGF sezernieren, könnten diese einen starken Einfluss auf die angiogenetische Aktivität der „*Sprouting Assays*“ haben. Zorzi und Mitarbeiter beschrieben darüber hinaus bereits CD45(+), CD68(+), CD169(+), α -SMA(+), CD163(-), CD31(-)-Zellen, welche sich in Makrophagen und dendritische Zellen differenzieren. Diese Zellen zeigten phagozytierende und proangiogenetische Eigenschaften durch die Produktion von VEGF [207].

Um die Hauptquelle des im „Ring Assay“ sezernierten VEGF zu bestimmen, wurden in dieser Arbeit Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen gegen die Antigene F4/80 und VEGF durchgeführt. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass der Hauptteil der VEGF(+)-Zellen ebenfalls positiv für das Antigen F4/80 ist. Aus diesem Grund wurden die Adventitia-abgeleiteten F4/80(+) Makrophagen als Hauptquelle des sezernierten VEGF identifiziert.

Die Gefäßwand-residenten Stamm- und Progenitorzellen weisen ein breites Differenzierungsspektrum in reife Zellen auf

Die Annahme, dass voll ausgebildete Blutgefäße im adulten Organismus eine Nische für Stamm- und Progenitorzellen darstellen ist relativ neu. Über die letzten zehn Jahre wurde auf diesem Gebiet intensiv geforscht und die Präsenz der so genannten „Vaskulogenen Zone“ bestätigt und etabliert. Im Allgemeinen werden zwei Zonen in der Wand der Blutgefäße beschrieben, welche Stammzellen beinhalten: Der subendotheliale Bereich der Intima aller und die Adventitia großer Gefäße [8-11, 14, 134, 137, 140, 203, 208]. Alessandri und Mitarbeiter beschreiben im Jahr 2001 CD34(+), CD31(-) EPCs (Angioblasten) in der Wand der embryonalen Aorta [134]. Weiter wurde der Begriff „Vaskulogene Zone“ durch die Arbeit von Zengin und Mitarbeitern 2006 eingeführt [9]. Passman und Mitarbeiter beschrieben einen „Sonic-Hedge-Hog“ Signalweg, der Sca1(+) vaskuläre Progenitorzellen in der Gefäßwand unterstützt [209]. Diese befinden sich ebenfalls in der „Vaskulogenen Zone“ [10]. Diese Vorläuferzellen differenzierten sich zu glatten Muskelzellen des vaskulären Typs. Ein weiteres Ergebnis der Arbeit von Passman zeigte die Anwesenheit der „Vaskulogenen Zone“ von der Fetalzeit bis hin ins Erwachsenenalter. Weiter waren vasa vasorum, in enger Nachbarschaft zur „Vaskulogenen Zone“ gelegen, als Reservoir für Stammzellen eingestuft. Damit würden die vasa vasorum einen deutlichen Beitrag zu Gefäßentzündungen und Atherosklerose leisten [210].

Zusammengefasst beinhaltet die „Vaskulogene Zone“:

- EPCs [9, 211]
- Nebenpopulationen von Zellen der arteriellen Tunica media [212]

- Sca1(+) adventitielle Stammzellen [8, 10]
- CD34(+), Flk1(+), CD31(-) Zellen [9, 140]
- -CD44(+), CD34(-) multipotente Stammzellen [203]
- CD45(+) Zellen und Perizyten [139, 213]
- Vorläuferzellen von CD68(+) Makrophagen [9]
- CD68(+), CD163(-), CD169(+) unreife Immunzellen [207]
- Sca1(+), CD45(+) Makrophagen Progenitorzellen [14]
- Vimentin(+), coll-I(+), CD29(+), CD44(+), CD105(+) MSCs [214]
- CD34(+), CD133(+), VEGFR2(+), desmin(+), humane Gefäßvorläuferzellen [137]

Die Heterogenität und das multipotente Potential der adventitiellen Stammzellen wurde durch die Arbeit von Campagnolo und Mitarbeitern bestätigt. Diese zeigte, dass CD34(+), CD31(-)-Zellen der Adventitia von humanen Vena saphena magna Explantaten in der Lage sind, die Differenzierung zu sehr proliferativen Zellpopulationen anzuregen. Die hieraus hervorgehenden Zellen wiederum waren positiv für Perizyten-, mesenchymale- und den Stammzell-Marker Sox2 [11]. Diese Zellen zeigen darüber hinaus Kolonie-bildende Eigenschaften und ein weites Differenzierungsspektrum. Nach Implantation in Skelettmuskulatur unterstützten sie die Vaskularisierung und ordneten sich, ähnlich wie Perizyten an die Endothelzellen der Kapillaren, an.

In der vorliegenden Arbeit konnten einige dieser Ergebnisse bestätigt und durch immunhistochemische Färbungen an frisch isolierten Mauseorta-Explantaten reproduziert werden. So zeigte sich ein klar definierter, CD34(+), VEGFR-2(+), CD31(-) adventitieller Bereich. Dieser entspricht exakt der durch Zengin et al. beschriebenen „Vaskulogenen Zone“ [9]. Weiter konnten Zellen in subendothelialen und adventitiellen Bereichen detektiert werden, die positiv für das Antigen Oct-4 waren. Dies könnte darauf hinweisen, dass die VW-SCs eine gewisse Kapazität an multipotentem Potential besitzen und bestätigt zugleich auch die Anwesenheit dieses sehr heterogenen Stammzellpools.

Aortale, Adventitia-abgeleitete F4/80(+)-Makrophagen sind zur Phagozytose fähig

Eine der basalen Funktionen der Makrophagen, wodurch sie sich von anderen Zelltypen klar unterscheiden, ist ihre Fähigkeit zur Phagozytose. Diese Eigenschaft liegt der experimentellen Depletion von Makrophagen durch Clodronat-Liposomen zugrunde, wodurch die Makrophagen sowohl in *in vivo*, als auch in *in vitro* Analysen in ihrer Anzahl deutlich verringert werden oder komplett verschwinden. In solchen Depletionsanalysen konnte bereits auch eine verringerte Produktion von VEGF und ein reduziertes angiogenetisches „*Sprouting*“ beschrieben werden [215]. Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Behandlung mit Diphtherie-Toxin an Maus-Aorten erreicht [180]. Diese Analysen belegen zum einen die Zuverlässigkeit der Methode zur Depletion von Makrophagen und zeigen zum anderen, dass diese mit einer Beeinträchtigung der lokalen Bildung von VEGF und somit seiner Wirkung bei der Angiogenese einhergehen.

Um zunächst die Phagozytosefähigkeit der Adventitia-abgeleiteten Makrophagen testen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die Methodik zur Depletion von Makrophagen durch Clodronat-Behandlung im „*Sprouting-Assay*“ genutzt. Die hierdurch erzielten Ergebnisse belegen, dass ähnlich wie bei der klassischen Makrophagendepletion auch die Adventitia-abgeleiteten F4/80(+)-Zellen sich durch Clodronat-Behandlung fast komplett depletieren lassen, während die Zellen der Tunica media, also glatte Muskelzellen, erhalten blieben. Dies zeigt, dass die F4/80(+)-Zellen Clodronat-Liposomen aufgenommen haben und somit zur Phagozytose fähig sind. Im Gegensatz zu den Adventitia-abgeleiteten F4/80(+)-Makrophagen zeigten die F4/80(+)-Zellen im subendothelialen Bereich nach Clodronat-Liposomen-Behandlung keinen signifikanten Unterschied zwischen elf Tage kultivierten Aortaexplantaten mit und ohne Clodronat-Behandlung.

Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte darin liegen, dass die aortale Adventitia a) keine Barriere für die Diffusion von Faktoren von außen besitzt und b) nach der Entfernung des peri-aortalen Fettgewebes während der Isolierung der Aorta diese noch stärker zugänglich für applizierte Faktoren, wie

z.B. Clodronat-Liposomen geworden ist. Dies bedeutet, dass Clodronat-Liposomen hier von allen Seiten in die Tiefe der Adventitia gelangen und somit effizient von F4/80(+)-Zellen aufgenommen werden können. Dies ist vermutlich in diesem Ausmaß für die Tunica intima nicht gegeben, da das Endothel, wenn auch sicherlich teilweise moduliert oder beschädigt, durch den Ablauf des Sprouting Assays, immer noch eine Barriere gegenüber dem Aortenlumen darstellt und somit das effiziente Eindringen von Clodronat-Liposomen in die subendotheliale Zone verhindert. Dadurch könnten also die F4/80(+)-Zellen der subendothelialen Zone weniger großen Mengen an Clodronat-Liposomen ausgesetzt sein als die der aortalen Adventitia. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die F4/80(+)-Zellen der subendothelialen Zone in ihrer Differenzierung nicht so weit und daher in ihrer Fähigkeit zur Phagozytose noch nicht ausgereift sind. Damit können sie nicht eine ausreichende Menge an Clodronat-Liposomen durch Phagozytose aufnehmen und nicht depletiert werden. Daher bleibt es noch zu untersuchen, in wieweit die subendothelialen F4/80(+)-Zellen tatsächlich zu phagozytierenden Makrophagen gezählt werden können oder nicht. Da die Anzahl der Makrophagen-Progenitorzellen im subendothelialen Bereich jedoch sehr gering ist, kann der Einfluss der entstehenden F4/80(+)-Zellen für das „*Sprouting*“ neuer Gefäße vernachlässigt werden, nicht jedoch ihre mögliche Auswirkung auf das eng benachbarte Endothel und die inflammatorischen Prozesse im Rahmen der Entstehung atherosklerotischer Plaques.

Zudem ist noch zu berücksichtigen, dass auch nach der Zugabe von PBS-Liposomen eine negative Wirkung auf die Entstehung von F4/80(+)-Makrophagen beobachtet werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass die bloße Anwesenheit von Liposomen und deren Phagozytose einen leichten Effekt auf die entstehende Anzahl der Makrophagen hat. Da jedoch im Vergleich zu den Versuchen mit Clodronat-Liposomen signifikant mehr F4/80(+)-Makrophagen entstehen, kann der Effekt von Liposomen an sich vernachlässigt werden.

Adventitia-abgeleitete Makrophagen weisen Eigenschaften von M1- und M2-Makrophagentypen auf

Makrophagen besitzen eine Schlüsselfunktion in der Beseitigung und Vernichtung von Bakterien, Viren und Protozoen, können jedoch auch einen negativen Effekt auf die Pathogenese der Inflammation ausüben [157, 158]. Makrophagen, die sich aus Monozyten gebildet haben, werden wie oben beschrieben, weiteren Unterteilungen unterzogen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Makrophagen im Verlauf des „Sprouting Assays“ entstehen. Die Zahl der antiinflammatorischen M2-Makrophagen, detektiert mit einem Antikörper gegen Arginase-1, ist im Vergleich zu der Zahl der proinflammatorischen Makrophagen, detektiert mit einem Antikörper gegen iNOS, sowohl im adventitiellen als auch im subendothelialen Bereich erhöht. Da die Makrophagen vom M2-Typ VEGF sezernieren, könnten diese einen starken Einfluss auf die angiogenetische Aktivität der „Sprouting Assays“ haben.

Aortale Adventitia-abgeleitete Makrophagen bilden die Quelle für den lokalen VEGF

VEGF ist bekanntlich der potenteste Faktor der Angiogenese und für die *de novo* Gefäßentstehung während der embryologischen Entwicklung unverzichtbar [1, 86, 96, 97]. So zeigten VEGF-Knock-out-Experimente, dass selbst das Ausschalten eines der beiden VEGF-Allele nicht mit dem Leben vereinbar ist [27]. Ebenso sind die VEGF-Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2 unverzichtbar, denn auch Mausmodelle mit VEGFR-Knock-out sind letal. Bei Ausschalten des Allels für VEGFR-1 kommt es zu einer unkontrollierten endothelialen Differenzierung, was in einer Überwucherung von Endothelzellen und damit in nicht funktionstüchtigen Gefäßen resultiert [216, 217]. Mutationen, die zum Ausschalten des VEGFR-2 Genes führten, resultierten in einer Unterdrückung der endothelialen Differenzierung und somit Verringerung der Bildung von funktionsfähigen Blutgefäßen [7, 27, 105, 218]. Basierend auf dieser essenziellen Rolle von VEGF bei der Gefäßneubildung wird in fast allen Angiogenese-Analysen VEGF als positiver Faktor eingesetzt, um die

Gefäßbildung zu stimulieren, oder das VEGF-VEGFR-System blockiert, um die pathologische Gefäßneubildung zu unterdrücken. Daher war es naheliegend, in dem hier eingesetzten aortalen „*Sprouting-Assay*“ nach VEGF und VEGF-Rezeptoren zu suchen. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass ein Teil der adventitiellen Stammzellen den VEGFR-2 exprimieren [9, 11]. Die hier vorgelegten Befunde bestätigen diese Ergebnisse und zeigen, dass VEGFR-2(Flk1) ein wichtiger und zuverlässiger Marker für Stamm- und Vorläuferzellen der adventitiellen „Vaskulogenen Zone“ darstellt. Darüber hinaus zeigen die hier vorgelegten Befunde der Doppelimmunfärbung für VEGF und F4/80, dass die im „*Sprouting-Assay*“ entstehenden Adventitia-abgeleiteten F4/80(+)-Zellen (Makrophagen) auch sehr stark für VEGF positiv werden. Damit liefern diese Makrophagen eine lokale Quelle für den VEGF, der vermutlich während ihrer Aktivierung freigesetzt wird und dann parakrin an den VEGFR-2(Flk1)(+)-Zellen der „Vaskulogenen Zone“ wirksam wird und somit deren Aussprossung sowie Differenzierung beeinflusst. Da die VEGF-positiven Zellen nach Clodronat-Liposomen-Behandlung fast komplett verschwinden, kann sicher davon ausgegangen werden, dass es die Adventitia-abgeleiteten Makrophagen sind, die hier hohe Mengen an VEGF bilden. Des Weiteren zeigen diese Analysen, dass durch Depletion der Makrophagen dem „*Sprouting-Assay*“ der endogen gebildete VEGF hoch effizient entzogen wird und somit seine Rolle auf das „*Sprouting*“ sowie auf die Kapillarbildung studiert werden kann.

Die Rolle der Adventitia-abgeleiteten Makrophagen bei der Bildung Kapillar-ähnlicher Strukturen

Das arterielle „*Ring-Assay*“ wird eingesetzt, um Aussprossung neuer Gefäße im Rahmen der Angiogeneseforschung studieren zu können. Auch hierbei spielt VEGF als positive Kontrolle, also als pro-angiogenetischer Faktor eine wichtige Rolle. Zengin et al. beschrieben in ihrer Arbeit von 2006 eine vermehrte Bildung von „*capillary-like-structures*“ nach Isolierung vaskulärer Zellen und Kultivierung mit VEGF im Vergleich zu Kultivierungen ohne VEGF [9]. Auch die Präsenz von Makrophagen wurde im „*Sprouting-Assay*“ getestet und zeigte, dass sie essentiell zur Kapillarbildung beitragen. Nicosia et al.

beschrieben 2011 die Reduktion des angiogenetischen „*Sproutings*“ durch die Depletion von Makrophagen über Clodronat-Behandlung [215].

Diese hier vorgelegten Ergebnisse bestätigen diese Befunde. Zudem belegen sie erstmalig, dass im arteriellen Sprouting-Assay Makrophagen und VEGF nicht zwei separate Parameter darstellen, sondern die Adventitia-abgeleiteten F4/80(+)-Makrophagen die Hauptquelle des VEGFs darstellen, denn die Depletion von Makrophagen durch Clodronat-Behandlung resultierte in den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen in einem fast kompletten Verschwinden von VEGF-positiven Zellen. Dementsprechend zeigten Aortenringe, welche mit Clodronat-Liposomen behandelt wurden, ein deutlich eingeschränktes Zellwachstum, begleitet von einer reduzierten Aussprossung und abnehmender Zelldichte im Kollagengel. Zudem wurden die sogenannten „*Cord-like-structures*“, welche die Grundlage für Kapillar-ähnliche Formationen bilden, reduziert. Nach Clodronat-Behandlung wurden deutlich weniger solcher Strukturen beobachtet. Ein weiterer Hinweis darauf, dass nach Clodronat-Behandlung das angiogenetische „*Sprouting*“ beeinträchtigt ist, ist die Tatsache, dass auch die sogenannten „*tip-cells*“, die ihre Filopodien in das Kollagengel ausstrahlen und somit den Weg für die Kapillarbildung vorbereiten, ebenfalls weniger geworden waren. Es kann also angenommen werden, dass durch die Clodronat-Behandlung und die damit verbundene Makrophagendepletion gleichzeitig dem System der von diesen Makrophagen endogen gebildete VEGF entzogen wurde, und dieser Vorgang letztendlich in einer signifikanten Beeinträchtigung der Gefäßneubildung resultierte.

Ein weiterer wichtiger Befund, der auf diesen lokalen Mechanismus hindeutet, ist die hier belegte Beobachtung, dass nach Clodronat-Behandlung, also der Depletion VEGF-positiver Adventitia-abgeleiteter Makrophagen, die CD34-positiven Zellen der adventitiellen „*Vaskulogenen Zone*“ besser in ihrer Nische erhalten blieben. Die mögliche Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass die meisten der adventitiellen Stammzellen VEGFR-2(Flk1)(+) sind und somit Ziel des von Makrophagen gebildeten und möglicherweise freigesetzten VEGF darstellen. Depletion von Makrophagen und somit Depletion des endogenen

VEGF eliminiert den wichtigen Stimulator und führt dazu, dass die Stamm- und Progenitorzellen in ihrer adventitiellen Nische bleiben.

VEGF-VEGFR-Signaling-System ist essentiell für die Mobilisierung und Differenzierung von adventitiellen Stamm- und Progenitorzellen

Um die Rolle von VEGF-induzierten Signalwegen bei der Aktivierung von VW-SCs besser analysieren zu können, wurde das VEGF-VEGFR-System im Sprouting-Assay blockiert und die Auswirkung dieser Blockade auf die adventitiellen Stammzellen studiert. Hierzu wurden die Mauseaortenringe mit der Substanz Lenvatinib (E7080) behandelt. Lenvatinib ist ein Multi-Kinase-Inhibitor und blockiert insbesondere die durch VEGF-vermittelte Angiogenese sowie Tumovaskularisierung in experimentellen Tumormodellen [219]. Seine Spezifität richtet sich unter anderem gegen die Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. Im aortalen „*Sprouting-Assay*“ ist davon auszugehen, dass eine Lenvatinib-Blockade vor allem im Hinblick auf VEGFR-2 von Bedeutung ist, da wie oben beschrieben und vielfach publiziert, ein wesentlicher Teil der adventitiellen Stamm- und Progenitorzellen den VEGFR-2 (Flk1) exprimieren und somit für die von diesem Rezeptor beeinflussten angiogenetische Prozesse von besonders großer Bedeutung sind [1, 96, 105].

In der vorliegenden Arbeit wurden „*Aortic Sprouting-Assays*“ unter Verwendung kleiner Geweberinge der murinen Aorta mit und ohne Zugabe von Lenvatinib (E7080) durchgeführt. Die hierdurch erzielten Ergebnisse zeigten zum einen eine Reduzierung der Aussprossung in Übereinstimmung mit den früher publizierten Befunden unserer und anderer Gruppen, sowie zum anderen eine deutliche Konservierung der adventitiellen „Vaskulogenen Zone“, wie die Evaluation der CD34(+)-Zellen nach Lenvatinib-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten aortalen „*Sprouting-Assays*“ ergab. Dieser Effekt von Lenvatinib war in der vorliegenden Arbeit direkt mit dem der Clodronat-Behandlung vergleichbar. Diese Versuche unterstreichen hierbei einerseits wieder die sehr wichtige Rolle von VEGF auf angiogenetische Prozesse und andererseits erstmalig auch die bisher nicht ausreichend berücksichtigte Bedeutung des von lokalen Gewebe-residenten Makrophagen gebildeten

VEGF in diesen Prozessen. Ein weiterer wichtiger Befund der hier durchgeführten Analysen ist, dass der von Adventitia-abgeleiteten Makrophagen gebildete VEGF offensichtlich nicht nur parakrin an adventitiellen Stammzellen wirksam wird, sondern auch für die weitere Entstehung und Erhaltung der adventitiellen Makrophagen von großer Bedeutung ist. Denn nach Behandlung mit Lenvatinib war auch die Anzahl der F4/80(+)-Zellen in der aortalen Adventitia und im umgebenden Kollagengel signifikant reduziert, was darauf schließen lässt, dass der von Makrophagen gebildete VEGF vermutlich in einem autokrinen Mechanismus wieder an den Makrophagen wirkt und somit deren Entstehung sowie Überleben beeinflusst.

5. Zusammenfassung

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass in adventitiellen Bereichen großer Gefäße eine Vielzahl multipotenter Stammzellen vorhanden ist. Die Beeinflussung dieser „Vaskulogenen Zone“ bietet ein enormes therapeutisches Potential, bspw. in der Beeinflussung der postnatalen Vaskulogenese oder prospektiv in der Behandlung vaskularisierender Tumore.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden murine Aorta-Explantate im experimentellen Ansatz des ARA über elf Tage kultiviert, erstmalig die Differenzierung zu F4/80(+)-Makrophagen gezeigt und eine nahezu vollständige Depletion dieser Zellen durch Clodronat-Liposomen bewirkt. Diese Adventitia-generierten Makrophagen wurden über immunhistochemische Fluoreszenz-Doppelfärbungen als die Hauptquelle des lokal gebildeten VEGF nachgewiesen. Die daraus resultierende Depletion des parakrin wirkenden VEGF resultierte in einer teilweisen Konservierung der CD34(+) „Vaskulogenen Zone“ der aortalen Adventitia. Zu der Bestätigung dieser Ergebnisse wurde experimentell über den VEGF-Rezeptor-Blocker E7080 in das VEGF-VEGFR-2 System eingegriffen und somit die Wirkung von VEGF auf Gefäßwand-residenten Zellen unterbunden. Die Versuchsansätze mit diesem Rezeptorblocker resultierten in einem ähnlichen Ergebnis wie die Versuche unter Makrophagen-Depletion. Dies unterstützt die These, dass F4/80(+)-Zellen die Hauptquelle des lokalen VEGF darstellen. Durch die Depletion phagozytierender Zellen konnte das „*Sprouting*“ kapillarähnlicher Gefäße unterdrückt und ebenfalls eine reduzierte Aussprossung von Zellen aus der Gefäßwand, sowie ihrer Vernetzung untereinander im Kollagengel festgestellt werden. Somit wird ein „*remodelling*“ der „Vaskulogenen Zone“ und die Migration und Proliferation von Zellen dieser Zone unterbunden. Dies bestätigt und unterstreicht die lokale proangiogenetische Wirkung Adventitia-abgeleiteten Makrophagen, deren Wirkungsmechanismus über dem VEGF-VEGF-Rezeptorsystem vermittelt zu werden scheint.

Durch eine gezielte Beeinflussung der „Vaskulogenen Zone“ und in Kombination mit der damit verbundenen Erreichbarkeit von Stammzellen im gesamten menschlichen Organismus sind die therapeutischen Ansätze enorm und vielversprechend, bedürfen aber weiterer translationaler Forschungsarbeiten, um die therapeutische Nutzbarkeit dieses Potenzials genauer ausloten zu können.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9:653-60.
- [2] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
- [3] Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mechanisms of development* 2001;100:157-63.
- [4] Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* 1995;11:73-91.
- [5] Luttun A. De novo vasculogenesis in the heart. *Cardiovascular research* 2003;58:378-89.
- [6] Asahara T. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 1997;275:964-6.
- [7] Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, et al. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997;89:981-90.
- [8] Hu Y, Zhang Z, Torsney E, Afzal AR, Davison F, Metzler B, et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* 2004;113:1258-65.
- [9] Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development (Cambridge, England)* 2006;133:1543-51.
- [10] Passman JN, Dong XR, Wu SP, Maguire CT, Hogan KA, Bautch VL, et al. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:9349-54.
- [11] Campagnolo P, Cesselli D, Al Haj Zen A, Beltrami AP, Krankel N, Katare R, et al. Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential. *Circulation* 2010;121:1735-45.
- [12] Majesky MW, Dong XR, Regan JN, Hognlund VJ. Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels. *Circ Res* 2011;108:365-77.
- [13] Psaltis PJ, Harbuzariu A, Delacroix S, Witt TA, Holroyd EW, Spoon DB, et al. Identification of a monocyte-predisposed hierarchy of hematopoietic progenitor cells in the adventitia of postnatal murine aorta. *Circulation* 2012;125:592-603.
- [14] Psaltis PJ, Puranik AS, Spoon DB, Chue CD, Hoffman SJ, Witt TA, et al. Characterization of a resident population of adventitial macrophage progenitor cells in postnatal vasculature. *Circ Res* 2014;115:364-75.
- [15] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-69.
- [16] Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozhiy S, et al. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 2010;116:829-40.

- [17] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
- [18] Detmar M. Tumor angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:20-3.
- [19] Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996;87:1153-5.
- [20] Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002;29:15-8.
- [21] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
- [22] Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin Oncol* 2002;29:3-9.
- [23] McDonald DM, Foss AJ. Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:109-20.
- [24] Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 1998;93:661-4.
- [25] Heil M, Schaper W. Cellular mechanisms of arteriogenesis. *Exs* 2005:181-91.
- [26] Benninghoff, Drenckhahn D. Anatomie, Band 2 Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie: Elsevier GmbH; 2004.
- [27] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-9.
- [28] Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-80.
- [29] Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2003;23:1185-9.
- [30] Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *American journal of physiology Cell physiology* 2004;287:C572-9.
- [31] Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 2001;26:25-35.
- [32] Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 1993;91:2235-43.
- [33] Liu Y, 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;77:638-43.
- [34] Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5.
- [35] Kalka C, Asahara T. Angiogenese und Vaskulogenese Therapeutische Strategien zur Stimulation der postnatalen Neovaskularisierung. *Herz Cardiovascular Diseases* 2000;6/2000:611-22.

- [36] Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:171-8.
- [37] Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106-12.
- [38] Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998;92:362-7.
- [39] Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:2885-90.
- [40] Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *The Annals of thoracic surgery* 1999;68:830-6; discussion 6-7.
- [41] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo j* 1999;18:3964-72.
- [42] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, et al. Vascular Endothelial Growth Factor165 Gene Transfer Augments Circulating Endothelial Progenitor Cells in Human Subjects. *Circulation Research* 2000;86:1198-202.
- [43] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307.
- [44] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
- [45] Bouis D, Kusumanto Y, Meijer C, Mulder NH, Hospers GA. A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharmacological research* 2006;53:89-103.
- [46] Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:15-23.
- [47] Moldovan NI. Role of monocytes and macrophages in adult angiogenesis: a light at the tunnel's end. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:179-94.
- [48] Cheresh DA, Stupack DG. Regulation of angiogenesis: apoptotic cues from the ECM. *Oncogene* 2008;27:6285-98.
- [49] Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochimica et biophysica acta* 2004;1654:13-22.
- [50] Pozzi A, Zent R. Regulation of endothelial cell functions by basement membrane- and arachidonic acid-derived products. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine* 2009;1:254-72.
- [51] Zhou Y, Yan H, Guo M, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Reactive oxygen species in vascular formation and development. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2013;2013:374963.
- [52] Mettouchi A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. *Cell adhesion & migration* 2012;6:528-34.
- [53] Eelen G, Cruys B, Welte J, De Bock K, Carmeliet P. Control of vessel sprouting by genetic and metabolic determinants. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2013;24:589-96.
- [54] Tecchio C, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines involved in physiological and pathological angiogenesis. *Chem Immunol Allergy* 2014;99:123-37.

- [55] De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab* 2013;18:634-47.
- [56] Pugh C, Ratcliffe P. Regulation of angiogenesis by hypoxia- role of the HIF system. *Nature Medicine* 2003;9.
- [57] Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8:464-78.
- [58] Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003;161:1163-77.
- [59] Kurz H, Gartner T, Egli PS, Christ B. First blood vessels in the avian neural tube are formed by a combination of dorsal angioblast immigration and ventral sprouting of endothelial cells. *Developmental biology* 1996;173:133-47.
- [60] Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes & development* 2002;16:2684-98.
- [61] Ribatti D, Crivellato E. "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. *Developmental biology* 2012;372:157-65.
- [62] Nielsen BS, Sehested M, Kjeldsen L, Borregaard N, Rygaard J, Dano K. Expression of matrix metalloproteinase-9 in vascular pericytes in human breast cancer. *Lab Invest* 1997;77:345-55.
- [63] Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;3:301-13.
- [64] Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008;102:77-85.
- [65] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438:967-74.
- [66] Fidler IJ. Angiogenesis and cancer metastasis. *Cancer J* 2000;6 Suppl 2:S134-41.
- [67] Secomb TW, Alberding JP, Hsu R, Dewhirst MW, Pries AR. Angiogenesis: an adaptive dynamic biological patterning problem. *PLoS computational biology* 2013;9:e1002983.
- [68] Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007;445:776-80.
- [69] Benedito R, Rocha SF, Woeste M, Zamykal M, Radtke F, Casanovas O, et al. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature* 2012;484:110-4.
- [70] Kume T. Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. *Advances in experimental medicine and biology* 2012;727:210-22.
- [71] Blanco R, Gerhardt H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a006569.
- [72] Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 2005;97:1093-107.

- [73] Berthod F, Germain L, Tremblay N, Auger FA. Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *Journal of cellular physiology* 2006;207:491-8.
- [74] Dimmeler S, Zeiher AM. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res* 2000;87:434-9.
- [75] Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:11205-10.
- [76] Takuwa Y, Du W, Qi X, Okamoto Y, Takuwa N, Yoshioka K. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World journal of biological chemistry* 2010;1:298-306.
- [77] Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-93.
- [78] Hudlicka O, Wright AJ, Ziada AM. Angiogenesis in the heart and skeletal muscle. *The Canadian journal of cardiology* 1986;2:120-3.
- [79] Egginton S, Zhou AL, Brown MD, Hudlicka O. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovascular research* 2001;49:634-46.
- [80] Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, et al. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* 2000;436:257-70.
- [81] Cai WJ, Kocsis E, Wu X, Rodriguez M, Luo X, Schaper W, et al. Remodeling of the vascular tunica media is essential for development of collateral vessels in the canine heart. *Mol Cell Biochem* 2004;264:201-10.
- [82] Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Luo X, et al. Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2003;284:H31-40.
- [83] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American journal of physiology Cell physiology* 2001;280:C1358-66.
- [84] Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 1989;8:3801-6.
- [85] Leung G, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen. *Science* 1989;246.
- [86] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
- [87] 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. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 1991;5:1806-14.
- [88] Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:2126-31.
- [89] Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci* 2001;114:853-65.

- [90] Wiesmann C, Fuh G, Christinger HW, Eigenbrot C, Wells JA, de Vos AM. Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor. *Cell* 1997;91:695-704.
- [91] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews* 2004;25:581-611.
- [92] Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2006;63:601-15.
- [93] Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature reviews Cancer* 2002;2:573-83.
- [94] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7:192-8.
- [95] Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood cells, molecules & diseases* 2007;38:258-68.
- [96] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
- [97] Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:13313-6.
- [98] Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *The American journal of physiology* 1998;274:H1054-8.
- [99] Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:11947-54.
- [100] Sheen IS, Jeng KS, Shih SC, Kao CR, Chang WH, Wang HY, et al. Clinical significance of the expression of isoform 165 vascular endothelial growth factor mRNA in noncancerous liver remnants of patients with hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2005;11:187-92.
- [101] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* 1997;18:4-25.
- [102] Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20:4368-80.
- [103] Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 2003;28:488-94.
- [104] Kiriakidis S, Andreacos E, Monaco C, Foxwell B, Feldmann M, Paleolog E. VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor I-kappaBalpha and a kinase-defective form of the I-kappaB kinase 2. *J Cell Sci* 2003;116:665-74.

- [105] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376:62-6.
- [106] Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature reviews Cancer* 2002;2:727-39.
- [107] Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management* 2006;2:213-9.
- [108] Paz K, Zhu Z. Development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor receptor 2. Current status and future perspective. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2005;10:1415-39.
- [109] Pavlidis ET, Pavlidis TE. Role of bevacizumab in colorectal cancer growth and its adverse effects: a review. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2013;19:5051-60.
- [110] Kramer I, Lipp HP. Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 2007;32:1-14.
- [111] Campa C, Harding SP. Anti-VEGF compounds in the treatment of neovascular age related macular degeneration. *Current drug targets* 2011;12:173-81.
- [112] Yamamoto Y, Matsui J, Matsushima T, Obaishi H, Miyazaki K, Nakamura K, et al. Lenvatinib, an angiogenesis inhibitor targeting VEGFR/FGFR, shows broad antitumor activity in human tumor xenograft models associated with microvessel density and pericyte coverage. *Vascular cell* 2014;6:18.
- [113] Matsui J, Yamamoto Y, Funahashi Y, Tsuruoka A, Watanabe T, Wakabayashi T, et al. E7080, a novel inhibitor that targets multiple kinases, has potent antitumor activities against stem cell factor producing human small cell lung cancer H146, based on angiogenesis inhibition. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2008;122:664-71.
- [114] Altun A, Temiz TK, Balci E, Polat ZA, Turan M. Effects of tyrosine kinase inhibitor E7080 and eNOS inhibitor L-NIO on colorectal cancer alone and in combination. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 2013;25:572-84.
- [115] Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639-48.
- [116] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
- [117] Beddington RS, Robertson EJ. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* 1989;105:733-7.
- [118] Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 2006;7:333-7.
- [119] Nicosia RF, T'chao R, Leighton J. Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In vitro* 1982;18:538-49.
- [120] Shinjir K, Mizuki F, Hitoshi K, Sumino Y, Ikuko K. A quantitative Assay for Angiogenesis of cultured choroidal Tissues in Streptozotocin- Diabetic Wistar and Spontaneously Diabetic GK Rats. *Jpn J Pharmacol* 1998;78:471-8.

- [121] Brown KJ, Maynes SF, Bezos A, Maguire DJ, Ford MD, Parish CR. A novel in vitro assay for human angiogenesis. *Lab Invest* 1996;75:539-55.
- [122] Bocci G, Danesi R, Benelli U, Innocenti F, Di Paolo A, Fogli S, et al. Inhibitory effect of suramin in rat models of angiogenesis in vitro and in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43:205-12.
- [123] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005;438:932-6.
- [124] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
- [125] Ergun S, Tilki D, Klein D. Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:981-95.
- [126] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer cell* 2007;11:69-82.
- [127] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119:2204-13.
- [128] De Angelis L, Berghella L, Coletta M, Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, et al. Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol* 1999;147:869-78.
- [129] Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005;121:1109-21.
- [130] Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Cote D, Means TK, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 2005;435:969-73.
- [131] Lin G, Nig H. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells and Development* 2008;17 No. 6: 1053-1063.
- [132] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *Journal of cellular physiology* 2006;208:64-76.
- [133] Suga H, Matsumoto D, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:1201-10.
- [134] Alessandri G, Girelli M, Taccagni G, Colombo A, Nicosia R, Caruso A, et al. Human vasculogenesis ex vivo: embryonal aorta as a tool for isolation of endothelial cell progenitors. *Lab Invest* 2001;81:875-85.
- [135] Ergun S, Hohn HP, Kilic N, Singer BB, Tilki D. Endothelial and hematopoietic progenitor cells (EPCs and HPCs): hand in hand fate determining partners for cancer cells. *Stem cell reviews* 2008;4:169-77.
- [136] Ergun S, Tilki D, Hohn HP, Gehling U, Kilic N. Potential implications of vascular wall resident endothelial progenitor cells. *Thromb Haemost* 2007;98:930-9.
- [137] Invernici G, Emanuelli C, Madeddu P, Cristini S, Gadau S, Benetti A, et al. Human fetal aorta contains vascular progenitor cells capable of inducing vasculogenesis, angiogenesis, and myogenesis in vitro and in a murine model of peripheral ischemia. *Am J Pathol* 2007;170:1879-92.

- [138] Klein D, Hohn HP, Kleff V, Tilki D, Ergun S. Vascular wall-resident stem cells. *Histol Histopathol* 2010;25:681-9.
- [139] Pasquinelli G, Tazzari PL, Vaselli C, Foroni L, Buzzi M, Storci G, et al. Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 2007;25:1627-34.
- [140] Tilki D, Hohn HP, Ergun B, Rafii S, Ergun S. Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. *Trends in molecular medicine* 2009;15:501-9.
- [141] Alessandri G., Girelli M., Taccagni G., Colombo A., Nicosia R., Caruso A., et al. Human Vasculogenesis Ex Vivo: Embryonal Aorta as a Tool for Isolation of Endothelial Cell Progenitors. *LABORATORY INVESTIGATION* 2001;81.
- [142] Barger AC, Beeuwkes R, 3rd, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1984;310:175-7.
- [143] Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, et al. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* 2006;168:659-69.
- [144] Davie NJ, Crossno JT, Jr., Frid MG, Hofmeister SE, Reeves JT, Hyde DM, et al. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L668-78.
- [145] Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 2006;124:175-89.
- [146] Bot I, de Jager SC, Zerneck A, Lindstedt KA, van Berkel TJ, Weber C, et al. Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2007;115:2516-25.
- [147] Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, et al. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res* 2009;104:541-9.
- [148] Robinson ST, Taylor WR. Beyond the adventitia: exploring the outer limits of the blood vessel wall. *Circ Res* 2009;104:416-8.
- [149] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- [150] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-74.
- [151] Santoro MM, Pesce G, Stainier DY. Characterization of vascular mural cells during zebrafish development. *Mechanisms of development* 2009;126:638-49.
- [152] Nathan C. Metchnikoff's Legacy in 2008. *Nat Immunol* 2008;9:695-8.
- [153] Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 1999;17:593-623.
- [154] Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953-64.
- [155] Ensan S, Li A, Besla R, Degousee N, Cosme J, Roufaiel M, et al. Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat Immunol* 2016;17:159-68.

- [156] Stefater JA, 3rd, Ren S, Lang RA, Duffield JS. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends in molecular medicine* 2011;17:743-52.
- [157] Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009;29:1412-8.
- [158] Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014;41:14-20.
- [159] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016;12:1-222.
- [160] Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology* 2000;164:6166-73.
- [161] Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacological reviews* 2011;63:218-42.
- [162] Syggelos SA, Aletras AJ, Smirlaki I, Skandalis SS. Extracellular matrix degradation and tissue remodeling in periprosthetic loosening and osteolysis: focus on matrix metalloproteinases, their endogenous tissue inhibitors, and the proteasome. *BioMed research international* 2013;2013:230805.
- [163] Krstic J, Santibanez JF. Transforming growth factor-beta and matrix metalloproteinases: functional interactions in tumor stroma-infiltrating myeloid cells. *TheScientificWorldJournal* 2014;2014:521754.
- [164] Baay M, Brouwer A, Pauwels P, Peeters M, Lardon F. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clinical & developmental immunology* 2011;2011:565187.
- [165] Knudsen NH, Lee CH. Identity Crisis: CD301b(+) Mononuclear Phagocytes Blur the M1-M2 Macrophage Line. *Immunity* 2016;45:461-3.
- [166] Kumamoto Y, Camporez JPG, Jurczak MJ, Shanabrough M, Horvath T, Shulman GI, et al. CD301b(+) Mononuclear Phagocytes Maintain Positive Energy Balance through Secretion of Resistin-like Molecule Alpha. *Immunity* 2016;45:583-96.
- [167] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 2002;23:549-55.
- [168] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:787-95.
- [169] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
- [170] Holgate ST. The role of mast cells and basophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 2000;30 Suppl 1:28-32.
- [171] Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Current opinion in immunology* 2006;18:49-53.
- [172] Salamonsen LA, Hannan NJ, Dimitriadis E. Cytokines and chemokines during human embryo implantation: roles in implantation and early placentation. *Semin Reprod Med* 2007;25:437-44.

- [173] Yan ZQ, Hansson GK. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev* 2007;219:187-203.
- [174] Bopst M, Haas C, Car B, Eugster HP. The combined inactivation of tumor necrosis factor and interleukin-6 prevents induction of the major acute phase proteins by endotoxin. *European journal of immunology* 1998;28:4130-7.
- [175] Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormone, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2002;966:290-303.
- [176] Cavillom JM. Cytokines and macrophages. *Biomed & Pharma* 1994;48:445-53.
- [177] Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:259-70.
- [178] Nucera S, Biziato D, De Palma M. The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *The International journal of developmental biology* 2011;55:495-503.
- [179] Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010;141:39-51.
- [180] Gelati M, Aplin AC, Fogel E, Smith KD, Nicosia RF. The angiogenic response of the aorta to injury and inflammatory cytokines requires macrophages. *Journal of immunology* 2008;181:5711-9.
- [181] Compston JE. The therapeutic use of bisphosphonates. *BMJ* 1994;309:711-5.
- [182] Russell RG, Rogers MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999;25:97-106.
- [183] Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000;289:1508-14.
- [184] Monkkonen J, Heath TD. The effects of liposome-encapsulated and free clodronate on the growth of macrophage-like cells in vitro: the role of calcium and iron. *Calcified tissue international* 1993;53:139-46.
- [185] Pelorgeas S, Martin JB, Satre M. Cytotoxicity of dichloromethane diphosphonate and of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate in the amoebae of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. A ³¹P NMR study. *Biochem Pharmacol* 1992;44:2157-63.
- [186] Claassen I, Van Rooijen N, Claassen E. A new method for removal of mononuclear phagocytes from heterogeneous cell populations in vitro, using the liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *Journal of immunological methods* 1990;134:153-61.
- [187] Qian Q, Jutila MA, Van Rooijen N, Cutler JE. Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. *Journal of immunology* 1994;152:5000-8.
- [188] Schmidt-Weber CB, Rittig M, Buchner E, Hauser I, Schmidt I, Palombo-Kinne E, et al. Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes. *Journal of leukocyte biology* 1996;60:230-44.
- [189] Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2000;88:2961-78.

- [190] Monkkonen H, Rogers MJ, Makkonen N, Niva S, Auriola S, Monkkonen J. The cellular uptake and metabolism of clodronate in RAW 264 macrophages. *Pharmaceutical research* 2001;18:1550-5.
- [191] Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, et al. Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nature protocols* 2011;7:89-104.
- [192] Bellacen K, Lewis EC. Aortic ring assay. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2009.
- [193] Lang G. *Histotechnik, Praxisbuch für die Biomedizinische Analytik* 2006.
- [194] Boenisch T. *Immunochemical Staining Methods* 3rd Edition. 2001.
- [195] Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, Olert J, Brauning W, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Establishment and characterization of an angiosarcoma-derived cell line, AS-M. *Endothelium* 2003;10:319-28.
- [196] Zengin E., Chalajour F., Gehling UM., Ito WD., Treede H., Lauke H., et al. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *DEVELOPMENT AND DISEASE* 2006;133.
- [197] Rizzino A. The Sox2-Oct4 Connection: Critical Players in a Much Larger Interdependent Network Integrated at Multiple Levels. *Stem cells* 2013;31:1033-9.
- [198] Krautler NJ, Kana V, Kranich J, Tian Y, Perera D, Lemm D, et al. Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell* 2012;150:194-206.
- [199] Shvitiel S, Kollet O, Lapid K, Schajnovitz A, Goichberg P, Kalinkovich A, et al. CD45 regulates retention, motility, and numbers of hematopoietic progenitors, and affects osteoclast remodeling of metaphyseal trabeculae. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:2381-95.
- [200] Tang Z, Wang A, Yuan F, Yan Z, Liu B, Chu JS, et al. Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nature communications* 2012;3:875.
- [201] Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nature neuroscience* 2007;10:1538-43.
- [202] Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature* 2015;518:547-51.
- [203] Klein D, Weisshardt P, Kleff V, Jastrow H, Jakob HG, Ergun S. Vascular wall-resident CD44+ multipotent stem cells give rise to pericytes and smooth muscle cells and contribute to new vessel maturation. *PLoS one* 2011;6:e20540.
- [204] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-37.
- [205] O'Garra A, Murphy K. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Current opinion in immunology* 1994;6:458-66.
- [206] Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *Journal of leukocyte biology* 2011;89:557-63.
- [207] Zorzi P, Aplin AC, Smith KD, Nicosia RF. Technical Advance: The rat aorta contains resident mononuclear phagocytes with proliferative capacity and proangiogenic properties. *Journal of leukocyte biology* 2010;88:1051-9.

- [208] Taviani M, Zheng B, Oberlin E, Crisan M, Sun B, Huard J, et al. The vascular wall as a source of stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1044:41-50.
- [209] Passman JN., Dong XR., Wu SP., Maguire CT., Hogan KA., Bautch VL., et al. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1 smooth muscle progenitor cells. *PNAS* 2008;105.
- [210] Kawabe J, Hasebe N. Role of the vasa vasorum and vascular resident stem cells in atherosclerosis. *BioMed research international* 2014;2014:701571.
- [211] Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;105:2783-6.
- [212] Sainz J, Al Haj Zen A, Caligiuri G, Demerens C, Urbain D, Lemitre M, et al. Isolation of "side population" progenitor cells from healthy arteries of adult mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2006;26:281-6.
- [213] Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Bostrom K, et al. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 2003;108:2505-10.
- [214] Hoshino A, Chiba H, Nagai K, Ishii G, Ochiai A. Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2008;368:305-10.
- [215] Nicosia RF, Zorzi P, Ligresti G, Morishita A, Aplin AC. Paracrine regulation of angiogenesis by different cell types in the aorta ring model. *The International journal of developmental biology* 2011;55:447-53.
- [216] Fong GH, Rossant J, Gertszenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-70.
- [217] Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development (Cambridge, England)* 1999;126:3015-25.
- [218] Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-42.
- [219] Wiegering A, Korb D, Thalheimer A, Kammerer U, Allmanritter J, Matthes N, et al. E7080 (lenvatinib), a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, demonstrates antitumor activities against colorectal cancer xenografts. *Neoplasia (New York, NY)* 2014;16:972-81.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. VEGF und seine Rezeptoren (modifiziert nach [95]).....	10
Abbildung 2. Interaktion von VEGF mit VEGFR-1, -2, -3 und Neuropilin 1 und 2 (modifiziert nach [95]).....	12
Abbildung 3. Grundstrukturen der Gefäßwand (modifiziert nach [125]).....	17
Abbildung 4. Gefäßwand- residente Nischen für Stamm- und Progenitorzellen (Abgeändert nach [125])	19
Abbildung 5: Präparationsschema ARA (modifiziert nach [191]).....	42
Abbildung 6: Schematische („Y-ähnliche“) Darstellung eines IgG-Antikörpers (Modifiziert nach [194])	49
Abbildung 7: Indirekte Methode der IHC-Färbung (Modifiziert nach [195]).	50
Abbildung 8: Indirekte Methode der DAB IHC-Färbung (Modifiziert nach [195]).	52
Abbildung 9: Bildbearbeitung mit der Threshold-Funktion des Programmes <i>Image J.</i>	61
Abbildung 10: Aortales „ <i>Sprouting-Assay</i> “ in Kultur ohne weitere Behandlung (A/B) und nach HE-Färbung, ohne weitere Behandlung (C/D)	64
Abbildung 11: Färbeprofil gegen CD34 (a), VEGFR-2 (b), Sox-2 (c) und Oct-4 (d) an frisch isolierten Aortenexplantaten ohne weiterer Behandlung (FIA)	66
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung für CD31 und α -SMA nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen	68
Abbildung 13: Generierung von Makrophagen im „ <i>Aortic Ring Assay</i> “ (ARA) ..	71
Abbildung 14: Makrophagendepletion via Clodronatliposomen	74
Abbildung 15: Statistische Auswertung der F4/80(+) Makrophagen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=4), PBS- Liposomen (PBS-liposomes/n=5), ohne weitere Behandlung (Untreated/n=4) und ohne Kultivierung (FIA/n=3)	76
Abbildung 16: Lichtmikroskopischer Vergleich des Zellwachstums von elf Tage kultivierten Aortenringen ohne weitere Behandlung (ARA) (a/b) zu Clodronat elf Tage kultivierten Aortenringen mit Clodronat-Liposomen Behandlung (ARA+Cl-L) (c/d)	78
Abbildung 17: Statistische Auswertung der CD34(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen(Clodronate/n=6), PBS- Liposomen(PBS-liposomes/n=4), ohne Behandlung(Untreated/n=4) und ohne Kultivierung(FIA/n=3)	81
Abbildung 18: Statistische Auswertung der CD34(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung der Aortenringe mit Clodronat-Liposomen (clodronate- liposomes), PBS-Liposomen (control-liposomes), ohne Behandlung (no treatment) und ohne Kultivierung (FIA)	83
Abbildung 19: Immunhistochemische Färbungen für CD34 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen.....	85
Abbildung 20: Statistische Auswertung der CD31(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=5), PBS-Liposomen	

(PBS-liposomes/n=4), ohne Behandlung (untreated/n=5) und ohne Kultivierung (FIA/n=3)	88
Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung für CD31 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen.....	90
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung für CD44 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen.....	93
Abbildung 23: Statistische Auswertung der CD44(+) Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=4), PBS-Liposomen (PBS-liposomes/n=5), ohne Behandlung (Untreated/n=4) und ohne Kultivierung (FIA/n=5)	95
Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung für CD45 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen.....	98
Abbildung 25. Statistische Auswertung der CD45(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=4), PBS-Liposomen (PBS-Liposomes/n=4), ohne Behandlung (Untreated/n=4) und ohne Kultivierung (FIA/n=2)	100
Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung für Ki67 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen.....	103
Abbildung 27: Statistische Auswertung der Ki67(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=3), PBS-Liposomen (PBS-Liposomes/n=4), ohne Behandlung (Untreated/n=4) und ohne Kultivierung (FIA/n=3)	105
Abbildung 28: Immunhistochemische Färbung für VEGF nach elf Tagen Zellkultur unter verschiedenen Bedingungen.....	108
Abbildung 29: Statistische Auswertung der VEGF(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit Clodronat-Liposomen (Clodronate/n=3), PBS-Liposomen (PBS-Liposomes/n=3), ohne Behandlung (Untreated/n=3) und ohne Kultivierung (FIA/n=3)	110
Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Doppelfärbung für VEGF-A und F4/80 nach elf Tagen Kultivierung ohne weitere Behandlung (unbehandelt/n=7)	112
Abbildung 31: Immunhistochemische Färbung für F4/80 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen.....	115
Abbildung 32: Immunhistochemische Färbung für CD34 nach elf Tagen Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen.....	116
Abbildung 33: Statistische Auswertung der CD34(+)-Zellen nach elf Tagen Kultivierung mit E7080 Behandlung in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Zugabe von VEGF sowie ohne Kultivierung (FIA)	118

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allgemeine Materialien	29
Tabelle 2: Geräte.....	30
Tabelle 3: Chemikalien.....	33
Tabelle 4: Kits.....	33
Tabelle 5: Software	34
Tabelle 6: Verwendete Erstantikörper	35
Tabelle 7: Verwendete Zweitantikörper.....	36
Tabelle 8: Lösungen und Puffer	38
Tabelle 9.: Zusammensetzung des Kollagengels.....	40
Tabelle 10.: Versuchsgruppen der ARA-Kultivierungen.....	41
Tabelle 11: Fluoreszenzfarbstoffe	53
Tabelle 12: Antikörper, Spezies und Reaktivität.....	53
Tabelle 13: Verwendete Antikörperkonzentrationen	54
Tabelle 14: PAP-Verstärkung, Entwicklungsdauer und „Antigen-Retrival“.....	55

9. Abkürzungsverzeichnis

z.B.	zum Beispiel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	VEGF Rezeptor
EPC	endotheliale Progenitorzelle
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
FGF	Fibroblast Growth Factor
MMP	Matrix-Metalloprotease
bspw.	beispielsweise.
ARA	Aortic Ring Assay
MSC	Mesenchymale Stammzelle
VW-SC	Gefäßwand residente Stammzelle
IL	Interleukin
NO	Stickstoffmonoxid
EGF	Epidermal Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TGF	Transforming Growth Factor
IFN	Interferone
CSF	Kolonie Stimulierender Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
s.o.	siehe oben
PFA	Paraformaldehyd
OT	Objektträger
Abb.	Abbildung.
dest.	destilliert.
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
nM	Nanomolar
DAB	3,3-Diaminobenzidin-

	Tetrahydrochlorid
DAPI	Diamino- Phyliindol
IHC	Immunhistochemie
dH2O	destilliertes Wasser
RT	Raumtemperatur
PBS	Phosphat Buffered Saline
ABC	Avidin Biotin Complex
E7080	Lenvatinib
Len	Lenvatinib
PB	Phosphate Buffer
(+)	positiv
(-)	negativ
HE	Hämatoxylin Eosin
FIA	Fresh Isolated Aorta
wt	wildtypisch
Cl-L	Clodronat Liposom
rb	rabbit
rt	rat
m	mouse
h	human
gt	goat
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
L	Liter
g	Gramm
ng	Nanogramm
°C	Grad Celsius
min	Minute
Nr.	Nummer

kDa	Kilodalton
MHC	Main Histocompatibility Complex
iNOS	inducible NO Synthase
vw	Gefäßwand
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PDGFR	PDGF Receptor
EC	Endothelzelle
PC	Perizyt
OEL	Äußere elastische Membran
BL	Basallamina
IEL	Innere elastische Membran
I	Intima
M	Media
A	Adventitia
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
bzw.	beziehungsweise
etc.	ecetara

10. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün für die Überlassung des Themas dieser Dissertation. Ich bedanke mich für die hervorragende Betreuung während meiner Arbeit und für sein außergewöhnliches Engagement und seine gute Beratung bei der Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. Jan Allmanritter danke ich für seine Unterstützung und Förderung bei der Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Verena Pfeiffer danke ich für die anhaltende Unterstützung, und Hilfe bei der Anfertigung der Statistiken dieser Arbeit.

Frau Ursula Roth danke ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die praktischen Tätigkeiten dieser Arbeit, ihre stets vorhanden Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit.

Frau Erna Kleinschroth danke ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die praktischen Tätigkeiten dieser Arbeit und die Hilfe bei der Paraffineinbettung der Aorten- Präparate.

Herrn Florian Kleefeldt danke ich für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau Valeria Mauro danke ich für die wunderbare Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne ihren stetigen Zuspruch und ihre Hilfe wäre diese Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen.

Meinen Eltern Georgia und Hermann Eckner danke ich ganz besonders für ihre unendliche Hilfe und ständige Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Erstellung dieser Dissertation. Durch ihre Hilfe wurde diese Arbeit erst möglich.