

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
(im Walter-Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
ehem. Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl
kommissar. Vorstand: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Charakterisierung der funktionalen Rolle des Zytokins Midkine bei der Arteriogenese



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Lautz

aus
Lüneburg

2018

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
(im Walter-Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
ehem. Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl
kommissar. Vorstand: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Charakterisierung der funktionalen Rolle des Zytokins Midkine bei der Arteriogenese



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Lautz

aus
Lüneburg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Elisabeth Deindl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Schober
Prof. Dr. med. Christian Kupatt
PD. Dr. med. Bruno C. Huber

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.4.2018

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Therapiemöglichkeiten	1
1.2	Entwicklung von Blutgefäßen	2
1.2.1	Vaskulogenese	2
1.2.2	Angiogenese	2
1.2.3	Arteriogenese	4
1.2.3.1	Klinische Relevanz der Arteriogenese	5
1.2.3.2	Auslöser der Arteriogenese und Abgrenzung zur Angiogenese	5
1.2.3.3	Zeitlicher Ablauf der Arteriogenese	7
1.2.3.4	Leukozyten in der Arteriogenese	8
1.2.3.5	Funktion des VEGF-Signalwegs bei der Arteriogenese	9
1.2.3.6	Rolle von Stickstoffmonoxid in der Arteriogenese	10
1.3	Mausmodell der peripheren Arteriogenese	11
1.4	Midkine	13
1.4.1	Rezeptoren für Midkine	13
1.4.2	Einfluss von Midkine auf die Angiogenese	14
1.4.3	Einfluss von Midkine auf die Rekrutierung von Leukozyten	15
2	Zielsetzung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Geräte und Instrumente	17
3.1.2	Verbrauchsmaterial	18
3.1.3	Lösungen und Substanzen	19
3.1.4	Herstellung von Lösungen	21
3.1.4.1	Adenosin-Lösung	21
3.1.4.2	Kollagenase-Lösung	21
3.1.4.3	30% und 15% Saccharose-Lösung	21
3.1.4.4	Puffer für Knochenmarkstransplantationen	21
3.1.4.5	Trinkwasser für Knochenmarkstransplantationen	21
3.1.4.6	BSA-Puffer	22
3.2	Mäuse	22
3.3	Methoden	22
3.3.1	Genotypisierung	22
3.3.2	Ligatur der A. femoralis	24
3.3.3	Laser-Doppler-Imaging	25
3.3.4	„Active Foot Movement Score“	26
3.3.5	Gewebeentnahme	26
3.3.6	Bestimmung des Midkine Plasmaspiegels	28
3.3.7	Bestimmung des VEGF-A Plasmaspiegels	29
3.3.8	Histologische Analysen	29
3.3.9	Immunhistochemische Färbungen gegen Bromdesoxyuridin	30
3.3.10	Immunfluoreszenzfärbung von Kollateralen	31
3.3.11	Bestimmung der Genexpression	32
3.3.12	<i>In Vitro</i> Versuche	35
3.3.12.1	Isolierung von Endothelzellen	35
3.3.12.2	Isolierung von glatten Gefäßmuskelzellen	36
3.3.12.3	Bromdesoxyuridin Inkorporation in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen <i>in vitro</i>	36
3.3.13	Knochenmarkstransplantation	37
3.3.14	Statistische Analysen und Abbildungen	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Einfluss von Midkine auf die Arteriogenese	39
4.1.1	Durchblutung der Pfoten nach Ligatur	39
4.1.2	„Active Foot Movement Score“ nach Ligatur	40
4.1.3	Makroskopische Analyse der Kollateralen	41
4.1.4	Morphologische Analysen der Kollateralen	41
4.1.5	Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen in Kollateralen	44
4.2	Quellen von endogenem Midkine	46

4.2.1	Midkine Expression in isolierten Kollateralen	46
4.2.2	Midkine Spiegel im Plasma	46
4.2.3	Lokalisation von Midkine im Gewebe bei der Arteriogenese	47
4.2.4	Einfluss von Midkine aus Zellen des Knochenmarks	48
4.3	Einfluss von exogenem Midkine auf die Arteriogenese	51
4.4	Einfluss von Midkine auf die NO-Synthasen	53
4.4.1	Expression der NO-Synthasen in isolierten Kollateralen.....	53
4.4.2	Einfluss von exogenem NO auf die Arteriogenese	54
4.5	Einfluss von Midkine auf die Proliferation von primären vaskulären Zellen <i>in vitro</i>	56
4.5.1	Expression der NO-Synthasen in isolierten Endothelzellen	56
4.5.2	Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskulzellen <i>in vitro</i>	56
4.6	Zusammenspiel von Midkine und VEGF-A in der Arteriogenese	58
4.6.1	VEGF-A Spiegel nach Ligatur	59
4.6.2	Einfluss von exogenem VEGF-A auf die Arteriogenese	60
4.6.3	Einfluss des VEGF-Signalwegs auf die Proliferation <i>in vitro</i>	62
5	Diskussion.....	64
5.1	Bewertung des verwendeten Tiermodells	64
5.2	Interpretation der Ergebnisse	66
5.2.1	Midkine beeinflusst die Proliferation von Endothelzellen in wachsenden Kollateralen	66
5.2.2	Midkine aus Leukozyten ist essentiell für die Arteriogenese.....	70
5.2.3	Exogenes Midkine steigert die Vasodilatation nach Ligatur	72
5.2.4	Endothelzellenproliferation in Kollateralen ist abhängig von NO-Synthasen	73
5.2.5	Beteiligung von VEGF-A	76
5.3	Fazit.....	79
5.4	Klinische Relevanz und Ausblick.....	81
6	Zusammenfassung	84
7	Literaturverzeichnis	86
8	Danksagung	95
9	Lebenslauf	96
10	Abkürzungsverzeichnis.....	98
11	Abbildungsverzeichnis.....	100
12	Tabellenverzeichnis	101
13	Eidesstattliche Versicherung.....	102

1 Einleitung

1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Therapiemöglichkeiten

Die gesundheitlichen Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weiterhin die häufigsten Todesursachen der Welt.^{1,2} Im Jahr 2015 sind weltweit schätzungsweise 17,8 Millionen Menschen an den Folgen von kardiovaskulären Erkrankungen gestorben. Das sind circa 31,1% der gesamten Todesfälle weltweit.³ Von diesen 17,8 Millionen Menschen litten 7,6 Millionen an Koronarer Herzkrankheit und 6,7 Millionen Menschen erlitten einen Schlaganfall. Beide Krankheiten werden durch den Verschluss eines arteriellen Gefäßes verursacht. Bis 2030 wird die Zahl der Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf schätzungsweise 22,2 Millionen steigen und weiterhin die häufigste Todesursache weltweit sein.^{3,4}

Der Hauptgrund für Gefäßverschlusskrankheiten ist die Arteriosklerose. Hierbei kommt es zur Ablagerung von Bluffetten, Bindegewebe und Thromben in den Gefäßwänden von Arterien. Embolien, Thromben und Traumata sind die Gründe für den akuten Verschluss von Gefäßen. Risikofaktoren für die Entstehung von Arteriosklerose sind hohes Alter, männliches Geschlecht, Raucheranamnese, Hypertonie und Krankheiten wie Diabetes mellitus oder chronisches Nierenversagen.⁵

Für den Verschluss von arteriellen Gefäßen haben sich verschiedene interventionelle und operative Behandlungsmöglichkeiten etabliert. Eine Erweiterung der Gefäße mittels Ballonkatheterisierung und Stent-Implantation oder eine offene Bypass Operation sind möglich. Über die Jahre sind sowohl die Mortalität als auch die Morbidität dieser Methoden stark gesunken.⁶ In Zukunft stellt die Überalterung des Patientenkollektivs ein großes Problem dar, da die Patienten mit steigendem Alter aufgrund von vielen Komorbiditäten häufig inoperabel sind. Bereits heute sind in 20-30% der Fälle keine der genannten Behandlungsmöglichkeiten anwendbar, da die Arteriosklerose zu weit vorangeschritten ist.⁷ Außerdem kommt es häufig zu einem erneuten Verschluss des Gefäßes oder des eingesetzten Stents.

Eine alternative Möglichkeit die Blutversorgung zu verbessern besteht darin, das Wachstum von vorhanden, arteriellen Umgehungskreisläufen, sogenannten Kollateralen, zu beschleunigen.^{7,8} Schon in den sechziger Jahren wurden präexistierende Kollateralkreisläufe am menschlichen Herzen entdeckt.^{9,10} Beim Verschluss eines arteriellen Gefäßes kommt es zum Wachstum dieser arteriellen Kollateralkreisläufe. Sie entwickeln sich zu funktionstüchtigen Bypässen und unter günstigen Umständen kann die Durchblutungsstörung vollständig kompensiert werden. Dieser Vorgang wird als Arteriogenese bezeichnet.¹¹

1.2 Entwicklung von Blutgefäßen

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten und auf Grund unterschiedlicher Auslöser wachsen Gefäße auf drei verschiedene Arten. Im einzelnen sind dies die Vaskulogenese, die Angiogenese und die Arteriogenese.

1.2.1 Vaskulogenese

Bevor sich während der Embryonalentwicklung das Herz und Gefäßsystem bildet, wird der Embryo durch Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Die Vaskulogenese beschreibt die Bildung eines primären embryonalen Netzwerkes aus sich *in situ* differenzierenden Angioblasten. Dabei entstehen aus den Hämangioblasten zunächst Endothelzellen, welche ein primitives Netzwerk aus Kapillaren, Arterien und Venen bilden.¹² Interessanterweise wurden zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen, welche aus dem Knochenmark stammen und sich zu Endothelzellen differenzieren können¹³, im Blut von erwachsenen Menschen nachgewiesen.¹⁴ Dies führte zu der Hypothese, dass die Vaskulogenese nicht auf die Embryonalentwicklung beschränkt ist, sondern auch zu späteren Zeitpunkten auftreten kann.¹⁵ Ob endotheliale Vorläuferzellen als therapeutische Option bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen verwendet werden können, wird in aktuellen präklinischen und klinischen Untersuchungen kontrovers diskutiert.¹⁶

1.2.2 Angiogenese

Als Angiogenese wird die Sprossung von Kapillaren aus bereits existierenden Blutgefäßen bezeichnet. Dabei können die neuen Gefäße durch Aussprossung von Endothelzellen, durch die Bildung von transendothelialen Brücken oder durch die Teilung eines existierenden Gefäßes durch einwandernde periendotheliale Zellen entstehen.¹⁴

Die Angiogenese läuft sowohl in der Embryonalentwicklung, als auch im adulten Organismus ab, und spielt bei mindestens drei Mechanismen eine entscheidende Rolle. Erstens, ist die Wundheilung abhängig von der Kapillarsprossung.¹⁷ Zweitens, ist die Angiogenese essentiell für die ausreichend Versorgung von wachsendem Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen. Zum Beispiel ist ein wachsender Tumor auf die Sprossung von Kapillaren – sogenannte Tumorangiogenese (Abbildung (Abb.) 1) – angewiesen, da der Tumor ohne die vermehrte Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen nicht weiter wachsen kann.¹⁸ Drittens, hat die Angiogenese eine wichtige Funktion nach dem Verschluss eines arteriellen Gefäßes. Distal des Verschlusses wird das Gewebe nicht ausreichend mit Blut versorgt und es resultiert ein ischämischer Schaden (Abb. 3). Durch die Sprossung von Kapillaren wird der Zelldebris abtransportiert.¹⁹

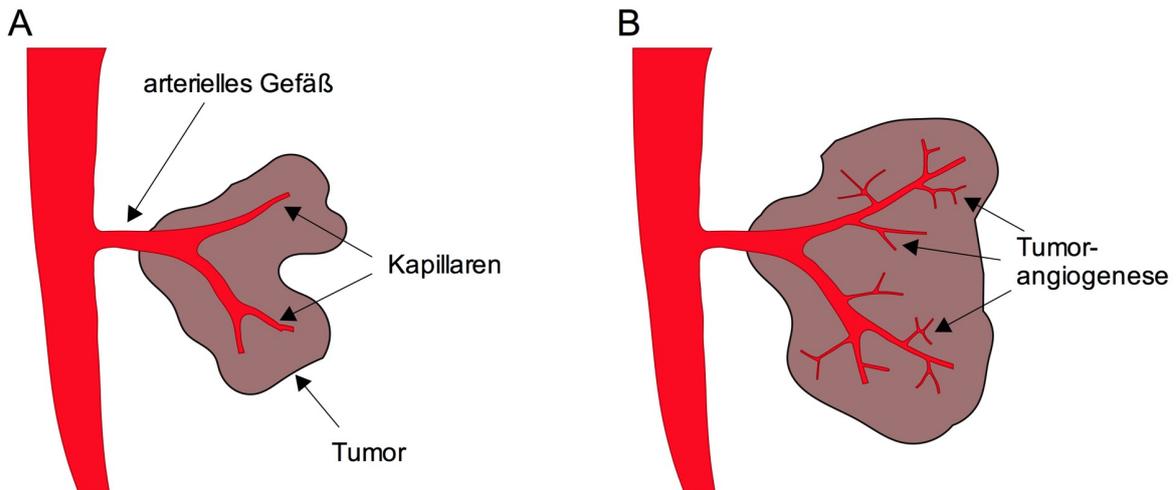


Abbildung 1: Überblick Tumorangiogenese

(A) Wie jedes Gewebe wird ein Tumor über arterielle Gefäße und Kapillaren mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. (B) Das Wachstum des Tumors hängt von der Sprossung von Kapillaren ins Tumorgewebe (Tumorangiogenese) ab, da nur so ausreichend Nährstoffe und Sauerstoff für das Wachstum bereitgestellt werden können.

Auslöser für die Angiogenese ist die unzureichende Versorgung von Gewebe mit Sauerstoff (Hypoxie).¹² Als Folge der Hypoxie wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha) aktiviert.²⁰ Dieser induziert wiederum den „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF). VEGFs sind eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die zu den wichtigsten und potentesten Faktoren der Angiogenese zählen.²¹ Sie werden unterteilt in VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und „placental growth factor“ (PLGF).²² Allgemein sind VEGFs endothelzellspezifische mitogene Faktoren und steigern zusätzlich die Permeabilität von Endothelzellen für Faktoren wie die Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9).²³ Metalloproteinasen sind wichtig für den Gewebeumbau, da sie die extrazelluläre Matrix abbauen.^{24,25}

Bisher wurden drei Rezeptoren entdeckt, welche die Signaltransduktion von VEGF vermitteln. „Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1“ (VEGFR-1), „Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2“ (VEGFR-2) und „Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3“ (VEGFR-3). Alle drei Rezeptoren besitzen eine Tyrosinkinaseaktivität. Im Gegensatz zum VEGFR-2, welcher ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird, wird der VEGFR-1 von Endothelzellen und Monozyten exprimiert.^{26,27} VEGFR-3 spielt eine wichtige Rolle in der Lymphangiogenese.²⁸ VEGF-A bindet und aktiviert sowohl VEGFR-1 als auch VEGFR-2, und fördert dadurch die Angiogenese, die Gefäßpermeabilität und die Migration von Zellen.²⁹ Durch alternatives Spleißen enthält das VEGF-A-Protein beim Menschen Subtypen mit Peptiden mit 121, 165, 189 oder 206 Aminosäuren.³⁰ Unter den Subtypen von VEGF-A ist VEGF-A165 (bei Mäusen VEGF-A164) für die Angiogenese essentiell und ausreichend ist.³¹

Weiterhin vermittelt HIF-1 α die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS).³² Verminderte eNOS Expression reduzierte die Proliferation von Endothelzellen *in vivo* und *in vitro*.³³ Im Vergleich zu Kontrollmäusen, wurden in eNOS defizienten (eNOS^{-/-}) Mäusen verminderte Angiogenese, kleinere Gefäßdurchmesser und geringere Gefäßpermeabilität beobachtet.³⁴

1.2.3 Arteriogenese

Anders als Kapillaren, welche Gewebe lokal mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen, haben Arterien die Funktion Blut durch den Körper zum Gewebe zu leiten. Nach Verschluss eines arteriellen Gefäßes wird das Gewebe stromabwärts nicht ausreichend mit Blut versorgt. Als Folge entsteht ein ischämischer Schaden, es sei denn, präexistierende Kollateralkreisläufe können das Durchblutungsdefizit kompensieren. Daher werden diese präexistierenden Kollateralkreisläufe auch als natürliche Bypässe bezeichnet.³⁵ Nach Verschluss des arteriellen Gefäßes wird die Arteriogenese durch die erhöhte Schubspannung, die auf die Gefäßwände der Kollateralen wirkt, induziert (Abb. 2).³⁶ Dabei nehmen sowohl der Gefäßdurchmesser, als auch die Wanddicke der Kollateralen zu.³⁷⁻³⁹

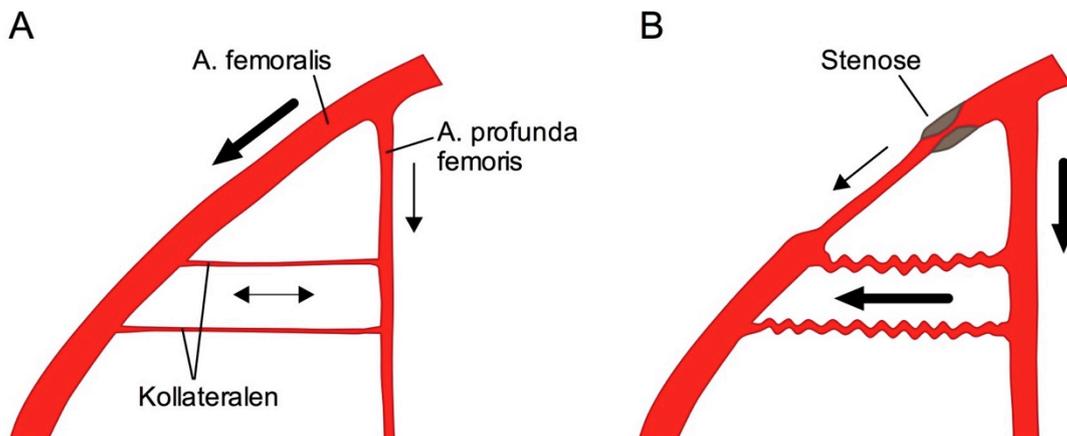


Abbildung 2: Arteriogenese im Oberschenkel der Maus

Der Hinterlauf der Maus wird durch die Arteria (A.) femoralis versorgt. Präexistierende Kollateralen verbinden die A. profunda femoris mit der A. femoralis. **(A)** Normalerweise fließt das Blut im Oberschenkel durch die A. femoralis (Pfeile symbolisieren den Blutfluss). In den Kollateralen fließt nur sehr wenig Blut. **(B)** Kommt es zu einem Verschluss – zum Beispiel durch eine Stenose – der A. femoralis distal des Abgangs der A. profunda, fließt das Blut durch die Kollateralen in den Unterschenkel. Die erhöhte Schubspannung in den Kollateralen induziert die Arteriogenese.

1.2.3.1 Klinische Relevanz der Arteriogenese

Schon 1956 wurden bei Patienten mit Hilfe von post-mortem Angiographien Kollateralkreisläufe am Herzen entdeckt. Diese Studien zeigten auch, dass der Durchmesser der Kollateralen nach Verschluss der entsprechenden Koronargefäße angestiegen ist.^{40,41} Außerdem ist das Überleben nach einem Herzinfarkt abhängig vom Ausmaß der präexistierenden Kollateralen am Herzen.⁴² In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass es 10-14 Tage dauert, bis weitere Kollateralen, welche vorher nicht sichtbar waren, zu erkennen sind.⁴³ Auch im Gehirn sind Kollateralkreisläufe vorhanden und das Ausmaß der Kollateralkreisläufe beeinflusst das Überleben und die Komplikationsrate nach einem Schlaganfall.⁴⁴ Insgesamt zeigten diese Studien deutlich, dass die Arteriogenese eine sehr große klinische Relevanz hat. Ziel der Forschung ist es die Mechanismen der Arteriogenese zu verstehen, um darüber mögliche Therapeutika zu entwickeln. Wenn es gelingt die Arteriogenese gezielt zu fördern, könnte dadurch das Überleben von Herz-Kreislauf-Erkrankungen signifikant verbessert werden.³⁵

1.2.3.2 Auslöser der Arteriogenese und Abgrenzung zur Angiogenese

Falls Kollateralkreisläufe vorhanden sind, induziert der Verschluss eines arteriellen Gefäßes die Angiogenese und die Arteriogenese. Nach dem Verschluss wird das Gewebe ausschließlich durch die Kollateralkreisläufe mit Blut versorgt (Abb. 3). Ohne eine therapeutische Intervention kann die Durchblutung des Gewebes nur durch das effektive Wachstum der Kollateralen wieder vollständig hergestellt werden.⁴⁵ Nach dem akuten Verschluss des Gefäßes wird das Gewebe stromabwärts nicht ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Die Folge sind schwere ischämische Schäden, die bis zum Verlust des Gewebes führen können. Der Sauerstoffmangel (Hypoxie) im Gewebe induziert die Angiogenese.¹² Durch vermehrte Sprossung von Kapillaren und Einwanderung von Leukozyten in das geschädigte Gewebe wird der Zelldebris abtransportiert. Durch das effektive Wachstum der Kollateralkreisläufe kann die Durchblutung aufrechterhalten werden und damit die Gewebeschädigung minimiert werden.⁴⁵

Da in den Kollateralen immer Blut fließt, liegen hier auch nach dem akuten Verschluss keine hypoxischen Bedingungen vor.⁴⁶ In Versuchen an Kaninchen konnte gezeigt werden, dass die Arteriogenese nicht durch Hypoxie induziert wird.⁴⁷ Im Gegensatz zur Angiogenese⁴⁸, war die Arteriogenese nicht mit einer erhöhten Expression von VEGF oder Hypoxie-induzierbaren Genen, wie HIF-1 α , assoziiert.⁴⁷ Nach Verschluss des arteriellen Gefäßes fließt das gesamte Blut durch die vorhandenen Kollateralen und folglich ist die Schubspannung, welche auf die Gefäßwände der Kollateralen wirkt, erhöht. Diese Schubspannung wird auch als „Fluid Shear Stress“ (FSS) bezeichnet und ist der

entscheidende Auslöser für das Wachstum der Kollateralen.³⁶ Der FSS ist proportional abhängig vom Blutfluss und indirekt proportional abhängig vom Radius des Gefäßes. Da die Kollateralen rasch wachsen, fällt der FSS auch wieder ab. In einem Versuch mit Kaninchen wurde durch die Ligatur der Arteria (A.) femoralis die Arteriogenese induziert und der FSS durch einen venösen Shunt konstant hochgehalten. Bereits nach sieben Tagen konnte die Durchblutung zu 100% kompensiert werden und im Verlauf sogar noch weiter gesteigert werden.⁴⁹ Dies belegt die bedeutende Rolle des FSSs bei der Arteriogenese.

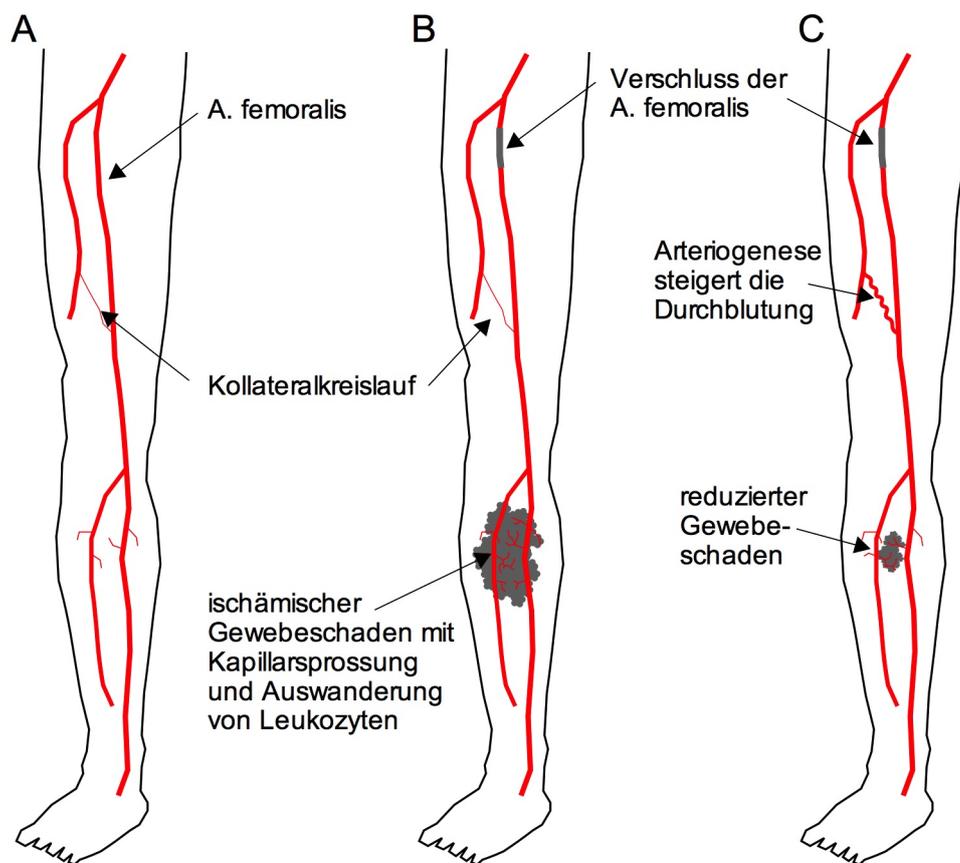


Abbildung 3: Kollateralkreisläufe schützen Gewebe vor ischämischen Gewebeschaden

(A) In den Beinen ist die A. femoralis die Hauptarterie des Oberschenkels und versorgt den Unterschenkel mit Blut. (B) Beim Verschluss der A. femoralis wird der Unterschenkel nicht ausreichend mit Blut versorgt und es resultiert ein ischämischer Gewebeschaden. Dies ist mit einer starken Auswanderung von Leukozyten und Angiogenese verbunden, um ischämisch geschädigtes Gewebe zu entfernen. (C) Durch das Wachstum von Kollateralkreisläufen (Arteriogenese) kann die Durchblutung aufrechterhalten werden und damit die Gewebeschädigung im Unterschenkel minimiert werden.

Durch die erhöhte Schubspannung, die auf die Gefäßwände der Kollateralen wirkt, kommt es zur Aktivierung des Gefäßendothels.⁴⁶ Die Endothelzellen erscheinen dann nicht mehr

flach, sondern ödematös geschwollen und die Zellkerne ragen in das Lumen. Dies führt zu einer gesteigerten Durchlässigkeit des Endothels. Im aktivierten Endothel wurden vermehrt eNOS, MCP-1 („Monocyte chemoattractant protein 1“) und die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 („Intercellular adhesion molecule 1“) und VCAM-1 („Vascular cell adhesion protein 1“) nachgewiesen.⁵⁰ MCP-1, ICAM-1 und VCAM-1 sind wichtig für die Einwanderung von Leukozyten und damit auch für das Wachstum der Gefäße (siehe 1.2.3.4). In Kollateralen wurden während der Arteriogenese vermehrt Matrix Metalloproteinasen 2 und 9 (MMP2 und MMP9) nachgewiesen.⁵¹ Die Proteinasen führen zusammen mit anderen Enzymen zur Auflösung der Lamina elastica interna und externa. Dies führt wiederum zur Aktivierung und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen.⁵²

1.2.3.3 Zeitlicher Ablauf der Arteriogenese

Der zeitliche Ablauf der Arteriogenese kann in folgende Abschnitte gegliedert werden: Initiale Phase (am ersten Tag nach Verschluss des arteriellen Gefäßes), proliferative Phase (1-3 Tage nach Verschluss), synthetische Phase (3-14 Tage nach Verschluss) und Reifungsphase (ab dem 14. Tag nach Verschluss).⁵⁰

In der Initialen Phase kommt es zur Aktivierung der Endothelzellen, der gesteigerten Expression von ICAM-1 und VCAM-1 und der Adhäsion von Leukozyten aus dem Blut am Endothel. In der proliferativen Phase erreichen die Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten ihre maximale mitotische Aktivität. Dies wurde daraus gefolgert, dass in den Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen viele freie Ribosomen und weniger raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) vorhanden war.⁵⁰ In Mäusen wurde durch gezielte Deletion von „synectin“ in Endothelzellen die Proliferation der Endothelzellen unterbunden. Die Arteriogenese war in diesen Mäusen signifikant schlechter als in den entsprechenden Kontrollmäusen.⁵³ Es wurde gezeigt, dass „synectin“ mit verschiedenen Proteinen, wie „Tropomyosin receptor kinase A“ (TrkA)⁵⁴ und „Neuropilin-1“ (NRP1)⁵⁵, interagiert. Die Aktivierung von TrkA steigert die Angiogenese.⁵⁶ NRP1 ist ein VEGFR-2 Co-Rezeptor bei der Angiogenese und moduliert die VEGFR-2 Signaltransduktion bei der Arteriogenese.⁵⁷ Während der synthetischen Phase steigt die Gefäßwanddicke der Kollateralen stark an. An der Ultrastruktur der glatten Gefäßmuskelzellen (sehr viel rER) wurde ein Wechsel vom mitotischen zum synthetischen und proteolytischen Typ festgestellt. Die Lamina elastica interna war zum Teil verdaut oder zerstört.⁵⁰ Außerdem kommt es während der synthetischen Phase zu einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen und verminderten Adhäsion von Leukozyten.

In der Reifungsphase sinken die Proliferationsrate, die Migrationsrate von Leukozyten und die proteolytische Aktivität. Der Großteil der glatten Gefäßmuskelzellen liegt dann wieder im kontraktiven Phänotyp vor.⁵⁰

1.2.3.4 Leukozyten in der Arteriogenese

Bereits 1976 wurde gezeigt, dass Monozyten bei der Arteriogenese eine Rolle spielen.⁵⁸ Schubspannung erhöht die Freisetzung von MCP-1 aus kultivierten Endothelzellen und steigert darüber die Adhäsion von Monozyten.^{59,60} In Kaninchen wurde durch die Behandlung mit MCP-1 die Adhäsion von Monozyten in Kollateralen gesteigert und insgesamt die Arteriogenese verbessert.⁶¹ Die einzelnen Subpopulationen der Leukozyten beeinflussen die Arteriogenese zu unterschiedlichen Zeitpunkten.⁶² Neutrophile Granulozyten sind in der Initialen Phase der Arteriogenese (ersten 24 Stunden nach Verschluss des arteriellen Versorgungsgefäßes) wichtig.⁶³ Während der Leukodiapedese, befinden sich neutrophile Granulozyten in engem Kontakt mit dem Endothel und können durch Chemokin (CXC-Motiv) -Ligand 1 (CXCL1) aktiviert werden.⁶⁴ Schubspannung steigert die Expression von CXCL1 in Endothelzellen *in vitro*⁶⁵ und in Kollateralen *in vivo*⁶⁶. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zur Freisetzung von LL-37 (auch CAP-18 („cathelicidin antimicrobial peptide 18“)) und „heparin-binding protein“ (HbP) aus den Granula neutrophiler Granulozyten führt und darüber die Rekrutierung von Monozyten reguliert wird.⁶⁷ Mäuse wurden mit G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor) behandelt und nach Entfernung der A. femoralis die Angiogenese und die Neovaskularisation, nicht aber die Arteriogenese, untersucht.⁶⁸ Durch vermehrte Freisetzung von VEGF aus neutrophilen Granulozyten und Rekrutierung von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark wurde die Angiogenese und die Neovaskularisation im Unterschenkel in behandelten Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen verbessert.⁶⁸ In einem murinen Myokardinfarkt-Model steigerte die Behandlung mit G-CSF die Arteriogenese am Herzen und verminderte darüber die ischämische Kardiomyopathie.⁶⁹ Hoefler et al. zeigten, dass die zusätzliche Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten mit NAP-2 (Neutrophilen aktivierendes Protein 2) und IL-8 (Interleukin 8) die Arteriogenese in Kaninchen nicht verbesserte.⁷⁰ Allerdings wurde in dieser Studie die Behandlung mit NAP-2 erst am Tag der Ligatur der A. femoralis begonnen und nicht 1-2 Tage vor der Induktion der Arteriogenese. Da neutrophile Granulozyten besonders in den ersten 24 Stunden der Arteriogenese eine Rolle spielen⁶³, hätte die Behandlung mit NAP-2 idealerweise früher gestartet werden müssen, um einen positiven Effekt auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zu gewährleisten. Insgesamt sind neutrophile Granulozyten wichtig als Initiator in der frühen Phase der Arteriogenese.⁷¹ Monozyten beeinflussen die Arteriogenese später als neutrophile Granulozyten.^{72,73} Dabei spielen Monozyten besonders zu Beginn der Wachstumsphase (3-5 Tage nach Verschluss) eine entscheidende Rolle.^{74,75} Ausgewanderte Monozyten differenzieren sich im perivaskulären Gewebe zu Makrophagen, welche MMPs freisetzen.^{74,76} Durch die Freisetzung von TGF- β („Transforming growth factor beta“) und

FGF-2 („Fibroblast Growth Factor 2“) induzieren Makrophagen das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen.^{74,77,78} Außerdem setzen Makrophagen TNF- α (Tumornekrosefaktor Alpha) frei, der für die Arteriogenese wichtig ist.⁷⁹ Die Behandlung mit den TNF- α Antikörpern Infliximab und Etanercept reduzierte das Wachstum von Kollateralen und die Auswanderung von Leukozyten in Kaninchen.⁸⁰ Mastzellen befinden sich im perivaskulären Raum von Arterien.⁸¹ Verschiedene Studien belegen, dass Mastzellen essentiell für erhöhte TNF- α Spiegel und die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während der Arteriogenese sind.^{71,82} Erhöhte Schubspannung induziert über den Thrombozytenrezeptor GPIb α (Glykoprotein I b alpha) und uPA (Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator) die Auswanderung von neutrophilen Granulozyten während der Arteriogenese.⁷¹ In perivaskulären neutrophilen Granulozyten werden „Sauerstoffradikale“ („reactive oxygen species“ (ROS)) von der NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)-Oxidase 2 (NOX2) gebildet und diese ROS führen zur Aktivierung von Mastzellen.⁷¹ Aktivierte Mastzellen steigern die Arteriogenese durch vermehrte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und T-Zellen, sowie durch die vermehrte Aktivität von MMP9.⁷¹ T-Zellen spielen wiederum eine Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen in den perivaskulären Raum von Kollateralen.⁸³

Zusammengefasst belegen diese Studien eindeutig, dass durch die Rekrutierung von Leukozyten, Mastzellen und T-Zellen wichtige Wachstumsfaktoren für die Arteriogenese bereitgestellt werden.

1.2.3.5 Funktion des VEGF-Signalwegs bei der Arteriogenese

Anderes als bei der Angiogenese, wird die Bedeutung von VEGF und dem VEGF-Signalweg bei der Arteriogenese kontrovers diskutiert.⁸⁴ Nach Ligatur der A. femoralis wurde keine erhöhte Expression von VEGF in den Kollateralen von Kaninchen beobachtet.⁴⁷ Außerdem verbesserte die Behandlung mit VEGF nicht das Wachstum der Kollateralen im Vergleich zu unbehandelten Kaninchen.⁴⁷ Auf der anderen Seite schränkten die Blockierung des VEGFR-2⁸⁵ und die Behandlung mit einem anti-VEGF Antikörper⁸⁶ die Arteriogenese in Mäusen signifikant ein. Diese Studien belegen, dass der VEGF-Signalweg wichtig für die Arteriogenese ist, aber zusätzliches VEGF die Arteriogenese nicht verbessert. Der VEGFR-2 wird durch die Bindung von VEGF-A aktiviert und ist einer der wichtigsten Modulatoren der Funktionen von Endothelzellen.^{87,88} Die Aktivierung des VEGFR-2 induziert verschiedene Signalwege, die wichtig für die endotheliale Proliferation und Migration sind.⁸⁹ Die Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/ Akt (auch Protein kinase B (PKB))-Signalwegs fördert das Überleben von Endothelzellen durch die Hemmung der Apoptose, während die Aktivierung des

Tyrosinkinase Src („sarcoma“) -FAK („focal adhesion kinase“) -Signalwegs die Endothelzellmigration und Gefäßpermeabilität vermittelt.^{90,91} Die Phosphorylierung von VEGFR2 aktiviert die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) -Signalkaskade und induziert die Phosphorylierung von extrazellulären signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2), als Teil der MAPK-Signalkaskade.^{92,93} Beide Signalwege steigern die Endothelzellproliferation. In Mäusen wurden nach Ligatur der A. femoralis vermehrt phosphorylierte ERK1/2 in Kollateralen nachgewiesen und die Inhibierung des ERK1/2-Signalwegs schränkte die Arteriogenese ein.^{49,92,94} Interessanterweise moduliert NRP1 die VEGFR-2 Signaltransduktion bei der Arteriogenese.⁵⁷ In Mäuse führt der Verlust der zytoplasmatischen Domäne von NRP1 zur verminderten Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis.⁹⁵ Der Effekt wurde durch die reduzierte Phosphorylierung des VEGFR-2 und reduzierte Aktivierung von ERK1/2 verursacht.⁹⁵ Außerdem wurde gezeigt, dass der VEGFR-2 Teil eines mechanosensorischen Komplexes von Endothelzellen ist.⁹⁶ Der VEGFR-2 wird durch erhöhten FSS aktiviert und induziert über den PI3K/Akt-Signalweg die Proliferation von Endothelzellen. Dabei ist die Signaltransduktion unabhängig von der Bindung von VEGF an den VEGFR-2.⁹⁶

Zusammengefasst belegen diese Studien eindeutig, dass der VEGF-Signalweg wichtig für die Arteriogenese ist. Inwieweit VEGF dabei eine Rolle spielt ist aber noch nicht ausreichend geklärt. Interessanterweise, induziert VEGF-A die Expression von NO-Synthasen⁹⁷ und umgekehrt steigert NO, produziert von NO-Synthasen, die VEGF-Synthese⁹⁸.

1.2.3.6 Rolle von Stickstoffmonoxid in der Arteriogenese

Säugetiere besitzen drei Stickstoffmonoxid (NO) Synthasen. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). Alle drei Synthasen katalysieren die Bildung von NO aus L-Arginin.⁹⁹ Die eNOS befindet sich hauptsächlich in den Endothelzellen von Gefäßen. Durch die Bildung von cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) führt NO zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und somit zur Vasodilatation.¹⁰⁰ NO produziert durch die nNOS ist ein Neurotransmitter im Gehirn.¹⁰¹ Die iNOS kommt vor allem in Makrophagen vor. Durch die Freisetzung von NO können Bakterien abgetötet werden.¹⁰² NO wirkt anti-mitotisch auf Gefäßmuskelzellen und hemmt die Bildung von Adhäsionsmolekülen am Gefäßendothel.^{103,104} Daraus würde man folgern, dass NO die Arteriogenese hemmt. Nichtsdestotrotz wurde gezeigt das NO essentiell für die Arteriogenese ist. Nach Verschluss einer Arterie wird sofort NO freigesetzt um das Gefäß und mögliche Umgehungskreisläufe zu dilatieren und die Durchblutung zu verbessern. In Kaninchen wurde durch die Behandlung mit einem NO-

Synthasen Inhibitor die Arteriogenese stark eingeschränkt.⁴⁹ Die Frage, woher das NO kommt und welche NO-Synthasen bei der Arteriogenese eine Rolle spielen, ist noch nicht ausreichend geklärt. Besonders der Einfluss der eNOS auf das Wachstum von Kollateralen wird kontrovers diskutiert.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Cui et al. haben gezeigt, dass in eNOS-/- Mäusen die Arteriogenese nach einem induzierten Schlaganfall signifikant schlechter war als in Kontrollmäusen.¹⁰⁵ In den eNOS-/- Mäusen ist der Gefäßdurchmesser der Kollateralen weniger stark angestiegen und die Prognose nach dem Schlaganfall war schlechter als in Kontrollmäusen. Durch die Behandlung mit dem NO-Donor DETA NONOate konnte das Gefäßwachstum wiederhergestellt und die Prognose verbessert werden.¹⁰⁵ Auf der anderen Seite wurde in einem Mausmodell der peripheren Arteriogenese gezeigt, dass das Wachstum der Kollateralen in eNOS-/- Mäusen nicht eingeschränkt war, aber eNOS wichtig für die Vasodilatation von Kollateralen ist.^{106,107} Als Ausgleich der fehlenden eNOS wurde eine erhöhte Expression der iNOS beobachtet. Durch die pharmakologische Inhibierung der iNOS wurde die Arteriogenese in eNOS-/- Mäusen stark eingeschränkt.¹⁰⁶ Weiterhin wurde eine gesteigerte Expression der nNOS bei der Arteriogenese beschrieben.¹⁰⁸ In einer anderen Studie wurde der Verlust der eNOS in eNOS-/- Mäusen durch die vermehrte Expression der nNOS, und nicht durch erhöhte Expression der iNOS, kompensiert.¹⁰⁹ In Mäusen, die sowohl für die eNOS als auch die nNOS defizient waren, bildeten sich vermehrt Aneurysmen, da nicht genügend NO produziert wurde, um durch Vasodilatation die hämodynamischen Kräfte auf die Gefäßwände zu reduzieren.¹⁰⁹ Im Gegensatz zur nNOS, die auch H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) produziert, produzieren die eNOS und iNOS hauptsächlich NO.^{110,111} Allerdings kann auch die eNOS, wenn sie entkoppelt ist, H₂O₂ produzieren.¹¹² Sowohl H₂O₂^{113,114}, als auch NO¹¹⁵ sind wichtig für die Proliferation von Endothelzellen und beide Isoformen können sich dabei gegenseitig ersetzen.

Zusammengefasst belegen diese Studien, dass NO-Synthasen eine entscheidende Rolle bei der Arteriogenese spielen, jedoch ist noch nicht abschließend geklärt, welche der NO-Synthasen welche Funktion beim Wachstum der Kollateralen übernimmt. Ob die Proliferation der Endothelzellen während der Arteriogenese von der Produktion von NO, H₂O₂ oder beiden abhängig ist, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

1.3 Mausmodell der peripheren Arteriogenese

Bis heute ist das Modell der peripheren Arteriogenese nach Limbourg et al. eines der am häufigsten benutzten Modelle um das Wachstum von Kollateralen in Mäusen zu untersuchen.¹¹⁶

Wie das Bein beim Menschen, wird der Hinterlauf der Maus durch die A. femoralis versorgt. Von dieser Arterie gehen unmittelbar distal des Leistenbands die A. epigastrica

caudalis und die A. profunda femoris ab. Präexistierende Kollateralen verbinden die A. profunda femoris mit der A. femoralis. Die Kollateralen verlaufen parallel zu den Fasern der Adduktoren-muskulatur des Oberschenkels (Abb. 4). Im rechten Hinterlauf wird durch die Ligatur (Occ) der A. femoralis unmittelbar distal des Abgangs der A. profunda femoris die Arteriogenese im Oberschenkel induziert (siehe 3.2.2). Der Unterschenkel wird zunächst nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt und die Hypoxie induziert die Angiogenese. Im linken Oberschenkel wird zur Kontrolle eine Scheinoperation durchgeführt.

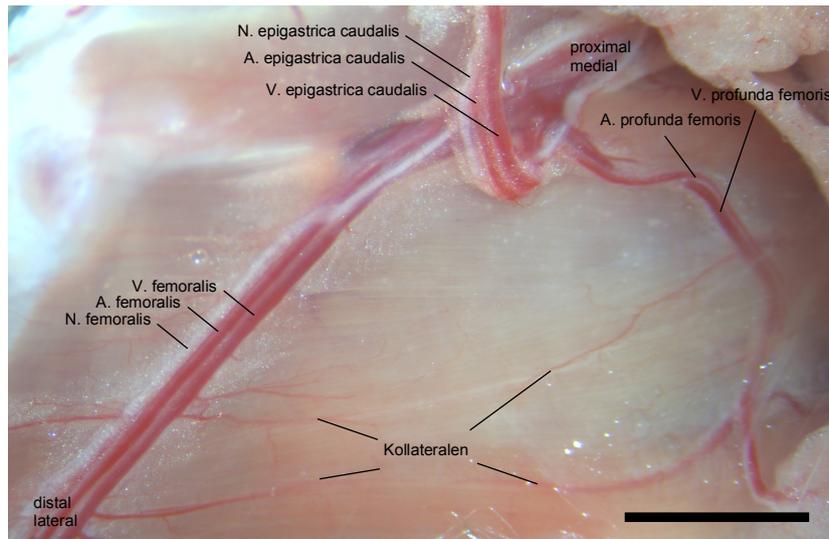


Abbildung 4: Übersichtsbild des Oberschenkels einer Maus

Zunächst wurde die Haut über dem Oberschenkel entfernt und die Adduktoren-muskulatur dargestellt. Im Oberschenkel der Maus verläuft das Gefäßnervenbündel aus Nervus (N.) femoralis, Arteria (A.) femoralis und Vena (V.) femoralis. Von dem Gefäßnervenbündel gehen die A., N. und V. epigastrica caudalis und die A. und V. profunda femoris ab. Kollateralen verbinden die A. profunda femoris mit der A. femoralis. Die Kollateralen verlaufen parallel zu den Fasern der Adduktoren-muskulatur des Oberschenkels. Maßstab = 4mm

Mit dem Laser-Doppler-Imaging (LDI) Verfahren wird die Durchblutung der Pfoten gemessen (siehe 3.3.3). Unmittelbar nach der Ligatur ist die Durchblutung des rechten Hinterlaufs stark eingeschränkt und das Verhältnis der Durchblutung von Occ zu Sham vermindert. Im Verlauf wachsen die Kollateralen und das Verhältnis gleich sich wieder aus. Die motorische Funktion des Hinterlaufs kann mit dem „Active Foot Movement Score“ bestimmt werden (siehe 3.3.4). Für morphologische Untersuchungen der Kollateralen und Analysen der Genexpression in Kollateralen können die Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten geopfert werden. Über den gesamten Zeitraum der Experimente können die Mäuse mit Substanzen *intravenös* (iv.), *subkutan* (sc.), *intraperitoneal* (ip.) oder *per os* (po.) behandelt werden. Weiterhin ermöglicht das Modell die Verwendung von genetisch veränderten Mäusen. Auf Grund all dieser Punkte wurde das Modell der peripheren Arteriogenese nach Limbourg et al.¹¹⁶ für dieses Projekt benutzt.

1.4 Midkine

Midkine (MK) ist ein 13 kDa (kilo Dalton) schwerer, Heparin bindender Wachstumsfaktor. Midkine wurde erstmals in Mäuseembryonen zwischen dem 7. und 13. Tag der Embryonalentwicklung nachgewiesen.¹¹⁷ Dabei wurde Midkine besonders stark in epithelialem Gewebe, welches mit mesenchymalem Gewebe und Nierengewebe verbunden ist, exprimiert. Letztendlich führten die beiden Entdeckungen, dass Midkine besonders in der Mitte der Entwicklung („Midgestation“) und in den Nieren („Kidney“) exprimiert wird, zum Namen des Zytokins Midkine.¹¹⁸ Die Sequenz des menschlichen Midkines stimmt zu 87% mit der Sequenz des murinen Midkines überein.^{119,120} Das Midkine Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 11 und bei der Maus auf Chromosom 2.^{121,122} Beide Gene bestehen aus vier Exons. In der Promotor Region des Gens wurden ein „retinoic acid response element“ (RARE), sowie ein „hypoxia responsive element“ (HRE), entdeckt.^{123,124} Beide induzieren die Expression von Midkine. Zusammen mit Pleiotrophin (PTN) bildet Midkine eine eigene Gruppe von Heparin bindenden Wachstumsfaktoren.^{120,125} Die Sequenzen von Midkine und Pleiotrophin stimmen zu 50% überein.^{126,127} Im Gegensatz zu Midkine wird Pleiotrophin am stärksten während der Geburt exprimiert.¹²⁸

1.4.1 Rezeptoren für Midkine

Bisher wurden verschiedene Rezeptorfamilien mit unterschiedlichen Rezeptoren als Rezeptoren für Midkine identifiziert (Tabelle 1).¹²⁹⁻¹³¹

Rezeptorfamilie	MK Rezeptor	Referenzen
Integrine	$\alpha_4\beta_1$; $\alpha_6\beta_1$; β_2	132-134
Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP)	LRP-1; LRP-6	135,136
Protein Tyrosin Phosphatase (PTP)	PTP ζ	137-139
Rezeptor Tyrosin Kinasen	ALK	140-142
Notch	Notch2	143,144
Kohlenhydrate	Neuroglykan C; Heparan Sulfat Trisulfat Einheit; Chondroitin Sulfat E Einheiten; Syndekan-1; Syndekan-3; Glypikan-2	145-151

Tabelle 1: Rezeptoren für Midkine

Interessanterweise wurde in menschlichen Endothelzellen (HUVEC, „Human umbilical vein endothelial cell“) gezeigt, dass die Stimulation mit Midkine zur Bindung und Phosphorylierung der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) führt.¹⁴⁰ Dadurch kommt es zur Aktivierung der PI3K und MAPK-Signalkaskade in den Endothelzellen. In Mäusen wurde bei einem Myokardinfarkt-Modell gezeigt, dass verstärkte Angiogenese durch exogenes Midkine mit PI3K/Akt und MAPK-Aktivierung assoziiert war.¹⁵² Allerdings ist PI3K/Akt auch ein Teil des VEGF-Signalwegs und die durch FSS induzierte Aktivierung

des VEGFR-2 führt zu einer PI3K Aktivierung.⁹⁶ Darüber hinaus zeigte eine Studie mit mesenchymalen Stammzellen, dass die Überexpression von Midkine zu einer vermehrten Expression und Freisetzung von VEGF-A führte.¹⁵³ Weiterhin ist bekannt, dass Notch Rezeptoren, als Teil des VEGF-Signalwegs¹⁵⁴, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des kardiovaskulären Systems spielen.¹⁵⁵ Ob Midkine die Proliferation von Endothelzellen über den VEGF-Signalweg beeinflusst, wurde bisher nicht untersucht.

1.4.2 Einfluss von Midkine auf die Angiogenese

In gesundem, adultem Gewebe wird Midkine nur sehr gering exprimiert. Auf der anderen Seite wurde in unterschiedlichen Tumoren eine vermehrte Expression von Midkine nachgewiesen. In Patientinnen und Patienten mit Brustkrebs¹⁵⁶, Blasenkrebs¹⁵⁷, oralem Plattenepithelkarzinom¹⁵⁸ und Pankreaskopfkarzinom¹⁵⁹ korrelierte die erhöhte Midkine Expression mit einer schlechteren Prognose. Dabei wurde in Tumoren mit erhöhter Midkine Expression auch vermehrtes Wachstum von Kapillaren nachgewiesen. Die sogenannte Tumorangiogenese ist für das Wachstum eines Tumors essentiell. In verschiedenen Tierversuchen wurde durch die Gabe von Midkine das Tumorstadium gefördert.^{140,160,161} Kaninchen wurden MCF-7 („Michigan Cancer Foundation 7“) Brustkrebszellen in die Hornhaut gespritzt. Die Behandlung mit Midkine und Pleiotrophin steigerte die Gefäßdichte und die Proliferation der Endothelzellen in den entstandenen Tumoren.¹⁶⁰ In Mäusen wurde nach der Überexpression von Midkine eine vermehrte Gefäßdichte in Blasenkrebstumoren beobachtet.¹⁶¹ Folglich steigert Midkine die Tumorangiogenese. Durch die Blockierung von Midkine könnte das Wachstum der Kapillaren in Tumoren inhibiert werden und somit auch das Wachstum der Tumoren limitiert werden. Im Tumorgewebe wird die Angiogenese durch Hypoxie induziert.¹⁶² Weckbach et al. zeigten bereits, dass die Angiogenese im Unterschenkel nach Ligatur der A. femoralis in Midkine defizienten (MK^{-/-}) Mäusen signifikant vermindert ist.¹⁶³ Weiterhin wurde beobachtet, dass die Hypoxie zu einer vermehrten Expression von Midkine in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und HUVECs führte. Allerdings kam es nur bei Endothelzellen zu einer signifikanten Steigerung des Midkine Spiegels im Zellüberstand.¹⁶³ In verschiedenen Myokardinfarkt-Modellen konnte gezeigt werden, dass Midkine nach Verschluss eines Koronargefäßes vermehrt im Infarktgebiet exprimiert wurde.^{152,164-166} Die Behandlung mit Midkine steigerte die Angiogenese in den Randgebieten des Myokardinfarktes.^{152,166} Weiterhin führte exogenes Midkine zu einer Verkleinerung des Infarktgebietes¹⁶⁵ und verhinderte den ventrikulären Umbau^{166,167}. In den Studien wurde der positive Effekt von Midkine immer auf die Angiogenese zurückgeführt. Ob die Behandlung mit Midkine auch das Wachstum von Kollateralen am Herzen verbesserte wurde bisher nicht untersucht.

1.4.3 Einfluss von Midkine auf die Rekrutierung von Leukozyten

Mit Hilfe einer Boyden Kammer wurde der Einfluss von Midkine auf die Rekrutierung von Leukozyten untersucht.¹⁶⁸ Bei einer Konzentration von 10ng/ml Midkine sind die meisten neutrophilen Granulozyten durch die Kammer gewandert. Durch Checkerboardanalysen wurde bewiesen, dass die Wanderung der neutrophilen Granulozyten nicht zufällig (chemokinetisch), sondern auf Midkine gerichtet (chemotaktisch) abgelaufen ist. In weiteren Versuchen wurden Polykarbonat Filter mit Midkine beschichtet. Dadurch steigerte sich sogar die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten. Folglich wirkt Midkine am ehesten haptotaktisch.¹⁶⁸ In einer Boyden Kammer wurde auch die Wanderung von Makrophagen durch die Gabe von Midkine gesteigert.¹⁶⁹ In verschiedenen *in vivo* Modellen wurde eine verminderte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in MK^{-/-} Mäusen beobachtet. In einem Mausmodell der Antikörper-induzierten Arthritis sind in MK^{-/-} Mäuse weniger neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die Synovialmembran ausgewandert.¹⁷⁰ Dies führte zu einer verringerten Symptomatik der Arthritis. Anschließend wurde in MK^{-/-} Mäusen durch die Behandlung mit Midkine sowohl die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, als auch die Symptomatik der Arthritis verstärkt.¹⁷⁰ Außerdem wurde die Rekrutierung von Leukozyten in einem Modell der Restenose nach Ballonkatheterisierung untersucht. Mit dem Pan-Leukozyten Marker CD45 („Cluster of Differentiation 45“) wurde nachgewiesen, dass in MK^{-/-} Mäusen weniger Leukozyten in die Neointima ausgewandert sind.¹⁶⁹ In einem Modell der Nierenverletzung nach Ischämie wurden in MK^{-/-} Mäusen weniger neutrophile Granulozyten und Makrophagen im Tubulointerstitium nachgewiesen. Außerdem wurde nach induzierter Ischämie weniger mRNA (messenger Ribonukleinsäure) der beiden Chemokine MIP-2 („macrophage inflammatory protein 2“) und MCP-1 nachgewiesen.¹⁷¹ Sowohl MIP-2¹⁷², als auch MCP-1¹⁷³, spielen eine wichtige Rolle bei der Auswanderung von Leukozyten. Außerdem unterstützt Midkine die Extravasation von neutrophilen Granulozyten durch β_2 -Integrine.¹³⁴ In MK^{-/-} Mäusen war die Adhäsion und Extravasation von neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Kontrollmäusen eingeschränkt. Die immobilisierte Form von Midkine steigerte die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten durch die Förderung der hochaffinen Konformation von β_2 -Integrinen *in vitro*. Dabei fungierte LRP1 („Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1“) als funktioneller Rezeptor für Midkine auf neutrophilen Granulozyten.¹³⁴

Zusammengefasst rekrutiert Midkine Leukozyten direkt über seine chemotaktische Wirkung und indirekt über die Induktion von Chemokinen.

2 Zielsetzung

Ziel der Studie war es die funktionale Rolle von Midkine bei der Arteriogenese in einem murinen Modell des peripheren Kollateralwachstums unter Verwendung von Midkine defizienten Mäusen und Kontrollmäusen zu charakterisieren. Vor dem Start des Projektes lagen bereits erste Daten vor, die darauf hinwiesen, dass die Arteriogenese bei Midkine defizienten Mäusen nach Ligatur der A. femoralis möglicherweise gestört ist.

Als erstes Ziel des Projektes sollte somit der Einfluss von Midkine auf die Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis untersucht werden. Weiterhin sollte analysiert werden, ob eine verminderte Durchblutung des Fußes nach Ligatur durch vermindertes Wachstum, eine geringe Anzahl oder eine eingeschränkte Vasodilatation der Kollateralen verursacht wird. Im Rahmen dessen sollte auch die Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen in Kollateralen untersucht werden. Der zweite Teil des Projektes befasste sich mit der Frage woher Midkine, welches für die Arteriogenese wichtig ist, kommt. Zunächst sollte analysiert werden ob die Ligatur der A. femoralis den Midkine Spiegel im Plasma und die Midkine Expression in Kollateralen beeinflusst. Da Midkine in Leukozyten vorkommt und diese eine wichtige Rolle beim Wachstum der Kollateralen spielen, sollte anhand von Knochenmarkstransplantationen die Relevanz von Midkine aus Leukozyten bei der Arteriogenese bestimmt werden. Zusätzlich sollte die Frage, ob exogenes Midkine die Arteriogenese in Kontrollmäusen beeinflusst, beantwortet werden. Da vorläufige Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe darauf hindeuteten, dass die Expression der NO-Synthasen in Midkine defizienten Mäusen möglicherweise reduziert ist, sollte als drittes Ziel des Projektes untersucht werden, inwieweit Midkine die Expression der NO-Synthasen beeinflusst. Trotz zahlreicher Studien werden die Funktionen der NO-Synthasen bei der Arteriogenese kontrovers diskutiert und der Einfluss auf das Wachstum der Kollateralen bleibt fraglich. Um diese Frage zu beantworten wurde der Zusammenhang von Midkine, den NO-Synthasen und der Proliferation von vaskulären Zellen untersucht. Weiterhin ist bekannt, dass NO die VEGF-A-Synthese induziert und *vice versa*. Daher sollte zum Abschluss der Zusammenhang zwischen VEGF-A, NO-Synthasen und Midkine untersucht werden. Die genaue Funktion des VEGF-Signalwegs in der Arteriogenese ist noch nicht abschließend geklärt. In diesem Projekt sollte untersucht werden, ob der VEGF-A Spiegel im Plasma wichtig für das Wachstum der Kollateralen ist und ob Midkine dabei eine Rolle spielt.

Zusammenfassend wurde diese Studie durchgeführt, um die Rolle von Midkine bei der Arteriogenese im Bezug auf die Perfusion nach Ligatur und das Wachstum von Kollateralen, sowie den Einfluss von Midkine auf NO-Synthasen und VEGF-A nach Ligatur, besser zu verstehen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Instrumente

Gerät/ Instrument			Hersteller
CCD-Kamera		Orca CCD Camera	Hamamatsu PHOTONICS GmbH, Herrsching, Deutschland
	Software	Wasabi	
Einbettung		Tissue-Tek TEC 5	Sakura Finetek USA, Torrance, CA, USA
ELISA Reader		Infinite F200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
	Software	i-control I.9	
Gallios Flow Cytometer		Gallios 2/8 AS29153	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
	Software	Kaluza 1.3	
Heizmatte		Heizmatte Deluxe 10W	Dragon Terraristik, Duisburg, Deutschland
Homogenisator		SpeedMill PLUS	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Hood		LaminAir HBB 2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Induktionsröhre			Eigenbau
Laserdoppler		moorLDI2-IR	Moor Instruments Ltd., Millwey, Axminster, Devon, England
	Software	moorLDI Version 5.3	
Magnetrührer			IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop - Histologie		Axioskop 40	Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz
	Kamera	Axiocam 105 color	
	Software	AxioVision 4.8.2.0	
Mikroskop - OP		LEICA M60	Leica, Solms, Deutschland
	Kaltlichtquelle	LEICA KL300 LED	
	Kamera	LEICA MC120 HD	
Mikrowelle			Siemens AG, München, Deutschland
Nadelhalter		Olsen-Hegar Needle Holder 12cm	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Neubauer Zählkammer		BLAUBRAND Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim Deutschland
Paraffinkarussell		Shandon Citadel 1000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
pH-Meter		inoLab pH 720	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pinzetten		Adson Forceps	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
		Dumont #5 Forceps Inox	
		Dumont #7 Forceps Inox	
		Dumont #5/45 Forcep Inox Medical	
Pipetboy		Pipetboy comfort	INTEGRA Biosciences, Hudson, NH, USA
Pipetten			Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen			Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
qRT-PCR		StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
	Software	StepOne Software v2.2.2	
Rotationsmikrotom		2030	Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland
Scheren		Vannas Spring Scissor - Straight	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
		Iris Scissors - Straight 11,5cm	
Software		GraphPad Prism 6.0f	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
		EndNote® X7	Thomson Reuters, New York, NY, USA
		Inkscape 0.91	Inkscape Community

Software	Microsoft® Excel®, Word® PowerPoint® 2011	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
Spektralfotometer	NanoVue Plus	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Thermocycler cDNA	Thermal Cycler 2720	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Thermoschüttler	Thermomixer Compact 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waage	Analysenwaage CPA225D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wärmekammer		Eigenbau
Zellkultur	CO2 Brutschrank C150	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zellschaber		Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifuge	Mikro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
	Rottina 420R	
Zerstäuber	Isoflurane Vapor 19.3	Abbott, Chicago, IL, USA

Tabelle 2: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte und Instrumente

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Material/ Kit		Hersteller
Aortenkatheter	Venofix Safety 25G	Braun, Melsungen, Deutschland
BrdU Färbung	BrdU In-Situ Detection Kit	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Deckelglas		Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Desinfektion	Desinfektionsspray Cutasept	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Doppelseitiges Klebeband	Doppelseitiges Klebeband universal	tesa, Hamburg, Deutschland
EDTA Blutröhrchen	Probengefäß 1,3ml K3E 1,6mg EDTA/ ml blood	Sarstedt Ag& Co., Nümbrecht, Deutschland
Einbettkassetten	Histosette I, Embedding Cassettes with LID, blue	Simport, Beloeil, Quebec, Kanada
ELISA BrdU	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Basel, Schweiz
ELISA Midkine	SEA631Mu ELISA Kit For Midkine (MK)	USCN Life Science Inc., Wuhan, Hubei, China
ELISA VEGF	Quantikine ELISA Mouse VEGF	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
Eppendorf Tube	Flex Tube	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fäden	ETHICON 4-0	Johnson&Johnson, New Brunswick, NJ, USA
	VICRYL 6-0	
	Silk Braided Suture 7/0	Peasalls Sutures, Somerset, GB
Falcontube	50ml	Corning Inc., Corning, NY, USA
	15ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Filter für Falcontubes	EASYstrainer 70µm	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Filterpapier	Filter Discs 3hw 150mm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Kanüle	30G Microlance 3	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
	24G Microlance 3	
Klebestreifen	3M Durapore Surgical Tape 1538-0	3M, St. Paul, MN, USA
Latex	Industrial Latex	Chicago Latex Products, Crystal Lake, IL, USA
Lysis tube	Lysis Tubes P	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Mikrotiterplatte (96-well)		Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Objektträger	Thermo Scientific Superfrost plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Petrischale	35mm	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Spritze	10ml - Injekt	Braun, Melsungen, Deutschland
	5ml - Discardit II	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
	2ml - Discardit II	
	1ml - Plastipak	
Stripette	10ml costar STRIPETTE	Corning Inc., Corning, NY, USA
	5ml costar STRIPETTE	

Tabelle 3: Alphabetische Auflistung der verwendeten Materialien und Kits

3.1.3 Lösungen und Substanzen

Substanz/ Lösung		Hersteller
ACK Lysing Buffer		Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Adenosin	Adenosine 25g	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Agarose, LE, analytical grade	Promega, Madison, WI USA
Albumin	Albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Alkohol 70%		SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach, Deutschland
Alkohol 96%		
Alkohol 99%		
Antikörper für Immunofluoreszenzfärbungen	primärer Minkine Antikörper Cat#: PA5-19640	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
	primärer VEGF-A164 Antikörper Cat#: AF-493-SP	Novus Biological, Littleton, CO, USA
	sekundärer Antikörper donkey anti-rabbit AF546 Cat#: A10040	MoBiTec, Goettingen, Germany
	Ly-6G FITC Cat#: ab25024	Abcam, Cambridge, MA, USA
	DAPI Cat#: D1306	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Antikörper für FACS	FITC anti-mouse CD45.1 Antibody	BioLegend, San Diego, CA, USA
	FITC Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody	
	Alexa Fluor® 488 anti-mouse CD45.2 Antibody	
	Alexa Fluor® 488 Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody	
Bepanthen	Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Bromdesoxyuridin	BrdU 0,5mg/ml	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
cDNA Synthese-Kit	1st Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Basel, Schweiz
Cotrimoxazol	Ampullen SF 480 mg/5 ml	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Chloroform/Isoamylalkohol	Chloroformisoamylalcohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DETA NONOate	100mg	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
DMEM	w 4,5g/L Glucose	PAN BIOTECH, Aidenbach, Deutschland
DNA-Marker 2000bp	TriDye 2-Log DNA Ladder	New England BioLabs, Ipswich, MA, USA
Dorbene	1mg/ml	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
DPBS	w/o Calcium w/o Magnesium	PAN BIOTECH, Aidenbach, Deutschland
DPBS10x	w/o Calcium w/o Magnesium	PAN BIOTECH, Aidenbach, Deutschland
EDTA Lösung	EDTA 0,02% Solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Acetic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Eukitt	Eukitt quick-hardening mounting medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fentanyl	0,5mg	CuraMED Pharma, Karlsruhe, Deutschland

- Material und Methoden -

Flumazenil	0,1mg/ml	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
Gelatine	Gelantine Solution 2% in PBS	PAN BIOTECH, Aidenbach, Deutschland
GelRed-Farbstoff	GelRed Nucleic Acid Stain, 10000x in DMSO	Biotrend, Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
GIEMSA Gebrauchslösung	Giemsa - Solution for microscopy	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Heparin	Heparin-Natirum- 25000 I.E./5ml	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isofluran	Forene 100% (V/V)	AbbVie GmbH &Co. KG, Ludwigshafen Deutschland
Isopropanol	Isopropanol 100%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isotone Kochsalzlösung	NaCl 0,9%	Braun, Melsungen, Deutschland
Kapa2G Fast HotStart	Kapa2G Fast HotStart ReadyMix	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kollagen A	Collagen A 1mg/ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Kollagenase	CLS II	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
L-NIO	L-NIO dihydrochloride	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Lysing solution	Lysing Solution 10X Concentrate	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Medium für Endothelzellen	Complete Mouse Endothelial Cell Medium	Cell Biologics, Chicago, IL, USA
Medium für glatte Gefäßmuskelzellen	Complete Mouse Smooth Muscle Cell Medium	Cell Biologics, Chicago, IL, USA
Midazolam	15mg/3ml	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Mowiol	Mowiol 4-88	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Naloxon	0,4mg/ml	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland
Natronlauge	c(NaOH) = 1 mol/l	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Paraplast Plus Tissue Embedding Medium	Leica, Solms, Deutschland
Power SYBR® Green Master Mix		Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Primer für qRT-PCR		eurofins mwg operon, Ebersberg, Deutschland
Paraformaldehyd-Lösung (3% und 4%)		Apotheke der Universität München, München, Deutschland
recombinant murine Midkine	1mg	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
recombinant murine VEGF-A164	100µg	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Revertor	5mg/ml	cp-pharma, Burgdorf, Deutschland
RNase freies DNase Set	RQ1 RNase free Dnase 1U/µl	Promega, Madison, WI USA
Saccharose	Sucrose for molecular biology	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure	HCl 1M	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
SU1498	5mg	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TAE 50X		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Technischer Puffer	pH 4,01	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
	pH 7,00	
	pH 10,00	
Temgesik	0,3mg/ml Buprenorphin	Reckitt Benckiser Healthcare (UK) Ltd., Slough, UK
Tissue Tek	Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Trizol	TRIZOL Reagent	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tryptan blau	Tryptan Blue Solution (0,4%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Xylol		AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Alphabetische Auflistung der verwendeten Lösungen und Substanzen

3.1.4 Herstellung von Lösungen

3.1.4.1 Adenosin-Lösung

Die Lösung wurde für jedes Experiment neu hergestellt.

1. 20ml DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)
2. 100mg BSA (Bovines Serumalbumin)
3. 20mg Adenosin
4. 10min mit einem Magnetrührer mischen und lichtgeschützt auf 37°C erwärmen
5. Bis zur Verwendung lichtgeschützt bei 37°C lagern

3.1.4.2 Kollagenase-Lösung

Die Lösung wurde für jedes Experiment neu hergestellt.

1. 10ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
2. 20mg Kollagenase II
3. 10min mit einem Magnetrührer mischen und auf 37°C erwärmen
4. Bis zur Verwendung bei 37°C lagern

3.1.4.3 30% und 15% Saccharose-Lösung

Die Lösungen wurden für jedes Experiment neu hergestellt.

1. 200ml destilliertes Wasser
2. 60g Saccharose (bzw. 30g für 15% Saccharose-Lösung)
3. 5min mit einem Magnetrührer mischen
4. Bis zur Verwendung bei Raumtemperatur lagern

3.1.4.4 Puffer für Knochenmarkstransplantationen

Der Puffer wurde für jedes Experiment neu hergestellt.

1. 20ml DPBS
2. 1% FCS (Fetales Kälberserum)
3. 4ml EDTA (Ethyldiamintetraessigacetat) Lösung 0,02%
4. 5min mit einem Magnetrührer mischen
5. Bis zur Verwendung auf Eis lagern

3.1.4.5 Trinkwasser für Knochenmarkstransplantationen

1. 1L Wasser mit Salzsäure (HCl) 1M auf pH 3,2 ansäuern
2. Autoklavieren
3. 5ml Cotrimoxazol (480mg/5 ml)
4. Steril verschlossen bis zu 4 Tage bei Raumtemperatur lagern
5. Vor der Verwendung 10min mit einem Magnetrührer mischen

3.1.4.6 BSA-Puffer

Die Lösung wurde für jedes Experiment neu hergestellt.

1. 10ml DPBS
2. 100mg BSA
3. 10min mit einem Magnetrührer mischen
4. Bis zur Verwendung bei Raumtemperatur lagern

3.2 Mäuse

Um den Einfluss von Midkine auf die Arteriogenese zu untersuchen, wurden MK^{-/-} Mäuse und Kontrollmäuse (WT) mit dem gleichen genetischen Hintergrund (C57BL/6J) für die Experimente verwendet. MK^{-/-} Mäuse mit dem MK^{tm1^{TMU}} Allel waren ein großzügiges Geschenk von Herrn Professor Takashi Muramatsu (Aichi Gakuin University, Japan) und wurden, wie zuvor beschrieben¹⁷⁴, gezüchtet. Für die Experimente wurden ausschließlich 8-11 Wochen alte männliche Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden in einem zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus mit Futter und Trinkwasser *ad libitum* gehalten. Alle Tierversuche wurden gemäß dem bayrischen Tierschutzgesetz durchgeführt und waren im entsprechenden Tierversuchsantrag genehmigt.

Um den Einfluss von exogenem NO, Midkine und VEGF zu untersuchen, wurden Mäuse mit dem NO Donor DETA NONOate (100µl DETA NONOATE 0,12mg/ml in 0,9% Kochsalzlösung, einmal täglich, ip.), rekombinatem murinen Midkine (rmMK) (50µl rmMK 0,1mg/ml in 0,9% Kochsalzlösung, zweimal täglich, sc.) oder rekombinatem murinen VEGF-A164 (rmVEGF) (100µl rmVEGF 0,01mg/ml in 0,9% Kochsalzlösung, einmal täglich, ip.) behandelt. Die Behandlung wurde drei Tage vor der Ligatur gestartet und bis zum Ende der Experimente fortgeführt. Die jeweiligen Kontrollgruppen wurden mit 0,9% Kochsalzlösung (Saline) behandelt.

3.3 Methoden

3.3.1 Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde ein *Kapa Mouse Genotyping Hot Start Kit* von PEQLAB und die folgende Primer benutzt: MK vorwärts 5'-TAACCCAGGTTTTACCCCTA-3'; MK rückwärts 5'-GTTGCAGGGCACCTTGCAATGGAC-3'.

Zunächst wurde aus Mäuseschwänzen DNA (Desoxyribonukleinsäure) gewonnen. Dazu wurde zu den Proben 2,0µl *Kapa Express Extract enzyme* (Kapa2G Fast HotStart ReadyMix), 10µl *Kapa Express Extract buffer* und 88µl destilliertes Wasser (Aqua dest)

gegeben. Die Proben wurden in einem Thermoschüttler inkubiert (10min bei 75°C und weitere 5min bei 95°C), anschließend zentrifugiert (1min, 12000rpm (Rotationen pro Minute)) und der Überstand für die Genotypisierung verwendet. Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde ein 25µl Ansatz verwendet: 1µl DNA, 1,25µl Primer vorwärts (10µM), 1,25µl Primer rückwärts (10µM), 12,5µl *2xKapa2G Fast HotStart* und 9,0µl Aqua dest. Die PCR wurde mit dem folgenden Thermoprofil gefahren: Vorlauf 3min 95°C; 35 Zyklen: Denaturierung 95°C 15s, Primerhybridisierung 58°C 15s und Elongation 72°C 30s; Nachlauf 72°C 10min; Abkühlen auf 4°C.

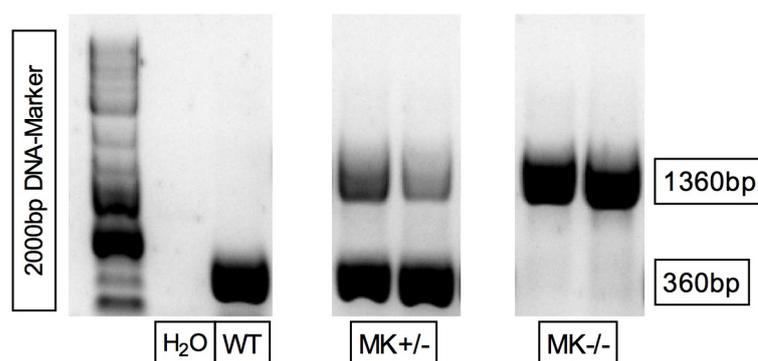


Abbildung 5: Genotypisierung

Die PCR-Produkte, ein 2000 Basenpaare (bp) großer DNA-Marker und Wasser (H₂O) wurden auf ein 1,2%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach zweistündiger Gelelektrophorese (70mA/60V) wurde das Gel fotografiert und die spezifischen Banden analysiert: WT ≈360bp, MK heterozygot (MK+/-) ≈360bp und 1360bp und MK-/- ≈1360bp.

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese auf einem 1,2%-igen Agarose-Gel mit GelRed-Färbung analysiert. Dazu wurden 1,2g Agarose mit 100ml 1xTAE (TRIS-Acetat-EDTA) Puffer vermischt, für 2 Minuten bei 600 Watt in einer Mikrowelle erhitzt, und anschließend mit einem Magnetrührer erhitzt, bis die Lösung lauwarm war. 5µl GelRed-Farbstoff wurden unter Rühren zugegeben. Die Mischung wurde in eine Gelkammer gefüllt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde der Tank mit 1xTAE Puffer gefüllt und je 10µl der Proben in die Schlitze des Gels pipettiert. Zur Beurteilung der PCR-Produkte wurden zusätzlich zu den Proben ein 2000 Basenpaare (bp) großer DNA-Marker und Wasser (H₂O) als Negativkontrolle auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde bei 70mA/60V für 2 Stunden laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel mit einer gekühlten CCD („charge-coupled device“) –Kamera fotografiert und mit der Software Wasabi analysiert. Bei WT Mäusen zeigten sich jeweils nur eine Bande bei 360bp, bei MK-/- Mäusen zeigten sich jeweils nur eine Bande bei 1360bp und bei heterozygoten Mäusen (MK+/-) zeigten sich jeweils zwei Banden bei 360bp und 1360bp (Abb. 5). Für die Experimente wurden nur männliche MK-/- Mäuse verwendet.

3.3.2 Ligatur der A. femoralis

Für dieses Projekt wurde ein etabliertes Maus-Modell der peripheren Arteriogenese verwendet.¹¹⁶

Die Mäuse wurden mit 0,1ml einer Dreifachkombination aus Fentanyl 0,05mg/kg, Midazolam 5,0mg/kg und Medetomidin 0,5mg/kg subkutan narkotisiert. Nach Entfernung der Haare an beiden Oberschenkeln wurden die Mäuse mit Klebestreifen auf einer Heizmatte fixiert. Die Operation erfolgte unter mikroskopischer Vergrößerung. Am rechten Oberschenkel wurde am Leistenband ein 5mm langer Hautschnitt parallel zur A. femoralis gesetzt. Anschließend wurde das Gefäßnervenbündel (V. femoralis, A. femoralis und N. femoralis) dargestellt (Abb. 6A). Unmittelbar distal des Abgangs der A. profunda femoris wurde die A. femoralis freigelegt und mit einem Faden unterlegt (Abb. 6B). Durch einen dreifachen chirurgischen Knoten wurde die Arterie ligiert (Abb. 6C) und anschließend der Hautschnitt mit einer Rückstichnaht verschlossen.

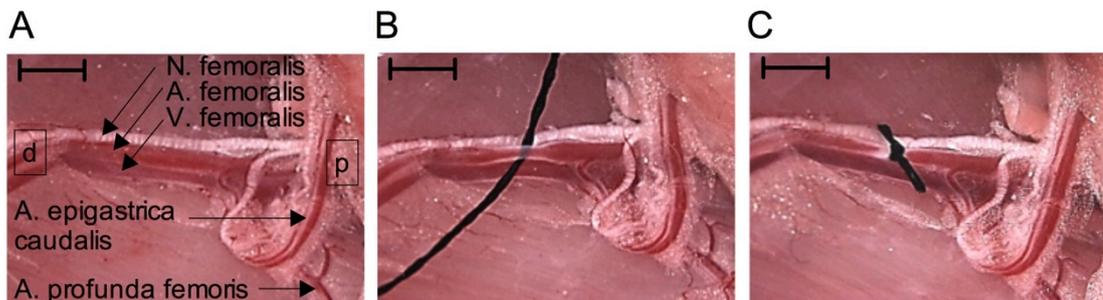


Abbildung 6: Ligatur der Arteria femoralis

(A) Darstellung des Gefäßnervenbündels (N./A./V. femoralis) im Oberschenkel von proximal (p) nach distal (d). Von der A. femoralis gehen die A. epigastrica caudalis und die A. profunda femoris ab. Die A. femoralis wurde mit einem Faden unterlegt (B) und mit einem dreifachen chirurgischen Knoten verschlossen (C). Maßstab = 1mm.

Am linken Hinterlauf wurde als Kontrolle eine Scheinoperation durchgeführt. Hierzu wurde auf die Ligatur der A. femoralis verzichtet und die Arterie stattdessen nur mit einem Faden unterlegt.

Während der Operation wurde die Temperatur der Mäuse mit einer Heizmatte aufrechterhalten und die Augen mit Bepanthen Augensalbe geschützt. Nach der Operation wurde die Narkose durch subkutane Gabe von 0,15ml einer Dreifachkombination aus Naloxon 1,2mg/kg, Flumazenil 0,5mg/kg und Atipamezol 2,5mg/kg antagonisiert. Als Schmerzmittel wurde den Mäusen drei Tage lang alle zwölf Stunden Buprenorphin 0,1mg/kg subkutan verabreicht.

3.3.3 Laser-Doppler-Imaging

Mit dem Laser-Doppler-Imaging (LDI) Verfahren konnte nicht-invasiv und schmerzfrei die Durchblutung (Perfusion) der Hinterläufe untersucht werden. Hierbei wurde die Tatsache genutzt, dass sich die Frequenz des Lichtes bei der Reflexion an bewegten Teilchen ändert.

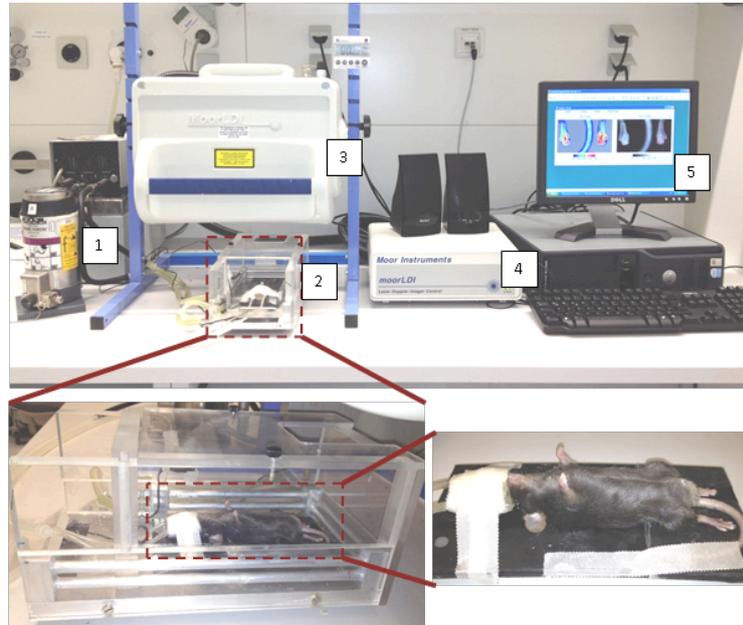


Abbildung 7: Versuchsaufbau für die LDI Messungen

Für die LDI Messungen wurden die Mäuse mit einem Isofluran Verdampfer (1) narkotisiert und für 10min in einer Wärmekammer (2) gelagert. Der Laser (3) scannte mit einer Geschwindigkeit von 4ms/pixel und einer Wellenlänge von 780-830nm einen 2,3x3,6cm großen Bereich. Der Laser Doppler Imager (4) verwandelte das reflektierte Signal in Flux Bilder. Mit der Moor LDI V5.3 Software (5) wurde anschließend eine Fläche (Region of Interest, ROI) von 0,55cm² mit einer Genauigkeit von 100% pro Pfote analysiert.

Für die Messungen befanden sich die Mäuse 20cm unterhalb des Laserkopfes in einer Wärmekammer bei 37°C (Abb. 7). Zunächst wurden die Mäuse in einer Induktionsröhre mit 5 Vol% Isofluran und 2l/min Sauerstoff narkotisiert und anschließend die Narkose durch eine Atemmaske mit 1,5 Vol% Isofluran und 2l/min Sauerstoff über den Zeitraum der Messung aufrechterhalten. Die Pfoten wurden mit doppelseitigem Klebeband plantarseitig auf der Unterlage fixiert. Vor dem Start der Messung wurden die Mäuse für zehn Minuten in der Wärmekammer gelagert. Der Laser scannte mit einer Geschwindigkeit von 4ms/Pixel und einer Wellenlänge von 780-830nm einen 2,3x3,6cm großen Bereich der Pfoten. Der an den Pfoten reflektierte Lichtstrahl wurde anschließend detektiert und in ein farbkodiertes Bild (Flux Bild) umgewandelt (Abb. 8).

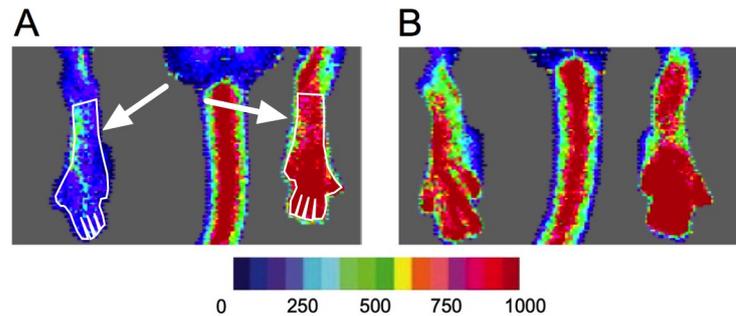


Abbildung 8: Flux Bilder nach Laser-Doppler-Imaging

Darstellung der Flux Bilder unmittelbar nach Ligatur **(A)** und 7d nach Ligatur **(B)**. Flux Bilder zeigen die farbkodierten Bilder des reflektierten Laserstrahls. Blau: niedrige Flux Werte \approx geringe Perfusion. Rot: hohe Flux Werte \approx starke Perfusion. Die Flux Mittelwerte der „Region of Interest“ (ROI, Pfeile, $0,55\text{cm}^2$) beider Pfoten wurde analysiert.

Die Durchblutung der Pfoten wurde vor Ligatur (basal), unmittelbar nach Ligatur (nLig), drei Tage und sieben Tage nach Ligatur gemessen. Die Auswertung der farbkodierten Bilder erfolgte mit der Computersoftware Moor LDI V5.3. An beiden Pfoten wurden die Flux Mittelwerte einer $0,55\text{cm}^2$ großen Fläche („Region of Interest“, ROI) analysiert. Anschließend wurde das Verhältnis der okkludierten zur scheinoperierten Seite (Occ/Sham) berechnet. Für die weiteren Versuche wurden nur Mäuse verwendet, deren Verhältnis Occ/Sham unmittelbar nach Ligatur unter $0,15$ lag.

3.3.4 „Active Foot Movement Score“

Am dritten und siebten postoperativen Tag wurde der „Active Foot Movement Score“ ermittelt.¹⁷⁵ Dazu wurden die Mäuse vor den LDI Messungen alleine in einen Käfig gesetzt und die Bewegung des rechten Hinterlaufs beobachtet. Die motorische Funktion des rechten Hinterlaufs wurde in folgende Kategorien unterteilt: 0= keine Bewegung; 1= nur das Bein wurde bewegt; 2=aktive Bewegung des Fußes; 3= vollständige Nutzung des Fußes, aber keine aktive Zehenspreizung; 4= uneingeschränkte Bewegung des Fußes. Mithilfe des Scores konnte die motorische Funktion nach Ligatur der A. femoralis beurteilt werden.¹⁷⁵

3.3.5 Gewebeentnahme

Um Gewebe für weitere Analysen zu gewinnen, wurden Mäuse 12 Stunden, 24 Stunden, 36 Stunden, 3 Tage oder 7 Tage nach Ligatur geopfert. Als Kontrollgruppe wurde Gewebe von nicht ligierten Mäusen (basal) verwendet.

Für Untersuchungen des Plasmas wurde Mäusen Vollblut mittels kardialer Punktion entnommen und in EDTA Röhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation (2800rpm, 4°C, 20min) des Vollblutes wurde aus dem Überstand das Plasma gewonnen und bei -80°C gelagert. Vor der Gewebeentnahme aus dem Oberschenkel wurde ein Aortenkatheter platziert.¹¹⁶ Hierzu wurde das Abdomen von narkotisierten Mäusen eröffnet, die Aorta abdominalis dargestellt (Abb. 9A) und diese mit einem Faden unterlegt (Abb. 9B). Proximal der Aortenbifurkation wurde die Aorta aufgeschnitten, der Aortenkatheter eingeführt und mit einem Knoten fixiert (Abb. 9C).

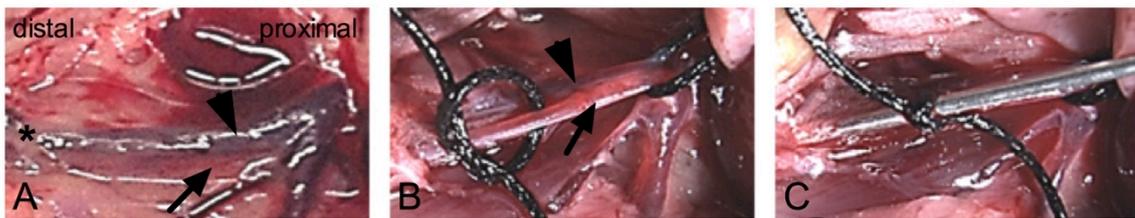


Abbildung 9: Katheterisierung der Aorta

(A) Darstellung der Vena cava inferior (Pfeilspitze), der Aorta abdominalis (Pfeil) und der Aortenbifurkation (*). **(B)** Die A. abdominalis wurde von der V. cava inf. gelöst und mit einem Faden unterlegt. **(C)** Proximal der Aortenbifurkation wurde der Aortenkatheter eingeführt und mit einem Knoten fixiert.

Für Analysen der Genexpression wurden einzelne Kollateralen aus dem Oberschenkel gewonnen. Zur besseren Darstellung der Kollateralen wurden beide Hinterläufe über den Aortenkatheter mit flüssigem Latex perfundiert. Anschließend wurden jeweils zwei oberflächliche Kollateralen der Occ- und Sham-Seite beziehungsweise des linken und des rechten Beins bei nicht ligierten Mäusen entnommen, mit Trockeneis gekühlt und bei -80°C gelagert.

Für histologische, immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen wurde Mäusen die Adduktorenmuskulatur entnommen. Zuvor erfolgte über den Aortenkatheter die Perfusion der Hinterläufe mit 20ml Adenosin-Lösung, um die maximale Vasodilatation der Kollateralen sicherzustellen, und anschließend mit 20ml 4% PFA (Paraformaldehyd) (für die Paraffineinbettung) oder 3% PFA (für die Kryokonservierung), zur Fixierung des Gewebes. Nach Entfernung der Haut an beiden Hinterläufen wurde die Adduktorenmuskulatur der okkludierten und scheinoperierten Seite entnommen.¹¹⁶ Für die Kryokonservierung wurde das Gewebe für 4 Stunden in 15% Saccharose-Lösung gelagert, anschließend für 12 Stunden in 30% Saccharose-Lösung bei 4°C gelagert und zuletzt mit Tissue Tek eingebettet. Für die Paraffineinbettung wurde das Gewebe für 24 Stunden in 4% PFA gelagert, anschließend für eine Stunde in fließendem Wasser gespült und dann in 70% Alkohol gelagert. Beim Einbetten in Paraffin wurde die Adduktorenmuskulatur

zunächst mit einem Skalpell im mittleren Bereich der Kollateralen senkrecht zum Faserverlauf der Adduktorenmuskulatur geteilt (Abb. 10).

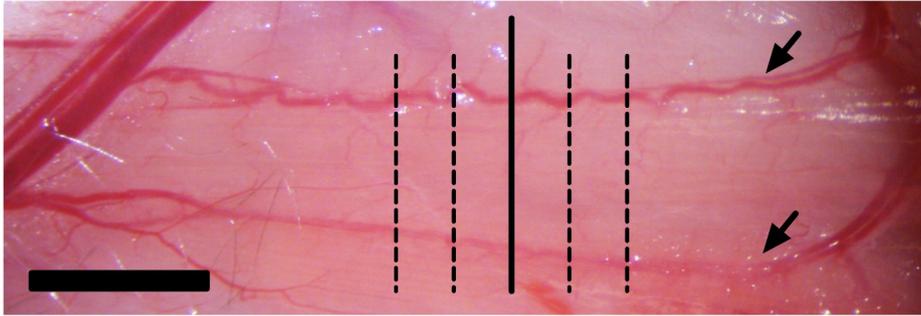


Abbildung 10: Anfertigung von Schnitten der Adduktorenmuskulatur

Adduktorenmuskulatur der Occ-Seite einer WT Maus mit Kollateralen (Pfeile) 7d (Tage) nach Ligatur. Vor dem Einbetten in Paraffin wurde die Adduktorenmuskulatur mit einem Skalpell im mittleren Bereich der Kollateralen geteilt (Linie). Aus den Paraffinblöcken wurden Schnitte senkrecht zum Verlauf der Kollateralen angefertigt. Der erste Schnitt erfolgt unmittelbar im mittleren Bereich der Kollateralen (Linie) und alle weiteren Schnitte im Abstand von je 1mm (gestrichelte Linien). Maßstab = 3mm.

Dadurch wurde gewährleistet, dass in allen Proben der gleiche Bereich der Kollateralen untersucht wurde. Dies ist von großer Bedeutung, da die Kollateralen nach Ligatur im mittleren Bereich zunächst am dünnsten sind. Von jeder Probe wurden mindestens drei Schnitte angefertigt: Einer direkt im mittleren Bereich und die weiteren Schnitte jeweils mit einem Abstand von 1mm. Außerdem wurde durch diese Methode gewährleistet, dass die Kollateralen senkrecht angeschnitten wurden, da die Kollateralen annähernd parallel zu den Muskelfasern der Adduktoren verlaufen.

3.3.6 Bestimmung des Midkine Plasmaspiegels

Die Plasmakonzentration von Midkine wurde mit einem standardisierten „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) Kit gemessen. Für die Standardkurve wurde der Standard in folgende Konzentrationen verdünnt: 10ng/ml, 5ng/ml, 2,5ng/ml, 1,25ng/ml, 0,625ng/ml, 0,312ng/ml, 0,156ng/ml und 0ng/ml. Von jeder Plasmaprobe wurden Triplikate mit jeweils 100µl Plasma analysiert. In eine 96-Well-Platte wurden je 100µl Standard oder 100µl der jeweiligen Probe pro „Well“ pipettiert, die 96-Well-Platte mit einer Klebefolie verschlossen und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit entfernt und alle Proben mit je 100µl *Detection Reagent A* für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt und die Platte dreimal mit einem Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden alle Proben für 30 Minuten mit je 100µl *Detection Reagent B* inkubiert. Zum Schluss wurde zu allen Proben je 50µl *Stop Solution* pipettiert. Nach zwei Minuten wurde mit einem „ELISA Reader“ die optische Dichte (OD) der Proben bei einer

Wellenlänge von 450nm bestimmt. Die Ergebnisse der Standardreihe wurden als Standardkurve gezeichnet und damit die Midkine Konzentration der Plasmaproben bestimmt.

3.3.7 Bestimmung des VEGF-A Plasmaspiegels

Die Plasmakonzentration von VEGF-A wurde mit einem standardisierten ELISA Kit gemessen. Für die Standardkurve wurde der Standard in folgende Konzentrationen verdünnt: 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml, 31,2pg/ml, 15,6pg/ml, 7,8pg/ml und 0pg/ml. Für die Plasmaproben wurden je 10µl Plasma mit 40µl *Calibrator Diluent RD5T* verdünnt. Von jeder Probe wurden Triplikate analysiert. In eine 96-Well-Platte wurden je 50µl des Standards oder 50µl der Plasmaproben und je 50µl *Assay Diluent RD1N* pro „Well“ pipettiert. Die 96-Well-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt und die Platte mit Waschpuffer dreimal gewaschen. Im Anschluss wurde je 100µl *Mouse VEGF Conjugate* zu jeder Probe pipettiert und erneut für zwei Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100µl Substrate Solution dazugegeben und für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurde 100µl Stop Solution hinzugefügt. Nach zwei Minuten wurde mit einem „ELISA Reader“ die OD der Proben bei 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 540nm bestimmt. Die Ergebnisse der Standardreihe wurden als Standardkurve gezeichnet und damit die VEGF-A Konzentration der Plasmaproben bestimmt.

3.3.8 Histologische Analysen

Um das Wachstum der Kollateralen genauer zu analysieren, wurden der Gefäßdurchmesser und die Gefäßwanddicke der Kollateralen bestimmt. Hierzu wurden aus dem eingebetteten Muskelgewebe 4µm dicke Schnitte angefertigt. Für die Analysen wurden pro Maus fünf Schnitte mit je drei Kollateralen analysiert. Zwischen zwei Schnitten war mindestens 1mm Abstand. Für die Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst zweimal für je zehn Minuten in Xylol getaucht und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (99%, 96% und 70% Ethanol) für je zehn Minuten rehydriert. Nach einer kurzen Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte für eine Stunde bei 65°C mit GIEMSA Gebrauchslösung gefärbt, im Anschluss wieder mit destilliertem Wasser gespült und für circa eine Sekunde in 0,5% Essigsäure differenziert (bis zum Farbumschlag von blau nach rot). Danach wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 99% Ethanol) und Xylol für je zehn Minuten dehydriert. Zuletzt wurden die Schnitte mit Eukitt und Deckgläsern verschlossen.

Die Schnitte wurden mit einem Axioskop40 Mikroskop untersucht und fotografiert (AxioCam 105 color) (Abb. 11A). Mit der Software AxioVision 4.8.2.0 wurde anschließend sowohl die Fläche des Gefäßlumens (A_{Lumen}), als auch die Gesamtfläche des Gefäßes (A_{Gesamt}) bestimmt (Abb. 11BC). Mit mathematischen Formeln konnte daraus der Gefäßdurchmesser, die Gefäßwanddicke und das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser berechnet (Abb. 11D).

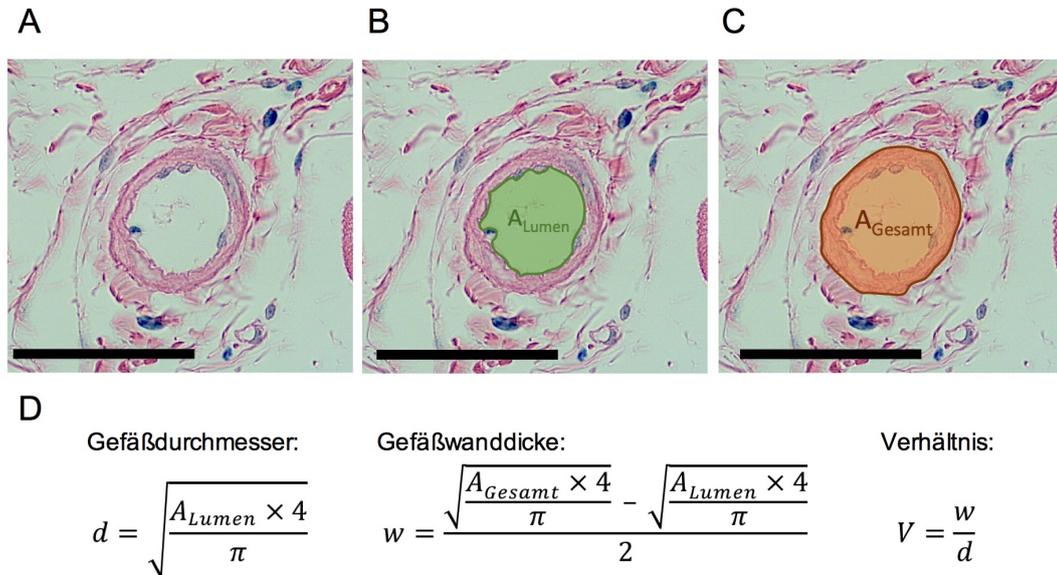


Abbildung 11: Histologische Analysen

(A) GIEMSA gefärbte Kollaterale einer MK-/- Maus 7d nach Ligatur. Maßstab = 50 μ m. Mit der Software AxioVision 4.8.2.0 wurde die Fläche des Gefäßlumens (B) und die Gesamtfläche des Gefäßes (C) bestimmt. (D) Benutze Formeln: d = Gefäßdurchmesser, A_{Lumen} = Fläche des Gefäßlumens; w = Gefäßwanddicke; A_{Gesamt} = Gesamtfläche des Gefäßes; V = Verhältnis Gefäßwanddicke zu Gefäßdurchmesser.

Außerdem wurde die Anzahl der Kollateralen auf der Occ- und Sham-Seite bestimmt. Dabei wurden auf der Occ-Seite nur Kollateralen mit einem Durchmesser >25 μ m als wachsende Kollateralen eingestuft und in den folgenden Analysen weiter untersucht. Kollateralen mit einem kleineren Durchmesser wurden nicht weiter analysiert, da ihr Durchmesser ungefähr so groß wie der Durchmesser von Kollateralen der Sham Seite war und die Kollateralen folglich nach Ligatur nicht gewachsen sind.

3.3.9 Immunhistochemische Färbungen gegen Bromdesoxyuridin

Ab dem Tag der Ligatur wurden Mäuse für vier Tage am Stück mit Bromdesoxyuridin (BrdU) (1.25mg/d BrdU in DPBS, ip.) behandelt. BrdU wird während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Mit Antikörpern gegen BrdU wurde die Zellproliferation im entnommenen Gewebe analysiert.¹⁷⁶ Für die Färbung wurde ein Detektionskit von BD Bioscience verwendet.

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und mit 3% H_2O_2 in DPBS für 10 Minuten geblockt. Danach wurde die Schnitte in *BD Retrieval A Solution* getaucht und zweimal für 12 Minuten in einer Mikrowelle mit 750 Watt erhitzt. Im Anschluss kühlte die Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur ab. Die Schnitte wurden mit 100 μ l Anti-BrdU Antikörper (1:10 mit *Diluent Puffer* verdünnt) für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten mit Streptavidin-„Horseradish Peroxidase“ (HRP) Lösung inkubiert und danach mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Lösung für fünf Minuten gefärbt. Zwischen jedem dieser Schritte wurden die Schnitte dreimal mit DPBS für je fünf Minuten gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte für 45 Sekunden mit Hämatoxylin gegengefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 99% Ethanol für je 5 Minuten) dehydriert, für 5 Minuten in Xylol getaucht und mit Eukitt verschlossen.

Anschließend wurde die Anzahl der BrdU positiven (BrdU⁺) Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen in den Kollateralen bestimmt. Die dargestellten Werte sind das Verhältnis von BrdU⁺ Zellen zu allen Endothelzellen beziehungsweise glatten Gefäßmuskelzellen in einer Kollateralen.

3.3.10 Immunfluoreszenzfärbung von Kollateralen

Zunächst wurden von dem kryokonservierten Gewebe 8 μ m dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurde für 5 Minuten in 4% PFA getaucht und anschließend dreimal für je 3 Minuten mit DPBS gewaschen. Über Nacht wurden die Schnitte bei 4°C mit einem primären Antikörper gegen Midkine (1:100 in DPBS) oder gegen VEGF-A164 (1:50 in DPBS) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einem sekundären „donkey anti-rabbit“ Antikörper (1:100 in DPBS) inkubiert und über Nacht bei 4°C mit einem Antikörper gegen neutrophile Granulozyten (Ly-6G (Lymphocyte antigen 6 complex, locus G)) (1:100 in DPBS) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Antikörper gegen DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (1:1000 in DPBS) inkubiert. Zwischen den einzelnen Färbungen wurden die Schnitte jeweils dreimal für je 3 Minuten mit DPBS gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte mit Mowiol verschlossen. Die Färbungen wurden von Christina Winterbauer (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) durchgeführt und die Verwendung der Bilder für dieses Projekt wurde von Dr. Kerstin Troidl (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) genehmigt.

3.3.11 Bestimmung der Genexpression

Für die Isolierung von RNA (Ribonukleinsäure) aus Kollateralen wurden zwei isolierte Kollateralen pro Maus pro Seite in einen „Lysis Tube“ mit 300µl Trizol gegeben, für 2 Minuten mit einem Homogenisator lysiert und die entstandene Probe in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Für die Isolierung von RNA aus primären Endothelzellen, wurde das Endothelzellmedium aus der Petrischale entfernt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1ml Trizol und einem Zellschaber lysiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Die Proben von Kollateralen und primären Endothelzellen wurden jeweils zentrifugiert (12000g, 10min, 4°C) und die folgenden Schritte waren für beide Probenarten identisch.

Nach der Zentrifugation wurde der klare Überstand abpipettiert, 60µl Chloroform/Isoamylalkohol zum Überstand dazugegeben und die Proben kurz geschüttelt. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben erneut zentrifugiert (15min, 12000g, 4°C). Nach der Zentrifugation unterteilte sich die Probe in eine untere, rote Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere, durchsichtige wässrige Phase. Die RNA befand sich ausschließlich in der wässrigen Phase, welche in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Zu jeder Probe wurden 150µl Isopropanol gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (12000g, 10min, 4°C) wurde der Überstand entfernt und die RNA blieb als Sediment im Reaktionsgefäß zurück. Die Proben wurden kurz mit 800µl 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5min, 5000g, 4°C) und der Überstand verworfen. Nach erneutem Waschen wurden die Proben für zwei Minuten an der Luft getrocknet. Das RNA Sediment wurde mit 48µl H₂O resuspendiert.

Um restliche genomische DNA zu entfernen, wurde zu den Proben je 6µl DNase Puffer (10x) und 6µl DNase (RNase freies DNase Set) gegeben und die Proben bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Um die DNase zu inaktivieren wurde die Proben für 10 Minuten bei 65°C inkubiert, sowie 40µl H₂O und 160µl Trizol zu den Proben gegeben. Anschließend wurden die Proben geschwenkt, zentrifugiert (12000g, 10min, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Dann wurden die Proben mit 32µl Chloroform/Isoamylalkohol vermischt, für 15 Sekunden kräftig geschüttelt, für 3 Minuten auf Eis gelegt und zentrifugiert (12000g, 15min, 4°C). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, mit 80µl Isopropanol vermischt und für 1 Stunde bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (12000g, 15min, 4°C), das Sediment zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol (300µl) gewaschen und erneut zentrifugiert (12000g, 5min, 4°C). Das Sediment wurde im geöffneten Reaktionsgefäß getrocknet, danach in 30µl H₂O resuspendiert und mit einem Thermoschüttler für 15 Minuten bei 64°C inkubiert.

Mit einem Spektrofotometer wurde die optische Dichte (OD) von 2µl Aliquoten bei 260nm bestimmt und anhand der folgenden Formel die Konzentration der Proben berechnet:

$$c(\mu\text{g RNA}/\mu\text{l H}_2\text{O}) = (\text{OD}_{260} \times V \times F)/1000$$

c = Konzentration; OD₂₆₀ = Absorption bei 260nm; F = Multiplikationsfaktor (40µg/ml bei RNA Proben); V = Verdünnungsfaktor der Probe

OD₂₆₀ Werte zwischen 0,1 und 1,0 wurden als zuverlässig angesehen. Um Verunreinigungen auszuschließen, wurde die Reinheit der Proben durch das Verhältnis der OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ bestimmt. Werte zwischen 1,8 bis 2,0 wurden akzeptiert. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung von 100µl cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) wurde 1µg RNA in 7,8µl sterilem Wasser verdünnt und bei 65°C für 15 Minuten denaturiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis gestellt. Zu je 7,8µl RNA wurden 12,2µl des folgenden Synthese-Mix (cDNA Synthese-Kit) gegeben:

Reagenz	Volumen pro Probe	Endgültige Konzentration
10x Reaction Buffer	2,0µl	1x
25mM MgCl ₂	4,0µl	5mM
Deoxynucleotide Mix	2,0µl	1mM
Zufälliger Primer p(dN) ₆	2,0µl	0,04 A ₂₆₀ Einheiten (1,6µg)
RNase Inhibitor	1,0µl	50 Einheiten
AMV-RT	0,8µl	≥20 Einheiten
Gelatine	0,4µl	0,01mg/ml
Gesamt	12,2µl	

Die Proben wurden gemischt und mit dem folgenden Thermoprofil cDNA hergestellt:

Primerhybridisierung	10min bei 25°C;
Reverse Transkription	60min bei 42°C;
Inhibierung der reversen Transkriptase	5min bei 99°C;
Abkühlen	5min bei 4°C

Zum Abschluss wurde die fertige cDNA mit 80µl H₂O verdünnt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR) wurde mit einem Light Cycler 1.5 und dem Power SYBR® Green Master Mix durchgeführt. Zunächst wurde aus den Primern (Tabelle 5) jeweils ein Primer-Mix hergestellt und auf Eis gelagert:

10µl Primer vorwärts 5µM,
 10µl Primer rückwärts 5µM,
 180µl H₂O

Primer			Annealingtemperatur
18S	vorwärts	5'-GGACAGGATTGACAGATTGATAG-3'	64°C
	rückwärts	5'-CTCGTTCGTTATCGGAATTAAC -3'	
MK	vorwärts	5'- GTGACTAAGCCCTGCACCTC -3'	61°C
	rückwärts	5'- ATCTCTTGTCCCTCCCCACT -3'	
eNOS	vorwärts	5'-GTTACCTACATCTGTAACCAC -3'	62°C
	rückwärts	5'-GCATAGCGTATCAGCTGGCTG -3'	
iNOS	vorwärts	5'-GCTCATGACATCGACCAGAAGC-3'	62°C
	rückwärts	5'-GTGATGTTTGCTTCGGACATC-3'	
nNOS	vorwärts	5'-TGGGCGATCCAGCTAATGTGG -3'	62°C
	rückwärts	5'-GGGGATCTGAAAGAGTTCAGGGTC -3'	

Tabelle 5: Primer für qRT-PCR

Für die qRT-PCR wurde ein 10µl Ansatz mit den folgenden Komponenten benutzt:

5µl Power Syber Green,
 1µl Primer-Mix,
 1µl der jeweiligen cDNA,
 3µl H₂O

Die qRT-PCR wurde mit dem folgenden Thermoprofil gefahren:

Initiale Denaturierung 10min bei 95,0°C;
 40 Zyklen
 Denaturierung 15s bei 95°C;
 Primerhybridisierung 1min bei der jeweiligen Annealingtemperatur;
 Elongation 15s bei 72°C;
 Schmelzkurve von 60°C bis 95°C, Anstiegsrate 0,04°C/s
 Abkühlen 30s bei 40°C

Es wurde die freiwerdende Fluoreszenz während der kombinierten Primerhybridisierungs- und Elongationsphase gemessen und somit die Menge der synthetisierten DNA bestimmt.

Von jeder Probe wurden Triplikate analysiert. Mit Schmelzkurven wurde die Spezifität der entstandenen Produkte bestimmt (nur ein Schmelzpunkt war sichtbar).

Als Referenz wurde die Expression von 18S rRNA (ribosomale Ribonukleinsäure) verwendet. Zunächst wurde mit Standardkurven die Effizienz (E) der Primer bestimmt. Dazu wurden Verdünnungsreihen von 10^5 bis 10^{10} analysiert und die Steigungen (a) der Standardkurven, sowie die Schnittpunkte (b) mit der y-Achse der einzelnen Gene (Z) und der Referenz (R), ermittelt. Die Effizienz wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$E = 10^{\frac{-1}{a}}$$

Die relative Expression der einzelnen Gene wurden mit der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Relative Expression} = \frac{E_Z^{bZ(C)-bZ(P)}}{E_R^{bR(C)-bR(P)}}$$

E_Z = Effizienz des Ziel-Gens, E_R = Effizienz von 18S rRNA

b_Z = Schnittpunkt des Ziel-Gens, b_R = Schnittpunkt von 18S rRNA

P = Probe, C = Calibrator (Gewebe von unbehandelten Mäusen)

Zum Abschluss wurde die Spezifität der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese untersucht (pro PCR-Produkt nur eine Bande). Dazu wurden die Proben auf ein 1,5%-iges Agarose-Gel pipettiert und die Gelelektrophorese wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (siehe 3.3.1).

3.3.12 In Vitro Versuche

Für die *in vitro* Versuche wurden zunächst Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen aus 8 Wochen alten WT Mäusen und MK^{-/-} Mäusen isoliert.¹⁷⁷

3.3.12.1 Isolierung von Endothelzellen

Kurz zusammengefasst wurde narkotisierten Mäusen 1.000IU/ml Heparin in 1ml DPBS in den linken Ventrikel gespritzt und anschließend die Aorta vom Aortenbogen bis zur Aorta abdominalis entnommen. Eine 24G Kanüle wurde in die entnommene Aorta eingeführt und mit 1ml DMEM gespült. Anschließend wurde das offene Ende der Aorta verknotet, über die Kanüle mit 200µl Kollagenase-Lösung gefüllt und für 45min in einer Petrischale mit DMEM bei 37°C inkubiert. Danach wurden die gelösten Endothelzellen mit 5ml DMEM aus der Aorta in einen Falcon Tube gespült. Die Probe wurde zentrifugiert (1200rpm, 5min) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit 2ml Medium für Endothelzellen („Complete Mouse Endothelial Cell Medium“) resuspendiert, auf eine kollagenbeschichtete Petrischale (35mm) gegeben und anschließend bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Sobald die Zellen annähernd volle Konfluenz erreicht hatten, wurden die Zellen von der Petrischale abgelöst und für

weitere Versuche verwendet. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 10ml DPBS gewaschen und mit 0,8ml Trypsin für 1 Minute inkubiert. Anschließend wurden 6ml DMEM dazugegeben, die gesamte Flüssigkeit in ein 15ml Reaktionsgefäß übertragen und zentrifugiert (1200rpm, 5min). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 6ml Endothelzellmedium resuspendiert. Vor der Verwendung der Zellen für weitere Experimente, wurde mit einer Neubauer Zählkammer die Anzahl der Zellen pro ml bestimmt.

3.3.12.2 Isolierung von glatten Gefäßmuskelzellen

Für die Gewinnung von glatten Gefäßmuskelzellen wurde den Mäusen wie zuvor beschrieben die Aorta entnommen. Nachdem die Endothelzellen aus der Aorta gespült worden sind, wurde die Aorta längs eröffnet und in 1x1mm kleine Stücke geschnitten. Die Stücke wurden mit der luminalen Seite nach unten auf eine mit Gelatine beschichtete Petrischale (35mm) gelegt und diese nach 20 Minuten mit Medium für glatte Gefäßmuskelzellen („Complete Mouse Smooth Muscle Cell Medium“) gefüllt. Anschließend sind aus den Rändern der Gefäßstücke glatte Gefäßmuskeln gewachsen und nach 14 Tagen wurden die Gefäßstücke entfernt. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Sobald die Zellen annähernd volle Konfluenz erreicht hatten, wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, von der Petrischale abgelöst und für weitere Versuche verwendet.

3.3.12.3 Bromdesoxyuridin Inkorporation in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro*

Um die Proliferation der Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* zu messen wurde ein BrdU ELISA Kit von Roche verwendet. Auf einer 96-Well Platte wurden je $1,2 \times 10^4$ Endothelzellen oder glatte Gefäßmuskelzellen pro „Well“ mit 100µl 2%FCS in DMEM für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 100µl DMEM ohne FCS für 24 Stunden kultiviert. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt und die Zellen mit 100µl Mastermix (10µl BrdU, 10µl Stimulus, 80µl DMEM) für 48 Stunden kultiviert. Als Stimuli wurde 2%FCS in DMEM alleine (basal), oder in verschiedenen Kombinationen mit 100µmol/l NO (aus 50µmol/ml DETA NONOate), rmMK (100ng/ml), dem NOS-Inhibitor L-NIO (0,1µmol/ml), rekombinantem murinen VEGF (50ng/ml) und dem VEGFR-2 Inhibitor SU1498 (100ng/ml), verwendet. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 5%FCS in DMEM stimuliert.

Nach der Stimulation wurde die Flüssigkeit entfernt und die Platte für 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 200µl *FixDenat Solution* für

30 Minuten bei Raumtemperatur denaturiert. Danach wurde die Lösung entfernt und die Zellen mit 100µl *Anti-BrdU POD Solution* (*Anti-BrdU POD* 1:100 verdünnt mit *Antibody Dilution Solution*) für 1,5 Stunden kultiviert. Die Flüssigkeit wurde entfernt und die Platte dreimal mit einem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde zu den Zellen 100µl *Substrat Solution* pipettiert und die Platte bei 4°C für 35 Minuten inkubiert. Zum Schluss wurden 25µl 1M Schwefelsäure (H₂SO₄) Lösung pro „Well“ hinzugefügt und die Platte für eine Minute mit 30rpm geschüttelt. Anschließend wurde die BrdU Inkorporation mit einem „ELISA Reader“ bei 450nm mit einer Referenzwellenlänge von 620nm gemessen. Die dargestellten Ergebnisse sind jeweils auf Zellen isoliert aus WT Mäusen, welche nur mit 2%FCS in DMEM kultiviert wurden, normalisiert.

3.3.13 Knochenmarkstransplantation

Für die Knochenmarkstransplantationen wurden vier Wochen alte Mäuse als Empfänger und elf Wochen alte Mäuse als Spender benutzt. WT Mäusen (C57BL/6-Ly5.1) wurde MK^{-/-} Spender-Knochenmark (WT^{MK^{-/-}}) oder WT Spender-Knochenmark (WT^{WT}) transplantiert. MK^{-/-} Mäusen wurde WT Spender-Knochenmarkt (MK^{-/-}^{WT}) oder MK^{-/-} Spender-Knochenmark (MK^{-/-}^{MK^{-/-}}) transplantiert (Tabelle 6).

		Spender	
		WT	MK ^{-/-}
Empfänger	WT	WT ^{WT}	WT ^{MK^{-/-}}
	MK ^{-/-}	MK ^{-/-} ^{WT}	MK ^{-/-} ^{MK^{-/-}}

Tabelle 6: Versuchsaufbau Knochenmarkstransplantation

Um das Spender-Knochenmark zu gewinnen wurden elf Wochen alten Mäuse geopfert. Die Knochen der Oberschenkel, Unterschenkel und des Beckens wurden von Muskeln und Bindegewebe freipräpariert. Nach der Entfernung der Epiphysen wurde das Knochenmark mit 2ml Puffer (siehe 3.1.4.4) aus den Knochen durch einen 75µm Filter gespült und zentrifugiert (1800rpm, 5min). Nach Entfernung des Überstands wurde das Sediment mit 1ml NH₄Cl (*ACK Lysing Buffer*) resuspendiert, für 8min bei 4°C inkubiert und anschließend 14ml Puffer dazugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (1800rpm, 3min) wurde der Überstand entfernt und das Sediment in 1ml Puffer resuspendiert. Mit einer Neubauer Zählkammer wurde die Anzahl der Zellen pro ml bestimmt. Bis zur Transplantation wurde das Knochenmark auf Eis gelagert. Die Empfängermäuse wurden im Abstand von zwölf Stunden zweimal mit einer subletalen Dosis von 6Gy bestrahlt.

Unmittelbar nach der zweiten Bestrahlung wurden den Mäusen jeweils 6×10^6 Zellen des entsprechenden Spenderknochenmarks in die Schwanzvene gespritzt. Für die nächsten vier Wochen haben die Mäuse saures, antibiotisches Trinkwasser (siehe 3.1.4.5) bekommen. Sieben Wochen nach der Knochenmarkstransplantation wurden die weiteren Versuche gestartet. Außerdem wurde mit „Fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) Analysen der stabile Chimärismus der Mäuse nachgewiesen.¹⁷⁸ Transplantierten Mäusen wurde mittels kardialer Punktion Vollblut entnommen und in ein EDTA-Röhrchen pipettiert. Anschließend wurden 100µl der Proben mit Antikörpern gegen CD45.1 (CD45 Isoform von C57BL/6-Ly5.1 Mäusen) und CD45.2 (CD45 Isoform von MK-/- Mäusen) für 20 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde 2ml „Lysing Solution“ (1:10 verdünnt in Aqua dest) zu jeder Probe gegeben, die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und danach zentrifugiert (1500rpm, 5min). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Proben mit 200µl BSA-Puffer (siehe 3.1.4.6) resuspendiert. Mit dem „Gallios Flow Cytometer“ und der Software Kaluza 1.3 wurde die Zahl der CD45.1 oder CD45.2 positiven Zellen in den Plasmaproben gemessen. Die Spezifität der Antikörper wurde durch Kontrollversuche mit den entsprechenden Isotypkontrollen untersucht.

3.3.14 Statistische Analysen und Abbildungen

Statistische Analysen wurden mit GraphPad Prism Version 6.0f durchgeführt. Alle dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD). Analysen zwischen zwei Gruppen wurden mit dem ungepaarten Student's t-Test oder ANOVA getestet. Mittelwerte zwischen mehreren Gruppen und unterschiedlichen Zeitpunkten wurden mit ANOVA und Bonferroni-Korrektur Test analysiert. Die einzelnen Analysen sind in den Legenden der Abbildungen beschrieben. Ergebnisse wurde als statistisch signifikant angenommen wenn $P < 0,05$.

Die Abbildungen wurden mit GraphPad Prism Version 6.0f und Inkscape 0.91 erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Midkine auf die Arteriogenese

Um den Einfluss von Midkine auf die Arteriogenese zu untersuchen, wurde ein etabliertes Modell der peripheren Arteriogenese in Mäusen verwendet.¹¹⁶ In WT und MK^{-/-} Mäusen wurde am rechten Oberschenkel durch die Ligatur der A. femoralis die Arteriogenese induziert. Auf der linken Seite erfolgte eine Scheinoperation.

4.1.1 Durchblutung der Pfoten nach Ligatur

Die Durchblutung der Pfoten (Perfusion) (Abb. 12A) wurde mit dem LDI Verfahren analysiert. Die Messungen erfolgten vor Ligatur (basal), unmittelbar nach Ligatur (nLig), sowie am dritten und siebten postoperativen Tag. Anschließend wurde aus den Flux Bildern das Verhältnis Occ zu Sham berechnet.

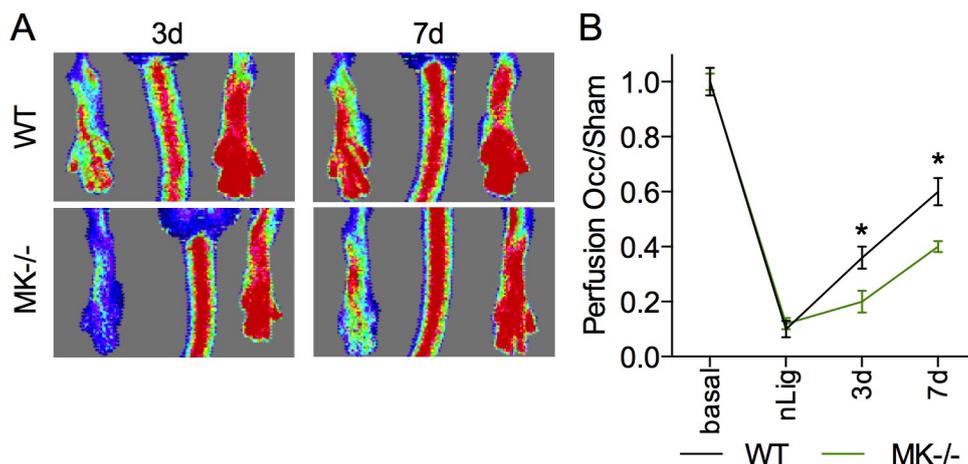


Abbildung 12: Durchblutung der Pfoten nach Ligatur

(A) Repräsentative LDI Flux Bilder von WT und MK^{-/-} Mäusen 3d und 7d nach Ligatur. (B) Verhältnis der Perfusion von Occ zu Sham vor Ligatur (basal), unmittelbar nach Ligatur (nLig), 3d und 7d nach Ligatur. $n=5$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. * $P<0,05$ (vs. MK^{-/-}), two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

Vor der Ligatur war das Verhältnis von Occ zu Sham in beiden Gruppen ungefähr 1 (WT: $1,00\pm 0,05$; MK^{-/-}: $1,00\pm 0,03$) (Abb. 12B). Durch die Ligatur der rechten A. femoralis konnte das Blut nur noch durch die präexistierenden Kollateralen fließen und die Durchblutung des rechten Hinterlaufs war zunächst stark vermindert. Dies spiegelte sich auch in den LDI Ergebnissen wieder. Unmittelbar nach der Ligatur ist das Verhältnis in beiden Gruppen auf unter 0,15 (WT: $0,10\pm 0,03$; MK^{-/-}: $0,12\pm 0,02$) abgesunken. In WT Mäusen ist das Verhältnis am dritten Tag auf $0,36\pm 0,04$ angestiegen. Bis zum siebten Tag steigerte sich

das Verhältnis bis auf $0,60 \pm 0,05$. Der Anstieg der Durchblutung war in MK^{-/-} Mäusen signifikant schlechter. Am dritten postoperativen Tag erreichte das Verhältnis nur $0,20 \pm 0,04$ und am siebten Tag nur $0,40 \pm 0,02$. Diese Ergebnisse deuteten auf eine verminderte Arteriogenese in MK^{-/-} Mäusen hin.

4.1.2 „Active Foot Movement Score“ nach Ligatur

Am dritten und siebten Tag nach Ligatur wurde der „Active Foot Movement Score“ für beide Gruppen ermittelt. Hierzu wurde die motorische Funktion des rechten Hinterlaufs analysiert.

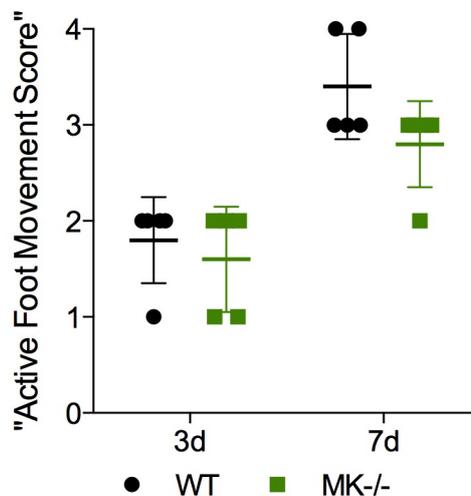


Abbildung 13: „Active Foot Movement Score“ nach Ligatur

Auswertung des „Active Foot Movement Scores“ 3d und 7d nach Ligatur in WT und MK^{-/-} Mäusen. Die motorische Funktion des rechten Hinterlaufs wurde dabei in 5 Kategorien unterteilt: 0= keine Bewegung; 1= nur das Bein wurde bewegt; 2=aktive Bewegung des Fußes; 3= vollständige Nutzung des Fußes, aber keine aktive Zehenspreizung; 4= uneingeschränkte Bewegung des Fußes. $n=5$.

Durch den „Active Foot Movement Score“ konnte die Funktionalität des rechten Hinterlaufs eingeschätzt werden.¹⁷⁵ In beiden Gruppen hat sich der Score vom dritten zum siebten postoperativen Tag verbessert (Abb. 13). Nichtsdestotrotz war die motorische Funktion des rechten Hinterlaufs in MK^{-/-} Mäusen schlechter als in WT Mäusen.

4.1.3 Makroskopische Analyse der Kollateralen

Sieben Tage nach Ligatur der A. femoralis wurden die Kollateralen im Oberschenkel freigelegt und fotografiert.

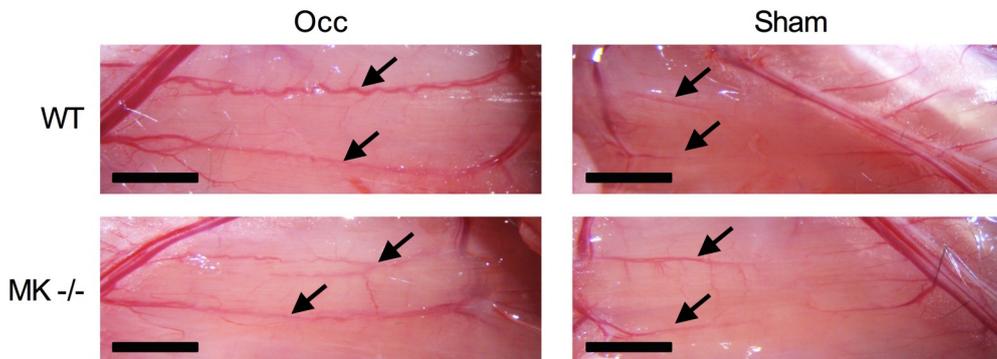


Abbildung 14: Übersichtsbilder von Kollateralen 7 Tage nach Ligatur
7 Tage nach Ligatur der A. femoralis wurde die Haut über den Oberschenkeln entfernt und die Kollateralen (Pfeile) fotografiert. Es sind jeweils Bilder der Occ und Sham-Seite von WT Mäusen und MK-/- abgebildet. Maßstab = 3mm

In beiden Gruppen wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den Kollateralen der Occ- und Sham-Seite beobachtet (Abb. 14). Die Kollateralen der Occ-Seite hatten nach sieben Tagen einen deutlich größeren Durchmesser im Vergleich zur Sham-Seite. Außerdem sind die Kollateralen nach Ligatur auch in die Länge gewachsen, wodurch die Kollateralen stärker gewunden waren (vermehrte Tortuosität). Folglich waren beide Kriterien von wachsenden Kollateralen nach Longland erfüllt.¹⁷⁹

4.1.4 Morphologische Analysen der Kollateralen

Für morphologische Analysen der Kollateralen wurden je fünf Mäuse am dritten und siebten postoperativen Tag geopfert. Um den Durchmesser und die Gefäßdicke der Kollateralen bestimmen zu können, musste zunächst die maximale Dilatation der Gefäße sichergestellt werden. Hierzu wurde den Mäusen 20ml Adenosin-Lösung über einen Aortenkatheter injiziert. Anschließend wurde die Adduktorenmuskulatur beider Seiten entnommen, in Paraffin eingebettet und mit GIEMSA gefärbt. Von jeder Maus wurden fünf Schnitte analysiert. Zunächst wurde auf der Occ-Seite die Anzahl der Kollateralen bestimmt, deren Durchmesser nach Ligatur gestiegen ist. Dafür wurden nur Kollateralen mit einem Durchmesser von mehr als 25 μ m gezählt. Es wurden zwar noch weitere Kollateralen (Durchmesser 10-15 μ m) gefunden, allerdings waren diese Kollateralen genauso groß wie die Kollateralen der Sham-Seite (Abb. 15C) und sind daher nach Ligatur nicht gewachsen.

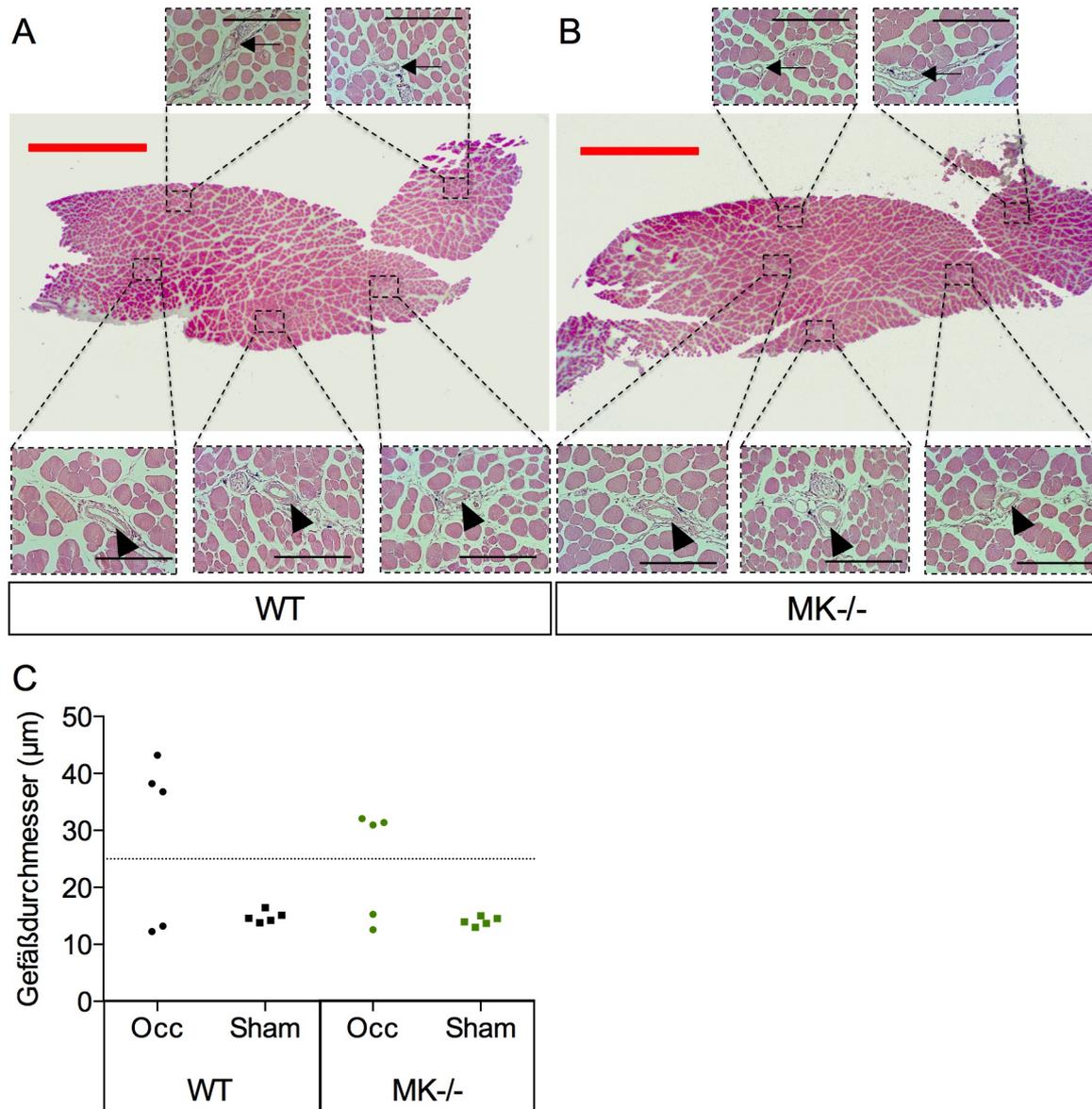


Abbildung 15: Anzahl der Kollateralen im Oberschenkel

Repräsentative Querschnittsbilder der Adduktorenmuskulatur 7 Tage nach Ligatur in WT (A) und MK-/- (B) Mäusen. Roter Maßstab = 2mm. Obere Reihe: Vergrößerte Bilder von Kollateralen <25µm (Pfeil), untere Reihe: Vergrößerte Bilder von Kollateralen >25µm (Pfeilspitze). Schwarzer Maßstab = 200µm. (C) Anzahl der Kollateralen auf der Occ und Sham-Seite. Repräsentative Daten einer WT und einer MK-/- Maus. Nur Kollateralen mit einem Durchmesser >25µm wurden als wachsende Kollateralen eingestuft.

In insgesamt fünf WT und fünf MK-/- Mäusen wurde jeweils drei wachsende Kollateralen auf der Occ-Seite gefunden (Abb. 15). Außerdem wurden auf der Occ-Seite je zwei Kollateralen mit einem kleineren Durchmesser gefunden. Auf der Sham-Seite waren jeweils 5 Kollateralen vorhanden. Anschließend wurde der Gefäßdurchmesser, sowie das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser der wachsenden Kollateralen ermittelt.

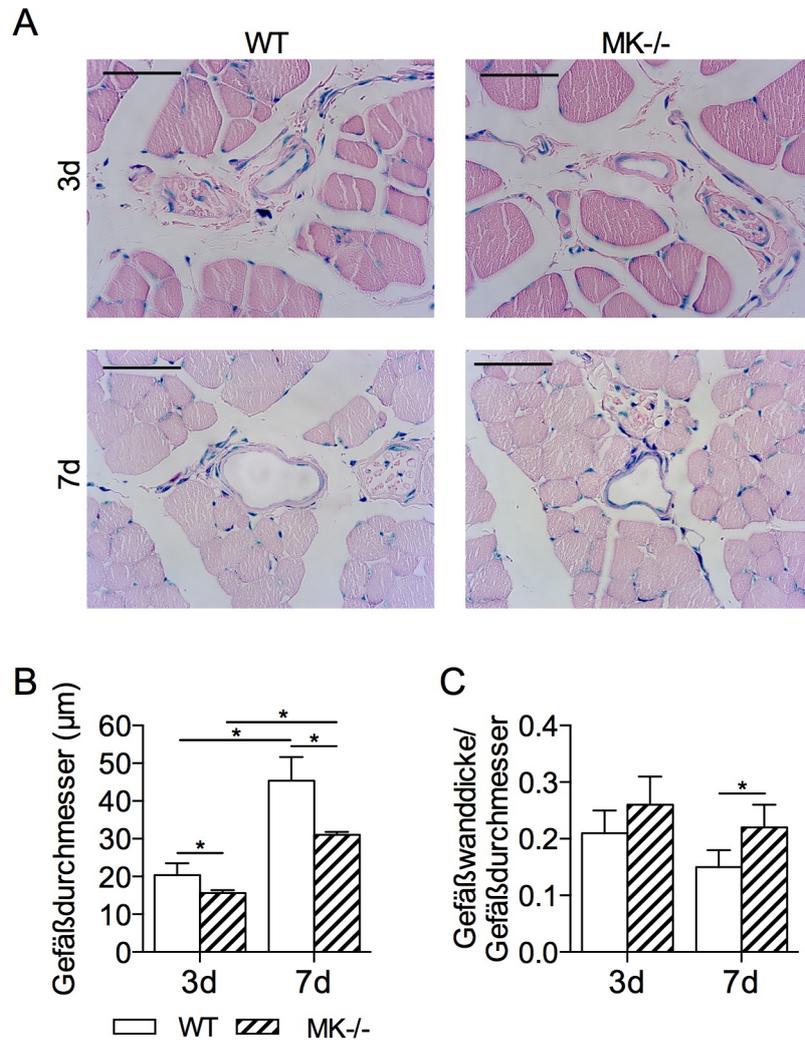


Abbildung 16: Morphologische Analysen der Kollateralen nach Ligatur

(A) Repräsentative Bilder von Kollateralen der Occ-Seite in WT und MK-/- Mäuse 3d und 7d nach Ligatur. Maßstab = 50µm. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt den Gefäßdurchmesser der Kollateralen in µm. **(C)** Das Balkendiagramm stellt das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser dar. *n*=5. Pro Maus wurden 5 Schnitte mit je 3 Kollateralen analysiert. Ergebnisse sind Mittelwerte ±SD. **P*<0,05, two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

In beiden Gruppen steigerte sich der Gefäßdurchmesser vom dritten zum siebten postoperativen Tag (Abb. 16A). In WT Mäusen hat sich der Durchmesser signifikant von 20,4±3,1µm auf 45,4±6,3µm mehr als verdoppelt (Abb. 16B). Auch wenn in MK-/- Mäusen der Durchmesser von 15,67±0,73µm auf 31,06±0,73µm angestiegen ist, so war er am siebten Tag doch signifikant geringer als in WT Mäusen. Am siebten postoperativen Tag war das Verhältnis von Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser in MK-/- Mäusen signifikant größer als in WT Mäusen (0,22±0,04 vs. 0,15±0,03 in WT Mäusen) (Abb. 16C). Anschließend wurden die Gefäßdurchmesser der Kollateralen auf der Sham-Seite analysiert und mit den Kollateralen der Occ-Seite verglichen.

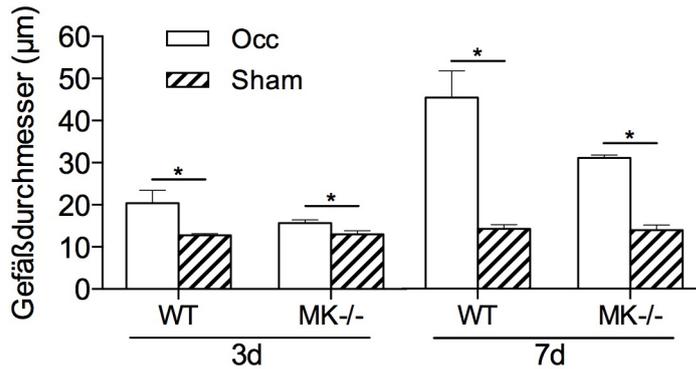


Abbildung 17: Gefäßdurchmesser Occ vs. Sham

Das Balkendiagramm zeigt den Gefäßdurchmesser von Kollateralen der Occ und Sham-Seite 3d und 7d nach Ligatur. $n=5$. Pro Maus wurden 5 Schnitte mit je 3 Kollateralen analysiert. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. $*P<0,05$, ungepaarter Student's t-Test.

Sowohl am dritten als auch am siebten postoperativen Tag waren die Gefäßdurchmesser der Occ-Seite signifikant größer als die der Sham-Seite (Abb. 17). Anders als bei den Kollateralen der Occ-Seite, ist der Gefäßdurchmesser der Sham-Seite im Verlauf nicht angestiegen. Weiterhin wurde kein Unterschied zwischen den WT (3d: $12,76\pm 0,42\mu\text{m}$ 7d: $14,9\pm 1,03\mu\text{m}$) und MK-/- Mäusen (3d: $13,02\pm 0,83\mu\text{m}$ 7d: $13,89\pm 1,23\mu\text{m}$) beobachtet.

Insgesamt belegen die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen, dass die Kollateralen in MK-/- Mäusen nach Ligatur weniger stark gewachsen sind als in WT Mäusen.

4.1.5 Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen in Kollateralen

Um die Gründe für das Wachstumsdefizit der Kollateralen in MK-/- Mäusen zu untersuchen, wurde die Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen in den Kollateralen analysiert. Hierzu wurden die Mäuse mit BrdU behandelt und am siebten postoperativen Tag Querschnitte der Adduktorenmuskulatur mit einem anti-BrdU Antikörper gefärbt.

Es wurde das Verhältnis der BrdU positiven (BrdU^+) Endothelzellen (proliferierende Endothelzellen) zu allen Endothelzellen und das Verhältnis der BrdU^+ glatten Gefäßmuskelzellen (proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen) zu allen glatten Gefäßmuskelzellen in den Kollateralen untersucht.

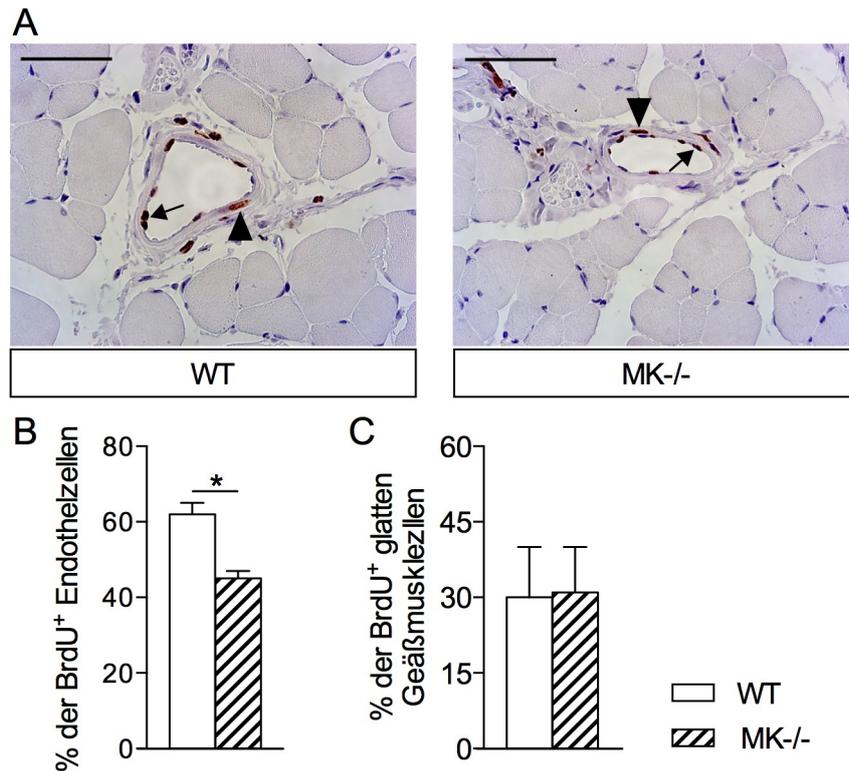


Abbildung 18: Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen

(A) Repräsentative Bilder von Kollateralen einer WT und MK-/- Maus 7 Tage nach Ligatur. Pfeil: Zellkern einer BrdU⁺ Endothelzelle, Pfeilspitze: Zellkern einer BrdU⁺ glatten Gefäßmuskelzelle. Maßstab = 50µm. Die Balkendiagramme zeigen den Anteil der BrdU⁺ Endothelzellen (B) und BrdU⁺ glatten Gefäßmuskelzellen (C) in den Kollateralen. *n*=5. Pro Maus wurden 3 Schnitte mit je 3 Kollateralen analysiert. Ergebnisse sind Mittelwerte ±SD. **P*<0,05, ungepaarter Student's t-Test.

Sowohl in WT Mäusen, als auch in MK-/- Mäusen, wurden BrdU⁺ Endothelzellen und BrdU⁺ glatte Gefäßmuskelzellen gefunden (Abb. 18A). Der Anteil der BrdU⁺ Endothelzellen war in den Kollateralen von MK-/- Mäusen signifikant geringer (45±2% vs. 62±3% in WT Mäusen) (Abb. 18B). Der Anteil der BrdU⁺ glatten Gefäßmuskelzellen war in beiden Gruppen annähernd gleich (31±9% vs. 30±10% in WT Mäusen) (Abb. 18C).

Zusammenfassend kam es in MK-/- Mäusen nach Ligatur zum verminderten Wachstum von Kollateralen, da die Proliferation von Endothelzellen in den Kollateralen eingeschränkt war. Als Folge war der Wiederanstieg der Durchblutung nach Ligatur reduziert.

4.2 Quellen von endogenem Midkine

Um die Funktion von Midkine in der Arteriogenese besser zu verstehen, wurde analysiert woher endogenes Midkine, welches relevant für die Arteriogenese ist, kommt.

4.2.1 Midkine Expression in isolierten Kollateralen

WT Mäusen wurden 12 Stunden, 24 Stunden oder 36 Stunden nach Ligatur einzelne Kollateralen entnommen. Als Kontrollgruppe wurden WT Mäusen ohne vorherige Ligatur Kollateralen entnommen. Mittels qRT-PCR wurde die Expression von Midkine gemessen (siehe 3.3.11).

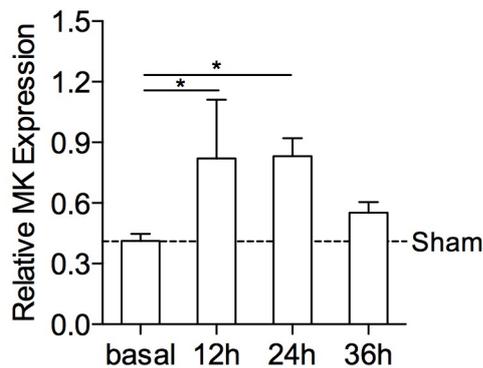


Abbildung 19: Midkine Expression in isolierten Kollateralen

WT Mäusen wurden 12h (Stunden), 24h oder 36h nach Ligatur einzelne Kollateralen aus der Adduktorenmuskulatur entnommen. Als Kontrollgruppe wurden WT Mäusen ohne vorherige Ligatur Kollateralen entnommen (basal). Mittels qRT-PCR wurde die Expression von Midkine in Kollateralen der Occ-Seite bestimmt und auf 18S rRNA normalisiert. Gestrichelte Linie = Relative Midkine Expression in Kollateralen der Sham-Seite. $n=5$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. * $P<0,05$, two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

Innerhalb von zwölf Stunden hat sich die Expression von $0,41 \pm 0,04$ (basal) auf $0,82 \pm 0,29$ (12 Stunden nach Ligatur) verdoppelt (Abb. 19). Auch 24 Stunden nach Ligatur war die Expression noch signifikant erhöht ($0,83 \pm 0,09$).

4.2.2 Midkine Spiegel im Plasma

Um den Midkine Spiegel zu bestimmen, wurde mittels kardialer Blutentnahme Vollblut aus WT Mäusen gewonnen und anschließend mit einem standardisierten ELISA Kit der Midkine Spiegel im Plasma bestimmt. Die Nachweisgrenze des ELISA Kits lag bei $0,12$ ng/ml.

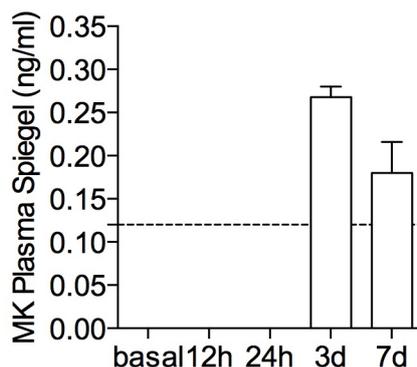


Abbildung 20: Midkine Spiegel im Plasma

Mittels kardialer Blutentnahme wurde WT Mäusen ohne vorherige Ligatur (basal), 12h, 24h, 3d oder 7d nach Ligatur Blut entnommen. Das Balkendiagramm zeigt den MK Spiegel im Plasma (ng/ml). Gestrichelte Linie = 0,12ng/ml - Nachweisgrenze des ELISA Kits. $n=5$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD.

Ohne vorherige Ligatur (basal), 12 Stunden und 24 Stunden nach Ligatur war zu wenig Midkine im Plasma vorhanden, um es mit dem ELISA Kit nachweisen zu können (Abb. 20). Am dritten postoperativen Tag ist der Spiegel auf $0,268 \pm 0,012$ ng/ml angestiegen und am siebten postoperativen Tag auf $0,18 \pm 0,036$ ng/ml abgesunken. Der Anstieg von Midkine im Plasma war folglich später als die Steigerung der MK Expression in Kollateralen.

4.2.3 Lokalisation von Midkine im Gewebe bei der Arteriogenese

Um genauer zu spezifizieren wo Midkine in Kollateralen oder dem umliegenden Gewebe vorkommt, wurde WT Mäusen die Adduktorenmuskulatur für Immunofluoreszenzfärbungen entnommen. Das Gewebe wurde Mäusen entweder ohne vorherige Ligatur, 24 Stunden oder sieben Tage nach Ligatur entnommen.

Ohne vorherige Ligatur wurde kein Midkine in Kollateralen oder dem umliegenden Gewebe gefunden (Bilder nicht gezeigt). 24 Stunden nach Ligatur wurde Midkine in perivaskulären Zellen nachgewiesen. Es wurde kein Midkine im Endothel der Kollateralen nachgewiesen. Durch die Färbung mit einem Antikörper gegen neutrophile Granulozyten (Ly-6G) wurde deutlich, dass ausgewanderte neutrophile Granulozyten im perivaskulären Raum eine Quelle von Midkine darstellen (Abb. 21).

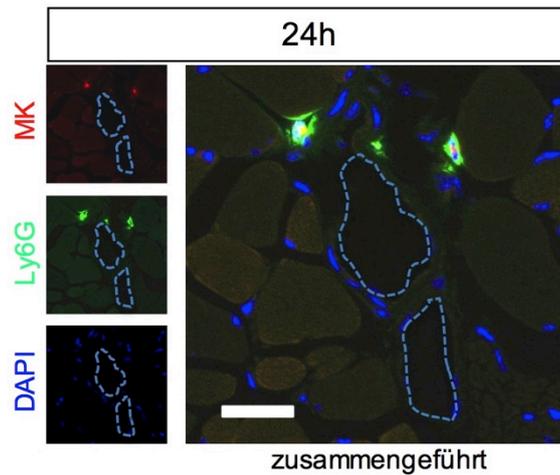


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbungen von Kollateralen

Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von Kollateralen einer WT Maus 24 Stunden nach Ligatur mit Antikörpern gegen Zellkerne (DAPI, blau, links unten), neutrophile Granulozyten (Ly-6G, grün, links mittig) und Midkine (MK, rot, links oben). Zusammengeführtes Bild identifiziert neutrophile Granulozyten als Midkine-Quelle im perivaskulären Gewebe. Gestrichelte Linie = Endothelschicht der Kollateralen. Maßstab = 15µm. Die Färbungen wurden von Frau Winterbauer (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) durchgeführt und die Verwendung der Bilder für dieses Projekt wurde von Frau Dr. Troidl (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) genehmigt.

Sieben Tage nach Ligatur konnte Midkine nicht im Endothel der Kollateralen oder perivaskulären Zellen nachgewiesen werden (Bilder nicht gezeigt). Auf der Sham-Seite konnte Midkine zu keinem Zeitpunkt gefunden werden. Die Färbungen wurden von Frau Winterbauer (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) durchgeführt und die Verwendung der Bilder für dieses Projekt wurde von Frau Dr. Troidl (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) genehmigt.

4.2.4 Einfluss von Midkine aus Zellen des Knochenmarks

Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten, dass Midkine in Kollateralen und dem perivaskulären Gewebe durch ausgewanderte Leukozyten bereitgestellt wurde. Mithilfe von Knochenmarkstransplantationen wurde untersucht, ob Zellen, die ihre Vorläufer im Knochenmark haben (Leukozyten), die einzige Quelle für Midkine während der Arteriogenese sind, oder ob auch andere Zellen, die nicht im Knochenmark entstehen, Midkine für die Arteriogenese bereitstellen. Hierzu wurde zunächst aus WT (C57BL/6-Ly5.1) und MK^{-/-} Mäusen Knochenmark gewonnen. Dieses Knochenmark wurde anschließend subletal bestrahlten WT oder MK^{-/-} Mäusen transplantiert. Als Kontrollgruppen wurde bestrahlten MK^{-/-} Mäusen MK^{-/-} Knochenmark (MK^{-/-}^{MK^{-/-}}) und bestrahlten WT Mäusen WT Knochenmark (WT^{WT}) transplantiert.

Sieben Wochen nach der Knochenmarkstransplantation wurden die Experimente gestartet. Mittels kardialer Punktion wurde Mäusen Blut entnommen und mit FACS-Analysen die Stabilität des Chimärismus bestätigt. In WT Mäusen mit MK-/- Spenderknochenmark wurden fast ausschließlich (>99%) CD45.2 positive Zellen (CD45 Isoform von MK-/- Mäusen) und in MK-/- Mäusen mit WT Spenderknochenmark fast ausschließlich (>99%) CD45.1 positive Zellen (CD45 Isoform von WT Mäusen) nachgewiesen.

Weiterhin wurde die Durchblutung der Pfoten, die Morphologie der Kollateralen und der Midkine Spiegel im Plasma nach Ligatur gemessen. In allen Gruppen war das Verhältnis der Durchblutung vom Occ zum Sham Hinterlauf vor der Ligatur circa 1 und nach der Ligatur unter 0,15 (Abb. 22A). Am dritten Tag nach Ligatur ist das Verhältnis in WT^{WT} Mäusen auf $0,38 \pm 0,05$ angestiegen, während es in MK-/-^{MK-/-} Mäusen nur auf $0,17 \pm 0,03$ angestiegen ist. Auch am siebten postoperativen Tag war das Verhältnis in MK-/-^{MK-/-} Mäusen signifikant schlechter ($0,38 \pm 0,03$ vs. $0,62 \pm 0,03$ in WT^{WT} Mäusen). Sowohl Midkine aus Leukozyten (MK-/-^{WT}), als auch aus anderen Zellen (WT^{MK-/-}) hat die Perfusion nach Ligatur wiederhergestellt. Am siebten postoperativen Tag war die Perfusion in beiden Gruppen signifikant besser als in MK-/-^{MK-/-} Mäusen (MK-/-^{WT} $0,59 \pm 0,02$; WT^{MK-/-} $0,57 \pm 0,04$). Folglich genügte sowohl Midkine aus Leukozyten, als auch aus anderen Zellen um die Durchblutung nach Ligatur wiederherzustellen. Es zeigte sich auch, dass die Knochenmarkstransplantation an sich keinen Einfluss auf die Perfusion hatte, da keine Unterschiede zwischen transplantierten Mäusen und elf Wochen alten nicht transplantierten Kontrollmäusen gefunden wurden (Abb. 22B).

Wie zuvor war der Gefäßdurchmesser der Kollateralen in MK-/-^{MK-/-} Mäusen signifikant kleiner als in WT^{WT} Mäusen ($29,86 \pm 6,78 \mu\text{m}$ vs. $43,8 \pm 4,59 \mu\text{m}$ in WT^{WT}) (Abb. 22C). Interessanterweise genügte Midkine aus Leukozyten (MK-/-^{WT} $41,47 \pm 1,96 \mu\text{m}$) um das Midkine Defizit zu kompensieren. Allerdings war der Gefäßdurchmesser in WT^{MK-/-} Mäuse (WT^{MK-/-} $35,47 \pm 2,01 \mu\text{m}$) im Vergleich zu MK-/-^{MK-/-} Mäusen nicht signifikant erhöht. Folglich ist Midkine aus Leukozyten wichtig für das Wachstum der Kollateralen. Midkine aus anderen Zellen beeinflusst die Arteriogenese hingegen nicht und die verbesserte Perfusion nach Ligatur im Vergleich zu MK-/-^{MK-/-} Mäusen kann dadurch auf vermehrte Vasodilatation zurückgeführt werden.

Sieben Tage nach Ligatur wurde kein Unterschied im Midkine Plasma Spiegel zwischen WT^{WT} ($0,2 \pm 0,04 \text{ ng/ml}$) und WT^{MK-/-} Mäusen ($0,19 \pm 0,06 \text{ ng/ml}$) beobachtet (Abb. 22D). In MK-/-^{WT} Mäusen lag der Midkine Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA Kits.

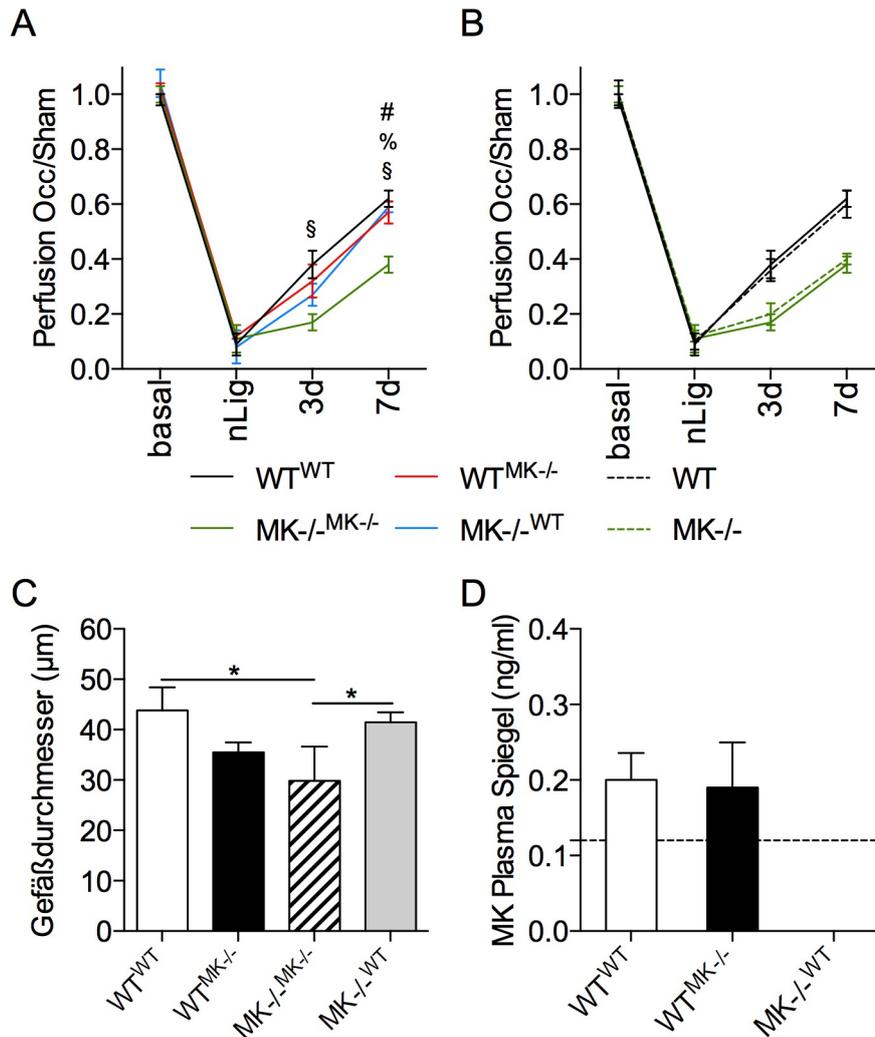


Abbildung 22: Einfluss der Knochenmarkstransplantation auf die Arteriogenese

Bestrahlten WT Mäusen wurde MK-/- Spender-Knochenmark (WT^{MK-/-}) oder WT Spender-Knochenmark (WT^{WT}) transplantiert. Bestrahlten MK-/- Mäusen wurde WT Spender-Knochenmark (MK-/-^{WT}) oder MK-/- Spender-Knochenmark (MK-/-^{MK-/-}) transplantiert. **(A)** Verhältnis der Perfusion vom Occ zum Sham-operierten Bein vor Ligatur (basal), unmittelbar nach Ligatur (nLig), 3d und 7d nach Ligatur. §*P*<0,05 (MK-/-^{MK-/-} vs. WT^{WT}), #*P*<0,05 (MK-/-^{MK-/-} vs. MK-/-^{WT}), %*P*<0,05 (MK-/-^{MK-/-} vs. WT^{MK-/-}), two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test **(B)** Verhältnis der Perfusion vom Occ zum Sham-operierten Bein in transplantierten Mäusen und 11 Wochen alten nicht transplantierten MK-/- und WT Mäusen vor Ligatur (basal), unmittelbar nach Ligatur (nLig), 3d und 7d nach Ligatur. **(C)** Das Balkendiagramm zeigt den Gefäßdurchmesser der Kollateralen 7d nach Ligatur. Pro Maus wurden 5 Schnitte mit je 3 Kollateralen analysiert. **(D)** Das Balkendiagramm zeigt den Midkine Spiegel im Plasma (ng/ml) 7d nach Ligatur. Gestrichelte Linie = Nachweisgrenze (1,2 ng/ml) des ELISA Kits. *n*=4. Ergebnisse sind Mittelwerte ±SD. **P*<0,05, one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

Zusammenfassend steigerte Midkine, sowohl aus Leukozyten, als auch aus anderen Zellen, die Perfusion nach Ligatur im Vergleich zu MK-/-^{MK-/-} Mäusen. Dieser Effekt ist jedoch auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen. Midkine aus Leukozyten war

essentiell für das Wachstum der Kollateralen während der Arteriogenese. Dahingegen steigerte Midkine aus anderen Zellen die Perfusion nach Ligatur durch vermehrte Vasodilatation der Kollateralen. Der Anstieg des Midkine Spiegels im Plasma nach Ligatur wurde nicht von Leukozyten, sondern anderen Zellen bestimmt.

4.3 Einfluss von exogenem Midkine auf die Arteriogenese

Inwiefern exogenes Midkine als mögliches Therapeutikum die Durchblutung nach Verschluss eines arteriellen Gefäßes verbessern oder gar wiederherstellen kann, wurde durch die Behandlung mit rekombinantem murinen Midkine (rmMK) überprüft. Dazu wurden WT und MK^{-/-} Mäusen ab dem dritten präoperativen Tag täglich mit rmMK oder 0,9%iger Kochsalzlösung (Saline) behandelt. Die Behandlung wurde bis zum Ende der Experimente fortgeführt.

Am dritten ($0,36 \pm 0,07$ vs. $0,20 \pm 0,04$ in MK^{-/-} +Saline) und siebten postoperativen Tag ($0,62 \pm 0,06$ vs. $0,4 \pm 0,02$ in MK^{-/-} +Saline) kam es durch die Behandlung mit rmMK zu einem signifikanten Anstieg der Durchblutung in MK^{-/-} Mäusen (Abb. 23A). Es wurde kein Unterschied mehr zu WT Mäusen, welche mit Saline behandelten wurden, beobachtet (3d: $0,36 \pm 0,04$; 7d: $0,60 \pm 0,05$). Interessanterweise führte die Behandlung mit rmMK zu einer signifikant gesteigerten Durchblutung in WT Mäusen am siebten postoperativen Tag ($0,78 \pm 0,04$ vs. $0,60 \pm 0,05$ in WT +Saline).

Histologische Analysen zeigten, dass der Gefäßdurchmesser in WT Mäusen durch die Behandlung mit rmMK nur geringfügig gesteigert wurde ($48,16 \pm 1,88 \mu\text{m}$ vs. $45,4 \pm 6,29 \mu\text{m}$ in WT+Saline) (Abb. 23B). Dahingegen kam es in MK^{-/-} Mäusen durch die Behandlung zu einem signifikanten Anstieg von $31,06 \pm 0,073 \mu\text{m}$ (MK^{-/-} +Saline) auf $42,33 \pm 2,81 \mu\text{m}$. Auch das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser wurde durch die Behandlung normalisiert ($0,17 \pm 0,02$ vs. $0,22 \pm 0,04$ in MK^{-/-} +Saline) (Abb. 23C). In WT Mäusen hatte die Behandlung dagegen keinen Einfluss auf das Verhältnis ($0,14 \pm 0,02$ vs. $0,15 \pm 0,03$ in WT +Saline).

Zuletzt wurde mithilfe von BrdU Färbungen die Proliferationsrate von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen nach Behandlung mit rmMK untersucht. Die Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Proliferation von Endothelzellen ($24 \pm 5\%$ vs. $22 \pm 3\%$ in WT +Saline) und glatten Gefäßmuskelzellen ($46 \pm 5\%$ vs. $48 \pm 12\%$ in WT +Saline) in WT Mäusen (Abb. 23DE). In MK^{-/-} Mäusen wurde jedoch die Proliferation von Endothelzellen durch die Behandlung mit rmMK normalisiert ($20 \pm 1\%$ vs. $13 \pm 2\%$ in MK^{-/-} +Saline). Die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst ($44 \pm 10\%$ vs. $40 \pm 15\%$ in MK^{-/-} +Saline).

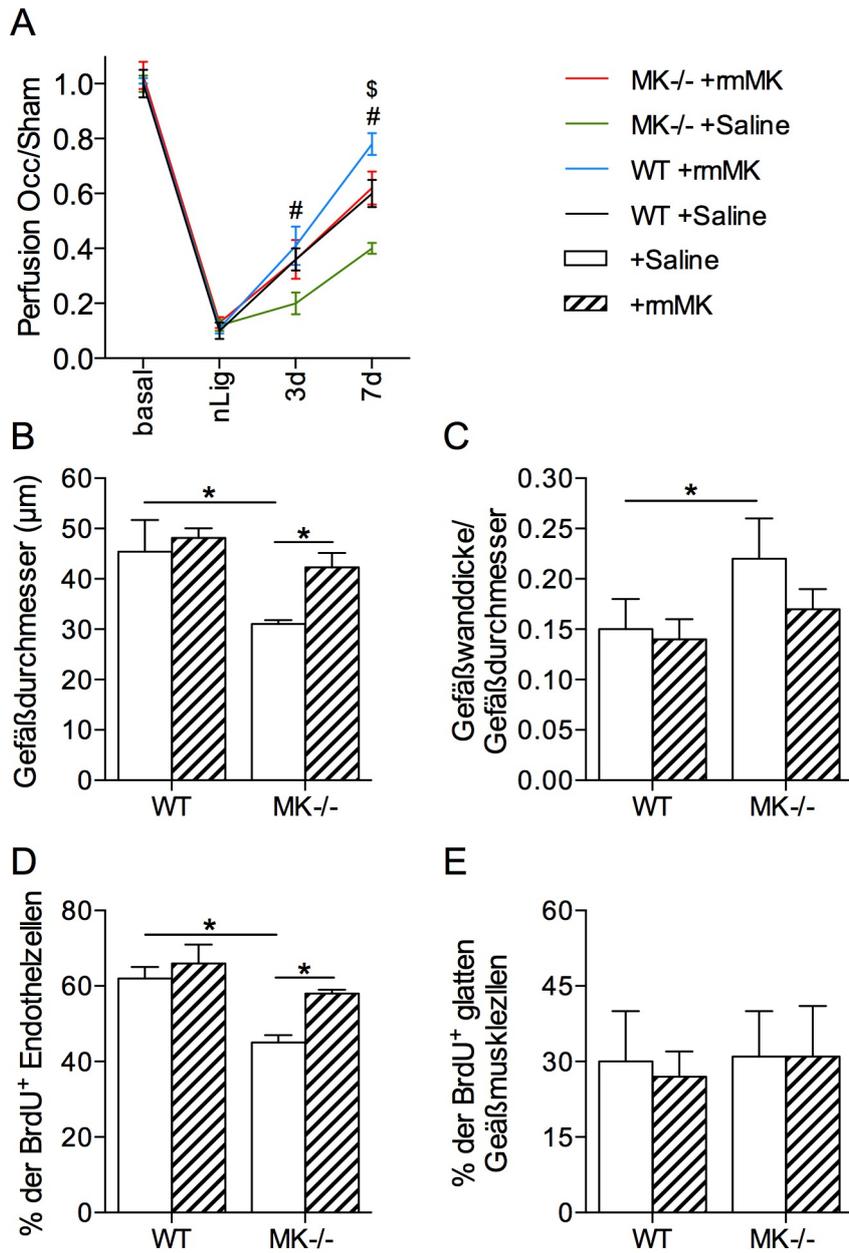


Abbildung 23: Einfluss von exogenem Midkine auf die Arteriogenese

MK^{-/-} und WT Mäuse wurden ab dem dritten präoperativen Tag mit rmMK (zweimal täglich, 50µl rmMK 0,1mg/ml, sc.) oder 0,9%iger Kochsalzlösung (Saline) behandelt. **(A)** Verhältnis der Perfusion vom Occ zum Sham-operierten Bein vor Ligatur (basal), unmittelbar nach Ligatur (nLig), 3d und 7d nach Ligatur. #*P*<0,05 (vs. MK^{-/-} +Saline), \$*P*<0,05 (vs. WT +Saline), two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test. Die Balkendiagramme zeigen den Gefäßdurchmesser **(B)** und das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser **(C)** der Kollateralen 7d nach Ligatur. Pro Maus wurden 5 Schnitte mit je 3 Kollateralen analysiert. Die Balkendiagramme zeigen den Anteil der BrdU⁺ Endothelzellen **(D)** und den Anteil der BrdU⁺ glatten Gefäßmuskelzellen **(E)** 7d nach Ligatur. Pro Maus wurden 3 Schnitte mit je 3 Kollateralen analysiert. *n*=5. Ergebnisse sind Mittelwerte ±SD. **P*<0,05, one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

Zusammenfassend konnte durch die Behandlung mit rmMK die Durchblutung, der Gefäßdurchmesser und die Proliferation von Endothelzellen in MK^{-/-} Mäusen verbessert werden. In WT Mäusen wurde ausschließlich am siebten postoperativen Tag eine Verbesserung der Durchblutung beobachtet, die aber ausschließlich auf eine verstärkte Vasodilatation zurückzuführen ist. Folglich ist Midkine nicht nur relevant für das Wachstum von Kollateralen, sondern beeinflusst auch die Vasodilatation der Kollateralen.

4.4 Einfluss von Midkine auf die NO-Synthasen

Da die vorherigen Experimente zeigten, dass Midkine die Vasodilatation beeinflusst, wurde im Folgenden untersucht, ob Midkine einen Einfluss auf die NO-Synthasen hat.

4.4.1 Expression der NO-Synthasen in isolierten Kollateralen

Zunächst wurde die Expression der eNOS, iNOS und nNOS zwölf Stunden nach Ligatur in isolierten Kollateralen aus WT und MK^{-/-} Mäusen untersucht.

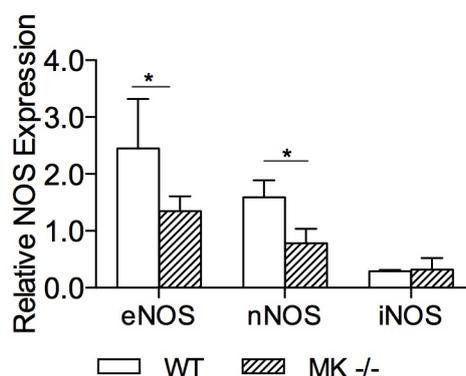


Abbildung 24: Expression von NOS in Kollateralen

12h nach Ligatur wurden WT und MK^{-/-} Mäusen Kollateralen der Occ-Seite entnommen. Das Balkendiagramm zeigt die Expression der eNOS, iNOS und nNOS normalisiert auf 18S rRNA. $n=5$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. * $P<0,05$, ungepaarter Student's t-Test.

Die Expression der eNOS war in Kollateralen von MK^{-/-} Mäusen signifikant geringer als in WT Mäusen ($1,35\pm 0,26$ vs. $2,45\pm 0,87$ in WT) (Abb. 24). Auch die Expression der nNOS war in MK^{-/-} Mäusen signifikant geringer ($0,78\pm 0,26$ vs. $1,59\pm 0,30$ in WT). Die iNOS war in WT und MK^{-/-} Mäusen gleich stark exprimiert ($0,32\pm 0,2$ vs. $0,29\pm 0,02$ in WT). Es bestand daher die Möglichkeit, dass Midkine die Arteriogenese über die Expression der NO-Synthasen beeinflusst.

4.4.2 Einfluss von exogenem NO auf die Arteriogenese

MK^{-/-} und WT Mäuse wurden mit dem NO-Donor DETA NONOate behandelt, um zu überprüfen, ob exogenes NO die Arteriogenese in MK^{-/-} Mäusen wiederherstellen kann und ob exogenes NO die Arteriogenese in WT Mäusen eventuell sogar verbessert. Ab dem dritten präoperativen Tag wurden WT und MK^{-/-} Mäuse täglich mit DETA NONOate oder 0,9%iger Kochsalzlösung behandelt. Die Behandlung wurde bis zum Ende der Experimente fortgeführt.

Durch die Behandlung mit DETA NONOate hat sich die Durchblutung nach Ligatur in WT Mäusen nicht verändert (Tag 7: $0,61 \pm 0,05$ vs. $0,6 \pm 0,05$ in WT+Saline) (Abb. 25A). In MK^{-/-} Mäusen kam es hingegen bereits nach drei Tagen zu einer signifikanten Verbesserung der Durchblutung ($0,39 \pm 0,08$ vs. $0,2 \pm 0,04$ in MK^{-/-} +Saline). Auch nach sieben Tagen war die Durchblutung signifikant besser ($0,62 \pm 0,05$ vs. $0,4 \pm 0,02$ in MK^{-/-} +Saline). Es konnte kein Unterschied mehr zwischen WT Mäusen und DETA NONOate behandelten MK^{-/-} Mäusen beobachtet werden.

Am siebten Tag nach Ligatur wurden die Mäuse geopfert, um den Einfluss von DETA NONOate auf das Wachstum der Kollateralen zu untersuchen. Die Behandlung mit DETA NONOate hatte keinen Einfluss auf den Gefäßdurchmesser der Kollateralen in WT Mäusen ($47,64 \pm 4,71 \mu\text{m}$ vs. $45,4 \pm 6,29 \mu\text{m}$ in WT +Saline) (Abb. 25B). Im Gegensatz dazu wurde in behandelten MK^{-/-} Mäusen ein signifikanter Anstieg des Gefäßdurchmessers beobachtet ($38,25 \pm 1,74 \mu\text{m}$ vs. $31,06 \pm 0,73 \mu\text{m}$ in MK^{-/-} +Saline). Zwischen WT Mäusen und behandelten MK^{-/-} Mäusen war kein signifikanter Unterschied mehr zu sehen. Weiterhin reduzierte die Behandlung das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser in MK^{-/-} Mäusen ($0,17 \pm 0,03$ vs. $0,22 \pm 0,04$ in MK^{-/-} +Saline) (Abb. 25C). In WT Mäusen hatte die Behandlung keine Auswirkung auf dieses Verhältnis ($0,15 \pm 0,02$ vs. $0,15 \pm 0,03$ in WT +Saline).

Mithilfe von BrdU Färbungen wurde der Einfluss von DETA NONOate auf die Proliferation der Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. In WT Mäusen wurde die Proliferation von Endothelzellen durch die Behandlung nicht beeinflusst ($21 \pm 4\%$ vs. $22 \pm 3\%$ in WT +Saline) (Abb. 25D). Im Gegensatz dazu steigerte sich die Proliferation von Endothelzellen in MK^{-/-} Mäusen durch die DETA NONOate Behandlung von $13 \pm 2\%$ auf $18 \pm 2\%$. Folglich normalisierte die Behandlung mit DETA NONOate das Proliferationsdefizit in MK^{-/-} Mäusen. Die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen wurde weder in WT Mäusen ($50 \pm 6\%$ vs. $48 \pm 12\%$ in WT +Saline) noch in MK^{-/-} Mäusen ($42 \pm 9\%$ vs. $40 \pm 15\%$ in MK^{-/-} +Saline) durch die Behandlung mit DETA NONOate beeinflusst (Abb. 25E).

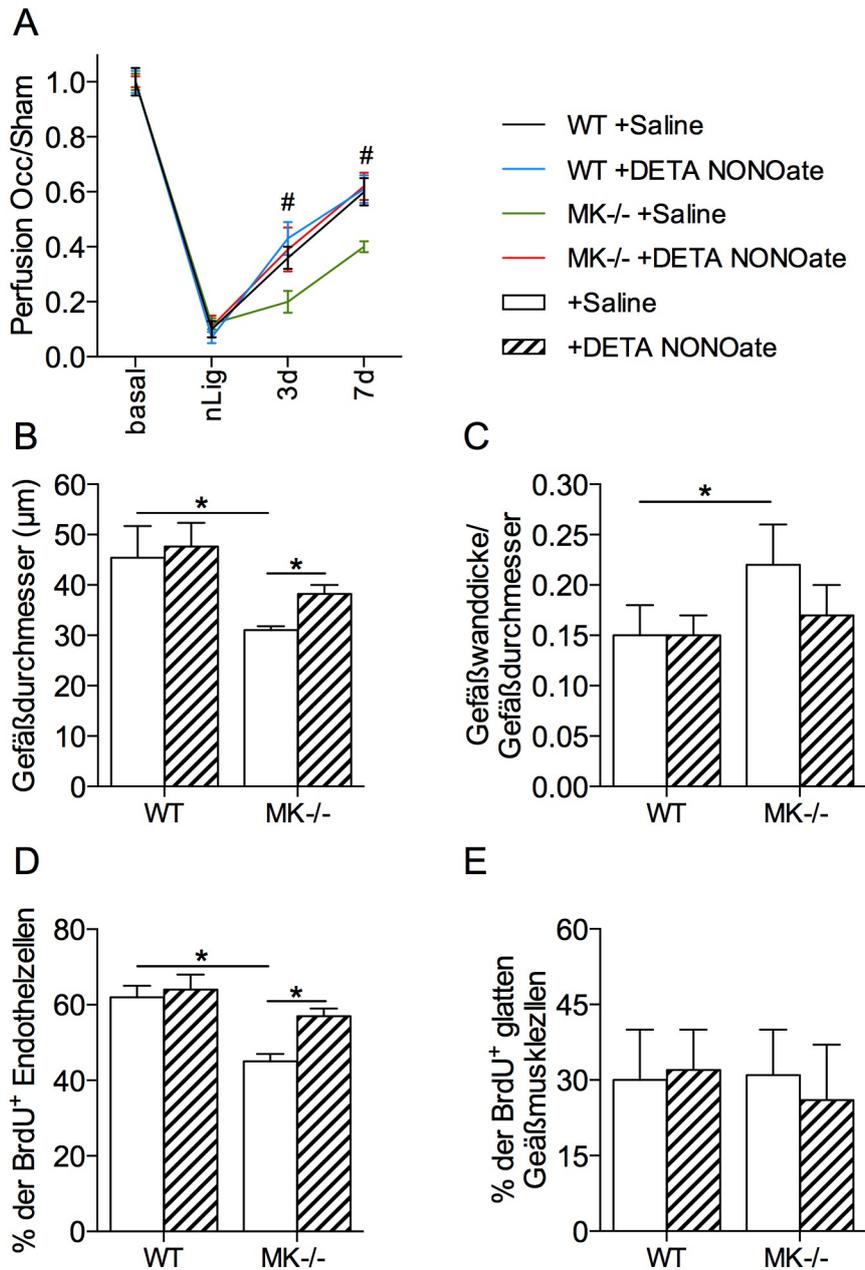


Abbildung 25: Einfluss von exogenem NO auf die Arteriogenese

MK^{-/-} und WT Mäuse wurden ab dem dritten präoperativen Tag mit DETA NONOate (einmal täglich, 100µl DETA NONOate 0,12mg/ml, ip.) oder 0,9%iger Kochsalzlösung (Saline) behandelt. **(A)** Verhältnis der Perfusion vom Occ zum Sham-operierten Bein vor Ligatur (basal), unmittelbar nach Ligatur (nLig), 3d und 7d nach Ligatur. #*P*<0,05 (vs. MK^{-/-} +Saline), two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test. Die Balkendiagramme zeigen den Gefäßdurchmesser **(B)** und das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser **(C)** der Kollateralen 7d nach Ligatur. Pro Maus wurden 5 Schnitte mit je 3 Kollateralen analysiert. Die Balkendiagramme zeigen den Anteil der BrdU⁺ Endothelzellen **(D)** und den Anteil der BrdU⁺ glatten Gefäßmuskelzellen **(E)** 7d nach Ligatur. Pro Maus wurden 3 Schnitte mit je 3 Kollateralen analysiert. *n*=5. Ergebnisse sind Mittelwerte ±SD. **P*<0,05, one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

Zusammenfassend wurde in Kollateralen von MK^{-/-} Mäusen eine verminderte Expression der eNOS und der nNOS nachgewiesen. Durch die Behandlung mit dem NO-Donor DETA NONOate konnten die Durchblutung, der Gefäßdurchmesser der Kollateralen und die Proliferation von Endothelzellen in MK^{-/-} Mäusen normalisiert werden.

4.5 Einfluss von Midkine auf die Proliferation von primären vaskulären Zellen *in vitro*

Um den genauen Wirkmechanismus von Midkine auf das Wachstum von Kollateralen besser verstehen zu können, wurden für *in vitro* Versuche Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen aus WT und MK^{-/-} Mäusen gewonnen (siehe 3.3.12).

4.5.1 Expression der NO-Synthasen in isolierten Endothelzellen

Aus isolierten Endothelzellen von je fünf WT und MK^{-/-} Mäusen wurde cDNA hergestellt und mittels qRT-PCR die Expression der NO-Synthasen analysiert.

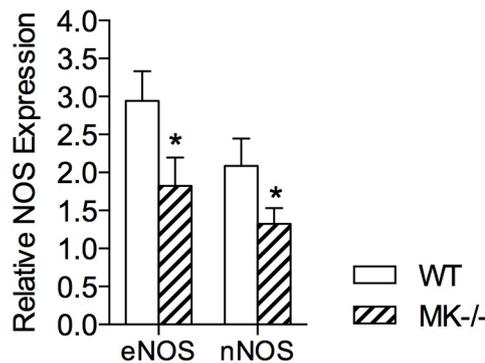


Abbildung 26: NOS Expression in isolierten Endothelzellen

MK^{-/-} und WT Endothelzellen wurden aus isolierten Aorten gewonnen, kultiviert und mittels qRT-PCR die Expression der NOS gemessen. Das Balkendiagramm zeigt die Expression der eNOS und nNOS in WT und MK^{-/-} Endothelzellen normalisiert auf 18S rRNA. $n=5$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. * $P<0,05$ (vs. WT in der jeweiligen Gruppe), ungepaarter Student's t-Test.

Ähnlich wie in isolierten Kollateralen führte der Midkine Verlust in Endothelzellen zu einer verminderten Expression der NO-Synthasen (Abb. 26). Die Expression der eNOS war in MK^{-/-} Endothelzellen signifikant geringer als in WT Endothelzellen ($1,82\pm 0,37$ vs. $2,94\pm 0,39$ in WT Endothelzellen). Auch die Expression der nNOS war in MK^{-/-} Endothelzellen signifikant geringer ($1,33\pm 0,21$ vs. $2,09\pm 0,36$ in WT Endothelzellen).

4.5.2 Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro*

Zunächst wurden die Zellen auf einer 96-Well Platte kultiviert (siehe 3.3.12.3). Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden mit 2%FCS in DMEM alleine (basal), oder

in verschiedenen Kombinationen mit DETA NONOate (50µmol/l), rmMK (100ng/ml) und dem NOS-Inhibitor L-NIO (0,1µmol/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 5%FCS in DMEM stimuliert. Die dargestellten Werte wurden auf WT basal normalisiert.

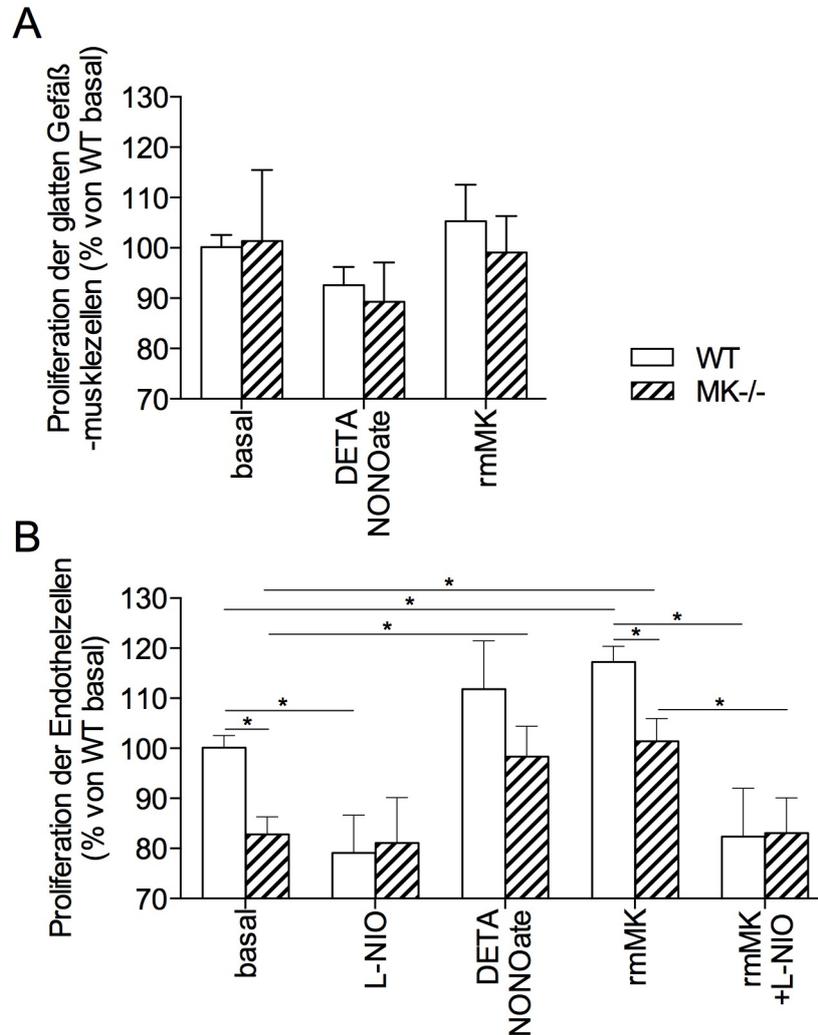


Abbildung 27: Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen *in vitro*

Primäre glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen wurden für 48 Stunden mit 2%FCS in DMEM alleine (basal), oder in verschiedenen Kombinationen mit DETA NONOate (50µmol/l), rmMK (100ng/ml) und dem NOS-Inhibitor L-NIO (0,1µmol/ml) stimuliert. Durch die BrdU Inkorporation in die DNA wurde der Anteil der proliferierenden Zellen bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Proliferationsrate von glatten Gefäßmuskelzellen (**A**) und Endothelzellen (**B**). Die dargestellten Werte sind auf WT basal normalisiert. $n=5$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. $*P<0,05$, two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

Ähnlich wie in den *in vivo* Experimenten, wurde kein Unterschied in der Proliferationsrate von WT und MK-/- glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet ($1,01\pm 0,14$ vs. $1,06\pm 0,16$ in WT basal) (Abb. 27A). Die Positivkontrollen (5% FCS in DMEM) waren jeweils mehr als vierfach so hoch wie die entsprechenden Basalwerte (2% FCS in DMEM) (MK-/-:

4,4±0,05; WT: 4,45±0,09). Die Stimulation mit 50µmol/l DETA NONOate reduzierte die Proliferationsrate in MK-/- und WT glatten Gefäßmuskelzellen, allerdings nicht signifikant, während die Stimulation mit 100ng/ml rmMK keinen Einfluss auf die Proliferationsrate hatte.

Die Proliferationsrate von MK-/- Endothelzellen war signifikant geringer im Vergleich zu WT Endothelzellen (0,83±0,04 vs. 1,0±0,02 in WT basal) (Abb. 27B). Die Positivkontrollen (5% FCS in DMEM) waren jeweils mehr als dreifach so hoch wie die entsprechenden Basalwerte (MK-/-: 3,09±0,08; WT: 3,12±0,06). Nachdem die Zellen mit L-NIO kultiviert wurden, ist die Proliferationsrate der WT Endothelzellen signifikant abgesunken (0,79±0,08 vs. 1,0±0,02 in WT basal), nicht jedoch die Proliferationsrate der MK-/- Endothelzellen. Die Stimulation mit 50µmol/l DETA NONOATE steigerte die Proliferationsrate in MK-/- Endothelzellen signifikant auf 0,98±0,06 und in WT Endothelzellen auf 1,12±0,1. Auch 100ng/ml rmMK führte zu einem Anstieg der Proliferationsrate in beiden Gruppen. Allerdings war die Proliferationsrate von behandelten MK-/- Endothelzellen immer noch signifikant geringer als von behandelten WT Endothelzellen (1,01±0,05 vs. 1,17±0,03 in WT +100ng/ml rmMK). Um zu überprüfen, ob rmMK die Proliferationsrate von Endothelzellen über die Expression von NO-Synthasen beeinflusst, wurden Endothelzellen mit rmMK und dem NOS-Inhibitor L-NIO kultiviert. Tatsächlich verringerte sich durch die Zugabe von L-NIO die Proliferationsrate in MK-/- Zellen signifikant auf 0,83±0,06. Auch in WT Endothelzellen ist die Proliferationsrate durch die Kultivierung mit rmMK und L-NIO signifikant gesunken (0,82±0,1).

Insgesamt haben die *in vitro* Versuche die *in vivo* Ergebnisse bestätigt. eNOS und nNOS waren in MK-/- Endothelzellen weniger stark exprimiert als in WT Endothelzellen und die Proliferationsrate von MK-/- Endothelzellen war vermindert. Die Stimulation mit DETA NONOate oder rmMK steigerte die Proliferationsrate von MK-/- und WT Endothelzellen, jedoch war die Proliferationsrate von MK-/- Endothelzellen immer noch reduziert im Vergleich zu WT Endothelzellen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass rmMK die Proliferationsrate der Endothelzellen über die NO-Synthasen beeinflusst. Midkine, sowie die Stimulation mit DETA NONOate oder rmMK, hatten keinen Einfluss auf die Proliferationsrate von glatten Gefäßmuskelzellen.

4.6 Zusammenspiel von Midkine und VEGF-A in der Arteriogenese

VEGF spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum von Gefäßen und besonders bei der Proliferation von Endothelzellen. Außerdem steigert NO, produziert von NO-Synthasen, die VEGF-Synthese⁹⁸ und umgekehrt induziert VEGF-A die Expression von NO-Synthasen⁹⁷. Deswegen wurde untersucht, ob Midkine die Arteriogenese auch über VEGF und den VEGF Signalweg beeinflusst.

4.6.1 VEGF-A Spiegel nach Ligatur

MK^{-/-} und WT Mäuse wurden für vier Tage mit DETA NONOATE, rmMK oder 0,9%iger Kochsalzlösung (Saline) behandelt. 24 Stunden nach Ligatur wurde Blut entnommen und mit einem ELISA Kit der VEGF-A Spiegel im Plasma bestimmt (siehe 3.3.7). Mäuse ohne vorherige Ligatur (basal) dienten als Kontrollgruppe.

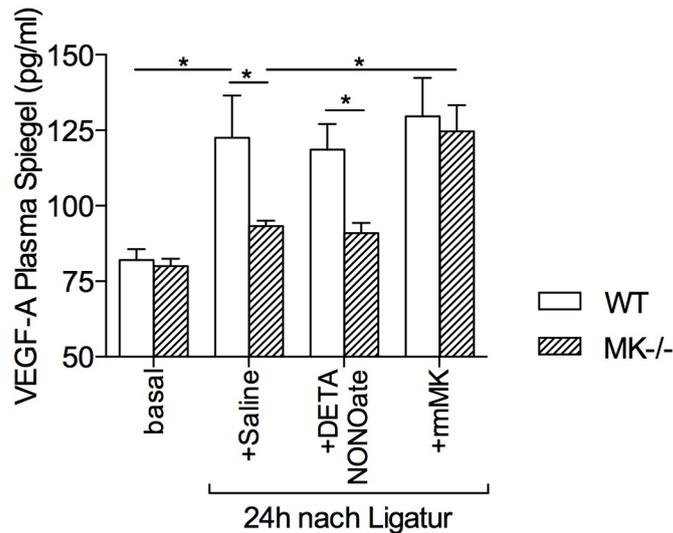


Abbildung 28: VEGF-A Spiegel im Plasma

WT und MK^{-/-} Mäuse wurden mit DETA NONOATE, rmMK oder 0,9%iger Kochsalzlösung (Saline) behandelt. 24h nach Ligatur wurde den Mäusen Blut entnommen und mit einem ELISA Kit der VEGF-A Spiegel im Plasma bestimmt. Als Kontrollgruppe wurde Mäusen ohne vorherige Ligatur (basal) Blut entnommen. Das Balkendiagramm zeigt den VEGF-A Spiegel im Plasma (pg/ml). $n=5$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. * $P<0,05$, one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

Der Verlust von Midkine hatte keinen Einfluss auf die VEGF-A Spiegel in nicht operierten Mäusen ($80,02 \pm 2,49$ pg/ml vs. $82,07 \pm 3,61$ pg/ml in WT) (Abb. 28). 24 Stunden nach Ligatur wurde ein signifikanter Unterschied zwischen MK^{-/-} und WT Mäusen beobachtet. Innerhalb von 24 Stunden ist der VEGF-A Spiegel in WT Mäusen signifikant auf $122,07 \pm 14,03$ pg/ml angestiegen. Im Vergleich dazu ist der Spiegel in MK^{-/-} Mäusen nur auf $93,24 \pm 1,8$ pg/ml angestiegen. Die Behandlung mit DETA NONOATE hatte weder in WT noch in MK^{-/-} Mäusen einen signifikanten Einfluss auf den VEGF-A Spiegel ($90,89 \pm 3,49$ pg/ml vs. $118,55 \pm 8,56$ pg/ml in WT +DETA NONOATE). Im Gegensatz dazu normalisierte die Behandlung mit rmMK den VEGF-A Spiegel in MK^{-/-} Mäusen und hatte gleichzeitig keinen Effekt in WT Mäusen ($124,65 \pm 8,65$ pg/ml vs. $129,66 \pm 12,68$ pg/ml in WT +rmMK).

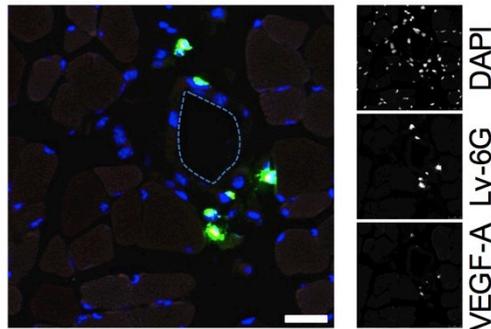


Abbildung 29: VEGF Immunfluoreszenzfärbung

Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung einer WT Maus 24 Stunden nach Ligatur mit Antikörpern gegen VEGF-A (rechts unten), Ly-6G (rechts mitte) und DAPI (rechts oben). Zusammengeführtes Bild belegt, dass neutrophile Granulozyten VEGF enthalten. Maßstab = 15µm. Die Färbungen wurden von Frau Winterbauer (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) durchgeführt und die Verwendung der Bilder für dieses Projekt wurde von Frau Dr. Troidl (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) genehmigt.

Immunfluoreszenzfärbungen 24 Stunden nach Ligatur zeigten, dass neutrophile Granulozyten eine Quelle von VEGF sind (Abb. 29). Die Färbungen wurden von Frau Winterbauer (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) durchgeführt und die Verwendung der Bilder für dieses Projekt wurde von Frau Dr. Troidl (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) genehmigt.

4.6.2 Einfluss von exogenem VEGF-A auf die Arteriogenese

Zum Abschluss wurde untersucht, ob durch die Behandlung mit rekombinantem murinen VEGF-A164 (rmMK) die Durchblutung und das Wachstum der Kollateralen in MK^{-/-}-Mäusen wiederhergestellt werden kann. Ab dem dritten präoperativen Tag wurden WT und MK^{-/-} Mäuse täglich mit rmVEGF oder 0,9%iger Kochsalzlösung (Saline) behandelt. Im Anschluss wurde die Durchblutung der Pfoten und der Gefäßdurchmesser der Kollateralen untersucht.

In WT Mäusen hatte die Behandlung mit rmVEGF weder am dritten ($0,4 \pm 0,03$ vs. $0,36 \pm 0,04$ in WT+Saline), noch am siebten Tag nach Ligatur ($0,65 \pm 0,05$ vs. $0,6 \pm 0,05$ in WT+Saline) einen Einfluss auf die Perfusion (Abb. 30A). Dahingegen kam es in MK^{-/-}-Mäusen bereits am dritten Tag nach Ligatur zu einem Anstieg der Perfusion ($0,27 \pm 0,07$ vs. $0,2 \pm 0,04$ in MK^{-/-}+Saline). Bis zum siebten postoperativen Tag hat sich die Durchblutung soweit verbessert ($0,59 \pm 0,03$ vs. $0,4 \pm 0,02$ in MK^{-/-}+Saline), dass kein Unterschied mehr zwischen behandelten MK^{-/-}- und WT Mäusen vorhanden war.

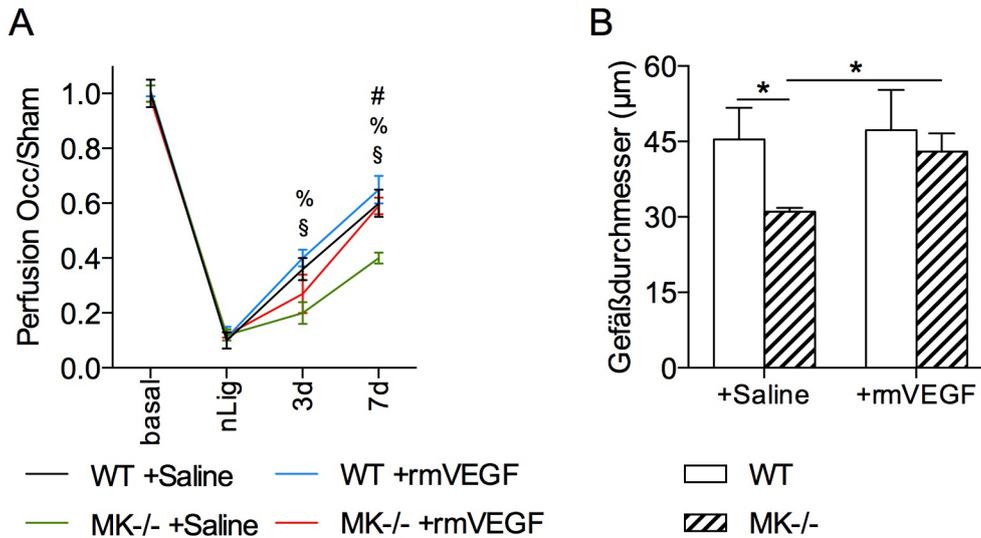


Abbildung 30: Einfluss von exogenem VEGF auf die Arteriogenese

MK-/- und WT Mäuse wurden ab dem dritten präoperativen Tag mit rmVEGF (einmal täglich, 100µl rmVEGF 0,1mg/ml, ip.) oder 0,9%iger Kochsalzlösung (Saline) behandelt. **(A)** Verhältnis der Perfusion vom Occ zum Sham-operierten Bein vor Ligatur (basal), unmittelbar nach Ligatur (nLig), 3d und 7d nach Ligatur. # $P < 0.05$ (MK-/- +rmVEGF vs. MK-/- +Saline), % $P < 0.05$ (WT +rmVEGF vs. MK-/- +Saline), two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt den Gefäßdurchmesser der Kollateralen 7d nach Ligatur. Pro Maus wurden 5 Schnitte mit je 3 Kollateralen analysiert. $n = 4$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. * $P < 0.05$, one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

Anschließend wurde der Gefäßdurchmesser der Kollateralen nach Behandlung mit rmVEGF analysiert (Abb. 30B). In MK-/- Mäusen führte die Behandlung zu einem signifikanten Anstieg des Gefäßdurchmesser ($42,98 \pm 3,62 \mu\text{m}$ vs. $31,06 \pm 0,73 \mu\text{m}$ in MK-/- +Saline). Die Behandlung hatte dagegen keinen Einfluss auf den Gefäßdurchmesser in WT Mäusen ($47,23 \pm 8,01 \mu\text{m}$ vs. $45,4 \pm 6,29 \mu\text{m}$ in WT+Saline). Folglich hat die Behandlung mit rmVEGF das Wachstumsdefizit in MK-/- Mäusen ausgeglichen.

Außerdem wurde analysiert, ob die Expression der NO-Synthasen 12 Stunden nach Ligatur durch die Behandlung mit rmVEGF beeinflusst wurde. In MK-/- Mäusen kam es durch die Behandlung mit rmVEGF zu einem signifikanten Anstieg der eNOS Expression ($2,95 \pm 0,03$ vs. $1,35 \pm 0,26$ in MK-/- +Saline) (Abb. 31). Es wurde kein Unterschied mehr zwischen WT und MK-/- Mäusen beobachtet. Auch die Expression der nNOS wurde durch die Behandlung normalisiert ($1,89 \pm 0,36$ vs. $1,74 \pm 0,22$ in WT +rmVEGF). Die Expression der iNOS wurde in WT und MK-/- Mäusen nur geringfügig durch die Behandlung mit rmVEGF beeinflusst.

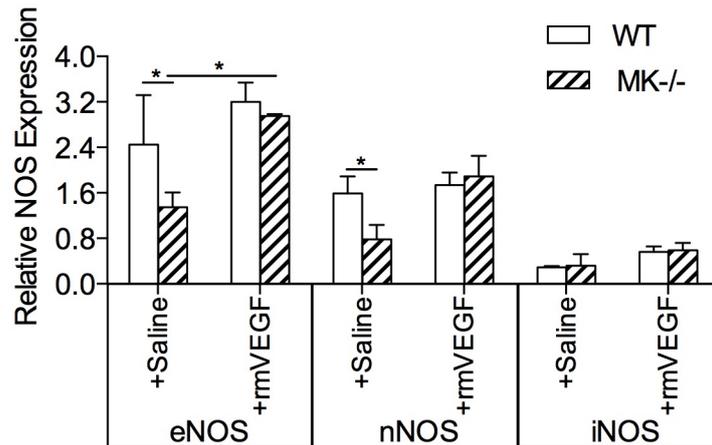


Abbildung 31: NOS Expression nach Behandlung mit rmVEGF

12h nach Ligatur und Behandlung mit rmVEGF oder Saline wurden WT und MK-/- Mäusen Kollateralen entnommen. Das Balkendiagramm zeigt die Expression der eNOS, iNOS und nNOS normalisiert auf 18S rRNA. $n=3$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. * $P<0,05$, one-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

4.6.3 Einfluss des VEGF-Signalwegs auf die Proliferation *in vitro*

Wie zuvor wurden Endothelzellen aus WT und MK-/- Mäusen isoliert, kultiviert und anschließend die Proliferation gemessen. Endothelzellen wurden für 48h mit 2%FCS in DMEM alleine (basal), oder in Kombinationen mit rmVEGF (50ng/ml) und dem VEGFR-2 Inhibitor SU1498 (100ng/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurden Endothelzellen mit 5%FCS in DMEM stimuliert (Daten nicht gezeigt).

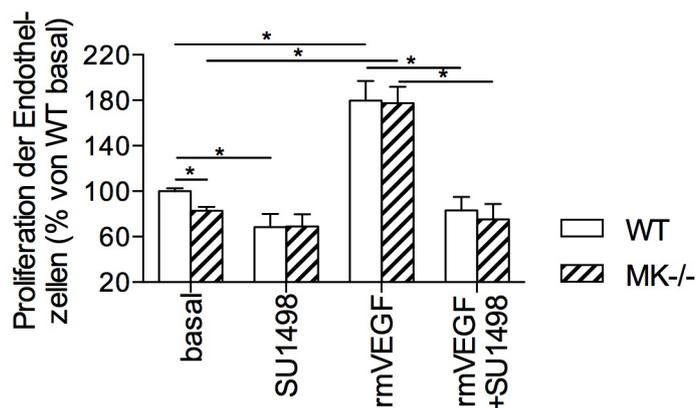


Abbildung 32: Einfluss von VEGF auf die Proliferation von Endothelzellen

Endothelzellen wurden für 48 Stunden mit 2%FCS in DMEM alleine (basal), oder in Kombination in Kombinationen mit rmVEGF (50ng/ml) und dem VEGFR-2 Inhibitor SU1498 (100ng/ml) stimuliert. Durch die Einlagerung von BrdU wurde der Anteil der proliferierenden Zellen bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Proliferation von Endothelzellen. Die dargestellten Werte sind auf WT basal normalisiert. $n=5$. Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SD. * $P<0,05$, two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur Test.

Die Einzelstimulation mit SU1498 reduzierte die Proliferationsrate von WT Endothelzellen signifikant ($0,68 \pm 0,12$ vs. $1,0 \pm 0,02$ in WT basal) (Abb. 32). Dahingegen veränderte sich die Proliferationsrate von MK^{-/-} Endothelzellen nicht signifikant ($0,69 \pm 0,11$ vs. $0,83 \pm 0,04$ in MK^{-/-} basal). Die Stimulation mit rmVEGF steigerte die Proliferationsrate von WT Endothelzellen ($1,8 \pm 0,17$) und MK^{-/-} Endothelzellen ($1,8 \pm 0,14$). Anders als bei der Stimulation mit rmMK und DETA NONOATE (Abb. 27B) war kein Unterschied mehr zwischen behandelten WT und MK^{-/-} Endothelzellen vorhanden. Durch die zusätzliche Behandlung mit dem VEGFR-2 Inhibitor SU1498 (50ng/ml rmVEGF und 100ng/ml SU1498) ist die Proliferationsrate von WT ($0,83 \pm 0,12$) und ($0,75 \pm 0,14$) MK^{-/-} Endothelzellen im Vergleich zur Einzelbehandlung mit rmVEGF signifikant gesunken.

Zusammengefasst war in MK^{-/-} Mäusen der VEGF-A Spiegel im Plasma nach Ligatur vermindert. Durch die Behandlung mit rmVEGF konnte sowohl die Proliferation von Endothelzellen *in vitro*, die Arteriogenese *in vivo* und die Expression der NO-Synthasen normalisiert werden.

5 Diskussion

5.1 Bewertung des verwendeten Tiermodells

Um den Einfluss von Midkine auf die Arteriogenese zu untersuchen wurden verschiedene *in vivo* und *in vitro* Experimente durchgeführt. Das Modell der peripheren Arteriogenese nach Limbourg et al¹¹⁶ ist bereits lange etabliert und wurde schon in zahlreichen Studien verwendet. Zur Induktion der Arteriogenese wurde in Mäusen die A. femoralis auf der rechten Seite unmittelbar distal des Abgangs der A. profunda ligiert. Auf der linken Seite wurde eine Scheinoperation durchgeführt.

Dazu wurde auf beiden Seiten ein 5mm langer Hautschnitt gesetzt. Die A. femoralis befand sich direkt unterhalb des Hautschnittes und durch den kurzen Zugangsweg wurde nur sehr wenig umliegendes Gewebe geschädigt. Folglich war die Gefahr von operativen und postoperativen Komplikationen äußerst gering. Die Scheinoperation links diente als Kontrolle. Damit wurde sichergestellt, dass die Veränderungen der Durchblutung und der Arteriogenese auf der rechten Seite durch die Ligatur selber und nicht allgemein durch den operativen Eingriff verursacht wurden.

Nach der Ligatur wurde der Hinterlauf ausschließlich durch die Kollateralen mit Blut versorgt. Der erhöhte Fluss in den Kollateralen induzierte die Arteriogenese. Mit dem LDI Verfahren konnte nicht invasiv und schmerzfrei über mehrere Tage die Durchblutung der Pfoten gemessen werden. Die Methode war ein sehr elegantes Verfahren um den Wiederanstieg der Durchblutung im ligierten Hinterlauf über einen gewissen Zeitraum zu erfassen. Aus den Ergebnissen konnten erste Rückschlüsse über das Wachstum der Kollateralen in MK-/- und WT Mäusen gemacht werden. Es wurden nur Mäuse für die Versuche verwendet, deren Verhältnis Occ zu Sham vor Ligatur zwischen 0,95 und 1,05 lag und nach der Ligatur auf unter 0,15 gesunken ist. Damit wurde sichergestellt, dass die Mäuse keine präexistierenden Gefäßanomalien zwischen dem rechten und linken Bein hatten und die A. femoralis auf der rechten Seite vollständig ligiert wurde. Trotz des präzisen Versuchsaufbaus war das LDI Verfahren eine sehr sensible und damit störungsanfällige Methode. Schon kleinste Änderungen während Narkose oder zu grober Druck bei der Platzierung der Pfoten beeinflussten die Ergebnisse. Dennoch zeigten die geringen Standardabweichungen der einzelnen Messungen, dass es sich beim LDI bei richtiger Anwendung um eine sehr gute und zuverlässige Methode handelte.

Während mit dem LDI Verfahren die Perfusion der Pfoten bestimmt wurde, konnte mit histologischen Untersuchungen die Morphologie der Kollateralen analysiert werden und daraus Rückschlüsse auf das Wachstum der Kollateralen gemacht werden. Für das Projekt waren besonders der Gefäßdurchmesser, die Gefäßwanddicke und die

Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen von Interesse. Um die Kollateralen zu analysieren wurde den Mäusen die Adduktorenmuskulatur entnommen. Man könnte argumentieren, dass der Gefäßdurchmesser nicht nur vom Wachstum der Kollateralen, sondern auch vom Blutdruck und von der Dilatation der Kollateralen zum Zeitpunkt der Entnahme abhängt. Um den Einfluss dieser Faktoren zu minimieren, wurden die Hinterläufe der Mäuse mit 20ml Adenosin-Lösung und 20ml PFA perfundiert. Dadurch wurde die maximale Dilatation der Kollateralen in jeder Maus sichergestellt.

Die Kollateralen im Oberschenkel der Maus verlaufen annähernd parallel zu den Muskelfasern. Um Querschnitte der Kollateralen für die histologischen Untersuchungen zu erhalten, wurden Muskelquerschnitte des entnommenen Gewebes angefertigt. Zunächst wurde die Adduktorenmuskulatur senkrecht zum Verlauf der Muskelfasern halbiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mindestens 3 Schnitte, je im Abstand von 1mm angefertigt und analysiert. Durch diesen Versuchsaufbau wurde sichergestellt, dass in jeder Maus die Kollateralen an der gleichen Stelle untersucht wurden. Für die Analysen des Gefäßdurchmessers und der Gefäßwanddicke wurden nur runde Querschnitte von Kollateralen verwendet. Die Proliferation einzelner Zellen in den Kollateralen wurde mit einem standardisierten BrdU-Kit untersucht. Die Spezifität der Antikörper der immunhistochemischen und Immunofluoreszenzfärbungen wurde mit den entsprechenden Negativkontrollen überprüft.

Weiterhin ermöglichte das Modell die Verwendung von Midkine defizienten Mäusen. Über den gesamten Zeitraum konnten die Mäuse mit Substanzen behandelt werden. Für die Behandlungen mit rekombinantem murinen Midkine¹⁸⁰, DETA NONOate¹⁸¹ und rekombinantem murinen VEGF¹⁸² wurden zuvor beschriebene Therapieschemata verwendet.

Um den Einfluss von Midkine aus Zellen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben (Leukozyten), und allen anderen Zellen genauer zu analysieren, wurden die beschriebene Maus-Chimäre erzeugt (siehe 3.3.13). Die Knochenmarkstransplantationen wurden anhand eines standardisierten Protokolls¹⁸³ durchgeführt. Bei LDI Messungen und histologischen Analysen des Gewebes, wurden keine Unterschiede zwischen nicht transplantierten WT Mäusen und den WT^{WT} transplantierten Mäusen gefunden. Auch in MK^{-/-} Mäusen hatten die Knochenmarks-transplantationen im Vergleich zu nicht transplantierten MK^{-/-} Mäusen keinen direkten Einfluss auf die Versuchsergebnisse.

5.2 Interpretation der Ergebnisse

5.2.1 Midkine beeinflusst die Proliferation von Endothelzellen in wachsenden Kollateralen

Zunächst wurde untersucht ob der Verlust von Midkine einen Einfluss auf die Arteriogenese hat. In MK^{-/-} und WT Mäusen wurde durch die Ligatur der A. femoralis die Arteriogenese in Kollateralen der Adduktorenmuskulatur induziert. Keine der beiden Gruppen zeigte spezielle Auffälligkeiten bei der Operation, der Narkose oder der anschließenden Wundheilung.

Nach der Ligatur der A. femoralis wurde der Unterschenkel zunächst nicht ausreichend mit Blut versorgt (Abb. 33A). Durch die Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen kommt es im Unterschenkel zur Ischämie, welche die motorische Funktion des Fußes einschränkt. Mit dem „Active Foot Movement Score“¹⁷⁵ wurde die motorische Funktion des rechten Hinterlaufs am dritten und siebten postoperativen Tag ermittelt. In MK^{-/-} Mäusen deutete die schlechtere motorische Funktion nach Ligatur auf einen vermehrten ischämischen Schaden im Unterschenkel im Vergleich zu WT Mäusen hin. Nach Ligatur der A. femoralis beeinflussen zwei Faktoren maßgeblich das Ausmaß des ischämischen Schadens im Unterschenkel. Zum einen induziert der Sauerstoffmangel im Gewebe das Wachstum von neuen Kapillaren (Angiogenese).¹² Diese Kapillaren sind essentiell für die Abräumreaktion des ischämischen Schadens im Unterschenkel.¹⁹ Durch das Wachstum der Kollateralen im Oberschenkel (Arteriogenese), wird die Blutversorgung des Unterschenkels wiederhergestellt.³⁵ Folglich haben Angiogenese und Arteriogenese einen positiven Effekt auf die motorische Funktion des Unterschenkels nach Ligatur. Durch die Angiogenese wird der Zelldebris im Unterschenkel abgeräumt und die Arteriogenese steigert die Blutversorgung des Unterschenkels durch das Wachstum der Kollateralen (Abb. 33B).

Es wurde bereits beschrieben, dass die Angiogenese im Unterschenkel nach Ligatur der A. femoralis in MK^{-/-} Mäusen vermindert ist.¹⁶³ Dabei wurde in MK^{-/-} Mäusen eine geringere Proliferation von Endothelzellen im Unterschenkel beobachtet. In diesem Projekt wird zum ersten Mal beschrieben, dass Midkine auch einen Einfluss auf die Arteriogenese im Oberschenkel hat.

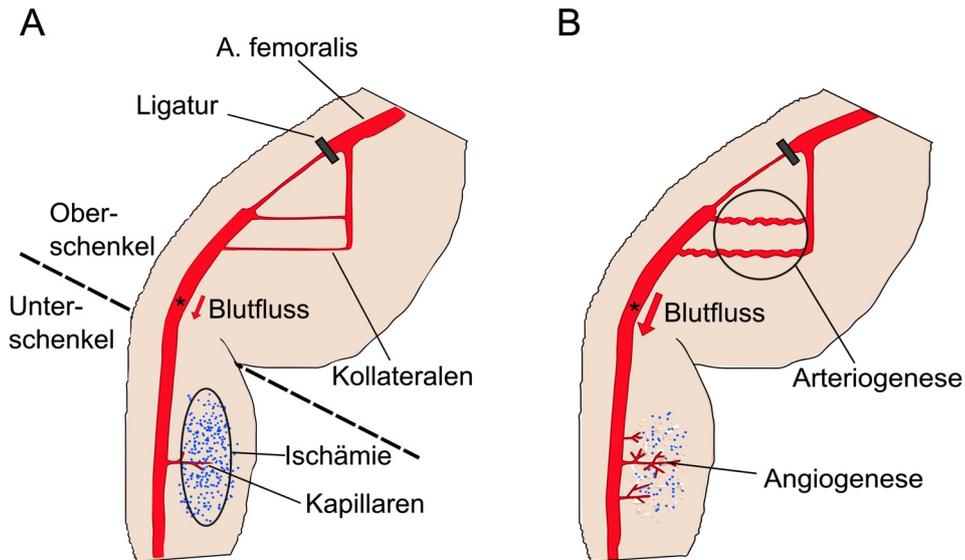


Abbildung 33: Arteriogenese und Angiogenese nach Ligatur der A. femoralis

(A) Schematische Zeichnung des Hinterlaufs unmittelbar nach Ligatur der A. femoralis. Der Blutfluss (*) ist distal der Ligatur stark eingeschränkt und es kommt zur Ischämie im Unterschenkel. Im Verlauf (B) wachsen die Kollateralen durch den erhöhten FSS (Arteriogenese). Dadurch wird der Blutfluss distal der Ligatur wieder normalisiert. Im Unterschenkel führt die Hypoxie zur Sprossung von Kapillaren (Angiogenese), welche essentiell für die Abräumreaktion des Zelldebris ist.

Die LDI Messungen zeigten einen signifikant verminderten Anstieg der Durchblutung in MK^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen. Dies war ein erster Hinweis auf eingeschränkte Arteriogenese in MK^{-/-} Mäusen.

Longland et al. haben beschrieben, dass erhöhter FSS das Wachstum von Kollateralen in die Breite und in die Länge fördert.¹⁷⁹ Dadurch steigen der Gefäßdurchmesser (Breite) und die Tortuosität (Längenwachstum führt zu vermehrten Windungen) der Kollateralen an. Makroskopische Bilder von Kollateralen der Occ-Seite zeigten, dass die Kollateralen in WT und MK^{-/-} Mäusen die Kriterien von wachsenden Kollateralen im Vergleich zur Sham-Seite erfüllten. Jedoch war in MK^{-/-} Mäusen das Wachstum in die Breite (kleinerer Gefäßdurchmesser) und die Länge (geringere Tortuosität) im Vergleich zu WT Mäusen vermindert.

Allerdings wird der Wiederanstieg der Durchblutung nicht nur durch die Arteriogenese beeinflusst. Auch die Anzahl der Kollateralen, der Blutdruck und die Vasodilatation der Kollateralen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Durchblutung der Pfoten. Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass MK^{-/-} Mäuse nicht weniger Kollateralen in der Adduktorenmuskulatur haben als WT Mäuse. Sowohl auf der Occ-Seite als auch der Sham Seite wurden in beiden Gruppen jeweils 5 Kollateralen gefunden. Auf der Occ-Seite

wurden in MK-/- und WT Mäusen je drei Kollateralen gefunden, deren Gefäßdurchmesser nach Ligatur angestiegen ist. Die anderen beiden Kollateralen waren sieben Tage nach Ligatur genauso groß wie Kollateralen der Sham Seite, sind folglich nach Ligatur nicht gewachsen und wurden für die weiteren Analysen nicht verwendet. Außerdem hätte man bei einer unterschiedlichen Anzahl von Kollateralen einen signifikanten Unterschied der Durchblutung unmittelbar nach Ligatur und nicht erst im Verlauf erwartet. Weiterhin belegte eine Studie, dass der Verlust von Midkine keinen Einfluss auf den Blutdruck in Mäusen hat.¹⁸⁴

Um zu analysieren, ob verminderte Vasodilatation oder vermindertes Wachstum der Kollateralen der Grund für die geringere Durchblutung in MK-/- Mäusen war, wurde den Mäusen die Adduktorenmuskulatur für histologische Untersuchungen entnommen. Mit der Perfusion von 20ml Adenosin-Lösung und 20ml PFA wurde in allen Mäusen die maximale Vasodilatation sichergestellt.

Allgemein führt erhöhter FSS in Arteriolen zum Wachstum des Gefäßdurchmessers und der Gefäßwanddicke.¹⁸⁵ In MK-/- und WT Mäusen ist der Gefäßdurchmesser vom dritten bis zum siebten postoperativen Tag signifikant angestiegen. Allerdings war der Gefäßdurchmesser in MK-/- Mäusen, dennoch signifikant kleiner als in WT Mäusen. Folglich wurde die verminderte Durchblutung durch das geringere Wachstum der Kollateralen verursacht. Im Gegensatz zu WT Mäusen ist das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser in MK-/- Mäusen signifikant angestiegen. Die Gefäßwand ist in Relation mehr gewachsen als der Gefäßdurchmesser. Dies wird generell als hypertrophes Gefäßwachstum bezeichnet¹⁸⁶ und kann durch verminderte Proliferation der Tunica intima (Endothelzellen) bei normaler Proliferation der Tunica media (glatte Gefäßmuskelzellen) und Tunica adventitia verursacht werden.

Mit immunhistochemischen Färbungen gegen BrdU wurde die Proliferation der Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen analysiert. Tatsächlich war der Anteil der proliferierenden Endothelzellen in MK-/- Mäusen signifikant geringer und der Anteil der proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen wurde durch den Verlust von Midkine nicht beeinflusst. Dies stimmt mit vorherigen Studien überein, in denen gezeigt wurde, dass Midkine die Proliferation von Endothelzellen fördert.¹⁸⁷

Zuletzt wurde auch der Gefäßdurchmesser der Kollateralen auf der Sham-Seite analysiert. Es wurde kein Unterschied zwischen den Kollateralen der Sham-Seite in MK-/- und WT Mäusen beobachtet. Dies beweist, dass die Kollateralen in MK-/- Mäusen tatsächlich weniger gewachsen sind und nicht von Anfang an kleiner waren als in WT Mäusen.

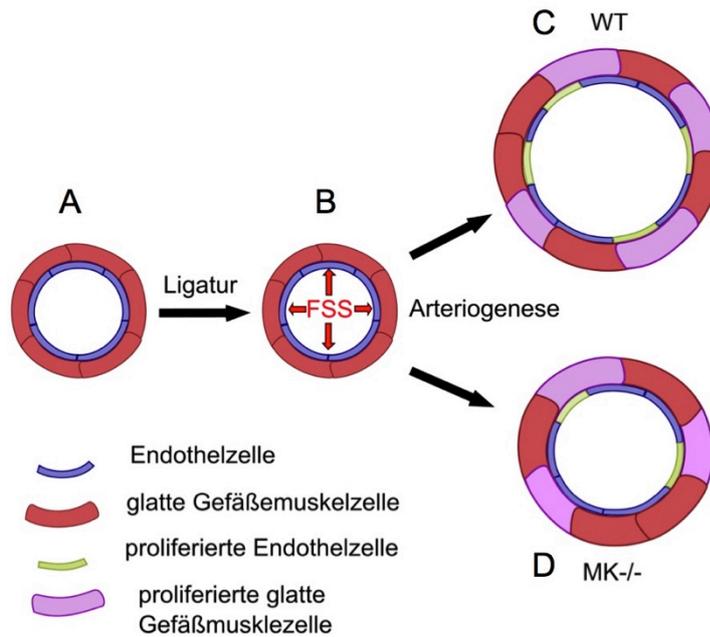


Abbildung 34: Wachstum von Kollateralen

(A) Kollaterale vor Ligatur mit Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen. (B) Nach der Ligatur induziert erhöhter FSS in den Kollateralen die Arteriogenese. (C) In WT Mäusen proliferieren Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen. Dadurch nehmen der Gefäßdurchmesser und die Gefäßwanddicke zu. (D) In *MK*^{-/-} ist die Proliferation der Endothelzellen eingeschränkt. Folglich steigt der Gefäßdurchmesser nicht so stark an wie die Gefäßwanddicke. Im Vergleich zu WT Mäusen ist das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser erhöht und die Perfusion vermindert.

Die Experimente belegen, dass die Arteriogenese in *MK*^{-/-} Mäusen nach Ligatur der A. femoralis eingeschränkt war. Der erhöhte FSS nach Ligatur induzierte das Wachstum der Kollateralen (Abb. 34AB). In WT Mäusen war die Proliferation der Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen nicht eingeschränkt (Abb. 34C). In *MK*^{-/-} Mäusen war das Wachstum des Gefäßdurchmessers durch die reduzierte Proliferation der Endothelzellen eingeschränkt (Abb. 34D). Andererseits wurden keine Unterschiede bei der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen beobachtet. Dies führte dazu, dass das Verhältnis der Gefäßwanddicke zum Gefäßdurchmesser in *MK*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen angestiegen ist.

Zusammengefasst ist Midkine wichtig für die Proliferation von Endothelzellen in wachsenden Kollateralen. Das geringere Wachstum der Kollateralen in *MK*^{-/-} Mäusen erklärt die verminderte Perfusion und den schlechteren „Active Foot Movement Score“ nach Ligatur im Vergleich zu WT Mäusen. Weiterhin wurden eine unterschiedliche Anzahl an Kollateralen, Blutdruckunterschiede und eingeschränkte Vasodilatation als mögliche Einflussfaktoren ausgeschlossen.

5.2.2 Midkine aus Leukozyten ist essentiell für die Arteriogenese

Um den Einfluss von Midkine auf die Arteriogenese besser verstehen zu können, wurden die Quellen von endogenem Midkine während der Arteriogenese untersucht. Dafür wurde auch die Auswirkung der Arteriogenese auf die Expression von Midkine und den Midkine Spiegel im Plasma analysiert. Ohne jegliche Operation war nicht genügend Midkine im Plasma vorhanden um mit dem ELISA Kit nachgewiesen zu werden. Erst am dritten Tag nach Ligatur konnte Midkine im Plasma nachgewiesen werden. Dahingegen erreichte die Expression von Midkine in Kollateralen bereits in den ersten 24 Stunden nach Ligatur ihr Maximum. In der Anfangsphase des Kollateralwachstums (ersten 24 Stunden nach Ligatur) spielt die Extravasation von Leukozyten eine wichtige Rolle.⁷¹ Insbesondere die Extravasation von neutrophilen Granulozyten, welche von Mastzellen reguliert wird⁷¹, beeinflusst die Arteriogenese maßgeblich⁶³. Eine frühere Studie zeigte, dass neutrophile Granulozyten Midkine enthalten und dieses Midkine wichtig für die Angiogenese ist.¹⁶³ Weitere Studien haben belegt, dass Midkine in neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, diese Midkine aber nicht freisetzen.^{134,163,188} Interessanterweise fördert Midkine die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Gefäßendothel durch Verstärkung der hochaffinen Konformation von β_2 -Integrinen und führt somit zur vermehrten Extravasation von neutrophilen Granulozyten.¹³⁴ Während sich neutrophile Granulozyten an der Gefäßwand bewegen, befinden sie sich in engem Kontakt mit dem Endothel und können durch CXCL1 aktiviert werden.⁶⁴ Nach Stimulation mit CXCL1, setzen neutrophile Granulozyten angiogene Wachstumsfaktoren wie VEGF-A frei.¹⁸⁹ Interessanterweise wurde gezeigt, dass *in vitro*⁶⁵ in Endothelzellen erhöhte Schubspannung und *in vivo*⁶⁶ in Kollateralen die Induktion der Arteriogenese zu einer vermehrten Expression von CXCL1 (früher als wachstumsbezogenes Onkogen α (GRO α) bezeichnet) führen. Darüber hinaus förderte die Behandlung mit CXCL1 die Arteriogenese, während Chemokin (C-X-C-Motiv) - Rezeptor 2 (CXCR2) -Antagonist-Behandlung die Arteriogenese reduzierte.⁶⁶ In diesem Projekt wurde mit Immunofluoreszenzfärbungen gegen Midkine die genaue Lokalisation von Midkine in der Adduktorenmuskulatur analysiert. 24 Stunden nach Ligatur wurde Midkine in ausgewanderten neutrophilen Granulozyten gefunden. Vor Ligatur, sieben Tage nach Ligatur und auf der Sham Seite wurden Midkine weder in ausgewanderten neutrophilen Granulozyten, noch in den Kollateralen nachgewiesen.

Um den Einfluss von Midkine aus neutrophilen Granulozyten beziehungsweise generell aus Zellen des Knochenmarks zu analysieren, wurden die genannten Knochenmarkstransplantationen durchgeführt. Die Knochenmarkstransplantationen an sich hatten keinen Einfluss auf die Durchblutung nach Ligatur im Vergleich zu nicht transplantierten Kontrollmäusen. Sowohl Midkine aus Leukozyten (MK-/-^{WT}), als auch aus anderen Zellen

(WT^{MK^{-/-}}), genügte um die Perfusion der Pfoten nach Ligatur wieder zu normalisieren. In beiden Gruppen wurde kein Unterschied mehr zu WT^{WT} Mäusen beobachtet. Interessanterweise hat nur Midkine aus Leukozyten zu einem signifikanten Anstieg des Gefäßdurchmessers im Vergleich zu MK^{-/-} Mäusen geführt. Folglich hat Midkine aus Nicht-Knochenmarkszellen die Durchblutung nach Ligatur durch vermehrte Vasodilatation beeinflusst. Weiterhin zeigten die Experimente, dass der Anstieg des Midkine Plasma Spiegels nach Ligatur nicht durch Leukozyten, sondern durch andere Zellen beeinflusst wurde.

Frühere *in vitro* Studien haben ergeben, dass nicht nur neutrophile Granulozyten, sondern auch Monozyten und Endothelzellen Quellen von endogenem Midkine sind.¹⁶³ Die Proteinexpression von Midkine in den Zellen wurde durch Hypoxie gesteigert, jedoch kam es nur bei Endothelzellen zu einem signifikanten Anstieg des Midkine Spiegels im Überstand der Zellkultur.¹⁶³ Da durch die Kollateralen immer Blut fließt, werden diese nicht ischämisch. Die Arteriogenese - im Gegensatz zur Angiogenese – wird nicht durch Hypoxie-induzierbare Gene wie HIF-1 α reguliert.⁴⁷ Dies erklärt auch, warum Midkine in den Immunofluoreszenz Färbungen nicht in den Endothelzellen der Kollateralen nachgewiesen wurde. In den Endothelzellen der Kollateralen liegen keine hypoxischen Bedingungen vor¹⁹⁰, welche die Expression von Midkine steigern würden. Erhöhter FSS scheint ein Stimulus für die Midkine Expression in Kollateralen zu sein. Die qRT-PCR Experimente beweisen, dass Midkine in den Kollateralen vermehrt nach Ligatur exprimiert wird, aber eventuell sind die basalen Midkine Level zu gering um mit der Immunofluoreszenzfärbung dargestellt zu werden.

Nach Ligatur der A. femoralis im Oberschenkel wird der Unterschenkel nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt und es kommt zur Hypoxie-induzierten Angiogenese.¹¹⁶ Eine Studie, in der das gleiche Mausmodell wie in diesem Projekt benutzt wurde, zeigte, dass HIF-1 α während der ersten drei Tage nach Ligatur in der Wadenmuskulatur des Unterschenkels erhöht war.⁷² Es ist bekannt, dass HIF-1 α die Expression von Midkine verstärkt.¹²⁴ Es ist anzunehmen, dass es nach Ligatur durch die Hypoxie im Unterschenkel zur vermehrten Expression von Midkine in den Endothelzellen der Kapillaren im Unterschenkel kommt. Dieses Midkine wird dann, ähnlich wie in den *in vitro* Versuchen¹⁶³, aus den Endothelzellen freigesetzt und steigert den Midkine Spiegel im Plasma. Dieser Vorgang erklärt auch warum Midkine erst drei Tage nach Ligatur im Plasma nachgewiesen werden konnte und nicht unmittelbar nach Ligatur. HIF-1 α ist am stärksten zwischen dem ersten und dritten Tag nach Ligatur in der Wadenmuskulatur exprimiert.⁷² Dadurch kommt es zur verstärkten Expression von Midkine und anschließend zur Freisetzung aus den Endothelzellen ins Plasma. Unmittelbar nach Ligatur ist in den Endothelzellen nicht genügend Midkine vorhanden um den Plasmaspiegel zu steigern. Dies belegen auch die

Immunofluoreszenzfärbungen, da hier kein Midkine in den Endothelzellen nachgewiesen werden konnte. Weiterhin tritt in diesem Modell die Angiogenese zeitlich verzögert zur Arteriogenese auf. Unmittelbar nach Ligatur induziert erhöhter FSS die Arteriogenese im Oberschenkel, während die Angiogenese im Unterschenkel erst nach 2 bis 3 Tagen beginnt.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass Midkine aus Leukozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten, wichtig für das Wachstum der Kollateralen nach Ligatur ist. Midkine aus Nicht-Knochenmarkszellen verbesserte die Durchblutung nach Ligatur, aber hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Kollateralen. Folglich regulierte Midkine aus Nicht-Knochenmarkszellen die Vasodilatation nach Ligatur. Der Midkine Plasma Spiegel nach Ligatur wurde durch Nicht-Knochenmarkszellen beeinflusst und der erhöhte Midkine Plasma Spiegel drei Tage nach Ligatur kam mit großer Wahrscheinlichkeit aus dem hypoxischen Unterschenkel.

5.2.3 Exogenes Midkine steigert die Vasodilatation nach Ligatur

Im nächsten Schritt wurden MK^{-/-} und WT Mäuse mit rekombinanten murinen Midkine behandelt. Damit wurde untersucht, ob exogenes Midkine die Arteriogenese in MK^{-/-} Mäusen wiederherstellen kann und ob exogenes Midkine in WT die Arteriogenese noch weiter verbessert. Das Therapieschema orientierte sich an der Studie von Zhang et al.¹⁸⁰ Als Kontrollgruppen wurden MK^{-/-} und WT Mäuse mit 0,9% Kochsalzlösung behandelt.

Durch die Behandlung mit rmMK kam es in MK^{-/-} Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der Durchblutung, des Gefäßwachstums und der Proliferation von Endothelzellen nach Ligatur im Vergleich zu Saline behandelten MK^{-/-} Mäusen. Es wurde kein Unterschied mehr zu Saline behandelten WT Mäusen festgestellt. Interessanterweise steigerte die Behandlung auch in WT Mäusen die Durchblutung nach Ligatur. Allerdings beruhte dies nicht auf vermehrtem Gefäßwachstum. Folglich beeinflusst exogenes Midkine in WT Mäusen die Durchblutung nach Ligatur durch gesteigerte Vasodilatation.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Midkine wichtig für die Arteriogenese ist, aber exogenes Midkine in WT Mäusen nur die Vasodilatation verstärkt und nicht die Arteriogenese.

5.2.4 Endothelzellenproliferation in Kollateralen ist abhängig von NO-Synthasen

Die Ergebnisse dieses Projektes zeigten, dass Midkine neben dem Wachstum der Kollateralen auch die Vasodilatation der Kollateralen beeinflusste. Um den Einfluss von Midkine auf die Vasodilatation zu untersuchen, wurde die Expression der NO-Synthasen analysiert. NO-Synthasen produzieren NO, welches entscheidend für die Vasodilatation von Gefäßen ist.

Aus den Ergebnissen der qRT-PCR ging hervor, dass die eNOS und nNOS in den Kollateralen von MK^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen weniger stark exprimiert wurden. Midkine hatte keinen Einfluss auf die Expression der iNOS. Dai et al. haben beschrieben, dass in eNOS Knockout (eNOS^{-/-}) Mäusen weniger Kollateralen in der Adduktorenmuskulatur vorhanden waren als in entsprechenden WT Mäusen.¹⁹¹ Auch wenn in MK^{-/-} Mäusen die Expression der eNOS vermindert war, wurden gleich viele Kollateralen wie in den WT Mäusen gefunden.

Um herauszufinden, ob die verminderte Expression der NO-Synthasen einen Einfluss auf die Arteriogenese hatte, wurden WT und MK^{-/-} Mäuse mit dem NO-Donor DETA NONOate behandelt. Als Kontrollgruppen wurden MK^{-/-} und WT Mäuse mit Saline behandelt. In MK^{-/-} Mäusen steigerte die Behandlung mit DETA NONOate die Durchblutung nach Ligatur so stark, dass kein Unterschied mehr zwischen behandelten MK^{-/-} Mäusen und Saline behandelten WT Mäusen vorhanden war. Morphologische Analysen der Kollateralen zeigten, dass die Behandlung auch das Wachstum der Kollateralen und die Proliferation von Endothelzellen in MK^{-/-} Mäusen verbesserte. In WT Mäusen hatte die Behandlung mit DETA NONOATE weder Einfluss auf die Durchblutung nach Ligatur, noch auf das Wachstum der Kollateralen. Der Körper entwickelt sehr schnell eine sogenannte Nitrattoleranz gegen NO-Donatoren.¹⁹² Innerhalb von 2 Tagen vermindert sich bei regelmäßiger Behandlung (alle 6 Stunden) mit dem NO-Donor Isosorbiddinitrat die gefäßerweiternde Wirkung des NO-Donors signifikant.¹⁹³ Folglich besteht die Möglichkeit, dass die Mäuse eine Nitrattoleranz gegen DETA NONOate entwickelt haben und die Vasodilatation deswegen nicht gesteigert war.

Wie zuvor beschrieben, führt die Bindung von Midkine an den Rezeptor ALK zur Aktivierung von PI3K und MAPK-Signaltransduktion.¹⁴⁰ PI3K ist ein Teil des VEGF-A Signalwegs. So führt die Aktivierung des VEGFR-2 durch Schubspannung zur Aktivierung von PI3K.⁹⁶ Verschiedene Studien belegen den Einfluss des VEGF-A Signalwegs und PI3K auf die Expression von NO-Synthasen: (1) VEGF-A steigert die Expression der eNOS⁹⁷, (2) Schubspannung die Aktivierung der eNOS¹⁹⁴ und (3) „retinoic acid“ die Expression der nNOS¹⁹⁵.

Dieses Projekt zeigt zum ersten Mal, dass Midkine die Expression der eNOS und nNOS in Kollateralen beeinflusst. Möglicherweise wird dieser Vorgang direkt über ALK und PI3K oder indirekt über den VEGF-A Signalweg (Midkine, VEGF-A, VEGFR-2, PI3K) vermittelt. Außerdem belegen die Ergebnisse, dass NO-Synthasen wichtig für die Proliferation von Endothelzellen in wachsenden Kollateralen sind.

Wie zuvor beschrieben (siehe 1.2.3.5) spielen NO-Synthasen eine wichtige Rolle bei der Arteriogenese. Jedoch ist noch nicht abschließend geklärt, welche NO-Synthase für das Wachstum von Kollateralen wichtig ist. Besonders die Funktion der eNOS wird kontrovers diskutiert.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Die Ligatur der A. femoralis induziert die Expression der eNOS¹⁰⁷, iNOS¹⁰⁶ und nNOS¹⁰⁸ in Kollateralen. Mees et. al haben gezeigt, dass in eNOS^{-/-} Mäusen die Vasodilatation der Kollateralen nach Ligatur eingeschränkt war und die Kollateralen normal gewachsen sind, es jedoch zu einer zeitlichen Verzögerung kam im Vergleich zu WT Mäusen.¹⁰⁷ Interessanterweise wurde in eNOS^{-/-} Mäusen eine erhöhte Expression der iNOS nach Ligatur nachgewiesen und Inhibierung der iNOS in eNOS^{-/-} Mäusen schränkte die Arteriogenese stark ein.¹⁰⁶ Die Ergebnisse dieses Projektes zeigten, dass die reduzierte Expression der eNOS und nNOS in MK^{-/-} Mäusen nicht ausreichend durch die iNOS Expression kompensiert werden konnte. Im Gegensatz zu vorherigen Studien, haben Cui et al gezeigt, dass die Arteriogenese in eNOS^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nach Verschluss der A. cerebri media signifikant schlechter war.¹⁰⁵ eNOS^{-/-} Mäuse, die mit DETA NONOate behandelt wurden, hatten eine signifikant verminderte Mortalitätsrate und verbesserte Arteriogenese im Vergleich zu eNOS^{-/-} Mäusen. Die verbesserte Arteriogenese wurde auf die gesteigerte Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und dadurch größere Durchmesser der Kollateralen zurückgeführt.¹⁰⁵ In MK^{-/-} Mäusen war die Expression der eNOS und nNOS signifikant vermindert, aber dies beeinflusste nicht die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, sondern nur die Proliferation der Endothelzellen. In einem Mausmodell des zerebralen Aneurysmas wurde die Expression der nNOS, aber nicht die Expression der iNOS, in eNOS^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen hochreguliert.¹⁰⁹ In Mäusen, die sowohl für die eNOS als auch die nNOS defizient waren, war die Produktion von NO zu gering, um hämodynamische Kräfte auf die Gefäßwände zu entlasten und es bildeten sich vermehrt Aneurysmen. In MK^{-/-} Mäusen waren sowohl die eNOS als auch die nNOS vermindert. Folglich kann hier auch keine Kompensation stattfinden.

Es ist bekannt, dass sich eNOS und nNOS gegenseitig kompensieren können. Während die eNOS und iNOS vor allem NO produzieren, ist die nNOS stärker in die Produktion von H₂O₂ verwickelt.^{110,111} Allerdings kann auch die eNOS, wenn sie entkoppelt ist, H₂O₂ produzieren.¹¹² Neben NO¹¹⁵, spielt auch H₂O₂^{113,114} eine Rolle bei der Proliferation von Endothelzellen und beide Isoformen können sich gegenseitig ersetzen.

Die Ergebnisse dieses Projektes zeigten deutlich, dass NO-Synthasen eine entscheidende Rolle in der Arteriogenese spielen. Ob NO-Synthasen die Proliferation von Endothelzellen durch die Produktion von NO oder H₂O₂ beeinflussen ist noch nicht abschließend geklärt.

Vorherige Studien zeigten, dass NO wichtig für die Proliferation von Endothelzellen ist.¹⁹⁶ NO, besonders produziert von der eNOS, reguliert die Proliferation von Endothelzellen und die Angiogenese.³⁴ Inhibierung der eNOS hemmt die Proliferation von Endothelzellen *in vivo* und *in vitro*.³³ Metaxa et al haben zeigten, dass durch Inhibierung der NO-Synthasen mit N(omega)-nitro-l-arginine methyl ester (L-NAME) die Proliferation von Endothelzellen bei erhöhter Schubspannung reduziert wird.¹⁹⁷ Allerdings hemmt L-NAME auch die Arginase.¹⁹⁸ Erst kürzlich zeigten eigene Daten, dass die Arginase wichtig für die Proliferation von Endothelzellen in wachsenden Kollateralen ist.¹⁹⁹ Folglich ist aus der Studie von Metaxa et al kein Rückschluss möglich, ob L-NAME über die Inhibierung der NO-Synthasen oder über die Inhibierung der Arginase die Proliferation der Endothelzellen reduzierte.

Ähnlich wie in den Kollateralen war die Expression der eNOS und nNOS in isolierten MK-/- Endothelzellen im Vergleich zu WT Endothelzellen vermindert. Weiterhin war die basale Proliferation der MK-/- Endothelzellen reduziert. In einem artifizialen *in vitro* Blutgefäß-Modell wurde bereits bewiesen, dass Midkine die Proliferation von Endothelzellen steigert.¹⁸⁷ Die Behandlung mit dem unspezifischen NOS-Inhibitor L-NIO reduzierte signifikant die Proliferation von WT Endothelzellen, nicht aber von MK-/- Endothelzellen. Dies belegt, dass Midkine über die NO-Synthasen die Proliferation von Endothelzellen beeinflusst und bestätigt, dass L-NIO die Proliferation von Endothelzellen hemmt²⁰⁰. Durch die Behandlung mit 50µmol/l DETA NONOATE konnte die Proliferation in WT und MK-/- Endothelzellen gesteigert werden. Bao et al haben bewiesen, dass ausreichend hohe Konzentrationen von NO (100µmol/l NO = 50µmol/l DETA NONOATE) die Proliferation von Endothelzellen steigern, während zu niedrige Konzentrationen (<10µmol/l NO) die Proliferation hemmen²⁰¹ Dabei fördern hohe Konzentrationen von NO die Aktivierung der ERK1/2 und niedrige Konzentrationen von NO hemmen die Aktivierung. ERK1/2 sind Mitglieder der MAPK-Familie und sind an FSS induzierten endothelialen Signalwegen beteiligt.²⁰² Außerdem ist bekannt, dass FSS die eNOS in Endothelzellen induziert und darüber die Produktion von NO steigert.²⁰³ Durch die Behandlung mit rmMK ist die Proliferation in beiden Gruppen angestiegen. Nichtsdestotrotz war immer noch ein signifikanter Unterschied zwischen MK-/- und WT Endothelzellen vorhanden. Die gesteigerte Proliferation der Endothelzellen nach Behandlung mit rmMK wurde durch die NO-Synthasen vermittelt, da die zusätzliche Gabe von L-NIO den positiven Effekt von

rmMK wieder aufgehoben hat. Die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen wurde weder *in vivo*, noch *in vitro* durch Midkine, oder durch die Behandlungen mit NO oder rmMK beeinflusst.

Zusammenfassend beeinflusst Midkine die Expression der eNOS und nNOS in Kollateralen und in isolierten Endothelzellen. In MK^{-/-} Mäusen beziehungsweise MK^{-/-} Endothelzellen wurde durch die Behandlung mit dem NO-Donor DETA NONOate die Arteriogenese *in vivo* und die Proliferation der Endothelzellen *in vitro* signifikant gesteigert. Allerdings verbesserte die Behandlung mit DETA NONOate die Arteriogenese nicht in WT Mäusen. Die Ergebnisse dieses Projektes belegen deutlich, dass die eNOS und nNOS essentiell für die Proliferation von Endothelzellen sind. Möglicherweise steigert Midkine die Expression der eNOS und nNOS direkt über ALK und PI3K oder indirekt über den VEGF-A Signalweg. Welche der NO-Synthasen für das Wachstum der Kollateralen entscheidend ist und ob die NO-Synthasen die Proliferation der Endothelzellen über die Produktion von NO oder H₂O₂ regulieren, ist noch nicht abschließend geklärt.

5.2.5 Beteiligung von VEGF-A

VEGF ist entscheidend für die Proliferation von Endothelzellen während der Angiogenese.²⁰⁴ Da frühere Studien darauf hindeuteten, dass NO-Synthasen eine wichtige Rolle bei der VEGF-induzierten Angiogenese spielen³⁴, wurde in diesem Projekt untersucht, ob Midkine über die Expression der NO-Synthasen die VEGF-vermittelte Zellproliferation in Gefäßen beeinflusst.

Amano et al. zeigten, dass der VEGF-A Spiegel im Plasma in WT Mäusen innerhalb von 24 Stunden nach Entfernung der A. femoralis im Oberschenkel auf circa 150% des Ausgangswertes angestiegen ist.²⁰⁵ In der Studie wurde jedoch nur die Angiogenese im Unterschenkel untersucht, da durch die Entfernung der A. femoralis die Arteriogenese im Oberschenkel nicht induziert wurde. In diesem Projekt ist der VEGF-A Spiegel im Plasma in WT Mäusen innerhalb von 24 Stunden nach Ligatur der A. femoralis auf 149% des Ausgangswertes angestiegen. In MK^{-/-} Mäusen war der Anstieg des VEGF-A Spiegels nach Ligatur signifikant geringer (116%). Dies konnte durch die Behandlung mit rmMK ausgeglichen werden. In WT Mäusen hatte die Behandlung mit rmMK jedoch keinen Einfluss auf den VEGF-A Spiegel im Plasma. In den ersten 24 Stunden nach Ligatur sind neutrophile Granulozyten die wichtigsten Mediatoren der Arteriogenese.⁷¹ Die Immunofluoreszenzfärbungen dieses Projektes zeigten, dass neutrophile Granulozyten 24 Stunden nach Ligatur eine Quelle von VEGF-A darstellen könnten. Bisherige Daten zu mesenchymalen Stammzellen haben gezeigt, dass die Überexpression von Midkine nicht nur zu erhöhten mRNA-Expressionsniveaus von VEGF-A führte, sondern auch zu

erhöhten Mengen von VEGF-A im Zellüberstand.¹⁵³ Folglich könnte Midkine in neutrophilen Granulozyten zur vermehrten Expression und Freisetzung von VEGF-A führen. Frühere Studien belegen, dass CXCL1 durch Schubspannung vermehrt in Endothelzellen exprimiert wird^{65,66} und die Arteriogenese fördert⁶⁶. Außerdem führt CXCL1 zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten⁶⁴ und zur Freisetzung von VEGF-A aus neutrophilen Granulozyten¹⁸⁹. Es wird interessant sein, in weiteren Studien zu sehen, ob CXCL1 relevant für die VEGF-A Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten während der Arteriogenese ist oder sogar wichtig für die Expression von Midkine in neutrophilen Granulozyten. In der Tat zeigte eine aktuelle Studie, dass CXCL1 die mikrovaskuläre Dichte und die Aktivierung des VEGF-A-Signalwegs in einem Modell des Xenotransplantat-Tumorwachstums erhöht hat.²⁰⁶

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass der Anstieg des VEGF-A Spiegels im Plasma nach Ligatur von Midkine abhängig ist, da der Anstieg in MK-/- Mäusen nicht beobachtet wurde und durch Behandlung mit rmMK wiederhergestellt werden konnte. Weiterhin sind neutrophile Granulozyten eine möglich Quelle von VEGF-A in den ersten 24 Stunden nach Ligatur. Vermutlich steigert Midkine, welches selber in neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, die Expression und Freisetzung von VEGF-A aus den neutrophilen Granulozyten ins Plasma.

In verschiedenen Studien wurde die Bedeutung des VEGF-Signalwegs in der Arteriogenese untersucht, jedoch ist der Einfluss von VEGF-A auf das Wachstum von Kollateralen noch nicht abschließend geklärt.⁸⁴ In Hunden wurde durch den teilweisen Verschluss eines Koronargefäßes die Arteriogenese im Herz induziert. Die intrakoronare Applikation von VEGF-A erhöhte den Blutfluss in den Kollateralen innerhalb von 28 Tagen um 40%.²⁰⁷ Allerdings wurde in dieser Studie nur der Blutfluss durch die Kollateralen untersucht und nicht die morphologischen Veränderungen der Kollateralen. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Behandlung mit VEGF das Wachstum der Kollateralen in Kaninchen im Vergleich zu unbehandelten Kaninchen nicht verbessert.⁴⁷ Die Blockierung des VEGFR-2⁸⁵ und die Behandlung mit einem anti-VEGF Antikörper⁸⁶ schränkten jeweils die Arteriogenese in Mäusen signifikant ein. Diese Studien belegen, dass der VEGF-Signalweg wichtig für die Arteriogenese ist, aber zusätzliches VEGF die Arteriogenese nicht verbessert.

Durch die Behandlung mit rekombinantem murinen VEGF-A164 (rmVEGF) wurde die Durchblutung und das Wachstum der Kollateralen nach Ligatur in MK-/- Mäusen wiederhergestellt. Im Einklang mit vorherigen Studien⁴⁷ hatte die Behandlung mit rmVEGF keinen positiven Effekt auf das Wachstum der Kollateralen in WT Mäusen. Folglich zeigen diese Ergebnisse, dass der durch Midkine vermittelte Anstieg des VEGF-A Spiegels im

Plasma ausreicht um die Arteriogenese unter normalen physiologischen Bedingungen zu fördern.

In vitro wurde durch die Behandlung mit rmVEGF die Proliferation der Endothelzellen aus MK-/- Mäusen komplett normalisiert. Anders als bei der Behandlung mit DETA NONOate beziehungsweise rmMK wurde kein Unterschied mehr zwischen WT und MK-/- Zellen beobachtet. *In vivo* wurde durch die Behandlung mit rmVEGF die Expression der eNOS und nNOS in MK-/- Mäusen signifikant gesteigert. In WT Mäusen hatte die Behandlung keinen Einfluss auf die Expression der eNOS und nNOS. Die Expression der iNOS wurde durch rmVEGF in beiden Gruppen nur leicht gesteigert.

Diese Ergebnisse belegen, dass rmVEGF die Expression der NO-Synthasen wiederherstellt, wenigstens ein basaler Spiegel von VEGF für die Proliferation von Endothelzellen nötig ist und bestätigen die essentielle Funktion der NO-Synthasen bei der Proliferation von Endothelzellen. Diese Annahmen werden durch die Ergebnisse der Behandlung von MK-/- Mäusen mit DETA NONOate bestätigt. In MK-/- Mäusen, welche nach Ligatur nur basale VEGF Spiegel vorweisen, wurde die Proliferation der Endothelzellen durch die Behandlung mit DETA NONOate wieder komplett hergestellt. Der VEGF-A Spiegel im Plasma nach Ligatur wurde durch die Behandlung mit DETA NONOate aber nicht beeinflusst. In WT Mäusen hatte die Behandlung rmVEGF keinen Einfluss auf die Arteriogenese, da es die Expression der eNOS und nNOS nicht weiter steigerte und erhöhte VEGF Level die Arteriogenese nicht fördern⁴⁷.

Durch die kombinierte Behandlung von Endothelzellen *in vitro* mit rmVEGF und dem spezifischen VEGFR-2 Inhibitor SU1498, wurde der positive Effekt von rmVEGF wieder aufgehoben. Folglich stimuliert rmVEGF die Endothelzellproliferation über den VEGFR-2. Interessanterweise wurde durch alleinige Inhibierung des VEGFR-2 mit SU1498 die Proliferation von WT Endothelzellen vermindert, nicht aber die Proliferation von MK-/- Endothelzellen. Daraus folgt, dass Midkine in WT Endothelzellen die Proliferation über den VEGFR-2 steigert. Zuvor wurde beschrieben, dass SH-PTP1 (SH2-containing protein-tyrosine phosphatase) zur Dephosphorylierung und Inaktivierung des VEGFR-2 führt.¹¹⁵ NO, produziert durch die eNOS, senkt jedoch die Aktivität von SH-PTP1 und steigert somit die Aktivität von VEGFR-2. Die Ergebnisse dieses Projektes zeigten, dass Midkine die Expression der eNOS induziert. Möglicherweise steigert Midkine in Endothelzellen über die Expression der eNOS die Aktivität des VEGFR-2. In MK-/- Endothelzellen fehlt die zusätzliche Aktivierung des VEGFR-2 durch die eNOS, da die Expression der eNOS reduziert ist. Es wird äußerst interessant sein, in zukünftigen Studien zu sehen, ob die Aktivität des VEGFR-2 in MK-/- Endothelzellen tatsächlich reduziert ist und ob die Aktivität

des VEGFR-2 durch Behandlung mit DETA NONOate, Midkine oder VEGF gesteigert werden kann.

Es ist bekannt, dass VEGF über den VEGFR-2 die Expression der eNOS induziert und dadurch die Aktivität des Rezeptors zusätzlich verstärkt.¹¹⁵ Dies belegen auch die Ergebnisse dieses Projektes. Midkine ist verantwortlich für erhöhte Plasmaspiegel von VEGF-A während der Arteriogenese, welche wiederum für die Aktivierung von VEGFR-2 und die Expression der eNOS und nNOS in Endothelzellen von wachsenden Kollateralen relevant sind. Die Aktivierung des VEGFR-2 induziert die Proliferation von Endothelzellen in Kollateralen. *In vitro* Daten von Tzima et al. identifizierten den VEGFR-2 als Teil eines mechanosensorischen Komplexes in Endothelzellen.⁹⁶ Weiterhin wurde gezeigt, dass der VEGFR-2 unabhängig von der Bindung des Liganden VEGF durch Schubspannung aktiviert wird. Im Gegensatz dazu belegt dieses Projekt, dass die Proliferation von Endothelzellen nach Ligatur abhängig von VEGF ist. Nur durch die Behandlung mit rmVEGF konnte die Proliferation der MK-/- Endothelzellen normalisiert werden.

5.3 Fazit

Zusammengefasst belegen die Ergebnisse dieses Projektes eindrücklich die funktionale Rolle von Midkine bei der Arteriogenese. Nach Ligatur der A. femoralis kommt es durch erhöhten FSS zur Aktivierung von Endothelzellen in den Kollateralen (Abb. 35). Erhöhter FSS aktiviert CXCL1, welches die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten fördert und vermutlich die Expression von Midkine und VEGF-A in neutrophilen Granulozyten steigert. Die Ergebnisse der Knochenmarkstransplantationen zeigen, dass Midkine aus Knochenmarkszellen wichtig für das Wachstum der Kollateralen ist, während Midkine aus Nicht-Knochenmarkszellen, wie zum Beispiel Endothelzellen, die Durchblutung nach Ligatur nur durch vermehrte Vasodilatation beeinflusst.

24 Stunden nach Ligatur stellen neutrophile Granulozyten VEGF-A und Midkine für das Wachstum der Kollateralen bereit. Dabei ist der VEGF-A Spiegel im Plasma abhängig von Midkine. VEGF-A bindet an den VEGFR-2 und induziert darüber die Proliferation von Endothelzellen, sowie die Expression der eNOS und nNOS. Weiterhin beweist dieses Projekt, dass die Expression der eNOS und nNOS essentiell für die Proliferation von Endothelzellen ist. Die Expression der eNOS und nNOS in Kollateralen wird von Midkine reguliert. Dies geschieht entweder direkt über die PI3K, möglicherweise durch intrazelluläres Midkine oder exogenes Midkine welches vermutlich an ALK bindet, oder indirekt über die erhöhte Verfügbarkeit von VEGF-A.

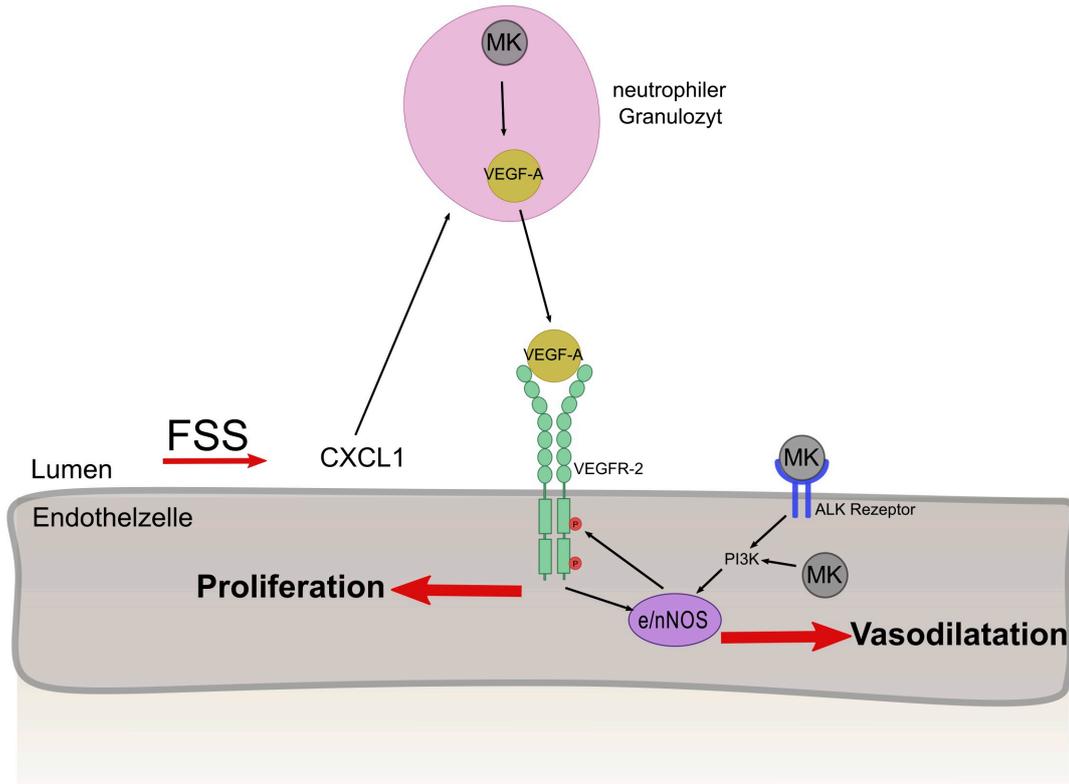


Abbildung 35: Vorgeschlagenes Modell zur Funktion von Midkine bei der Arteriogenese

Nach Ligatur induziert erhöhter FSS in Kollateralen die Expression von CXCL1, welches wiederum zur Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führt. Neutrophile Granulozyten sind eine Quelle von Midkine und VEGF-A. Der VEGF-A Spiegel im Plasma ist abhängig von Midkine. VEGF-A bindet an den VEGFR-2, fördert darüber die Proliferation der Endothelzellen und steigert die Expression der eNOS und nNOS. Midkine beeinflusst die Expression der eNOS und nNOS entweder direkt (eventuell über ALK und PI3K) oder indirekt über erhöhte VEGF-A Spiegel.

Sowohl, die Behandlung mit rmMK, als auch die Behandlung mit DETA NONOate oder rmVEGF haben keinen positiven Effekt auf das Wachstum von Kollateralen in WT Mäusen, da bereits basale Level von VEGF-A, sowie eNOS und nNOS, für die Arteriogenese ausreichend sind. Die verbesserte Durchblutung in WT Mäusen nach Behandlung mit rmMK beruht vermutlich auf gesteigerter Vasodilatation durch vermehrte Expression der NO-Synthasen.

Zu späteren Zeitpunkten der Arteriogenese (3 Tage und 7 Tage nach Ligatur), spielen nicht mehr neutrophile Granulozyten, sondern Monozyten die entscheidende Rolle beim Wachstum der Kollateralen²⁰⁸. Obwohl es in dem vorliegenden Projekt nicht untersucht wurde, ist es wahrscheinlich, dass VEGF-A und Midkine zu diesen Zeitpunkten von dieser Art von Leukozyten bereitgestellt werden, da auch Monozyten eine Quelle für Midkine²⁰⁹ und VEGF-A²¹⁰ sind.

5.4 Klinische Relevanz und Ausblick

Wie zuvor beschrieben hat die Arteriogenese eine große klinische Relevanz. Ziel der Forschung ist es Mechanismen zu entdecken, mit denen die Arteriogenese gezielt verstärkt und damit das Überleben von Herz-Kreislauf-Erkrankungen verbessert werden kann. Allerdings muss die systemische Gabe möglicher Stoffe immer kritisch betrachtet werden, da die viele Stoffe auch ungewünschte vaskuläre Prozesse wie die Tumorangiogenese oder die diabetische Retinopathie verstärken können.

Die Ergebnisse dieses Projektes zeigten eindeutig, dass Midkine aus neutrophilen Granulozyten wichtig für das Wachstum von Kollateralen ist. Midkine induziert die Expression der eNOS und nNOS in Kollateralen und beeinflusst den Anstieg des VEGF-A Spiegels im Plasma nach Ligatur. Die Proliferation von Endothelzellen ist abhängig von der Expression der eNOS und nNOS, wobei beide Isoformen wahrscheinlich in der Lage sind sich gegenseitig zu ersetzen. Der erhöhte VEGF-A Spiegel nach Ligatur ist notwendig und ausreichend für die Hochregulierung der eNOS und nNOS Expression in wachsenden Kollateralen und für das effektive Wachstum von Kollateralen. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse, dass die Behandlung mit Midkine, DETA NONOate und VEGF-A keinen Effekt auf das Wachstum der Kollateralen in WT Mäusen hat. Exogenes Midkine verbessert die Durchblutung nur durch verstärkte Vasodilatation. Folglich ist eine Behandlung mit Midkine bei Patienten mit normalem Midkine Spiegel nicht sinnvoll. Nur Patienten mit verminderten Midkine Spiegeln würden von der Behandlung profitieren. Zukünftige Studien könnten die Zusammenhänge zwischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Midkine Spiegeln analysieren. Eventuell haben Patienten mit einem geringeren Midkine Spiegel eine schlechtere Prognose der Herz-Kreislauf-Erkrankungen, da die Arteriogenese eingeschränkt ist. Diese Patienten könnten von einer Therapie mit Midkine profitieren.

Allerdings sprechen zwei Gründe gegen die systemische Behandlung mit Midkine. Wie zuvor beschrieben, fördert Midkine die Angiogenese, ein Vorgang, der bei vielen Erkrankungen das „Outcome“ verschlechtert und dementsprechend versucht wird zu unterdrücken. Besonders in Patienten mit Tumorerkrankungen hätte die vermehrte Tumorangiogenese verheerende Folgen. In Patientinnen mit Brustkrebs war die erhöhte Expression von Midkine ein Indikator für schlechteres Überleben der Erkrankung.¹⁵⁶ In oralen Plattenepithelkarzinomen korrelierte die Midkine Expression im Tumorgewebe mit der Tumorgroße, dem klinischen Stadium und der Prognose der Erkrankung.¹⁵⁸ Dabei wurde eine hohe Midkine Expression mit einer verstärkten Tumorangiogenese assoziiert. Dementsprechend würde die Behandlung mit Midkine die Tumorangiogenese fördern und damit das Überleben der Krankheit verschlechtern. Auch bei Erkrankung wie der proliferativen diabetischen Retinopathie ist eine verstärkte Angiogenese unerwünscht. Es

wurde bereits gezeigt, dass Pleiotrophin, dessen Sequenz zu 50% mit Midkine übereinstimmt¹²⁶, durch vermehrte Angiogenese und Proliferation von Endothelzellen die proliferative diabetische Retinopathie negativ beeinflusst.²¹¹ Der zweite Grund, der gegen die systemische Gabe von Midkine spricht, ist die Extravasation von Leukozyten durch Midkine. In Patienten mit rheumatoider Arthritis wurden erhöhte Midkine Spiegel nachgewiesen.¹⁷⁰ In Mäusen führte die Behandlung mit Midkine zur vermehrten Auswanderung von Leukozyten und damit zu einer Verschlechterung der rheumatoiden Arthritis.¹⁷⁰

Obwohl diese beiden Gründe die systemische Gabe von Midkine zunächst ausschließen, wurden in diesem Projekt zwei wichtige Entdeckungen gemacht. Erstens reguliert Midkine die Expression der eNOS und nNOS. Durch die Behandlung mit rmMK konnte die Vasodilatation in WT Mäusen verbessert werden. Patienten mit pektanginösen Beschwerden werden mit NO-Donatoren behandelt, um durch vermehrte Vasodilatation der Koronargefäße die Symptome zu lindern.²¹² Bei einem längeren Behandlungszeitraum entwickelt der Körper jedoch eine sogenannte Nitratoleranz und die NO-Donatoren verlieren ihre Wirkung.¹⁹² Bei regelmäßiger (alle 6 Stunden), oraler Einnahme des NO-Donors Isosorbiddinitrat, tritt der Wirkverlust innerhalb von 45 Stunden auf.¹⁹³ Dieser Wirkverlust lässt sich erst durch eine Behandlungspause von mindestens 12 Stunden wieder aufheben. Midkine steigert die Expression der NO-Synthasen und setzt selber nicht NO frei. Folglich könnte Midkine als Alternative zu bestehenden NO-Donatoren bei Patienten mit pektanginösen Beschwerden verwendet werden, da der Körper keine Toleranz gegenüber Midkine entwickelt und die gefäßerweiternde Wirkung längerfristig erhalten bleibt.

Zweitens wurde in diesem Projekt gezeigt, dass der VEGF Spiegel im Plasma nach Ligatur abhängig von Midkine ist. In einer Vielzahl von Studien wurde untersucht, ob durch die Gabe von VEGF das Ausmaß der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) verbessert werden kann.²¹³ Erste Studien zeigten, dass durch die intramuskuläre Injektion von DNA Plasmiden, welche für die humane Isoform VEGF165 kodieren, die Perfusion der Unterschenkel von Patienten mit pAVK im Endstadium verbessert wird, jedoch als Komplikation vermehrt periphere Ödeme in den Unterschenkeln auftreten.²¹⁴ Histologische Untersuchungen von amputierten Beinen belegten, dass die Behandlung lediglich zu einer vermehrten Bildung von Kapillarknäulen im Unterschenkel führt.²¹⁴ Dieses Projekt zeigt erstmals, warum die Behandlung mit VEGF keinen Einfluss auf die Arteriogenese hat. Der endogene VEGF Spiegel im Plasma ist ausreichend für die Proliferation von Endothelzellen und damit das Wachstum von Kollateralen.

Zusammengefasst müssen die genauen Wirkmechanismen von Midkine weiter erforscht werden, bevor eine therapeutische Anwendung von Midkine bei Patienten möglich ist. Insbesondere die systemische Gabe ist durch die Verstärkung der Angiogenese und Extravasation von Leukozyten kritisch zu betrachten. Eine Studie, die den Zusammenhang zwischen dem Midkine Spiegel in Patienten, dem „Outcome“ von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und der Ausbildung von Kollateralkreisläufen analysiert, wäre äußerst interessant. Falls niedrige Midkine Spiegel mit weniger Kollateralkreisläufen und schlechterem „Outcome“ im Zusammenhang stehen, könnten Patienten mit einem niedrigen Midkine Spiegel von der Behandlung mit Midkine profitieren. Außerdem induziert Midkine die Expression der eNOS und nNOS und könnte daher als langanhaltender Vasodilator eingesetzt werden, da es nicht zur Ausbildung einer Nitratoleranz, wie bei herkömmlichen NO-Donatoren, kommen würde.

6 Zusammenfassung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen und deren Folgen sind die häufigsten Todesursachen weltweit. Bei einem Teil des Patientenkollektivs kann trotz intensiver medikamentöser, interventioneller und chirurgischer Therapieoptionen, das Fortschreiten der chronischen Ischämie von Herz und peripherer Muskulatur nicht verhindert werden. Eine vielversprechende Therapieoption, besonders bei Patienten, die nicht revaskularisiert werden können, ist das Wachstum von natürlichen Bypässen (Arteriogenese). Wichtige Schritte dieses Prozesses sind die Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen, sowie die Extravasation von Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe. Leukozyten sind essentiell für die Arteriogenese, weil sie das Gewebe mit Wachstumsfaktoren und Zytokinen versorgen. Da durch zahlreiche Studien bekannt ist, dass der Heparin-bindende Wachstumsfaktor Midkine unter anderem für genau diese Prozesse wichtig ist, war das Ziel dieser Arbeit, die funktionale Rolle von Midkine bei der Arteriogenese zu analysieren. Weiter galt es, den Zusammenhang zwischen Midkine, Stickstoffmonoxid-Synthasen und der Proliferation von Endothelzellen zu untersuchen.

In einem Modell der peripheren Arteriogenese zeigten Midkine defizienten (MK^{-/-}) Mäuse eine reduzierte Durchblutung der Pfoten und vermindertes Wachstum der Kollateralen nach Ligatur der Femoralarterie im Vergleich zu Kontrollmäusen. Hierbei stellte sich heraus, dass Midkine aus Leukozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten, essentiell für die Proliferation von Endothelzellen in Kollateralen ist. Während der Arteriogenese kontrolliert Midkine den Spiegel des „Vascular Endothelial Growth Factor A“ (VEGF-A) im Plasma und die Expression der endothelialen (eNOS) und neuronalen (nNOS) Stickstoffmonoxid-Synthasen. Die Versuche zeigten, dass die eNOS und nNOS für die Proliferation von Endothelzellen unerlässlich sind, wobei beide Isoformen wahrscheinlich in der Lage sind, sich gegenseitig zu ersetzen. Erhöhte VEGF-A Spiegel im Plasma, die bei der Induktion der Arteriogenese beobachtet wurden, sind notwendig und ausreichend für die Hochregulierung der eNOS und nNOS Expression in wachsenden Kollateralen. Außerdem genügt der erhöhte VEGF-A Spiegel im Plasma nach Ligatur für das Wachstum der Kollateralen und zusätzliche Gabe von VEGF-A fördert die Arteriogenese nicht. Die Behandlung mit Midkine, DETA NONOate und VEGF-A stellte die Arteriogenese in MK^{-/-} Mäusen wieder her und hatte keinen Einfluss auf die Arteriogenese in Kontrollmäusen. *In vitro* Experimente belegten den Einfluss von eNOS und nNOS, sowie VEGF-A, auf die Proliferation von Endothelzellen und den Zusammenhang mit Midkine.

Insgesamt belegt dieses Projekt deutlich, dass Midkine sehr wichtig für die Arteriogenese ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass nach Ligatur der A. femoralis erhöhte Schubspannung in Kollateralen die Endothelzellen aktiviert und den Chemokin (CXC-Motiv) -Ligand 1 (CXCL1) induziert. Möglicherweise induziert CXCL1 die Expression von

Midkine in neutrophilen Granulozyten und steigert darüber die Expression und Freisetzung von VEGF-A aus neutrophilen Granulozyten. VEGF-A bindet an den VEGFR-2 und induziert darüber die Proliferation von Endothelzellen. Die Expression der eNOS und nNOS ist essentiell für die Proliferation von Endothelzellen und wird von Midkine, entweder direkt über ALK und PI3K oder indirekt über VEGF-A, reguliert. Nichtsdestotrotz verbessert exogenes Midkine das Wachstum vom Kollateralen in Kontrollmäusen nicht und die therapeutische Anwendung zur Förderung der Arteriogenese bleibt fraglich. Allerdings zeigt dieses Projekt, dass Midkine als möglicher Vasodilator in Frage kommt. Im Gegensatz zu herkömmlichen NO-Donatoren, welche NO direkt freisetzen, reguliert Midkine die Expression der eNOS und nNOS und unterliegt damit nicht der Nitrattoleranz wie herkömmliche NO-Donatoren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit exogenem VEGF keinen Einfluss auf die Arteriogenese hat, da bereits endogene VEGF-A Spiegel im Plasma für das adäquate Wachstum der Kollateralen ausreichen.

7 Literaturverzeichnis

1. Organization, W.H. *Global status report on noncommunicable diseases 2014*, (World Health Organization, 2014).
2. Organization, W.H. *Global health estimates: Deaths by cause, age, sex and country, 2000-2012*. Geneva, WHO **9**(2014).
3. Organization, W.H. *Projections of mortality and causes of death, 2015 and 2030*. Geneva: World Health Organization (2014).
4. Mathers, C.D. & Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* **3**, e442 (2006).
5. Cox, G.S., *et al.* Nonoperative treatment of superficial femoral artery disease: long-term follow-up. *J Vasc Surg* **17**, 172-181; discussion 181-172 (1993).
6. Gupta, A., Burke, J. & Bove, A. Coronary artery revascularization: past, present, future: part II--newer technologies. *Clin Cardiol* **29**, 341-344 (2006).
7. Hunt, S.A. Taking heart--cardiac transplantation past, present, and future. *N Engl J Med* **355**, 231-235 (2006).
8. Seiler, C. The human coronary collateral circulation. *Heart* **89**, 1352-1357 (2003).
9. Fulton, W.F. ANASTOMOTIC ENLARGEMENT AND ISCHAEMIC MYOCARDIAL DAMAGE. *Br Heart J* **26**, 1-15 (1964).
10. Zoll, P.M., Wessler, S. & Schlesinger, M.J. Interarterial coronary anastomoses in the human heart, with particular reference to anemia and relative cardiac anoxia. *Circulation* **4**, 797-815 (1951).
11. Schaper, W. & Buschmann, I. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc Res* **43**, 835-837 (1999).
12. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674 (1997).
13. Asahara, T., *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967 (1997).
14. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**, 389-395 (2000).
15. Ribatti, D., Vacca, A., Nico, B., Roncali, L. & Dammacco, F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev* **100**, 157-163 (2001).
16. Liu, W., *et al.* A meta-analysis of the impact of EPC capture stent on the clinical outcomes in patients with coronary artery disease. *J Interv Cardiol* **26**, 228-238 (2013).
17. Tonnesen, M.G., Feng, X. & Clark, R.A. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* **5**, 40-46 (2000).
18. Folkman, J. The vascularization of tumors. *Sci Am* **234**, 58-64, 70-53 (1976).
19. Hayashi, T., Abe, K. & Itoyama, Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 887-895 (1998).
20. Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M. & Wang, G.L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **269**, 23757-23763 (1994).
21. Iyer, N.V., *et al.* Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* **12**, 149-162 (1998).
22. Shibuya, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer* **2**, 1097-1105 (2011).
23. Conway, E.M., Collen, D. & Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* **49**, 507-521 (2001).
24. Kutryk, M.J. & Stewart, D.J. Angiogenesis of the heart. *Microsc Res Tech* **60**, 138-158 (2003).
25. Stamenkovic, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* **200**, 448-464 (2003).
26. Clauss, M., *et al.* The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem* **271**, 17629-17634 (1996).
27. Petrova, T.V., Makinen, T. & Alitalo, K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* **253**, 117-130 (1999).
28. Zhang, L., *et al.* VEGFR-3 ligand-binding and kinase activity are required for lymphangiogenesis but not for angiogenesis. *Cell Res* **20**, 1319-1331 (2010).

29. Shibuya, M. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* **312**, 549-560 (2006).
30. Ferrara, N. & Kerbel, R.S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**, 967-974 (2005).
31. Maes, C., *et al.* Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev* **111**, 61-73 (2002).
32. Palmer, L.A., Semenza, G.L., Stoler, M.H. & Johns, R.A. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* **274**, L212-219 (1998).
33. Michaelis, M., *et al.* Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol* **65**, 520-527 (2004).
34. Fukumura, D., *et al.* Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2604-2609 (2001).
35. van Royen, N., *et al.* Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res* **49**, 543-553 (2001).
36. Pipp, F., *et al.* Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1664-1668 (2004).
37. Beck, L., Jr. & D'Amore, P.A. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* **11**, 365-373 (1997).
38. Folkman, J. & D'Amore, P.A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* **87**, 1153-1155 (1996).
39. Schaper, W. & Scholz, D. Growth and Remodeling of Coronary Collateral Vessels. in *Arterial Remodeling: A Critical Factor in Restenosis*, Vol. 198 (eds. Lafont, A. & Topol, E.) 31-48 (Springer US, 1997).
40. van Royen, N., Piek, J.J., Schaper, W. & Fulton, W.F. A critical review of clinical arteriogenesis research. *J Am Coll Cardiol* **55**, 17-25 (2009).
41. Fulton, W.F. Chronic generalized myocardial ischaemia with advanced coronary artery disease. *Br Heart J* **18**, 341-354 (1956).
42. Williams, D.O., Amsterdam, E.A., Miller, R.R. & Mason, D.T. Functional significance of coronary collateral vessels in patients with acute myocardial infarction: relation to pump performance, cardiogenic shock and survival. *Am J Cardiol* **37**, 345-351 (1976).
43. Schwartz, H., *et al.* Temporal evolution of the human coronary collateral circulation after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **4**, 1088-1093 (1984).
44. Fanou, E.M. & Knight, J. Effect of Collaterals on Clinical Presentation, Baseline Imaging, Complications, and Outcome in Acute Stroke. **36**, 2285-2291 (2015).
45. Cai, W. & Schaper, W. Mechanisms of arteriogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**, 681-692 (2008).
46. Schaper, W. & Scholz, D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1143-1151 (2003).
47. Deindl, E., *et al.* Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res* **89**, 779-786 (2001).
48. Carmeliet, P., *et al.* Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* **394**, 485-490 (1998).
49. Eitenmuller, I., *et al.* The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res* **99**, 656-662 (2006).
50. Scholz, D., *et al.* Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* **436**, 257-270 (2000).
51. Tronc, F., *et al.* Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, E120-126 (2000).
52. Southgate, K.M., Mehta, D., Izzat, M.B., Newby, A.C. & Angelini, G.D. Increased secretion of basement membrane-degrading metalloproteinases in pig saphenous vein into carotid artery interposition grafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1640-1649 (1999).
53. Moraes, F., *et al.* Endothelial cell-dependent regulation of arteriogenesis. *Circ Res* **113**, 1076-1086 (2013).
54. Lou, X., Yano, H., Lee, F., Chao, M.V. & Farquhar, M.G. GIPC and GAIP form a complex with TrkA: a putative link between G protein and receptor tyrosine kinase pathways. *Mol Biol Cell* **12**, 615-627 (2001).

55. Cai, H. & Reed, R.R. Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J Neurosci* **19**, 6519-6527 (1999).
56. Vera, C., Tapia, V., Vega, M. & Romero, C. Role of nerve growth factor and its TRKA receptor in normal ovarian and epithelial ovarian cancer angiogenesis. *J Ovarian Res* **7**, 82 (2014).
57. Kofler, N.M. & Simons, M. Angiogenesis versus arteriogenesis: neuropilin 1 modulation of VEGF signaling. *F1000Prime Rep* **7**, 26 (2015).
58. Schaper, J., König, R., Franz, D. & Schaper, W. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **370**, 193-205 (1976).
59. Shyy, Y.J., Hsieh, H.J., Usami, S. & Chien, S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4678-4682 (1994).
60. Wang, D.L., *et al.* Mechanical strain induces monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells. Effects of mechanical strain on monocyte adhesion to endothelial cells. *Circ Res* **77**, 294-302 (1995).
61. Ito, W.D., *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* **80**, 829-837 (1997).
62. Meisner, J.K. & Price, R.J. Spatial and temporal coordination of bone marrow-derived cell activity during arteriogenesis: regulation of the endogenous response and therapeutic implications. *Microcirculation* **17**, 583-599 (2010).
63. Behm, C.Z., *et al.* Molecular imaging of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression and inflammatory cell recruitment during vasculogenesis and ischemia-mediated arteriogenesis. *Circulation* **117**, 2902-2911 (2008).
64. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**, 678-689 (2007).
65. Hagiwara, H., Mitsumata, M., Yamane, T., Jin, X. & Yoshida, Y. Laminar shear stress-induced GRO mRNA and protein expression in endothelial cells. *Circulation* **98**, 2584-2590 (1998).
66. Vries, M.H., *et al.* CXCL1 promotes arteriogenesis through enhanced monocyte recruitment into the peri-collateral space. *Angiogenesis* **18**, 163-171 (2015).
67. Soehnlein, O., *et al.* Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* **112**, 1461-1471 (2008).
68. Ohki, Y., *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *Faseb j* **19**, 2005-2007 (2005).
69. Deindl, E., *et al.* G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *Faseb j* **20**, 956-958 (2006).
70. Hofer, I.E., *et al.* Leukocyte subpopulations and arteriogenesis: specific role of monocytes, lymphocytes and granulocytes. *Atherosclerosis* **181**, 285-293 (2005).
71. Chillo, O., *et al.* Perivascular Mast Cells Govern Shear Stress-Induced Arteriogenesis by Orchestrating Leukocyte Function. *Cell Rep* **16**, 2197-2207 (2016).
72. Lee, C.W., *et al.* Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice: insights into the genomic program for collateral vessel development. *J Am Coll Cardiol* **43**, 474-482 (2004).
73. Capoccia, B.J., Gregory, A.D. & Link, D.C. Recruitment of the inflammatory subset of monocytes to sites of ischemia induces angiogenesis in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent fashion. *J Leukoc Biol* **84**, 760-768 (2008).
74. Arras, M., *et al.* Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* **101**, 40-50 (1998).
75. Khmelevski, E., Becker, A., Meinertz, T. & Ito, W.D. Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation. *Circ Res* **95**, E56-64 (2004).
76. Tyagi, S.C., Kumar, S., Cassatt, S. & Parker, J.L. Temporal expression of extracellular matrix metalloproteinases and tissue plasminogen activator in the development of collateral vessels in the canine model of coronary occlusion. *Can J Physiol Pharmacol* **74**, 983-995 (1996).

77. Deindl, E., *et al.* Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res* **92**, 561-568 (2003).
78. Heil, M., *et al.* Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H2411-2419 (2002).
79. Hoefer, I.E., *et al.* Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. *Circulation* **105**, 1639-1641 (2002).
80. Grundmann, S., *et al.* Anti-tumor necrosis factor- α therapies attenuate adaptive arteriogenesis in the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H1497-1505 (2005).
81. Wolf, C., *et al.* Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 2291-2305 (1998).
82. Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E. & Abraham, S.N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**, 77-80 (1996).
83. Stabile, E., *et al.* Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* **108**, 205-210 (2003).
84. Jazwa, A., *et al.* Limb ischemia and vessel regeneration: Is there a role for VEGF? *Vascul Pharmacol* **86**, 18-30 (2016).
85. Lloyd, P.G., Prior, B.M., Li, H., Yang, H.T. & Terjung, R.L. VEGF receptor antagonism blocks arteriogenesis, but only partially inhibits angiogenesis, in skeletal muscle of exercise-trained rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H759-768 (2005).
86. Toyota, E., *et al.* Vascular endothelial growth factor is required for coronary collateral growth in the rat. *Circulation* **112**, 2108-2113 (2005).
87. Adams, R.H. & Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 464-478 (2007).
88. Eichmann, A. & Simons, M. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* **24**, 188-193 (2012).
89. Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* **437**, 169-183 (2011).
90. Gerber, H.P., *et al.* Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* **273**, 30336-30343 (1998).
91. Bazzoni, G. & Dejana, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* **84**, 869-901 (2004).
92. Lanahan, A.A., *et al.* VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Dev Cell* **18**, 713-724 (2010).
93. Wheeler-Jones, C., *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett* **420**, 28-32 (1997).
94. Ren, B., *et al.* ERK1/2-Akt1 crosstalk regulates arteriogenesis in mice and zebrafish. *J Clin Invest* **120**, 1217-1228 (2010).
95. Lanahan, A., *et al.* The neuropilin 1 cytoplasmic domain is required for VEGF-A-dependent arteriogenesis. *Dev Cell* **25**, 156-168 (2013).
96. Tzima, E., *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**, 426-431 (2005).
97. Kroll, J. & Waltenberger, J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 743-746 (1998).
98. Dulak, J., *et al.* Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 659-666 (2000).
99. Knowles, R.G. & Moncada, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298** (Pt 2), 249-258 (1994).
100. Denninger, J.W. & Marletta, M.A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* **1411**, 334-350 (1999).
101. Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* **27**, 2783-2802 (2008).
102. Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Mastroeni, P., Ischiropoulos, H. & Fang, F.C. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med* **192**, 227-236 (2000).

103. Garg, U.C. & Hassid, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **83**, 1774-1777 (1989).
104. Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4651-4655 (1991).
105. Cui, X., *et al.* Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice. *Neuroscience* **159**, 744-750 (2009).
106. Troidl, K., *et al.* Effects of endogenous nitric oxide and of DETA NONOate in arteriogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* **55**, 153-160 (2010).
107. Mees, B., *et al.* Endothelial nitric oxide synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1926-1933 (2007).
108. Pagel, J.I., *et al.* Involvement of neuronal NO synthase in collateral artery growth. *Indian J Biochem Biophys* **48**, 270-274 (2011).
109. Aoki, T., *et al.* Complementary inhibition of cerebral aneurysm formation by eNOS and nNOS. *Lab Invest* **91**, 619-626 (2011).
110. Capettini, L.S., Cortes, S.F. & Lemos, V.S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *Eur J Pharmacol* **643**, 260-266 (2010).
111. Costa, E.D., Rezende, B.A., Cortes, S.F. & Lemos, V.S. Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front Physiol* **7**, 206 (2016).
112. Li, H., Wallerath, T., Munzel, T. & Forstermann, U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide* **7**, 149-164 (2002).
113. Oshikawa, J., *et al.* Extracellular SOD-derived H₂O₂ promotes VEGF signaling in caveolae/lipid rafts and post-ischemic angiogenesis in mice. *PLoS One* **5**, e10189 (2010).
114. Li, J., Wang, J.J. & Zhang, S.X. NADPH oxidase 4-derived H₂O₂ promotes aberrant retinal neovascularization via activation of VEGF receptor 2 pathway in oxygen-induced retinopathy. *J Diabetes Res* **2015**, 963289 (2015).
115. Cai, J., Jiang, W.G., Ahmed, A. & Boulton, M. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation is regulated by interaction between VEGFR-2, SH-PTP1 and eNOS. *Microvasc Res* **71**, 20-31 (2006).
116. Limbourg, A., *et al.* Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* **4**, 1737-1746 (2009).
117. Kadomatsu, K., Tomomura, M. & Muramatsu, T. cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **151**, 1312-1318 (1988).
118. Kadomatsu, K., Huang, R.P., Suganuma, T., Murata, F. & Muramatsu, T. A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *J Cell Biol* **110**, 607-616 (1990).
119. Uehara, K., Matsubara, S., Kadomatsu, K., Tsutsui, J. & Muramatsu, T. Genomic structure of human midkine (MK), a retinoic acid-responsive growth/differentiation factor. *J Biochem* **111**, 563-567 (1992).
120. Tsutsui, J., Uehara, K., Kadomatsu, K., Matsubara, S. & Muramatsu, T. A new family of heparin-binding factors: strong conservation of midkine (MK) sequences between the human and the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* **176**, 792-797 (1991).
121. Kaname, T., *et al.* Midkine gene (MDK), a gene for prenatal differentiation and neuroregulation, maps to band 11p11.2 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **17**, 514-515 (1993).
122. Simon-Chazottes, D., Matsubara, S., Miyauchi, T., Muramatsu, T. & Guenet, J.L. Chromosomal localization of two cell surface-associated molecules of potential importance in development: midkine (Mdk) and basigin (Bsg). *Mamm Genome* **2**, 269-271 (1992).
123. Matsubara, S., Take, M., Pedraza, C. & Muramatsu, T. Mapping and characterization of a retinoic acid-responsive enhancer of midkine, a novel heparin-binding growth/differentiation factor with neurotrophic activity. *J Biochem* **115**, 1088-1096 (1994).

124. Reynolds, P.R., Mucenski, M.L., Le Cras, T.D., Nichols, W.C. & Whitsett, J.A. Midkine is regulated by hypoxia and causes pulmonary vascular remodeling. *J Biol Chem* **279**, 37124-37132 (2004).
125. Zhang, N. & Deuel, T.F. Pleiotrophin and midkine, a family of mitogenic and angiogenic heparin-binding growth and differentiation factors. *Curr Opin Hematol* **6**, 44-50 (1999).
126. Li, Y.S., et al. Cloning and expression of a developmentally regulated protein that induces mitogenic and neurite outgrowth activity. *Science* **250**, 1690-1694 (1990).
127. Deuel, T.F., Zhang, N., Yeh, H.J., Silos-Santiago, I. & Wang, Z.Y. Pleiotrophin: a cytokine with diverse functions and a novel signaling pathway. *Arch Biochem Biophys* **397**, 162-171 (2002).
128. Rauvala, H. An 18-kd heparin-binding protein of developing brain that is distinct from fibroblast growth factors. *EMBO J* **8**, 2933-2941 (1989).
129. Weckbach, L.T., Muramatsu, T. & Walzog, B. Midkine in inflammation. *ScientificWorldJournal* **11**, 2491-2505 (2011).
130. Sakamoto, K. & Kadomatsu, K. Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation. *Pathol Int* **62**, 445-455 (2012).
131. Muramatsu, T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**, 410-425 (2010).
132. Muramatsu, H., et al. alpha4beta1- and alpha6beta1-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor. *J Cell Sci* **117**, 5405-5415 (2004).
133. Huang, Y., Sook-Kim, M. & Ratovitski, E. Midkine promotes tetraspanin-integrin interaction and induces FAK-Stat1alpha pathway contributing to migration/invasiveness of human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 474-478 (2008).
134. Weckbach, L.T., et al. The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via beta2 integrins (CD11/CD18). *Blood* **123**, 1887-1896 (2014).
135. Lee, S.H., et al. Midkine prevented hypoxic injury of mouse embryonic stem cells through activation of Akt and HIF-1alpha via low-density lipoprotein receptor-related protein-1. *J Cell Physiol* **227**, 1731-1739 (2012).
136. Muramatsu, H., et al. LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 936-941 (2000).
137. Maeda, N., et al. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *J Biol Chem* **274**, 12474-12479 (1999).
138. Qi, M., et al. Haptotactic migration induced by midkine. Involvement of protein-tyrosine phosphatase zeta. Mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **276**, 15868-15875 (2001).
139. Sakaguchi, N., et al. Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons. *Neurosci Res* **45**, 219-224 (2003).
140. Stoica, G.E., et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem* **277**, 35990-35998 (2002).
141. Lorente, M., et al. Stimulation of ALK by the growth factor midkine renders glioma cells resistant to autophagy-mediated cell death. *Autophagy* **7**, 1071-1073 (2011).
142. Reiff, T., et al. Midkine and Alk signaling in sympathetic neuron proliferation and neuroblastoma predisposition. *Development* **138**, 4699-4708 (2011).
143. Gungor, C., et al. Notch signaling activated by replication stress-induced expression of midkine drives epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* **71**, 5009-5019 (2011).
144. Huang, Y., et al. Midkine induces epithelial-mesenchymal transition through Notch2/Jak2-Stat3 signaling in human keratinocytes. *Cell Cycle* **7**, 1613-1622 (2008).
145. Ichihara-Tanaka, K., Oohira, A., Rumsby, M. & Muramatsu, T. Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells. *J Biol Chem* **281**, 30857-30864 (2006).
146. Kaneda, N., et al. Structural characteristics of heparin-line domain required for interaction of midkine with embryonic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 108-112 (1996).
147. Ueoka, C., et al. Neuronal cell adhesion, mediated by the heparin-binding neuroregulatory factor midkine, is specifically inhibited by chondroitin sulfate E.

- Structural and functional implications of the over-sulfated chondroitin sulfate. *J Biol Chem* **275**, 37407-37413 (2000).
148. Zou, P., *et al.* Glycosaminoglycan structures required for strong binding to midkine, a heparin-binding growth factor. *Glycobiology* **13**, 35-42 (2003).
149. Mitsiadis, T.A., *et al.* Expression of the heparin-binding cytokines, midkine (MK) and HB-GAM (pleiotrophin) is associated with epithelial-mesenchymal interactions during fetal development and organogenesis. *Development* **121**, 37-51 (1995).
150. Nakanishi, T., *et al.* Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *J Biochem* **121**, 197-205 (1997).
151. Kurosawa, N., *et al.* Glypican-2 binds to midkine: the role of glypican-2 in neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *Glycoconj J* **18**, 499-507 (2001).
152. Takenaka, H., *et al.* Midkine prevents ventricular remodeling and improves long-term survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**, H462-469 (2009).
153. Zhao, S.L., Zhang, Y.J., Li, M.H., Zhang, X.L. & Chen, S.L. Mesenchymal stem cells with overexpression of midkine enhance cell survival and attenuate cardiac dysfunction in a rat model of myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther* **5**, 37 (2014).
154. Zhang, P., Yan, X., Chen, Y., Yang, Z. & Han, H. Notch signaling in blood vessels: from morphogenesis to homeostasis. *Sci China Life Sci* **57**, 774-780 (2014).
155. Hofmann, J.J. & Iruela-Arispe, M.L. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circ Res* **100**, 1556-1568 (2007).
156. Li, F., Tian, P., Zhang, J. & Kou, C. The clinical and prognostic significance of midkine in breast cancer patients. *Tumour Biol* **36**, 9789-9794 (2015).
157. O'Brien, T., Cranston, D., Fuggle, S., Bicknell, R. & Harris, A.L. The angiogenic factor midkine is expressed in bladder cancer, and overexpression correlates with a poor outcome in patients with invasive cancers. *Cancer Res* **56**, 2515-2518 (1996).
158. Ruan, M., Ji, T., Wu, Z., Zhou, J. & Zhang, C. Evaluation of expression of midkine in oral squamous cell carcinoma and its correlation with tumour angiogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* **36**, 159-164 (2007).
159. Maeda, S., *et al.* Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer* **97**, 405-411 (2007).
160. Choudhuri, R., Zhang, H.T., Donnini, S., Ziche, M. & Bicknell, R. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res* **57**, 1814-1819 (1997).
161. Muramaki, M., Miyake, H., Hara, I. & Kamidono, S. Introduction of midkine gene into human bladder cancer cells enhances their malignant phenotype but increases their sensitivity to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res* **9**, 5152-5160 (2003).
162. Liao, D. & Johnson, R.S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 281-290 (2007).
163. Weckbach, L.T., *et al.* Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxia-induced angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **303**, H429-438 (2012).
164. Obama, H., *et al.* Myocardial infarction induces expression of midkine, a heparin-binding growth factor with reparative activity. *Anticancer Res* **18**, 145-152 (1998).
165. Horiba, M., *et al.* Midkine plays a protective role against cardiac ischemia/reperfusion injury through a reduction of apoptotic reaction. *Circulation* **114**, 1713-1720 (2006).
166. Fukui, S., *et al.* Therapeutic effect of midkine on cardiac remodeling in infarcted rat hearts. *Ann Thorac Surg* **85**, 562-570 (2008).
167. Sumida, A., *et al.* Midkine gene transfer after myocardial infarction in rats prevents remodeling and ameliorates cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res* **86**, 113-121 (2010).
168. Takada, T., *et al.* Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J Biochem* **122**, 453-458 (1997).
169. Horiba, M., *et al.* Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice. *J Clin Invest* **105**, 489-495 (2000).
170. Maruyama, K., Muramatsu, H., Ishiguro, N. & Muramatsu, T. Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **50**, 1420-1429 (2004).
171. Sato, W., *et al.* Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J Immunol* **167**, 3463-3469 (2001).

172. Diab, A., *et al.* Neutralization of macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and MIP-1 α attenuates neutrophil recruitment in the central nervous system during experimental bacterial meningitis. *Infect Immun* **67**, 2590-2601 (1999).
173. Leonard, E.J. & Yoshimura, T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* **11**, 97-101 (1990).
174. Nakamura, E., *et al.* Disruption of the midkine gene (Mdk) resulted in altered expression of a calcium binding protein in the hippocampus of infant mice and their abnormal behaviour. *Genes Cells* **3**, 811-822 (1998).
175. Heil, M., *et al.* Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* **94**, 671-677 (2004).
176. Gratzner, H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**, 474-475 (1982).
177. Kobayashi, M., Inoue, K., Warabi, E., Minami, T. & Kodama, T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* **12**, 138-142 (2005).
178. Baskiewicz-Masiuk, M., *et al.* Induction of mixed chimerism in mice by employing different conditioning protocols and bone marrow cell transplantation. *Transplant Proc* **41**, 1894-1899 (2009).
179. Longland, C.J. Collateral circulation in the limb. *Postgrad Med J* **29**, 456-458 (1953).
180. Zhang, Z.H., *et al.* Recombinant human midkine stimulates proliferation of articular chondrocytes. *Cell Prolif* **43**, 184-194 (2010).
181. Hua, Y., *et al.* DETA/NONOate, a nitric oxide donor, produces antidepressant effects by promoting hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology (Berl)* **200**, 231-242 (2008).
182. Asahara, T., *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo j* **18**, 3964-3972 (1999).
183. Cheng, H., Liang, P.H. & Cheng, T. Mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Methods Mol Biol* **976**, 25-35 (2013).
184. Hobo, A., *et al.* The growth factor midkine regulates the renin-angiotensin system in mice. *J Clin Invest* **119**, 1616-1625 (2009).
185. Tuttle, J.L., *et al.* Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1380-1389 (2001).
186. Mulvany, M.J. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? *Cardiovasc Res* **41**, 9-13 (1999).
187. Sumi, Y., *et al.* Midkine, a heparin-binding growth factor, promotes growth and glycosaminoglycan synthesis of endothelial cells through its action on smooth muscle cells in an artificial blood vessel model. *J Cell Sci* **115**, 2659-2667 (2002).
188. Narita, H., Chen, S., Komori, K. & Kadomatsu, K. Midkine is expressed by infiltrating macrophages in in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Vasc Surg* **47**, 1322-1329 (2008).
189. Scapini, P., *et al.* CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *J Immunol* **172**, 5034-5040 (2004).
190. Helisch, A. & Schaper, W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* **10**, 83-97 (2003).
191. Dai, X. & Faber, J.E. Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis. *Circ Res* **106**, 1870-1881 (2010).
192. Fung, H.L. & Bauer, J.A. Mechanisms of nitrate tolerance. *Cardiovasc Drugs Ther* **8**, 489-499 (1994).
193. Parker, J.O., Fung, H.L., Ruggirello, D. & Stone, J.A. Tolerance to isosorbide dinitrate: rate of development and reversal. *Circulation* **68**, 1074-1080 (1983).
194. Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Hermann, C., Busse, R. & Fleming, I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* **168**, 81-88 (2000).
195. Nagl, F., *et al.* Retinoic acid-induced nNOS expression depends on a novel PI3K/Akt/DAX1 pathway in human TGW-nu-1 neuroblastoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C1146-1156 (2009).
196. Napoli, C., *et al.* Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *J Am Coll Cardiol* **62**, 89-95 (2013).

197. Metaxa, E., *et al.* Nitric oxide-dependent stimulation of endothelial cell proliferation by sustained high flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H736-742 (2008).
198. Reisser, D., Onier-Cherix, N. & Jeannin, J.F. Arginase activity is inhibited by L-NAME, both in vitro and in vivo. *J Enzyme Inhib Med Chem* **17**, 267-270 (2002).
199. Lasch, M., *et al.* Arginase inhibition attenuates arteriogenesis and interferes with M2 macrophage accumulation. *Lab Invest* **96**, 830-838 (2016).
200. Gentile, C., Muise-Helmericks, R.C. & Drake, C.J. VEGF-mediated phosphorylation of eNOS regulates angioblast and embryonic endothelial cell proliferation. *Dev Biol* **373**, 163-175 (2013).
201. Bao, X., Lu, C. & Frangos, J.A. Mechanism of temporal gradients in shear-induced ERK1/2 activation and proliferation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H22-29 (2001).
202. Takahashi, M. & Berk, B.C. Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells. Essential role for a herbimycin-sensitive kinase. *J Clin Invest* **98**, 2623-2631 (1996).
203. Wessells, H., *et al.* Fluid shear stress-induced nitric oxide production in human cavernosal endothelial cells: inhibition by hyperglycaemia. *BJU Int* **97**, 1047-1052 (2006).
204. Hoeben, A., *et al.* Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* **56**, 549-580 (2004).
205. Amano, H., *et al.* The Role of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Signaling in the Recovery from Ischemia. *PLoS One* **10**, e0131445 (2015).
206. Wei, Z.W., *et al.* CXCL1 promotes tumor growth through VEGF pathway activation and is associated with inferior survival in gastric cancer. *Cancer Lett* **359**, 335-343 (2015).
207. Banai, S., *et al.* Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* **89**, 2183-2189 (1994).
208. Troidl, C., *et al.* The temporal and spatial distribution of macrophage subpopulations during arteriogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* **11**, 5-12 (2013).
209. Badila, E., *et al.* Midkine proteins in cardio-vascular disease. Where do we come from and where are we heading to? *Eur J Pharmacol* **762**, 464-471 (2015).
210. Ramanathan, M., Giladi, A. & Leibovich, S.J. Regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in murine macrophages by nitric oxide and hypoxia. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**, 697-705 (2003).
211. Zhu, X., *et al.* The effects of pleiotrophin in proliferative diabetic retinopathy. *PLoS One* **10**, e0115523 (2015).
212. Riseman, J.E., Altman, G.E. & Koretsky, S. Nitroglycerin and other nitrites in the treatment of angina pectoris; comparison of six preparations and four routes of administration. *Circulation* **17**, 22-39 (1958).
213. Gupta, R., Tongers, J. & Losordo, D.W. Human studies of angiogenic gene therapy. *Circ Res* **105**, 724-736 (2009).
214. Baumgartner, I., *et al.* Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* **97**, 1114-1123 (1998).

8 Danksagung

Ohne die Hilfe und Unterstützung sehr vieler Leute, wäre es nicht möglich gewesen diese Arbeit zu schreiben. Leider kann ich mich hier nur bei einem Bruchteil dieser Leute bedanken.

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Elisabeth Deindl für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, ihre andauernde Hilfe und wegweisenden Ratschläge bedanken.

Hierbei möchte ich mich auch herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl bedanken, der er mir die Möglichkeit gegeben hat im Walter Brendel Zentrum zu forschen.

Ein ganz herzliches Dankeschön an Frau Dr. rer. nat. Kerstin Troidl und ihre technische Assistentin Frau Christina Winterbauer aus Bad Nauheim, für die Unterstützung bei den Immunofluoreszenzfärbungen. Besonderer Dank auch an Frau Prof. Dr. med. Kirsten Lauber für die Hilfe bei den Knochenmarkstransplantationen.

Ganz besonders möchte ich mich bei den anderen Doktoranden unserer Arbeitsgruppe: Frau Amelia Caballero, Herrn Eike Kleinert, Herrn Omary Chillo und Herrn Manuel Lasch bedanken. Sie haben mir sämtliche Methoden erläutert und stets meine Fragen beantwortet. Es war für mich eine große Ehre ein Teil des Teams zu sein.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Frau Christine Csapo für ihre Hilfe im Labor bedanken. Über die Jahre stand sie mehr stets mit Rat und Tat zur Seite. Auch bei Frau Sendelhofert und Frau Lü möchte ich mich für die technische Unterstützung bedanken. Außerdem bei allen Mitarbeitern des Walter Brendel Zentrums für die großzügige Unterstützung und den ansteckenden Teamgeist.

Zuletzt möchte ich gerne den Menschen meine tiefste Dankbarkeit ausdrücken, die mich nicht nur während meiner Doktorarbeit sondern schon mein ganzes Leben unterstützt haben. Danke Mama und Papa für alles, was ihr bisher getan habt. Ohne eure Unterstützung wären das Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank auch an meine kleine Schwester Kristin, die mich immer aufbaut, wenn etwas nicht klappt und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hat.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Thomas Lautz
Anschrift: Zenettistraße 42
80337 München
Telefon: 01702976923
E-Mail: thomas.lautz@gmail.com
Geburtsdag: 19.12.1990
Geburtsort: Lüneburg

Akademischer Werdegang:

10/2010 – 12/2016 Ludwig-Maximilians-Universität München – Humanmedizin
12/2016 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung – Note 2
10/2015 – 9/2016 Stipendiat des Studierende Exzellenz Programms (StEP) der LMU München
10/2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung – Note 1 (92,5%)
Wahlfach: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde – Note 1
8/2012 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung – Note 2,0 (85,6%)
Wahlfach: Spezielle Themen der Anatomie – Note 1
2001 – 2010 Peter-Vischer-Gymnasium Nürnberg
Allgemeine Hochschulreife – Note 1,1
7 – 12/2007 Cromwell College, Cromwell, Neuseeland

Praktische Erfahrung (Auszug):

6 – 9/2016 3. Tertial des Praktischen Jahres, Klinik für Chirurgie, University Stellenbosch, Südafrika
3 – 6/2016 2. Tertial des Praktischen Jahres, Klinik für Onkologie, Weill Cornell Medical Colleges, New York und University of Cincinnati, USA
11/2015 – 2/2016 1. Tertial des Praktischen Jahres, Klinik für HNO-Heilkunde, LMU München
3/2015 Praktikum, Klinik für HNO-Heilkunde, Stanford School of Medicine, Stanford, USA
2 – 3/2015 Famulatur, Klinik für HNO-Heilkunde, LMU München
8 – 9/2013 Famulatur, Klinik für Orthopädie, Singapore General Hospital, Singapur

Extracurriculare Aktivitäten (Auszug):

10/2015 – 2/2016 „Simulation Gesundheitsmanagement – MeCuM-SiGma“, LMU München
10/2014 – 4/2015 Juniormentor des MeCuM-Mentor Programms, LMU München
9/2014 „International Case Discussion Summer School 2014 (ICDSS)“, LMU, TU München und Weill Cornell Medical College New York in München, Moderator und Organisator des Kurses
10/2013 – 7/2015 „Clinical Case Discussion Program“, LMU München, Teilnehmer und anschließend Organisator des Kurses
4/2013 – 7/2015 „Arzt und Zukunft – Unternehmer sein und Arzt bleiben“, LMU München, Teilnehmer und anschließend Organisator des Kurses
6/2008 „Siemens Talent Academy – A challenge for high potentials“, Siemens Erlangen
12/2007 – 12/2009 Mitglied des Siemens Innovation Think Tanks, Siemens-Forum Erlangen
2005 – 2008 Teilnahme am Hochbegabtenmodell Mittelfranken

Wissenschaftliche Arbeit:

2013 – 2017 Doktorand in der Arbeitsgruppe von PD Dr. rer. nat. Elisabeth Deindl
Walter-Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin

Kongressbeiträge: Lautz T, Pagel J, Borgolte J, Walzog B, Deindl E. Midkine expression is crucial for arteriogenesis. *Journal of Vascular Research*. 2014;51:89-89; Conference: 11th International Symposium on Resistance Arteries from Molecular Machinery to Clinical Challenges Location: Banff, CANADA Date: SEP 07-11, 2014

Lautz T, Pagel J, Borgolte J, Walzog B, Deindl E. Proper vascular remodeling during arteriogenesis is depending on the expression of midkine. Conference: 3rd Joint Meeting of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB) and the Swiss Society for Microcirculation and Vascular Research (SSMVR) Location: Muenster, GERMANY Date: SEP 30 - OCT 2, 2014

Publikationen:

Chillo O, Kleinert EC, Lautz T, Lasch M, Pagel JI, Heun Y, Troidl K, Fischer S, Caballero-Martinez A, Mauer A, Kurz AR, Assmann G, Rehberg M, Kanse SM, Nieswandt B, et al. Perivascular Mast Cells Govern Shear Stress-Induced Arteriogenesis by Orchestrating Leukocyte Function. *Cell Rep*. 2016;16:2197-2207

Lasch M, Caballero-Martinez A, Troidl K, Schloegl I, Lautz T, Deindl E. Arginase inhibition attenuates arteriogenesis and interferes with M2 macrophage accumulation. *Lab Invest*. 2016;96:830-838

Lautz T, Lasch M, Borgolte J, Troidl K, Pagel J, Caballero-Martinez A, Kleinert EC, Walzog B, Deindl E. Midkine Controls Endothelial Cell Proliferation in Arteriogenesis by Regulating the Bioavailability of VEGF-A and eNOS/nNOS Expression. – eingereicht

Lasch M, Kleinert EC, Pagel J, Meister S, Konda K, Lautz T, Fischer S, Caballero-Martinez A, Fleming I, Preissner KT, Deindl E. Extracellular RNA mediates Shear Stress Induced Activation of Endothelial Cells in Arteriogenesis. 2017 – in Vorbereitung zur Publikation

Preise:

12/2015 Verleihung des Lehrinnovationspreises 2015 der LMU München an das „Clinical Case Discussion Program“

9/2014 Verleihung des Trainee Travel Awards für das beste Abstract
Lautz T, Pagel J, Borgolte J, Walzog B, Deindl E. Midkine expression is crucial for arteriogenesis. *Journal of Vascular Research*. 2014;51:89-89; Conference: 11th International Symposium on Resistance Arteries from Molecular Machinery to Clinical Challenges Location: Banff, CANADA Date: SEP 07-11, 2014

10 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A./a.	<i>Arteria</i>
Abb.	Abbildung
ALK	anaplastischen Lymphomkinase
Auqa dest	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BrdU+	Bromdesoxyuridin positiv
BSA	Bovines Serumalbumin
CAP-18	cathelicidin antimicrobial peptide
CD45	Cluster of Differentiation 45
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CXCL1	Chemokin (CXC-Motiv) -Ligand 1
CXCR2	Chemokin (C-X-C-Motiv) -Rezeptor 2
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS-/-	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase defizient
ERK1/2	extrazelluläre signalregulierte Kinasen 1 und 2
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAK	focal adhesion kinase
FCS	Fetales Kälberserum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FSS	Fluid Shear Stress
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GPIb α	Glykoprotein I b alpha
GRO α	wachstumsbezogenes Onkogen α
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HbP	heparin-binding protein
HCl	Salzsäure
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha
HRE	Hypoxia response element
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL-8	Interleukin 8
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ip.	<i>intraperitoneal</i>
iv.	<i>intravenös</i>
kDA	kilo Dalton
L-NAME	N(omega)-nitro-L-arginine methyl ester
LDI	Laser-Doppler-Imaging
LRP	Lipoprotein Receptor-related Protein
LRP1	Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
Ly-6G	Lymphocyte antigen 6 complex, locus G
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation 7
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1

- Abkürzungsverzeichnis -

MIP2	Macrophage inflammatory protein 2
MK	Midkine
MK-/-	Midkine defizient
MMP-2	Matrix Metalloproteinase 2
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N.	<i>Nervus</i>
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natronlauge
NAP-2	Neutrophilen aktivierendes Protein 2
nLig	unmittelbar nach Ligatur
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOX2	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat Oxidase 2
NRP1	Neuropilin-1
Occ	Ligierter Hinterlauf
OD	optische Dichte
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB	Protein kinase B
PLGF	placental growth factor
po.	<i>per os</i>
PTN	Pleiotrophin
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
qRT-PCR	quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
RARE	Retinoic acid response element
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
rmMK	rekombinantes murines Midkine
rmVEGF	rekombinanter muriner VEGF-A164
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
ROS	reactive oxygen species
rpm	Rotationen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
Saline	0,9% Kochsalzlösung
sc.	<i>subkutan</i>
SH-PTP2	SH2-containing protein-tyrosine phosphatase
Sham	unligierter Hinterlauf
Src	sarcoma
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor Alpha
Trk A	Tropomyosin receptor kinase A
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
V.	<i>Vena</i>
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR-1	Vascular endothelial growth factor receptor 1
VEGFR-2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
VEGFR-3	Vascular endothelial growth factor receptor 3
WT	Wildtyp - Kontrollmaus
α SMA	alpha smooth muscle actin

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick Tumorangiogenese.....	3
Abbildung 2: Arteriogenese im Oberschenkel der Maus	4
Abbildung 3: Kollateralkreisläufe schützen Gewebe vor ischämischem Gewebeschaden..	6
Abbildung 4: Übersichtsbild des Oberschenkels einer Maus	12
Abbildung 5: Genotypisierung	23
Abbildung 6: Ligatur der Arteria femoralis	24
Abbildung 7: Versuchsaufbau für die LDI Messungen	25
Abbildung 8: Flux Bilder nach Laser-Doppler-Imaging	26
Abbildung 9: Katheterisierung der Aorta.....	27
Abbildung 10: Anfertigung von Schnitten der Adduktorenmuskulatur	28
Abbildung 11: Histologische Analysen	30
Abbildung 12: Durchblutung der Pfoten nach Ligatur.....	39
Abbildung 13: „Active Foot Movement Score“ nach Ligatur	40
Abbildung 14: Übersichtsbilder von Kollateralen 7 Tage nach Ligatur	41
Abbildung 15: Anzahl der Kollateralen im Oberschenkel	42
Abbildung 16: Morphologische Analysen der Kollateralen nach Ligatur	43
Abbildung 17: Gefäßdurchmesser Occ vs. Sham	44
Abbildung 18: Proliferation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen	45
Abbildung 19: Midkine Expression in isolierten Kollateralen	46
Abbildung 20: Midkine Spiegel im Plasma	47
Abbildung 21: Immunofluoreszenzfärbungen von Kollateralen	48
Abbildung 22: Einfluss der Knochenmarkstransplantation auf die Arteriogenese	50
Abbildung 23: Einfluss von exogenem Midkine auf die Arteriogenese.....	52
Abbildung 24: Expression von NOS in Kollateralen	53
Abbildung 25: Einfluss von exogenem NO auf die Arteriogenese.....	55
Abbildung 26: NOS Expression in isolierten Endothelzellen	56
Abbildung 27: Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen <i>in vitro</i> ...	57
Abbildung 28: VEGF-A Spiegel im Plasma	59
Abbildung 29: VEGF Immunofluoreszenzfärbung	60
Abbildung 30: Einfluss von exogenem VEGF auf die Arteriogenese	61
Abbildung 31: NOS Expression nach Behandlung mit rmVEGF	62
Abbildung 32: Einfluss von VEGF auf die Proliferation von Endothelzellen	62
Abbildung 33: Arteriogenese und Angiogenese nach Ligatur der A. femoralis	67
Abbildung 34: Wachstum von Kollateralen.....	69
Abbildung 35: Vorgeschlagenes Modell zur Funktion von Midkine bei der Arteriogenese	80

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rezeptoren für Midkine.....	13
Tabelle 2: Alphabetische Auflistung der verwendeten Geräte und Instrumente.....	18
Tabelle 3: Alphabetische Auflistung der verwendeten Materialien und Kits.....	19
Tabelle 4: Alphabetische Auflistung der verwendeten Lösungen und Substanzen.....	20
Tabelle 5: Primer für qRT-PCR	34
Tabelle 6: Versuchsaufbau Knochenmarkstransplantation	37

13 Eidesstattliche Versicherung

Lautz, Thomas Christoph

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
das ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

„Charakterisierung der funktionalen Rolle des Zytokins Midkine bei der Arteriogenese“

selbstständig verfasst, mich außer der angegeben keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Thomas Lautz

München 06.06.2017