

Der Einfluss der Gefäßremodellierung auf die Entstehung und Rückbildung von Gewebsfibrosen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Dipl.-Ing. agr.

Anna-Katharina Meinecke

aus Bottrop

Februar 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im Zeitraum von Juni 2010 bis Dezember 2012 im Arbeitskreis von **Prof. Dr. Stockmann am Institut für Physiologie** der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. C. Stockmann

2. Gutachter: Prof. Dr. V. Jendrossek

3. Gutachter: -

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. J. Boenigk

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2013

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	LUNGE, LEBER UND GEFÄßSYSTEME	1
1.1.1	ANATOMIE DER LUNGE	1
1.1.2	ANATOMIE DER LEBER	2
1.1.3	FUNKTION UND AUFBAU DES BLUTGEFÄßSYSTEMS	3
1.1.4	FUNKTION UND AUFBAU DES LYMPHGEFÄßSYSTEMS	5
1.2	ANGIOGENESEFAKTOREN	7
1.2.1	VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR	7
1.2.2	PLATELET DERIVED GROWTH FACTOR	9
1.3	GEWEBSFIBROSEN	11
1.3.1	IDIOPATHISCHE LUNGENFIBROSE	12
1.3.2	LEBERFIBROSE	17
1.4	GEFÄßREMODELLIERUNG IM RAHMEN VON GEWEBSFIBROSEN	21
1.4.1	LYMPHGEFÄßREMODELLIERUNG IM RAHMEN EINER LUNGENFIBROSE	22
1.4.2	BLUTGEFÄßREMODELLIERUNG IM RAHMEN EINER LEBERFIBROSE	24
2.	<u>ZIELSETZUNG</u>	28
3.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	30
3.1	GERÄTE	30
3.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	31
3.3	SUBSTANZEN	32
3.3.1	CHEMIKALIEN	32
3.3.2	ANTIKÖRPER	34
3.3.3	PRIMER	36
3.3.4	RT-REAGENZIEEN, PCR-ZUSÄTZE	37
3.3.5	PUFFER	38
3.3.6	ZELLKULTURMEDIEN	39
3.3.7	KITS	39
3.4	VERSUCHSTIERE	39
3.4.1	TIERHALTUNG	39
3.4.2	TRANSGENE MAUSSTÄMME	40
3.5	TIEREXPERIMENTELLE ARBEITEN	41
3.5.1	GENOTYPISIERUNG	41
3.5.2	INDUKTION EINER LUNGENFIBROSE	41
3.5.3	INDUKTION EINER LEBERFIBROSE	42
		III

3.5.4	VERWENDUNG WEITERER TIERMODELLE	43
3.5.5	HEMMUNG DER PDGFR-B-SIGNALÜBERTRAGUNG	43
3.5.6	488-DEXTRAN ASSAY	43
3.5.7	<i>IN-VIVO</i> NEUTRALISATION VON LYVE1	44
3.5.8	KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION	44
3.5.9	GEWEBEENTNAHME UND FIXIERUNG	47
3.5.10	BLUTENTNAHME UND SERUMGEWINNUNG	48
3.5.11	ISOLATION VON LUNGENLYMPHENDOTHELZELLEN, LEBERENDOTHELZELLEN SOWIE MAKROPHAGEN AUS MURINER LUNGE ODER LEBER	48
3.6	HISTOLOGIE	49
3.6.1	HÄMATOXYLIN- UND EOSIN-FÄRBUNG	49
3.6.2	SIRIUS RED FÄRBUNG	50
3.6.3	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG MITTELS DER ABC-KOMPLEX-METHODE	50
3.6.4	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	52
3.6.5	FÄRBUNG EINES MAUS-ANTIKÖRPERS AUF MAUSGEWEBE	53
3.6.6	<i>IN SITU</i> ZYMOGRAPHIE	53
3.6.7	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON ISOLIERTEN LUNGENLYMPHENDOTHELZELLEN	54
3.6.8	MIKROSKOPIE UND QUANTITATIVE AUSWERTUNG HISTOLOGISCHER PROBEN	54
3.7	RNA-ISOLATION UND PCR-ANALYSEN	55
3.7.1	HERSTELLUNG VON GEWEBEHOMOGENISATEN	55
3.7.2	ISOLATION DER RNA DURCH PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION	55
3.7.3	QUANTIFIZIERUNG DER RNA MITTELS EINES NANODROP	56
3.7.4	HERSTELLUNG VON CDNA	56
3.7.5	PCR	57
3.7.6	QUANTITATIVE REAL TIME PCR	57
3.8	WESTERN BLOT ANALYSE	58
3.8.1	PROTEINISOLATION AUS GEWEBE	58
3.8.2	PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY	58
3.8.3	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	59
3.8.4	WESTERN BLOT	59
3.8.5	PROTEINDETEKTION DURCH DAS ECL-SYSTEM	60
3.9	HYALURONSÄURE-EXTRAKTION AUS GEWEBE	61
3.10	HUMANE LUNGENPROBEN	61
3.11	STATISTIK	62
4.	ERGEBNISSE	63
4.1	DIE ROLLE PULMONALER LYMPHGEFÄÙE BEI DER ENTSTEHUNG EINER LUNGENFIBROSE	63
4.1.1	CHARAKTERISIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG PULMONALER LYMPHGEFÄÙE	63

4.1.2	REMODELLIERUNG PULMONALER LYMPHGEFÄÙE WÄHREND DER BILDUNG FIBROTISCHER LÄSIONEN	66
4.1.3	ANSAMMLUNG MURALER ZELLEN UM LYMPHGEFÄÙE IST PDGF-B/PDGFR-B-ABHÄNGIG	72
4.1.4	ANSAMMLUNG MURALER ZELLEN UM PULMONALE LYMPHGEFÄÙE FÜHRT ZU EINER STÖRUNG DES LYMPHABFLUSSES	80
4.1.5	DIE BEDEUTUNGEN VON HYALURONSÄURE-OBERFLÄCHENREZEPTOREN FÜR DIE ENTSTEHUNG EINER LUNGENFIBROSE	84
4.1.6	HEMMUNG DER PDGF-B/PDGFR-B-SIGNALÜBERTRAGUNG FÜHRT IM RAHMEN EINER LUNGENFIBROSE ZU EINER VERBESSERTEN TRANSPORTKAPAZITÄT PULMONALER LYMPHGEFÄÙE	89
4.1.7	ANSAMMLUNG MURALER ZELLEN UM LYMPHGEFÄÙE IN LUNGEN VON IPF-PATIENTEN	92
4.2	EINFLUSS DER HÄMANGIOGENESE AUF DIE ENTSTEHUNG UND RÜCKBILDUNG EINER LEBERFIBROSE IN ABHÄNGIGKEIT VON VEGF AUS MYELOISCHEN ZELLEN	95
4.2.1	ENTSTEHUNG UND RÜCKBILDUNG EINER LEBERFIBROSE IN ABHÄNGIGKEIT VON MYELOIDZELL-SPEZIFISCHEM VEGF	96
4.2.2	HÄMANGIOGENESE IN ABHÄNGIGKEIT VON VEGF AUS MYELOISCHEN ZELLEN WÄHREND DER ENTSTEHUNG UND RÜCKBILDUNG EINER LEBERFIBROSE	99
4.2.3	EXPRESSION UND AKTIVITÄT VON MATRIXMETALLOPROTEASEN IN ABHÄNGIGKEIT VON VEGF AUS MYELOISCHEN ZELLEN	103
4.2.4	DIE RÜCKBILDUNG EINER LEBERFIBROSE IN ABHÄNGIGKEIT VON VEGF AUS MYELOISCHEN ZELLEN	106
5.	DISKUSSION	114
5.1	EINFLUSS DER REMODELLIERUNG PULMONALER LYMPHGEFÄÙE AUF DIE ENTWICKLUNG EINER LUNGENFIBROSE	114
5.2	EINFLUSS DER HÄMANGIOGENESE AUF DIE ENTSTEHUNG UND RÜCKBILDUNG EINER LEBERFIBROSE IN ABHÄNGIGKEIT VON VEGF AUS MYELOISCHEN ZELLEN	125
6.	ZUSAMMENFASSUNG	133
7.	LITERATUR	135
8.	ANHANG	157
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	157
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	161
8.3	TABELLENVERZEICHNIS	162
8.4	PUBLIKATIONSLISTE	163
8.5	LEBENS LAUF	165

8.6	ERKLÄRUNG	166
8.7	DANKSAGUNG	167

1. Einleitung

Eine Fibrose ist durch eine pathologische Vermehrung von Kollagen und Myofibroblasten gekennzeichnet und geht mit Veränderungen der Blut- und Lymphgefäße einher. Fibrosen können nahezu jedes Gewebe oder Organ eines Körpers betreffen (Wynn und Ramalingam, 2012). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Remodellierung und Neubildung von Blut- und Lymphgefäßen im Rahmen der Lungen- und der Leberfibrose.

1.1 Lunge, Leber und Gefäßsysteme

Für ein besseres Verständnis der Lungen- und Leberfibrose wird zunächst die Anatomie der betreffenden Organe behandelt. Weiter werden im Folgenden der physiologische Aufbau und die Funktion des Blut- und Lymphgefäßsystems erläutert.

1.1.1 Anatomie der Lunge

In der Lunge (Abb. 1.1) wird das Kohlendioxid abgeatmet und das Blut durch Sauerstoffaufnahme aus der Luft oxygeniert. Eingeatmete Luft gelangt über die Trachea (Lufttröhre) und eine der zwei Hauptbronchien in den rechten oder linken Lungenflügel. Die Lungenflügel sind jeweils in Lungenlappen und weiter in Segmente (Lobuli) unterteilt. Im unteren Bereich der Bronchien schließen sich die Bronchiolen an, die über die Alveolargänge in die Alveolen (Lungenbläschen) übergehen (Stevens und Lowe, 1997).

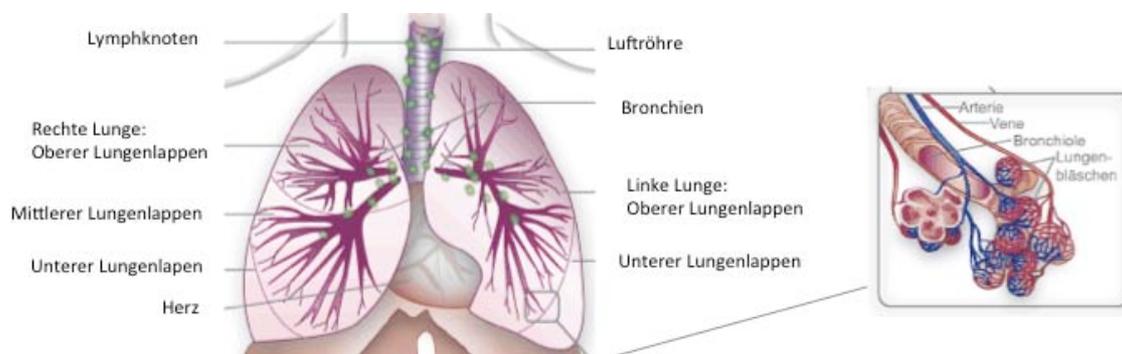


Abb. 1.1 Architektur der Lunge

Die Lunge teilt sich in den rechten und linken Lungenflügel auf, die weiter in Lobuli unterteilt sind. Am Ende der Bronchien befinden sich die Bronchiolen, die in die Alveolen übergehen (verändert nach DKFZ, 2011).

Die Alveolen sind von elastischem Bindegewebe umgeben und bilden den Ort des Gasaustausches. Benachbarte Alveolen sind durch schmale Alveolarsepten voneinander getrennt. Das Blut fließt von den pulmonalen Arterien in die Arteriolen über in die Kapillaren, die die Lungenalveolen durchziehen. Von den Kapillaren aus gelangt das Blut in die Venolen und über die Pulmonalvenen zurück zum Herzen (Schiebler, Schmidt und Zilles, 1997; Stevens und Lowe, 1997).

Lymphgefäße befinden sich in der Lunge perivaskulär um Venen und Arterien sowie peribronchiolär (Schiebler, Schmidt und Zilles, 1997). Die Alveolarsepten sind frei von Lymphgefäßen. Die Lymphgefäße verlaufen in den interlobulären Septen, entlang der Venenäste, zur Pleura sowie parallel mit den größeren Gefäßen der Bronchien. Beide Systeme münden im Hiluslymphknoten (Pusztaszeri et al., 2006).

1.1.2 Anatomie der Leber

Die Leber (Abb. 1.2 A) dient als zentrales Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers und wird makroskopisch in vier Leberlappen unterteilt (Lobus Hepatis Dexter, Lobus Hepatis Sinister, Lobus Quadratus und Lobus Caudatus). An der Unterseite der Leber liegt die Leberpforte (Porta Hepatis), über welche die Pfortader und die Leberarterien in die Leber ein- und die Lebergallengänge aus der Leber austreten. Die Blutversorgung der Leber erfolgt dabei über zwei Wege. Nährstoffreiches und sauerstoffarmes Blut gelangt über die Pfortader in die Leber, während sauerstoffreiches Blut über die Arteria Hepatica Propria in die Leber eintritt (Stevens und Lowe, 1997; Schiebler, Schmidt und Zilles, 1997).

Histologisch gesehen sind die Leberlappen aus kleinen Zentralvenenläppchen (1-2 mm) aufgebaut (Abb. 1.2 B). Die Zentralvenenläppchen setzen sich überwiegend aus konzentrisch um eine Zentralvene angeordneten Leberzellälkchen zusammen, welche wiederum aus säulenartig aufgereihten Leberepithelzellen (Hepatozyten) bestehen. Jedes Leberläppchen weist sechs Eckpunkte zu benachbarten Leberläppchen auf. In den Eckpunkten befinden sich die Periportalfelder, die einen Ast der Pfortader, der Leberarterie und einen Gallengang enthalten, welche zusammen die Glisson-Trias bilden (Stevens und Lowe, 1997).

Zwischen den Hepatozyten liegen die Kapillaren der Leber (Lebersinusoide), die ein fenestriertes Endothel durch interzelluläre Öffnungen zwischen den flachen sinusoidalen Endothelzellen (ECs) aufweisen. Die Struktur der Lebersinusoide erlaubt nichtzellulären Stoffen den Übertritt vom Lumen in den perisinusoidalen

Raum. An der Innenwand der Lebersinusoiden befinden sich Kupffer-Zellen (Makrophagen), die einen Teil der Immunabwehr darstellen. Innerhalb der Leber wird das Blut über die Lebersinusoiden zu der Zentralvene weitergeleitet, die es wiederum zurück zum Herzen transportiert (Abb. 1.2 A) (Schiebler, Schmidt und Zilles, 1997).

In dem anatomischen Spaltraum zwischen den Hepatozyten und sinusoidalen ECs (Disse-Raum) findet der eigentliche Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten statt. Im Disse-Raum befinden sich Blutplasma und Hepatische Sternzellen (HSCs) (Schiebler, Schmidt und Zilles, 1997). HSCs sind Perizyten, die zu Myofibroblasten differenzieren und Kollagen synthetisieren können (Wright et al., 2001).

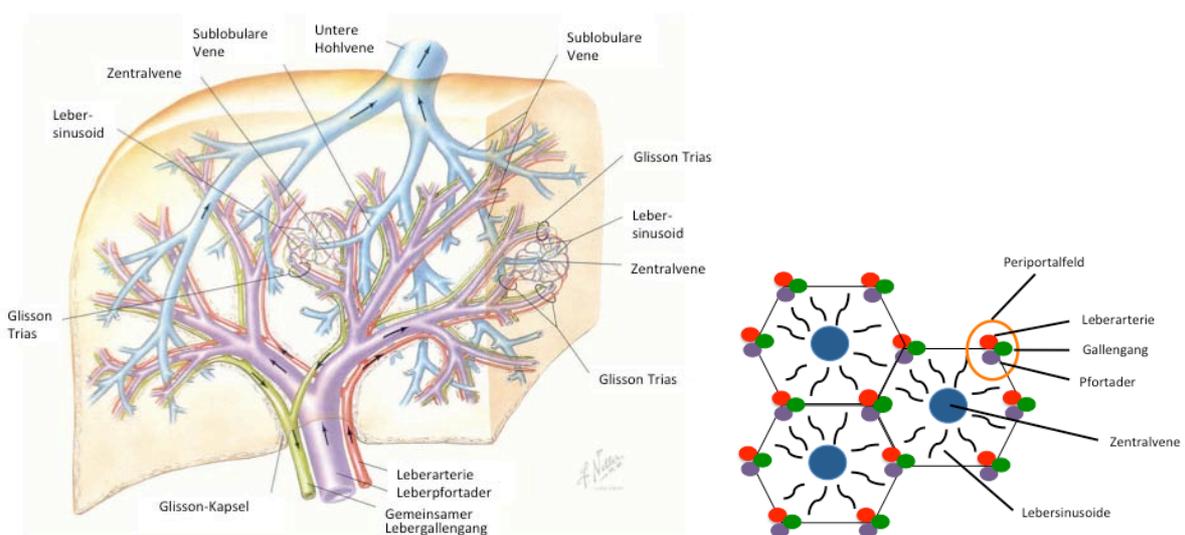


Abb. 1.2 Anatomie der Leber und der Leberläppchen

A) Die Leber ist in vier Lappen unterteilt, die wiederum aus einer Vielzahl an Leberläppchen bestehen. Sauerstoffarmes Blut erreicht die Leber über die Pfortader, während sauerstoffreiches Blut über die Leberarterie eintritt (verändert nach Netter, 1997). B) Die sechseckigen Leberläppchen weisen an jeder Ecke ein Periportalfeld auf, welches aus einem Ast der Pfortader, einer Leberarterie und einem Gallengang besteht. Innerhalb der Läppchen befinden sich zentralgerichtete Lebersinusoiden und eine mittig angeordnete Zentralvene (eigene Darstellung).

1.1.3 Funktion und Aufbau des Blutgefäßsystems

Blutgefäße transportieren Sauerstoff, Nährstoffe und Hormone, sowie Blut- und Immunzellen in verschiedene Gewebe und stellen mit dem Herzen ein geschlossenes Zirkulationssystem, den Blutkreislauf, dar. Das Blutgefäßsystem ist hierarchisch gegliedert und beginnt bei den Arterien. Von den Arterien geht es über die kleineren, in den Organen verzweigten Arteriolen hin zu den Kapillaren, die das jeweilige Gewebe mit Blut versorgen. Das rückführende Blutgefäßsystem besteht

aus den Venolen, die das Blut aus den Kapillaren sammeln und in die Venen transportieren. Von den Venen aus gelangt das Blut zurück zum Herzen (Torres-Vazquez et al., 2003).

Die Bildung des Blutgefäßsystems wird in vier Schritte untergliedert: 1) In die Bildung und 2) die Stabilisierung immaturer Blutgefäße, 3) in die Verzweigung, Remodellierung und Verästelung der Blutgefäße sowie 4) in die Spezialisierung der jeweiligen Blutgefäße (Jain, 2003). Das Netzwerk der Blutgefäße bildet sich während der embryonalen Entwicklung durch die Vaskulogenese (Neubildung der Blutgefäße aus Angioblasten oder Stammzellen) und Hämangiogenese (Sprossung, Brückenbildung oder Intussuszeption aus existierenden Gefäßen) folgendermaßen: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)-2 positive Angioblasten (endotheliale Vorläuferzellen) bilden ein vorläufiges Geflecht aus Gefäßen, aus dem die dorsale Aorta, die Kardinalvene, die embryonalen Zellen des Dottersacks und Venen entstehen (Carmeliet, 2000). Dieser Schritt geht mit einer Hypoxie (Sauerstoffmangel) des Gewebes einher, die für eine erhöhte Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A sowie einer vermehrten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) sorgt. Die bestehenden Gefäße erweitern sich als Reaktion auf das NO und werden aufgrund der erhöhten Expression von VEGF-A permeabel (Eliceiri et al., 1999). Endothelzellen exprimieren zudem Matrixmetalloproteasen (MMPs), die eine Degradierung der extrazellulären Matrix (ECM) auslösen (Visse und Nagase, 2003). Infolge des teilweisen Abbaus der ECM migrieren Endothelzellen schließlich in das umliegende Gewebe und beginnen zu proliferieren. Plasmaproteine, die aus den undichten Gefäßen austreten, dienen als provisorische Matrix. Dieser als *Tube Formation* bezeichnete Vorgang führt zur Entstehung immaturer Blutgefäße, den *Tubes* (Yancopoulos et al., 2000).

Die Gefäße maturieren durch die Anlagerung muraler Zellen (glatte Muskelzellen, Perizyten) sowie durch die Formation einer Basalmembran (Abb. 1.3). Beides führt zu einer Stabilisierung und zu einer geringeren Permeabilität der Blutgefäße (Carmeliet, 2000). Für die Maturierung von Blutgefäßen ist besonders die Signalkaskade des Platelet Derived Growth Factor (PDGF)-B und Platelet Derived Growth Factor Rezeptor (PDGFR)- β von großer Bedeutung. Während Blutendothelzellen große Mengen PDGF-B exprimieren, wird PDGFR- β von den umgebenden muralen Zellen exprimiert (Holmgren et al. 1991). PDGFR- β -positive

murale Zellen migrieren entlang der PDGF-B-exprimierenden Gefäße, proliferieren und unterstützen somit die Reifung immaturer Blutgefäße (Lindahl et al., 1997).

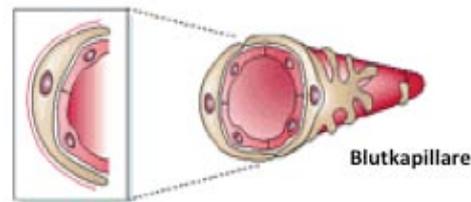


Abb. 1.3 Schematische Darstellung einer Blutkapillare

Eine mature Blutkapillare, bestehend aus Endothelzellen (innen), muralen Zellen (mittig) und einer Basalmembran (außen) (verändert nach Jain, 2003).

1.1.4 Funktion und Aufbau des Lymphgefäßsystems

Im Gegensatz zum Blutgefäßsystem, das einen geschlossenen Kreislauf darstellt, hat das Lymphgefäßsystem ausschließlich eine Drainagefunktion. Durch den Perfusionsdruck in den Blutkapillaren leckt kontinuierlich Plasma aus den Kapillaren in das Interstitium. Etwa 90% der Gewebsflüssigkeit gelangt durch den kolloidosmotischen Druck in die venöse Zirkulation zurück. Die Hauptaufgabe der Lymphgefäße ist es, die verbleibenden 10% der proteinreichen Flüssigkeit zurück in die Blutzirkulation zu leiten (Casley-Smith, 1980). Eine weitere fundamentale Funktion des Lymphgefäßsystems besteht in der Beihilfe zur Immunantwort. Antigene und aktivierte antigenpräsentierende Zellen werden aus dem Interstitium über die Lymphgefäße in die Lymphknoten und somit zu den dort ansässigen B- und T-Zellen transportiert (Tammela und Alitalo, 2010).

Die kleinste Einheit des Lymphgefäßsystems bilden die dünnwandigen Lymphkapillaren, die aus einer einzelnen Schicht überlappender Endothelzellen bestehen. Lymphkapillaren sind weder mit Perizyten oder glatten Muskelzellen besetzt noch von einer Basalmembran umgeben (Abb. 1.4). Aufgrund dieser Struktur weisen Lymphkapillaren eine hohe Permeabilität auf, was sie dazu befähigt, selbst große Moleküle aus ihrer Umgebung aufzunehmen (Schulte-Merker et al., 2011). Lymphflüssigkeit (Lymphe), Makromoleküle und Zellen, wie beispielsweise aus den Blutgefäßen stammende Leukozyten, treten zwischen den überlappenden Lymphendothelzellen (LECs) in die Lymphkapillaren ein (Abb.1.4) und werden dann von den Kapillaren ausgehend zu den Lymphkollektoren transportiert (Tammela und Alitalo, 2010).

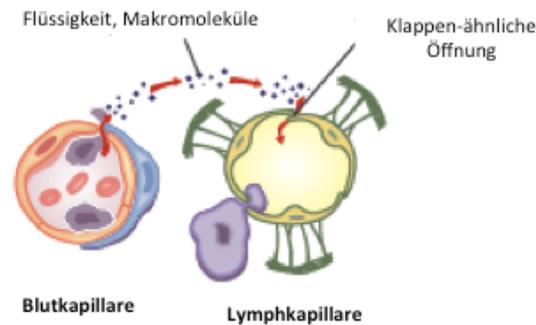


Abb. 1.4 Flüssigkeitsaustausch zwischen einer Blut- und einer Lymphkapillare

Flüssigkeit und Makromoleküle, die aus den Blutkapillaren austreten, werden von Lymphgefäßen, die aus überlappenden Endothelzellen bestehen, aufgenommen (verändert nach Alitalo et al., 2005).

Bei Lymphkollektoren handelt es sich um Lymphsammelgefäße, die mit den Lymphknoten verbunden sind und einen zentralgerichteten Lymphstrom gewährleisten. Lymphkollektoren sind von einer Schicht glatter Muskelzellen sowie einer Basalmembran umgeben. Die Umlagerung dieser Lymphsammelgefäße mit glatten Muskelzellen führt zu ihrer Impermeabilität, die es ihnen ermöglicht, die Lymphflüssigkeit einzuschließen und weiterzuleiten. In den Lymphkollektoren befinden sich zudem Klappen, die den Lymphrückfluss verhindern (Alitalo et al., 2005; Baluk et al., 2007). Zuletzt wird die Lymphe vom Ductus Thoracicus, dem größten Lymphgefäß des menschlichen Körpers, oder dem Ductus Lymphaticus Dexter aus den Kollektoren aufgenommen und zum venösen System zurückgeführt (Tammela und Alitalo, 2010).

Auf den gesamten Körper bezogen gelangt die Lymphflüssigkeit der linken Körperhälfte, des Abdomens sowie beider unterer Gliedmaßen in den Ductus Thoracicus, welcher sich rechts der Aorta befindet und schließlich in die linke Vena Subclavia mündet. Die Lymphflüssigkeit aus dem oberen rechten Arm, dem Thorax und dem Kopf wird über den Ductus Lymphaticus Dexter der rechten Vena Subclavia zugeführt (Jeltsch et al., 2003). In einem adulten humanen Organismus werden täglich 1-2 Liter Lymphflüssigkeit mit 20-30 Gramm Protein in die Blutzirkulation zurücktransportiert (Levick, 1999).

Obwohl verschiedene Theorien bezüglich der Entstehung des Lymphgefäßsystems existieren, wird vorrangig angenommen, dass sich das Lymphgefäßsystem aus und nach dem Blutgefäßsystem bildet. Vermutlich sprossen aus den Endothelzellen embryonaler Venen Lymphatic Vessel Hyaluronan Receptor 1 (Lyve1)- und

VEGFR3-positive Lymphendothelzellen aus, die sich zu primären Lymphbläschen formieren (Alitalo et al., 2005; Sabin, 1909; Gray, 1985). Der Transkriptionsfaktor Prospero Homeobox Protein 1 (Prox1) reguliert dabei die Transformation venöser Endothelzellen zu Lymphendothelzellen (Wigle und Oliver, 1999). Im nächsten Schritt folgt eine Prox1-unabhängige Aussprossung der Lymphendothelzellen aus den primären Lymphbläschen. Umliegendes Gewebe sezerniert VEGF-C, wodurch VEGFR3-positive Lymphendothelzellen migrieren, proliferieren und primäre Dottersäckchen bilden (Karkkainen et al., 2004). Von den primären Dottersäckchen ausgehend beginnen Lymphendothelzellen erneut zu sprossen. Das primäre Lymphgefäßgeflecht wird vom Blutgefäßsystem getrennt und bildet sich unter Anwesenheit von Ephrin B2, Angiopoietin 2 (Ang2) und dem Forkhead Box Protein C2 (FOXC2) durch Remodellierung und Maturation zum vollständigen Lymphgefäßsystem (Alitalo et al., 2005).

1.2 Angiogenesefaktoren

Zahlreiche Angiogenesefaktoren sind an der Entstehung und Reifung von Gefäßen beteiligt. Zwei der wichtigsten Familien, die Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) sowie die Platelet Derived Growth Factors (PDGF), spielen bei der Remodellierung von Gefäßen während der Entstehung und Rückbildung von Gewebsfibrosen eine zentrale Rolle und werden im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.2.1 Vascular Endothelial Growth Factor

Die Familie der Vascular Endothelial Growth Factors gehört zu den Dimeren von Disulfid-gebundenen Polypeptidketten. Vor mehr als 40 Jahren konnte der Vascular Permeability Factor (VPF), heute bekannt als VEGF-A oder kurz VEGF, im Zusammenhang mit der Permeabilität von Gefäßen als ein Faktor identifiziert werden, der mit der Maturierung von Blutgefäßen zusammenhängt (Dvorak et al., 1979; Senger et al., 1983). Erst deutlich später wurde VEGF-A die physiologische Funktion eines endothelspezifischen Mitogens zugeordnet (Leung et al., 1989).

Bis heute sind insgesamt sieben Vertreter der VEGF-Familie bekannt (Abb. 1.5). VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Placental Growth Factor (PlGF), VEGF-E (darunter fallen sämtliche viralen VEGF-Homologe) (Cross et al., 2003) sowie VEGF-F (Yamazaki et al., 2003). Die Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-

1), -2 (KDR/FLK-1) und -3 (Flt-4) sind die bisher bekannten Zielrezeptoren der verschiedenen VEGF-Liganden (Karkkainen und Petrova, 2000).

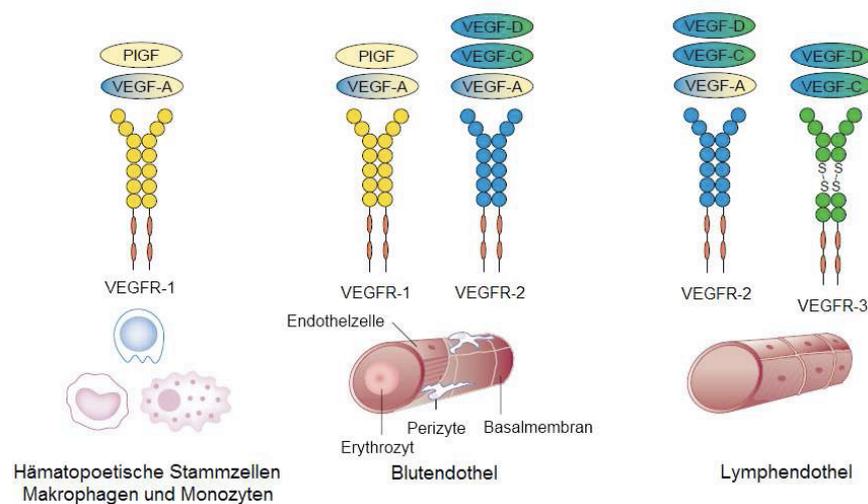


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der VEGFR-Liganden VEGF-A, -B, -C, -D, -E und PlGF sowie der gewebsspezifischen VEGFR-Expressionsmuster und ihrer Ligandenspezifität

Die Liganden binden in unterschiedlichen Mustern an den Tyrosinkinase VEGFR-1,-2 und/oder -3. VEGFR-1 wird von Hämatopoetischen Stammzellen sowie Makrophagen, Monozyten und Blutendothelzellen exprimiert. VEGFR-2 wird von Blut- sowie Lymphendothelzellen exprimiert, während VEGFR3 ausschließlich von Lymphendothelzellen exprimiert wird. PlGF und VEGF-B binden einzig an VEGFR-1. VEGF-A ist ein Ligand, der an sämtliche Rezeptoren bindet. Unprozessiert binden VEGF-C und -D nur an VEGFR3. Nach der Prozessierung binden sie ebenfalls an VEGFR-2. VEGF-E ist ebenfalls ausschließlich spezifisch für VEGFR-2 (verändert nach Cross et al., 2003).

Es wird angenommen, dass sowohl VEGF-A als auch VEGF-C über angiogene Wirkung verfügen (Cao et al., 1998; Carmeliet et al., 1996). Für die Hämangiogenese besitzt VEGF-A jedoch die größte Bedeutung unter den Wachstumsfaktoren. In experimentellen Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die über einen globalen VEGF-A-Knockout (KO) verfügen, im frühen embryonalen Stadium versterben, da sie keine funktionsfähigen Blutgefäße ausbilden (Carmeliet et al., 1996).

VEGF-A bindet sowohl an VEGFR-1 (Flt-1) als auch an VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Für die Hämangiogenese wird jedoch hauptsächlich die Aktivierung von VEGFR-2 verantwortlich gemacht. VEGFR-1 weist eine zu geringe Tyrosinkinase-Aktivität auf, um den notwendigen Signaltransduktionsweg initiieren zu können (Seetharam et al., 1995). Infolge der Bindung von VEGF-A an VEGFR-2 kommt es zu einer Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ). Aktivierte PLC γ stimuliert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat (PIP $_2$) und führt durch die Generierung von

sn-1,2-Diacylglycerol (DAG) zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Aktivierte PKC wiederum aktiviert den Raf-MEK-MAP-Kinase Signaltransduktionsweg (Cross et al., 2003). Die der Bindung von VEGF-A an VEGFR-2 folgende Signalkaskade löst unter anderem die Expression von MMPs durch ECs aus (Genis et al., 2006; Taraboletti et al., 2002). MMPs sind in der Lage, Kollagen und andere Bestandteile der ECM zu degradieren. Dieser kontrollierte Abbau von ECM-Komponenten ist eine Voraussetzung für die Migration von ECs in umliegendes Gewebe (Visse und Nagase, 2003). Eine detaillierte Beschreibung von MMPs findet sich in Kapitel 1.3.2. Des Weiteren bewirkt die VEGF-A/VEGFR-2-Signaltransduktion die Migration, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen sowie die *Tube Formation* (Ferrara und Davis-Smyth, 1997). Im Rahmen der Bildung von Lebersinusoiden initiiert die VEGF-A/VEGFR-2-Signalübertragung darüber hinaus die Fenestrierung der Sinusoide (May et al., 2011; Yamane et al., 1994).

VEGFR-1 fungiert als Negativregulator der Hämangiogenese. Durch die Bindung von VEGF-A an VEGFR-1 steht VEGF-A nicht mehr für eine Bindung an VEGFR-2 zur Verfügung. Die VEGF-A/VEGFR-2-Signaltransduktion wird auf diesem Weg verhindert und die Hämangiogenese gehemmt. Durch das Zusammenspiel von VEGFR-1 und VEGFR-2 bleibt die Hämangiogenese in einer physiologischen Balance (Hiratsuka et al., 2001).

1.2.2 Platelet Derived Growth Factor

Die Familie der Platelet Derived Growth Factors gehört, ebenso wie die der VEGFs, zu den Dimeren Disulfid-gebundener Polypeptidketten und wurde vor mehr als 30 Jahren als ein Serumwachstumsfaktor für Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Gliazellen entdeckt (Kohler und Lipton, 1974, Ross et al., 1974, Westermarck and Wasteson, 1976). Bald darauf war man in der Lage, die Liganden PDGF-A und PDGF-B voneinander zu unterscheiden und diese genauer zu charakterisieren (Johnsson et al., 1982). Zum heutigen Zeitpunkt ordnet man der Familie der PDGFs die Liganden PDGF-A, -B, -C und -D, sowie die Tyrosinkinase-Rezeptoren Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) α und β zu (Abb. 1.6) (Andrea et al., 2008; Li et al., 2000; Bergsten et al., 2001).

Die Liganden bilden Homo- bzw. Heterodimere und besitzen unterschiedliche Spezifitäten für die Rezeptoren. Die Möglichkeiten der PDGF/PDGFR-Interaktion

sind zahlreich und komplex. *In vivo* konnte jedoch bislang nur die Interaktion von PDGF-AA und PDGF-CC mit PDGFR- α und PDGF-BB mit PDGFR- β nachgewiesen werden (Abb. 1.6) (Andrea et al., 2008).

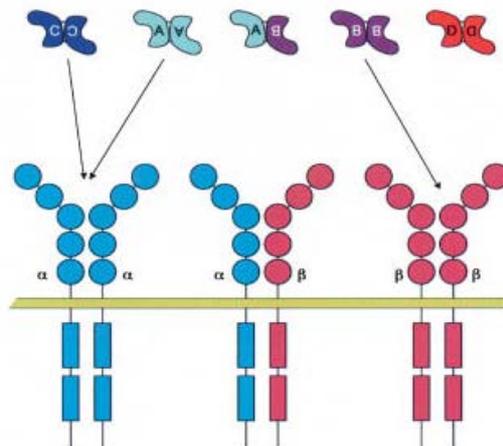


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der PDGF/PDGFR-Interaktion *in vivo*

In vivo binden die Homodimere PDGF-AA und -CC an den PDGFR- α sowie PDGF-BB an PDGFR- β (verändert nach Andrea et al., 2008).

PDGFs spielen unter anderem während der embryonalen Entwicklung eine zentrale Rolle. Durch die Bindung an einen der beiden PDGF-Rezeptoren steuern die PDGF-Liganden die Proliferation und Migration von Zellen, die Produktion extrazellulärer Matrixproteine sowie die Produktion pro- und antiinflammatorischer Mediatoren. Tierversuche ergaben, dass sich Mäuse, die defizient für einen der vier Liganden sind, als nicht überlebensfähig zeigen und in der Regel im frühen Embryonalstadium versterben (Betsholtz et al., 2001).

Darüber hinaus spielt die PDGF/PDGFR-Signalübertragung eine wichtige Rolle bei der Maturation von Blutgefäßen. Der für diesen Prozess wichtigste Faktor der PDGF-Familie ist PDGF-B. Tierexperimentelle Arbeiten zeigten, dass PDGF-B-defiziente Mäuse im frühen embryonalen Stadium keine Rekrutierung PDGFR- β -positiver muraler Zellen um Blutgefäße aufweisen und noch während der Schwangerschaft versterben (Lindahl et al., 1997). Weiterhin versterben PDGF-B- sowie PDGFR- β -defiziente Mäuse während des letzten Schwangerschaftsabschnitts infolge kardiovaskulärer Schäden. An Schwangerschaftstag 16-19 bilden sich Ödeme, Herz und Blutgefäße vergrößern sich und es kommt zur Dilatation und Ruptur der Kapillaren (Levéen et al., 1994; Soriano, 1994). Passend dazu konnte gezeigt werden, dass PDGF-B in Kapillarendothelzellen sowie in ECs von Arterien und

Arteriolen zwischen Schwangerschaftstag 11,5 und dem frühen postnatalen Tag 10 die höchste Expression aufweisen (Hellström et al., 1999).

PDGF-B selbst wird hauptsächlich in vaskulären Endothelzellen, Megakaryozyten und Neuronen exprimiert, während PDGFR- β im Mesenchym vor allem von vaskulären glatten Muskelzellen und Perizyten exprimiert wird (Holmgren et al. 1991). Die Signalübertragung von PDGF-B/PDGFR- β ist komplex. Durch die Anlagerung von PDGF-B an den PDGFR- β und die folgende Rezeptordimerisierung wird nicht nur die PLC γ , sondern auch die Phosphatidylinositol 3-Kinase p85 subunit (PI3K), das Ras GTPase-aktivierende Protein (RasGAP), das Adapterprotein Shc, das Growth Factor Receptor-bound Protein 2 (Grb2) sowie die Shp2 Phosphatase und die Familie der Src-Kinasen aktiviert. Durch die Aktivierung dieser Faktoren, die wiederum zahlreiche weitere Signalwege aktivieren (Pawson und Saxton, 1999), initiiert PDGF-B/PDGFR- β schließlich unter anderem die Maturation von Blutgefäßen (Lindahl et al., 1997).

1.3 Gewebsfibrosen

Unter dem Begriff der Fibrose versteht man einen Umbau von Geweben oder Organen, der durch eine pathologische Ansammlung von Myofibroblasten sowie einer konsekutiv gesteigerten Kollagensynthese gekennzeichnet ist, und mit Veränderungen der Blut- und Lymphgefäße einhergeht. Eine Fibrose wird als das Resultat einer unkontrollierten Wundheilungsreaktion betrachtet, die aus einer chronischen Entzündung oder wiederholten Verletzungen des betroffenen Gewebes entsteht (Wynn und Ramalingam, 2012).

Gewebsfibrosen haben in den vergangenen Jahren in den westlichen Ländern an Bedeutung gewonnen, da sich etwa 45% aller Todesfälle in den Industriestaaten auf fibrotische Veränderungen in verschiedenen Organen zurückführen lassen. Häufig stellt eine Organfibrose die Folge einer schweren Primärerkrankung dar (Wynn, 2007). Als Risikofaktoren für die Entstehung einer Fibrose gelten eine Vielzahl von Primärerkrankungen. So können etwa 57% aller Leberfibrosen einer vorhergehenden Infektion mit dem Hepatitis B oder C Virus zugeordnet werden (Perz et al., 2006). Auch infolge eines Herzinfarktes leiden viele Patienten an einer Fibrosierung des Herzmuskels (Swynghedaw, 1999). Fibrosen können jedoch nicht nur als

Folgeerscheinung einer Erkrankung auftreten, sondern auch die Ursache für nachfolgende Sekundärerkrankungen darstellen. Bei vielen Fibrosepatienten besteht eine Prädisposition für maligne Erkrankungen. Eine Leberfibrose beispielsweise führt im weiteren Verlauf häufig zu einer Leberzirrhose und zu einem Leberzellkarzinom, der weltweit fünfthäufigsten Krebserkrankung (Llovet, 2005).

1.3.1 Idiopathische Lungenfibrose

Ursachen für das Auftreten von Lungenfibrosen sind Infektionen, Inhalation von z.B. Asbest, Bestrahlung, immunologische Defekte oder medikamentöse Nebenwirkungen von beispielsweise dem Chemotherapeutikum Bleomycin. Die sogenannte idiopathische Lungenfibrose (IPF) tritt jedoch ohne erkennbaren Auslöser vermehrt ab dem sechzigsten Lebensjahr auf. Die IPF gehört zu der Gruppe der idiopathischen interstitiellen Pneumonien und nimmt unter den ca. 150 bekannten interstitiellen Lungenerkrankungen eine Sonderstellung ein. Von allen interstitiellen Lungenerkrankungen ist die IPF die Erkrankung mit der schlechtesten Prognose und einem rasch progredienten und therapierefraktären Verlauf (Günther et al., 2003; Michaelson et al., 2000). Die Lebenserwartung von IPF-Patienten beträgt nach der Diagnose im Mittel zwei bis fünf Jahre, die 5-Jahres-Überlebensrate beläuft sich auf nur ca. 20%. Der einzige kurative Therapieansatz, der das Überleben der Patienten langfristig sichert, ist die Lungentransplantation (Olsen et al., 2007). In den Vereinigten Staaten konnte für die IPF eine Steigerung der Prävalenz von 14 auf 42,7 pro 100.000 Einwohner festgestellt werden (Raghu et al., 2006). Darüber hinaus ist die Mortalität infolge von IPF zwischen 1992 und 2003 um 28% bei Männern und um 41% bei Frauen gestiegen (Olson et al., 2007).

Die genaue Pathogenese der Krankheit ist nur unzureichend geklärt. Lange wurde angenommen, dass eine chronische Entzündung im Lungengewebe die Grundlage für die Entstehung einer IPF sei (Keogh et al., 1982). Diese Annahme wurde jedoch durch drei maßgebliche Beobachtungen in Frage gestellt. Zunächst korrelierte das Maß der Gewebsentzündung nur schwach mit der Schwere der IPF. Zudem konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass der fibrotische Umbau von Geweben auch in Abwesenheit einer Entzündung erfolgen kann. Weiterhin konnte die Gabe von immunsuppressiven Medikamenten das Voranschreiten der Fibrose kaum beeinflussen (Selman et al., 2001). Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass

eine auf eine Verletzung des Epithels folgende unkontrollierte Wundheilungsreaktion Auslöser der IPF ist (Selman und Pardo, 2006). Die Wiederherstellung von verletztem Gewebe (Wundheilung) ist ein fundamentaler biologischer Mechanismus, bei dem tote oder beschädigte Zellen durch Neue ersetzt werden. Der Entstehung einer IPF liegt offenbar eine Störung dieses Prozesses zugrunde (Abb. 1.7), deren Ursache bislang unbekannt ist (Strieter und Mehrad, 2009).

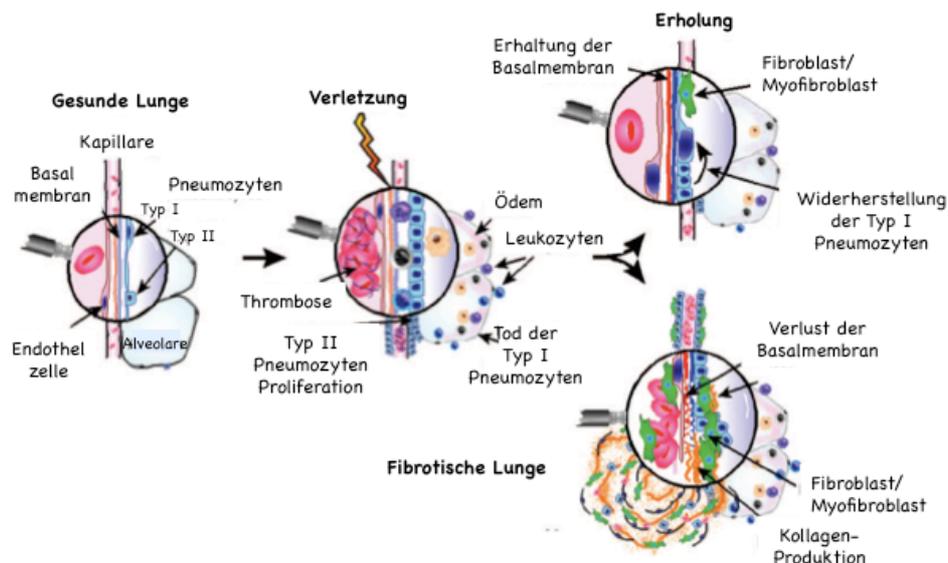


Abb. 1.7 Physiologische Wundheilung und pathophysiologische Entstehung einer Lungenfibrose infolge einer Gewebsverletzung

Nach einer Verletzung von Gewebe kommt es zum Tod der Pneumozyten Typ 1 und zur Proliferation der Pneumozyten Typ 2. Ferner kommt es zu einer Aktivierung der Fibroblasten, zur Wiederherstellung der Pneumozyten Typ 1 und zu einer vollständigen Erholung des geschädigten Gewebes. Unter physiologischen Bedingungen bleibt die Struktur der Basalmembran während des Wundheilungsprozesses erhalten. Im Zuge einer Fibrose kommt es zu einer überhöhten Ansammlung von Myofibroblasten, einem Verlust der Basalmembranstruktur und zu einer abnormen Kollagenproduktion, welche in der Bildung fibrotischer Läsionen resultiert (verändert nach Strieter und Mehrad, 2009).

Auch wenn die Pathogenese der IPF bislang nicht hinreichend geklärt werden konnte, gibt es einige Hauptmerkmale, die die Entstehung der Lungenfibrose kennzeichnen. Zunächst kommt es zu einer Schädigung und Apoptose von Alveolar-Typ-I-Epithelzellen und Endothelzellen. Anschließend folgt eine Schädigung der Basalmembran sowie der alveolokapillären Barriere. Die alveolaren Strukturen kollabieren und es folgt der endgültige Verlust der Basalmembranstruktur (Burkhardt, 1989; Strieter und Mehrad, 2009). Alveolar-Typ-II-Epithelzellen und Endothelzellen proliferieren nahe der provisorischen extrazellulären Matrix, ohne dabei jedoch für die Wiederherstellung der ursprünglichen alveolokapillären Struktur

sorgen zu können (Kawanami et al., 1982). Wie bei der physiologischen Wundheilung migrieren auch während einer pathologischen Wundheilung inflammatorische Zellen, unter anderem Neutrophile, Makrophagen, Lymphozyten und Eosinophile, in das geschädigte Gewebe. Im weiteren Verlauf kommt es zur Migration, Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten, die unterschiedlichen Quellen entstammen können (Abb.1.8) (Wynn, 2007).

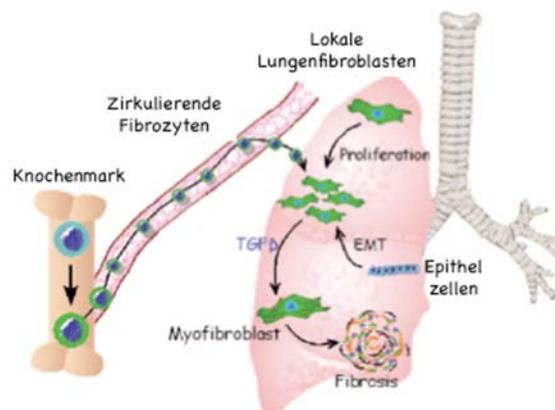


Abb. 1.8 Möglicher Ursprung von Lungenfibroblasten

Drei mögliche Quellen für Myofibroblasten sind bekannt. Es kann es sich um aktivierte lokale Lungenfibroblasten handeln, sie können zirkulierenden Fibrozyten aus dem Knochenmark entstammen oder sie bilden sich durch EMT aus Epithelzellen (verändert nach Strieter und Mehrad, 2009).

Eine mögliche Quelle stellen lokale Lungenfibroblasten dar, die zunächst durch von Makrophagen produzierte Zytokine aktiviert werden, und anschließend proliferieren (Fukuda et al., 1987). Möglich ist außerdem, dass die Fibroblasten aus zirkulierenden Fibrozyten hervorgehen, die dem Knochenmark entstammen (Abe et al., 2001). Ferner können sich Epithelzellen mittels Epithelialer-Mesenchymaler-Transition (EMT) zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen transdifferenzieren (Kalluri und Neilson, 2003).

Die Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten wird von zahlreichen Faktoren, unter anderem der Hyaluronsäure (HA) und der Lysophosphatidsäure (LPA), ausgelöst. Während gezeigt werden konnte, dass Albumin-gebundene LPA die Rekrutierung von Fibroblasten induzieren kann (Tager et al., 2008), unterstützt HA sowohl die Migration als auch die Proliferation von Fibroblasten (Meran et al., 2008). Zusätzlich ist die Überexpression von Hyaluronsynthase 2, und damit die Induktion von HA, mit einer Differenzierung von Fibroblasten zu α -smooth-muscle-actin (SMA) exprimierenden Myofibroblasten

verbunden (Meran et al, 2007). Nachdem Fibroblasten in Entzündungsbereiche migriert und zu Myofibroblasten differenziert sind, setzen sie große Mengen an ECM-Bestandteilen, wie fibrilläres Kollagen, Fibronectin, elastische Fasern sowie Proteoglykane frei (Selman et al., 1986). Während einer Lungenfibrose kommt es zu einer fortlaufenden Migration, Proliferation und Differenzierung der Fibroblasten, was zu einer kontinuierlichen Produktion kollagenreicher ECM führt. Die Ablagerung des Kollagens im Lungenparenchym führt zu einem Verlust der alveolaren Strukturen und resultiert schließlich in der Entstehung einer Lungenfibrose (Burkhardt, 1989).

Die Rolle der Hämangiogenese bei der Entstehung einer Lungenfibrose wird bislang kontrovers diskutiert (Renzoni et al., 2004; Tzouvelekis et al., 2006). Keane et al. (1997) zeigten, dass die Entstehung einer Lungenfibrose mit einer aberranten Hämangiogenese einhergeht und vermuten, dass die Neubildung von Blutgefäßen den fibrotischen Umbau des Gewebes unterstützt. Im Gegensatz dazu zeigten Ebina et al. (2004), dass es während einer IPF innerhalb fibrotischer Areale zu einer Blutgefäßregression kommt. Sie mutmaßen deshalb, dass eine Hämangiogenese innerhalb fibrotischer Bereiche dem Fortschreiten der Krankheit entgegenwirkt. Zusätzlich dazu konnten Stockmann et al. (2010) zeigen, dass die Neubildung von Blutgefäßen während einer Lungenfibrose die Ausprägung der Krankheit deutlich mildert.

Die IPF gilt als therapierefraktär und Behandlungen weisen, ungeachtet des medizinischen Fortschritts, nur mäßige und vorübergehende Effekte auf den Verlauf der Erkrankung auf. Antiinflammatorische Behandlungsstrategien, wie die Gabe der Immunsuppressiva Prednison, Azathioprin sowie Cyclophosphamid, konnten bislang keine positive Wirkung erzielen (King Jr et al., 2000), weshalb eine Therapie mit Prednison allein oder in Kombination mit Azathioprin bzw. Cyclophosphamid aktuell nicht empfohlen wird (Raghu et al., 2011).

Da gegenwärtig angenommen wird, dass es sich bei der IPF um einen Prozess der gestörten Wundheilung handelt, wurden antioxidative sowie zahlreiche antifibrotische Therapien entwickelt und getestet, doch nur wenige wurden zu klinischen Studien zugelassen (Costabel und Bonella, 2011). Das Antioxidativum N-Acetylcystin (NAC) wurde in die klinische Phase aufgenommen. Als Cysteinlieferant steigert es die Glutathionsynthese und soll somit den oxidativen Stress sowie die daraus resultierende Aktivierung der Fibroblasten hemmen (Meyer et al., 1994).

Nachdem eine erste klinische Studie, in der NAC in Kombination mit Prednison und Azathioprin getestet wurde, positive Trends bei der Belastbarkeit sowie der Überlebensrate der Patienten aufwies (Demedts et al., 2005), musste die zweite klinische Studie zur Behandlung mit dieser Dreifachkombination (PANTHER-IPF-Studie) aufgrund von Sicherheitsbedenken abgebrochen werden. Unter den behandelten Teilnehmern kam es zu einer Zunahme der Sterberate, eine höhere Rate an Klinikeinweisungen und zu stärkeren Nebenwirkungen (Costabel und Bonella, 2011).

Auch zahlreiche Medikamente, die gezielt einzelne profibrotische Signalwege stoppen sollen, zeigten zumeist keine signifikanten Resultate. Eines der Medikamente ist Interferon- γ -1b, ein Zytokin, das die Proliferation von Fibroblasten aufhalten soll, von dem aufgrund mangelhafter Wirkung sowie erheblicher Nebenwirkungen mittlerweile abgeraten wird (King et al., 2009). Auch Bosentan und Ambrisentan, beides Endothelin-Rezeptorantagonisten, welche die Dilatation von Blutgefäße bewirken, erwiesen sich als unwirksam (King et al., 2011). Etanercept, ein rekombinant hergestellter Antikörper, der die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und TNF- β bindet und neutralisiert, zeigte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf einen kombinierten Endpunkt, der sich aus der Überlebensrate der Patienten und einer Kombination verschiedener Lungenfunktionstests zusammensetzt (Raghu et al., 2008). Darüber hinaus wurden die Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib und Sildenafil getestet. Während Imatinib, als ein PDGF-Rezeptor-Inhibitor, die Proliferation mesenchymaler Stammzellen verhindern soll, bewirkt Sildenafil, als ein Inhibitor der Phosphodiesterase 5, eine Vasodilatation der Gefäße. Die Behandlung von IPF-Patienten mit Imatinib und Sildenafil führte jedoch zu keiner signifikanten Verbesserung der Ergebnisse des 6-Minuten-Gehtests, einem diagnostischen Mittel welches bei IPF-Patienten als Verlaufs- und Therapiekontrolle eingesetzt wird (Zisman et al., 2010; Daniels et al., 2010).

Pirfenidon, das bislang einzige Medikament, das in der Europäischen Union für die Behandlung leichter bis mittelschwerer IPF zugelassen ist, konnte in klinischen Studien zumindest moderate Erfolge in der IPF-Behandlung aufweisen. Eine Metaanalyse aller drei Phase-III-Studien zeigte, dass Pirfenidon das Risiko der Krankheitsprogression signifikant um 30% verringert und die Gesamtsterblichkeit um 2% dezimierte (nicht signifikant) (Spagnolo et al., 2010). Für die Behandlung einer

fortgeschrittenen IPF wird es allerdings nicht empfohlen. Bei Pirfenidon handelt es sich um ein modifiziertes Phenylpyridon, dessen molekularer Wirkungsmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Costabel und Bonella, 2011; Raghu et al., 2011). Pirfenidon hat antifibrotische sowie antiinflammatorische Wirkung, reduziert die Fibroblastenproliferation, hemmt die Produktion fibroseassoziiertes Proteine und Zytokine und reduziert die Akkumulation der extrazellulären Matrix (Schaefer et al., 2011).

Ein weiteres erfolgsversprechendes Medikament, BIBF-1120, befindet sich momentan in einer klinischen Phase-II-Studie. Bei BIBF-1120 handelt es sich um einen intrazellulären Tyrosinkinase-Inhibitor, der die Rezeptoren von PDGF, VEGF sowie des Fibroblast Growth Factor (FGF) hemmt. In der Phase-II-Studie zeigten BIBF-1120-behandelte Patienten, verglichen mit Placebo-behandelten Kontrollpatienten, eine verbesserte Lungenfunktion und eine Verringerung der Exazerbation. Ferner führt die Behandlung mit BIBF-1120 zu einer Steigerung der Lebensqualität der Patienten (Richeldi et al., 2011). Phase-III-Studien werden zeigen, ob BIBF-1120 als Medikament zur Therapie der IPF infrage kommt.

Die Resultate dieser klinischen Studien zeigen, dass sich die Therapien der IPF noch immer in rudimentärem Zustand befinden. Ein besseres Verständnis über den Verlauf der Krankheit ist notwendig, um zukünftig eine Behandlung der IPF-Patienten gewährleisten zu können.

1.3.2 Leberfibrose

Eine Leberfibrose tritt infolge verschiedener Primärerkrankungen auf. In Industrieländern wurden chronische Hepatitis C-Infektion (HCV), Alkoholabhängigkeit und die nichtalkoholische Fettleberhepatitis (NASH) als die Hauptursachen einer Leberfibrose identifiziert (Bataller und Brenner, 2005). Die Krankheitsausprägung ist je nach Stimulus und Patient stark unterschiedlich. Die Verteilung des fibrotischen Materials in der Leber, welches hauptsächlich Kollagen umfasst, unterscheidet sich ebenfalls je nach Primärerkrankung. Ist die Fibrose mit Hepatitiden (beispielsweise Hepatitis C) oder einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) assoziiert, sammelt sich fibrotisches Gewebe vermehrt um die Periportalfelder (Faria et al., 2009; Ginés et al., 2004). Bei auf Alkoholmissbrauch zurückzuführenden Fibrosen findet man dagegen eine Akkumulation fibrotischen Gewebes in den perisinusoidalen Arealen der Leberläppchen (Li et al., 2005).

Grundsätzlich wird zwischen der kompensierten und der dekompenzierten Leberfibrose unterschieden. Die kompensierte Leberfibrose verläuft lange Zeit weitestgehend symptom- und beschwerdefrei und die daraus resultierende Leberzirrhose tritt häufig erst 15-20 Jahre nach Beginn der Krankheit auf. Eine frühe Diagnose und Behandlung der Erkrankung wird somit erschwert (Davis et al., 2003). Die Zirrhose führt letztlich zu einer irreversiblen Leberfunktionsstörung und zu einem erhöhten intrahepatischen Gefäßwiderstand mit resultierender Leberinsuffizienz bzw. portaler Hypertension (Ginès et al., 2004). Die dekompenzierte Leberfibrose führt rasch zum Tod. Hier ist eine Lebertransplantation der einzige kurative Therapieansatz zur Sicherung des Überlebens der Patienten (Davis et al., 2003).

Ursprünglich wurde angenommen, dass es sich bei der Leberfibrose um einen irreversiblen narbigen Umbau des Lebergewebes handelt (Schaffner und Klion, 1968). Heute wird davon ausgegangen, dass es sich bei der Leberfibrose um eine unkontrollierte Wundheilungsreaktion handelt, die bedingt reversibel ist (Friedman, 2003). Bis zu welchem Zeitpunkt in der Krankheitsentstehung die Leberfibrose als reversibel gilt, konnte bislang nicht eindeutig gezeigt werden (Dufour et al., 1998; Issa et al., 2004). Hauptkennzeichen der Leberfibrose sind die übermäßige Ansammlung von Myofibroblasten, die vermehrte Bildung und Ablagerung von Kollagen ebenso wie Veränderungen intrahepatischer Blutgefäße (Pinzani, 1999).

Es konnten bereits verschiedene Prozesse identifiziert werden, die als ursächlich für den fibrotischen Umbau des Lebergewebes gelten (Abb. 1.9).

Durch die andauernde Entzündung im Lebergewebe kommt es zunächst zur Aktivierung von Immunzellen, insbesondere Makrophagen. Im Rahmen einer Leberfibrose sind zwei Makrophagenpopulationen in der Leber zu finden, die unterschiedlichen Quellen entstammen. Eine Makrophagenpopulation differenziert sich im Rahmen einer Leberfibrose aus zirkulierenden Monozyten. Die zweite Population differenziert sich vermutlich aus residenten Kupffer-Zellen (Duffield et al., 2005). Aktivierte Makrophagen migrieren in die geschädigten Bereiche der Leber. Da es innerhalb dieser Bereiche im Rahmen der Leberfibrose zunehmend zu einer kollagenartigen Vernarbung des Gewebes kommt, werden diese Makrophagen auch als Narben-assoziierte Makrophagen (scar-associated macrophages, SAMs) bezeichnet. SAMs regulieren die Infiltration weiterer inflammatorischer Zellen sowie die Rekrutierung und Aktivierung von Fibroblasten (Leibovich und Ross, 1975;

Friedmann, 2005). Darüber hinaus setzen sie große Mengen des Angiogenesefaktors VEGF-A frei (Berse et al., 1992; Dirx et al., 2006). Während Makrophagen somit maßgeblich an der Entstehung einer Leberfibrose beteiligt sind, spielen sie darüber hinaus auch bei der Rückbildung einer Leberfibrose eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen während der Regenerationsphase einer Leberfibrose mit einer erhöhten MMP-Expression und folgend einem vermehrten Abbau von Kollagen assoziiert sind (Duffield et al., 2005).

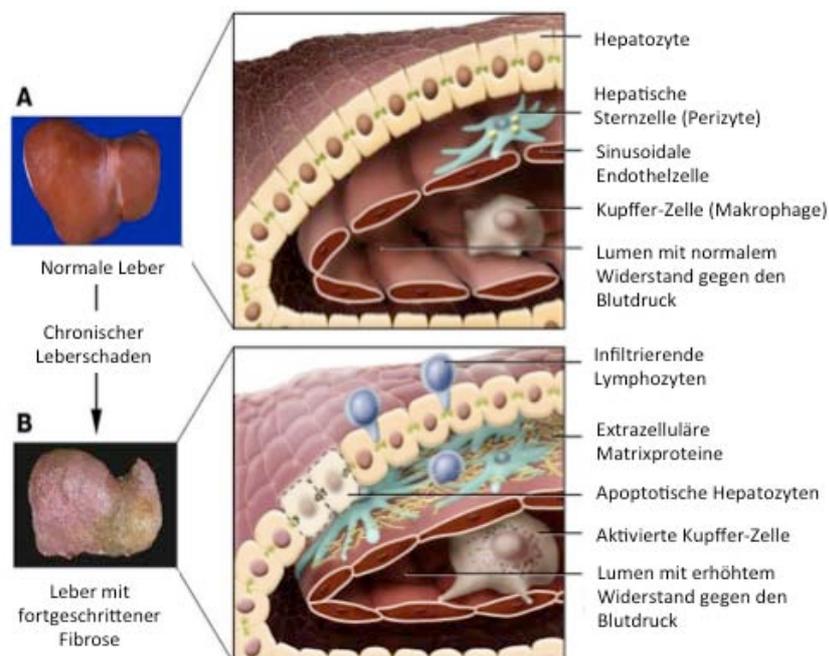


Abb. 1.9 Veränderung der Leberarchitektur im Rahmen einer Leberfibrose

A) Gesunde Leber bestehend aus fenestrierten sinusoidalen Endothelzellen mit residenten HSCs, intakten Hepatozyten und ruhenden Kupfer-Zellen. B) In der geschädigten Leber kommt es zu einer Einwanderung von Lymphozyten, einer Apoptose der Hepatozyten und einer Aktivierung der Kupfer-Zellen, die fibrinogene Mediatoren sezernieren. HSCs differenzieren zu Myofibroblasten und sezernieren große Mengen an ECM-Proteinen. Darüber hinaus verlieren sinusoidale Zellen ihre Fenestrierung (verändert nach Bataller und Brenner, 2005).

Myofibroblasten bilden eine weitere profibrotisch wirkende Zellpopulation. Wie bereits in 1.4.1 beschrieben, können die Vorläufer der Myofibroblasten, die Fibroblasten, unterschiedlichen Quellen entstammen. Die naheliegendste Vermutung ist, dass ruhende, im Disse-Raum befindliche Hepatische Sternzellen (HSCs) zu Myofibroblasten differenzieren. Die Differenzierung der HSCs wird über die Freisetzung verschiedener Zytokine durch Hepatozyten und Kupfer-Zellen initiiert (Bataller und Brenner, 2005, Naito et al., 2004). Ferner können knochenmarkansässige Fibrozyten oder zirkulierende mesenchymale Zellen in die

Leber migrieren und zu Myofibroblasten differenzieren (Kisseleva et al., 2006). Des Weiteren zeigten Hepatozyten *in vitro* die Fähigkeit, durch EMT zu Myofibroblasten zu differenzieren. Im Rahmen einer Leberfibrose gibt es bislang keine Hinweise auf eine *in vivo* EMT der Hepatozyten (Wells, 2010). Infolge ihrer Aktivierung produzieren Myofibroblasten große Mengen an Kollagen. Darüber hinaus sezernieren sie autoregulative Zytokine, die die myofibroblastische Aktivität aufrechterhalten. Die andauernde Aktivität der Myofibroblasten führt zu einer kontinuierlichen Neubildung von Kollagen, die langfristig den natürlichen Kollagenabbau übersteigt (Gabbiani, 2003; Desmouliere et al., 2005).

Entscheidend für den Kollagengehalt des Gewebes ist die Aktivität der MMPs, eine Gruppe von 23 verschiedenen Enzymen mit gemeinsamen funktionellen Eigenschaften. MMPs können Proteine durch Hydrolisierung spalten und somit den Abbau zahlreicher Bestandteile der ECM, wie Kollagene, Laminin, Fibronectin oder Proteoglycane, bewirken (Sternlicht und Werb, 2001). Exprimiert werden MMPs von einer Vielzahl verschiedener Zellen, unter anderem von Makrophagen, Myofibroblasten und Endothelzellen. Eine vollständige Degradierung der ECM wird durch die Tissue Inhibitor Metalloproteinases (TIMPs) verhindert. TIMPs hemmen die proteolytische Aktivität der MMPs durch die Bildung eines nicht kovalenten 1:1-Komplexes, wodurch der Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht gehalten wird (Gomez et al., 1997). Im Rahmen einer Leberfibrose kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs. Die Kombination aus der dauerhaften Bildung von Kollagen, einer verminderten MMP- und einer erhöhten TIMP-Expression führt dazu, dass überschüssiges Kollagen und weitere ECM-Bestandteile nicht abgebaut werden und sich der fibrotische Umbau des Gewebes somit fortsetzt (Iimuro und Brenner, 2007). Im Zuge der vermehrten Ablagerung von Kollagen im Lebergewebe werden apoptotische Hepatozyten durch extrazelluläre Matrix ersetzt, was zu einer drastischen Veränderung der Leberarchitektur führt (Arthur, 2000). Die zunehmende Substituierung des Leberparenchyms durch Bindegewebe resultiert in der Bildung kollagenreicher fibrotischer Narben (Ginés et al., 2004).

Entgegen der lange vorherrschenden Meinung, dass es sich bei der Leberfibrose um einen irreversiblen Prozess handelt, kann gegenwärtig davon ausgegangen werden, dass die Leberfibrose unter bestimmten Bedingungen reversibel ist (Issa et al., 2004).

Die Behandlung zugrundeliegender Primärerkrankungen kann zu einer deutlichen Rückbildung fibrotischer Areale führen (Dufour et al., 1998; Shiratori et al., 2000). Zahlreiche Patienten sprechen jedoch nicht, oder nur unzureichend, auf eine konventionelle Behandlung der Primärerkrankung an oder können aufgrund einer zu späten Diagnose nicht rechtzeitig behandelt werden. Die Patienten unterliegen weiterhin dem Risiko, infolge der Fibrose an einer Leberzirrhose mit portaler Hypertension oder an einem Leberzellkarzinom zu erkranken (Talwalkar, 2010). Aus diesem Grund ist es notwendig, Therapiestrategien zu entwickeln, die gezielt das Voranschreiten der Leberfibrose verhindern. Bislang wurden Wirkstoffe zur Behandlung einer Leberfibrose jedoch ausschließlich in Tiermodellen untersucht. Anhand von Maus- und Rattenmodellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung, Proliferation und Kontraktion der Myofibroblasten medikamentös gehemmt und die Apoptose der Myofibroblasten stimuliert werden kann (Wright et al., 2001; Douglass et al., 2008). Eine andere Strategie beschäftigt sich mit der pharmakologischen Hemmung der Kollagenproduktion (Galli et al., 2002; Roderfeld et al., 2006). Darüber hinaus werden die Auswirkungen von sowohl pro- als auch antiangiogenen Therapien auf die Entstehung einer Leberfibrose untersucht, worauf in Kapitel 1.4.2 detailliert eingegangen wird.

Einige der genannten Therapieansätze führten in Tiermodellen zwar zu einem Rückgang der Fibrose, doch bislang ist kein Medikament zur gezielten Behandlung einer Leberfibrose in die klinische Phase gelangt. Eine Lebertransplantation bleibt häufig die einzige langfristige Therapie, um das Überleben der Patienten zu sichern. Deshalb ist es notwendig, tiefere Einblicke in die Prozesse der Entstehung und vor allem der Rückbildung einer Leberfibrose zu erhalten, um effektive antifibrotische Therapien zu entwickeln.

1.4 Gefäßremodellierung im Rahmen von Gewebsfibrosen

Organfibrosen gehen mit Veränderungen der Blut- und Lymphgefäße einher, die sowohl die Neubildung als auch die Remodellierung bereits bestehender Blut- und Lymphgefäße umfassen. Die Rolle der Gefäßveränderungen bei der Entstehung und Rückbildung von Gewebsfibrosen ist jedoch Gegenstand einer kontrovers geführten Debatte. Es ist möglich, dass Gefäßveränderungen eine Voraussetzung für die Entstehung einer Fibrose darstellen. Eine andere Möglichkeit ist, dass es sich bei

den Gefäßveränderungen um einen kompensatorischen Mechanismus handelt, der dem fibrotischen Umbau des Gewebes entgegenwirkt. Ferner könnte es sich bei der Neubildung und Remodellierung von Blut- und Lymphgefäßen um ein Phänomen handeln, das keinerlei kausalen Zusammenhang mit dem Krankheitsbild aufweist (Coulon et al., 2010; Ebina et al., 2010; El-Chemaly et al., 2009; Fernandez et al., 2009; Hanumegowda et al., 2012; Tzouveleakis et al., 2006).

1.4.1 Lymphgefäßremodellierung im Rahmen einer Lungenfibrose

Aufgabe der Lymphgefäße ist es, die Flüssigkeitshomöostase in Geweben aufrechtzuerhalten. Darüber hinaus unterstützen Lymphgefäße das Immunsystem, indem sie Antigene und antigenpräsentierende Zellen zu den Lymphknoten weiterleiten (Casley-Smith, 1980; Tammela und Alitalo, 2010). Wie in 1.1.1 beschrieben, anastomosieren die pulmonalen Lymphgefäße entlang der Venenäste zur Pleura sowie parallel zu den Hauptbronchien und sammeln sich im Hiluslymphknoten. Die Alveolarsepten hingegen sind frei von Lymphkapillaren (Pusztaszeri et al., 2006).

Das Auftreten von Lymphangiogenese wird in zahlreichen inflammatorisch bedingten Erkrankungen, beispielsweise Psoriasis (Schuppenflechte) und Gelenkrheumatismus, beschrieben (Cueni und Detmar, 2008). Meist unterstützt die Lymphangiogenese in jenen Erkrankungen vor allem die Auflösung von Gewebsödemen durch den Abtransport von Lymphflüssigkeit, den Leukozytentransport durch das Lymphgefäßsystem sowie die Mobilisierung von Makrophagen und dendritischen Zellen (Karpanen und Alitalo, 2008; Kataru et al., 2009). Dabei gilt VEGF-C als ein Hauptfaktor der Lymphangiogenese (Ristimäki et al., 1998). Ob und welche Rolle die Lymphangiogenese für die Entstehung und den Verlauf einer Lungenfibrose spielt, wird bislang kontrovers diskutiert. Teles-Grilo et al. (2005) stellten fest, dass in einem Bleomycin-induzierten Rattenmodell der Lungenfibrose erst die Häm- und dann die Lymphangiogenese einsetzt. Untersuchungen humaner IPF Lungen ergaben ferner, dass Lymphangiogenese im frühen Stadium der Entstehung einer IPF auftritt. Während die Neubildung der Lymphgefäße in der fortgeschrittenen Phase der Krankheit zum Erliegen kommt, vergrößern sich die Lymphgefäße mit zunehmender Schwere der Krankheit. Die neugebildeten Lymphgefäße weisen dabei eine atypische Lokalisation auf. Sie finden sich in der Nähe der Alveolen, in den

peripheren Bereichen fibrotischer Areale und ebenso innerhalb der fibrotischen Bereiche (El-Chemaly et al., 2009). El-Chemaly et al. (2009) vermuten aufgrund dieser Ergebnisse, dass die Lymphangiogenese ursächlich für die Entstehung einer Lungenfibrose ist. Diese Annahme steht im Gegensatz zu einer Studie von Ebina et al. (2010), die einen Verlust der subpleuralen und interlobulären Lymphgefäße im Verlauf der IPF beschreiben. Sie vermuten, dass das Fehlen der Lymphgefäße nahe fibrotischer Läsionen dazu führt, dass die Lymphflüssigkeit nicht abtransportiert werden kann und die Entwicklung der Fibrose somit begünstigt wird. In Übereinstimmung mit dieser Theorie konnte in einem murinen Modell der chronischen Hautentzündung gezeigt werden, dass die Stimulation der Lymphangiogenese zu einer Reduktion der Entzündung führt (Huggenberger et al., 2010). Die Autoren dieser Studie vermuten, dass die Lymphangiogenese einen Kompensationsmechanismus darstellt, der infolge der Entstehung einer Lungenfibrose auftritt und der weiteren Entwicklung der Fibrose entgegenwirkt.

Nicht nur die Neubildung von Lymphgefäßen, sondern auch die Remodellierung und Dysfunktion bereits bestehender Lymphgefäße konnte im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder, wie Lymphödemen oder Tumorerkrankungen nachgewiesen werden (Dagenais et al., 2004; Isaka et al., 2004). Oftmals führt eine Remodellierung der Lymphgefäße zu einer Störung oder einem Verlust ihrer Funktion. Die Hauptfolge des Funktionsverlustes ist eine pathologische Ansammlung der Lymphe (Karpanen und Alitalo, 2008), wobei die Ursachen für die Dysfunktion von Lymphgefäßen unterschiedlicher Natur sein können.

In einem murinen Modell einer chronischen Hautentzündung konnte beispielsweise eine Hyperplasie der Lymphgefäße, also eine Zunahme der Lymphendothelzellen, infolge einer VEGFR3-Überexpression beobachtet werden (Baluk et al., 2005). Vermutlich führt die Hyperplasie zu einer Störung des Abtransports der Lymphflüssigkeit und schließlich zur Bildung von Ödemen. Eine andere Studie beschreibt, dass es infolge einer zu geringen Expression von Ang2 zu einem Verlust der muralen Zellen um Lymphsammelgefäße (Kollektoren) kommt. Der Verlust muraler Zellen führt dazu, dass die Gefäße permeabel werden und die Lymphe aus den Kollektoren austritt (Gale et al., 2002).

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass kutane Lymphgefäße von Lymphödem-Distichiasis-Patienten (LD-Patienten) von einer Schicht muraler Zellen

sowie einer Basalmembran umgeben sind (Petrova et al. 2004). Zur Untersuchung der pathogenetischen Mechanismen von LD, die unter anderem zu dieser abnormalen Remodellierung der Lymphgefäße führen, nutzten Petrova et al. (2004) ein murines FOXC2-KO-Modell. Ein FOXC2-KO führt in Mäusen zu Schäden, die mit dem Krankheitsbild von LD-Patienten, die ihrerseits eine FOXC2-Mutation aufweisen (Brice et al., 2002), vergleichbar sind. Somit eignet sich ein FOXC2-KO als murines Krankheitsmodell der LD. Petrova et al. (2004) konnten anhand dieses Modells zeigen, dass es infolge des FOXC2-KO zunächst zu einer Überexpression von PDGF-B in Lymphendothelzellen und infolgedessen zu einer Rekrutierung PDGFR- β -positiver muraler Zellen um Lymphgefäße kommt. Foo et al. (2006) stellten ferner fest, dass es in muriner Haut aufgrund eines Ephrin B2-Knockouts in glatten Muskelzellen, ebenfalls zu einer Assoziation der Lymphgefäße mit muralen Zellen kommt. Unter physiologischen Bedingungen bestehen Lymphgefäße aus einer einfachen Schicht Lymphendothelzellen. Eine Basalmembran sowie murale Zellen finden sich ausschließlich um Lymphkollektoren, nicht aber um Lymphkapillaren (Schulte-Merker et al., 2011). Aufgrund der Assoziation der Lymphgefäße mit muralen Zellen kommt es zu einem Permeabilitätsverlust. Lymphflüssigkeit kann nicht mehr in die Lymphgefäße eintreten und abtransportiert werden, wodurch es zu einer Störung des Lymphabflusses kommt (Petrova et al., 2004).

Obwohl die Remodellierung von Lymphgefäßen in zahlreichen Krankheitsbildern beobachtet wird, gibt es bislang keine Studie, die sich mit der Struktur von Lymphgefäßen im Rahmen der Lungenfibrose auseinandersetzt. El-Chemaly et al. (2009) stellten zwar fest, dass es während der IPF zu einer Hyperplasie der Lymphgefäße kommt, untersuchten aber weder den Aufbau der Gefäße, noch ob es durch die Hyperplasie zu einem Funktionsverlust kommt. Ob in der Lungenfibrose eine Dysfunktion der Lymphgefäße vorliegt und, wenn ja, welcher Mechanismus ihr zugrunde liegt, ist bislang unbekannt. Tiefere Kenntnisse über den Aufbau und die Funktion pulmonaler Lymphgefäße in der Lungenfibrose könnten einen wichtigen Beitrag dazu leisten, eine effektive Therapie zur Behandlung der IPF zu entwickeln.

1.4.2 Blutgefäßremodellierung im Rahmen einer Leberfibrose

Die Hämangiogenese spielt eine zentrale Rolle bei der Wiederherstellung von gesundem Gewebe infolge einer akuten oder chronischen Verletzung. Unter

physiologischen Bedingungen führt die Neubildung von Blutgefäßen zu einer gesteigerten Durchblutung des geschädigten Gewebes. Mit dem Blut eingetragener Sauerstoff verhindert eine andauernde Gewebshypoxie und das geschädigte Gewebe regeneriert sich durch mit dem Blut eingetragener Nährstoffe (Carmeliet, 2005; Zawicki et al., 1981).

Vaskuläre Veränderungen stellen ein Hauptcharakteristikum der Leberfibrose dar. Zu vaskulären Veränderungen zählen die Umschließung der Sinusoide durch kontrahierende Myofibroblasten (Lee et al., 2007), sowie die Bildung intrahepatischer portosystemischer Shunts, also funktioneller Kurzschlussverbindungen zwischen der Pfortader und der unteren Hohlvene (Vena Cava), die das Blut unter Umgehung des Leberparenchyms transportieren (Coulon et al., 2010). Darüber hinaus kommt es zu einer Kapillarisation der Sinusoide, also einem Verlust ihrer Fenestrierung (Onori et al., 2000). Die Kapillarisation der Sinusoide führt zunächst zum verminderten Blutfluss gegen einen erhöhten Widerstand und somit zu einer schlechteren Sauerstoffversorgung des Gewebes. Die aus der verminderten Sauerstoffversorgung resultierende Gewebshypoxie führt zu einer erhöhten Expression von Angiogenesefaktoren, was die Neubildung von Blutgefäßen initiiert (Corpechot et al., 2002) und schließlich in einer vermehrten Hämangiogenese resultiert (Yoshiji et al., 2003; Taura et al. 2008). Unter den vielen Faktoren, die an den komplexen Vorgängen der Hämangiogenese beteiligt sind, gilt VEGF-A als wichtigster Angiogenesefaktor für diesen Prozess (Gerber et al., 1999; Carmeliet und Jain, 2011).

Die Hämangiogenese ist zwar ein Charakteristikum der Leberfibrose, ihre Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf der Krankheit ist jedoch umstritten. Es konnte sowohl in humanen als auch murinen Leberproben gezeigt werden, dass die Anzahl der neugebildeten Blutgefäße mit dem Fortschreiten der Leberfibrose korreliert (Taura et al., 2008). Daher wurden zahlreiche Anti-Angiogenese-Therapien getestet, deren Erfolge jedoch fraglich sind. Einerseits konnte in einer Vielzahl von Tierstudien belegt werden, dass die Verabreichung von Hämangiogenese-Hemmern zu einer Reduktion der Leberfibrose führt. So verhindert beispielsweise die Gabe des Angiogenese-Inhibitors Angiostatin das Voranschreiten der Leberfibrose (Vogten et al., 2004). Auch die pharmakologische Neutralisierung der VEGF-Rezeptoren

VEGFR-1 und VEGFR-2 führt zu einer verminderten Ausprägung der Leberfibrose (Yoshiji et al., 2003). Die Verabreichung weiterer Angiogenese-Inhibitoren wie TNP-470 oder SU11248 haben ebenfalls eine deutlich mildere Ausprägung der Leberfibrose zur Folge (Tugues et al., 2007; Wang et al., 2000).

Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die Hemmung der Hämangiogenese zu einer stärkeren Ausprägung der Leberfibrose führt. Die Inhibition des Integrins $\alpha\beta 3$ beispielsweise, welches die Migration und Proliferation von ECs vermittelt und somit zur Neubildung von Blutgefäßen beiträgt, führt zu einer deutlichen Verschlechterung der Leberfibrose (Patsenker et al., 2009). In einem Rattenmodell der renalen Fibrose resultierte die Gabe von VEGF-A, und somit die Stimulation der Hämangiogenese, in einer Reduktion der Fibrose (Kang et al., 2001). In Übereinstimmung mit diesen Studien wurde in einem Mausmodell für Lungenfibrose gezeigt, dass es unter der Abwesenheit von VEGF-A aus myeloischen Zellen zu einer Reduktion der Hämangiogenese kommt und die Entstehung der Fibrose beschleunigt wird (Stockmann et al., 2010). Diese Studien weisen darauf hin, dass die Neubildung von Blutgefäßen einen kompensatorischen Mechanismus darstellt, der das Fortschreiten einer Fibrose verhindert.

Die genannten Studien beschäftigen sich weitestgehend mit der Rolle der Hämangiogenese während der Entstehung einer Fibrose. Obwohl es sich bei der Leberfibrose um einen reversiblen Prozess handelt, gibt es bislang kaum Erkenntnisse über die Auswirkung der Gefäßremodellierung auf die Rückbildung einer Leberfibrose. Aktuell lassen einzig Studien von partiellen Hepatektomien einen Aufschluss über die Bedeutung der Hämangiogenese für die Regeneration der Leber zu. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass sinusoidale Endothelzellen infolge einer partiellen Hepatektomie durch die Freisetzung von speziellen Wachstumsfaktoren, sogenannten *angiokrinen Faktoren*, in ihrer unmittelbaren Umgebung zunächst die Proliferation von Hepatozyten und folgend die Regeneration des Lebergewebes initiieren (Ding et al., 2010). Lebersinusoide können somit direkt an einer Regeneration der Leber beteiligt sein. Darüber hinaus konnte die Behandlung von partiell hepatektomierten Mäusen mit exogenem VEGF-A die Regeneration der Leber beschleunigen (Beaudry et al., 2007), was die Vermutung zulässt, dass VEGF-A eine Rolle bei der Rückbildung einer Leberfibrose spielt. Eine wichtige VEGF-A-Quelle stellen die Makrophagen dar (Berse et al., 1992; Dirx et al., 2006), welche im

Rahmen einer Leberfibrose in großen Mengen im fibrotischen Gewebe akkumulieren (Friedmann, 2005). Daher könnte die Untersuchung des Effekts von Myeloidzell-spezifischem VEGF-A auf die Rückbildung einer Leberfibrose helfen, die Mechanismen, die der Rückbildung einer Leberfibrose zugrunde liegen, besser zu verstehen. Tiefergehende Kenntnisse über die Rolle der VEGF-abhängigen Hämangiogenese im Rahmen der Rückbildung einer Leberfibrose könnten dazu beitragen, zukünftig eine effektivere Behandlung der Krankheit zu ermöglichen.

2. Zielsetzung

Organfibrosen, zu denen die Lungen- und Leberfibrose gehören, erlangten in den vergangenen Jahren eine wachsende Bedeutung. In den Industriestaaten lassen sich gegenwärtig etwa 45% aller Todesfälle auf Erkrankungen zurückführen, die mit fibrotischen Veränderungen des Gewebes einhergehen (Wynn, 2007). Ein Charakteristikum von Gewebsfibrosen stellt die Neubildung und Remodellierung von Blut- und Lymphgefäßen dar. Obwohl die Rolle von Blut- und Lymphgefäßen in Gewebsfibrosen Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten ist, ist ihr Einfluss noch nicht in Gänze verstanden und wird kontrovers diskutiert.

Während eine Remodellierung von Lymphgefäßen mit einer Vielzahl an Erkrankungen assoziiert werden kann, gibt es über die Rolle der Lymphgefäße während der Entstehung einer Lungenfibrose nur marginale Erkenntnisse. Es ist unklar, ob es während einer IPF zu einer Neubildung oder einer Degression der Lymphgefäße kommt. Ferner ist nicht bekannt, ob die Entstehung einer IPF mit einer Remodellierung lymphatischer Gefäße assoziiert ist. Ziel des ersten Teils der Arbeit war daher, den Einfluss der Lymphgefäße auf die Entstehung einer Lungenfibrose zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollte ermittelt werden, ob es im Rahmen einer Lungenfibrose zu einer Neubildung von Lymphgefäßen kommt. Darüber hinaus sollten die Lymphgefäße charakterisiert, und die Folgen einer möglichen Remodellierung der Lymphgefäße für die Lungenfibrose ermittelt werden. Für die Untersuchung der angegebenen Fragestellungen wurde das Mausmodell einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose genutzt.

Die Rolle der Hämangiogenese im Rahmen der Entstehung einer Leberfibrose ist zwar bereits vielfach untersucht worden, die Ergebnisse sind allerdings höchst widersprüchlich. Während einerseits gezeigt werden konnte, dass die Neubildung von Blutgefäßen die Entstehung der Leberfibrose unterstützt, zeigten andere Arbeiten, dass die Fibrose durch die Hemmung der Hämangiogenese deutlich stärker voranschreitet. Darüber hinaus gibt es keine Kenntnisse über die Rolle der Hämangiogenese bei der Rückbildung einer Leberfibrose, obwohl bekannt ist, dass es sich bei einer Leberfibrose um einen bedingt reversiblen Prozess handelt. Als wichtigster Faktor für die Hämangiogenese gilt VEGF-A. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Gabe von VEGF-A infolge einer partiellen Hepatektomie die

Leberregeneration fördert (Beaudry et al., 2007), ob VEGF-A aber eine Rolle bei der Rückbildung einer Leberfibrose besitzt, ist bislang nicht bekannt. Als eine wichtige Quelle von VEGF-A gelten Makrophagen, die im Zuge einer Leberfibrose zahlreich im Gewebe akkumulieren (Berse et al., 1992; Dirkx et al., 2006; Friedmann, 2005). Die zentrale Frage des zweiten Teils der Arbeit war daher, ob VEGF-A aus Makrophagen die Neubildung der Blutgefäße im Rahmen der Rückbildung einer Leberfibrose beeinflusst und welchen Effekt dies auf die Regression der Fibrose ausübt. Zur Untersuchung der Fragestellung wurde ein Mausmodell für einen Myeloidzell-spezifischen VEGF-A-Knockout genutzt.

3. Material und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 3.1 Verwendete Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Brutschrank	Hera Cell 240	Thermo Scientific
Chirurgische Instrumente		Aesculap
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories
Geldokumentation	BioDoc-It Imaging System	UVP Cambridge
Fluoreszenz- und Chemilumineszenzsystem	Fusion-FX7	Peqlab
Heizblock	HTM 130	HLC
Kryotom		Thermo Fisher Scientific
Mikroskop	E1000 Eclipse	Nikon
-Kamera	DS-Ri1 camera system	Nikon
Mikrotom	HM340-E	Thermo Fisher Scientific
Nanodrop	Epoch	BioTek
Netzgeräte	Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories
PCR-Gerät	Thermocycler T-professional	Biometra
	Mastercycler	Eppendorf
Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph
pH-Meter	PH 3.3	Mellter Taledo
Photometer	Smart Spec 300	Bio-Rad Laboratories
Pipetten	(10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Gilson
Pumpe (Absaugen)		Schuett Biotec
Real Time PCR-Gerät	IQ5 iCycler	Bio-Rad Laboratories
Sterile Werkbank	HERAsafe	Haereus
Vortexer		Select Bioproducts
Waage	Ken GS	Satorius
Western Blot-Kammer	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories
Zählkammer	Neubauer	Ratiomed
Zellisolation	MACS Miltenyi	Miltenyi Biotec

Zentrifugen (Tisch-)	Biofuge pico	Heraeus Instruments
	Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Zentrifugen (Kühl-)	Biofuge fresco	Heraeus Instruments
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf
	Labofuge 400 R function line	Heraeus Instruments

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
6-Well-Platten	Sarstedt
96-Well-Platten	DB-Biosciences
Blot Papier	Bio-Rad Laboratories
Deckgläser	Waldeck
Glasplättchen (rund)	Thermo Fisher Scientific
Histosetten	Medite
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (Glas)	Brand
Mikrovetten	Sarstedt
Nagellack	Handelsüblich
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll
Objekträger	R. Langenbrinck
Petrischalen	Sarstedt
Pipetboy comfort	Integra Biosciences
Pipettenspitzen - nicht gestopft	Sarstedt
- gestopft	Biozym
Plastikröhrchen (steril, 15 und 50 ml)	Greiner
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Spritzen (1 ml, 5 ml)	Braun
Kanülen (22G, 27G)	Braun
Wachsstift (Pap pen)	Sigma

3.3 Substanzen

3.3.1 Chemikalien

Tabelle 3.3 Verwendete Chemikalien

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Dextran, Alexa Fluor® 488, 10.000 MW	Invitrogen
2-Desoxyadenosin-5-Triphosphat (dATP)	Fermentas
2-Desoxycytidin-5-Triphosphat (dCTP)	Fermentas
2-Desoxyguanosin-5-Triphosphat (dGTP)	Fermentas
2-Desoxythymidin-5-Triphosphat (dTTP)	Fermentas
Acrylamid 30%	Bio-Rad Laboratories
AG-1296	Cayman Chemical
Agarose	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories
Bleomycin	Calbiochem
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Serva
Collagen I	BD Biosciences
Collagenase Typ 3	Worthington
Cytoseal XYL Mounting Medium	Microm
DAPI Nucleic Acid Stain	Invitrogen
DEPC	Sigma
DirectPCR® Lysis Reagent Ear	Peqlab
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad Laboratories
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DQ Gelatin	Invitrogen
Eosin	Sigma
Epitope Retrieval Solution	DAKO
Ethanol	Sigma

Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
EDTA-free Protease Inhibitor Cocktails Tablets	Roche
Fibronectin	Sigma
Fötales Rinderserum (FBS)	BioChrom
Gelatine	Invitrogen
Guanidinisothiocyanat (GTC)	Roth
Glycin	Fluka
Isofluran (Forene)	Abbott
Isopropanol	Sigma
Kalسيومchlorid	AppliChem
anti-mLyve1	R&D Systems
Methanol	J.T. Baker
Milchpulver	Sucofin
MicroBeads (Anti-rat, Anti-rabbit IgG)	Miltenyi Biotec
Fluorescence Mounting Medium	DAKO
Natriumchlorid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Neomycin	Sigma
Normal Goat Serum	Sigma
OCT Compound Tissue Tek	Sakura
Paraformaldehyd (PFA)	Prolabo
Phenol	AppliChem
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	AppliChem
Polymyxin B	Sigma
Proteinase K	Fermentas
Reagenz A, B	Bio-Rad Laboratories
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce

Substrate-Chromogen Solution mit DAB	DAKO
Sudan Black	Sigma
Target Retrieval Lösung	DAKO
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Tetrachlormethan (CCl ₄)	Sigma
TRIS	Fluka
TRIS-EDTA Buffer Solution pH 8,0	Fluka
Tween20	Roth
Wasserstoffperoxid	Sigma
Xylol	Sigma

3.3.2 Antikörper

Tabelle 3.4 Primärantikörper

<i>Antigen</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
Mouse Serum Albumin	<i>goat</i>	Abcam	1:500	60 Min
CD31	<i>rat</i>	BD	1:100	12 h
CD34	<i>rat</i>		1:200	12 h
CD44	<i>rabbit</i>	Sigma-Aldrich	1:50	12 h
D2-40	<i>mouse</i>	Dako	1:200	60 Min
DAPI		Invitrogen	1:1000	5 Min
FSP (S100A4)	<i>rabbit</i>	Dako	1:200	2 h
HA (biotinylated hyaluronan-binding peptide)		Calbiochem	1:100	12 h
Laminin	<i>rabbit</i>	Sigma-Aldrich	1:50	12 h
Lyve1	<i>rabbit</i>	Abcam	1:200	60 Min
Mac2	<i>mouse</i>	Cedarlane	1:100	60 Min
PDGF-BB	<i>rabbit</i>	Abcam	1:100	12 h
PDGFR-β	<i>rabbit</i>	Cell Signaling	1:100	12 h
phospho-PDGFR-β	<i>mouse</i>	Cell Signaling	1:50	12 h

Prox1	<i>goat</i>	R&D	1:200	60 Min
α -SMA	<i>mouse</i>	Chemicon	1:500	60 Min
VEGFR-2	<i>rabbit</i>	Cell Signaling	1:100	12 h
VEGFR3	<i>rat</i>	BD Biosciences	1:100	12 h

Tabelle 3.5 Sekundärantikörper

<i>Antigen</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
Alexa Fluor 488/ Alexa Fluor 568 <i>anti-mouse</i>	<i>goat</i>	Invitrogen	1:200	30 min
Alexa Fluor 488/ Alexa Fluor 568 <i>anti-rabbit</i>	<i>goat</i>	Invitrogen	1:200	30 min
Alexa Fluor 488/ Alexa Fluor 568 <i>anti-rat</i>	<i>goat</i>	Invitrogen	1:200	30 min
<i>anti-rabbit</i> -Biotin	<i>goat</i>	Santa Cruz	1:200 (IHC)	30 min
<i>anti-rat</i> -Biotin	<i>goat</i>	Santa Cruz	1:200 (IHC)	30 min
<i>anti-rabbit</i> -HRP	<i>goat</i>	Santa Cruz	1:1000 (Western Blot)	1 h
<i>anti-mouse</i> -HRP	<i>goat</i>	Santa Cruz	1:1000 (Western Blot)	1 h

Tabelle 3.6 Western Blot-Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Inkubationsdauer</i>
α -Tubulin	<i>mouse</i>	Santa Cruz	1:1000	über Nacht
phospho-PDGFR- β	<i>mouse</i>	Cell Signaling	1:1000	über Nach
PDGFR- β	<i>rabbit</i>	Cell Signaling	1:1000	über Nacht

3.3.3 Primer

Tabelle 3.7 Murine Primer

Zielgen	Primer-Art	Sequenz (5' → 3')
16S	<i>fwd.</i>	AGA TGA TCG AGC CGC GC
	<i>rev.</i>	GCT ACC AGG GCC TTT GAG ATG GA
Cre	<i>fwd.</i>	TGC AAG TTG AAT AAC CGG AAA
	<i>rev.</i>	CTA GAG CCT GTT TTG CAC GTT C
Ang1	<i>fwd.</i>	GAT CTT ACA CGG TGC CGA TT
	<i>rev.</i>	TTA GAT TGG AAG GGC CAC AG
Ang2	<i>fwd.</i>	TCC AAG AGC TCG GTT GCT AT
	<i>rev.</i>	AGT TGG GGA AGG TCA GTG TG
Endoglin	<i>fwd.</i>	CTG CCA ATG CTG TGC GTG AA
	<i>rev.</i>	GCT GGA GTC GTA GGC CAA GT
Ephrin B2	<i>fwd.</i>	GAC TTC GGA GCT TGC ACC ATC
	<i>rev.</i>	AAC ACC CGA ATC CAT AGA CGG TAA
Ephrin B4	<i>fwd.</i>	CGT CCT GAT GTC ACC TAT ACC TTT GAG G
	<i>rev.</i>	GAG TAC TCA ACT TCC CTC CCA TTG GTC T
VEGF-A	<i>fwd.</i>	CCG AGC AGC TTC TAG TTT GGA
	<i>rev.</i>	ATG GGA TGC TGA GCG TGA GT
MMP2	<i>fwd.</i>	GGC TGG AAC ACT CTC AGG AC
	<i>rev.</i>	CGA TGC CAT CAA AGA CAA TG
MMP3	<i>fwd.</i>	ACT CTA CCA CTC AGC CAA GG
	<i>rev.</i>	TCC AGA GAG TTA GAC TTG GTG G
MMP9	<i>fwd.</i>	CGG CAC GCT GGA ATG ATC
	<i>rev.</i>	TCG AAC TTC GAC ACT GAC AAG AA
MMP7	<i>fwd.</i>	GCT CTC AGA ATG TGG AGT ATG C
	<i>rev.</i>	AAG TTC ACT CCT GCG TCC
MMP13	<i>fwd.</i>	TGA TGG CAC TGC TGA CAT CAT
	<i>rev.</i>	TGT AGC CTT TGG AAC TGC TT
MMP14	<i>fwd.</i>	GTG CCC TAT GCC TAC ATC CG
	<i>rev.</i>	CAG CCA CCA AGA AGA TGT CA
MMP15	<i>fwd.</i>	GAC CAG TAT GGC CCC AAC AT
	<i>rev.</i>	CCA ATT GGC ATG GGG TAG TT

<i>PDGF-A</i>	<i>fwd.</i> <i>rev.</i>	CAA GAC CAG GAC GGT CAT TT ACT TTG GCC ACC TTG ACA CT
<i>PDGF-B</i>	<i>fwd.</i> <i>rev.</i>	CAT CCG CTC CTT TGA TGA TCT T ATG AGC TTT CCA ACT CGA CTC C
<i>PDGFR-β</i>	<i>fwd.</i> <i>rev.</i>	TTG CCA GTT CCA CCT TGA ATG TTG TGC CTC AGG CTC TGC TT
<i>TIMP1</i>	<i>fwd.</i> <i>rev.</i>	CGC AGA TAT CCG GTA CGC CTA CAC AAG CCT GGA TTC CGT GG
<i>TIMP2</i>	<i>fwd.</i> <i>rev.</i>	GGA ATG ACA TCT ATG GCA ACC GGC CGT GTA GAT AAA CTC GAT
<i>TIMP3</i>	<i>fwd.</i> <i>rev.</i>	TGA CAG GGC GCG TGT ATG AAG G GTG GTA GCG GTA ATT GAG GCC

3.3.4 RT-Reagenzien, PCR-Zusätze

Tabelle 3.8 Reagenzien und Zusätze

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
5x PCR-Puffer	Promega
10x PCR-Puffer	Invitrogen
100 kb DNA Ladder	Invitrogen
Reverse Transkriptase	Promega
RT-5x Puffer	Promega
Oligo dT	Invitrogen
NTPs	Qiagen
Taq Polymerase	Invitrogen, Promega
MgCl ₂	Invitrogen
qPCR MasterMix Plus for SYBRGreen I	Eurogentec

3.3.5 Puffer

Tabelle 3.9 Verwendete Puffer und Lösungen

<i>Puffer</i>	<i>Zusammensetzung</i>
4x lower Tris Puffer	150 mM Tris, 0,4% (w/v) SDS, pH 8,8
4x SDS Probenpuffer	240 mM Tris pH 6,8, 40% Glycerin, 8% SDS, 0,04% (m/v) Bromphenolblau, 5% β -Mercaptoethanol
4x upper Tris Puffer	250 mM Tris, 0,8% (w/v) SDS, pH 6,8
Blotpuffer (SDS-Page)	20 mM Tris, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8,6
DNA-Ladepuffer (5x)	0,025% (m/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 20% (m/v) Ficoll 400, 0,025% (m/v) Xylencyanol
dNTP-Mix	25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP
Laufpuffer (SDS-Page, 10x)	250 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3
Lysepuffer (Gesamtlysat Western Blot)	50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4 , 1-fach Pi, 1% TritonX, 73,5% dd- H_2O
MACS-Puffer	2 mM EDTA, 1% FBS in 1x PBS, pH 7,2
PBS, pH 7,2	137 mM NaCl_2 , 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH = 7,4
PBS-T	0,1% (v/v) Tween 20 in 1x PBS
Blockierungslösung	5% NGS in PBS-T
TBS	150 mM Tris, 50 mM NaCl
TBS-T	150 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,1% Tween20
TAE-Puffer	2 M Tris, 1 M Essigsäure, 0,05 M EDTA
Reaktionspuffer, Zymographie	0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 5 mM CaCl_2 , 2 mM NaN_3 , 40 $\mu\text{g/ml}$ DQ Gelatin, pH 7,6

3.3.6 Zellkulturmedien

Tabelle 3.10 Verwendete Zellkulturmedien

<i>Medium</i>	<i>Hersteller</i>
Clonetics endothelial cell basal medium-2	Lonza
+ Clonetics EGM-2 MV SingleQuots	Lonza
DMEM	Invitrogen
RPMI 1640	Invitrogen

3.3.7 Kits

Tabelle 3.11 Verwendete Kits

<i>Medium</i>	<i>Hersteller</i>
Amersham™ ECL™ Detection Systems	GE Healthcare
DAB-Kit	Vectastain
Hyaluronic Acid Test Kit	Corgemix
Mouse-on-Mouse Kit	Vectastain
Picrosirius Red Stain Kit	Polysciences Inc.
Qiaex II Gel Extraction Kit (150)	Qiagen
ABC-Kit Elite Standard	Vectastain

3.4 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Mäuse. Die Haltung der Mäuse und die Generierung transgener Mausstämme werden im Folgenden erläutert.

3.4.1 Tierhaltung

Alle Mäuse wurden im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen unter kontrollierten Umweltbedingungen gehalten. Bis zu fünf männliche oder weibliche Mäuse des Stammes C57Bl6/J wurden in Standardkäfigen und einem konstanten 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Alle Mäuse wiesen den gleichen

genetischen Hintergrund auf. Sie erhielten pelletiertes Alleinfuttermittel und Trinkwasser *ad libitum*. Die Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Vorschriften zur Haltung und Verwendung von Labortieren des Uniklinikums Essen und in Übereinstimmung mit dem Tierschutz nach Art. 20a GG.

Die Anzeige des Tierversuchs oder der Organentnahme bei den betroffenen Versuchstieren wurde unter der Ordnungsnummer G-1136/10 vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen bewilligt.

3.4.2 Transgene Mausstämme

Das *Cre/LoxP-System* ist ein patentiertes Rekombinationssystem, durch das gewebespezifische Gene in Organismen ausgeschaltet werden können. *Cre* (*Cyclization Recombination*) ist eine Rekombinase, die aus dem Bakteriophagen P1 stammt. Die *LoxP* (*locus of X-over P*)-Sequenz (ATAACTTCGTATA-GCATACAT-TATACGAAGTTAT) ist die typische Erkennungssequenz des Enzyms *Cre* (Nagy, 2000). Der von uns verwendete Knockout-Stamm mit der dazugehörigen Kontrolle wurde unserer Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Randall Johnson (University of California, San Diego) zur Verfügung gestellt. Bei den Knockout-Mäusen handelt es sich um Tiere des Stammes C57Bl/6J, die in den Zellen der myeloischen Reihe einen VEGF-A-Knockout aufweisen (Stockmann et al., 2008).

Ein Myeloidzell-spezifischer Knockout von VEGF-A wurde wie folgt generiert: In den sogenannten geflochten Zielmäusen (VEGF-A^{+f/+f}) ist ein Exon des *VEGF-A*-Gens auf beiden Allelen von *loxP*-sites flankiert (gefloxt). Die *loxP*-Sequenzen wurden so in die Introns, die das Exon flankieren, eingebracht, dass das *VEGF-A*-Gen funktionsfähig bleibt. Um einen myeloischen Knockout für VEGF-A zu generieren, wurden die VEGF-A^{+f/+f}-Mäuse mit einer gewebespezifischen *LysM/Cre*-positiven Maus gepaart. In dieser Maus wurde das *Cre*-Transgen unter Kontrolle des LysozymM (LysM)-Promoters in das Mausgenom integriert. Der LysM-Promoter ist spezifisch für myeloische Zellen. Das bedeutet, dass *Cre*-positive Mäuse das *Cre* in Granulozyten und Makrophagen sowie in etwa 16% aller dendritischen Zellen exprimieren (Clausen et al., 1999). Das *Cre* „erkennt“ die *loxP*-Sequenzen und schneidet den davon eingegrenzten DNA-Abschnitt aus dem Chromosom heraus. Es kommt zu einer Leserasterverschiebung, die dazu führt, dass aus der resultierenden mRNA kein funktionelles VEGF-A-Protein mehr gebildet werden kann. Die in dieser

Arbeit als Wildtyp bezeichneten Mäuse des Stammes C57Bl6/J enthalten das VEGF-A-Gen auf beiden Allelen von zwei *loxP*-Bindestellen flankiert ("gefloxte Mäuse"), sind jedoch Cre-negativ. VEGF-A wird im Folgenden als VEGF bezeichnet.

Das Knochenmark aus Mäusen eines weiteren transgenen Stammes mit einem globalen Knockout für den Obeflächenrezeptor CD44 (CD44^{-/-}) (Schmits et al., 1997) wurde uns von Frau Prof. Dr. Véronique Orian-Rousseau (Karlsruher Institut für Technologie, Institut für Toxikologie und Genetik, Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

3.5 Tierexperimentelle Arbeiten

3.5.1 Genotypisierung

Im Alter von etwa vier Wochen wurden die Mäuse abgesetzt und durch das Ausstanzen eines oder mehrerer Ohrlöcher markiert. Das Ohrgewebe wurde mit 100 µl DirectPCR[®]-Ear (Peqlab) und 1 µl Proteinase K (20 mg/ml, Fermentas) vermengt und für mindestens 5 h bei 55°C unter milder Schüttelbewegung bis zur kompletten Lyse des Gewebes auf einem Heizblock (HCL) inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur für 45 Min. auf 85°C erhöht. Das Produkt konnte direkt in die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Bei der Genotypisierungs-PCR wurde das Myeloidzell-spezifische Cre als Primer genutzt. Der PCR-Ansatz bestand aus 2 µl NTPs, 5 µl 5x PCR-Puffer, je 0,5 µl der beiden gewünschten Cre-Primer, 15 µl Aqua *bidest.* und 0,05 µl Taq-Polymerase (2,5 U). Die Durchführung der PCR erfolgte wie in Kapitel 2.7.5 beschrieben.

3.5.2 Induktion einer Lungenfibrose

Für die Induktion einer Lungenfibrose wurde das Glykosid Bleomycin verwendet (Adamson und Bowden, 1974). Hierbei handelt es sich um ein Antibiotikum, das aus dem *Streptomyces verticillus* gewonnen wird (Umezawa et al., 1966). Da es zu einer Schädigung der DNA in Tumorzellen führt, wurde Bleomycin in der Humanmedizin als Chemotherapeutikum eingesetzt (Mathé et al., 1970). Eine der bekanntesten Nebenwirkungen von Bleomycin jedoch ist die Entstehung einer Lungenfibrose. Durch die wiederholte Gabe von Bleomycin kommt es in der Lunge zu einer erhöhten Konzentration von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), einer Verringerung von Nicotinamid-Adenin-Dinukelotid (NAD) und Adenosintriphosphat (ATP) und zu einer

Überproduktion von Kollagen, was wiederum zu einer Lungenfibrose führt (Rudders und Hensley, 1973).

Zur Induktion der Lungenfibrose wurden nicht transgene, weibliche C57Bl6/J-Mäuse aus der Zucht des Zentralen Tierlaboratoriums des Universitätsklinikums Essen im Alter von zehn bis zwölf Wochen genutzt. Den Versuchstieren wurde Bleomycin in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht zweimal wöchentlich intraperitoneal (i.p.) über einen Zeitraum von vier Wochen oder einmalig 0,05 mg intratracheal (i.t.) injiziert. Jedes Tier erhielt die nötige Dosis gelöst in 100 µl sterilem PBS. Kontrollen erhielten vier Wochen lang, zweimal wöchentlich 100 µl steriles PBS i.p. Die Lungen wurden an Tag 28 entnommen.

3.5.3 Induktion einer Leberfibrose

Für die Induktion einer Leberfibrose wurde Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) eingesetzt. Infolge der Reduktion von CCl₄ durch die Monoxygenase Cytochrom-P450 in der Leber entstehen freie Trichloromethyl-Radikale, die eine Peroxidation von Lipiden bewirken. Die oxidative Degradierung der Lipide führt in der Leber zur Schädigung der Membranen des Endoplasmatischen Reticulums und der Mitochondrien. Es kommt zur Apoptose der Hepatozyten und einer Aktivierung hepatischer Sternzellen. Es folgt eine vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix insbesondere in den Bereichen der Periportalfelder sowie der Zentralvenen (Domitrovic et al., 2005; Recknagel et al., 1989).

Zur Induktion der Leberfibrose wurde weiblichen VEGF-A-Knockout- (KO-) sowie Wildtyp- (WT-) Mäusen, im Alter von zehn bis zwölf Wochen, Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) in einer Dosis von 240 µl/kg Körpergewicht zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von entweder sechs oder zwölf Wochen i.p. injiziert. Die Einzeldosis von 6 µl CCl₄ (für eine 25 g schwere Maus) wurde in 94 µl Olivenöl gelöst, da CCl₄ wasserunlöslich ist. Als Kontrollen wurden weibliche WT- und KO-Mäuse über zwölf Wochen mit 100 µl Olivenöl behandelt. Um die Rückbildung einer Leberfibrose untersuchen zu können wurden weibliche WT- und KO-Mäuse im Alter von zehn bis zwölf Wochen über einen Zeitraum von zwölf Wochen mit CCl₄ behandelt (240 µl/kg Körpergewicht). Anschließend wurde die Leber jedoch erst nach einer Rückbildungsdauer von weiteren vier Wochen entnommen.

3.5.4 Verwendung weiterer Tiermodelle

Zur Induktion von Wunden wurde KO- und WT-Mäusen auf dem fellfreien Rücken eine 8 mm-große runde Stanzbiopsie zugefügt. Nach Eintritt der Wundheilung wurden die Tiere an Tag 14 getötet und das Wundgewebe entnommen.

Zur Untersuchung des muralen Zellbesatzes von Lymphgefäßen in Tumoren wurden *Polyoma middle T-antigen* (PyMT)-Tumore genutzt. Dabei handelt es sich um Tumore der Brustdrüsen. Dieses Modell beruht auf der Integration des Onkoproteins PymT unter der Expressionskontrolle des Promoters des Maus-Mammatumovirus (MMTV) in das murine Genom. Das führt zu einer raschen Karzinogenese im Mammagewebe. PyMT-Tumore entwickeln sich in weiblichen Mäusen aufgrund der genetischen Veränderung spontan und sind bereits in der dritten Lebenswoche nachweisbar (Guy et al., 1992). Mäuse, die Tumore ausbildeten, wurden im Alter von 20 Wochen getötet um die Tumore zu entnehmen.

3.5.5 Hemmung der PDGFR- β -Signalübertragung

Zur Hemmung der Signalübertragung des PDGFR- β wurde weiblichen C57Bl6/J-Mäusen fünfmal wöchentlich 0,5 ng des PDGFR- β -Inhibitors AG-1296 (gelöst in 100 μ l sterilem PBS) i.p. injiziert. Die Behandlung begann an Tag 14 nach der ersten Bleomycin-Injektion und endete mit der letzten Bleomycin-Injektion nach weiteren zwei Wochen. Kontroll-Mäusen wurde 0,5 ng AG-1296 i.p. fünfmal wöchentlich über einen Zeitraum von zwei Wochen injiziert, ohne gleichzeitige Bleomycin-Behandlung. Die Lungen aller Tiere wurden an Tag 28 entnommen.

3.5.6 488-Dextran Assay

Mittels eines 488-Dextran Assays kann die Transportkapazität pulmonaler Lymphgefäße untersucht werden. Der Assay basiert auf der Beseitigung von 488-Dextran aus der Lunge über die Lymphgefäße. Das fluoreszenzmarkierte Polysaccharid 488-Dextran wird intratracheal in die Lunge eingebracht und dort, aufgrund seiner Größe, nicht über Blut- sondern Lymphgefäße abtransportiert. Das in der Lunge verbleibende Fluoreszenzsignal des 488-Dextran erlaubt daher Rückschlüsse auf die Transportfähigkeit des Lymphgefäßsystems. Zur Durchführung dieses Assays erhielten weibliche C57Bl6/J-Mäuse, denen zuvor PBS, Bleomycin oder Bleomycin+AG-1296 i.p. injiziert wurde, an Tag 28 50 μ l 488-Dextran, 10 000

MW (5 µg pro 1 µl PBS) intratracheal (i.t.). Die Tiere wurden in zwei Versuchsgruppen aufgeteilt. Mäusen der ersten Gruppe wurden die Lungen nach 15 Minuten, den Mäusen der zweiten Gruppe nach 50 Minuten entnommen. Die prätrachealen Lymphknoten wurden nach 50 Minuten entnommen. Das Fluoreszenzsignal auf den Gewebeschnitten wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie abfotografiert und die Stärke des Signals mit ImageJ bestimmt.

Um die Permeabilität von Blutgefäßen zu untersuchen, wurde weiblichen C57Bl6/J-Mäusen einmalig 50 µl 488-Dextran intravenös (i.v.) in die Schwanzvene injiziert. Die Lungen wurden direkt entnommen und die Permeabilität der Blutgefäße untersucht, indem die Signalintensität des 488-Dextran im Lungengewebe bestimmt wurde.

3.5.7 *In-vivo* Neutralisation von Lyve1

Um Lyve1 *in vivo* zu neutralisieren, wurde weiblichen C57Bl6/J-Mäusen ab Tag 15 nach der ersten Bleomycin-Injektion jeden zweiten Tag 100 µg anti-Lyve1 i.p. injiziert. Die Behandlung endete mit der letzten Bleomycin-Injektion. Die Lungen wurden an Tag 28 entnommen.

3.5.8 Knochenmarktransplantation

Zur Eradikation des vorhandenen Knochenmarks (BM) wurden die Empfängermäuse zunächst mit 10 Gray ganzkörperbestrahlt. 24 Stunden nach Bestrahlung wurde den Empfängermäusen 5×10^6 Knochenmarkszellen der jeweiligen Spendermäuse in die Schwanzvene injiziert. In einer anschließenden zweiwöchigen Regenerationsphase rekonstituierte sich das transplantierte Knochenmark. Die Ganzkörperbestrahlung führt durch Schädigung des Knochenmarks zu einer Immunsuppression. Bis zur vollständigen Rekonstitution des transplantierten Knochenmarks verfügen die Mäuse daher über kein intaktes Immunsystem so dass Infektionen während dieser Phase in der Regel letal verlaufen. Zum Zweck der Infektionsprophylaxe wurde den Empfängermäusen deshalb eine Woche vor und zwei Wochen nach der Bestrahlung angesäuertes, antibiotisches Wasser *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Zur Ansäuerung des Trinkwassers wurden 250 ml autoklaviertes Wasser mit 37% HCL versetzt (pH 2,6). Dann wurden 10 mg/ml Neomycin sowie 25 mg/ml Polymyxin B hinzugefügt.

Eine Transplantation von Knochenmark erfolgte in zwei unterschiedlichen Experimenten (*CD44-BM*, Abb. 3.1 und *VEGF-BM*, Abb. 3.2). Für den *CD44-BM*-Versuch (Abb. 3.1) wurde gesunden weiblichen C57Bl6/J-Mäusen, den Empfängertieren, das Knochenmark von CD44-defizienten Mäusen injiziert. Kontrollmäuse erhielten Knochenmark der entsprechenden WT-Mäuse. Die Injektion der Knochenmarkszellen erfolgte unmittelbar nach deren Entnahme. Hierfür wurden die CD44-KO- und WT-Mäuse getötet, die Hinterläufe entnommen, von Fell, Gewebe und Muskeln befreit und mit sterilem PBS gewaschen. Dann wurden die Knochen jeweils dicht unterhalb der Gelenke aufgeschnitten und mit RPMI + 2% FBS + Penicillin/Streptomycin (P/S) durchgespült. Das Medium mit den Zellen wurde in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen und für 10 Min. bei 900 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen mit 30 ml RPMI + P/S resuspendiert, durch ein 70 µm Nylonnetz in ein neues Röhrchen überführt und für 5 Min. bei 900 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, die Zellen in 50 ml RPMI + P/S resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Suspension zentrifugiert (5 Min., 900 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde in RPMI + P/S resuspendiert. Es wurde so viel Medium hinzugefügt, dass sich eine Konzentration von 5×10^6 Knochenmarkszellen pro 100 µl Medium ergab. Pro Empfängermaus wurden 100 µl Zellsuspension in eine 1 ml-Tuberkulinspritze aufgenommen und in die Schwanzvene injiziert.

Nach einer Erholungszeit von zwei Wochen wurden die Empfängertiere vier Wochen lang mit Bleomycin (10 mg/kg Körpergewicht, zweimal pro Woche, i.p.) behandelt. Der Versuchsaufbau wird im Folgenden dargestellt (Abb. 3.1):

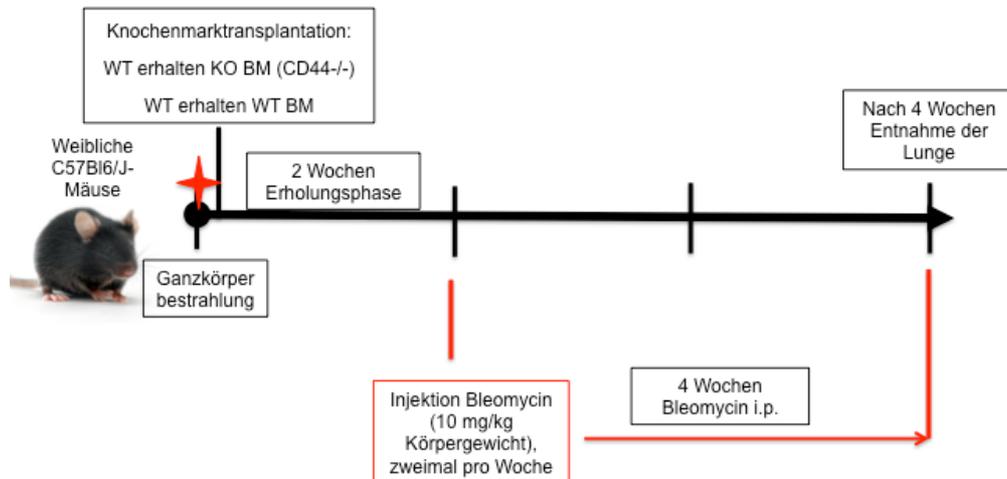


Abb. 3.1 Versuchsaufbau CD44-BM: Transplantation von Knochenmark CD44-defizienter Mäuse mit einer folgenden Induktion einer Lungenfibrose

Weibliche C57Bl6/J-Mäuse wurden ganzkörperbestrahlt und erhielten am Folgetag Knochenmark von CD44-defizienten Mäusen. Kontrollen erhielten Knochenmark der entsprechenden CD44-WT-Tiere. Im Anschluss wurden alle Mäuse vier Wochen lang zweimal wöchentlich mit Bleomycin behandelt und die Lungen an Tag 28 nach Beginn der Bleomycin-Behandlung entnommen (eigene Darstellung).

Zur Durchführung des *VEGF-BM*-Experiments (Abb. 3.2) wurden die Empfängertiere, Cre-positive und Cre-negative weibliche *VEGF/LysM*-Mäuse, zunächst zwölf Wochen lang mit CCl_4 (6 μl CCl_4 + 94 μl Olivenöl, zweimal wöchentlich, i.p.) behandelt. Die Ganzkörperbestrahlung (10 Gray) dieser Mäuse erfolgte zwei Tage nach der letzten CCl_4 -Injektion. Die Transplantation des Knochenmarks erfolgte nach weiteren 24 Stunden. Die Entnahme und die Transplantation des Spenderknochenmarks erfolgten wie zuvor beschrieben. Als Spendertiere dienten unbehandelte weibliche Cre-positive und Cre-negative *VEGF/LysM*-Mäuse. So erhielten Cre-positive Mäuse Knochenmark von Cre-negativen Spendertieren (KO/WT), während Cre-negative Mäuse Knochenmark von Cre-positiven Spendertieren (WT/KO) erhielten. Als Kontrollen dienten Mäuse denen Knochenmark von Mäusen des gleichen Genotyps (WT/WT, KO/KO) transplantiert wurde. Nach der Transplantation folgte eine zweiwöchige Ruhephase, die der Rekonstitution des Knochenmarks diene und eine weitere vierwöchige *Recovery*phase, während der die Mäuse kein CCl_4 erhielten, um die Rückbildung der Leberfibrose zu ermöglichen. Der Versuchsaufbau wird im Folgenden dargestellt (Abb. 3.2):

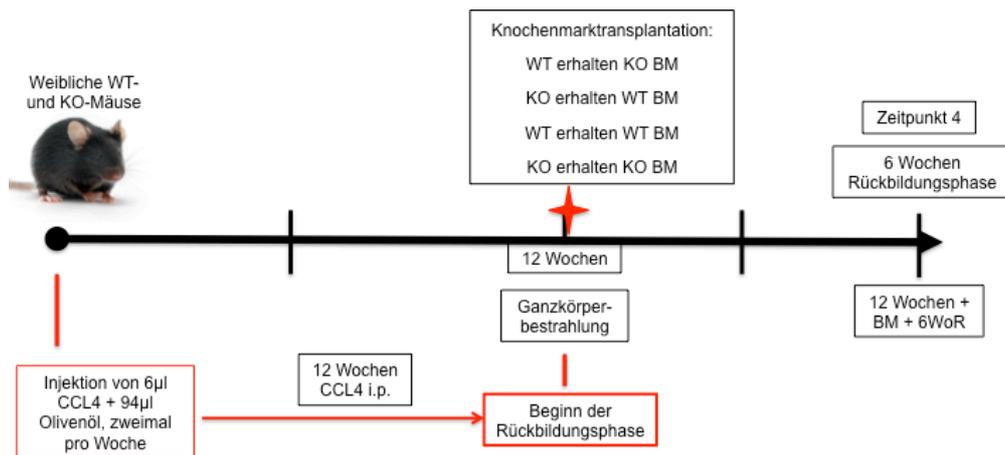


Abb. 3.2 Versuchsaufbau VEGF-BM: Induktion einer reversiblen Leberfibrose mit Wechsel der Genotypen vor Beginn der Rückbildungsphase (Recovery)

Weibliche WT- und KO-Mäuse erhielten 12 Wochen lang zweimal wöchentlich CCl_4 . Im Anschluss wurden alle Mäuse ganzkörperbestrahlt und erhielten am Folgetag Knochenmark (BM) des jeweiligen anderen Genotyps. WT-Mäuse erhielten KO-BM, KO-Mäusen wurde WT-BM injiziert. Kontrollen erhielten Knochenmark des gleichen Genotyps. Gewebe wurden nach weiteren 6 Wochen entnommen (12 Wochen+BM+6WoR). In dieser Phase konnte sich zunächst das Knochenmark zwei Wochen lang rekonstituieren und anschließend die Fibrose zurückbilden.

3.5.9 Gewebeentnahme und Fixierung

Zunächst wurden die Versuchstiere durch eine zervikale Dislokation getötet. Vor der Entnahme von Lunge oder Leber wurde der Blutkreislauf der Mäuse durch die linke Herzkammer mit PBS-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 5 mM) durchgespült. Die Lunge wurde vor der Entnahme durch die Trachea mit 1 ml PBS-EDTA aufgebläht. Anschließend wurden die jeweiligen Organe entnommen und entweder mit Tissue-Tek OCT (OCT) eingebettet und bei -80°C gelagert oder über Nacht in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die in PFA-fixierten Gewebeproben wurden am folgenden Tag in 70%-iges Ethanol überführt und anschließend in dem Shandon Excelsior (Thermo Electron Corporation) entwässert. Darauf folgend wurde das Gewebe in Hartparaffin eingebettet. PFA-eingebettetes Gewebe wurde an einem Mikrotom (Thermo Fisher Scientific) in $5\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte geschnitten und auf Glasobjektträger (OT) überführt. Ots wurden bis zur Nutzung bei Raumtemperatur gelagert. OCT-eingebettetes Gewebe wurde an einem Kryotom (Thermo Fisher Scientific) in ebenfalls $5\ \mu\text{m}$ dünne Schnitte geschnitten und auf Glasobjektträger überführt. Ots wurden bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Auf jeden Glasobjektträger wurden jeweils zwei Gewebeschnitte aufgebracht. Einer davon wurde mittels immunhistologischer Methoden angefärbt, der zweite Schnitt diente bei

den Färbungen als Negativkontrolle, um unspezifische Bindungen identifizieren zu können.

3.5.10 Blutentnahme und Serumgewinnung

Das Zentrallabor (UK Essen) benötigte zum Messen der Leberwerte Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) mindestens 200 µl Serum aus Blut. Zu diesem Zweck wurden nicht-heparinisierte Kapillaren in den inneren Augenwinkel einer mit Isofluran betäubten Maus eingeführt. Das Blut lief direkt aus der Kapillare in ein 500 µl-Gefäß mit Gerinnungsaktivator. Blut wurde sofort nach der Entnahme für 10 Min. bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde in ein neues Röhrchen überführt und bis zur Messung durch das Zentrallabor bei -80°C gelagert.

3.5.11 Isolation von Lungenlymphendothelzellen, Leberendothelzellen sowie Makrophagen aus muriner Lunge oder Leber

Zunächst wurden die Versuchstiere durch eine zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden zum Zweck der Desinfektion mit 70%-igem Ethanol eingesprüht. Vor der Entnahme von Lunge oder Leber wurde der Blutkreislauf der Mäuse durch die linke Herzkammer mit PBS-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, 5 mM) durchgespült. Zur Isolation von Lungenlymphendothelzellen wurde die Lunge entnommen. Für die Isolation der Leberendothelzellen und Makrophagen erfolgte die Entnahme der Leber. Das jeweilige Organ wurde in 2,5 ml Collagenase Typ 3 (Worthington) (2 mg/ml DMEM) gegeben, manuell zerkleinert und anschließend für 45 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach 45 Min. wurde das Collagenase-Gewebe-Gemisch durch ein 70 µm Nylonnetz in ein neues Röhrchen überführt. Das Nylonnetz wurde mit 4°C-kaltem, sterilem PBS nachgespült. Das in Collagenase und PBS gelöste Gewebe wurde anschließend für 10 Min. bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Leberzellsuspension wurde in 20 ml DMEM + 10% FBS, die Lungenzellsuspension in 20 ml Clonetics Endothelial Cell Basal Medium + Clonetics EGM-2 MV SingleQuots resuspendiert und durch ein 40 µm Nylonnetz in ein neues Gefäß überführt. Die im Netz verbliebenden Zellen wurden mit weiteren 20 ml des jeweiligen Mediums in das Gefäß gespült. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer und das erneute Zentrifugieren der Suspension (10 Min., 1200 rpm, 4°C). Der Überstand wurde

abgenommen und das Zellpellet in der nötigen Menge MACS-Buffer resuspendiert (80 µl Puffer pro 10^7 Zellen). Es wurde der primäre Antikörper im Verhältnis 1:200 zum MACS-Buffer hinzugefügt. Für die Isolation von Lungenlymphendothelzellen wurde Lyve1, für Leberendothelzellen CD31 und für Makrophagen F4-80 genutzt. Der Antikörper inkubierte für 45 Min. bei 4°C. Anschließend wurden die Proben mit MACS-Buffer auf 10 ml aufgefüllt und für 10 Min. bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen erneut mit 80 µl pro 10^7 Zellen MACS-Buffer, sowie 20 µl pro 10^7 Zellen anti-rabbit (für Lyve1) bzw. anti-rat (für CD31, F4-80) IgG microbeads (Miltenyi Biotec) resuspendiert und 15 Min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert, jedes Zellpellet in 500 µl MACS-Buffer resuspendiert, anschließend in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt und am MACS-Separator (Miltenyi Biotec) mit dem Programm *Possel* (positive Selektion) isoliert. Die Leberendothelzellen sowie die Makrophagen wurden anschließend zentrifugiert, in 700 µl Guanidinisothiocyanat (GTC) resuspendiert und bis zu der Isolation der RNA bei -20°C gelagert. Die Lungenlymphendothelzellen wurden nach der Isolation ebenfalls erneut zentrifugiert und in Clonetics Endothelial Cell Basal Medium + Clonetics EGM-2 MV SingleQuots resuspendiert. Dann wurden sie in gelatinebeschichteten 6-Well-Platten ausplattiert und 12 h bei 37°C inkubiert. Für die *ex vivo* Behandlung der LECs wurde dem Medium 10 µg/ml Bleomycin hinzugefügt. Nach 12 h wurde das Medium abgenommen, 700 µl GTC hinzugegeben und die Platten bei -20°C gelagert. Die Reinheit der Zellkultur wurde mittels einer Immunfluoreszenzfärbung der Zellen bestimmt. Die Färbe-Methode wird in Kapitel 2.6.7 beschrieben.

3.6 Histologie

3.6.1 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Zunächst wurde das Gewebe zweimal für 10 Min. in Xylol deparaffinisiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (jeweils 3 Min. in 100%, 96%, 90%, 80% und 70% Ethanol, dd-H₂O). Dann wurden die Schnitte für 1 Min. in Hämatoxylin gegeben und anschließend unter fließendem Leitungswasser gespült, bis das Wasser klar wurde. Das spülen mit Wasser dient der Erhöhung des pH-Wertes (Bläuen) infolge der Hämatoxylin-Färbung. Dadurch schlägt die zunächst

rötlich-braune Färbung der Zellkerne in Blauviolett um. Dann wurden die Schnitte kurz in VE-Wasser getaucht und eine weitere Minute in Eosin gegeben. Daraufhin sind die Schnitte für wenige Sekunden in 50% und 70% Ethanol getaucht worden. Zuletzt erfolgte die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Min. in 80%, 90% und 100% Ethanol sowie zweimal 10 Min. in Xylol). Eingedeckt wurden die Objektträger (OT), indem je ein Tropfen Cytoseal CYL Mounting Medium auf das Gewebe gegeben und der OT mit einem Glasplättchen zugedeckt wurde. Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter einem Nikon Eclipse E1000 Mikroskop bei Durchlicht.

3.6.2 Sirius Red Färbung

Zur Bestimmung kollagenhaltiger Areale in fibrotischen Lebern wurde eine Sirius Red Färbung mit dem Picosirius Red Stain Kit (BD Biosciences) durchgeführt. Zunächst wurden die Leberschnitte deparaffiniert und rehydriert (zweimal 5 Min. in Xylol, dann jeweils 3 Min. in Isopropanol sowie 90%, 80% und 70% Ethanol und weitere 3 Min. in VE-H₂O). Daraufhin wurden die Schnitte 2 Min. in Lösung A (Picosirius Red Stain) inkubiert, anschließend in H₂O gewaschen, bis das Wasser klar war und für 60 Min. in Lösung B (Picosirius Red F3BA) sowie weitere 2 Min. in Lösung C (0,01 N Hydrochloryde Acid) platziert. Anschließend wurden die Schnitte für 45 Sekunden in 70%-iges Ethanol getaucht und mittels der aufsteigenden Alkoholreihe und abschließendem mit Xylol dehydriert. Zuletzt wurden die OTs mit Cytoseal benetzt und mit einem Glasplättchen abgedeckt.

3.6.3 Immunhistochemische Färbung mittels der ABC-Komplex-Methode

Paraffinierte Gewebeschnitte wurden dreimal für je 5 Min. in Xylol deparaffiniert. Daraufhin wurden sie in einer absteigenden Alkoholreihe beginnend bei einem Ethanolgehalt von 100%, folgend von 96%, 90%, 80% und 70%-igem Ethanol dehydriert und zum Abschluss 3 Min. in VE-H₂O gewaschen. Dann wurden die Schnitte für 15 Min. in einem Citratpuffer mit einem pH-Gehalt von 6,1 (Epitope Retrieval Solution) in einem Dampfkochtopf gekocht, anschließend ca. 30 Min. auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut einmal für 3 Min. in VE-H₂O gewaschen. Um die endogenen Peroxidasen irreversibel zu hemmen, wurden die Schnitte anschließend für 5 Min. mit 3% H₂O₂ inkubiert und weitere 5 Min. mit jeweils VE-H₂O und PBS-Puffer gewaschen.

Zunächst wurde das Gewebe auf den Objektträgern mit einem Wachsstift umkreist, um ein Verlaufen der aufzutragenden Flüssigkeiten und ein anschließendes Austrocknen des Gewebes zu vermeiden. Zur Unterdrückung von unspezifischen Bindungen zwischen den primären Antikörpern und dem Gewebe wurden die Schnitte für 60 Min. mit 5% Normal Goat Serum in PBS (NGS) inkubiert. Folgend wurde das NGS mit einer Pumpe (Schuett Biotec) von den Schnitten abgesaugt und das Gewebe mit 100 µl eines in NGS verdünnten primären Antikörpers bei 4°C inkubiert. Die jeweilige Verdünnung, die Inkubationszeiten ebenso wie die Wahl des sekundären Antikörpers hingen von dem jeweiligen primären Antikörper ab (siehe Tabelle 2.4, Kapitel 2.3.2). Die Negativkontrolle wurde während dieser Zeit weiterhin mit NGS ohne Antikörper inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Objektträger zweimal 3 Min. in PBS-T und einmal 3 Min. in PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe eines biotinylierten Sekundärantikörpers, der mit 1:200 in NGS verdünnt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. bei Raumtemperatur wurden die Schnitte erneut in PBS-T und PBS-Puffer gewaschen.

Der Streptavidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC-Kit) wurde nach den Vorgaben des Herstellers vermengt und für 30 Min. auf den Gewebeschnitten inkubiert. Es folgte ein erneutes Waschen mit PBS-T und PBS.

Abschließend wurden 100 µl der Substrat-Chromogen-Lösung mit 3,3'-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid (DAB) auf jeden Gewebeschnitt gegeben. DAB führt zu einer braunen Farbumschwung jener Bereiche auf dem Gewebe, an welche der sekundäre Antikörper gebunden hat. Die Reaktion auf dem Objektträger wurde in Echtzeit durch ein Durchlichtmikroskop beobachtet und nach eigenem Ermessen, jedoch immer innerhalb von 3 Minuten, durch Spülen mit VE-H₂O gestoppt. Alle weiteren Schnitte wurden anschließend für die gleiche Zeit mit der Substrat-Chromogen-Lösung inkubiert. Die Konzentration der DAB-Lösung betrug 0,1% DAB und 0,01% H₂O₂ in VE-H₂O. Nach dem Waschen der Schnitte in PBS wurden diese für ca. 30 Sekunden zur Gegenfärbung in Hämatoxylin getaucht und mit VE-H₂O gewaschen.

Die Gewebeschnitte wurden zum Abschluss mittels der aufsteigenden Alkoholreihe beginnend bei 70% EtOH gefolgt von 80%, 90%, 96% und 100% EtOH sowie Xylol dehydriert. Das Gewebe wurde mit Cytoseal bedeckt und mit Deckgläsern abgedeckt.

3.6.4 Immunfluoreszenzfärbung

Mit einer Immunfluoreszenzfärbung (IF) können zwei bis drei unterschiedliche primäre Antikörper simultan auf demselben Gewebeschnitt angefärbt werden. Die IF beruht darauf, dass die sekundären Antikörper unterschiedlich farbige Fluorochrome (fluoreszierender Farbstoffe) gebunden haben, welche beim Mikroskopieren in unterschiedlichen Farben sichtbar werden.

Die Immunfluoreszenzfärbung beginnt, ebenso wie die immunhistochemische Färbung, mit dem Deparaffinisieren (Xylol), Rehydrieren (absteigende Alkoholreihe) und Kochen (mit Citratpuffer) der paraffinierten Gewebeschnitte. Die Schnitte wurden anschließend ohne Peroxidaseblock für 60 Min. mit 5% NGS in PBS (NGS) blockiert. Anschließend wurde der erste primäre Antikörper in NGS verdünnt (s. Tabelle 2.4) und auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Nach der Inkubation des ersten primären Antikörpers wurden die OTs in PBS-T und PBS gewaschen. Es erfolgte das Auftragen des ersten sekundären Antikörpers mit einer Verdünnung von 1:200 in NGS. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer halben Stunde wurden die Schnitte in PBS-T und PBS gewaschen und erneut für 30 Min. mit NGS blockiert. Die NGS-Lösung wurde anschließend abgesaugt und durch den zweiten primären Antikörper ersetzt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Schnitte wiederholt in PBS-T und PBS gewaschen, bevor der zweite sekundäre Antikörper auf die Gewebeproben gegeben wurde. Nach einer weiteren halben Stunden Inkubationsdauer erfolgte abermals das Waschen der Objektträger in PBS-T und PBS.

Folgend wurden die Gewebeschnitte für 5 Min. mit DAPI (4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:1000 verdünnt in PBS) inkubiert. DAPI färbt Zellkerne blau, wodurch die Struktur des Gewebes beim Mikroskopieren mit dem Fluoreszenzmikroskop gut sichtbar wird. Daraufhin wurden die Objektträger je ein weiteres Mal in PBS und VE-H₂O gewaschen, bevor sie für 10 Minuten in eine Küvette mit Sudan Black gegeben wurden. Sudan Black dient der Reduktion von Autofluoreszenz. Abschließend wurden die Objektträger dreimal für je 3 Min. in VE-H₂O gewaschen und anschließend mit einigen Tropfen des Mounting Mediums (Dako) und einem Glasplättchen eingedeckt. Um die Schnitte länger haltbar zu machen und das Austrocknen zu verhindern, wurden die Kanten mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

3.6.5 Färbung eines Maus-Antikörpers auf Mausgewebe

Für die Färbung von Mausgewebe mit einem primären Maus-Antikörper wurde das M.O.M (Mouse-on-Mouse)-Kit (Vector Laboratories) verwendet. Bei einer IF erfolgte zunächst die Färbung des primären Antikörpers, welcher nicht aus der Maus stammt. Bis zum zweiten Blockierungsschritt wurde die Färbung wie in 2.6.4 beschrieben durchgeführt. Doch anstatt dann erneut für 30 Min. mit NGS zu blockieren, wurde das Blocking Reagent (Vector Laboratories) des M.O.M.-Kits auf die Schnitte gegeben und für 60 Min. inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte zweimal für 2 Min. in PBS gewaschen. Der zweite primäre Antikörper (Maus) wurde nun im M.O.M.-Diluent (Vector Laboratories) verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Auf die Negativkontrollen wurde M.O.M-Diluent ohne Antikörper gegeben. Nach einer vom Antikörper abhängigen Inkubationszeit wurden die Objektträger erneut zweimal für 2 Min. in PBS gewaschen. Der fluoreszierende Alexa-488- oder Alexa-568-mouse-Antikörper wurde mit 1:200 im M.O.M-Diluent verdünnt und für 10 Min. auf die Gewebeschnitte gegeben. Anschließend wurden die Objektträger abermals zweimal mit PBS gewaschen.

Die restliche Färbung wurde ab dem Schritt der Inkubation mit DAPI ebenfalls wie in 2.6.4 beschrieben durchgeführt.

3.6.6 *In situ* Zymographie

Die Enzymaktivität von MMPs in murinem Lebergewebe kann mittels *in situ* Zymographie nachgewiesen werden. Bei dieser Methode wird OCT-eingebettetes Lebergewebe auf einem Objektträger mit der sogenannten DQTM Gelatine (Invitrogen) inkubiert. Die DQTM Gelatine ist ein fluoreszenzmarkiertes Substrat, welches, nachdem es auf das Gewebe gegeben wird, von aktivierten MMPs lysiert wird. Nach einer 12-stündigen Inkubationszeit kann die Lyse des Substrats durch ein grün fluoreszierendes Signal unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen, und somit die Enzymaktivität der MMPs bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden OCT-fixierte Gewebeschnitte für 10 Min. bei RT getrocknet. Danach wurde der Reaktionspuffer mit DQTM Gelatine auf das Gewebe gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach 12 h erfolgte das Abfotografieren des grün fluoreszierenden Signals unter dem Fluoreszenzmikroskop. Hierfür wurde der Reaktionspuffer + DQTM Gelatine abgenommen und 100 µl Reaktionspuffer ohne DQTM Gelatine auf das

Gewebe gegeben um ein Austrocknen während des Mikroskopierens zu verhindern. Anschließend wurden die Objektträger mit dem Gewebe zunächst für 15 Min. mit 4% PFA fixiert, dann für 5 Min. im Reaktionspuffer ohne DQTM Gelatine gewaschen und für weitere 5 Min. mit DAPI inkubiert. Abschließend wurde das Gewebe zweimal 3 Min. mit PBS gewaschen und mit einigen Tropfen des Mounting Mediums (Dako) und einem Deckglas eingedeckt.

3.6.7 Immunfluoreszenzfärbung von isolierten Lungenlymphendothelzellen

In Kapitel 2.5.11 wurde beschrieben, wie Lungenlymphendothelzellen isoliert wurden. Um die Reinheit der Zellpopulation bestimmen zu können mussten die Zellen mit spezifischen Lymphendothelzellmarkern immunfluoreszenzgefärbt werden. Zunächst wurden dafür 24-Well-Platten mit runden Glasplättchen ausgelegt, die mit 10 µg/ml Fibronectin (Sigma) und Collagen 1 (BD Biosciences) in 0,1% Gelatine in PBS beschichtet wurden. Die beschichteten 24-Well-Platten wurden anschließend für 1 h bei 37°C und dann bis zur Nutzung bei 4°C gelagert.

Nach der Zellisolation wurden pro Well 150.000 Zellen ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach einer Inkubationszeit der Zellen von mindestens 8 h wurden diese im Well 10 Min. lang mit 4% PFA bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Nachdem die Zellen dreimal 5 Min. lang mit PBS gewaschen wurden, sind sie für 5 Min. mit 0,1% TritonX-100 (Fluka) bei RT permeabilisiert worden. Daraufhin wurden sie für 30 Min. mit 1% BSA in PBS (BSA) blockiert. Die primären Antikörper (Lyve1, Prox1) wurden in BSA gemischt und für 1 h auf die Zellen gegeben. Es folgte das Waschen mit PBS und ein erneutes 15-minütiges Blockieren mit BSA. Anschließend wurden die sekundären Antikörper ebenfalls in BSA auf die Zellen gegeben. Nach 30 Min. wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, für 5 Min. mit DAPI inkubiert und weitere zweimal mit PBS gewaschen. Zum Eindecken der Zellen wurde ein Tropfen Mounting Medium (Dako) auf einen Objektträger gegeben, das Glasplättchen aus dem Well mit den Zellen nach unten auf das Mounting Medium gegeben und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

3.6.8 Mikroskopie und quantitative Auswertung histologischer Proben

Gefärbte Gewebe- und Zellpräparate wurden mit einem Nikon Eclipse E1000 Mikroskop und einem Nikon DS-Ri1 Kamera-System bei 21°C und 200-facher Vergrößerung abfotografiert. Zur quantitativen Analyse der immunhistochemisch

gefärbten Marker wurde die ImageJ 1.42 Software (National Institut of Health) genutzt. Hierbei wurde die Pixelanzahl des braunen DAB-Signals gemessen und auf die Pixelzahl der Gesamtfläche des Gewebes bezogen. Für die Auswertung immunfluoreszenzgefärbter Marker wurde Photoshop (CS5) genutzt. Auch hier wurde die Anzahl der Pixel des fluoreszierenden Signals ausgewertet und auf die Anzahl der Pixel von DAPI bezogen.

Zur quantitativen Analyse von Lymphgefäßen sowie von Lymphgefäßen die eine Ansammlung muraler Zellen aufweisen wurde die Anzahl der jeweiligen Gefäße pro Bild ausgezählt. Die Anzahl der Lymphgefäße, die von muralen Zellen umgeben sind, wurde prozentual an der Gesamtzahl an Lymphgefäßen berechnet.

3.7 RNA-Isolation und PCR-Analysen

RNA wurde sowohl aus Gewebe als auch aus primären Mauszellen isoliert. Die Zellproben wurden mit je 720 µl Guanidiniumthiocyanat (GTC) vermengt, während Gewebe zunächst zu Gewebehomogenisaten weiterverarbeitet wurde. Anschließend wurde die RNA mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion aus den Zell- und Gewebehomogenisaten extrahiert.

3.7.1 Herstellung von Gewebehomogenisaten

Vor der Extraktion der Gesamt-RNA aus dem Gewebe musste dieses mechanisch aufgeschlossen werden. Entnommenes Gewebes wurde in Flüssigstickstoff schockgefrostet und anschließend bei -80°C gelagert. Zu dem gefrorenen Gewebe wurden 10 ml GTC pro Gramm Gewebe hinzugefügt. Das Gewebe-GTC-Gemisch wurde daraufhin für ca. 30 Sekunden mit einem Homogenisierstab zerkleinert und anschließend bei 13.000 rpm und 4°C für 30 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C gelagert, der Rest wurde verworfen.

3.7.2 Isolation der RNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Die RNA-Isolation wurde mittels der Methode der sauren Phenol-Chloroform-Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt. Zur Isolation der RNA aus den Zell- bzw. Gewebehomogenisaten wurde von diesen je 700 µl abgenommen und mit 70 µl Natriumacetat (2 M, pH 4), 500 µl Phenol (pH < 4,5) sowie 350 µl eines Phenol : Chloroform : Isoamyl-Gemisches vermengt, gevortext

und für ca. 1 h auf Eis inkubiert. Nachdem eine sichtbare Phasentrennung eingetreten war, wurden die Proben erneut gevortext und bei 13.000 rpm und 4°C für 30 Min. zentrifugiert. Das Zentrifugieren führte zu einer Auftrennung der Proben in drei Phasen: am Boden des Reaktionsgefäßes befindet sich die organische Phase, in der zelluläre Proteine enthalten sind, in der Mitte befindet sich die Interphase, in der die DNA zu finden ist, und in der wässrigen, oberen Phase befindet sich die RNA. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol vermischt und zur Ausfällung der RNA für mindestens 4 h bei -20°C eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden zur Weiterverarbeitung bei 13.000 rpm und 4°C für 30 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet für ca. 1 h getrocknet, in 300 µl GTC und 300 µl Isopropanol resuspendiert und erneut für mindestens 1 h bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben abermals bei 13.000 rpm und 4°C für 30 Min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für ca. 20 Min. getrocknet. Anschließend wurden die Proben ca. 15 Min. mit 500 µl Ethanol (75%) bei Raumtemperatur gewaschen. Die Proben wurden bei 13.000 rpm und 4°C für 30 Min. zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Die Pellets wurden solange getrocknet, bis sämtliche Ethanolrückstände verdunstet waren. Dann wurde das Pellet, je nach Größe, in mindestens 10 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) 0,1% VE-H₂O gelöst. Abschließend wurde das RNA-Pellet bei 58°C für 10 Min. gelöst. Darauf folgend wurde der RNA-Gehalt gemessen und die Proben bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

3.7.3 Quantifizierung der RNA mittels eines Nanodrop

Zur Messung des RNA-Gehaltes der Proben wurde der Epoch-Nanodrop (BioTek) genutzt. Zunächst wurde das Gerät durch das Auftragen und Messen der „Blanks“ (DEPC-Wasser das zur Resuspendierung der Pellets verwendet wurde) kalibriert. Anschließend wurde der RNA-Gehalt jeder Probe an 2,5 µl unverdünnter Probe gemessen.

3.7.4 Herstellung von cDNA

Zur Herstellung von cDNA wurde eine Reverse-Transkriptase (RT)-PCR durchgeführt. Bei diesem Prozess wird 1 µg RNA pro Probe *in vitro* mit Hilfe der reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben. Hierfür wurden zunächst 1 µg RNA,

2,5 µl Oligo-dT und die entsprechende Menge DEPC-Wasser, bis zu einem Gesamtvolumen von 12 µl, zusammen gemischt und für 10 Min. auf 68°C erhitzt. Nach einer anschließenden zehnmütigen Inkubation der Proben auf Eis wurde jedem Ansatz weitere 13 µl des folgenden Puffers hinzugefügt: 5 µl 5x RT-Puffer, 5 µl NTPs, 2,5 µl DEPC-Wasser und 0,5 µl Reverse Transkriptase. Das Gesamtvolumen jeder Probe betrug nun 25 µl, welche im Anschluss 90 Min. auf 45°C, 30 Min. auf 52°C und 15 Min. auf 95°C erhitzt wurden. Die cDNA wurde bei 4°C gelagert.

3.7.5 PCR

Zur semiquantitativen Bestimmung der Expression bestimmter Gene wurde das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) angewandt. Hierbei wurde 1 µl cDNA pro Reaktion eingesetzt. Es wurden 4 µl NTPs, 10 µl 5x PCR-Puffer, je 1 µl der beiden gewünschten Primer (ca. 100 pmol/µl), 33 µl VE-H₂O und 0,25 µl Taq-Polymerase (2,5 U) pro Ansatz zusammen gemischt. Die PCR wurde in den Thermocyclern „Mastercycler“ (Eppendorf) oder „Thermocycler T-professional“ (Biometra) durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne cDNA eingesetzt. Die Ansätze wurden dann einmalig für 5 Min. auf 94°C und schließlich in der gewünschten Zyklenzahl für 1 Minute auf ebenfalls 94°C, für 1 Minute auf die entsprechende Annealing-Temperatur der Primer (55-65°C) und für 1 Minute auf 72°C erhitzt. Abschließend erfolgte eine letzte zehnmütige Erhitzung der Ansätze auf 72°C.

Zur Auswertung der PCR-Reaktion wurden die amplifizierten Fragmente mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dafür wurde eine Horizontal-Elektrophorese sowie ein 2%-iges (w/v) Agarosegel in 1x TAE-Puffer und 0,2% Ethidiumbromid verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 Volt. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe des „BioDock Imaging Systems“ (UPS) unter UV-Licht.

3.7.6 Quantitative Real Time PCR

Zur quantitativen Bestimmung der Expressionslevel unterschiedlicher Gene wurde das Verfahren der quantitativen Real Time PCR (qPCR) genutzt. Für die Quantifizierung der cDNA wurde der qPCR Mastermix for SYBRGreen I-System (Eurogentec) verwendet. Die Standards (von 1000 – 0,001 fg/µg, Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:10) wurden mittels Dreifachbestimmung, die Proben mittels

Doppelbestimmung bestimmt. Der Mastermix für eine Dreifachbestimmung bestand aus: 37,5 µl zweifacher Reaktionspuffer, 33 µl H₂O, 1,5 µl der jeweiligen benötigten Primer sowie 1,5 µl des jeweiligen Primerstandards. Für die Zweifachbestimmung ergab sich folgender Mastermix: 25 µl 2-facher Reaktionspuffer, 22 µl H₂O, 1 µl der jeweiligen benötigten Primer sowie 1 µl der jeweiligen cDNA Probe. Zunächst wurden eine Kontrolle, die sogenannte *non-template-control* (1,5 µl VE-H₂O), und die jeweiligen Standards auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend wurden die zu untersuchenden Proben auf die Platte geladen. Das Reaktionsvolumen betrug für jedes Well 20 µl. Die Bedingungen der Real Time im ICycler waren bei den Quantifizierungen weitestgehend konstant: 2 Min. 50°C, 10 Min. 95°C, 35 Zyklen mit je 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 60 Sekunden. Zur Dissoziation erfolgte eine anschließende langsame Erhitzung auf 95°C über einen Zeitraum von 20 Minuten. Die Expressionsprofile aller untersuchten Gene wurden auf das Housekeeping-Gen *Ribosomales Protein 16 (16S)* bezogen.

3.8 Western Blot Analyse

3.8.1 Proteinisolation aus Gewebe

Zunächst wurden pro Gewebeprobe 600 µl Isolationspuffer in ein FACS-Röhren (Sarstedt) gefüllt und auf Eis kalt gestellt. Das bei -80°C gelagerte Gewebe wurde in Flüssigstickstoff überführt und erst direkt vor dem mechanischen Zerkleinern in den Probenpuffer eingebracht. Nach dem Zerkleinern des Gewebes durch den Homogenisierstab, wurde das Homogenisat für mindestens 10 Min. auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Gewebehomogenisat aus den FACS-Röhren in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 4°C und 3000 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration gemessen und bis zur Durchführung des Western Blots bei -80°C gelagert.

3.8.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei Reaktionen. Zunächst bilden die CU(II)-Ionen, die im Folin-Ciocalteu-Reagenz enthalten sind, einen Farbkomplex mit Stickstoffatomen der Amidbindungen von Proteinen. Dann wird CU(II) zu CU(I) reduziert. Dieses einwertige Kupfer reduziert ebenfalls enthaltene Heteropolyphosphomolybdate und -wolframate. Hierbei tritt ein Farbumschlag des

Folin-Reagenzes nach Tiefblau auf. Der Farbumschlag kann zur quantitativen Proteinbestimmung genutzt werden.

Die hergestellten Standards (25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 und 0,1 mg/ml BSA) sowie die Proben wurden 1:10 mit VE-H₂O verdünnt und je 20 µl in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Pro Ansatz wurden 10 µl Reagenz A und 80 µl Reagenz B (Bio-Rad Laboratories) hinzugefügt, 10 Min. inkubiert und schließlich die Extinktion mit Hilfe des Epoch-Nanodrop (BioTek) gemessen.

3.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Page wurde zur größenabhängigen Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld verwendet und nach Laemmli in einem diskontinuierlichem Tris-HCL/Tris-Glycin-Puffersystem durchgeführt. Es wurde ein Sammelgel (4x upper Tris Puffer pH 6,8 mit 3-4% Acrylamid) zur Aufkonzentrierung der Proben und ein Trenngel (4x lower Tris Puffer pH 8,8 mit 10% Acrylamid) zur Auftrennung der denaturierten Proteine entsprechend ihrer Größe verwendet. Die Proben wurden zunächst mit einem 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Das Protein-Gemisch wurde für 5 Min. im Heizblock auf 95°C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert. Dann wurden die Proben (enthielten je 70 µg Protein) in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer „Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell“ (Bio-Rad Laboratories) nach den Angaben des Herstellers mit einer Spannung von 100 Volt (V). Als Proteinstandard wurde in die erste Tasche des Sammelgels der „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Fermentas) eingefüllt.

3.8.4 Western Blot

Infolge der SDS-Page wurden die dort aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamid (PAA)-matrix des PAA-Gels auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dieser Prozess wird als Blotten bezeichnet. Es wurde das so genannte Tank-Blotting-System, bei dem sich der gepackte Blot komplett in Transferpuffer befindet, verwendet. Die relative Lage der Proteine auf dem Gel bleibt beim Blotten auf die Membran erhalten. Der Zusammenbau des Blots erfolgte in einer Schale mit Transferpuffer in der folgenden Reihenfolge: Zwischen der Kathode und der Anode befanden sich von außen nach innen auf jeder Seite je ein Schwamm, auf dem ein Blotpapier aufgelegt wurde. Auf das Blotpapier wurde, ausgehend von der Kathode,

erst das Trenngel der SDS-Page und dann eine Nitrozellulose-Membran aufgelegt. Während des Zusammenbaus wurden Schwämme, Membran und Blotpapier somit bereits vom Transferpuffer durchtränkt. Der Blot erfolgte in einer „Mini Trans-Blot® Cell“ (Bio-Rad Laboratories), die mit Transferpuffer und einem Kühlakku befüllt wurde. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Amperezahl von 300 mA für 120 Minuten.

3.8.5 Proteindetektion durch das ECL-System

Infolge des Blottings wurden die Proteine auf der Nitrozellulose-Membran mittels einer Inkubation mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Zunächst wurde die Membran für 60 Min. bei Raumtemperatur in einer 5%-igen Milchlösung (in TBS-T) geblockt, um freie Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Dann wurde die Membran dreimal 5 Min. in TBS-T-Puffer gewaschen und mit dem jeweiligen primären Antikörper (gelöst in 5%-iger Milchlösung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation und einem erneuten dreimaligen Waschen der Membran in TBS-T wurde diese mit einem spezifischen sekundären Antikörper für 60 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte abermals das dreimalige Waschen in TBS-T. Final wurde die Detektion der Antikörper-markierten Banden durch die Nutzung des ECL-Reagenzes (Amersham™ ECL™ Detection Systems) ermöglicht. Zu diesem Zweck wurden die Komponenten A und B des ECL-Systems 1:1 vermengt, auf die Membran gegeben und für 5 Min. inkubiert. Abschließend wurde die Membran ohne erneutes Waschen in eine durchsichtige Plastikfolie gegeben. Die Banden auf der Membran wurden daraufhin mit dem „Fusion-FX7“ (Pierce) sichtbar gemacht und abfotografiert. Die sichtbaren Banden wurden densitometrisch mit der Bildbearbeitungssoftware „Fusion Capt“ (Pierce) aufbereitet und mit „ImageJ“ (NIH) quantitativ ausgewertet.

Im Anschluss an diesen Schritt wurde der bereits gebundene Antikörper mithilfe eines Stripping Puffers (Pierce) entfernt. Hierfür wurde die Membran bei Raumtemperatur für maximal 15 Min. in dem Stripping Puffer und anschließend dreimal für 5 Min. in TBS-T gewaschen. Es folgte ein wiederholtes Blocken über 1 h in einer 5%-igen Milchlösung. Die Membran wurde daraufhin erneut mit einem primären und sekundären Antikörper, wie zuvor beschrieben, behandelt. Auch die

Visualisierung des Antikörpers sowie dessen Auswertung erfolgten, wie bereits beschrieben, mit dem ECL-System und dem „Fusion-FX7“.

3.9 Hyaluronsäure-Extraktion aus Gewebe

Um den Hyaluronsäuregehalt in den Lebern messen zu können, wurde zunächst Hyaluronsäure (HA) aus dem Gewebe isoliert. Hierfür wurde das Gewebe sofort nach der Entnahme in Flüssigstickstoff schockgefroren, lyophilisiert und das Trockengewicht bestimmt. Anschließend wurde das getrocknete, gefrorene Gewebe zerkleinert und mit 6 mg/ml Pronase (Protease von *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich) in 100 mM Tris HCl (pH 8,1) und 1 mM CaCl₂ bei 60°C für 24 h lysiert. Daraufhin wurden die Proben bei 13.000 rpm und 4°C für 15 Min. zentrifugiert, der Überstand abgenommen und über 12 h bei -20°C mit Ethanol (100%) ausgefällt. Die Proben wurden erneut bei 13.000 rpm und 4°C für 15 Min. zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Pellet mit reinem Ethanol gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wurde für weitere 12 h lyophilisiert und anschließend in 150 µl dd-H₂O resuspendiert. Die Proben wurden 1:50 verdünnt und der Hyaluronsäuregehalt mit Hilfe eines Sandwich-Protein-Binding-Assays (HA Test Kit, Corgemix) gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Der HA-Gehalt wurde auf den Gesamttrockengehalt der Lunge bezogen. Die Bestimmung des HA-Gehalts wurde in Kooperation mit der AG Fischer vom Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des UK Düsseldorf durchgeführt.

3.10 Humane Lungenproben

In der vorliegenden Arbeit wurden humane Gewebeproben mittels immunhistochemischer sowie Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Die fibrotischen Gewebeproben stammen von Patienten, die an einer Interstitiellen Pulmonalen Fibrose leiden oder litten. Die Gewebeproben wurden entweder zum Zeitpunkt einer Lungenbiopsie zum Zweck der Diagnosestellung oder während der Lungentransplantation gewonnen. Als Kontrollen wurden Gewebeproben von Patienten genutzt, die an pulmonalen Tumoren litten. Jene Proben stammen aus nicht befallenen Arealen der Lunge, die zum Zeitpunkt einer Operation zum Zweck der Tumorentfernung gewonnen wurden. Die hier verwendeten Proben wurden uns

von Herrn Prof. Theegarten (Pathologie und Neuropathologie, UK Essen) zur Verfügung gestellt.

3.11 Statistik

Die Erhebung und Berechnung der Daten wurde mit Excel 2010 (Microsoft) durchgeführt. Statistisch aufgearbeitet wurden die Daten anschließend mit der Prism 4.0 Software der Firma GraphPad. Als Signifikanztest wurde ein doppelseitiger t-Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Die Ergebnisse wurden ab $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Die Rolle pulmonaler Lymphgefäße bei der Entstehung einer Lungenfibrose

Um den Einfluss pulmonaler Lymphgefäße auf die Homöostase des Lungenparenchyms während der Entstehung einer Lungenfibrose zu untersuchen, wurden weibliche C57Bl6/J-Mäuse im Alter von acht bis zehn Wochen mit Bleomycin (Bleo) behandelt. Die Gabe erfolgte intraperitoneal (i.p.), zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von vier Wochen mit der Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht. Kontrollmäuse wurden mit PBS behandelt (100 µl PBS, zweimal wöchentlich, vier Wochen, i.p.). An Tag 28 wiesen die Bleomycin-behandelten Tiere einen fortgeschrittenen fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms auf. Die Lungen der Kontrolltiere ließen keine pathologischen Veränderungen erkennen (Abb. 4.1).

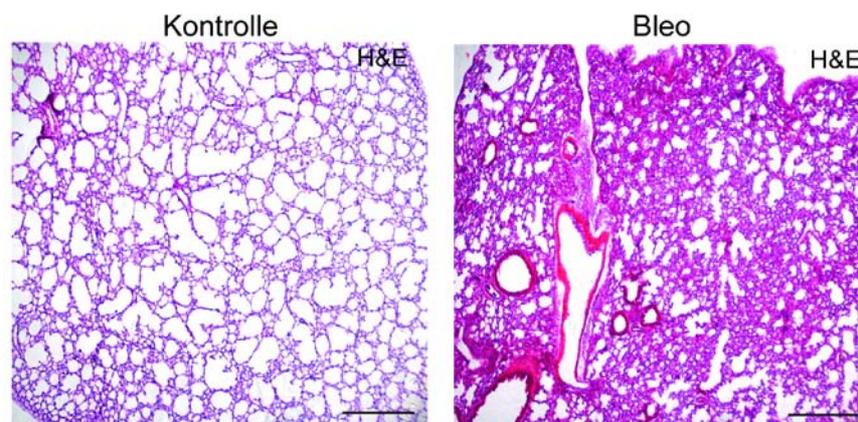


Abb. 4.1 Bleomycin-Behandlung von Mäusen führt zum fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms

Zur Induktion einer Lungenfibrose wurden Mäuse vier Wochen lang zweimal wöchentlich mit 10 mg/kg Körpergewicht Bleomycin (in 100 µl PBS, i.p.) behandelt. Kontrollmäuse erhielten vier Wochen lang zweimal wöchentlich 100 µl PBS (i.p.). Die Hämatoxylin und Eosin (H&E)-Färbung des Lungengewebes zeigte einen deutlichen fibrotischen Umbau der Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse an Tag 28. Lungengewebe PBS-behandelter Kontrollmäuse zeigte keine pathologischen Veränderungen. Maßstabskala entspricht 500 µm.

4.1.1 Charakterisierung und Quantifizierung pulmonaler Lymphgefäße

Ein Hauptcharakteristikum von Organfibrosen ist die Veränderung von Gefäßen, wobei der Einfluss von Gefäßveränderungen auf die Entstehung einer Lungenfibrose bislang nicht hinreichend geklärt werden konnte (Tzouvelekis et al., 2006). Zur

Darstellung der Blut- und Lymphgefäße in fibrotischem Lungengewebe wurden Immunfluoreszenzfärbungen von CD34 und Lyve1 durchgeführt (Abb. 4.2). Das membranständige Protein CD34 gilt als etablierter Marker für Blutendothelzellen (Fina et al., 1990). Lyve1, ein Oberflächenrezeptor von Lymphendothelzellen, diente als Lymphgefäßmarker (Jackson, 2003). Die Fluoreszenzfärbung der Blutgefäße zeigte eine Bildung fibrotischer Läsionen in der Lunge um gefäßähnliche Strukturen, die negativ für CD34 sind und demnach keine Blutgefäße darstellen. Durch eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung von CD34 und Lyve1 konnten die CD34-negativen Strukturen schließlich als Lyve1-positive Lymphgefäße identifiziert werden.

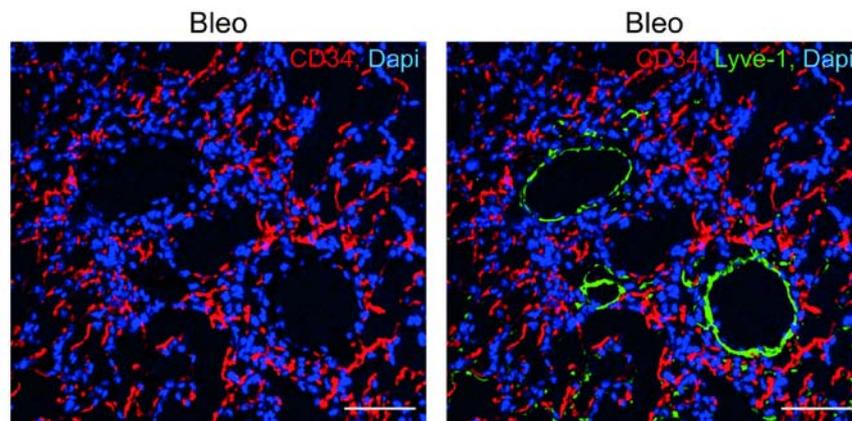


Abb. 4.2 Entstehung perilymphatischer Läsionen im Rahmen einer Lungenfibrose

Immundetektion von Blutgefäßen (CD34) sowie simultane Immundetektion von Blutgefäßen (CD34) und Lymphgefäßen (Lyve1) auf fibrotischem Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse (Bleo) an Tag 28 zeigte eine initiale Bildung fibrotischer Läsionen um CD34-negative und Lyve1-positive Lymphgefäße. Maßstabskala entspricht 100 µm.

Da ein geringer Teil venöser Gefäße ebenfalls Lyve1 exprimiert (Gordon et al., 2008), wurde die Identität der Lymphgefäße spezifischer eruiert. Zu diesem Zweck wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für Lyve1 und Prox1 bzw. Lyve1 und VEGFR3 durchgeführt (Abb. 4.3 A, B). Sowohl Prox1 als auch VEGFR3 werden von Lymphendothelzellen exprimiert und gelten, zusammen mit Lyve1, als etablierte Marker für Lymphgefäße (Wigle und Oliver, 1999; Mäkinen et al., 2001; Jackson, 2004). Die Färbungen zeigten eine Koexpression von Lyve1 und Prox1 (Abb. 4.3 A) bzw. Lyve1 und VEGFR3 (Abb. 4.3 B) in gesundem und fibrotischem Lungengewebe.

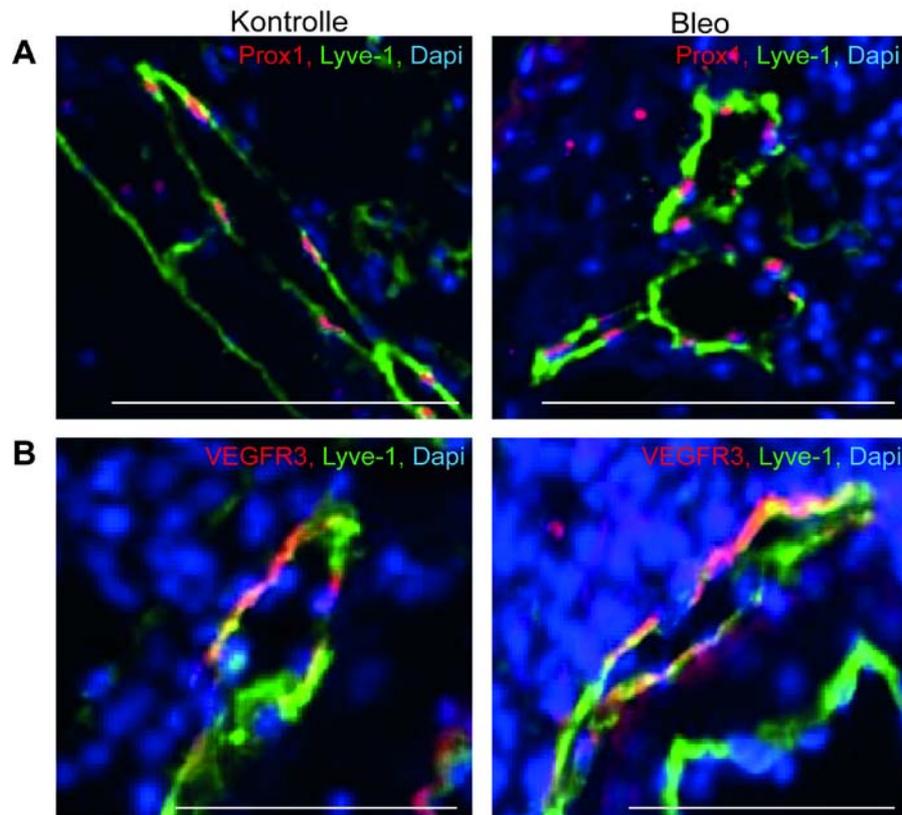
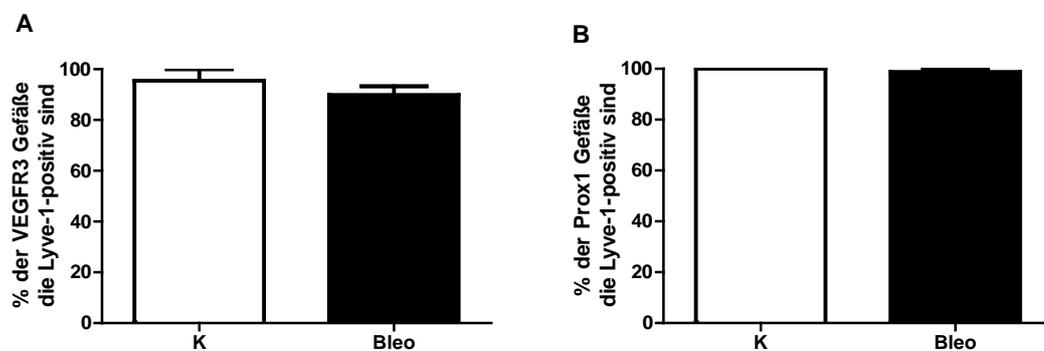


Abb. 4.3 Charakterisierung pulmonaler Lymphgefäße

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für A) Prox1/Lyve1 sowie B) VEGFR3/Lyve1 auf Gewebe fibrotischer Mauslungen (Bleo) und gesunder Kontrolllungen (Kontrolle) an Tag 28 zeigten eine Koexpression von Lyve1 und VEGFR3 bzw. Lyve1 und Prox1 in Lungengewebe gesunder und Fibrose-erkrankter Mäuse. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

Die quantitative Auswertung der Färbungen ergab, dass annähernd alle Prox1- und VEGFR3-positiven Gefäße ebenfalls Lyve1-positiv waren (97%-100%) (Abb. 4.4 A, B). Umgekehrt koexprimierten nur etwa 70-80% der Lyve1-positiven Gefäße Prox1 und VEGFR3 (Abb. 4.4 C, D). Demnach handelt es sich bei 70-80% aller Lyve1-positiven Gefäße um Lymphgefäße.



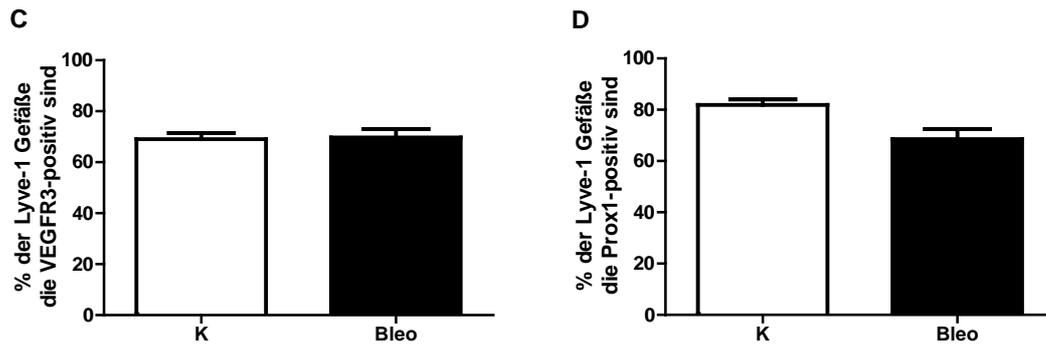


Abb. 4.4 Identifikation Lyve1-positiver Gefäße als Lymphgefäße

Die quantitative Auswertung von A) VEGFR3-positiven bzw. B) Prox1-positiven Gefäßen, die ebenfalls positiv für Lyve1 waren, sowie aller Lyve1-positiver Lymphgefäße, die ebenfalls C) VEGFR3 sowie D) Prox1 auf Gewebe fibrotischer (Bleo) und gesunder (K) Mäuslungen exprimierten (Tag 28), ergab, dass 97-100% aller Prox1- und VEGFR3-positiven Lymphgefäße eine Koexpression mit Lyve1 zeigte. Ca. 80% aller Lyve1-positiven Gefäße koexprimierten Prox1 und VEGFR3 (Mittelwerte \pm SD, K n=3, Bleo n=6).

Der Identifikation der Lymphgefäße folgend wurde das Ausmaß der Lymphangiogenese ermittelt. Die Auswertung der Prox1- und VEGFR3-positiven Gefäße auf den Lungenschnitten PBS- und Bleomycin-behandelter Mäuse (Abb. 4.3) belegten keinen signifikanten Anstieg in der Anzahl der Lymphgefäße in fibrotischem Gewebe (Abb. 4.5 A, B).

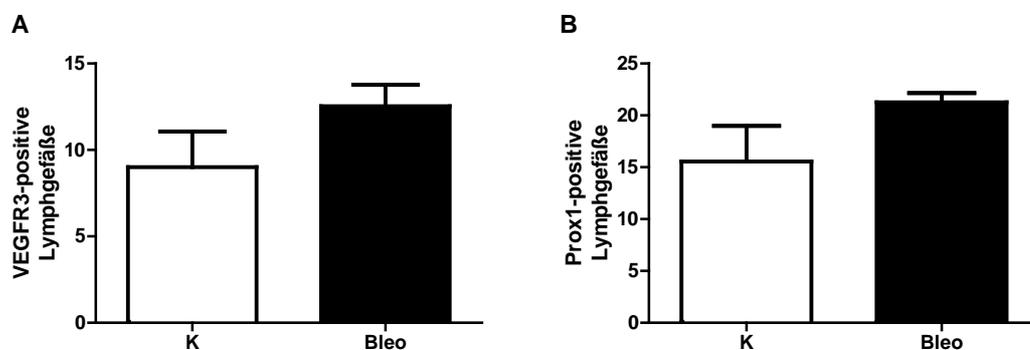


Abb. 4.5 Keine gesteigerte Lymphangiogenese in Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse

Die quantitative Bestimmung der Lymphgefäße in gesunden (K) und fibrotischen (Bleo) Lungen an Tag 28 ergab keine erhöhte Neubildung von Lymphgefäßen in fibrotischen Mäuslungen (Mittelwerte \pm SD, K n=15/5, Bleo n=29/6).

4.1.2 Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße während der Bildung fibrotischer Läsionen

Die Detektion der Fibroseherde im Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse lässt vermuten, dass sich die Fibrose von den Lymphgefäßen beginnend im Gewebe ausbreitet (Abb. 4.2). Um mögliche Ursachen für die perilymphatische Bildung der

Fibrose identifizieren zu können, wurde die Struktur der Lymphgefäße weiter untersucht. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Lymphgefäßen (Lyve1) und muralen Zellen (SMA) auf gesundem Lungengewebe, sowie auf Gewebe von Mauslungen im frühen, mittleren und späten Stadium einer Lungenfibrose (Abb. 4.6) zeigten in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse eine zunehmende Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße.

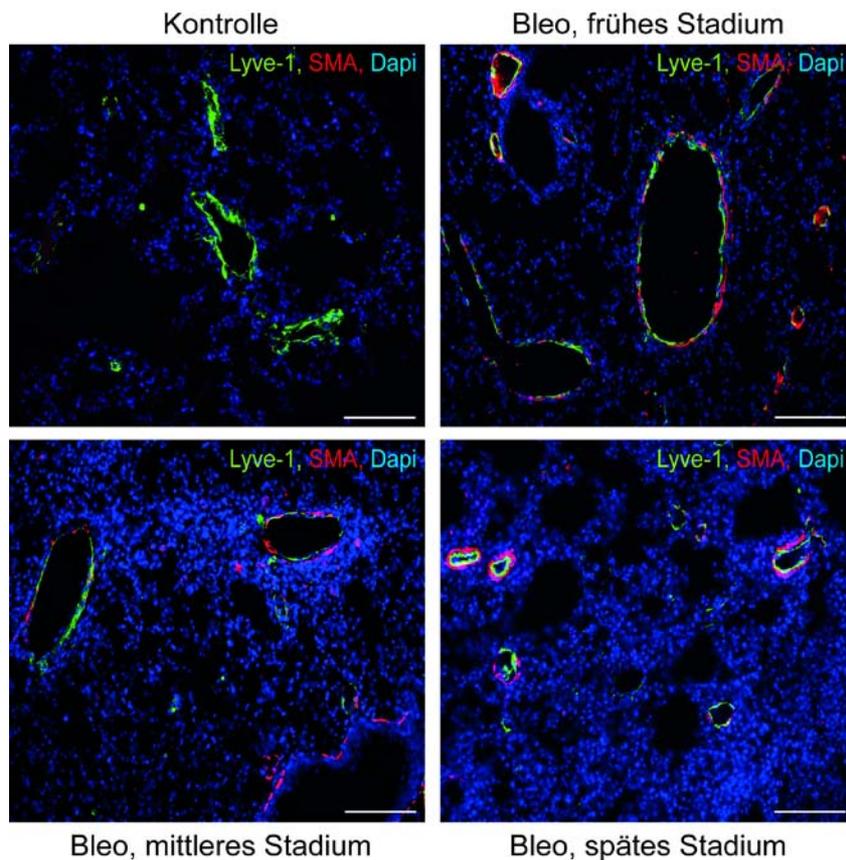


Abb. 4.6 Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße im Rahmen einer Lungenfibrose

Die Doppelfärbung für Lymphgefäße (Lyve1) sowie murale Zellen (SMA) an Tag 28 auf Lungengewebe von gesunden (Kontrolle) und fibrotischen (frühes Stadium, mittleres Stadium, spätes Stadium) Mäusen ließ in jedem Krankheitsstadium eine Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße erkennen. In Kontrolllungen wiesen kaum Lymphgefäße ein SMA-positives Signal auf. Maßstabskala entspricht 100 µm.

Während etwa 70% aller Lyve1-positiven Lymphgefäße in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse eine Ansammlung muraler Zellen zeigten, (Abb. 4.6, 4.7 A), wiesen Kontrolllungen nur eine geringe Anzahl an mit muralen Zellen assoziierten Lymphgefäßen auf (ca. 25%) (Abb. 4.7 A).

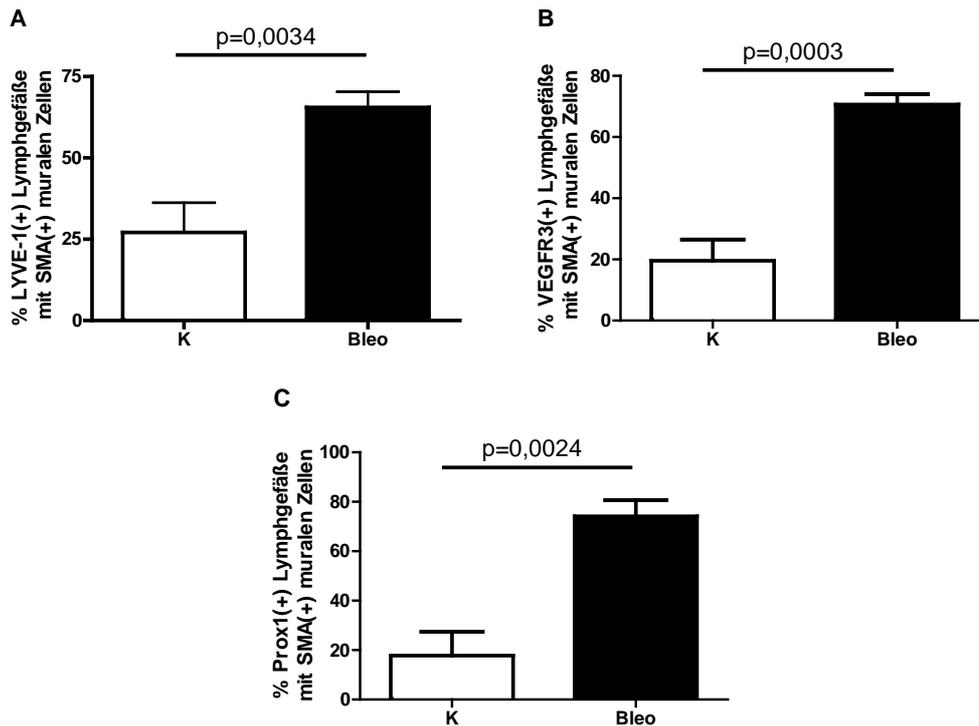


Abb. 4.7 Lungenfibrose geht mit einer Zunahme an Lymphgefäßen, die mit muralen Zellen assoziiert sind, einher

Die Anzahl aller A) Lyve1-positiven, B) VEGFR3-positiven und C) Prox1-positiven Lymphgefäße, die eine Rekrutierung muraler Zellen aufwiesen, wurden auf die Anzahl aller Lymphgefäße in Lungengewebe von PBS-behandelten (K) und Bleomycin-behandelten Mäusen an Tag 28 normiert. Fibrotische Lungen zeigten eine erhöhte Zahl an Lymphgefäßen, die mit muralen Zellen assoziiert sind (Mittelwerte \pm SD, K n=5, Bleo n=5).

Auch die simultane Doppelimmunfluoreszenzfärbung von SMA mit den weiteren Lymphendothelzellmarkern Prox1 und VEGFR3 (Abb. 4.8) sowie deren quantitative Auswertung (Abb. 4.7 B, C) zeigten bei 70-80% aller Lymphgefäße in fibrotischen Lungen eine Assoziation mit muralen Zellen. In den Kontrolllungen wiesen ebenfalls nur etwa 20% aller VEGFR3- und Prox1-positiven Lymphgefäße eine Ansammlung muraler Zellen auf.

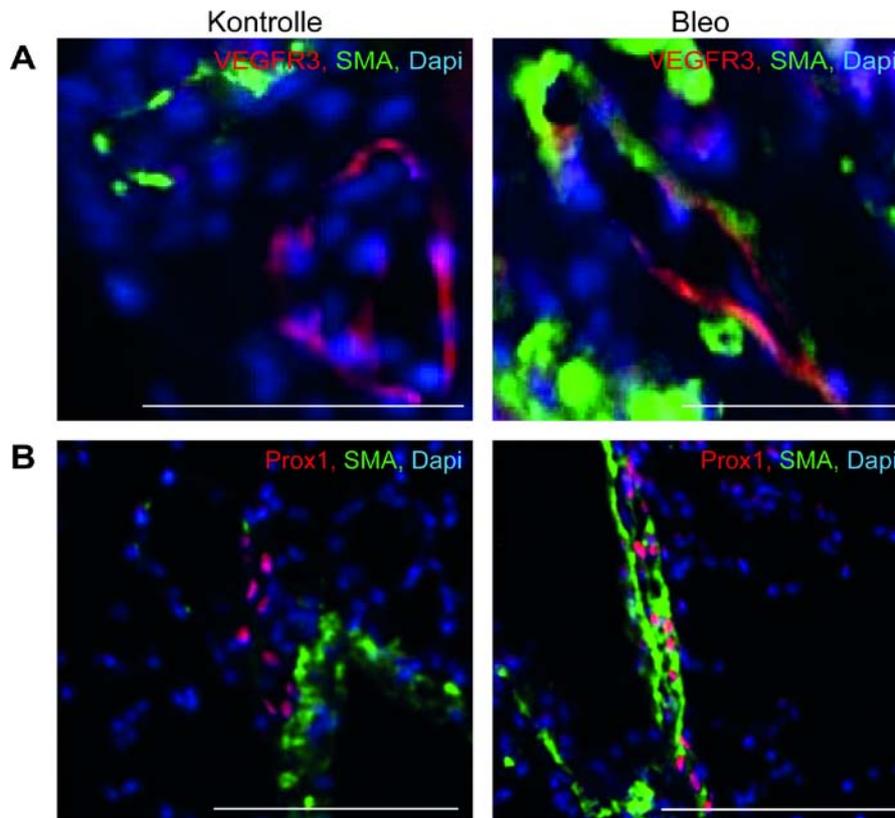


Abb. 4.8 Charakterisierung der Lymphgefäße, die im Rahmen einer Lungenfibrose eine Ansammlung muraler Zellen aufweisen

Die Doppelfärbungen für A) VEGFR3/SMA sowie B) Prox1/SMA auf pulmonalem Gewebe von PBS-behandelten Kontrollmäusen sowie Bleomycin-behandelten Mäusen an Tag 28 zeigten, dass in fibrotischen Lungen auch VEGFR3- und Prox1-positive Lymphgefäße mit muralen Zellen assoziiert sind. Maßstabskala entspricht 100 µm.

Es konnte beobachtet werden, dass einige Lymphgefäße zwar von einer Schicht muraler Zellen umgeben waren, darüber hinaus aber noch kein fibrotischer Umbau des Lungenparenchyms erkennbar war (Abb. 4.6, frühes Stadium). Daher lässt sich vermuten, dass die Rekrutierung muraler Zellen um Lymphgefäße früh in der Entstehung einer Lungenfibrose auftritt. Um die zeitliche Abfolge der Ereignisse besser erfassen zu können, wurden Mauslungen an Tag 11 nach Beginn der Bleomycin-Behandlung entnommen. Tag 11 entspricht dem Anfangsstadium in der Entwicklung der Lungenfibrose. Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung des Lungengewebes für Lyve1 und SMA ergab, dass es zu diesem Zeitpunkt bereits zu einer Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße gekommen ist (Abb. 4.9). Allerdings war gleichzeitig noch kein perilymphatischer fibrotischer Umbau des Lungengewebes zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Assoziation pulmonaler Lymphgefäße mit muralen Zellen tatsächlich ein frühes Ereignis in der Entstehung einer Lungenfibrose darstellt.

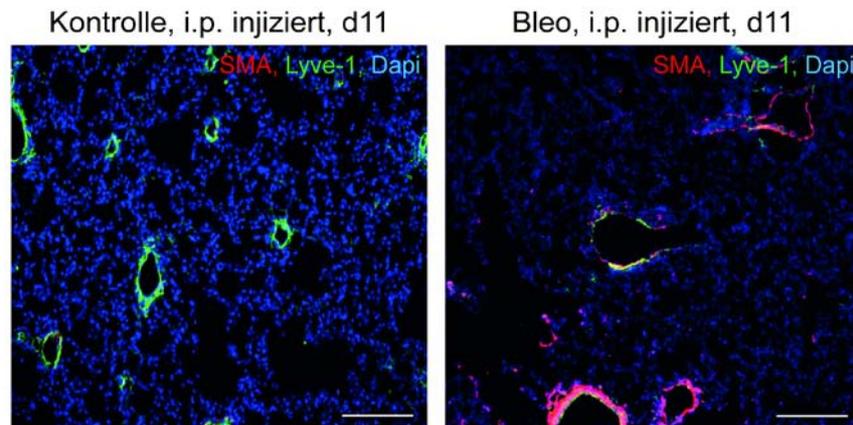


Abb. 4.9 Assoziation pulmonaler Lymphgefäße mit muralen Zellen tritt früh in der Entstehung der Lungenfibrose auf

Mäuse wurden dreimal mit Bleomycin (10 mg/kg Körpergewicht in 100 µl PBS) behandelt und deren Lungen an Tag 11 entnommen. Doppelimmunfluoreszenzfärbung für SMA und Lyve1 auf fibrotischen und gesunden Mauslungen an Tag 11 zeigte, dass die Rekrutierung muraler Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits erfolgte. Maßstabskala entspricht 100 µm.

Zur Induktion der Lungenfibrose wurde das Bleomycin in der Regel intraperitoneal verabreicht. Doch auch eine einmalige intratracheale (i.t.) Injektion von Bleomycin führte in den Mauslungen zu einer Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße (Abb. 4.10), so dass man davon ausgehen kann, dass dieser Lymphgefäßphänotyp in einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose unabhängig von der Injektionsroute auftritt.

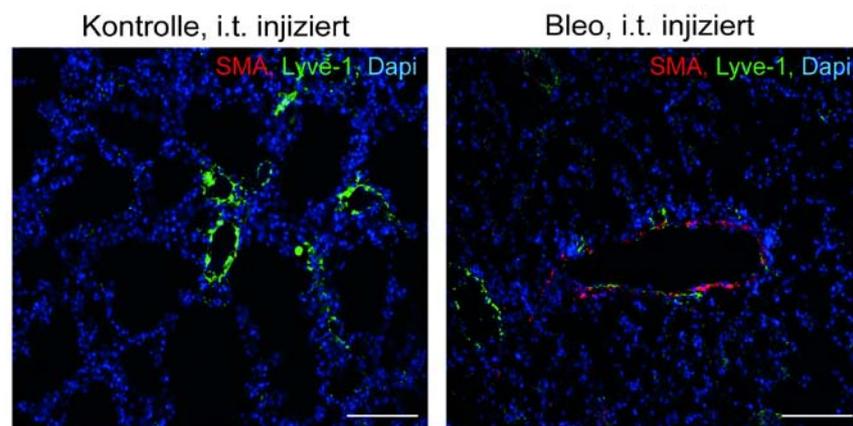


Abb. 4.10 Assoziation pulmonaler Lymphgefäße mit muralen Zellen tritt unabhängig der Injektionsroute für Bleomycin auf

Mäusen wurde Bleomycin (0,05 mg) einmalig intratracheal verabreicht. Lymphgefäße in Lungen von Mäusen, denen Bleomycin i.t. injiziert wurde, zeigten in einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung für SMA und Lyve1 ebenfalls eine Rekrutierung muraler Zellen. Maßstabskala entspricht 100 µm.

In der Regel bestehen Lymphgefäße aus einer einfachen Schicht Lymphendothelzellen. Blutgefäße hingegen sind ferner von einer muralen Zellschicht umgeben und weisen eine Basalmembran auf. Eine

Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Lyve1 und dem Basalmembranmarker Laminin ergab, dass auch die Lymphgefäße in fibrotischem Lungengewebe von einer Basalmembran umgeben sind. Lymphgefäße in Kontrolllungen exprimierten kaum Laminin (Abb. 4.11).

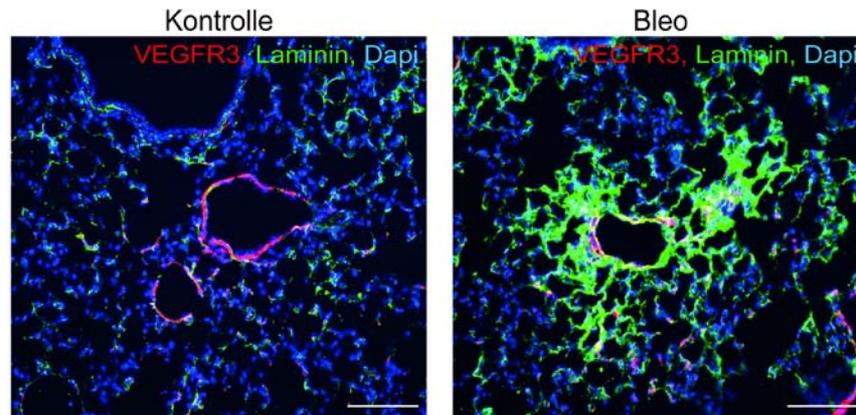


Abb. 4.11 Lymphgefäße in fibrotischem Lungengewebe sind von Basalmembran umgeben

Die simultane Immundetektion von Laminin und VEGFR3 auf Gewebe von Kontroll- und fibrotischen Lungen an Tag 28 zeigte, dass Lymphgefäße in fibrotischem Lungengewebe von einer Basalmembran umgeben sind. Maßstabskala entspricht 100 µm.

Eine Remodellierung von Lymphgefäßen wird ferner bei der Entstehung von Tumoren und während des Wundheilungsvorgangs beobachtet (Baluk et al., 2005; Isaka et al., 2004). Folgend wurde daher überprüft, ob die Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße ebenfalls im Verlauf dieser Prozesse eine Rolle spielt. Doppelimmunfluoreszenzfärbungen von Lyve1 und SMA auf Gewebe muriner Brusttumore und kutanem Narbengewebe zeigten jedoch SMA-freie Lymphgefäße (Abb. 4.12). Demnach handelt es sich bei der Assoziation von Lymphgefäßen mit muralen Zellen vermutlich um ein für die Bleomycin-induzierte Lungenfibrose spezifisches Phänomen.

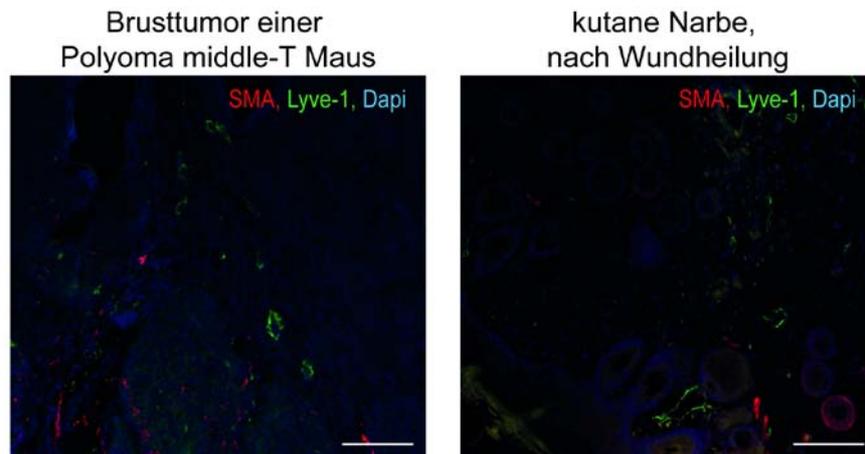


Abb. 4.12 Lymphgefäße in murinem Tumor und murinem, kutanem Narbengewebe sind frei von muralen Zellen

Murine Brusttumore von Polyoma Middle-T-Mäusen sowie murines Narbengewebe aus der Haut ließen mittels einer Immundetektion von SMA und Lyve1 keine Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße erkennen. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

4.1.3 Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße ist PDGF-B/PDGFR- β -abhängig

Im Weiteren sollen die potentiellen Signalübertragungswege identifiziert werden, die an der abnormen Rekrutierung muraler Zellen um pulmonale Lymphgefäße beteiligt sind. Zu diesem Zweck wurden qualitative und quantitative Real Time Genexpressionsanalysen der Faktoren durchgeführt, die durch die Rekrutierung muraler Zellen für die Reifung immaturer Blutgefäße verantwortlich sind. Von den untersuchten Faktoren PDGF-A, PDGF-B, PDGFR- β , Ephrin B4, Ephrin B2, Angiopoietin 1 (Ang1), Ang2 sowie Endoglin (Petrova et al., 2004; Foo et al., 2006; Hellström et al., 1999; Shimoda et al., 2007) (Abb. 4.13 A-H), zeigten ausschließlich PDGF-B sowie der entsprechende Rezeptor PDGFR- β eine signifikant höhere Expression in fibrotischen Lungen (Bleo) (Abb. 4.13 B, C).

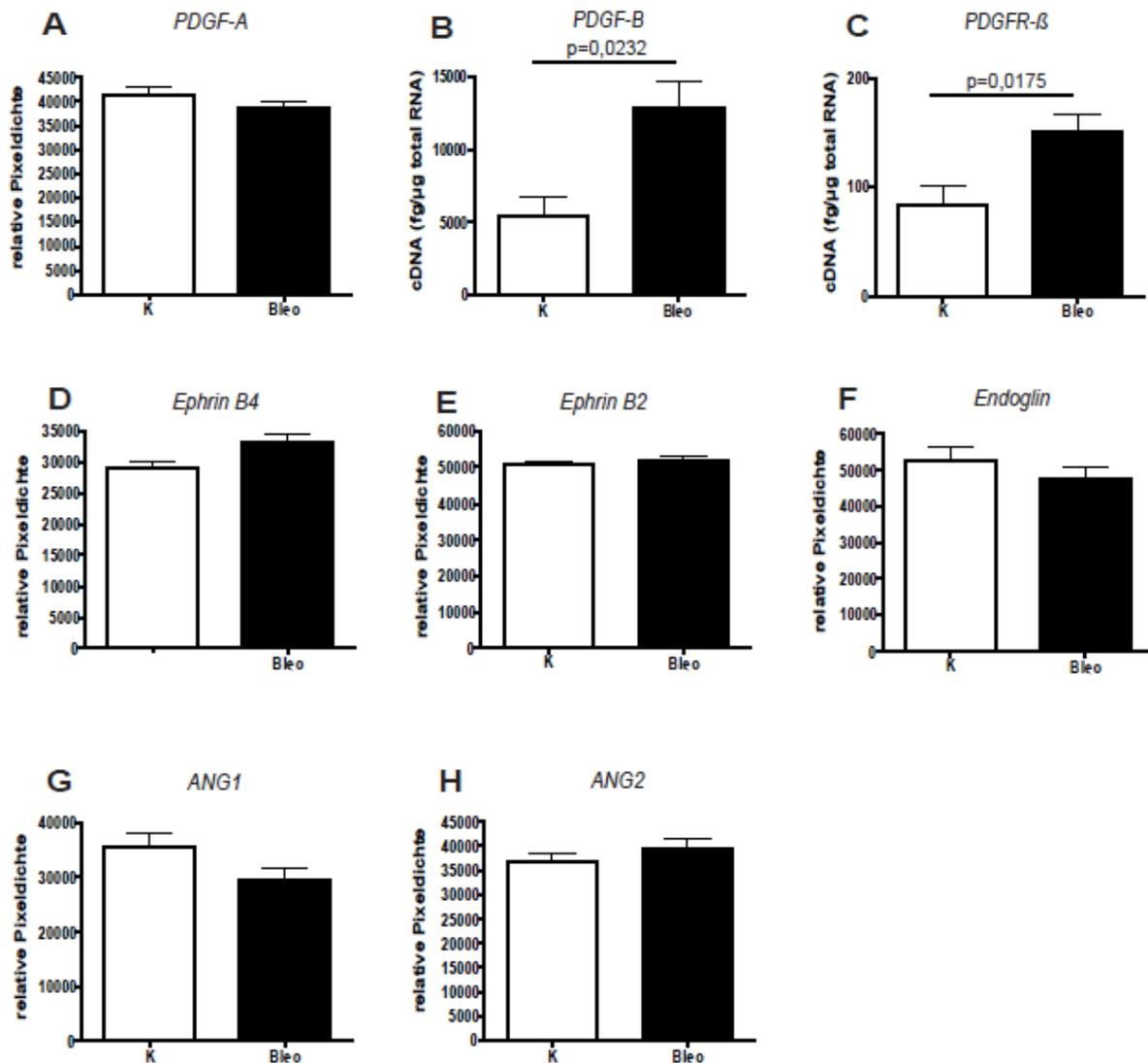


Abb. 4.13 PDGF-B- und PDGFR-β-mRNA-Expression in fibrotischen Mauslungen erhöht

Qualitative bzw. quantitative Genexpressionsanalysen von *PDGF-A*, *PDGF-B*, *PDGFR-β*, *Ephrin B4*, *Ephrin B2*, *Angiopoietin 1 (Ang1)*, *Angiopoietin 2 (Ang2)* sowie *Endoglin* wurden in Gewebelysaten von Lungen Bleomycin- und PBS-behandelter Mäuse an Tag 28 durchgeführt. *PDGF-A*, *Ephrin B4*, *Ephrin B2*, *Ang1*, *Ang2* und *Endoglin* zeigten zwischen gesunden und fibrotischen Lungen keinen signifikanten Expressionsunterschied. *PDGF-B* und *PDGFR-β* wurden in fibrotischen Lungen höher exprimiert (Mittelwerte \pm SD, K n=8, Bleo n=10).

Unter physiologischen Umständen exprimieren Endothelzellen PDGF-B, das die Migration von PDGFR-β-positiven muralen Zellen initiiert (Hellström et al., 1999; Lindahl et al., 1997). Um zu untersuchen, ob der PDGF-B/PDGFR-β-Signaltransduktionsweg für die Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße verantwortlich ist, wurden deshalb zunächst Lymphendothelzellen (LECs) aus den Lungen gesunder und Bleomycin-behandelter Mäuse isoliert und auf ihre PDGF-B-

Expression hin untersucht. Vorab wurde die Reinheit der isolierten Lymphendothelzellkultur untersucht. Zu diesem Zweck wurden LECs aus gesunden und fibrotischen Lungen für 2',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Lyve1 und Prox1 fluoreszenzgefärbt (Abb. 4.14 A, B). DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA eingesetzt wird und Zellkerne in Blau sichtbar macht. Zur quantitativen Bestimmung der Reinheit der Lymphendothelzellkultur wurde die Anzahl der Prox1- und Lyve1-positiven Zellen auf die Gesamtzellzahl (DAPI-positive Zellen) bezogen. Die quantitative Auswertung der Zellkulturfärbung ergab bei 95% der isolierten Zellen ein doppelt positives Signal der Lymphendothelzellmarker Lyve1 und Prox1 (Abb. 4.14 C, D), weshalb die Zellkultur als rein bezeichnet werden kann.

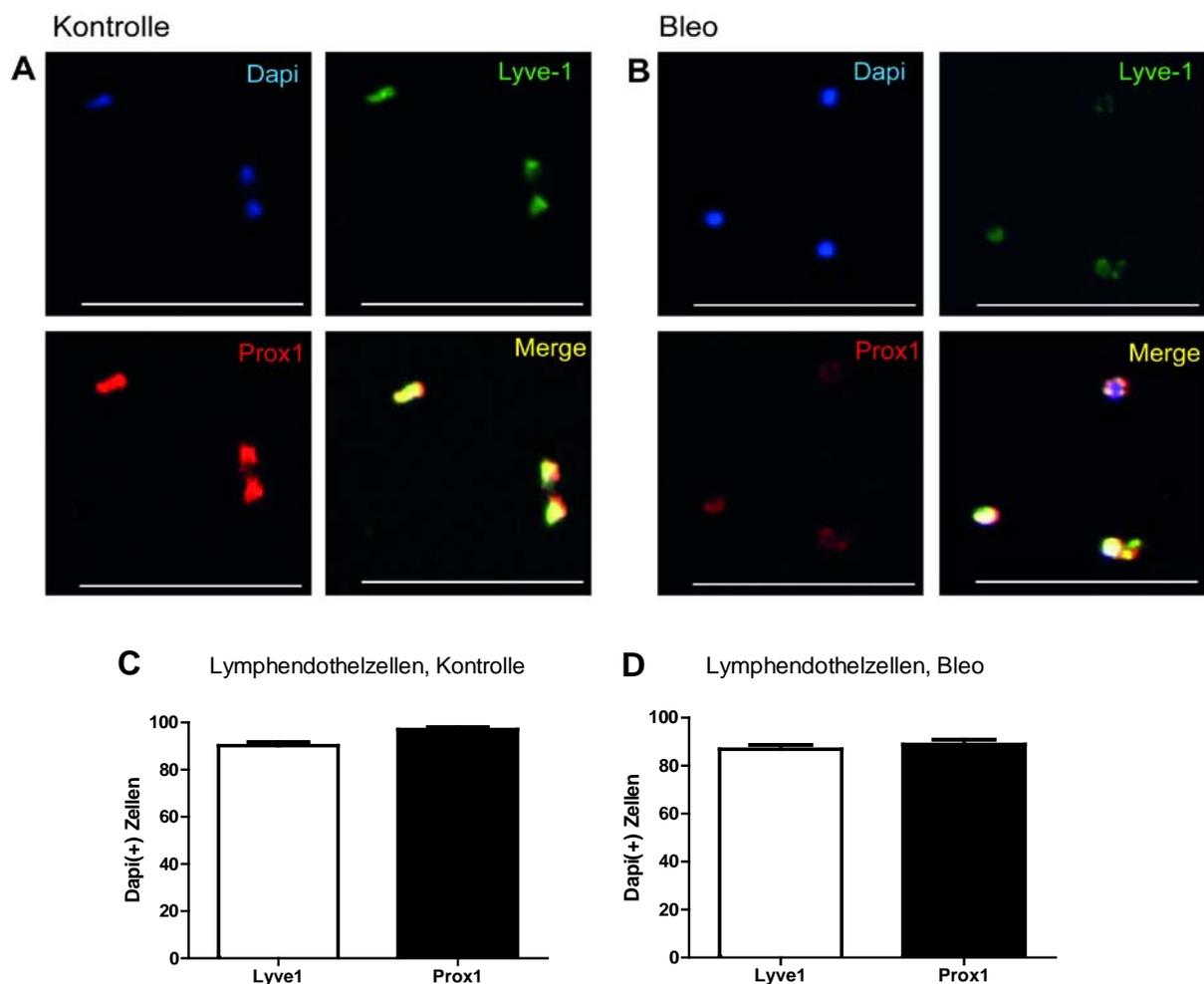


Abb. 4.14 Charakterisierung isolierter Lungenlymphendothelzellen

Lymphendothelzellen wurden aus gesunden Kontrolllungen und fibrotischen Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse an Tag 28 isoliert und für DAPI sowie die Lymphendothelzellmarker Lyve1 und Prox1 immunfluoreszenzgefärbt (A, B). Maßstabskala entspricht 100 μ m. Die quantitative Auswertung der gefärbten Zellen aus C) gesunden und D) fibrotischen Lungen zeigte, dass etwa 90% aller DAPI-positiven Zellen ebenfalls positiv für Prox1 und Lyve1 sind (Mittelwerte \pm SD).

Anschließend wurden die isolierten LECs mittels quantitativer Real Time Analyse auf ihre PDGF-B-Expression hin untersucht (Abb. 4.15 A). Während LECs aus gesunden Lungen nur geringe Mengen an PDGF-B exprimierten, zeigten LECs aus fibrotischen Lungen eine signifikant erhöhte PDGF-B-Expression. Lymphendothelzellen gesunder Lungen, die *ex vivo* mit Bleomycin behandelt wurden, zeigten eine geringfügig, jedoch nicht signifikant höhere PDGF-B-Expression (Abb. 4.15 B).

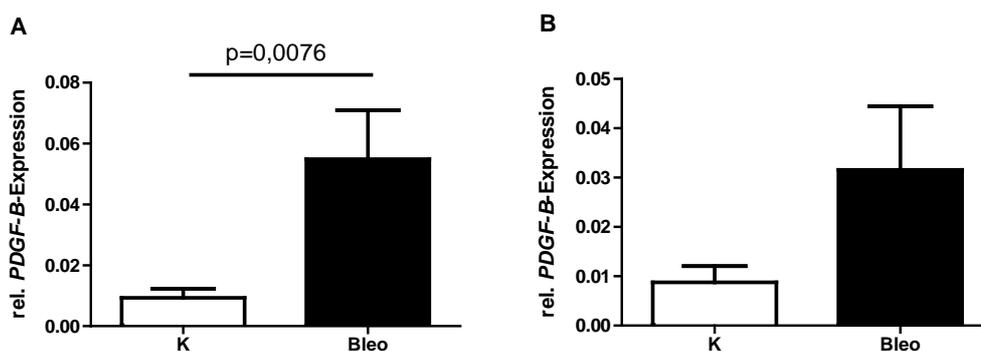


Abb. 4.15 Erhöhte *PDGF-B*-mRNA-Expression in isolierten LECs infolge der Bleomycin-Behandlung

Die Genexpressionsanalyse von *PDGF-B* in A) Lungenlymphendothelzellen, die aus Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse (Bleo) an Tag 28 isoliert wurden, zeigte einen signifikanten Anstieg verglichen mit LECs aus gesunden Kontrolllungen (K) (K n=15, Bleo n=14). B) Lungenlymphendothelzellen, die aus gesunden Kontrolllungen an Tag 28 isoliert und mit Bleomycin-angereichertem Medium (Bleo) (10 µg/ml Medium, 12 h) inkubiert wurden, zeigten eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der *PDGF-B*-Expression verglichen mit Zellen, die in Medium ohne Bleomycin (K) (12 h) inkubiert wurden (Mittelwerte ± SD, K n=8, Bleo n=9).

Ergänzend zur Genexpressionsanalyse, konnte mittels einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung ein deutliches PDGF-B-positives Fluoreszenzsignal auf VEGFR3-positiven Lymphgefäßen in Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse lokalisiert werden. Die Lymphgefäße der Kontrolllungen blieben weitestgehend frei von PDGF-B (Abb. 4.16 A). In Abb. 4.16 B ist zu erkennen, dass die Lymphgefäße in fibrotischen Lungen darüber hinaus mit PDGFR-β-positiven muralen Zellen assoziiert sind. In den Kontrolllungen hingegen konnte kaum perilymphatisches PDGFR-β-positives Fluoreszenzsignal gefunden werden.

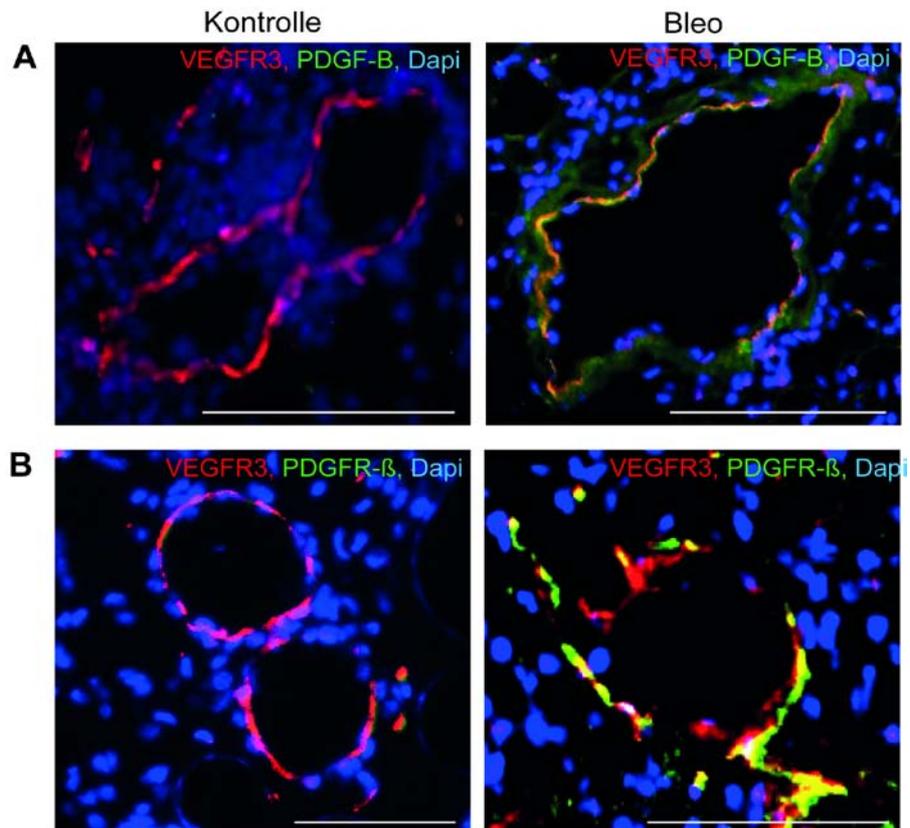


Abb. 4.16 Lymphgefäße in fibrotischen Lungen weisen ein PDGF-B-positives, assoziierte murale Zellen ein PDGFR- β -positives Fluoreszenzsignal auf
 Die Doppelfärbungen für A) PDGF-B/VEGFR3 sowie B) PDGFR- β /VEGFR3 auf pulmonalem Gewebe von PBS-behandelten Kontrollmäusen und Bleomycin-behandelten Mäusen an Tag 28 zeigten eine intensive Fluoreszenzfärbung für PDGF-B und PDGFR- β auf bzw. um Lymphgefäße in fibrotischen Lungen. Lymphgefäße gesunder Lungen wiesen kaum PDGF-B- oder PDGFR- β -positives Signal auf. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

Im Folgenden wurde untersucht, ob es in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse zu einer erhöhten Aktivierung des PDGF-B/PDGFR- β -Signaltransduktionsweges kommt. Zu diesem Zweck wurde die Aktivierung des PDGFR- β in Proteinlysaten aus gesunden sowie fibrotischen murinen Lungen mittels Western Blot analysiert. Die Aktivierung eines Rezeptors, die eine darauffolgende Signalübertragung ermöglicht, geht mit der Phosphorylierung des Rezeptors einher. Deshalb kann die Aktivierung eines Rezeptors über dessen Phosphorylierung bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde sowohl Gesamt-PDGFR- β als auch die phosphorylierte Form des Rezeptors, der phospho-PDGFR- β , mittels einer Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 4.17 A). Die Menge des phospho-PDGFR- β wurde quantitativ bestimmt und auf die Menge des Gesamt-PDGFR- β bezogen (Abb. 4.17 B). Wie in Abbildung 4.17 A und B zu erkennen, kam es in fibrotischen Lungen zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung des PDGFR- β .

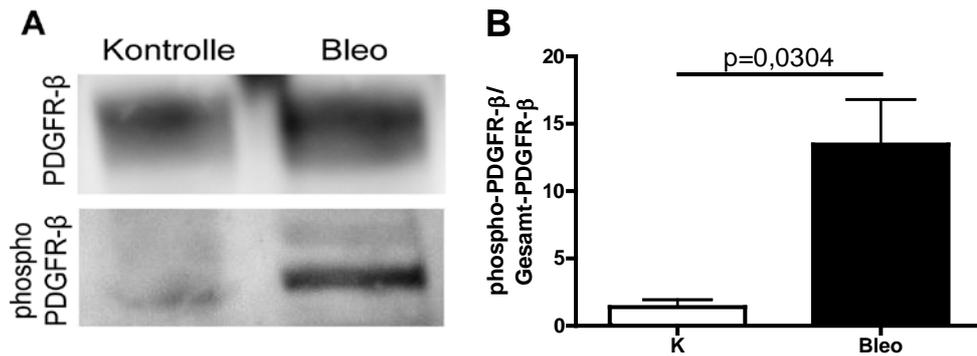


Abb. 4.17 Lungenfibrose geht mit erhöhter PDGFR- β -Aktivität im Lungengewebe einher

A) Es wurde eine Western Blot-Analyse von PDGFR- β und phospho-PDGFR- β in Gewebelysaten von Lungen Bleomycin- und PBS-behandelter Mäuse durchgeführt. B) Die Menge des phospho-PDGFR- β wurde auf den gesamten PDGFR- β -Gehalt der Lunge bezogen. Gewebelysate von Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse zeigten signifikant erhöhte Mengen an phospho-PDGFR- β (Mittelwerte \pm SD, C n=5, Bleo n=13).

Zur *in situ* Lokalisierung des aktivierten Rezeptors wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung für phospho-PDGFR- β und Lyve1 auf Lungenschnitten durchgeführt. Lymphgefäße fibrotischer Lungen waren von einer intensiven phospho-PDGFR- β -Färbung umgeben, während Lymphgefäße der Kontrolllungen kaum perilymphatisches phospho-PDGFR- β -positives Signal aufwiesen (Abb. 4.18). Diese Daten zeigen, dass die mit pulmonalen Lymphgefäßen assoziierten muralen Zellen in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse eine erhöhte Phosphorylierung und somit Aktivierung des PDGFR- β aufweisen.

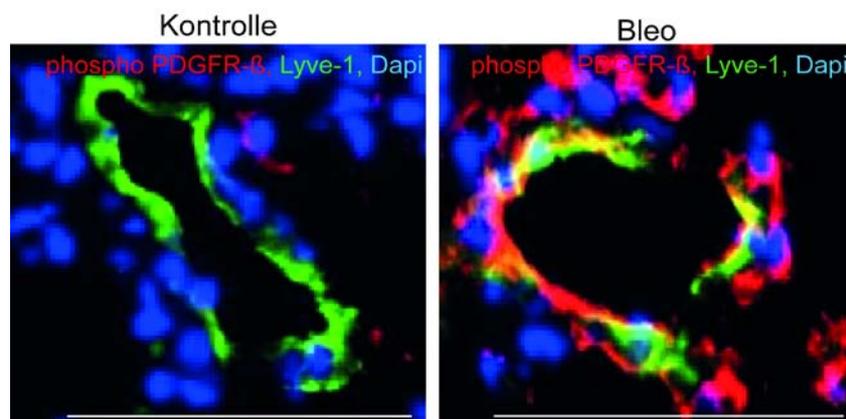


Abb. 4.18 Perilymphatische Detektion von phospho-PDGFR- β in Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse

Doppelfärbung von phospho-PDGFR- β und Lyve1 auf pulmonalem Gewebe fibrotischer (Bleo) und gesunder (K) Mäuse an Tag 28 zeigte ein starkes Fluoreszenzsignal des phospho-PDGFR- β um Lymphgefäße in fibrotischen Lungen. Lymphgefäße gesunder Mauslungen zeigten kaum phospho-PDGFR- β -positives Signal. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

Anschließend wurde untersucht, ob eine Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges die Entstehung einer Lungenfibrose und die Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße beeinflussen kann. Zur Inhibierung von PDGFR- β wurden Mäuse während der Induktion einer Lungenfibrose mit dem PDGFR- β -Inhibitor AG-1296 (Kovalenko et al., 1997) (0,5 ng pro Maus, fünfmal wöchentlich, i.p.) behandelt. Die Behandlung der Mäuse mit AG-1296 erfolgte ab Tag 14 nach Beginn der Bleomycin-Behandlung und somit zu einem Zeitpunkt, an dem es bereits zu einer Anlagerung muraler Zellen um Lymphgefäße kam. Die H&E-Färbung von Lungengewebe Bleomycin- sowie Bleo+AG-1296-behandelter Mäuse und die quantitative Auswertung der Färbung zeigten, dass die Gabe von AG-1296 zu einem weniger ausgeprägten fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms und zu einer geringeren Zunahme des Lungengewebes führte (Abb. 4.19 A, B).

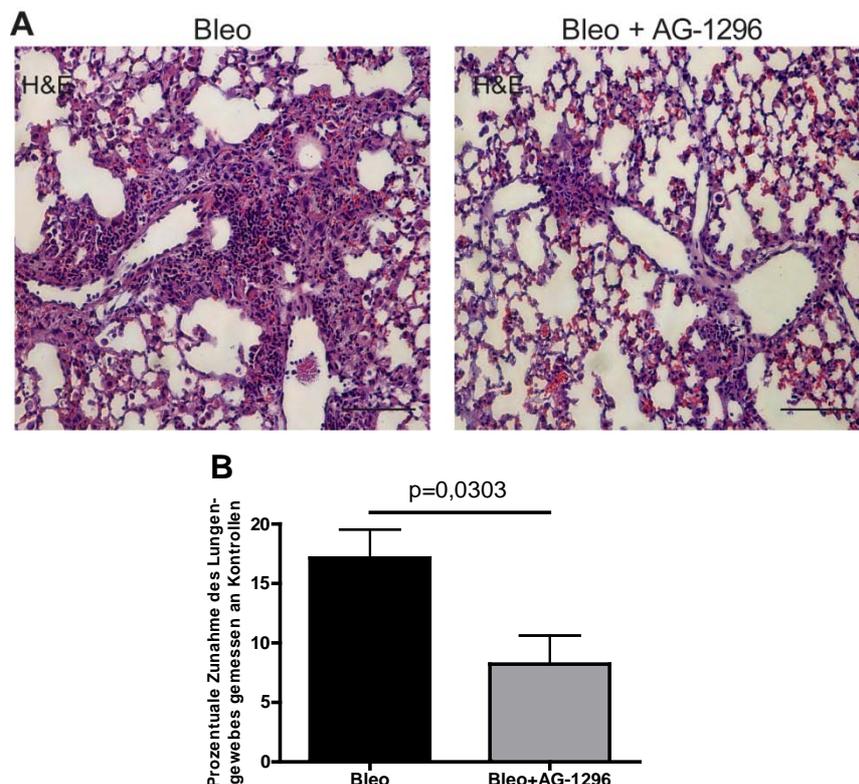


Abb. 4.19 Hemmung der PDGF-B/PDGFR- β -Signaltransduktion führt zu vermindertem fibrotischem Umbau des Lungenparenchyms

A) Es wurde eine H&E-Färbung auf Lungengewebe von Mäusen die Bleomycin oder Bleomycin + AG-1296 erhielten, durchgeführt. Bleo+AG-1296-behandelte Mäuse zeigten einen schwächeren fibrotischen Umbau des Gewebes. Maßstabskala entspricht 100 μ m. B) Die prozentuale Zunahme des Lungengewebes von Mäusen, die mit Bleomycin (Bleo) oder Bleomycin + AG-1296 (Bleo+AG-1296) behandelt wurden, wurde auf die Fläche des Lungengewebes von Kontrolllungen normiert. Die Auswertung zeigte, dass es in Lungen der Bleo+AG-1296-behandelten Mäusen zu einer signifikant geringeren Zunahme des Lungengewebes kam (Mittelwerte \pm SD, K n=15, Bleo n= 29, Bleo+AG-1296 n=13).

Um die Auswirkungen der PDGFR- β -Hemmung auf die Remodellierung der Lymphgefäße zu detektieren, wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen für Lyve1/SMA, VEGFR3/SMA sowie Prox1/SMA auf Lungengewebe von gesunden Kontrollen (K), Bleomycin-behandelten (Bleo) sowie Bleomycin- und Inhibitor-behandelten (Bleo+AG-1296) Mäusen durchgeführt. Wie die quantitative Auswertung der Färbungen zeigt, wiesen fibrotische Lungen durch die Hemmung des PDGFR- β eine signifikant geringere Anzahl an Lymphgefäßen, die mit muralen Zellen assoziiert sind, auf (Abb. 4.20 A, B, C).

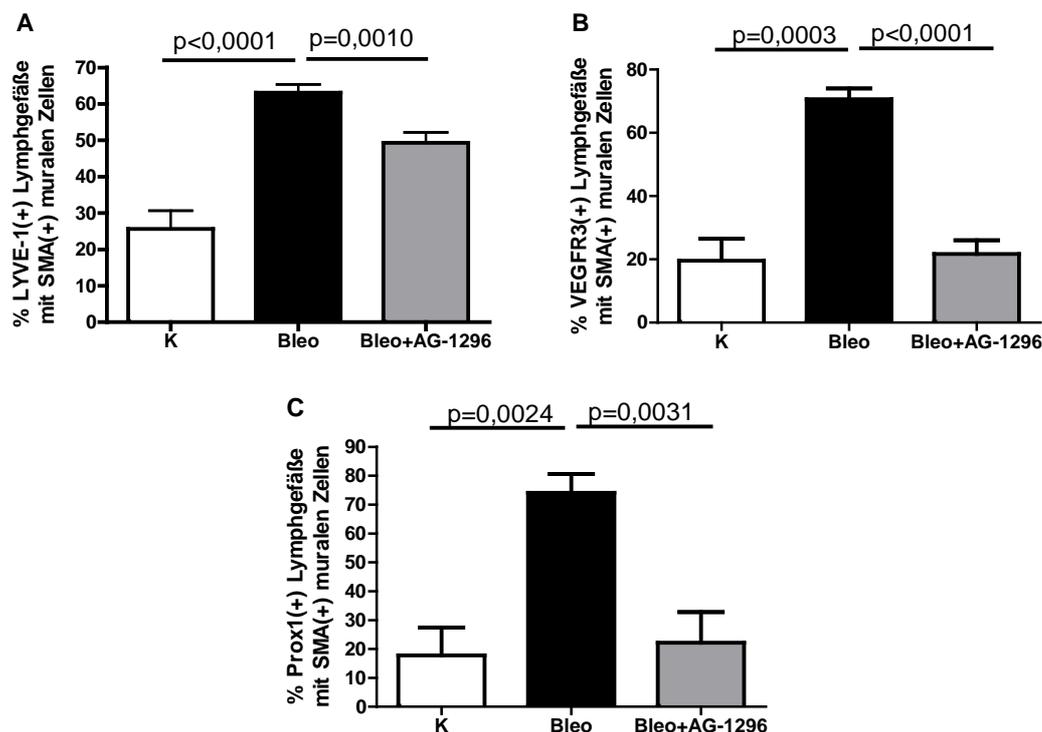


Abb. 4.20 Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges geht mit Reduktion der Anzahl an Lymphgefäßen, die mit muralen Zellen assoziiert sind, einher

Immunfluoreszenzfärbungen von A) Lyve1 B) VEGFR3 sowie C) Prox1 mit SMA auf Lungengewebe von Mäusen, die mit PBS (K), Bleomycin (Bleo) oder Bleomycin und AG-1296 (Bleo + AG-1296) behandelt wurden, wurden quantitativ ausgewertet. Dafür wurde die Anzahl der Lymphgefäße, die eine Ansammlung muraler Zellen aufweisen, auf die Gesamtzahl aller Lymphgefäße bezogen. Infolge der Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges (Bleo + AG-1296) reduzierte sich die Anzahl an Lymphgefäßen, die einen Besatz muraler Zellen aufwiesen, signifikant (Mittelwerte \pm SD, K n=15, Bleo n= 29, Bleo+AG-1296 n=13).

Darüber hinaus zeigte eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung für phospho-PDGFR- β und Lyve1 ein sehr schwaches perilymphatisches phospho-PDGFR- β -positives-Signal in den Lungen der AG-1296-behandelten Mäuse (Abb. 4.21), verglichen mit Lungen der nur mit Bleomycin behandelten Mäuse (Abb. 4.18), was dafür spricht,

dass die Hemmung des PDGFR- β die Rekrutierung muraler Zellen um Lymphgefäße verhindert.

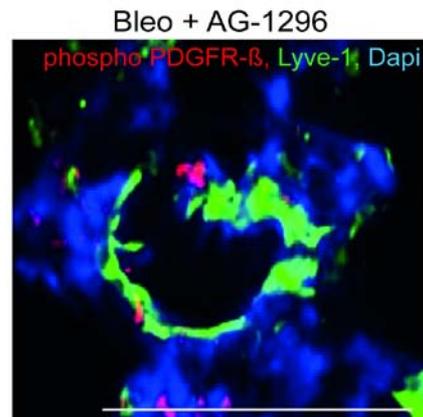


Abb. 4.21 Reduktion der perilymphatischen PDGFR- β -Aktivität in fibrotischem Lungengewebe infolge der Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Lyve1 und phospho-PDGFR- β zeigte, dass Lymphgefäße in Lungen von Mäusen, die mit Bleo+AG-1296 behandelt wurden, an Tag 28 nur ein marginales Fluoreszenzsignal für phospho-PDGFR- β aufwiesen. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

4.1.4 Ansammlung muraler Zellen um pulmonale Lymphgefäße führt zu einer Störung des Lymphabflusses

Eine der Hauptaufgaben des Lymphgefäßsystems ist der Abtransport interstitieller Flüssigkeiten und die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase (Aukland und Reed, 1993). In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Lymphgefäße in fibrotischen Lungen von muralen Zellen und einer Basalmembran umgeben sind. Diese veränderte Struktur der pulmonalen Lymphgefäße könnte zu einer Störung des Lymphabflusses führen.

Albumin und Hyaluronsäure (HA) sind zwei Moleküle, die normalerweise mit der Lymphflüssigkeit abtransportiert werden. Darüber hinaus werden Albumin und HA mit der Entstehung einer Lungenfibrose in Zusammenhang gebracht (Meran et al., 2008; Tager et al., 2008). Deshalb wurde folgend mittels Immunfluoreszenzfärbungen für Lyve1 und Albumin bzw. Lyve1 und HA untersucht, ob die Remodellierung lymphatischer Gefäße den Abtransport von Albumin und HA aus dem Lungenparenchym beeinflusst (Abb. 4.22, 4.23). Wie in Abb. 4.22 und 4.23 dargestellt, wiesen die Lungen gesunder Mäuse nur geringe Mengen an Albumin und HA auf. Bereits zu Beginn der Fibroseentstehung (frühes Stadium) konnte eine perilymphatische Akkumulation beider Moleküle nachgewiesen werden. Mit

zunehmender Schwere der Fibrose (mittleres Stadium, spätes Stadium) akkumulierten auch Albumin und HA zunehmend im perilymphatischen Raum.

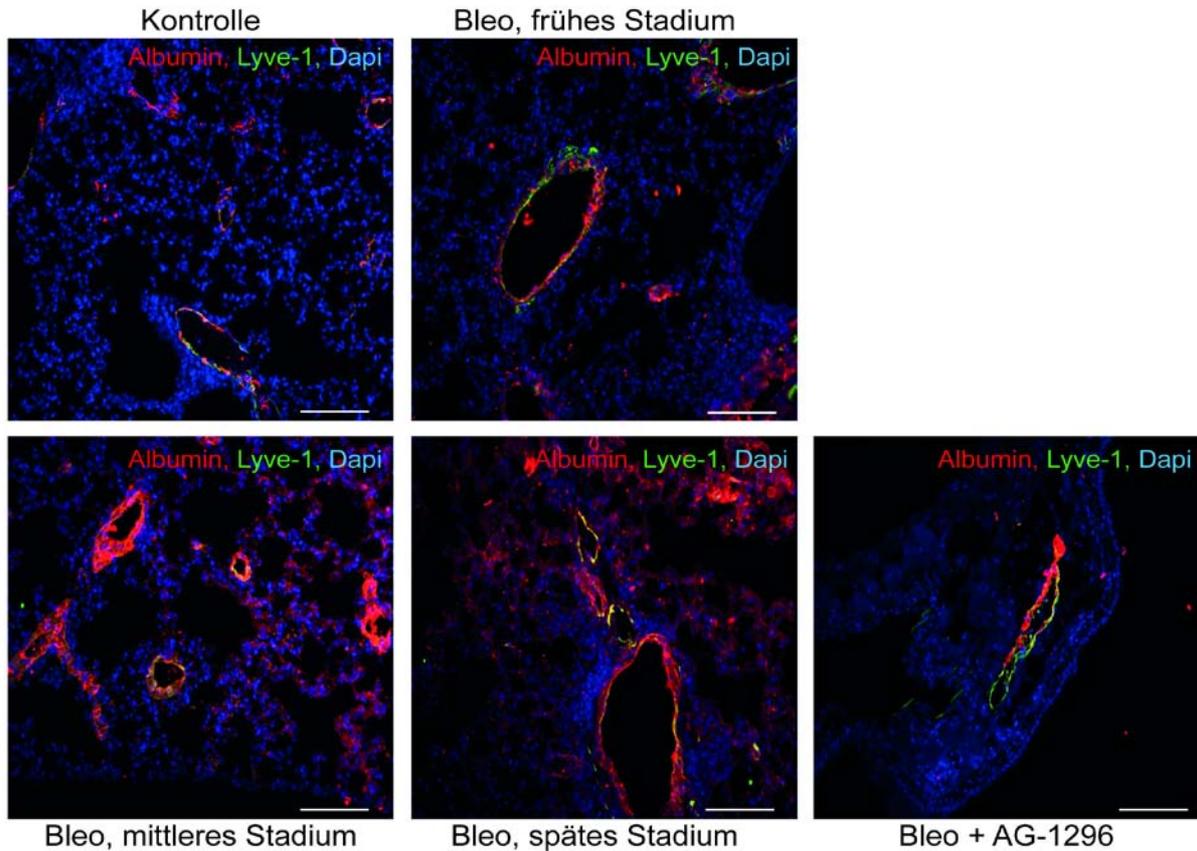


Abb. 4.22 Albumin akkumuliert in murinem Lungengewebe perilymphatisch mit voranschreitender Lungenfibrose

Es wurde eine simultane Immundetektion von Albumin und Lyve1 in Lungen von Mäusen, die mit PBS (K), Bleomycin (Bleo) oder Bleomycin und AG-1296 (Bleo + AG-1296) behandelt wurden, durchgeführt. Fibrotische Lungen wurden im frühen, mittleren und späten Stadium betrachtet. Die Färbung ergab, dass das perilymphatische Fluoreszenzsignal für Albumin mit voranschreitender Fibrose zunahm. PBS- und Bleo+AG-1296-behandelte Mäuse zeigten ein geringes Fluoreszenzsignal für Albumin. Maßstabskala entspricht 100 μm .

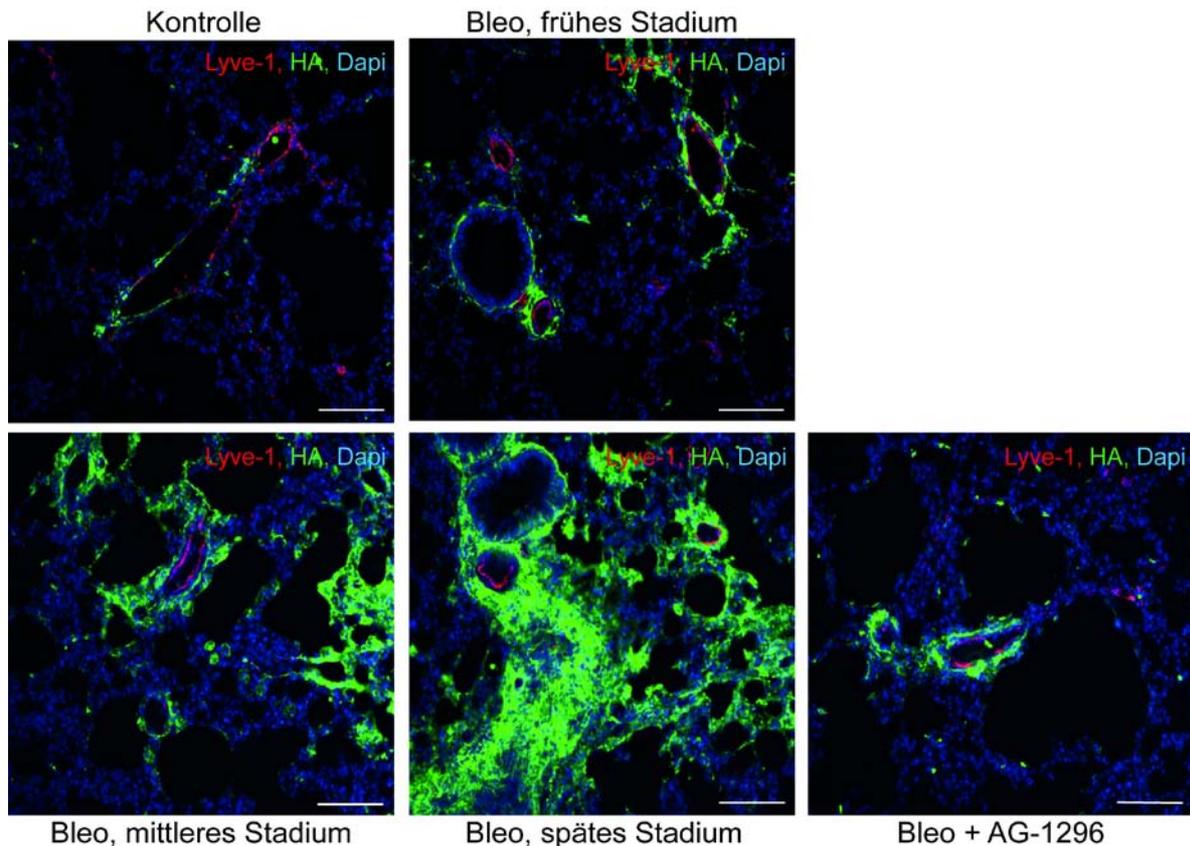


Abb. 4.23 Hyaluronsäure akkumuliert perilymphatisch in murinem Lungengewebe mit voranschreitender Lungenfibrose

Es wurde eine simultane Immundetektion von Hyaluronsäure (HA) und Lyve1 in Lungen von Mäusen, die mit PBS (K), Bleomycin (Bleo) oder Bleomycin und AG-1296 (Bleo + AG-1296) behandelt wurden, durchgeführt. Fibrotische Lungen wurden im frühen, mittleren und späten Stadium betrachtet. Die Färbung ergab, dass das perilymphatische Fluoreszenzsignal für HA mit voranschreitender Fibrose zunahm. PBS- und Bleo+AG-1296-behandelte Mäuse zeigten ein geringes Fluoreszenzsignal für HA. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

Da Albumin und HA die Rekrutierung von Fibroblasten initiieren, wurde mittels einer Färbung für das Fibroblast-specific Protein-1 (FSP) und VEGFR3 überprüft, ob die zunehmende perilymphatische Akkumulation von Albumin und HA mit einem Anstieg der Fibroblastenzahl einherging (Abb. 4.24). Im Lungengewebe gesunder Kontrollmäuse waren kaum Fibroblasten zu finden. Doch bereits im frühen Stadium der Fibrose erhöhte sich vor allem perilymphatisch die Zahl der Fibroblasten. Mit Voranschreiten der Fibrose stieg auch die Zahl der Fibroblasten im perilymphatischem Raum zunehmend. Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass die Rekrutierung muraler Zellen um Lymphgefäße zu einer chronischen Lymphstasis und einer anschließenden Fibroblastenakkumulation führt.

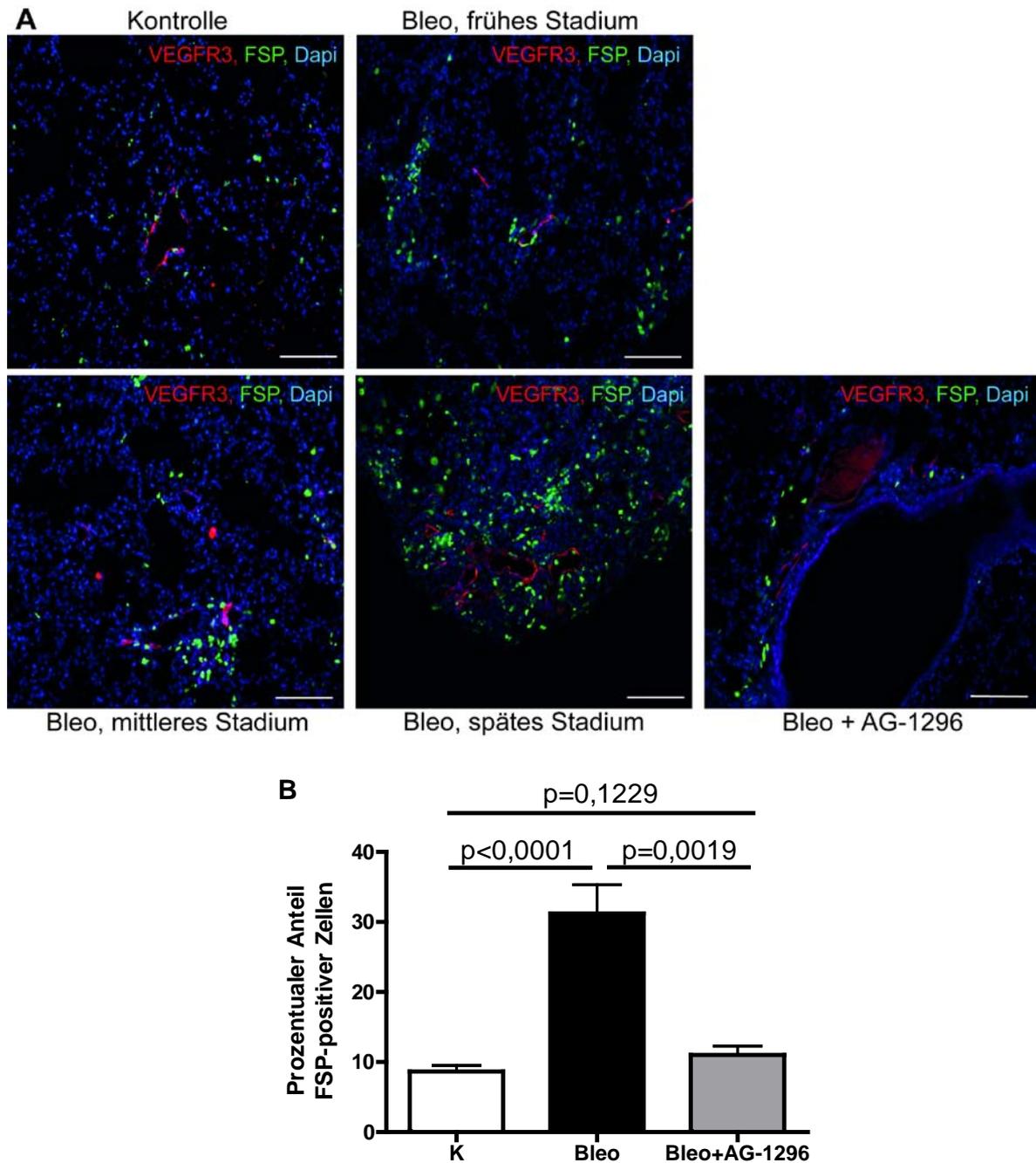


Abb. 4.24 Fibroblasten akkumulieren perilymphatisch im Lungengewebe mit voranschreitender Lungenfibrose und reduzieren sich infolge der Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges

A) Eine simultane Immundetektion von FSP und Lyve1 in Lungen von Mäusen, die mit PBS (K), Bleomycin (Bleo) oder Bleomycin und AG-1296 (Bleo + AG-1296) behandelt wurden, zeigte an Tag 28 eine Zunahme des Fluoreszenzsignals für FSP mit zunehmender Schwere der Fibrose, sowie eine Verringerung des Signals infolge der Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges. Maßstabskala entspricht 100 μ m. B) Die quantitative Auswertung der FSP-positiven Zellen an Tag 28 in Bleo-, Bleo+AG-1296- und PBS-behandelten Mauslungen zeigte einen signifikanten Anstieg an FSP-positiven Fibroblasten in fibrotischen Lungen und eine signifikante Reduktion der Fibroblasten infolge der Hemmung von PDGF-B/PDGFR- β (Mittelwerte \pm SD, C n= 15, Bleo n=29, Bleo+AG-1296 n=13).

Um die Auswirkungen der PDGFR- β -Hemmung auf die Akkumulation fibrogener Moleküle zu evaluieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen für Lyve1 mit jeweils HA und Albumin auf Lungengewebe PDGFR- β -Inhibitor-behandelter Mäuse (Bleo + AG-1296) durchgeführt. Die Hemmung des PDGFR- β führte zu einer deutlichen Reduktion von HA und Albumin im perilymphatischen Lungengewebe sowie zu einer signifikanten Verringerung des Gesamt-HA-Gehalts in der Lunge, wie in Abbildungen 4.22, 4.23 und 4.25 zu erkennen ist. Die Färbung sowie die quantitative Auswertung der FSP-positiven Fibroblasten im Lungengewebe der AG-1296-behandelten Mäuse ergab zudem eine signifikante Reduktion der Anzahl an Fibroblasten im perilymphatischen Raum (Abb. 4.24 A, B).

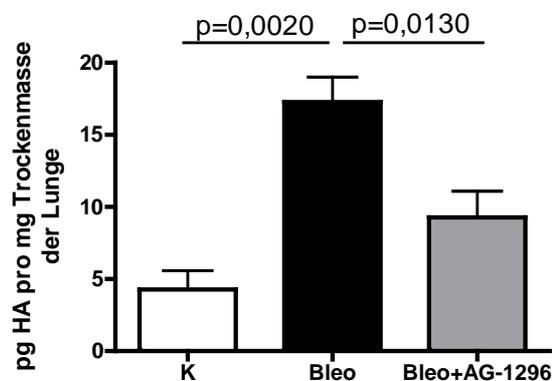


Abb. 4.25 HA-Gehalt steigt in fibrotischen Lungen und sinkt infolge der Inhibierung von PDGFR- β

Der HA-Gehalt wurde in Bleo-, Bleo+AG-1296- und PBS-behandelten Mauslungen an Tag 28 bestimmt und auf die gesamte Trockenmasse der Lunge bezogen. Nur Bleomycin-behandelte Mauslungen wiesen erhöhte HA-Gehalte auf (Mittelwerte \pm SD, K n= 3, Bleo n=6, Bleo+AG-1296 n=6).

4.1.5 Die Bedeutungen von Hyaluronsäure-Oberflächenrezeptoren für die Entstehung einer Lungenfibrose

Wie in 1.3.1 beschrieben, begünstigt Hyaluronsäure (HA) die Entstehung einer Lungenfibrose, weshalb die Beseitigung von HA eine wichtige Aufgabe zur Gesunderhaltung des Lungengewebes darstellt. Ob und welche Rolle die HA-Transmembranrezeptoren Lyve1 und CD44 im Zuge einer Lungenfibrose bei der Beseitigung von HA spielen, ist bislang nicht bekannt (Culty et al, 1992; Prevo et al., 2001) und wurde deshalb im Folgenden untersucht. Zunächst wurde Lyve1 *in vivo* durch die Verabreichung eines hemmenden Antikörpers während der gleichzeitigen Behandlung mit Bleomycin neutralisiert (Bleo + Lyve1-AB). Die HA-Level wurden

sowohl im Plasma (Abb. 4.26 A) als auch in der Lunge (Abb. 4.26 B) gesunder (K) sowie Bleomycin- (Bleo) und Lyve1-AB-behandelter (Bleo + Lyve1-AB) Mäuse bestimmt. Im Gegensatz zu fibrotischen Lungen, in denen der HA-Gehalt erhöht war (Abb. 4.26 B, K vs. Bleo), zeigte das Blutplasma fibrotischer Mäuse keine erhöhten HA-Spiegel (Abb. 4.26 A, K vs. Bleo). Die *in vivo*-Neutralisierung von Lyve1 hingegen führte zu einer signifikanten Erhöhung des HA-Gehaltes im Plasma (Abb. 4.26 A, K/Bleo vs. Bleo+Lyve1-AB). Der HA-Gehalt der Lungen Bleomycin- und Lyve1-AB-behandelter Mäuse wies allerdings keinen signifikanten Unterschied auf. Im Vergleich zum HA-Gehalt gesunder Lungen zeigten beide eine ähnliche Zunahme des HA-Gehaltes (Abb. 4.25 B, K vs. Bleo/Bleo+Lyve1-AB).

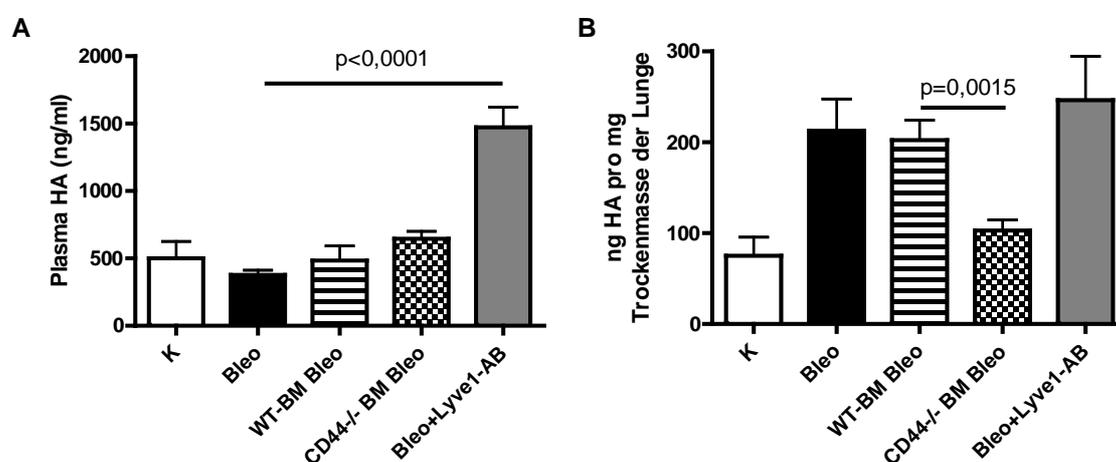


Abb. 4.26 HA-Gehalte im Blutplasma und in den Lungen gesunder und Bleomycin-behandelter WT- sowie CD44-defizienter Mäuse und in Lungen Bleo+Lyve1-AB-behandelter Mäuse

Mäuse wurden mit PBS (K), Bleomycin (10 mg/kg Körpergewicht, zweimal wöchentlich, 4 Wochen i.p.) (Bleo) oder mit Bleomycin (10 mg/kg Körpergewicht, zweimal wöchentlich, 4 Wochen i.p.) und Lyve1-AB (ab Tag 15 nach der ersten Bleomycin-Injektion jeden zweiten Tag 100 µg anti-Lyve1, i.p.) (Bleo+Lyve1-AB) behandelt. „CD44^{-/-} BM Bleo-Mäuse“ erhielten vor Beginn der Bleomycin-Behandlung Knochenmark von CD44^{-/-} defizienten Mäusen. „WT-BM Bleo-Mäuse“ erhielten vor Beginn der Bleomycin-Behandlung Knochenmark entsprechender WT-Mäuse. Die Hyaluronsäurelevel (HA-Level) wurden A) im Plasma und B) in ganzen Lungen an Tag 28 der K, Bleo, Bleo+AG-1296, CD44^{-/-} BM Bleo sowie Bleo+Lyve1-AB Mäuse bestimmt (Mittelwerte ± SD, K n= 3, Bleo n=6, WT-BM Bleo n=5, CD44^{-/-} BM Bleo n=7, Bleo+Lyve1-AB n=5). Die Auswertung des Plasma-HA-Gehaltes zeigte einen signifikanten Anstieg des HA-Gehaltes der Bleomycin+Lyve1-AB-behandelten Mäuse. Die Auswertung des Gesamt-HA-Gehaltes der Lungen zeigte einen signifikanten Anstieg der HA-Level in den Bleo-, WT-BM Bleo sowie Bleo+Lve1-AB-behandelten Mäusen. Einzig die Bleomycin-behandelten CD44-defizienten Mäuse zeigten, verglichen mit gesunden Kontrolllungen, keinen Anstieg des Gesamt-HA-Gehalts (Mittelwerte ± SD, K n=6, Bleo n=5, Bleo+Lyve1-AB n=5, WT-BM Bleo n=5, CD44^{-/-} BM Bleo n=7).

Anschließend wurde die Schwere der Fibrose und die Anzahl der FSP-positiven Fibroblasten ermittelt. Wie in Abb. 27 A und B zu erkennen ist, wiesen Mäuse, die mit

dem Lyve1-Antikörper behandelt wurden, einen stärkeren fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms auf. Darüber hinaus konnte eine signifikant höhere Anzahl an Fibroblasten in den Lungen Lyve1-AB-behandelter Mäuse gefunden werden (Abb. 4.27 C). Die Neutralisierung von Lyve1 scheint das Voranschreiten einer Lungenfibrose demnach zu begünstigen.

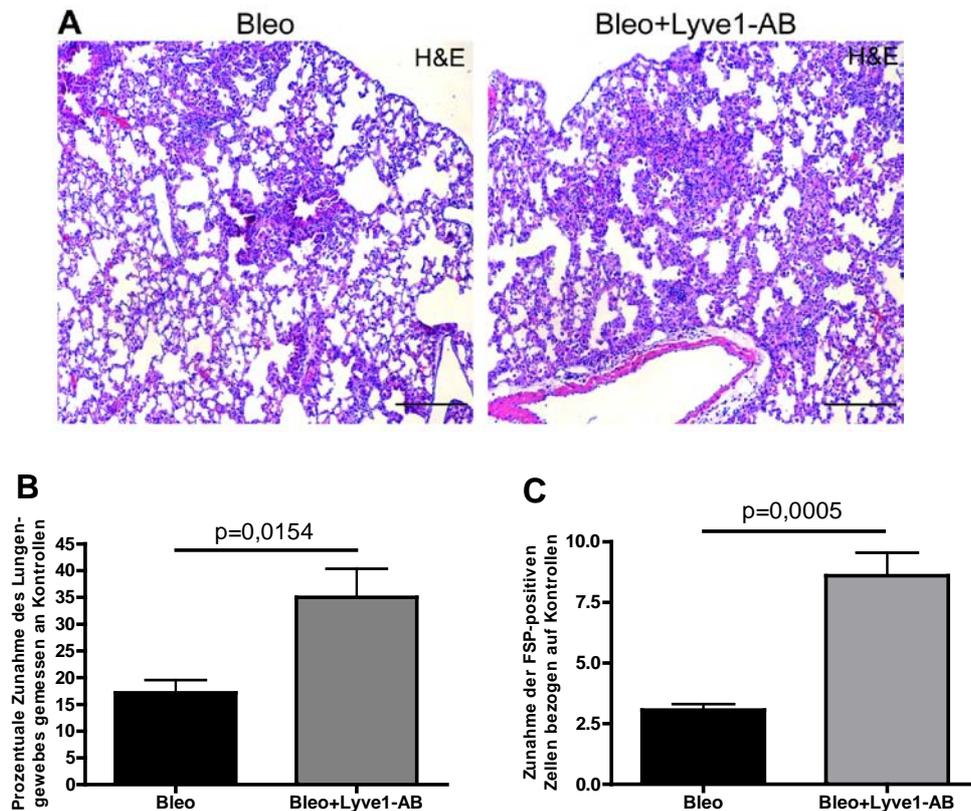


Abb. 4.27 Neutralisierung von Lyve1 in fibrotischen Lungen geht mit verstärktem fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms und erhöhter Zahl an Fibroblasten einher

A) Eine H&E-Färbung wurde auf Lungengewebe von Mäusen, die mit Bleomycin (Bleo) oder mit Bleomycin + Lyve1-Inhibitor behandelt wurden, durchgeführt. Lungen der Bleo+Lyve1-AB-behandelten Mäuse zeigten einen stärkeren fibrotischen Umbau des Gewebes. Maßstabskala entspricht 200 μm . B) Die prozentuale Zunahme des Lungengewebes von Mäusen, die mit Bleo oder Bleo+Lyve1-AB behandelt wurden, wurde anhand des Lungengewebes von Kontrolllungen bestimmt. Die Auswertung zeigte eine signifikant höhere Zunahme des Lungengewebes der Lyve1-AB-behandelten Mäuse. C) Die Anzahl der Fibroblasten im Lungengewebe der Bleo- und Bleo+Lyve1-AB-behandelten Mäuse wurde mittels quantitativer Auswertung einer IF-Färbung für FSP ermittelt. Die Ergebnisse dieser Auswertung wurden auf die Anzahl FSP-positiver Zellen gesunder Mauslungen bezogen. Bleo+Lyve1-AB-behandelte Mäuse wiesen eine signifikant höhere Zunahme der FSP-positiven Zellen auf (Mittelwerte \pm SD, Bleo n=5, Bleo+Lyve1-AB n=5).

Im nächsten Schritt wurde die Rolle von CD44 bei der Entstehung einer Lungenfibrose untersucht. Obwohl CD44 auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert wird, findet es sich in der gesunden sowie fibrotischen Lunge vor allem auf der Zelloberfläche von Makrophagen und Pneumozyten Typ 2 (Kasper et al., 1995). Eine

Doppelimmunfluoreszenzfärbung für CD44 und den Makrophagen-spezifischen Marker Mac2 (Ho und Springer, 1982) ergab einen signifikanten Anstieg von CD44-positiven Makrophagen in fibrotischem Lungengewebe (Abb. 4.28).

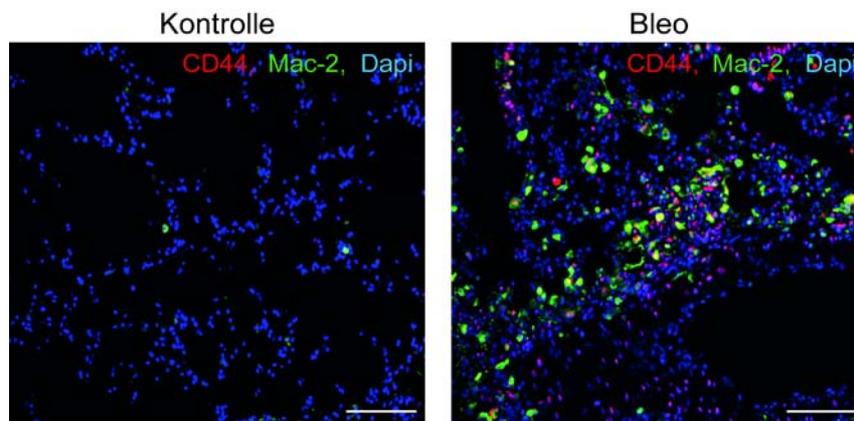


Abb. 4.28 Lokalisierung von CD44 und Mac2-positiven Makrophagen in gesunden und fibrotischen Mauslungen

Es wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung für CD44 und Mac2 auf Gewebe von gesunden (K) und fibrotischen (Bleo) Mauslungen durchgeführt. Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse wiesen an Tag 28 vor allem innerhalb fibrotischer Areale ein ausgeprägtes CD44- und Mac-2-positives Fluoreszenzsignal auf, während Lungengewebe gesunder Mäuse kaum Fluoreszenzsignal für CD44 und Mac2 zeigte. Maßstabskala entspricht 100 μm .

Um die Rolle von CD44-positiven Zellen aus dem Knochenmark (BM) bei der Beseitigung von HA aus fibrotischen Lungen untersuchen zu können, wurde C57Bl6/J-Mäusen infolge einer Ganzkörperbestrahlung das Knochenmark von CD44-defizienten Mäusen transplantiert (CD44^{-/-} BM) (5×10^6 Zellen in 100 μl Medium, intravenös (i.v.)). Als Kontrolle dienten C57Bl6/J-Mäuse, denen Knochenmark der entsprechenden Wildtyp-Mäuse injiziert wurde (WT-BM) (5×10^6 Zellen in 100 μl Medium, i.v.). Anschließend wurden sowohl WT-BM-Mäuse als auch CD44^{-/-} BM-Mäuse mit Bleomycin (WT-BM Bleo bzw. CD44^{-/-} BM Bleo) behandelt, um eine Lungenfibrose zu induzieren. Lungen und Plasma wurden ebenfalls an Tag 28 nach Beginn der Bleomycin-Behandlung entnommen. Zunächst erfolgte die Untersuchung des HA-Gehaltes im Plasma. CD44-defiziente Tiere wiesen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen sowie den Bleo- und WT-BM Bleo-Mäusen keine signifikante Zunahme der Plasma-HA-Gehalte auf (Abb. 4.26 A). Die HA-Gehalte in den Lungen der CD44-defizienten Tiere blieben sogar signifikant geringer, verglichen mit den Lungen Bleomycin-behandelter und WT-BM Bleo-Mäusen (Abb. 4.26 B). Zusätzlich kam es infolge des Knockouts von CD44 auf Knochenmarkszellen zu einem signifikant geringeren Anstieg der Anzahl an FSP-

positiven Fibroblasten (Abb. 4.29). Die Schwere der Fibrose Bleomycin-behandelter WT- und CD44-defizienter Mäuse zeigte allerdings keinen Unterschied (Abb. 4.30).

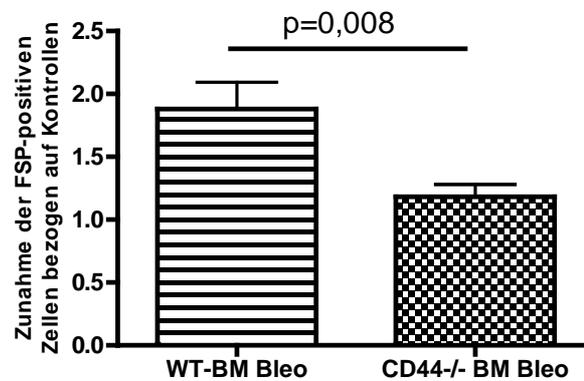


Abb. 4.29 Transplantation von CD44-defizientem Knochenmark führt zu signifikant geringerer Zunahme der Fibroblasten

Es erfolgte die quantitative Auswertung einer IF-Färbung für FSP auf Lungengewebe von Mäusen, die entweder Wildtyp- (WT-BM Bleo) oder CD44-defizientes (CD44-/- BM Bleo) Knochenmark erhielten und anschließend mit Bleomycin behandelt wurden. Die Resultate werden als x-fache Zunahme zu den FSP-positiven Zellen gesunder Kontrollungen (0) dargestellt. In Lungengewebe von Mäusen, die CD44-defizientes Knochenmark erhielten (CD44-/- BM Bleo), kam es zu einer signifikant geringeren Zunahme der FSP-positiven Fibroblasten (Mittelwerte \pm SD, WT-BM Bleo n=5, CD44-/- BM Bleo n=7, CD44-/- BM PBS n=4).

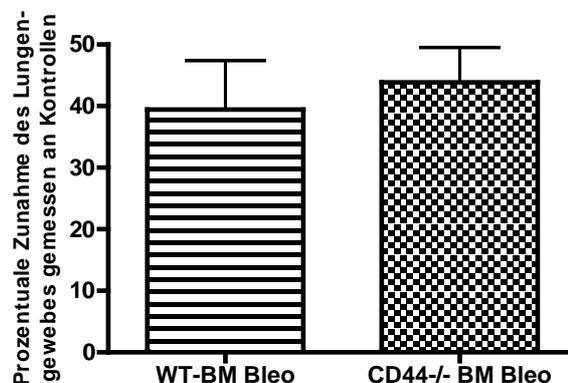


Abb. 4.30 Schwere der Lungenfibrose änderte sich nach Transplantation CD44-defizienten Knochenmarks nicht

Die Fläche des Lungengewebes von Mäusen, die entweder WT-Knochenmark (WT-BM Bleo) oder CD44-defizientes Knochenmark (CD44-/- BM Bleo) erhielten und anschließend mit Bleomycin behandelt wurden, wurde durch die quantitative Auswertung einer H&E-Färbung erfasst und als prozentuale Zunahme zur Fläche des Lungengewebes gesunder Mäuse dargestellt. Die Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede (Mittelwerte \pm SD, WT-BM Bleo n=5, CD44-/- BM Bleo n=7, CD44-/- BM PBS n=4).

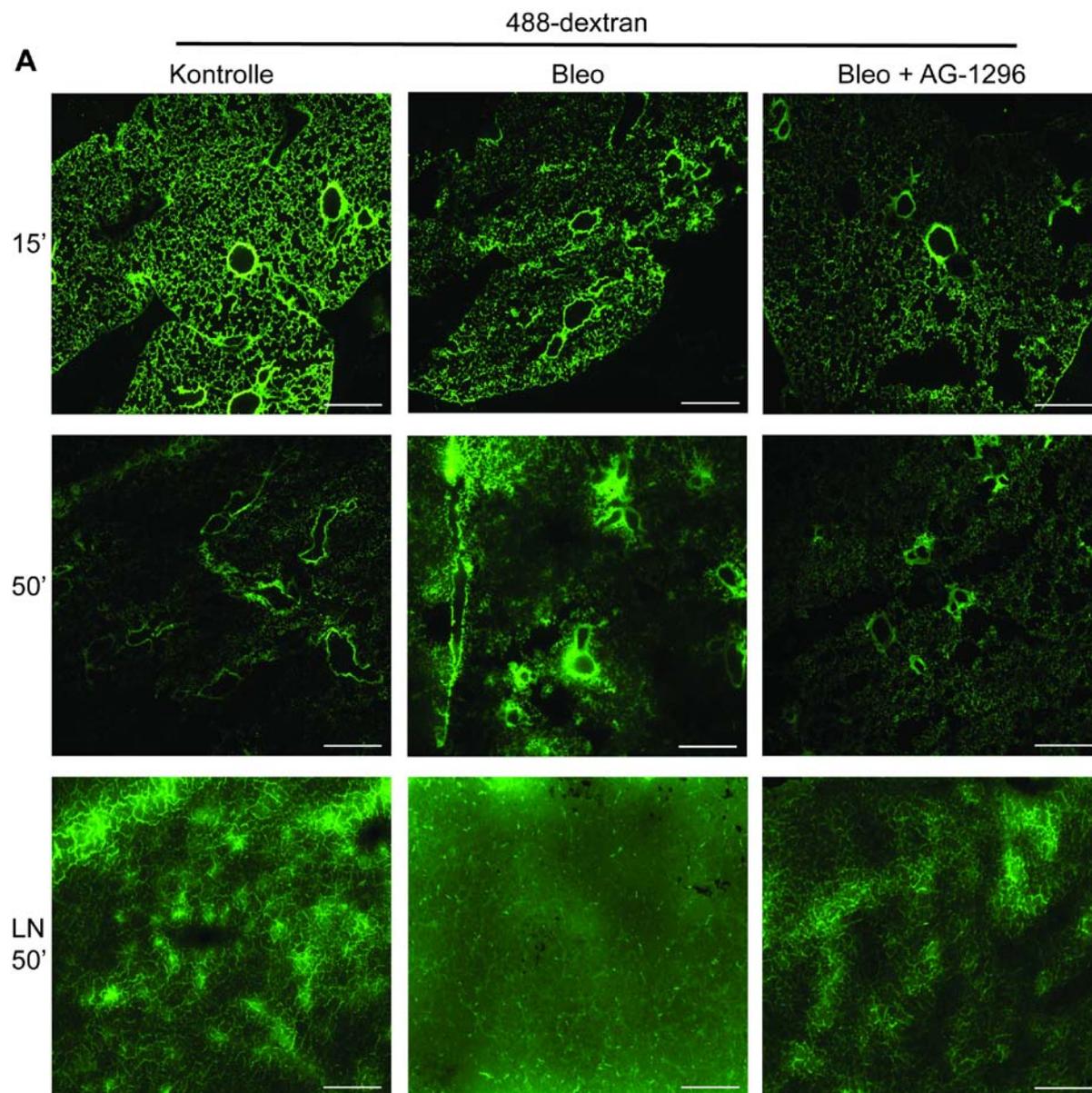
4.1.6 Hemmung der PDGF-B/PDGFR- β -Signalübertragung führt im Rahmen einer Lungenfibrose zu einer verbesserten Transportkapazität pulmonaler Lymphgefäße

Wie in den vorangehenden Kapiteln gezeigt werden konnte, kommt es im Zuge einer Lungenfibrose zu einer Ansammlung muraler Zellen um pulmonale Lymphgefäße. Vermutlich resultiert diese Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße in einer Störung ihrer Transportkapazität, was die perilymphatische Akkumulation von Albumin, HA und schließlich die Expansion von Fibroblasten zur Folge hat. Deshalb wurde die Permeabilität und Transportkapazität der pulmonalen Lymphgefäße im Rahmen einer Lungenfibrose mithilfe eines funktionellen 488-Dextran Assays untersucht.

Zu diesem Zweck wurde das fluoreszenzmarkierte Polysaccharid 488-Dextran durch eine intratracheale (i.t.) Injektion in die Lunge eingebracht. Aufgrund seiner Größe wird es dort normalerweise über Lymphgefäße und nicht über Blutgefäße abtransportiert. Folglich kommt es im Fall eines Verlustes der Transportkapazität der Lymphgefäße zu einer perilymphatischen Akkumulation des 488-Dextran. Somit erlaubt das in der Lunge verbleibende Fluoreszenzsignal die Bestimmung der Transportfähigkeit der Lymphgefäße. Die Mäuse wurden in zwei Versuchsgruppen unterteilt. Mäusen der ersten Gruppe wurden die Lungen 15 Minuten nach der 488-Dextran-Injektion entnommen. Lungen der zweiten Gruppe wurden nach 50 Minuten entnommen.

15 Minuten nach der Injektion wies das 488-Dextran-Fluoreszenzsignal zunächst eine gleichmäßige Verteilung in den Lungen gesunder, Bleomycin-behandelter sowie Bleomycin + AG-1296-behandelter Mäuse auf (Abb. 4.31 A, B). 50 Minuten nach der Injektion ist der Großteil des 488-Dextran aus den Lungen gesunder sowie Bleo+AG-1296-behandelter Mäuse zu den Lymphknoten (LN 50´) abtransportiert worden. In den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse hingegen wurde das 488-Dextran nicht zu den Lymphknoten abtransportiert, sondern akkumulierte perilymphatisch (Abb. 4.31 A). Die Signalintensität des 488-Dextran verstärkte sich in den Lungen der Bleomycin-behandelten Mäuse signifikant, verglichen mit den Lungen gesunder und Bleo+AG-1296-behandelter Mäuse (Abb. 4.31 B). Aufgrund dieser Resultate kann davon ausgegangen werden, dass es in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse zu einer Verminderung der Drainagekapazität pulmonaler Lymphgefäße kommt. Die

gestörte Drainagekapazität pulmonaler Lymphgefäße kann jedoch durch die Hemmung des PDGFR- β wiederhergestellt werden.



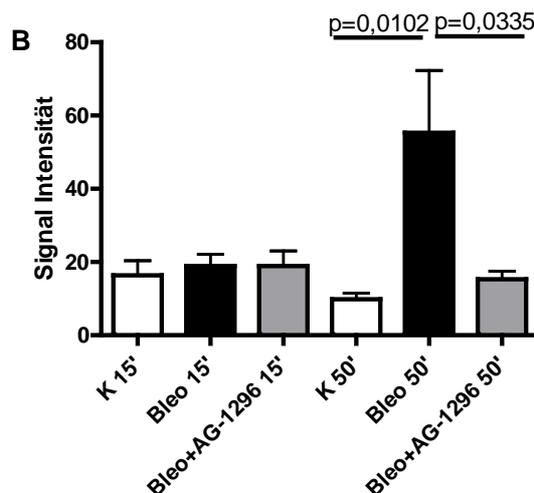


Abb. 4.31 Transportkapazität der Lymphgefäße in Lungen PBS-, Bleomycin-, oder Bleomycin+AG-1296-behandelter Mäuse

Mäusen wurde infolge der Behandlung mit PBS (Kontrolle), Bleomycin (Bleo) oder Bleomycin und AG-1296 (Bleo+AG-1296) an Tag 28 einmalig 50 μ l 488-Dextran intratracheal (i.t.) injiziert. Lungen wurden 15 oder 50 Minuten, prätracheale Lymphknoten (LN) 50 Minuten nach Injektion entnommen. Das Fluoreszenzsignal des 488-Dextran wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ab fotografiert (A) und die Signalintensität mittels ImageJ quantitativ bestimmt (B). 15 Minuten nach der Injektion zeigten alle Lungen eine gleichmäßige Verteilung und Intensität des Fluoreszenzsignals. 50 Minuten nach der Injektion zeigten Lungen PBS- und Bleo-AG-1296-behandelter Mäuse eine Reduktion des Signals in den Lungen und eine erhöhte Signalstärke in den LN auf. Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse zeigten eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals, welches sich perilymphatisch lokalisieren ließ. Maßstabskala entspricht 100 μ m. (Mittelwerte \pm SD, je n=3).

Vermutlich akkumulieren Albumin und HA im Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse aufgrund einer gestörten Transportkapazität der Lymphgefäße. Alternativ könnte jedoch eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße als Reaktion auf die Bleomycin-Behandlung ein Grund für die Akkumulation dieser Moleküle im Lungengewebe darstellen. Um die Permeabilität der Blutgefäße in Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse zu ermitteln, wurde 488-Dextran intravenös (i.v.) injiziert. 488-Dextran kann aufgrund seiner Größe nur im Fall einer erhöhten Permeabilität aus den Blutgefäßen austreten und im Gewebe akkumulieren. Wie in Abb. 4.32 zu erkennen ist, zeigten jedoch weder gesunde noch fibrotische Lungen einen Austritt des 488-Dextran aus den Blutgefäßen, so dass angenommen werden kann, dass es infolge der Bleomycin-Behandlung der Mäuse nicht zu einer erhöhten Permeabilität der Blutgefäße kommt.

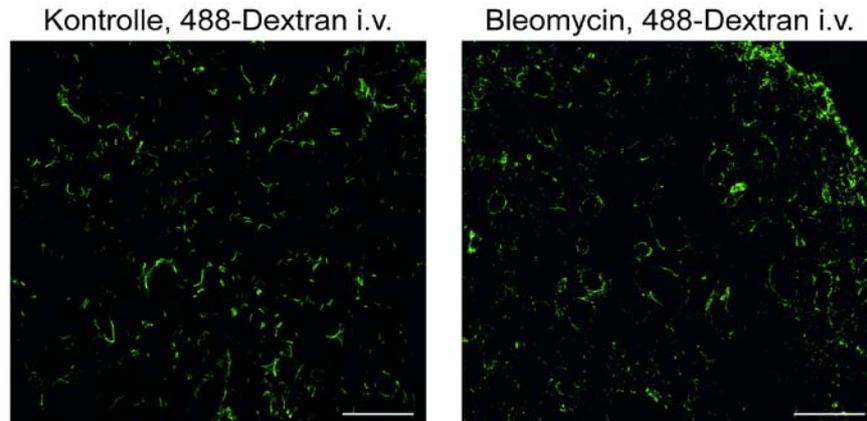


Abb. 4.32 Keine erhöhte Permeabilität pulmonaler Blutgefäße infolge der Bleomycin-Behandlung

Mäusen, die mit PBS (Kontrolle) oder Bleomycin (Bleo) behandelt wurden, wurde an Tag 28 einmalig 50 μ l 488-Dextran intravenös (i.v.) injiziert. Die Fluoreszenzmikroskopie des 488-Dextran in gesundem und fibrotischem Lungengewebe zeigte keine Unterschiede in der Signalstärke oder Verteilung des Fluoreszenzsignals in den Mauslungen. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

4.1.7 Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße in Lungen von IPF-Patienten

Abschließend wurde untersucht, ob die Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße nur ein pathogenetisches Ereignis der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose darstellt, oder auch auf die Pathogenese einer IPF übertragbar ist. Zu diesem Zweck wurden histologische Proben von IPF- und Nicht-IPF-Patienten untersucht. Bei den Gewebeproben der Nicht-IPF-Patienten handelt es sich um tumorfreies Gewebe von Lungenkrebspatienten, welches während einer OP entnommen wurde, und in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle diente. Die Gewebeproben der IPF-Patienten (IPF Lunge) wurden entweder durch eine Lungenbiopsie gewonnen oder während einer Lungentransplantation entnommen. Zunächst wurde der Lymphendothel-spezifische Marker D2-40 genutzt, um die Kontroll- sowie IPF-Präparate hinsichtlich einer Neuf ormation von Lymphgefäßen zu untersuchen. Wie in Abb. 4.33 A und B zu erkennen ist, wiesen die Gewebeproben der IPF-Patienten eine signifikant höhere Anzahl an D2-40-positiven Lymphgefäßen auf. Im Rahmen einer IPF kommt es demnach zu einer Neubildung von Lymphgefäßen.

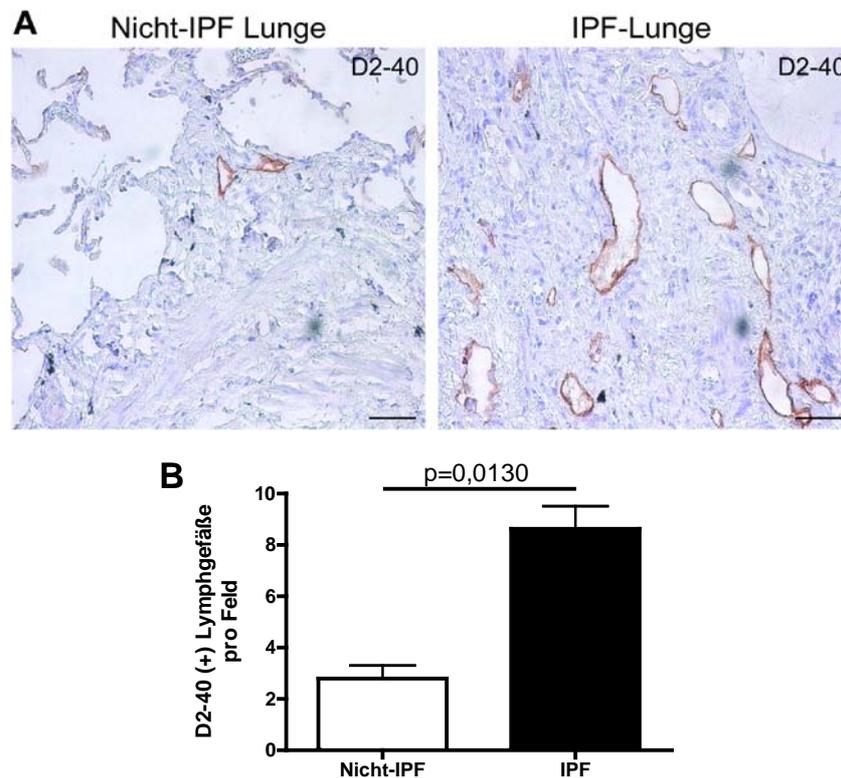


Abb. 4.33 Lymphangiogenese in Lungen von IPF-Patienten

A) Es wurde eine immunhistochemische Färbung des Lymphgefäßmarkers D2-40 auf Lungengewebe von Kontroll- (Nicht-IPF) und IPF-Patienten durchgeführt. Maßstabskala entspricht 200 μ m. B) Die Anzahl der D2-40-positiven Lymphgefäße pro Feld wurden quantitativ erfasst. Lungengewebe der IPF-Patienten wiesen eine signifikant höhere Zahl an D2-40-positiven Lymphgefäßen auf, verglichen mit Lungengewebe der Kontrollpatienten (Mittelwerte \pm SD, Nicht-IPF n=3, IPF n =12).

Als nächstes wurde untersucht, ob Lymphgefäße in Lungen der IPF-Patienten ebenfalls einen Besatz von PDGFR- β -exprimierenden muralen Zellen aufweisen. Eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung für PDGFR- β und D2-40 auf Kontroll- sowie IPF-Präparaten zeigte tatsächlich eine deutliche PDGFR- β -positive Färbung um pulmonale Lymphgefäße auf den histologischen Proben der IPF-Patienten (Abb. 4.34 A). Lungengewebe der IPF-Patienten wiesen eine signifikant höhere Anzahl an Lymphgefäßen, die von PDGFR- β -positiven muralen Zellen umgeben waren, auf als Lungengewebe der Kontrollpatienten ($25,36 \pm 3,065$ (IPF) zu $6,9 \pm 1,735$ (Nicht-IPF)) (Abb. 4.34 B).

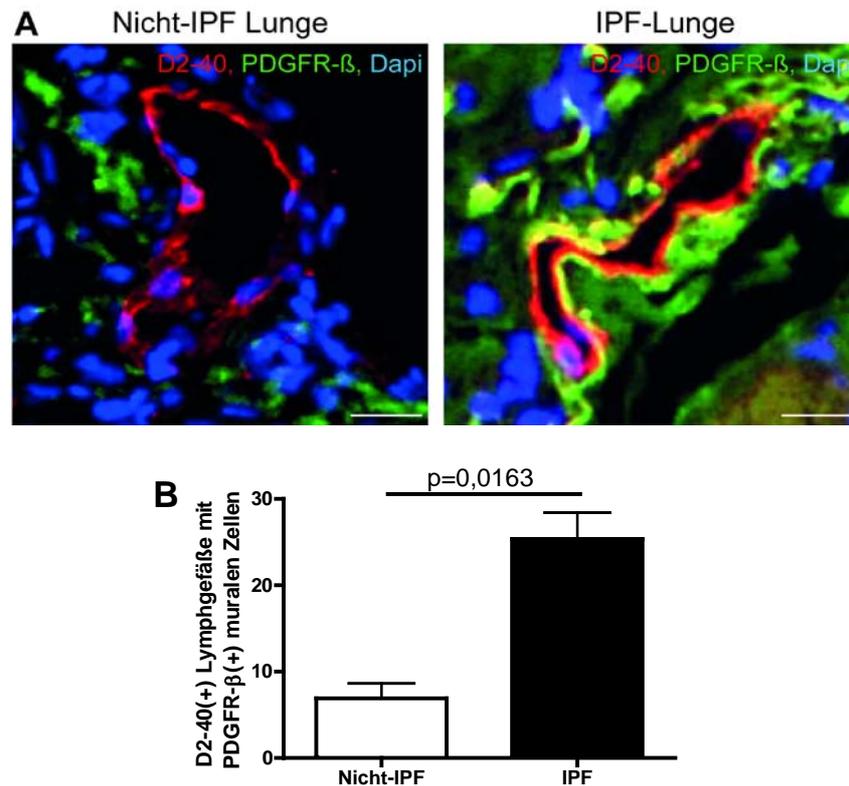


Abb. 4.34 Lymphgefäße in Lungen von IPF-Patienten weisen Ansammlung muraler Zellen auf

A) Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung für D2-40 und PDGFR- β auf Lungengewebe von IPF- und Kontrollpatienten zeigte in Lungen der IPF-Patienten eine Kolokation von D2-40 und PDGFR- β . B) Die Zahl der Lymphgefäße, die mit PDGFR- β -positiven muralen Zellen umgeben waren, wurde auf die Gesamtzahl der Lymphgefäße bezogen. Lungen der IPF-Patienten wiesen eine signifikant erhöhte Zahl an Lymphgefäßen mit einer Ansammlung muraler Zellen auf (Mittelwerte \pm SD, Nicht-IPF n=3, IPF n=12). Maßstabskala entspricht 50 μ m.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es im murinen Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose durch eine aktive PDGF-B/PDGFR- β -Signaltransduktion zu einer aberranten Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße kommt. Die Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße führt zu einer Störung der Transportkapazität der Lymphgefäße. Albumin, HA und Fibroblasten akkumulieren perilymphatisch und verursachen eine von den Lymphgefäßen ausgehende Bildung fibrotischer Läsionen.

Eine pharmakologische Hemmung der Signaltransduktion von PDGF-B/PDGFR- β führt zu einer Reduktion der Anzahl an Lymphgefäßen, die mit muralen Zellen assoziiert sind. Es kommt zu einer Wiederherstellung der Transportkapazität der Lymphgefäße und zu einem reduzierten fibrotischen Umbau des Lungengewebes. Darüber hinaus konnte die Assoziation pulmonaler Lymphgefäße mit muralen Zellen

auch in histologischen Proben von IPF-Patienten nachgewiesen werden und spielt somit offensichtlich auch während der Pathogenese der IPF eine Rolle.

4.2 Einfluss der Hämangiogenese auf die Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen

Um den Einfluss der Hämangiogenese auf die Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose zu untersuchen, wurde ein Mausmodell für einen Myeloidzell-spezifischen Knockout von VEGF-A verwendet. VEGF-A wird im Folgenden als VEGF bezeichnet. Mäuse, die einen Myeloidzell-spezifischen Knockout für VEGF tragen, werden als Knockout-Mäuse (KO) bezeichnet. Die Zellen der myeloischen Reihe dieser Tiere können kein VEGF exprimieren. Mäuse, die keinen VEGF-Knockout in myeloischen Zellen besitzen, werden als Wildtyp (WT) bezeichnet. Zur Induktion einer reversiblen Leberfibrose wurden weibliche WT- und KO-Mäuse im Alter von acht bis zehn Wochen mit CCl₄ behandelt (6 µl CCl₄ + 94 µl Olivenöl, zweimal pro Woche, für sechs bzw. zwölf Wochen, i.p.). Die entsprechenden Kontrolltiere erhielten Olivenöl (100 µl Olivenöl, zweimal pro Woche, sechs bzw. zwölf Wochen, i.p.). Die Entstehung der Fibrose wurde 6 und 12 Wochen nach Beginn der CCl₄-Behandlung untersucht. Zur Untersuchung der Fibroserrückbildung wurden die Lebern der Tiere erst weitere vier Wochen nach Beendigung der CCl₄-Behandlung entnommen (4 Wochen Recovery) (Abb. 4.35).

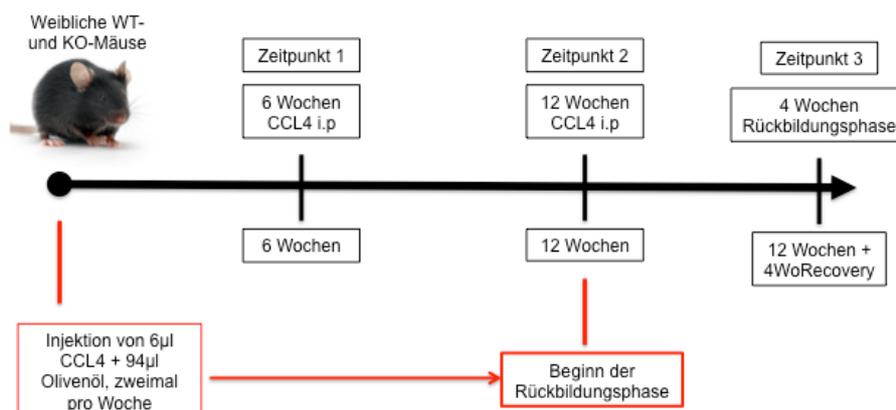


Abb. 4.35 Versuchsaufbau: Induktion und Rückbildung einer reversiblen Leberfibrose

Weibliche WT- und KO-Mäuse erhielten 6 oder 12 Wochen lang zweimal wöchentlich 6 µl CCL₄ + 94 µl Olivenöl. Gewebe wurde entweder nach 6 oder 12 Wochen CCl₄-Behandlung oder nach weiteren 4 Wochen Rückbildungsphase entnommen (4WoRecovery). Kontrollen erhielten zweimal wöchentlich 100 µl Olivenöl.

4.2.1 Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von Myeloidzell-spezifischem VEGF

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, geht der fibrotische Umbau der Leber mit einer vermehrten Akkumulation von Kollagen einher. Eine Rückbildung der Leberfibrose setzt demnach den Abbau von Kollagen voraus. Um den Effekt von VEGF aus myeloischen Zellen auf die Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose zu evaluieren, wurde deshalb zunächst die Zu- und Abnahme des Kollagens in den Lebern der WT- und KO-Mäuse zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Sirius Red Färbung für Kollagen durchgeführt (Abb. 4.36) und die Fläche des rot gefärbten Kollagens anschließend quantitativ erfasst (Abb. 4.37).

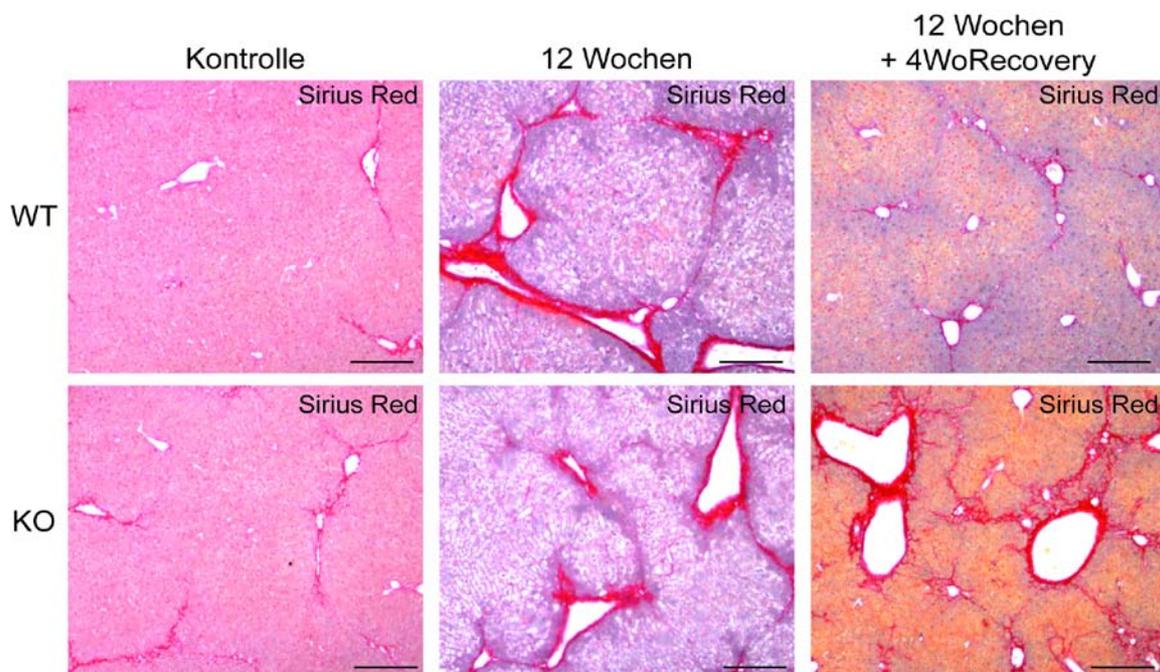


Abb. 4.36 Distribution von Kollagen im murinen Lebergewebe vor und nach Induktion einer Leberfibrose sowie nach der Rückbildungsphase in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen

Die Fläche des Kollagens wurde im Lebergewebe von WT- und KO-Mäusen vor (Kontrolle, 12 Wochen zweimal wöchentlich 100 μ l Olivenöl) und nach der Induktion einer Leberfibrose (12 Wochen zweimal wöchentlich 6 μ l CCl₄, i.p.) sowie nach der Rückbildungsphase (12 Wochen zweimal wöchentlich 6 μ l CCl₄, i.p. + 4WoRecovery) mittels einer Sirius Red Färbung der histologischen Leberpräparate ermittelt. Nach der Entstehung der Fibrose kam es zu einer Akkumulation von Kollagen um die Periportalfelder und um die Zentralvenen in den Lebern beider Genotypen. Infolge der vierwöchigen Rückbildungsphase zeigen nur WT-Mäuse eine Reduktion des Kollagens. Die Lebern der KO-Mäuse wiesen unverändert starke fibrotische Areale auf. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

Die Kontrolllebern beider Genotypen zeigten zunächst keinen kollagenartigen Umbau des Leberparenchyms (Abb. 4.36). Nach zwölfwöchiger CCl₄-Behandlung kam es in den Lebern beider Genotypen zu einer signifikanten Zunahme des Kollagens (Abb. 4.37), vor allem in den Bereichen der Periportalfelder und der Zentralvenen (Abb. 4.36). Infolge der Rückbildungsphase zeigten die Lebern der WT-Mäuse eine signifikante Reduktion des Kollagens. Im Gegensatz dazu konnte in den Lebern der KO-Mäuse keine Reduktion der Kollagengehalte beobachtet werden (Abb. 4.37). Die Leberpräparate der KO-Mäuse wiesen nach wie vor kollagenreiche, fibrotische Narben im Bereich der Periportalfelder sowie der Zentralvenen auf (Abb. 4.36).

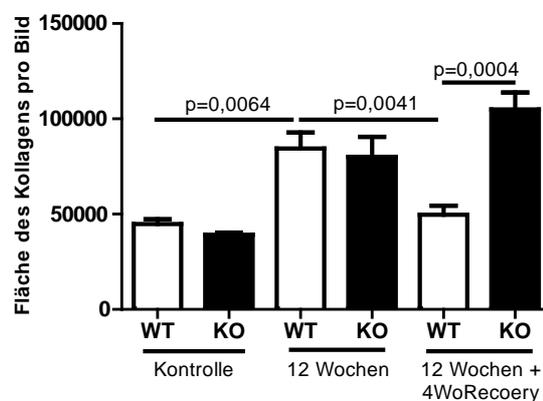


Abb. 4.37 Quantifizierung des Kollagens in Lebern von WT- und KO-Mäusen vor und nach der Induktion der Fibrose sowie nach der Rückbildungsphase

Die kollagenhaltige Fläche im Lebergewebe von WT- und KO-Mäusen, die mit Olivenöl (Kontrolle) oder 12 Wochen lang mit CCl₄ behandelt wurden, sowie WT- und KO-Mäusen, die 12 Wochen lang CCl₄ erhielten und eine Rückbildungszeit von 4 Wochen hatten, wurde durch die quantitative Auswertung der Sirius Red Färbung ermittelt. Während der Entwicklung einer Fibrose kam es zu einer signifikanten, aber genotypunabhängigen Zunahme des Kollagens. Lebern der WT-Mäuse wiesen nach der Rückbildungsphase eine signifikante Reduktion des Kollagens auf, während sich die Kollagenfläche in den Lebern der KO-Mäuse nicht verringerte (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT n=7, KO n=7; 12 Wochen WT n=10, KO n=13; 12Wochen+4WoRec. WT n=8, KO n=17).

Neben der Zunahme von Kollagen kommt es während der Entstehung einer Leberfibrose zu einer vermehrten Ansammlung aktivierter Makrophagen innerhalb fibrotischer Narben. Um die Akkumulation der Makrophagen in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen zu untersuchen, wurde eine Mac2-Färbung für Makrophagen auf Lebergewebe von WT- und KO-Mäusen nach der Entstehungs- (12 Wochen) und der Rückbildungsphase (12 Wochen + 4WoRecovery) der Leberfibrose sowie auf Kontrolllebern durchgeführt (Abb. 4.38). Wie in Abb. 4.38 A und B zu sehen ist, kam es während der Entstehung der Fibrose in den Lebern beider Genotypen zu einer signifikanten Zunahme der Mac2-positiven Makrophagen,

vor allem innerhalb fibrotischer Areale. KO-Mäuse zeigten nach der Induktion der Fibrose eine leicht, jedoch nicht signifikant höhere Anzahl von Makrophagen. Infolge der Rückbildungsphase kam es in den Lebern der WT- und KO-Mäuse wieder zu einer signifikanten und weiterhin genotypunabhängigen Reduktion der Makrophagenzahl (Abb. 4.38 B).

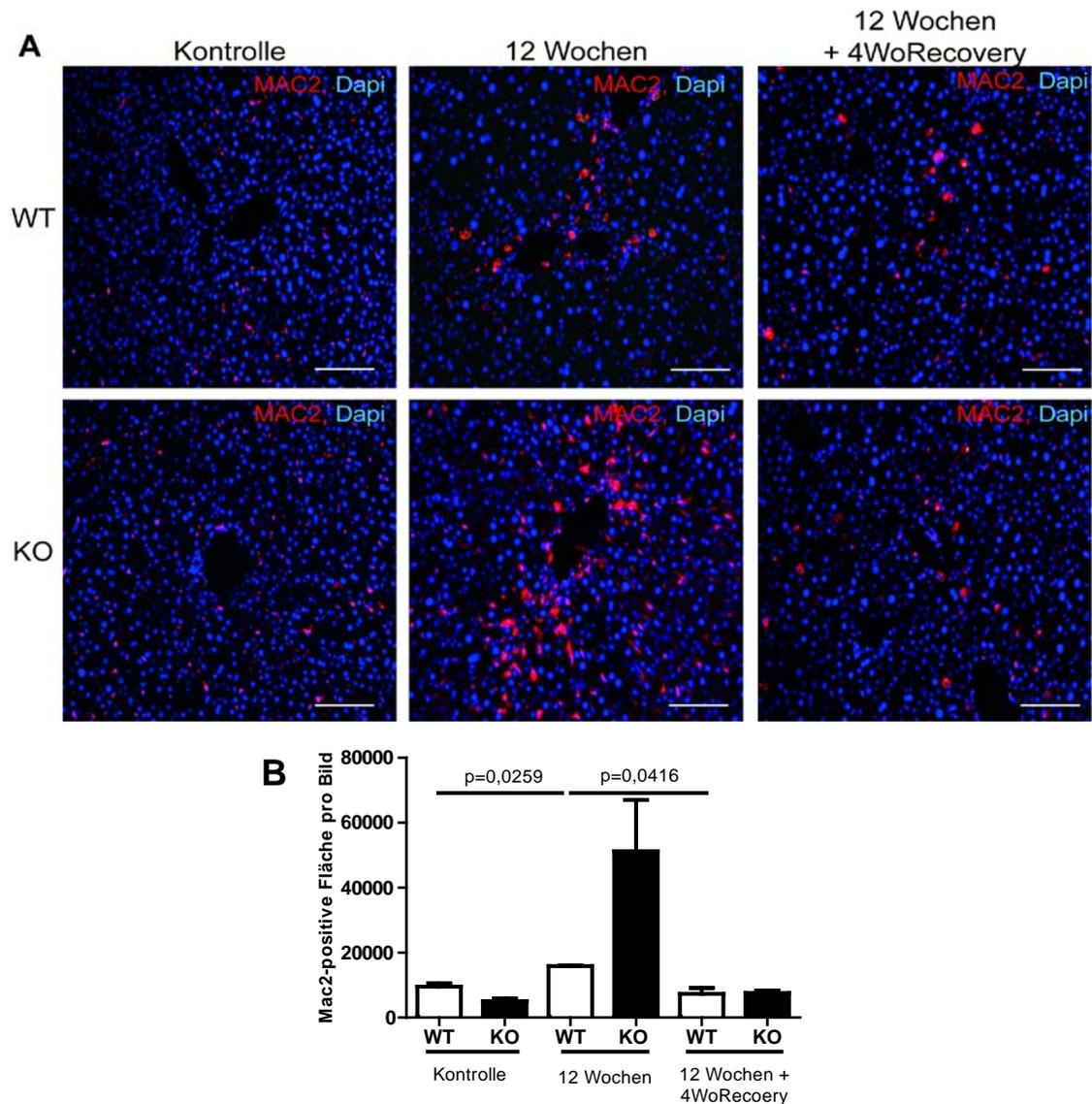


Abb. 4.38 Distribution und Quantifizierung von Mac2-positiven Makrophagen im Lebergewebe der WT- und KO-Mäuse vor und nach der Entstehung sowie nach der Rückbildung einer Leberfibrose

A) Makrophagen wurden im Lebergewebe von WT- und KO-Mäusen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten mittels einer Immunfluoreszenzfärbung für Mac2 nachgewiesen und B) mittels ImageJ quantitativ bestimmt. Nach der zwölfwöchigen CCl_4 -Behandlung der Mäuse kam es zu einer verstärkten Ansammlung der Makrophagen innerhalb fibrotischer Läsionen. KO-Lebern zeigten eine leicht höhere, aber nicht signifikante Zunahme der Makrophagen. Nach der Rückbildungsphase sank die Anzahl der Makrophagen ebenfalls genotypunabhängig. Maßstabskala entspricht 100 μ m. (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT n=6, KO n=7; 12 Wochen WT n=3; KO n=5; 12Wochen+4WoRec. WT n=4, KO n=5).

Um das Ausmaß des Leberschadens während einer Leberfibrose besser beurteilen zu können, wurden die typischen Lebermarker Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Serum von WT- und KO-Mäusen zum 6 Wochen-, 12 Wochen- und 12 Wochen + 4 Wochen Rückbildungszeitpunkt bestimmt (Abb. 4.39 A, B). Die Untersuchung des Serums nach sechswöchiger CCl₄-Behandlung wies kaum Anzeichen eines Leberschadens auf. Nach der zwölfwöchigen CCl₄-Behandlung jedoch konnte sowohl für GOT als auch für GPT ein leicht, aber nicht signifikant erhöhter Wert im Serum der KO-Mäuse gemessen werden. Der GOT-Wert im Serum der KO-Mäuse blieb auch nach dem Rückbildungszeitraum leicht erhöht, während der GPT-Wert im Serum der KO-Mäuse wieder sank.

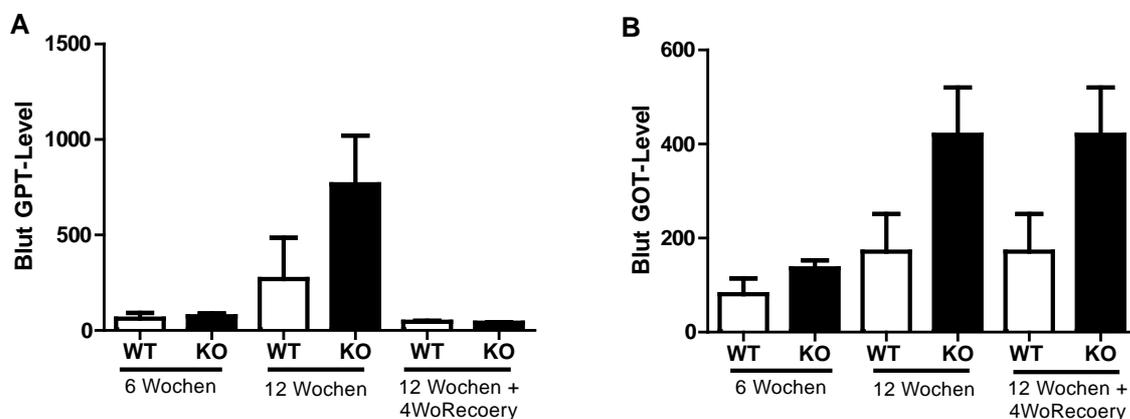


Abb. 4.39 Leberwerte im Serum von Mäusen nach der Induktion und Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) wurden im Serum von KO- und WT-Mäusen nach je 6 und 12 Wochen Behandlung mit CCl₄ sowie nach 12 Wochen CCl₄-Behandlung und 4 Wochen Rückbildungszeit gemessen. KO-Mäuse zeigten leicht erhöhte Werte für GOT und GPT nach der Induktion der Fibrose, sowie leicht erhöhte GOT-Wert nach der Rückbildungsphase. Die Unterschiede waren nicht signifikant (Mittelwerte \pm SD, 6 Wochen WT n=5, KO n=5; 12 Wochen WT n=10, KO n=13; 12Wochen+4WoRec. WT n=8, KO n=17).

4.2.2 Hämangiogenese in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen während der Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose

Nachdem im vorhergehenden Kapitel gezeigt werden konnte, dass Myeloidzell-spezifisches VEGF eine Rolle bei der Rückbildung einer Leberfibrose spielt, sollte folgend der Einfluss von VEGF aus myeloischen Zellen auf die Hämangiogenese während der Induktion und der Rückbildung einer Leberfibrose untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde zunächst mittels einer quantitativen Real Time Analyse evaluiert, ob Myeloidzell-spezifisches VEGF während der Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose einen Einfluss auf die Gesamt-VEGF-Expression der Leber besitzt. Infolge der Induktion der Fibrose kam es zunächst zu einer genotypunabhängigen Reduktion der Gesamt-VEGF-Expression (Abb. 4.40, 12 Wochen). Nach einer Rückbildungsdauer von vier Wochen kam es in den Lebern der WT-Mäuse wieder zu einem Anstieg der VEGF-Expression, während die VEGF-Expression in den Lebern der KO-Mäuse unverändert niedrig blieb (Abb. 4.40, 12 Wochen + 4WoRecovery). Myeloische Zellen sind demnach während der Rückbildungsphase der Leberfibrose eine maßgebliche Quelle des Gesamt-VEGF.

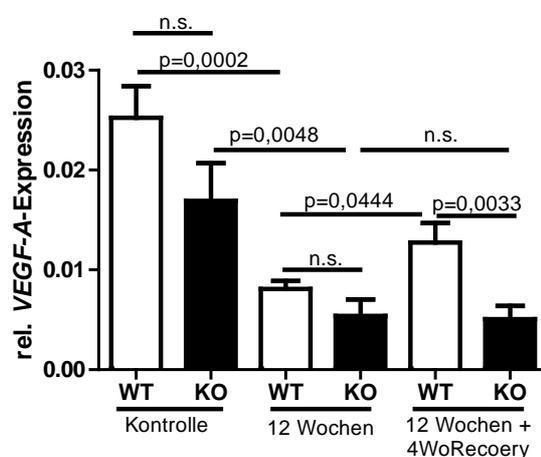


Abb. 4.40 VEGF-A-mRNA-Expression in Mauslebern während der Entstehung und der Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen

VEGF-mRNA-Expression in Lebern von WT- und KO-Mäusen, die mit Olivenöl (Kontrollen) oder CCl_4 (12 Wochen) behandelt wurden, sowie jenen, die mit CCl_4 behandelt wurden und eine Rückbildungsphase von 4 Wochen hatten, ist mittels einer Real Time PCR nachgewiesen worden. Zunächst verringerte sich die VEGF-Expression genotypunabhängig. Infolge der Rückbildungsphase stieg die VEGF-Expression in den Lebern der WT-Mäuse signifikant an, während es in den Lebern der KO-Mäuse zu keiner Veränderung der VEGF-Expression kam (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT n=7, KO n=7, 12 Wochen WT n=10, KO n=13; 12Wochen+4WoRec. WT n=8, KO n=17).

Um die Folgen der verringerten VEGF-Expression während der Rückbildungsphase für die Hämangiogenese zu ermitteln, wurden im nächsten Schritt die Anzahl und die Distribution der Lebersinusoide untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von VEGFR2-positiven Lebersinusoiden auf dem Lebergewebe von WT- und KO-Mäusen der Kontrollgruppe sowie nach der Entstehung und Rückbildung der Fibrose durchgeführt (Abb. 4.41 B). Die VEGFR2-positiven Sinusoide wurden anschließend quantitativ erfasst (Abb. 4.41 A). Wie in

Abbildung 4.41 A zu erkennen ist, zeigten die Lebern der WT-Mäuse nach der zwölfwöchigen CCl₄-Behandlung einen signifikanten Anstieg in der Anzahl der VEGFR2-positiven Lebersinusoide, gefolgt von einer signifikanten Reduktion nach der vierwöchigen Rückbildungsphase. KO-Mäuse hingegen zeigten zunächst ebenfalls einen signifikanten, wenn auch weniger drastischen Anstieg in der Anzahl der Lebersinusoide bis hin zur zwölften Behandlungswoche mit CCl₄. Diesem Anstieg folgte allerdings keine Reduktion der Lebersinusoide während der Erholungsphase. Die Anzahl der Sinusoide stieg weiterhin signifikant an (Abb. 4.41 A).

Darüber hinaus wurde die Distribution der Lebersinusoide genauer betrachtet. Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung für VEGFR2 und SMA zeigte in den gesunden Lebern beider Genotypen eine homogene Verteilung der VEGFR2-positiven Lebersinusoide (Abb. 4.41 B). Nach zwölfwöchiger CCl₄-Behandlung kam es genotypunabhängig zu einer perifibrotischen Ansammlung der Sinusoide, die das fibrotische Material nicht infiltrierten. Weder in den Lebern der WT- noch der KO-Mäuse ließen sich VEGFR2-positive Sinusoide innerhalb fibrotischer Areale um die Periportalfelder sowie die Zentralvenen finden. Nach der Rückbildungsphase zeigten die Lebern der WT-Mäuse wieder eine normalisierte Distribution der Sinusoide. VEGFR2-positive Lebersinusoide konnten erneut innerhalb der periportalen und perizentralen Bereiche, in denen sich die Fibrose weitestgehend zurückgebildet hat, lokalisiert werden. Die Lebern der KO-Mäuse hingegen wiesen innerhalb des weiterhin bestehenden fibrotischen Materials nach wie vor eine Rarifizierung der Sinusoide auf (Abb. 4.41 B). Sinusoidale Endothelzellen können fibrotisches Material demnach unter der Abwesenheit von VEGF aus myeloischen Zellen nicht infiltrieren.

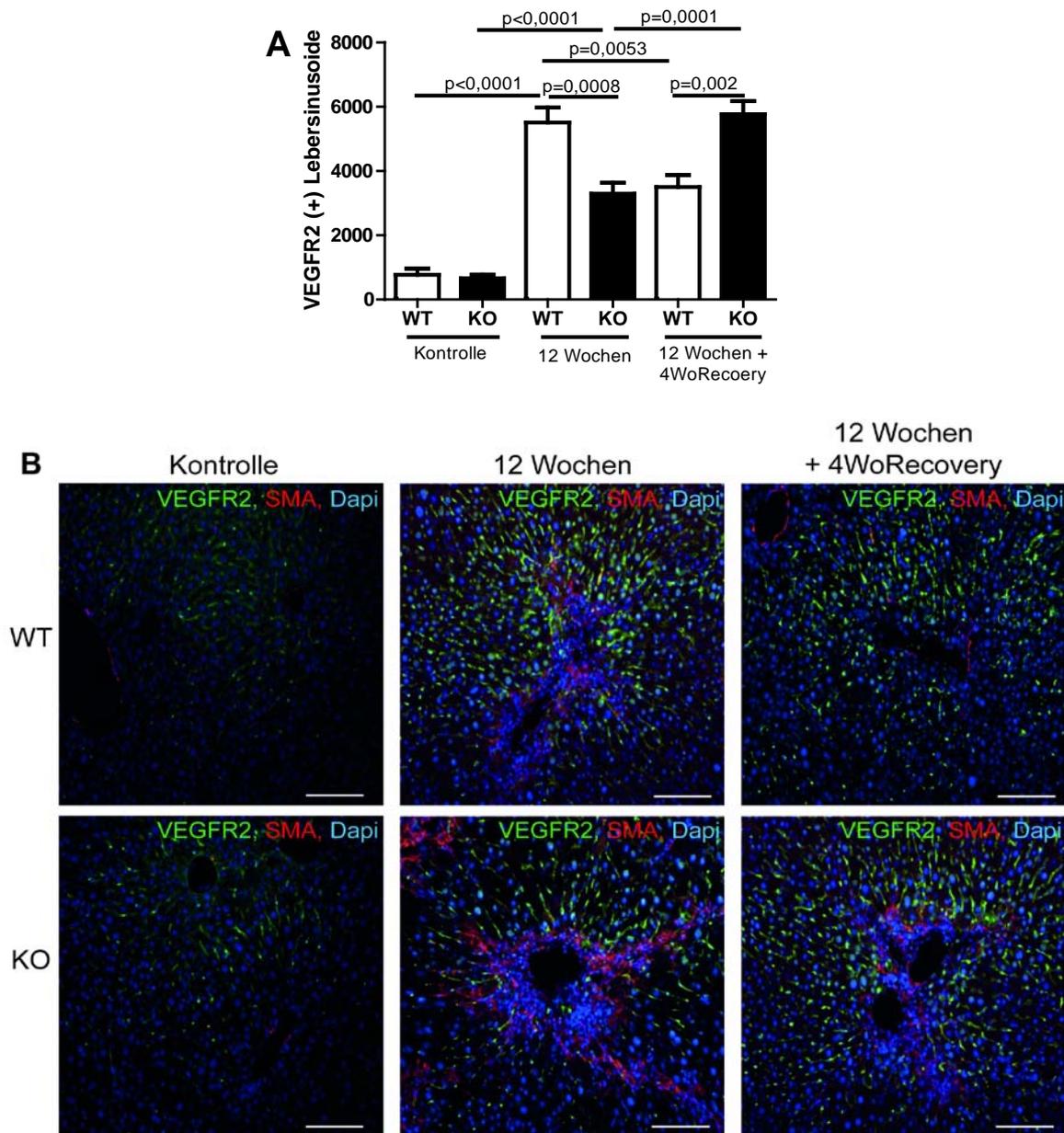


Abb. 4.41 Quantifizierung und Distribution der Lebersinusoiden in Lebergewebe der WT- und KO-Mäuse vor und nach der Induktion der Fibrose sowie nach der Rückbildungsphase

A) Hämangiogenese wurde mittels quantitativer Auswertung VEGFR2-positiver Lebersinusoiden in Lebern von WT- und KO-Mäusen ermittelt. Nach der Fibroseinduktion kam es in den Lebern der WT- und KO-Mäuse zu einer signifikanten Zunahme der Lebersinusoiden. Nach der Rückbildungsphase sank die Anzahl der Lebersinusoiden in den WT-Lebern, während die Anzahl der Sinusoiden in KO-Lebern weiter signifikant anstieg (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT $n=7$, KO $n=7$, 12 Wochen WT $n=10$, KO $n=13$; 12Wochen+4WoRec. WT $n=8$, KO $n=17$). B) Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Lebersinusoiden (VEGFR2) und SMA auf Lebergewebe von WT- und KO-Mäusen zeigte, dass Lebersinusoiden nach der Induktion der Fibrose weder in Lebern der WT- noch der KO-Mäuse innerhalb fibrotischer Areale, sondern ausschließlich perifibrotisch, zu finden waren. Nach der Rückbildungsphase wiesen WT-Lebern eine homogene Verteilung der Lebersinusoiden auf, während in KO-Lebern weiterhin keine Sinusoiden im Bereich der fibrotischen Narbe zu finden waren. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

4.2.3 Expression und Aktivität von Matrixmetalloproteasen in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen

Die Voraussetzung dafür, dass Endothelzellen in umliegendes Gewebe eindringen können und dort Blutgefäße bilden, ist der Abbau von ECM-Bestandteilen. MMPs sind dabei maßgeblich an der Degradierung kollagenhaltiger ECM beteiligt. Ihre Antagonisten, die TIMPs, beeinflussen den MMP-abhängigen Abbau der ECM, indem sie an MMPs binden und so deren Aktivität hemmen (Sternlicht und Werb, 2001; Gomez et al., 1997). Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass Lebersinusoiden in den Lebern der KO-Mäuse die fibrotischen Areale auch infolge der Rückbildungsphase nicht infiltrieren können. Möglicherweise ist ein mangelhafter Abbau der ECM, aufgrund verminderter MMP-Expression oder -Aktivität, ursächlich für den Phänotyp der KO-Mäuse. Deshalb wurde weitergehend untersucht, ob es in Abhängigkeit des VEGF aus myeloischen Zellen zu einer Veränderung der Genexpression verschiedener fibroseassoziiierter MMPs oder TIMPs kommt. Zu diesem Zweck erfolgte die Genexpressionsanalyse von MMP2, MMP9, MMP13, MMP14, MMP15 sowie TIMP2 in Leberlysaten von gesunden WT- und KO-Mäusen, sowie in Leberlysaten von WT- und KO-Mäusen nach der Induktion sowie der Rückbildung der Leberfibrose (Abb. 4.42 A-F).

Die Expression von MMP2 und MMP9 zeigte zu keinem Versuchszeitpunkt VEGF-abhängige Unterschiede (Abb. 4.42 A, B). Die Expression von MMP13 stieg zunächst ebenfalls genotypunabhängig. Während die WT-Lebern nach der Rückbildungsphase weiterhin eine konstant hohe MMP13-Expression zeigten, wiesen die KO-Lebern allerdings eine deutlich verringerte MMP13-Expression auf (Abb. 4.42 C). MMP14 zeigte bereits in gesunden WT-Lebern eine signifikant erhöhte Expression. Nach der Entstehung der Fibrose kam es zu einer genotypunabhängigen, verringerten Expression von MMP14. Infolge der Rückbildungsphase jedoch stieg die MMP14-Expression in den Lebern der WT-Mäuse wieder signifikant an, während die Lebern der KO-Mäuse keine Expressionssteigerung aufwiesen (Abb. 4.42 D). MMP15 hingegen zeigte über alle Versuchszeitpunkte hinweg eine durchgehend signifikant geringere Expression in den KO-Lebern, verglichen mit den Lebern der WT-Mäuse (Abb. 4.42 E). TIMP2 wiederum wies in den Kontrollen und nach der Fibroseinduktion eine genotypunabhängige hohe Expression auf. Infolge der

Rückbildungsphase allerdings war die Expression von TIMP2 in den Lebern der KO-Mäuse signifikant verringert (Abb. 4.42 F).

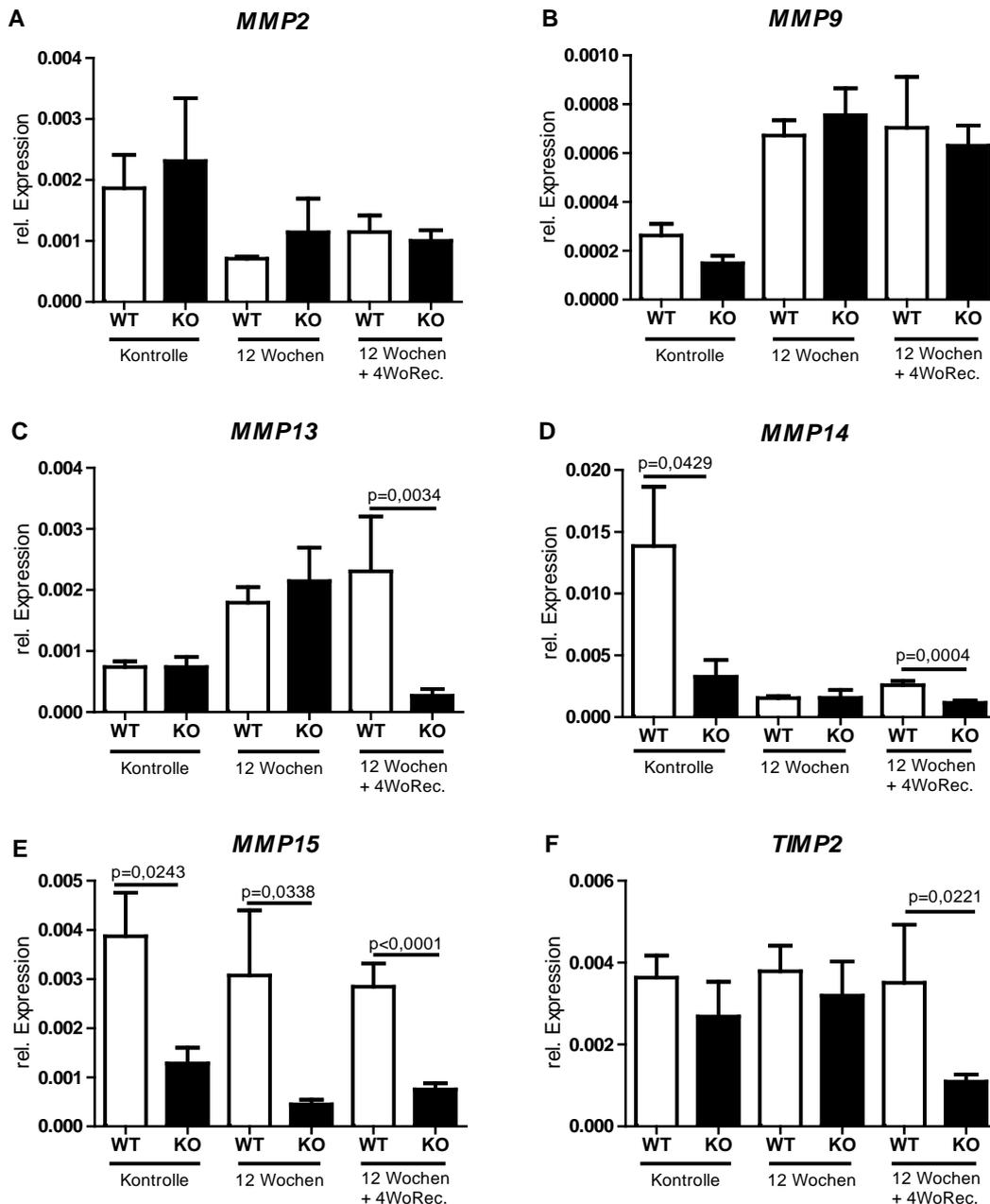
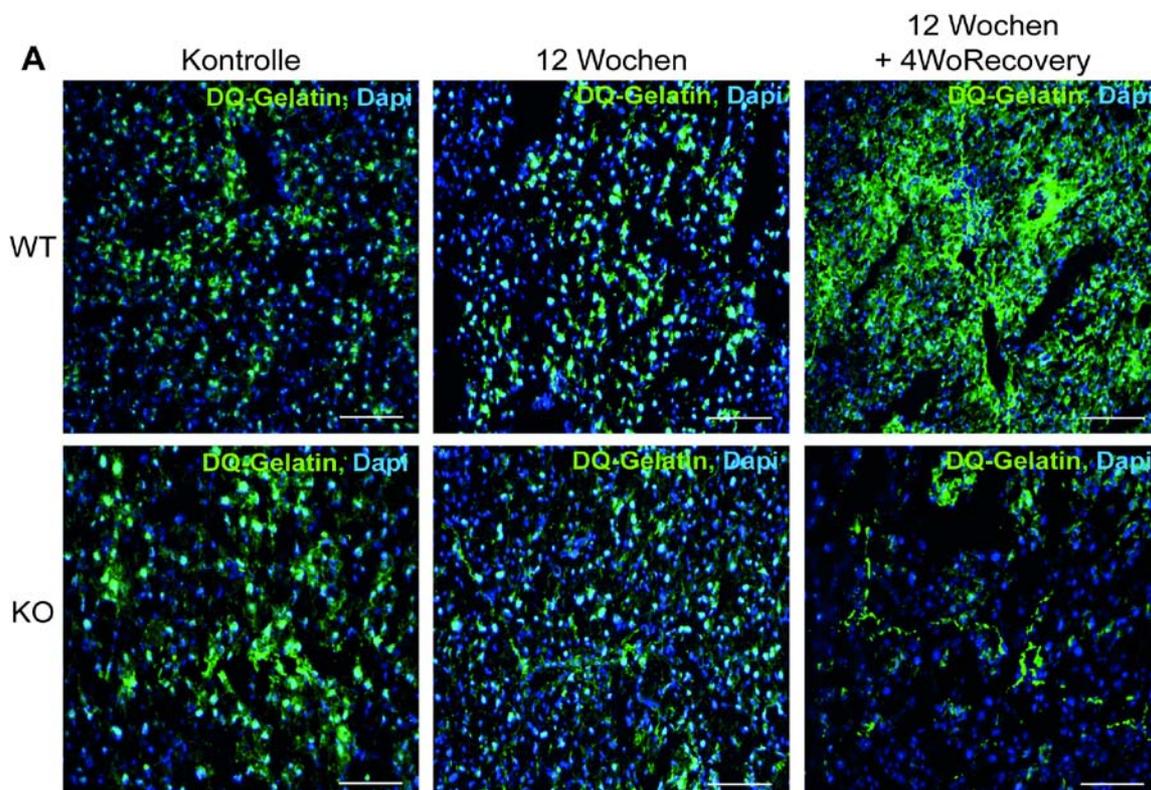


Abb. 4.42 Genexpressionsanalyse fibroseassoziiertes MMPs und TIMPs während der Entwicklung und Rückbildung einer Fibrose in Leberlysaten von WT- und KO-Mäusen

Die mRNA-Expression von *MMP2*, *MMP9*, *MMP13*, *MMP14*, *MMP15* und *TIMP2* wurden vor und nach der Induktion der Leberfibrose sowie nach der Rückbildungsphase in Gewebelysaten von Lebern der WT- und KO-Mäuse mittels Real Time PCR gemessen. *MMP13*, *MMP14* und *MMP15* zeigten unter Abwesenheit von VEGF aus myeloischen Zellen eine signifikant geringere Expression nach der Rückbildungsphase. *MMP2* und *MMP9* zeigten zu keinem Zeitpunkt genotypabhängige Unterschiede, während *MMP15* in den Lebern der WT-Mäuse zu jedem Versuchszeitpunkt signifikant höher exprimiert wurde (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT n=10, KO n=8; 12 Wochen WT n=10, KO n=13, 12Wochen+4WoRec. WT n=8, KO n=17).

Somit konnte gezeigt werden, dass es nach der Rückbildungsphase der Leberfibrose ausschließlich unter der Anwesenheit von VEGF aus myeloischen Zellen zu einer signifikant erhöhten Expression von MMP13, MMP14 und MMP15 kommt. Die Genexpression der MMPs lässt jedoch keine Rückschlüsse auf die Aktivität der MMPs im Gewebe von WT- und KO-Mäusen zu. Daher wurde die Enzymaktivität der MMPs mittels einer DQTM Gelatine-Zymographie ermittelt. Nachdem die fluoreszenzmarkierte DQTM Gelatine auf das Lebergewebe gegeben wird, kommt es durch die Aktivität der MMPs zum proteolytischen Aufschluss der DQTM Gelatine und folgend zu einer Freisetzung eines grünen Fluoreszenzsignals. Die Bestimmung der Farbintensität erlaubt demnach die Messung der enzymatischen Aktivität der MMPs. Die Fluoreszenzbilder sowie die quantitative Auswertung des fluoreszierenden Signals der DQTM Gelatine zeigte zunächst keine genotypspezifischen Unterschiede in der MMP-Aktivität in den Lebern der Kontroll- und 12-Wochen-CCl₄-Mäuse (Abb. 4.43 A, B). Zu beiden Zeitpunkten konnte für beide Genotypen eine ähnlich homogene Verteilung des Fluoreszenzsignals im Gewebe beobachtet werden. Nach einer Rückbildungszeit von vier Wochen zeigte sich allerdings ein signifikanter Anstieg der MMP-Aktivität in den Lebern der WT-Mäuse. Die Lebern der KO-Mäuse hingegen wiesen keine gesteigerte MMP-Aktivität auf (Abb. 4.43 A, B).



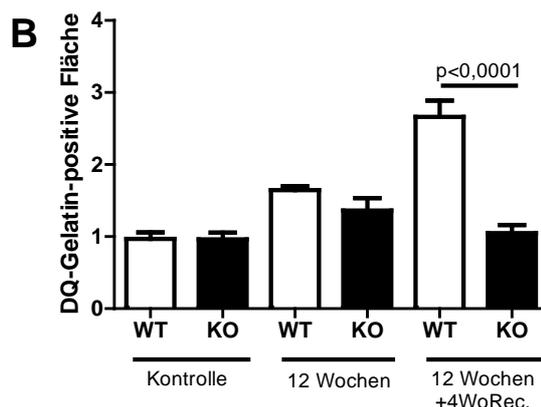


Abb. 4.43 MMP-Aktivität vor und nach der Entstehung sowie nach der Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen

Zur Bestimmung der MMP-Aktivität in Mauslebern vor und nach der Fibroseinduktion sowie nach der Rückbildungsphase wurden histologische Leberproben über Nacht mit DQ-Gelatin inkubiert, A) das Fluoreszenzsignal mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops abfotografiert, und B) die Signalstärke mittels ImageJ bestimmt. Die MMP-Aktivität veränderte sich während der Entstehung der Fibrose nicht. Infolge der Rückbildungsphase kam es unter Anwesenheit von VEGF aus myeloischen Zellen zu einer Steigerung der Aktivität der MMPs (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT n=4, KO n=4; 12 Wochen WT n=4, KO n=4; 12Wochen+4WoRec. WT n=6, KO n=6). Maßstabskala entspricht 100 μ m.

4.2.4 Die Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen

In Kapitel 4.2.1 konnte gezeigt werden, dass KO-Mäuse nicht dazu in der Lage sind, überschüssiges Kollagen in fibrotischem Lebergewebe zu degradieren. Vermutlich ist der Mangel an VEGF aus myeloischen Zellen ursächlich für das Fortbestehen der Leberfibrose in den KO-Mäusen. Ferner ist es denkbar, dass es während der Induktion der Leberfibrose in den Lebern der KO-Mäuse zu einem irreversiblen Schaden kommt, der die Rückbildung der Fibrose verhindert. Um die Rolle von VEGF aus myeloischen Zellen isoliert während der Rückbildung einer Leberfibrose betrachten zu können, wurde KO-Mäusen nach zwölfwöchiger CCl₄-Behandlung und somit vor der Rückbildungsphase Knochenmark von WT-Mäusen transplantiert. Vor der Knochenmarktransplantation erfolgte eine Ganzkörperbestrahlung der Mäuse, die der Eradikation des vorhandenen Knochenmarks dient. Durch die anschließende Transplantation von WT-Knochenmark wird die Myeloidzell-spezifische VEGF-Expression in den Empfänger-KO-Mäusen während der Rückbildungsphase wiederhergestellt (KO/WT). WT-Mäusen wurde, ebenfalls nach der Induktion der Fibrose und infolge einer Ganzkörperbestrahlung, Knochenmark von KO-Mäusen

(WT/KO) transplantiert. Die Myeloidzell-spezifische VEGF-Expression dieser WT/KO-Mäuse ist somit während der Rückbildungsphase unterdrückt. Anhand dieses Versuchsaufbaus, der in Abbildung 3.2 detailliert dargestellt ist, konnte nun gezielt untersucht werden, ob eine Wiedereinführung von VEGF aus myeloiden Zellen zu einer Rückbildung der Fibrose führt bzw. ob der Entzug von VEGF aus myeloiden Zellen während der Rückbildung das Fortbestehen der Leberfibrose zur Folge hat. Das Ausmaß der Leberfibrose wurde abermals mittels einer Sirius Red Färbung und anschließender quantitativer Erfassung der Kollagenfläche in den Lebern bestimmt (Abb. 4.44). Infolge der Wiedereinführung von VEGF aus myeloiden Zellen kam es nach der Rückbildungszeit zu einer signifikanten Reduktion des Kollagengehalts (WT, 12 Wochen vs. KO/WT). Mäuse, denen VEGF für die Phase der Rückbildung entzogen wurde, wiesen im Gegensatz dazu keine Reduktion des Kollagengehaltes auf (KO, 12 Wochen vs. WT/KO) (Abb. 4.44). Somit weisen diese Daten darauf hin, dass die Anwesenheit VEGF aus myeloiden Zellen eine Voraussetzung für die Rückbildung einer Leberfibrose ist und das Fehlen von VEGF aus myeloiden Zellen während der Rückbildungsphase das Fortbestehen der Fibrose zur Folge hat.

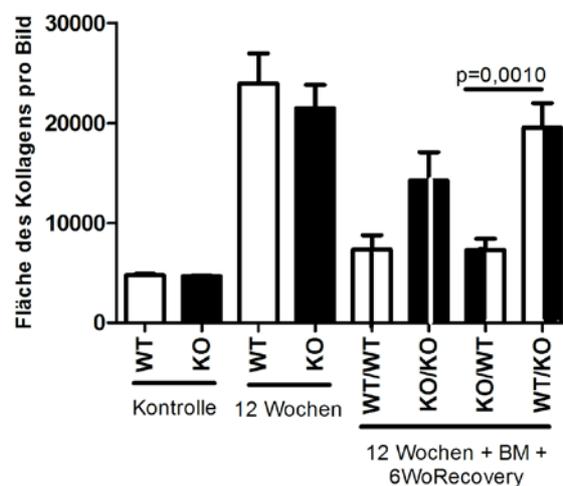
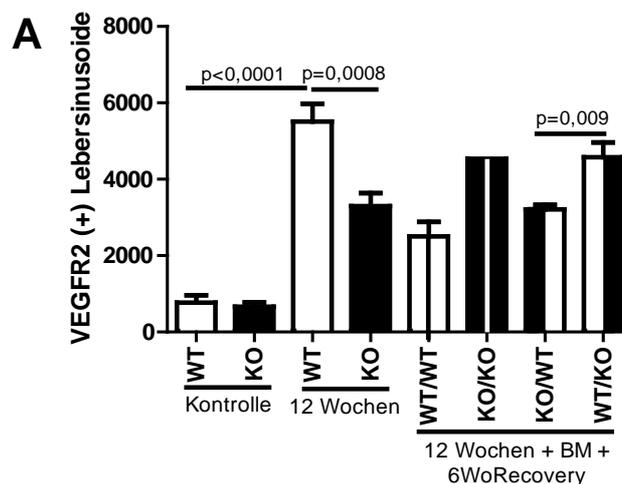


Abb. 4.44 Quantifizierung des Kollagens in Lebern von Mäusen, denen für die Dauer der Rückbildung VEGF aus myeloiden Zellen hinzugefügt (KO/WT) oder entzogen (WT/KO) wurde

Die Sirius Red Färbung für Kollagen auf Lebern von WT- und KO-Mäusen, die 12 Wochen lang CCl₄ erhielten, ganzkörperbestrahlt wurden und denen vor der Erholungsphase je Knochenmark des anderen Genotypen transplantiert wurde (Kontrollen erhielten Knochenmark des eigenen Genotyps) (12Wochen+BM+6WoRecovery), wurde mittels ImageJ quantitativ ausgewertet. Mäuse, denen VEGF aus myeloiden Zellen hinzugefügt wurde, wiesen eine signifikant geringere Fläche an Kollagen auf, als Mäuse, denen VEGF aus myeloiden Zellen entzogen wurde (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT n=3, KO n=3; 12 Wochen WT n=4, KO n=4; 12Wochen+BM+6WoRec. WT/WT n=4, KO/KO n=4, KO/WT n=5; WT/KO n=5).

Um den Effekt des VEGF aus myeloischen Zellen auf die Hämangiogenese als auch auf die Distribution der Lebersinusoide isoliert betrachten zu können, wurde als nächstes eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung für VEGFR2 und SMA auf Lebergewebe der knochenmarktransplantierten Tiere durchgeführt (Abb. 4.45). Die quantitative Auswertung der VEGFR2-positiven Lebersinusoide zeigte, dass die Zuführung von VEGF aus myeloischen Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Sinusoide führte (KO/WT, Abb. 4.45 A). Im Gegensatz dazu wiesen Mäuse, die nicht mehr über VEGF aus myeloischen Zellen verfügten, infolge der Rückbildungsphase weiterhin eine erhöhte Anzahl an Lebersinusoiden auf (WT/KO, Abb. 4.45 A).

Im nächsten Schritt wurde die Distribution der VEGFR2-positiven Lebersinusoide betrachtet. Wie in Abbildung 4.45 B zu sehen ist, wiesen die fibrotischen Areale in den WT/KO-Lebern, ebenso wie die KO-Lebern nach der Rückbildungsphase (Abb. 4.41), eine Rarifizierung der Sinusoide auf. Die Sinusoide in den Lebern der KO/WT-Mäuse hingegen zeigten infolge der Wiedereinführung von VEGF aus myeloischen Zellen in den peripheren Bereichen der Periportalfelder und der Zentralvenen wieder ein homogenes Verteilungsmuster. Es konnte keine Rarifizierung der Sinusoide mehr beobachtet werden (Abb. 4.45 B).



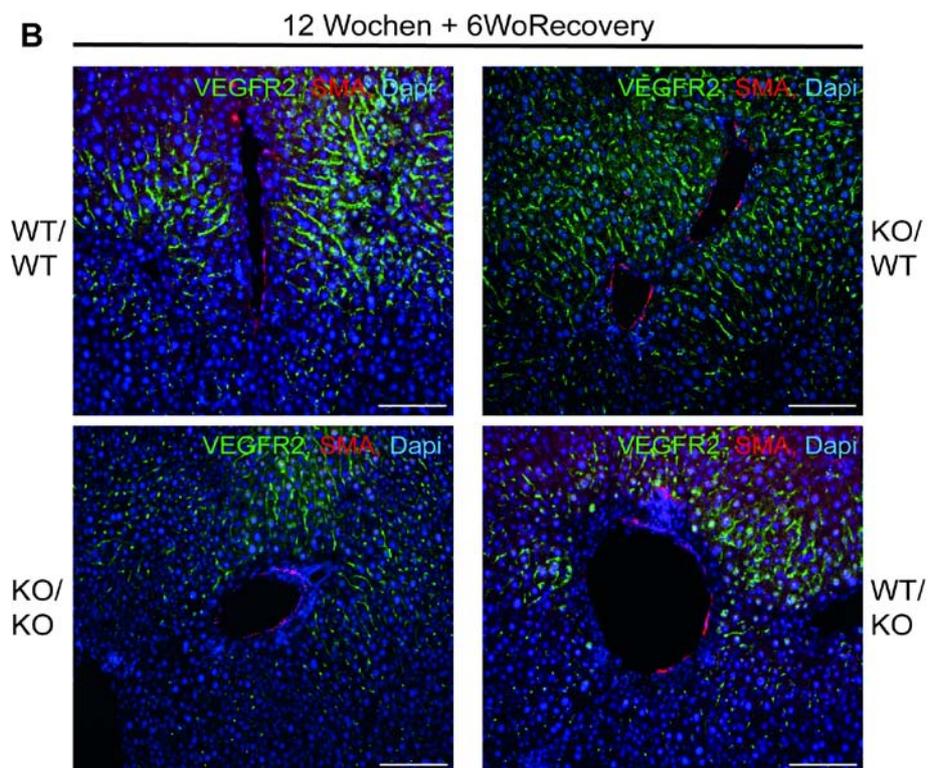
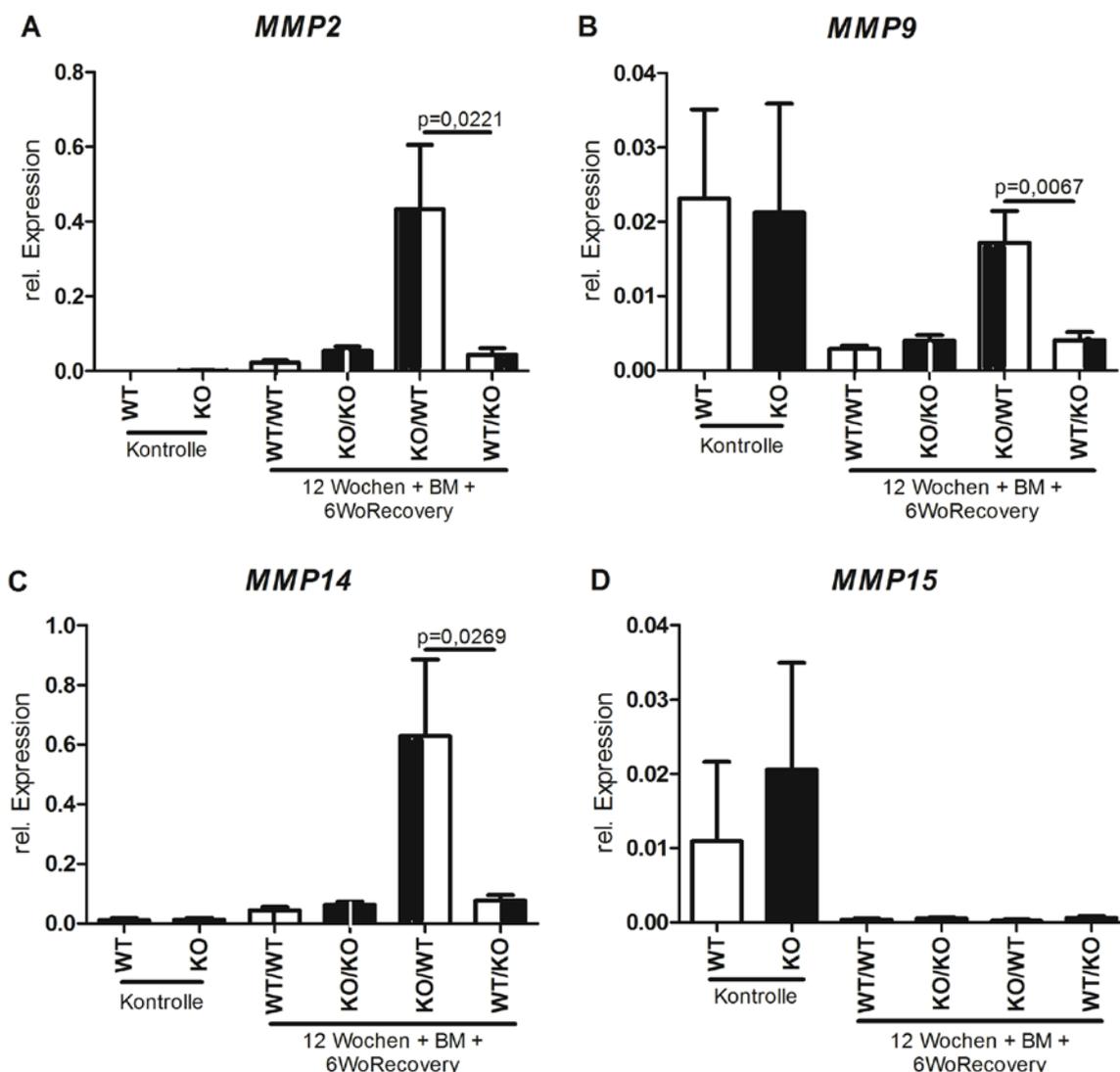


Abb. 4.45 Quantifizierung und Distribution der Lebersinusoide in Lebergewebe von Mäusen, denen VEGF aus myeloischen Zellen für die Dauer der Rückbildungsphase zugefügt bzw. entzogen wurde

A) Hämangiogenese wurde erneut durch die Quantifizierung der VEGFR2-positiven Lebersinusoide ermittelt. Infolge der Wiedereinführung von VEGF aus myeloischen Zellen kam es zu einer signifikanten Reduktion in der Anzahl der Lebersinusoide. Durch den Entzug von Myeloidzell-spezifischem VEGF blieb die Anzahl der Sinusoide signifikant erhöht (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT n=3, KO n=3; 12 Wochen WT n=4, KO n=4; 12Wochen+BM+6WoRec. WT/WT n=4, KO/KO n=4, KO/WT n=5; WT/KO n=5). B) Anhand der Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Lebersinusoide (VEGFR2) und SMA auf murinem Lebergewebe war zu erkennen, dass die Lebersinusoide infolge der Wiedereinführung des VEGF aus myeloischen Zellen die Bereiche der fibrotischen Läsionen infiltrierten. Fibrotische Areale im Lebergewebe der Mäuse, denen VEGF aus myeloischen Zellen entzogen wurde, wiesen weiterhin eine Rarifizierung der Lebersinusoide auf. Maßstabskala entspricht 100 μ m.

Wie bereits beschrieben, ist die Degradierung von Kollagen durch MMPs eine Voraussetzung für die Migration von Endothelzellen in umliegendes Gewebe. Obwohl MMPs von einer Vielzahl an Zellen exprimiert werden, spielt in diesem Zusammenhang vor allem die MMP-Genexpression durch Endothelzellen eine wichtige Rolle (Visse und Nagase, 2003). Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob sich die Expression von MMP2, MMP9, MMP14 und MMP15 durch Endothelzellen infolge der Wiedereinführung des VEGF aus myeloischen Zellen verändert. Zu diesem Zweck wurden quantitative Real Time Analysen dieser MMPs in isolierten Endothelzellen knochenmarktransplantierte Mäuse durchgeführt (Abb.

4.46 A-E). Wie in Abbildung 4.46 A, B und C zu erkennen ist, stieg die Expression von MMP2, MMP9 und MMP14 durch ECs nach der Wiedereinführung von VEGF aus myeloischen Zellen signifikant an. Mäuse, die während der Phase der Rückbildung kein VEGF aus myeloischen Zellen exprimieren konnten, zeigten eine signifikant geringere Expression für MMP2, MMP9 und MMP14. Die MMP15-Expression sank genotypunabhängig infolge der Induktion einer Leberfibrose (Abb. 4.46 D). Die Expression von TIMP2 in WT/KO-Mäusen war leicht, jedoch nicht signifikant erhöht (Abb. 4.46 E). Die Wiedereinführung von VEGF aus myeloischen Zellen führt demnach zu einer Steigerung der Expression von MMP2, MMP9 und MMP14 durch ECs.



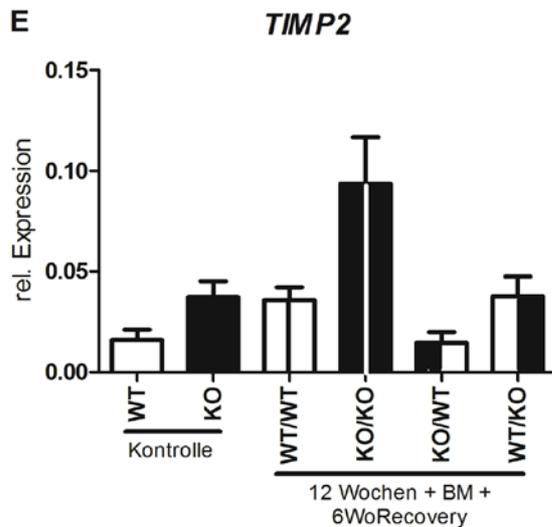


Abb. 4.46 Wiedereinführung von VEGF aus myeloischen Zellen vor der Rückbildungsphase führt zu gesteigerter Expression fibroseassoziiierter *MMPs* durch lebersinusoidale Endothelzellen

Endothelzellen wurden aus den Lebern der Kontroll- sowie der knochenmarktransplantierten Tiere isoliert und mittels einer Real Time PCR auf ihre mRNA-Expression von *MMP2*, *MMP9*, *MMP14*, *MMP15* und *TIMP2* untersucht. Endothelzellen zeigten infolge der Wiedereinführung von Myeloidzell-spezifischen VEGF signifikant erhöhte *MMP2*-, *MMP9*- und *MMP14*-Expression. Die *TIMP2*-Expression blieb genotypunabhängig (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT n=3, KO n=3; 12Wochen+BM+6WoRec. WT/WT n=4, KO/KO n=4, KO/WT n=5; WT/KO n=5).

Anschließend wurde die MMP-Aktivität in den Lebern der knochenmarktransplantierten Mäuse ebenfalls mittels der DQTM Gelatine-basierten Zymographie bestimmt (Abb. 4.47). Die histologischen Schnitte und die quantitative Auswertung des DQTM Gelatin-Signals zeigten, dass auch die MMP-Aktivität infolge der Wiedereinführung des VEGF aus myeloischen Zellen signifikant anstieg. Mäuse, denen vor der Rückbildungsphase VEGF aus myeloischen Zellen entzogen wurde (WT/KO), zeigten im Gegensatz dazu keine Steigerung der MMP-Aktivität mehr (Abb. 4.47 A, B).

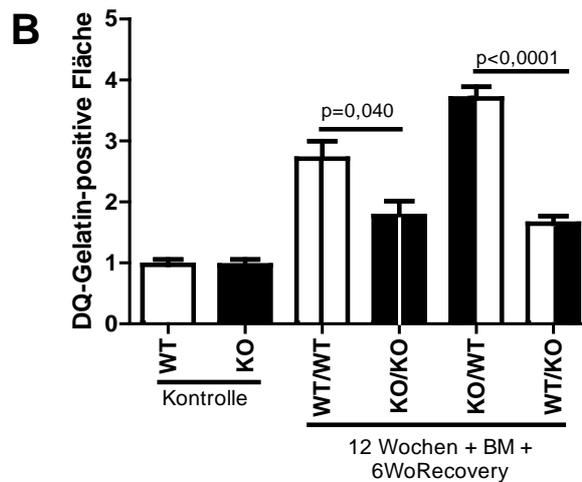
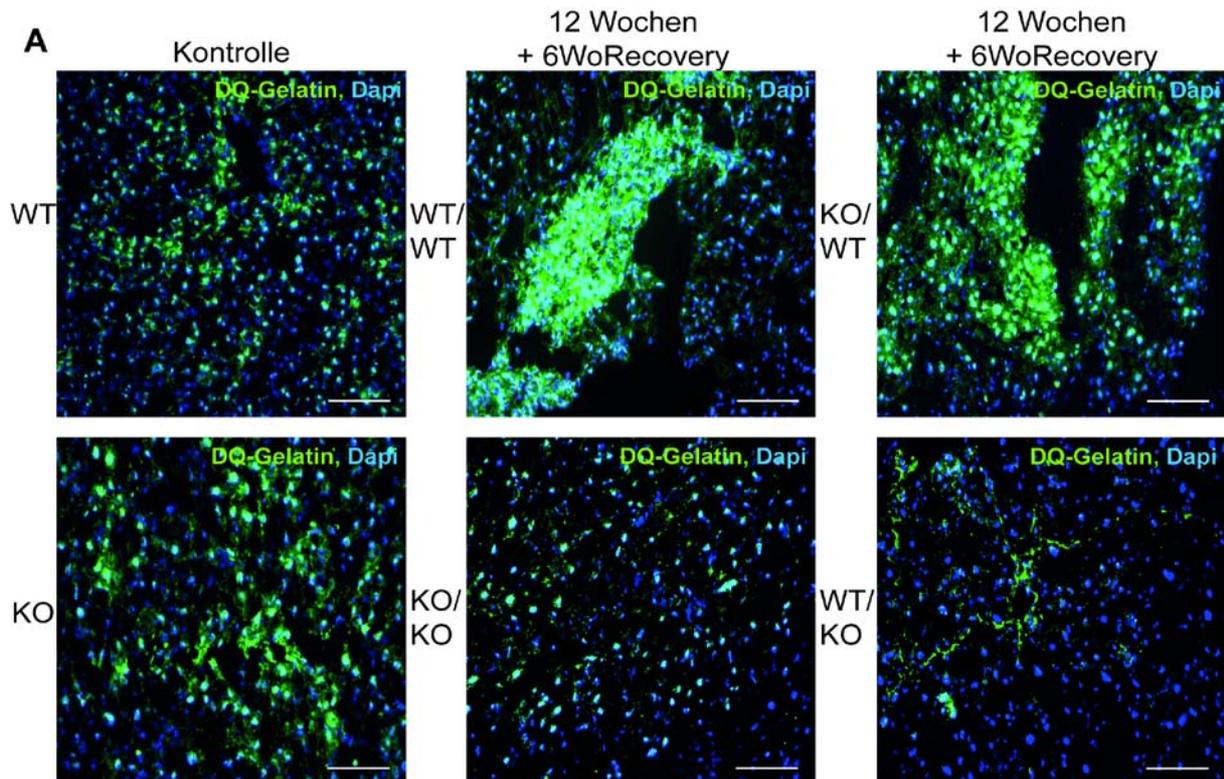


Abb 4.47 Erhöhte MMP-Aktivität in der Leber infolge der Wiedereinführung von Myeloidzell-spezifischem VEGF

Histologische Leberproben der knochenmarktransplantierten Mäuse wurden über Nacht mit DQ-Gelatine inkubiert, um die MMP-Aktivität zu bestimmen. A) Das Fluoreszenzsignal der DQ-Gelatine sowie B) die quantitative Auswertung des Signals mittel ImageJ zeigten nach der Rückbildungsphase eine signifikant erhöhte Aktivität der MMPs in den Lebern der KO/WT-Mäuse. Die Aktivität in den WT/KO-Mäusen hingegen blieb infolge des Entzugs von VEGF aus myeloischen Zellen konstant niedrig (Mittelwerte \pm SD, Kontrolle WT n=3, KO n=3; 12Wochen+BM+6WoRec. WT/WT n=4, KO/KO n=4, KO/WT n=5; WT/KO n=5). Maßstabskala entspricht 100 μ m.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass Mäuse, die defizient für Myeloidzell-spezifisches VEGF sind, eine Leberfibrose nicht zurückbilden können. Der Mangel an Myeloidzell-spezifischem VEGF führt zu einer verringerten MMP-Expression und -Aktivität in der Leber. Die mangelhafte MMP-Aktivität ist vermutlich die Ursache dafür, dass sich VEGFR2-positive Lebersinusoidale in den Lebern der KO-Mäuse perifibrotisch sammeln, ohne fibrotische Areale zu infiltrieren. Die Wiedereinführung von VEGF aus myeloischen Zellen vor der Rückbildungsphase (KO/WT) führt zu einer gesteigerten MMP-Expression durch Endothelzellen und zu einer erhöhten Aktivität der MMPs. Aufgrund einer erhöhten MMP-Aktivität kommt es zum Abbau des Kollagens im Bereich der Periportalfelder und der Zentralvenen. Infolge des Kollagenabbaus migrieren lebersinusoidale ECs in die ehemaligen fibrotischen Bereiche, so dass eine normalisierte Distribution der Lebersinusoidale resultiert.

5. Diskussion

5.1 Einfluss der Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße auf die Entwicklung einer Lungenfibrose

Während die Rolle des Blutgefäßsystems in der Entstehung einer Lungenfibrose Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten ist (Hanumegowda et al., 2012), wurde die Rolle der Lymphgefäße in diesem Prozess bislang nur rudimentär betrachtet. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit anhand eines Mausmodells (Abb. 4.1) die Bedeutung pulmonaler Lymphgefäße für die Entstehung einer Lungenfibrose untersucht. Die erste Betrachtung der Lymphgefäße im Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse ließ vermuten, dass sich fibrotische Läsionen in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse zunächst um pulmonale Lymphgefäße bilden und sich von dort aus im Gewebe ausbreiten (Abb. 4.2). Eine hohe Zahl der Lymphgefäße, die sich innerhalb fibrotischer Areale befanden, zeigte eine Assoziation mit muralen Zellen als auch eine Basalmembran (Abb. 4.6, Abb. 4.11). Lymphgefäße bestehen in der Regel aus einer einzelnen Schicht übereinanderlappender Lymphendothelzellen. Die Struktur der Lymphgefäße führt zu einer hohen Permeabilität und erlaubt der Lymphflüssigkeit den Eintritt in die Lymphgefäße (Aukland und Reed, 1993). Eine Ansammlung muraler Zellen weisen üblicherweise nur die impermeablen Lymphkollektoren und Blutgefäße auf (Jain, 2003). Somit stellt die Assoziation pulmonaler Lymphgefäße mit muralen Zellen in fibrotischen Mauslungen eine abnormale Remodellierung der Lymphgefäße dar. Obwohl eine Remodellierung oder Dysfunktion von Lymphgefäßen bereits mit einer Reihe anderer Krankheitsbilder assoziiert wird (Baluk et al., 2005; Gale et al., 2002; Petrova et al., 2004), wurde eine mögliche Remodellierung von Lymphgefäßen im Zusammenhang mit der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) bislang nicht untersucht. El-Chemaly et al. (2009) konnten zwar zeigen, dass es mit voranschreitender IPF zu einer Hyperplasie der Lymphgefäße kommt, untersuchten deren Struktur jedoch nicht weitergehend. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Studie, die einen Besatz muraler Zellen um Lymphgefäße oder eine ähnliche Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße im Rahmen einer IPF oder dem Bleomycin-induzierten Modell der Lungenfibrose aufzeigen kann. Die vorliegenden Daten lassen demnach erstmals die Vermutung zu,

dass eine Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße in Form einer Ansammlung muraler Zellen und dem Vorhandensein einer perilymphatischen Basalmembran pathogenetische Merkmale der Lungenfibrose darstellen.

Die Spezifität von Lymphendothelzellmarkern ist in der Vergangenheit immer wieder kontrovers diskutiert worden. Vor allem Lyve1 wird, neben Lymphendothelzellen, ebenfalls von einer Subpopulation pulmonaler venöser Blutgefäße exprimiert (Gordon et al., 2008). Auch ein geringer Anteil an Makrophagen zeigt eine Lyve1-Expression (Schledzewski et al., 2006). Zur eindeutigen Identifizierung der Lymphgefäße wurden VEGFR3 und Prox1 hinzugezogen, die, neben Lyve1, zu den etablierten Lymphendothelzellmarkern gehören (Wigle und Oliver, 1999; Makinen et al. 2001; Jackson, 2004). Tatsächlich wiesen nur etwa 70% aller Lyve1-positiven Gefäße eine Koexpression von VEGFR3 und Prox1 auf (Abb. 4.3, Abb. 4.4 C, D), was darauf hinweist, dass es sich bei etwa 30% der Lyve1-positiven Gefäße nicht um Lymphgefäße, sondern vermutlich um venöse Blutgefäße handelt. Dennoch wiesen ca. 75% aller VEGFR3- und Prox1-positiven Lymphgefäße eine Assoziation mit muralen Zellen auf (Abb. 4.7), so dass weiterhin davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den mit muralen Zellen assoziierten Gefäßen tatsächlich um Lymphgefäße handelt.

Es ist ferner denkbar, dass es sich bei der Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße um eine Folge der Bleomycin-Behandlung handelt und somit keinerlei klinische Relevanz für die IPF besitzt. Doch auch Lungen von IPF-Patienten wiesen eine Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße auf (Abb. 4.34 A, B) und zeigen somit, dass es sowohl im Zuge einer Bleomycin-induzierten Lungenfibrose als auch einer IPF zu einer abnormalen Assoziation pulmonaler Lymphgefäße mit muralen Zellen kommt.

Bislang konnte in der Literatur nur gezeigt werden, dass Lymphgefäße im Rahmen einer IPF innerhalb fibrotischer Läsionen zu finden sind (El-Chemaly et al., 2009). Ob die Fibrose ihren Ursprung in den perilymphatischen Bereichen hat, oder die Lymphgefäße erst im Zuge des fibrotischen Umbaus eingeschlossen werden, ist unklar. Die histologischen Präparate von Mauslungen, die an Tag 28 entnommen wurden, lassen die Vermutung zu, dass sich fibrotische Läsionen zunächst um Lymphgefäße entwickeln und sich von dort aus im Lungengewebe ausbreiten (Abb. 4.6, frühes Stadium). Folglich sollte deshalb untersucht werden, ob es sich bei der

Remodellierung der Lymphgefäße um eine mögliche Ursache oder aber um die Folge einer Lungenfibrose handelt. Lungen, die an Tag 11 der Bleomycin-Behandlung entnommen wurden und bereits eine Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße, darüber hinaus aber noch keine fibrotischen Veränderungen zeigten (Abb. 4.9), unterstützten die Vermutung, dass es im Rahmen einer IPF zunächst zu einer Remodellierung der Lymphgefäße und erst anschließend zu der Bildung perilymphatischer Läsionen kommt. Diese Annahme wird von einer Studie von Yamashita et al. (2009a), welche die Lymphangiogenese in verschiedenen Stadien eines diffusen alveolaren Schadens (*diffuse alveolar damage, DAD*) untersuchten, bekräftigt. Sie konnten bereits in einem frühen Stadium der Krankheit Lymphgefäße in direkter Nähe zu fibrotischen Arealen lokalisieren, was ebenfalls auf eine perilymphatische Entwicklung fibrotischer Areale hindeutet.

Der Umbau lymphatischer Gefäße konnte in der Vergangenheit unter anderem mit Tumorwachstum und Wundheilungsprozessen in Verbindung gebracht werden (Baluk et al., 2005; Isaka et al., 2004). Daher stellt sich die Frage, ob die Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße ausschließlich in der Lungenfibrose auftritt oder auch in den eben erwähnten Prozessen zu beobachten ist. Da jedoch weder Gewebe muriner Brusttumore noch murines Hautgewebe infolge einer Wundheilung Lymphgefäße mit assoziierten muralen Zellen aufweisen (Abb. 4.12), ist davon auszugehen, dass die Rekrutierung muraler Zellen um Lymphgefäße spezifisch für die Pathogenese einer Lungenfibrose ist.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, eine Lungenfibrose pharmakologisch zu induzieren (Chua et al., 2005), wobei wir uns für das etablierte Bleomycin-Modell entschieden haben. Die intraperitoneale (i.p.) und die intratracheale (i.t.) Verabreichung von Bleomycin gelten als die üblichen Injektionsrouten (Walters und Kleeberger, 2008). Bei der von uns gewählten intraperitonealen Injektion wird der Wirkstoff über das Peritoneum resorbiert. Somit gelangt das Bleomycin zunächst über die Endothelzellen der pulmonalen Blutgefäße in die Lunge. Es stellt sich deshalb die Frage, ob die Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße nur eine Folge dieser Injektionsroute des Bleomycins darstellt oder unabhängig davon und damit spezifisch für die Pathogenese der Lungenfibrose ist. Um sich dieser Frage anzunehmen, wurde Mäusen Bleomycin einmalig i.t. verabreicht und daraufhin die pulmonalen Lymphgefäße dieser Mäuse untersucht (Abb. 4.10). Durch eine i.t.-

Injektion gelangt der Wirkstoff, unter Umgehung des Blutkreislaufs, direkt über die Trachea in die Lunge, wodurch Nebeneffekte aufgrund der Injektionsroute ausgeschlossen werden können. Auch infolge der i.t.-Injektion des Bleomycins kam es in den Lungen zu einer Umlagerung der pulmonalen Lymphgefäße mit muralen Zellen und zeigt somit, dass die Ansammlung muraler Zellen um pulmonale Lymphgefäße unabhängig von der Injektionsroute ein Charakteristikum der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose in Mäusen darstellt.

Folgend wurde untersucht, ob die Remodellierung der Lymphgefäße mit einer gesteigerten Lymphangiogenese einhergeht. Während in den Lungen der Bleomycin-behandelten Mäuse keine Lymphangiogenese stattfand (Abb. 4.5), zeigten die Lungen der IPF-Patienten einen signifikanten Anstieg in der Anzahl der Lymphgefäße (Abb. 4.33). Diese Resultate spiegeln die kontroverse Diskussion über die Rolle der Lymphangiogenese bei der Entstehung einer Lungenfibrose wider (Ebina et al., 2010, El-Chemaly et al., 2009). Einerseits konnte gezeigt werden, dass es in den Lungen von IPF-Patienten zu einer Rarifizierung der Lymphgefäße kommt (Ebina et al., 2010). Im Gegenteil dazu demonstrierten El-Chemaly et al. (2009) und Yamashita et al. (2009a) dass es im Lungengewebe von IPF-Patienten zu einer *de novo* Lymphangiogenese kommt. Auch in Bezug auf andere Lungenerkrankungen herrscht bislang keine Klarheit über das Ausmaß der Lymphangiogenese. So wurde beispielsweise in Lungen von DAD-Patienten ebenfalls eine *de novo* Lymphangiogenese beobachtet (Yamashita et al., 2009b), während es in den Lungen von Asthma-Patienten zu einer Reduktion der Lymphgefäße kommt (Ebina, 2008). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen die Vermutung zu, dass die Lymphangiogenese charakteristisch für eine IPF, nicht jedoch für das Bleomycin-induzierte Modell einer murinen Lungenfibrose ist. Falls gezeigt werden kann, dass die Lungen Bleomycin-behandelter Patienten ebenfalls keine Lymphangiogenese aufweisen, würde dies die Theorie festigen, dass die Lymphangiogenese zwar ein Charakteristikum der IPF, nicht jedoch der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose darstellt. In den 1960-er Jahren wurde Bleomycin entdeckt und ursprünglich als ein Chemotherapeutikum in der Behandlung von Tumoren eingesetzt (Umezawa 1965). Bereits 1973 wurde erstmalig berichtet, dass ein Patient infolge der Bleomycin-Behandlung an einer Lungenfibrose verstarb (Rudders und Hansley, 1973). Seitdem folgte eine Vielzahl weiterer Krebspatienten, die infolge einer Bleomycin-Behandlung

an einer Lungenfibrose erkrankten. Die Untersuchung von Lungenproben Bleomycin-behandelter Krebspatienten könnte bezüglich der Bleomycin-induzierten Lymphangiogenese für Klarheit sorgen.

Nachdem die Assoziation pulmonaler Lymphgefäße mit muralen Zellen als ein pathogenetisches Ereignis der Lungenfibrose identifiziert werden konnte, stellt sich nun die Frage, welcher Signalübertragungsweg für dieses Phänomen verantwortlich ist. Vor allem PDGF-A, PDGF-B, PDGFR- β , Ephrin B2, Ephrin B4, Endoglin, Ang1 sowie Ang2 gelten als wichtige Signalmoleküle für die Rekrutierung muraler Zellen (Petrova et al., 2004; Foo et al., 2006; Hellström et al., 1999; Shimoda et al., 2007). Von diesen Faktoren zeigten ausschließlich PDGF-B und PDGFR- β eine signifikant erhöhte Genexpression in fibrotischen Mauslungen (Abb. 4.13 B, C). Dass die PDGF-B/PDGFR- β -Signalübertragung eine Rolle in der Pathogenese der IPF spielt, wurde bereits postuliert. Lungen von IPF-Patienten weisen eine erhöhte PDGF-B-Expression in Epithelzellen und alveolaren Makrophagen auf (Antoniades et al., 1990; Homma et al., 1995). Aono et al. (2005) sowie Daniels et al. (2004) zeigten, dass PDGF-B/PDGFR- β die Entstehung einer Lungenfibrose unterstützt, indem es die Proliferation von Fibroblasten anregt. Petrova et al. (2004) beschrieben darüber hinaus, dass die PDGF-B/PDGFR- β -Signaltransduktion ursächlich für die Rekrutierung muraler Zellen um Lymphgefäße im Hereditärem Lymphödem-Distichiasis-Syndrom (LD-Syndrom) ist. Sie zeigten, dass Lymphgefäße mit einem Besatz muraler Zellen eine Überexpression von PDGF-B aufweisen (Petrova et al., 2004). In Übereinstimmung damit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Lungenlymphendothelzellen Bleomycin-behandelter Mäuse ebenfalls eine signifikant höhere PDGF-B-mRNA-Expression aufweisen (Abb. 4.15). Darüber hinaus ließ sich PDGF-B in situ direkt auf den Lymphgefäßen in Lungen fibrotischer Mäuse lokalisieren, während die Lymphgefäße in Lungen gesunder Mäuse kaum PDGF-B aufwiesen (Abb. 4.16 A). Unter physiologischen Bedingungen migrieren PDGFR- β -positive murale Zellen entlang PDGF-B-exprimierender Endothelzellen und sorgen somit für die Reifung der Blutgefäße (Hellström et al., 1999; Lindahl et al., 1997). Passend dazu wiesen die muralen Zellen, welche die Lymphgefäße Bleomycin-behandelter Mauslungen umgeben, sowohl ein PDGFR- β - als auch ein phosphoPDGFR- β -positives Signal auf (Abb. 4.16 B, Abb. 4.18), was für eine erhöhte Rezeptoraktivierung spricht. Darüber hinaus konnte in den fibrotischen

Mauslungen eine erhöhte Phosphorylierung des Rezeptors nachgewiesen werden (Abb. 4.17).

Anschließend wurde der PDGF-B/PDGFR- β -Signalweg durch die Gabe des Tyrosinkinase-Inhibitors AG-1296 gehemmt und die Auswirkungen auf die Entwicklung der Lungenfibrose untersucht. Obwohl mögliche *Off-target-Effekte* von Tyrosinkinase-Inhibitoren Gegenstand einer kontrovers geführten Debatte sind, gilt AG-1296 als ein spezifischer Inhibitor für PDGFR- β mit minimalen *Off-target-Effekten* auf das Kinom, also der Summe aller Kinasen einer Zelle (Levitcki und Mishani, 2006). Infolge der Gabe von AG-1296 zeigten die Mauslungen eine Reduktion des fibrotischen Umbaus (Abb. 4.19). Darüber hinaus führte die PDGFR- β -Inhibition zu einer verminderten Anzahl an Lymphgefäßen, die eine Ansammlung muraler Zellen aufweisen (Abb. 4.20). Passend dazu kam es zu einer Reduktion der PDGFR- β -Aktivierung in Lymphgefäß-assoziierten muralen Zellen (Abb. 4.21). Es wurde bereits beschrieben, dass die Inhibition des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges zu einer milderer Ausprägung einer Lungenfibrose führt (Aono et al., 2005; Daniels et al., 2004, Rice et al., 1999). Doch diese Arbeitsgruppen vermuten dahinter einen direkten Effekt von PDGFR- β auf die Proliferation von Fibroblasten. Aono et al. (2005) sowie Daniels et al. (2004) nutzten den Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib zur Hemmung des PDGF-Rezeptors und stellten fest, dass es zu einer verminderten Proliferation der Fibroblasten und somit zu einer schwächeren Ausprägung der Fibrose kommt. Rice et al. (1999) nutzten in einem Rattenmodell für Lungenfibrose ebenfalls AG-1296 zur Hemmung der PDGF-B/PDGFR- β -Signalübertragung. Auch sie vermuten, dass die Inhibition von PDGFR- β zu einer Reduktion der Fibroblastenproliferation sowie des Kollagens im Lungengewebe führt. Die Resultate der vorliegenden Arbeit lassen jedoch ferner die Vermutung zu, dass eine übermäßige PDGF-B-Expression der Lymphendothelzellen die Rekrutierung PDGFR- β -positiver muraler Zellen initiiert und somit zu einer Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße in der IPF führt.

Darüber hinaus weisen die Daten darauf hin, dass es sich bei der Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße um ein frühes Ereignis bei der Entstehung einer Lungenfibrose handelt. Während es an Tag 11 nach Beginn der Bleomycinbehandlung bereits zu einer Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße kam, konnte gleichzeitig noch kein fibrotischer Umbau des Lungengewebes beobachtet

werden. Die konstante Gabe von AG-1296 ab Tag 14 konnte die Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße um bis zu 50% reduzieren, wie histologische Proben an Tag 28 zeigen (Abb. 4.20). Aono et al. (2005) und Daniels et al. (2004) hingegen beobachten nur einen positiven Effekt, wenn eine Hemmung der PDGF-B/PDGFR- β -Signalübertragung durch Imatinib bereits zu Beginn der Induktion der Fibrose erzielt wird. Das Ausbleiben eines positiven Effekts nach späterer Gabe des Imatinib könnte sich mit einer unterschiedlichen Spezifität der Inhibitoren erklären lassen.

Eine kürzlich veröffentlichte klinische Studie konnte zudem zeigen, dass die Hemmung verschiedener Tyrosinkinase-Rezeptoren, unter anderem PDGFR- β , die Symptome einer IPF mildern und die Lebensqualität der Patienten signifikant verbessern kann (Richeldi et al., 2011). Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mechanismen, aufgrund derer die Hemmung des PDGFR- β zu einer Reduktion der Lungenfibrose führen kann, konnte in der vorliegenden Arbeit ein weiterer Mechanismus identifiziert werden, der die Entstehung einer Lungenfibrose begünstigt und der durch die Inhibition der PDGF-B/PDGFR- β -Signalübertragung gehemmt werden kann.

Wie bereits beschrieben, ist die Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit von Lymphgefäßen ihre permeable Struktur. Die Rekrutierung muraler Zellen um Lymphgefäße kann zu einem Permeabilitätsverlust und somit zu einer Störung ihrer Funktion führen. Wie die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, kam es in den Mauslungen mit zunehmender Schwere der Fibrose zu einer ansteigenden perilymphatischen und interstitiellen Akkumulation von Albumin (Abb. 4.22) und HA (Abb. 4.23). Da beide Moleküle unter physiologischen Bedingungen mit der Lymphflüssigkeit abtransportiert werden (Aukland und Reed, 1993; Reed et al., 1990), weist die Ansammlung von Albumin und HA im Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse auf einen Funktionsverlust der Lymphgefäße infolge ihrer Remodellierung hin. Die Vermutung, dass der Besatz von Lymphgefäßen mit muralen Zellen zu einem Funktionsverlust führt, wird durch eine Studie von Petrova et al. (2004) unterstützt. Sie zeigten in Gewebe von LD-Patienten, dass die Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße zum Verlust ihrer Transportkapazität, mit folgender Akkumulation von Lymphflüssigkeit im Gewebe, führt.

Die Akkumulation von Albumin und HA in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse könnte eine mögliche Ursache für die Entstehung fibrotischer Läsionen darstellen. Sowohl Albumin als auch HA wurde in der Vergangenheit profibrotische Wirkung zugeschrieben. So löst die Albumin-gebundene LPA die Migration von Kollagen produzierenden Fibroblasten aus (Tager et al., 2008). HA ihrerseits unterstützt die Proliferation, Migration und Differenzierung von Fibroblasten (Meran et al., 2007; Meran et al., 2008). Analog zu der Akkumulation von LPA und HA kam es in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse mit voranschreitender Lungenfibrose zu einer zunehmenden perilymphatischen Akkumulation der Fibroblasten (Abb. 4.24). Somit stehen diese Resultate im Einklang mit zahlreichen Forschungsarbeiten, die darstellen konnten, dass eine chronische Lymphstase in der Haut mit einer erhöhten Anzahl an Fibroblasten und einer abnormalen Kollagendisposition einhergeht (Piller, 1980; Piller 1990; Rockson, 2001; Ryan und deBerker, 1995; Schirger et al., 1962). Mäkinen et al. (2001) wiesen darüber hinaus nach, dass es in muriner Haut infolge einer Störung des Abtransports von Lymphflüssigkeit zu einer Bildung fibrotischer Areale kommt und unterstützen unsere Theorie, dass die perilymphatische Ansammlung fibrogener Stoffe den fibrotischen Umbau des Gewebes initiiert.

Die pharmakologische Hemmung von PDGFR- β führte in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse nicht nur zu einer Reduktion von Albumin und HA (Abb. 4.22, 4.23, 4.25), sondern auch zu einem signifikanten Rückgang der Fibroblasten (Abb. 4.24). In Übereinstimmung mit diesen Daten beschreiben vorangegangene Studien, dass die Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges die Fibroblastenproliferation und -migration verhindern und somit die Ausprägung der Fibrose abmildern konnte (Aono et al., 2005; Daniels et al., 2004). Diese Resultate untermauern die Hypothese, dass eine PDGF-B/PDGFR- β -vermittelte Signalübertragung zwischen Lymphendothelzellen und muralen Zellen zu einem Funktionsverlust der Lymphgefäße führt und somit ursächlich für die Ansammlung von Bestandteilen der Lymphflüssigkeit im perilymphatischem Gewebe ist.

Um zu untersuchen, ob die Rekrutierung muraler Zellen direkt mit einem Funktionsverlust der Lymphgefäße assoziiert werden kann, wurde die Transportkapazität der pulmonalen Lymphgefäße mit einem 488-Dextran-Assay bestimmt (Abb. 4.31). Die Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse zeigten eine deutliche perilymphatische Akkumulation des 488-Dextran und es konnte kein

Abtransport des Farbstoffes mit der Lymphflüssigkeit zu den prätrachealen Lymphknoten beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wiesen sowohl die Lungen gesunder als auch PDGFR- β -Inhibitor-behandelter Mäuse einen Abtransport des 488-Dextran aus dem Gewebe hin zu den prätrachealen Lymphknoten auf und unterstützen somit die Hypothese, dass die perilymphatische Ansammlung von HA, Albumin und Fibroblasten auf einen gestörten Lymphabfluss infolge der Ansammlung muraler Zellen um pulmonale Lymphgefäße zurückzuführen ist.

Eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße könnte, neben einer gestörten Transportkapazität der Lymphgefäße, eine alternative Erklärung für die Akkumulation von HA und Albumin im interstitiellen Gewebe Bleomycin-behandelter Mäuse darstellen. Es besteht die Möglichkeit, dass es infolge der Bleomycin-Behandlung zu einer erhöhten Permeabilität der Blutgefäße und somit zu einem verstärkten Austritt von Makromolekülen aus den Blutgefäßen kommt, was eine vermehrte Ansammlung dieser Moleküle im Gewebe zur Folge hätte. Da Blutgefäße in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse jedoch keine erhöhte Permeabilität aufwiesen (Abb. 4.32), kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass ein gestörter Lymphabfluss und nicht eine erhöhte Permeabilität der Blutgefäße zu einer Akkumulation der Lymphflüssigkeit im Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse führt.

Dass HA einen wichtigen profibrotischen Faktor während einer IPF darstellt, wurde bereits beschrieben (Meran et al., 2007; Meran et al., 2008). Lungenflüssigkeit, die von IPF-Patienten durch eine bronchoalveoläre Lavage („Lungenspülung“) gewonnen wurde, wies erhöhte HA-Level auf (Bjerner et al., 1989) und bestärkt somit die klinische Relevanz von HA im Rahmen einer IPF. HA verfügt über die Transmembranrezeptoren Lyve1 und CD44 (Culty et al., 1992; Prevo et al., 2001), deren Rolle bei der Entstehung einer Lungenfibrose bislang jedoch unklar ist und deshalb genauer untersucht wurde. Lyve1, welcher auf der Oberfläche von Lymphendothelzellen exprimiert wird, kann HA binden, in das Lymphgefäßlumen internalisieren und so für den Abtransport von HA aus dem Gewebe verantwortlich sein (Prevo et al., 2001). Unbehandelte Lyve1-defiziente Mäuse zeigen allerdings keine erhöhten HA-Gehalte im Gewebe (Gale et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit jedoch führte die Neutralisierung von Lyve1 durch die Gabe eines Lyve1-Antikörpers (Lyve1-AB) in Bleomycin-behandelten Mäusen zu einer signifikant erhöhten HA-Menge im Blutplasma (Abb. 4.26 A), was vermuten lässt, dass Lyve1 im Rahmen

einer Lungenfibrose eine Rolle beim Abtransport von HA aus dem Lungengewebe spielt. Passend dazu kam es infolge der Neutralisierung von Lyve1 in fibrotischen Lungen zu einem Anstieg der Fibroblasten (Abb. 4.27 C) und einer Zunahme der fibrotischen Areale (Abb. 4.27 A, B). Diese Resultate unterstützen unsere Theorie, dass die Akkumulation von HA im Lungengewebe ursächlich für die Bildung fibrotischer Areale ist und lassen vermuten, dass der Abtransport von HA aus fibrotischem Lungengewebe Lyve1-abhängig ist. Überraschend hingegen war, dass der HA-Gehalt in den fibrotischen Mauslungen infolge der Lyve1-Neutralisierung zwar einen signifikanten Anstieg gegenüber den unbehandelten Kontrolllungen, nicht aber gegenüber den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse zeigte (Abb. 4.26 B). Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen erfolgte diese Messung zum Ende des Versuches, als die Störung des Lymphabflusses durch die Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse schon ausgeprägt und der Abtransport von HA nicht mehr möglich war. Möglicherweise sammelte sich also bereits in den Lungen der Bleomycin-behandelten Mäuse die maximale Menge an HA im Gewebe, so dass die zusätzliche Neutralisierung von Lyve1 dies nicht weiter verstärken konnte. Die zweite Erklärung beruht darauf, dass die Bestimmung der HA-Gehalte auf einem HA-bindenden Protein-abhängigen Assay basiert, der keine Detektion von HA-Fragmenten mit geringerer molekularer Masse zulässt. Gerade diese kurzen HA-Fragmente akkumulieren jedoch im Zuge einer Entzündung (McKee et al., 1996). Demnach ist es möglich, dass die Neutralisierung von Lyve1 während einer Lungenfibrose zwar zu einer Akkumulation dieser kurzen HA-Fragmente führt, diese jedoch mit Hilfe unserer Methoden nicht nachgewiesen werden kann.

Ein weiterer Transmembranrezeptor, CD44, wird unter anderem auf hämatopoetischen Zellen (z.B. Makrophagen) exprimiert und ist weniger an dem Abtransport als am intrazellulärem Abbau von HA beteiligt (Culty et al., 1992). Um die Rolle von CD44 bei der Entstehung einer IPF untersuchen zu können, wurde den Versuchsmäusen nach einer Ganzkörperbestrahlung und vor Beginn der Bleomycin-Behandlung Knochenmark CD44-defizienter Mäuse transplantiert (CD44-/-BM Bleo). Kontrollen erhielten Knochenmark der entsprechenden WT-Mäuse (WT-BM Bleo). Die Lungen der WT-BM Bleo-Mäuse zeigten einen signifikant höheren Gesamt-HA-Gehalt, verglichen mit CD44-defizienten Bleomycin-behandelten Mäusen (Abb. 4.26

B). Darüber hinaus konnte jedoch kein Unterschied in der Ausprägung der Fibrose zwischen CD44-defizienten und WT-Mäusen beobachtet werden (Abb. 4.30), so dass davon ausgegangen werden kann, dass CD44 keine maßgebliche Rolle an der Beseitigung von HA aus fibrotischem Gewebe spielt. Lauer et al. (2008) vermuten, dass CD44 vielmehr für die Rekrutierung inflammatorischer Zellen in HA-reiche Gewebe verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die sogenannten „Hyaluron-Cables“, einzigartige faserähnliche Strukturen, die unter anderem glatten Muskelzellen der Atemwege entstammen können, für die CD44-vermittelte Infiltration inflammatorischer Zellen ins Gewebe verantwortlich sind (deLaMotte et al., 2003; Lauer et al., 2009). Darüber hinaus tragen diese kurzen HA-Fragmente via CD44 zu einer Aktivierung der Makrophagen bei (McKee et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit kam es infolge der Bleomycin-Behandlung in murinen Lungen zu einer deutlichen Akkumulation CD44-positiver Makrophagen in den fibrotischen Arealen (Abb. 4.28), was mit der These von Lauer et al. (2008, 2009), dass CD44-positive Makrophagen in HA-reiches, fibrotisches Gewebe einwandern, übereinstimmt. Darüber hinaus wiesen die Lungen der CD44-defizienten Mäuse signifikant reduzierte HA-Spiegel (Abb. 4.26 B) sowie eine geringere Anzahl an Fibroblasten (Abb. 4.29) auf. Es ist demnach denkbar, dass CD44 auf Makrophagen nicht nur dazu führt, dass Makrophagen in fibrotisches, HA-reiches Gewebe einwandern, sondern dort wiederum Zytokine und Wachstumsfaktoren wie PDGF (Kovacs et al., 1994; Morisaki et al., 1992) und Interleukin-1 sezernieren, somit die HA-Synthese weiter aktivieren und die vermehrte Rekrutierung und Aktivierung von Fibroblasten unterstützen (Lindroos et al., 1997).

Insgesamt sprechen diese Daten für unterschiedliche Rollen von Lyve1 und CD44 im Rahmen einer Lungenfibrose. Während Lyve1 wahrscheinlich direkt am Abtransport von HA aus dem Lungengewebe Bleomycin-behandelter Mäuse involviert ist, und somit im Rahmen einer Lungenfibrose zur Erhaltung der Gewebemöostase beiträgt, spielt CD44 vermutlich eine tragende Rolle in der Regulation der HA-Synthese und der Rekrutierung der Makrophagen in HA-reiche Gewebe.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit die Ansammlung muraler Zellen um pulmonale Lymphgefäße als ein pathogenetisches Merkmal der IPF identifiziert werden. Diese Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße tritt früh in der Entstehung einer Lungenfibrose auf, ist PDGF-B/PDGFR- β -abhängig und führt zu

einem Funktionsverlust der Lymphgefäße. Infolge der gestörten Drainagekapazität der Lymphgefäße kommt es zu einer perilymphatischen Akkumulation fibrogener Moleküle und schließlich zur perilymphatischen Bildung fibrotischer Areale.

5.2 Einfluss der Hämangiogenese auf die Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen

Die Entstehung einer Leberfibrose ist mit der Neubildung von Blutgefäßen und einer Remodellierung der Lebersinusoide assoziiert. Die Auswirkungen beider Prozesse auf die Leberfibrose werden jedoch kontrovers diskutiert (Jackson et al., 1997; Kalluri und Sukhatme, 2000; Park et al., 1998; Taura et al., 2008). Einer der wichtigsten Faktoren der physiologischen sowie der pathologischen Hämangiogenese ist der Angiogenesefaktor VEGF-A (VEGF) (Leung et al., 1989). Die Zellen der myeloischen Reihe, vor allem Makrophagen, welche im Zuge einer Organfibrose im Gewebe akkumulieren (Leibovich und Ross, 1975), stellen eine essentielle Quelle von VEGF dar (Berse et al., 1992; Dirx et al., 2006). In einem Mausmodell für Lungenfibrose konnte gezeigt werden, dass die Myeloidzell-spezifische Expression von VEGF einen maßgeblichen Einfluss auf die Hämangiogenese und folgend auf die Ausprägung einer Fibrose besitzt (Stockmann et al., 2010). Im Rahmen der Entstehung und vor allem der Rückbildung einer Leberfibrose gibt es bislang keine Kenntnisse über die Rolle der Hämangiogenese in Abhängigkeit von myeloidem VEGF. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Myeloidzell-spezifischen VEGF bei der Hämangiogenese und deren Effekt auf die Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose untersucht (Abb. 4.35).

Ein charakteristisches Merkmal der Leberfibrose ist die übermäßige Akkumulation von Kollagen im Gewebe. Infolge der Induktion der Leberfibrose wiesen die Lebern der WT- und KO-Mäuse in der vorliegenden Arbeit ähnlich stark ausgeprägte kollagenreiche Areale vorwiegend im Bereich der Periportalfelder und der Zentralvenen auf (Abb. 4.36, 4.37). Die Gesamt-VEGF-Expression zeigte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls keinen genotypspezifischen Unterschied (Abb. 4.40), so dass angenommen werden kann, dass VEGF aus myeloischen Zellen keinen maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung einer Leberfibrose besitzt. Im Verlauf der

vierwöchigen Rückbildungsphase kam es in den Lebern der WT-Mäuse zu einer beinahe vollständigen Regression der Leberfibrose. Die Lebern der KO-Mäuse wiesen jedoch keine Rückbildung der Fibrose, sondern unverändert stark ausgeprägte kollagenreiche Areale auf (Abb. 4.36, 4.37). Gleichzeitig zeigten die Lebern der WT-Mäuse nach der Rückbildungsphase einen signifikanten Anstieg der Gesamt-VEGF-Expression, während die Gesamt-VEGF-Expression in den Lebern der KO-Tiere gering blieb (Abb. 4.40). Die beschriebenen Daten lassen die Theorie zu, dass VEGF aus myeloischen Zellen während der Rückbildung einer Leberfibrose eine wichtige Quelle des Gesamt-VEGF-A darstellt und für die Regression einer Leberfibrose benötigt wird. Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Forschungsarbeiten, die aufweisen konnten, dass VEGF ursächlich für die Entstehung einer Fibrose ist (Yoshiji et al., 2003) und die Hemmung von VEGF zu einer schwächeren Ausprägung einer Leberfibrose führt (Tugues et al., 2007; Taura et al., 2008). Andererseits beschreiben Kang et al. (2001), dass eine zusätzliche Gabe von VEGF die Ausprägung einer Nierenfibrose abschwächt. Darüber hinaus zeigten Stockmann et al. (2010), dass der Verlust von speziell Myeloidzell-spezifischem VEGF die Entwicklung einer Lungenfibrose drastisch beschleunigt. Diese Arbeiten unterstreichen die Rolle von VEGF im Allgemeinen und myeloidem VEGF im Speziellen als antifibrotisch-wirkenden Faktor.

Neben der Bildung großer Mengen an Kollagen kommt es im Rahmen einer Leberfibrose zu einer Ansammlung Narben-assoziiierter Makrophagen (Friedmann, 2005). Auch die Daten der vorliegenden Arbeit belegen, dass es infolge der Induktion der Leberfibrose in den Lebern beider Genotypen zu einer signifikanten Zunahme in der Anzahl der Makrophagen kam (Abb. 4.38). Die Lebern der KO-Mäuse zeigten dabei eine leicht stärkere Zunahme der Makrophagen in fibrotischen Arealen, verglichen mit den Lebern der WT-Mäuse. Möglicherweise handelt es sich bei der vermehrten Akkumulation von Makrophagen um einen Kompensationsmechanismus der fibrotischen Lebern der KO-Mäuse, der wie folgt aussehen könnte. Da Makrophagen eine wichtige Quelle von VEGF darstellen (Jeon et al., 2008; Kataru et al., 2009; Kim et al., 2009), kommt es während der Entstehung der Leberfibrose zunächst zu einer vermehrten Rekrutierung von Makrophagen, um eine Bereitstellung von VEGF für die Regeneration der Leber zu gewährleisten. Da die Makrophagen der KO-Mäuse kein VEGF exprimieren und die Regeneration der

Leber ausbleibt, kommt es dann möglicherweise zu einer verstärkten Rekrutierung der Makrophagen, um den Mangel an VEGF zu kompensieren.

Die Hämangiogenese stellt ein weiteres zentrales Charakteristikum der Leberfibrose dar. Über die Rolle der Hämangiogenese im Zusammenhang mit einer Leberfibrose existiert trotz einer Vielzahl an Forschungsarbeiten dennoch keine einheitliche Meinung. Einerseits konnte gezeigt werden, dass es infolge der Hemmung verschiedener Angiogenesefaktoren zu einer Reduktion der Gefäßdichte, des inflammatorischen Infiltrats sowie der ECM-Deposition kommt, was die Ausbildung einer Fibrose vermindert (Tugues et al., 2007; Taura et al., 2008). Andererseits wurde gezeigt, dass die Inhibition der Hämangiogenese zu einer Verstärkung der Fibrose führt (Patsenker et al., 2009). Die Kontroversität dieser Publikationen spiegelt sich auch in den Daten der vorliegenden Arbeit wieder. Während sich die kollagenreichen Areale im Zuge der Leberfibrose genotypunabhängig ausbreiteten, stieg die Anzahl der Sinusoide in den Lebern der WT-Mäuse signifikant stärker als in den Lebern der KO-Mäuse (Abb. 4.37, 4.41 A). Infolge der Rückbildungsphase wiederum stieg die Anzahl der Sinusoide in den KO-Lebern weiter signifikant, während die kollagenreichen Areale in den KO-Lebern unverändert blieben (Abb. 4.37, 4.41 A). Anhand dieser Daten kann kein kausaler Zusammenhang zwischen der Gefäßdichte in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen und der Entstehung beziehungsweise Rückbildung einer Leberfibrose hergestellt werden.

Neben der Gefäßdichte wurde auch die Distribution der Sinusoide in den Lebern der WT- und KO-Mäuse untersucht. Unter physiologischen Bedingungen sind die Lebersinusoide innerhalb eines Leberläppchens radiär auf die in der Achse liegende Zentralvene hin angeordnet (Stevens und Lowe, 1997). Infolge der Induktion der Leberfibrose zeigten die Lebern beider Genotypen eine perifibrotische Akkumulation sinusoidaler ECs. Die fibrotischen Läsionen, die weitestgehend in den Bereichen der Periportalfelder, aber auch perizentral zu finden waren, wiesen eine Rarifizierung sinusoidaler ECs auf (Abb. 4.41 B). Nach der Rückbildungsphase ließen die Lebern der WT-Mäuse, neben einer Regression der fibrotischen Areale, wieder eine homogene Verteilung der Lebersinusoide erkennen. In den Lebern der KO-Mäuse ließen sich jedoch auch nach der Rückbildungsphase keine Sinusoide innerhalb der weiterhin bestehenden fibrotischen Areale nachweisen (Abb. 4.41 B). Diese atypische Distribution der Sinusoide in Lebern der KO-Mäuse infolge der

Rückbildungsphase weist darauf hin, dass eine Infiltration fibrotischer Areale der Leber durch Blutgefäße abhängig von myeloidem VEGF ist und die Bildung neuer Lebersinusoide innerhalb fibrotischer Areale eine Voraussetzung für die Regression der Fibrose darstellt. Warum Blutgefäße bei der Rückbildung fibrotischen Gewebes eine Rolle spielen könnten, erschließt sich aus ihrer physiologischen Funktion. Einerseits infiltrieren Blutgefäße Gewebe, um es mit Sauerstoff, Nährstoffen, Signalmolekülen sowie Immunzellen zu versorgen, und somit die Gewebemöostase zu erhalten (Carmeliet und Jain, 2011). Darüber hinaus sezernieren ECs parakrine Wachstumsfaktoren (*Angiocrine Signaling*), die die Regeneration von Lebergewebe fördern (Ding et al., 2010). Die vorliegenden Daten erlauben demnach die Annahme, dass VEGF aus myeloischen Zellen im Rahmen einer Leberfibrose weniger die Gefäßdichte als vielmehr die Redistribution der Blutgefäße beeinflusst und somit die Rückbildung der Leberfibrose unterstützt.

Die vorangehenden Daten deuten darauf hin, dass myeloides VEGF einen maßgeblichen Einfluss auf die Rückbildung, nicht aber auf die Entstehung einer Leberfibrose besitzt. Die laborchemische Bestimmung des Leberschadens anhand der Messung von Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Serum (Miyake, 1979) zeigten während der Entstehung der Fibrose jedoch leicht erhöhte Werte in den fibrotischen Lebern der KO-Mäuse (Abb. 4.39). Während der GPT-Gehalt im Serum der KO-Mäuse infolge der Rückbildungsphase sank, blieb der GOT-Wert weiterhin leicht erhöht. Die Erhöhung der Leberwerte war zwar nicht signifikant, könnte aber dennoch darauf hinweisen, dass während der Fibroseentstehung, trotz genotypunabhängiger Ausprägung der Fibrose, ein irreversibler Schaden der Hepatozyten entstanden ist, der sich in den von uns untersuchten Parametern nicht wiederfindet. Somit ist es möglich, dass nicht die Abwesenheit von Myeloidzell-spezifischem VEGF während der Regression der Fibrose, sondern ein irreversibler Leberschaden, der während der Induktion der Fibrose auftrat, der Grund dafür ist, dass die Leberfibrose in KO-Mäusen nicht zurückgebildet wird.

Um deshalb die Rolle des myeloiden VEGF bei der Rückbildung der Fibrose isoliert untersuchen zu können (Abb. 3.2), wurde KO-Mäusen nach der Induktion der Fibrose und infolge einer Ganzkörperbestrahlung, jedoch vor Beginn der Rückbildungsphase, Knochenmark (BM) von WT-Mäusen (KO/WT) transplantiert.

Durch diesen *Genotypenwechsel* erlangten die KO-Mäuse zu Beginn der Rückbildungsphase die Fähigkeit zurück, Myeloidzell-spezifisches VEGF zu exprimieren. WT-Mäusen hingegen wurde zu Beginn der Rückbildungsphase Knochenmark von KO-Mäusen (WT/KO) transplantiert. Mäusen, denen also während der Induktion der Fibrose Myeloidzell-spezifisches VEGF zur Verfügung stand, wurde die Fähigkeit, VEGF aus myeloischen Zellen zu produzieren somit zu Beginn der Rückbildungsphase entzogen. Die Lebern der WT/KO-Mäuse waren infolge des neu induzierten Mangels an Myeloidzell-spezifischem VEGF nicht mehr in der Lage, die Fibrose zurückzubilden. KO/WT-Mäuse hingegen zeigten nach der Wiedereinführung von Myeloidzell-spezifischem VEGF eine Reduktion des Kollagengehaltes in der Leber (Abb. 4.44). Das Ausbleiben der Fibroseregression ist demnach tatsächlich auf die Abwesenheit von Myeloidzell-spezifischem VEGF zurückzuführen. Somit kann angenommen werden, dass kein irreversibler Leberschaden die Fähigkeit zur Rückbildung der Fibrose in den Lebern der KO-Mäuse beeinträchtigt.

Die Gefäßdichte als auch die Distribution der lebersinusoidalen ECs änderten sich ebenfalls analog zum Wechsel der Genotypen. Während die Lebern der KO-Mäuse zuvor eine erhöhte Anzahl der Lebersinusoide aufwiesen, die ECs jedoch die fibrotische Narbe nicht infiltrieren konnten (Abb. 4.41), zeigten die KO/WT-Mäuse nun eine Reduktion in der Anzahl der Lebersinusoide und eine homogene Verteilung der sinusoidalen ECs nach der Rückbildungsphase (Abb. 4.45). Gleichzeitig wiesen die WT/KO-Mäuse nach dem Entzug des Myeloidzell-spezifischen VEGF eine beständig hohe Zahl an perifibrotisch akkumulierenden sinusoidalen ECs auf, welche die fibrotischen Areale nicht infiltrierten (Abb. 4.45). Aufgrund dieser Resultate kann davon ausgegangen werden, dass VEGF aus myeloischen Zellen, welche in fibrotischen Arealen akkumulieren, die Infiltration sinusoidaler ECs in fibrotische Bereiche initiiert und somit die Regression der Fibrose zur Folge hat.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass die Voraussetzung für die Regression einer Leberfibrose eine VEGF-abhängige Neubildung von Lebersinusoiden innerhalb fibrotischer Areale darstellt. Der zugrunde liegende Mechanismus verbleibt bislang unklar. Hämangiogenese basiert auf der Migration von Endothelzellen in das umliegende Gewebe. Eine Voraussetzung für die Infiltration von ECs in verschiedenste Gewebe ist eine kontrollierte Fragmentation der ECM (Kleiner und Stretler-Stevenson, 1993; Nagase et al., 2006; Rundhaug,

2005). Um einen teilweisen Abbau der ECM zu gewährleisten, exprimieren Endothelzellen MMPs, die infolge ihrer Aktivierung ECM-Bestandteile degradieren und somit die Neubildung von Blutgefäßen in umliegendes Gewebe ermöglichen (Cornelius et al., 1995; Newby, 2008). Es ist denkbar, dass eine VEGF-abhängige MMP-Expression der sinusoidalen ECs die Infiltration fibrotischer Areale durch ECs ermöglicht und so die Regression der Fibrose unterstützt. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Genexpression von MMP2, -9, -13, -14 und -15 in Lebern der WT- und KO-Mäuse (Abb. 4.42) sowie in isolierten Endothelzellen aus WT/KO- und KO/WT-Mäusen untersucht (Abb. 4.46). Die untersuchten MMPs sind auf unterschiedliche Weise an der Neubildung von Blutgefäßen beteiligt. MMP2, MMP9, MMP13 und MMP15 unterstützen die Hämangiogenese maßgeblich durch die Fragmentierung der ECM (Itoh et al., 1998; Lambert et al., 2003; Olle et al., 2006; Shi und Sottile, 2011; Vu et al., 1998), während MMP14 darüber hinaus direkt mit der Migration von ECs, sowie der *Tube formation* und der Maturation von Blutgefäßen durch die Rekrutierung muraler Zellen in Verbindung gebracht wird (Galvez et al., 2001; Lehti et al., 2005; Robinet et al., 2005).

Während die Genexpression von MMP2 und MMP9 in Lebern der WT- und KO-Mäuse unabhängig von Myeloidzell-spezifischem VEGF war, und nur MMP14 unter Anwesenheit von VEGF eine höhere Expression aufwies (Abb. 4.42 A, B, C), kam es in den isolierten ECs infolge der Wiedereinführung von Myeloidzell-spezifischem VEGF zu einer erhöhten Expression aller drei Matrixmetalloproteasen (Abb. 4.46 A, B, C). Diese Daten zeigen, dass Leberendothelzellen während der Rückbildung einer Fibrose eine VEGF-abhängige MMP-Expression aufweisen. Bislang wurden MMPs im Zusammenhang mit einer Leberfibrose vor allem wegen ihrer kollagendegradierenden Eigenschaften untersucht (Hemmann et al., 2007). DeMeijer et al. (2010) zeigten zudem, dass die Hemmung der MMP-Aktivität zu einer stärker ausgeprägten Leberfibrose führt. Es wird deshalb postuliert, dass MMPs durch den Abbau von Kollagen zur Rückbildung der Fibrose beitragen können (Iredale et al., 1998; Issa et al., 2004). Die Daten der vorliegenden Arbeit erlauben darüber hinaus die Hypothese, dass eine parakrine VEGF-Expression der myeloischen Zellen zu einer erhöhten MMP-Expression durch sinusoidale Endothelzellen führt, was wiederum die Neubildung von Lebersinusoiden innerhalb fibrotischer Areale ermöglicht und zu einer Regression der Leberfibrose führt.

Ferner wurde beschrieben, dass auch MMP15 von ECs in Abhängigkeit von VEGF exprimiert und mit der Neubildung von Blutgefäßen assoziiert wird (Chen et al., 2010; Ratel et al., 2007; Visse und Nagase, 2003). Die vorliegende Arbeit lässt jedoch keinen Zusammenhang zwischen Myeloidzell-spezifischem VEGF, der Rückbildung der Leberfibrose und der Expression von MMP15 zu. Während die Lebern der WT-Mäuse eine durchgehend signifikant erhöhte MMP15-Expression aufwiesen (Abb. 4.42 E), exprimierten weder ECs der WT/KO- noch der KO/WT-Mäuse MMP15 (Abb. 4.46 D). Dieses unerwartete MMP15-Expressionsmuster könnte mit der Komplexität der Faktoren, welche die MMP-Expression bedingen, erklärt werden. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren, die den Einfluss des VEGF überwiegen könnten (Fini et al., 1998).

MMP13 wiederum zeigte in der Leber unter Abwesenheit von Myeloidzell-spezifischem VEGF eine Reduktion der Genexpression infolge der Rückbildungsphase (Abb. 4.42 C). Da MMP13 hauptsächlich von Makrophagen exprimiert wird (Fallowfield et al., 2007), könnte die VEGF-abhängige MMP13-Expression mit einer autokrinen Wirkung der VEGF-Expression der Makrophagen erklärt werden. Somit könnten neben Endothelzellen auch Makrophagen durch die Expression von MMPs einen Einfluss auf die Hämangiogenese und folgend auf die Rückbildung einer Leberfibrose besitzen. Die Expressionsanalyse Makrophagen-assoziiertes MMPs in isolierten Makrophagen können hier zukünftig Klarheit schaffen.

Neutralisiert werden aktive MMPs durch TIMPs, indem diese einen 1:1-Komplex mit den MMPs bilden. Somit verhindern TIMPs unter physiologischen Bedingungen eine überschießende Degradation der ECM und erhalten die Struktur des Gewebes (Gomez et al., 1997). Ein Ungleichgewicht von MMPs und TIMPs wird mit einer Vielzahl von Erkrankungen, unter anderem auch Gewebsfibrosen, in Verbindung gebracht (Amalinei et al., 2010). Im Zuge einer Leberfibrose kann es zu einer verminderten MMP- und einer erhöhten TIMP-Expression kommen, was den Abbau von ECM-Bestandteilen verhindert und die Entstehung fibrotischer Areale begünstigt (Iimuro und Brenner, 2007; Zhou et al., 2007). Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen unter Abwesenheit von VEGF allerdings keine Überexpression von TIMP2 bei einer gleichzeitig verminderten Expression der MMPs (Abb. 4.42 F, 4.46 E). Somit kann nicht davon ausgegangen werden, dass eine verstärkte Neutralisierung der

MMPs durch eine erhöhte TIMP-Expression unter Abwesenheit von VEGF ursächlich für das Ausbleiben der Fibroserückbildung ist.

Intrazellulär werden MMPs als inaktive Zymogene (Pro-Enzyme) synthetisiert und erst im Anschluss proteolytisch oder autokatalytisch aktiviert (Kleiner und Stretler-Stevenson, 1993; Nagase et al., 2006). Da das Expressionsmuster der MMPs demnach nicht gleichbedeutend mit deren Aktivität ist, wurde die MMP-Aktivität im Folgenden in den Lebern der WT- und KO-Mäuse während der Induktion und Auflösung der Fibrose, sowie in Lebern der KO/WT- und WT/KO-Mäusen, ermittelt. Während der Induktion der Leberfibrose blieb die MMP-Aktivität in den Lebern beider Genotypen unverändert verglichen mit den Lebern unbehandelter Mäuse (Abb. 4.43 A, B). Infolge der Rückbildungsphase kam es in den Lebern der WT-Mäuse zu einem Anstieg der MMP-Aktivität, während die MMP-Aktivität in den Lebern der KO-Mäuse auf einem konstant niedrigen Niveau blieb (Abb. 4.43 A, B). Darüber hinaus zeigten die Lebern der KO/WT-Mäuse, nach der Wiedereinführung von VEGF aus myeloischen Zellen, ebenfalls einen signifikanten Anstieg in der MMP-Aktivität (Abb. 4.47 A, B). Die Lebern der WT/KO-Mäuse hingegen wiesen nun eine konstant geringe MMP-Aktivität auf. Infolge des neu induzierten Mangels an Myeloidzell-spezifischem VEGF blieb der Anstieg der MMP-Aktivität während der Rückbildungsphase aus (Abb. 4.47 A, B). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es unter Abwesenheit von VEGF aus myeloischen Zellen während der Phase der Rückbildung nicht nur zu einer verminderten Expression, sondern auch zu einer Verminderung der Aktivität der MMPs kommt. Die Wiedereinführung von Myeloidzell-spezifischem VEGF wiederum führt zu einer Steigerung der MMP-Expression und schließlich zu einer erhöhten MMP-Aktivität.

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass VEGF aus myeloischen Zellen notwendig für die Rückbildung einer Leberfibrose ist. Unter der Anwesenheit von VEGF aus myeloischen Zellen kommt es zunächst zu einer gesteigerten MMP-Expression der Endothelzellen sowie einer erhöhten MMP-Aktivität. Kollagen wird aufgrund der erhöhten MMP-Aktivität degradiert und ECs somit die Migration in fibrotische Areale ermöglicht. Die Neubildung von Lebersinusoiden innerhalb fibrotischer Bereiche führt schließlich zur Regression der Leberfibrose.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Häm- und Lymphangiogenese sowie der Gefäßremodellierung im Rahmen verschiedener Gewebsfibrosen. Es konnte gezeigt werden, dass es in den Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse zu einer Rekrutierung muraler Zellen und dem Vorhandensein einer Basalmembran um Lymphgefäße kommt. Eine Ansammlung muraler Zellen um pulmonale Lymphgefäße konnte darüber hinaus in Lungengewebe von IPF-Patienten beobachtet und somit als pathogenetisches Merkmal einer IPF identifiziert werden. Ferner wurde gezeigt, dass die Rekrutierung muraler Zellen um Lymphgefäße durch einen aktiven PDGF-B/PDGFR- β -Signalweg induziert wird und zu einer Störung der Transportkapazität der pulmonalen Lymphgefäße führt. Die gestörte Drainagefunktion der Lymphgefäße ging mit einer perilymphatischen Akkumulation fibrogener Makromoleküle, wie Albumin und HA, einher und resultierte schließlich in einer übermäßigen Ansammlung von Fibroblasten und der Bildung perilymphatischer fibrotischer Läsionen. Die pharmakologische Hemmung der PDGF-B/PDGFR- β -Signaltransduktion führte zu einer Reduktion der Anzahl an Lymphgefäßen, die einen Besatz muraler Zellen aufwiesen. Darüber hinaus kam es zu einer Wiederherstellung der Transportkapazität pulmonaler Lymphgefäße und einer Reduktion von HA, Albumin und Fibroblasten in den perilymphatischen Bereichen. Anhand dieser Arbeit konnte somit erstmalig eine Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße mit der Entstehung einer IPF in Verbindung gebracht werden.

Im Weiteren wurde die Bedeutung der Hämangiogenese in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen für die Rückbildung einer Leberfibrose untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen der myeloischen Reihe in der Phase der Rückbildung einer Leberfibrose eine maßgebliche Quelle des Gesamt-VEGF darstellen. Die Abwesenheit von Myeloidzell-spezifischem VEGF während der Rückbildungsphase führte zu einer Hemmung der MMP-Expression und -Aktivität in der Leber. Aufgrund der geringen MMP-Aktivität und dem damit verbundenen verminderten Kollagenabbau wurde die Infiltration fibrotischer Areale durch sinusoidale ECs verhindert und somit die Rückbildung der Leberfibrose gehemmt. Die Wiedereinführung von Myeloidzell-spezifischem VEGF durch eine

Knochenmarktransplantation vor der Phase der Rückbildung führte zu einem Anstieg der MMP-Expression durch ECs und zu einer gesteigerten MMP-Aktivität. Die gesteigerte Aktivität der MMPs führte zu einer adequaten Degradierung des Kollagens und ermöglichte so die Migration lebersinusoidaler ECs in fibrotische Bereiche. Schließlich kam es infolge der normalisierten Distribution der Lebersinusoidale zu einer Regression der Leberfibrose. Somit zeigt diese Arbeit erstmalig die Bedeutung myeloischer Zellen als Quelle von VEGF bei der Rückbildung einer Leberfibrose auf. Ferner zeigt die vorliegende Arbeit, dass nicht die Gefäßdichte, sondern die VEGF-abhängige Distribution der Lebersinusoidale eine bedeutende Rolle bei der Regression einer Fibrose spielt. Darüber hinaus konnte die Expression und Aktivität der MMPs, in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen als ein kritischer Faktor für die Infiltration fibrotischer Areale durch ECs identifiziert werden.

7. Literatur

- ABE R, DONNELLY SC, PENG T, BUCALA R, METZ CN (2001). Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol*, **166**, 7556-62
- ADAMSON IY, BOWDEN DH (1974). The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Pathol*, **77**, 185-97
- ALITALO K, TAMMELA T, PETROVA TV (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, **438**, 946-53
- AMĂLINEI C, CĂRUNTU ID, GIUȘCĂ SE, BĂLAN RA (2010). Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol*, **51**, 215-28
- ANDRAE J, GALLINI R, BETSHOLTZ C (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, **22**, 1276-312
- ANTONIADES HN, BRAVO MA, AVILA RE, GALANOPOULOS T, NEVILLE-GOLDEN J, MAXWELL M, SELMAN M (1990). Platelet-derived growth factor in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*, **86**, 1055-64
- AONO Y, NISHIOKA Y, INAYAMA M, UGAI M, KISHI J, UEHARA H, IZUMI K, SONE S (2005). Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, **171**, 1279-85
- ARTHUR MJ (2000). Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **279**, G245-9
- AUKLAND K, REED RK (1993). Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiol Rev*, **73**, 1-78
- BALUK P, FUXE J, HASHIZUME H, ROMANO T, LASHNITS E, BUTZ S, VESTWEBER D, CORADA M, MOLENDINI C, DEJANA E, McDONALD D (2007). Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med*, **204**, 2349-62
- BALUK P, TAMMELA T, ATOR E, LYUBYNKA N, ACHEN MG, HICKLIN DJ, JELTSCH M, PETROVA TV, PYTOWSKI B, STACKER SA, YLÄ-HERTTUALA S, JACKSON DG, ALITALO K, McDONALD DM (2005). Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest*, **115**, 247-57

- BATALLER R, BRENNER DA (2005). Liver fibrosis. *J Clin Invest*, **115**, 209-18
- BEAUDRY P, HIDA Y, UDAGAWA T, ALWAYN IP, GREENE AK, ARSENAULT D, FOLKMAN J, HEYMACH JV, RYEOM S, PUDER M (2007). Endothelial progenitor cells contribute to accelerated liver regeneration. *J Pediatr Surg*, **42**, 1190-8
- BERGSTEN E, UUTELA M, LI X, PIETRAS K, OSTMAN A, HELDIN CH, ALITALO K, ERIKSSON U (2001). PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol*, **3**, 512-6
- BERSE B, BROWN L, VAN DE WATER L, DVORAK H, SENGER D (1992). Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*, **3**, 211-20
- BETSHOLTZ C, KARLSSON L, LINDAHL P (2001). Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays*, **23**, 494-507
- BJERMER L, LUNDGREN R, HÄLLGREN R (1989). Hyaluronan and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, **44**, 126-31
- BRICE G, MANSOUR S, BELL R, COLLIN JR, CHILD AH, BRADY AF, SARFARAZI M, BURNAND KG, JEFFERY S, MORTIMER P, MURDAY VA (2002). Analysis of the phenotypic abnormalities in lymphoedema-distichiasis syndrome in 74 patients with FOXC2 mutations or linkage to 16q24. *J Med Genet*, **39**, 478-83
- BURKHARDT A (1989). Alveolitis and collapse in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis*, **140**, 513-24
- CAO Y, LINDEN P, FARNEBO J, CAO R, ERIKSSON A, KUMAR V, QI JH, CLAEISSON-WELSH L, ALITALO K (1998). Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 14389-94
- CARMELIET P, JAIN RK (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, **473**, 298-307
- CARMELIET P (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, **438**, 932-6
- CARMELIET P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, **6**, 389-95

- CARMELIET P, FERREIRA V, BREIER G, POLLEFEYT S, KIECKENS L, GERTSENSTEIN M, FAHRIG M, VANDENHOECK A, HARPAL K, EBERHARDT C, DECLERCQ C, PAWLING J, MOONS L, COLLEN D, RISAU W, NAGY A (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, **380**, 435-9
- CASLEY-SMITH JR (1980). The fine structure and functioning of tissue channels and lymphatics. *Lymphology*, **13**, 177-83
- CHEN L, DI D, LUO G, ZHENG L, TAN Y, ZHANG X, XU N (2010). Immunochemical staining of MT2-MMP correlates positively to angiogenesis of human esophageal cancer. *Anticancer Res*, **30**, 4363-8
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-9
- CHUA F, GAULDIE J, LAURENT GJ (2005). Pulmonary fibrosis: searching for model answers. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **33**, 9-13
- CLAUSEN BE, BURKHARDT C, REITH W, RENKAWITZ R, FÖRSTER I (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*, **8**, 265-77
- CORNELIUS LA, NEHRING LC, ROBY JD, PARKS WC, WELGUS HG (1995). Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. *J Invest Dermatol*, **105**, 170-6
- CORPECHOT C, BARBU V, WENDUM D, KINNMAN N, REY C, POUPON R, HOUSSET C, ROSMORDUC O (2002). Hypoxia - induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *J Hepatol*, **35**, 1010-21
- COSTABEL U, BONELLA F (2011). Therapie der Lungenfibrose. *Internist*, **52**, 1422-8
- COULON S, HEINDRYCKX F, GEERTS A, VAN STEENKISTE C, COLLE I, VAN VLIERBERGHE H (2010). Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver Int*, **3**, 146-62
- CROSS MJ, DIXELIUS J, MATSUMOTO T, CLAESSION-WELSH L (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*, **28**, 488-94
- CUENI LN, DETMAR M. (2008). The lymphatic system in health and disease. *Lymphat Res Biol*, **6**, 109-22

- CULTY M, NGUYEN HA, UNDERHILL CB (1992). The hyaluronan receptor (CD44) participates in the uptake and degradation of hyaluronan. *J Cell Biol*, **116**, 1055-62
- DAGENAIS SL, HARTSOUGH RL, ERICKSON RP, WITTE MH, BUTLER MG, GLOVER TW (2004). Foxc2 is expressed in developing lymphatic vessels and other tissues associated with lymphedema-distichiasis syndrome. *Gene Expr Patterns*, **4**, 611-9
- DANIELS CE, LASKY JA, LIMPER AH, MIERAS K, GABOR E, SCHROEDER DR (2010). Imatinib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: Randomized placebo-controlled trial results. *Am J Respir Crit Care Med*, **181**, 604-10
- DANIELS CE, WILKES MC, EDENS M, KOTTOM TJ, MURPHY SJ, LIMPER AH, LEOF EB (2004). Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest*, **114**, 1308-16
- DAVIS GL, ALBRIGHT JE, COOK SF, ROSENBERG DM (2003). Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. *Liver Transpl*, **9**, 331-8
- DELAMOTTE CA, HASCALL VC, DRAZBA J, BANDYOPADHYAY SK, STRONG SA (2003). Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol*, **163**, 121-33
- DEMEIJER VE, SVERDLOV DY, POPOV Y, LE HD, MEISEL JA, NOSÉ V, SCHUPPAN D, PUDER M (2010). Broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibition curbs inflammation and liver injury but aggravates experimental liver fibrosis in mice. *PLoS ONE*, **5**, e11256
- DEMEDTS M, BEHR J, BUHL R, COSTABEL U, DEKHUIJZEN R, JANSSEN HM, MACNEE W, THOMEER M, WALLAERT B, LAURENT F, NICHOLSON AG, VERBEKEN EK, VERSCHAKELEN J, FLOWER CD, CAPRON F, PETRUZZELLI S, DE VUYST P, VAN DEN BOSCH JM, RODRIGUEZ-BECERRA E, CORVASCE G, LANKHORST I, SARDINA M, MONTANARI M, IFIGENIA STUDY GROUP (2005). High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, **353**, 2229-42
- DESMOULIÈRE A, CHAPONNIER C, GABBIANI G (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Rep Reg*, **13**, 7-12
- DING BS, NOLAN DJ, BUTLER JM, JAMES D, BABAZADEH AO, ROSENWAKS Z, MITTAL V, KOBAYASHI H, SHIDO K, LYDEN D, SATO TN, RABBANY SY, RAFII S (2010). Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature*, **468**, 310-5

- DIRKX AE, OUDE EGBRINK MG, WAGSTAFF J, GRIFFIOEN AW (2006). Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol*, **80**, 1183-96
- DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) (2011). In: Die Lunge: Funktion und Aufbau, URL: <http://www.krebsinformation.de/tumorarten/lungenkrebs/ueberblick.php> (Stand: 30.05.2011)
- DOMITROVIĆ R, JAKOVAC H, TOMAC J, SAIN I (2009). Liver fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride and its reversion by luteolin. *Toxicol Appl Pharmacol*, **241**, 311-21
- DOUGLASS A, WALLACE K, PARR R, PARK J, DURWARD E, BROADBENT I, BARELLE C, PORTER AJ, WRIGHT MC (2008). Antibody-targeted myofibroblast apoptosis reduces fibrosis during sustained liver injury. *J Hepatol*, **49**, 88-98
- DUFFIELD JS, FORBES SJ, CONSTANDINOUCM, CLAY S, PARTOLINA M, VUTHOORI S, WU S, LANG R, IREDALE JP (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*, **115**, 56-65
- DUFOUR JF, DELELLIS R, KAPLAN MM (1998). Regression of hepatic fibrosis in hepatitis C with long-term interferon treatment. *Dig Dis Sci*, **43**, 2573-6
- DVORAK HF, ORENSTEIN NS, CARVALHO AC, CHURCHILL WH, DVORAK AM, GALLI SJ, FEDER J, BITZER AM, RYPYSC J, GIOVINCO P (1979). Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products. *J Immunol*, **122**, 166-74
- EBINA M, SHIMIZUKAWA M, SHIBATA N, KIMURA Y, SUZUKI T, ENDO M, SASANO H, KONDO T, NUKIWA T (2004). Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **169**, 1203-8
- EBINA M (2008). Remodeling of airway walls in fatal asthmatics decreases lymphatic distribution; beyond thickening of airway smooth muscle layers. *Allergol Int*, **57**, 165-74
- EBINA M, SHIBATA N, OHTA H, HISATA S, TAMADA T, ONO M, OKAYA K, KONDO T, NUKIWA T (2010). The disappearance of subpleural and interlobular lymphatics in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lymphat Res Biol*, **8**, 199-207
- EL-CHEMALY S, MALIDE D, ZUDAIRE E, IKEDA Y, WEINBERG BA, PACHECO-RODRIGUEZ G, ROSAS IO, APARICIO M, REN P, MACDONALD SD, WU HP, NATHAN SD, CUTTITTA F, MCCOY JP, GOCHUICO BR, MOSS J (2009). Abnormal lymphangiogenesis in idiopathic

- pulmonary fibrosis with insights into cellular and molecular mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 3958-63
- ELICEIRI BP, PAUL R, SCHWARTZBERG PL, HOOD JD, LENG J, CHERESH DA (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*, **4**, 915-24
- FALLOWFIELD JA, MIZUNO M, KENDALL TJ, CONSTANDINOUCM, BENYON RC, DUFFIELD JS, IREDALE JP (2007). Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol*, **178**, 5288-95
- FARIA SC, GANESAN K, MWANGI I, SHIEHMORTEZA M, VIAMONTE B, MAZHAR S, PETERSON M, KONO Y, SANTILLAN C, CASOLA G, SIRLIN CB (2009). MR imaging of liver fibrosis: current state of the art. *Radiographics*, **29**, 1615-35
- FERNÁNDEZ M, SEMELA D, BRUIX J, COLLE I, PINZANI M, BOSCH J (2009). Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol*, **50**, 604-20
- FERRARA N, DAVIS-SMYTH T (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, **18**, 4-25
- FINA L, MOLGAARD HV, ROBERTSON D, BRADLEY NJ, MONAGHAN P, DELIA D, SUTHERLAND DR, BAKER MA, GREAVES MF (1990). Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, **75**, 2417-26
- FINI ME, COOK JR, MOHAN R, BRINCKERHOFF CE (1998): Regulation of matrix metalloproteinases gene expression In: Parks WC, Mecham R.P. (eds) *Matrix Metalloproteinases*. New York, Academic Press: 299-356
- FOO SS, TURNER CJ, ADAMS S, COMPAGNI A, AUBYN D, KOGATA N, LINDBLOM P, SHANI M, ZICHA D, ADAMS RH (2006). Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell*, **124**, 161-73
- FRIEDMAN SL (2005). Mac the knife? Macrophages- the double-edged sword of hepatic fibrosis. *J Clin Invest*, **115**, 29-32
- FRIEDMAN SL (2003). Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*, **38**, S38-53
- FUKUDA Y, ISHIZAKI M, MASUDA Y, KIMURA G, KAWANAMI O, MASUGI Y (1987). The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol*, **126**, 171-82

- GABBIANI G (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*, **200**, 500-3
- GALE NW, PREVO R, ESPINOSA J, FERGUSON DJ, DOMINGUEZ MG, YANCOPOULOS GD, THURSTON G, JACKSON DG (2007). Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Mol Cell Biol*, **27**, 595-604
- GALE NW, THURSTON G, HACKETT SF, RENARD R, WANG Q, MCCLAIN J, MARTIN C, WITTE C, WITTE MH, JACKSON D, SURI C, CAMPOCHIARO PA, WIEGAND SJ, YANCOPOULOS GD (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell*, **3**, 411-23
- GALLI A, CRABB DW, CENI E, SALZANO R, MELLO T, SVEGLIATI-BARONI G, RIDOLFI F, TROZZI L, SURRENTI C, CASINI A (2002). Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology*, **122**, 1924-40
- GÁLVEZ BG, MATÍAS-ROMÁN S, ALBAR JP, SÁNCHEZ-MADRID F, ARROYO AG (2001). Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem*, **276**, 37491-500
- GENÍS L, GÁLVEZ BG, GONZALO P, ARROYO AG (2006). MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis? *Cancer Metastasis Rev*, **25**, 77-86
- GERBER HP, HILLAN KJ, RYAN AM, KOWALSKI J, KELLER GA, RANGELL L, WRIGHT BD, RADTKE F, AGUET M, FERRARA N (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, **126**, 1149-59
- GINÈS P, CÁRDENAS A, ARROYO V, RODÉS J (2004). Management of cirrhosis and ascites. *N Engl J Med*, **350**, 1646-54
- GOMEZ DE, ALONSO DF, YOSHIJI H, THORGEIRSSON UP (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, **74**, 111-22
- GORDON EJ, GALE NW, HARVEY NL (2008). Expression of the hyaluronan receptor LYVE-1 is not restricted to the lymphatic vasculature; LYVE-1 is also expressed on embryonic blood vessels. *Dev Dyn*, **237**, 1901-9
- GRAY H (1985). The lymphatic system. In: Clemente CD (ed). *Anatomy of the human body*. Philadelphia, Lea and Febiger: 866-932.

- GÜNTHER A, ERMERT L, BREITHECKER A, HACKSTEIN N, EICKELBERG O, MORR H, GRIMMINGER F, VELCOVSKY HG, SEEGER W (2003). Classification of Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Dtsch Ärzteblatt*, **24**, 1676-85
- GUY CT, CARDIFF RD, MULLER WJ (1992). Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol*, **12**, 954-61
- HANUMEGOWDA C, FARKAS L, KOLB M (2012). Angiogenesis in pulmonary fibrosis: too much or not enough? *Chest*, **142**, 200-7
- HELLSTRÖM M, KALÉN M, LINDAHL P, ABRAMSSON A, BETSHOLTZ C (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, **126**, 3047-55
- HEMMANN S, GRAF J, RODERFELD M, ROEB E (2007). Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol*, **46**, 955-75
- HIRATSUKA S, MARU Y, OKADA A, SEIKI M, NODA T, SHIBUYA M (2001). Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res*, **61**, 1207-13
- HO MK, SPRINGER TA (1982). Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*, **128**, 1221-8
- HOLMGREN L, GLASER A, PFEIFER-OHLSSON S, OHLSSON R (1991). Angiogenesis during human extraembryonic development involves the spatiotemporal control of PDGF ligand and receptor gene expression. *Development*, **113**, 749-54
- HOMMA S, NAGAOKA I, ABE H, TAKAHASHI K, SEYAMA K, NUKIWA T, KIRA S (1995). Localization of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I in the fibrotic lung. *Am J Respir Crit Care Med*, **152**, 2084-9
- HUGGENBERGER R, ULLMANN S, PROULX ST, PYTOWSKI B, ALITALO K, DETMAR M (2010). Stimulation of lymphangiogenesis via VEGFR-3 inhibits chronic skin inflammation. *J Exp Med*, **207**, 2255-69
- IIMURO Y, BRENNER DA (2008). Matrix metalloproteinase gene delivery for liver fibrosis. *Pharm Res*, **25**, 249-58

- IREDALE JP, BENYON RC, PICKERING J, MCCULLEN M, NORTHROP M, PAWLEY S, HOVELL C, ARTHUR MJP (1998). Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*, **102**, 538-549
- ISAKA N, PADERA TP, HAGENDOORN J, FUKUMURA D, JAIN RK (2004). Peritumor lymphatics induced by vascular endothelial growth factor-C exhibit abnormal function. *Cancer Res*, **64**, 4400-4
- ISSA R, ZHOU X, CONSTANDINOU CM, FALLOWFIELD J, MILLWARD-SADLER H, GACA MD, SANDS E, SULIMAN I, TRIM N, KNORR A, ARTHUR MJ, BENYON RC, IREDALE JP (2004). Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology*, **126**, 1795-808
- ITOH T, TANIOKA M, YOSHIDA H, YOSHIOKA T, NISHIMOTO H, ITOHARA S (1998). Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*, **58**, 1048-51
- JACKSON DG (2004). Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS*, **112**, 526-38
- JACKSON DG (2003). The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med*, **13**, 1-7
- JACKSON JR, SEED MP, KIRCHER CH, WILLOUGHBY DA, WINKLER JD (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J*, **11**, 457-65
- JAIN RK (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, **9**, 685-93
- JELTSCH M, TAMMELA T, ALITALO K, WILTING J (2003). Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. *Cell Tissue Res*, **314**, 69-84
- JEON B, JANG C, HAN J, KATARU R, PIAO L, JUNG K, CHA H, SCHWENDENER R, JANG K, KIM K, ALITALO K, KOH G (2008). Profound but Dysfunctional Lymphangiogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor Ligands from CD11b+ Macrophages in Advanced Ovarian Cancer. *Cancer Res*, **68**, 1100-09
- JOHNSSON A, HELDIN CH, WESTERMARK B, WASTESON A (1982). Platelet-derived growth factor: identification of constituent polypeptide chains. *Biochem Biophys Res Commun*, **104**, 66-74

- KALLURI R, NEILSON EG (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, **112**, 1776-84
- KALLURI R, SUKHATME VP (2000). Fibrosis and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **9**, 413-8
- KANG DH, HUGHES J, MAZZALI M, SCHREINER GF, JOHNSON RJ (2001). Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol*, **12**, 1448-57
- KARKKAINEN MJ, HAIKO P, SAINIO K, PARTANEN J, TAIPALE J, PETROVA TV, JELTSCH M, JACKSON DG, TALIKKA M, RAUVALA H, BETSHOLTZ C, ALITALO K (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, **5**, 74-80
- KARKKAINEN MJ, PETROVA TV (2000). Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene*, **19**, 5598-605
- KARPANEN T, ALITALO K (2008). Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol*, **3**, 367-97
- KASPER M, GÜNTHER U, DALL P, KAYSER K, SCHUH D, HAROSKE G, MÜLLER M (1995). Distinct expression patterns of CD44 isoforms during human lung development and in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **13**, 648-56
- KATARU R, JUNG K, JANG C, YANG H, SCHWENDENER R, BAIK J, HAN S, ALITALO K, KOH G (2009). Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood*, **113**, 5650-5659
- KAWANAMI O, FERRANS VJ, CRYSTAL RG (1982). Structure of alveolar epithelial cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab Invest*, **46**, 39-53
- KEANE MP, ARENBERG DA, LYNCH JP, WHYTE RI, IANNETTONI MD, BURDICK MD, WILKE CA, MORRIS SB, GLASS MC, DIGIOVINE B, KUNKEL SL, STRIETER RM (1997). The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* vol, **159** 1437-43
- KEOGH BA, CRYSTAL RG (1982). Alveolitis: the key to the interstitial lung disorders. *Thorax*, **37**, 1-10

- KIM KE, KOH YJ, JEON BH, JANG C, HAN J, KATARU RP, SCHWENDENER RA, KIM JM, KOH GY (2009). Role of CD11b+ macrophages in intraperitoneal lipopolysaccharide-induced aberrant lymphangiogenesis and lymphatic function in the diaphragm. *Am J Pathol*, **175**, 1733-45
- KING TE, BROWN KK, RAGHU G, DU BOIS RM, LYNCH DA, MARTINEZ F, VALEYRE D, LECONTE I, MORGANTI A, ROUX S, BEHR J (2011). BUILD-3: a randomized, controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **184**, 92-9
- KING JR EA, ALBERA C, BRADFORD WT, COSTABEL U, HORMEL P, LANCASTER L, NOBLE PW, SAHN SA, SZWARCBERG J, THOMEER M, VALEYRE D, DU BOIS RM (2009). Effect of interferon gamma-1b on survival in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (INSPIRE): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet*, **374**, 222-8
- KING JR TE, COSTABEL U, CORDIER J-F, DOPICO GA, DUBOIS RM, LYNCH D, LYNCH JP, MYERS J, PANOS, R, RAGHU G, SCHWARTZ D, SMITH CM (2000). American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med*, **161**, 646-64
- KISSELEVA T, UCHINAMI H, FEIRT N, QUINTANA-BUSTAMANTE O, SEGOVIA JC, SCHWABE RF, BRENNER DA (2006). Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis. *J Hepatol*, **45**, 429-38
- KLEINER DE, STETLER-STEVENSON WG (1993). Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 891-7
- KOHLER N, LIPTON A (1974). Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res*, **87**, 297-300
- KOVACS EJ, VAN STEDUM S, NEUMAN JE (1994). Selective induction of PDGF gene expression in peritoneal macrophages by interleukin-2. *Immunobiology*, **190**, 263-74
- KOVALENKO M, RÖNNSTRAND L, HELDIN CH, LOUBTCHENKOV M, GAZIT A, LEVITZKI A, BÖHMER FD (1997). Phosphorylation site-specific inhibition of platelet-derived growth factor beta-receptor autophosphorylation by the receptor blocking tyrophostin AG1296. *Biochemistry*, **36**, 6260-9
- LAMBERT V, WIELOCKX B, MUNAUT C, GALOPIN C, JOST M, ITOH T, WERB Z, BAKER A, LIBERT C, KRELL HW, FOIDART JM, NOËL A, RAKIC JM (2003). MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization. *FASEB J*, **17**, 2290-2

- LAUER ME, FULOP C, MUKHOPADHYAY D, COMHAIR S, ERZURUM SC, HASCALL VC (2009). Airway smooth muscle cells synthesize hyaluronan cable structures independent of inter-alpha-inhibitor heavy chain attachment. *J Biol Chem*, **284**, 5313-23
- LAUER M, ERZURUM S, MUKHOPADHYAY D, VASANJI A, DRAZBA J, WANG A, FULOP C, HASCALL V (2008). Differentiated Murine Airway Epithelial Cells Synthesize a Leukocyte-adhesive Hyaluronan Matrix in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *J Biol Chem*, **283**, 26283-26296
- LEE J, SEMELA D, IREDALE J, SHAH V (2007). Sinusoidal remodeling and angiogenesis: A new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology*, **45**, 817-825
- LEHTI K, ALLEN E, BIRKEDAL-HANSEN H, HOLMBECK K, MIYAKE Y, CHUN TH, WEISS SJ (2005). An MT1-MMP-PDGF receptor-beta axis regulates mural cell investment of the microvasculature. *Genes Dev*, **19**, 979-91
- LEIBOVICH SJ, ROSS R (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*, **78**, 71-100
- LEUNG DW, CACHIANES G, KUANG WJ, GOEDEL DV, FERRARA N (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**, 1306-9
- LEVÉEN P, PEKNY M, GEBRE-MEDHIN S, SWOLIN B, LARSSON E, BETSHOLTZ C (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev*, **8**, 1875-87
- LEVICK JR (1999). Changing perspectives on microvascular fluid exchange. In: Jordan D, Marshall J (eds). *Cardiovascular Regulation*. London, UK, Portland Press: 127-152.
- LEVITZKI A, MISHANI E (2006). Tyrosine kinases and other tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Biochem*, **75**, 93-109
- LI X, PONTÉN A, AASE K, KARLSSON L, ABRAMSSON A, UUTELA M, BÄCKSTRÖM G, HELLSTRÖM M, BOSTRÖM H, LI H, SORIANO P, BETSHOLTZ C, HELDIN CH, ALITALO K, OSTMAN A, ERIKSSON U (2000). PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor. *Nat Cell Biol*, **2**, 302-9
- LI J, NIU JZ, WANG JF, LI Y, TAO XH (2005). Pathological mechanisms of alcohol-induced hepatic portal hypertension in early stage fibrosis rat model. *World J Gastroenterol*, **11**, 6483-88

- LINDAHL P, JOHANSSON BR, LEVÉEN P, BETSHOLTZ C (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, **277**, 242-5
- LINDROOS PM, COIN PG, BADGETT A, MORGAN DL, BONNER JC (1997). Alveolar macrophages stimulated with titanium dioxide, chrysotile asbestos, and residual oil fly ash upregulate the PDGF receptor-alpha on lung fibroblasts through an IL-1beta-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **16**, 283-92
- LLOVET JM (2005). Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, **40**, 225-35
- MÄKINEN T, JUSSILA J, VEIKKOLA J, KARPANEN T, KETTUNEN MI, PULKKANEN KJ, KAUPPINEN R, JACKSON DG, KUBO H, NISHIKAWA S-I, YLÄ-HERTTUALA S, ALITALO K (2001). Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nature Medicine*, **7**, 199-205
- MATHÉ G, REDON H, HYAT M (1970). Study of the clinical efficiency of bleomycin in human cancer. *Br Med J*, **2**, 643-5
- MAY D, DJONOV V, ZAMIR G, BALA M, SAFADI R, SKLAIR-LEVY M, KESHET E (2011). A transgenic model for conditional induction and rescue of portal hypertension reveals a role of VEGF-mediated regulation of sinusoidal fenestrations. *PLoS ONE*, **6**, e21478
- MCKEE CM, PENNO MB, COWMAN M, BURDICK MD, STRIETER RM, BAO C, NOBLE PW (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*, **98**, 2403-13
- MERAN S, THOMAS DW, STEPHENS P, ENOCH S, MARTIN J, STEADMAN R, PHILLIPS AO (2008). Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-mediated fibroblast proliferation. *J Biol Chem*, **283**, 6530-45
- MERAN S, THOMAS D, STEPHENS P, MARTIN J, BOWEN T, PHILLIPS A, STEADMAN R (2007). Involvement of hyaluronan in regulation of fibroblast phenotype. *J Biol Chem*, **282**, 25687-97
- MEYER A, BUHL R, MAGNUSSEN H (1994). The effect of oral N-acetylcysteine on lung glutathione levels in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*, **7**, 431-6
- MICHAELSON JE, AGUAYO SM, ROMAN J (2000). Idiopathic pulmonary fibrosis: a practical approach for diagnosis and management. *Chest*, **118**, 788-94

- MIYAKE S (1979). The mechanism of release of hepatic enzymes in various liver diseases. II. Altered activity ratios of GOT to GPT in serum and liver of patients with liver diseases. *Acta Med Okayama*, **33**, 343-58
- MORISAKI N, KOYAMA N, KAWANO M, MORI S, UMEMIYA K, KOSHIKAWA T, SAITO Y, YOSHIDA S (1992). Human macrophages modulate the phenotype of cultured rabbit aortic smooth muscle cells through secretion of platelet-derived growth factor. *Eur J Clin Invest*, **22**, 461-8
- N**AGASE H, VISSE R, MURPHY G (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, **69**, 562-73
- NAGY A (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, **26**, 99-109
- NAITO M, HASEGAWA G, EBE Y, YAMAMOTO T (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc*, **37**, 16-28
- NETTER FH (1997). Atlas der Anatomie des Menschen. Stuttgart New York, Thieme Verlag, Tafel 273
- NEWBY AC (2008). Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *ATVB*, **28**, 2108-114
- O**LLE EW, REN X, MCCLINTOCK SD, WARNER RL, DEOGRACIAS MP, JOHNSON KJ, COLLETTI LM (2006). Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*, **44**, 540-9
- OLSON A, SWIGRIS J, LEZOTTE D, NORRIS J, WILSON C, BROWN K (2007). Mortality from Pulmonary Fibrosis Increased in the United States from 1992 to 2003. *Am J Respir Crit Care Med*, **176**, 277-284
- ONORI P, MORINI S, FRANCHITTO A, SFERRA R, ALVARO D, GAUDIO E (2000). Hepatic microvascular features in experimental cirrhosis: a structural and morphometrical study in CCl₄-treated rats. *J Hepatol*, **33**, 555-63
- P**ARK YN, YANG CP, FERNANDEZ GJ, CUBUKCU O, THUNG SN, THEISE ND (1998). Neovascularization and sinusoidal "capillarization" in dysplastic nodules of the liver. *Am J Surg Pathol*, **22**, 656-62
- PATSENKER E, POPOV Y, STICKEL F, SCHNEIDER V, LEDERMANN M, SÄGESSER H, NIEDOBITEK G, GOODMAN SL, SCHUPPAN D (2009). Pharmacological inhibition of integrin α v β 3

- aggravates experimental liver fibrosis and suppresses hepatic angiogenesis. *Hepatology*, **50**, 1501-11
- PAWSON T, SAXTON T (1999). Signaling networks--do all roads lead to the same genes? *Cell*, **97**, 675
- PERZ JF, ARMSTRONG GL, FARRINGTON LA, HUTIN YJ, BELL BP (2006). The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*, **45**, 529-38
- PETROVA TV, KARPANEN T, NORRMÉN C, MELLOR R, TAMAKOSHI T, FINEGOLD D, FERRELL R, KERJASCHKI D, MORTIMER P, YLÄ-HERTTUALA S, MIURA N, ALITALO K (2004). Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nature Medicine*, **10**, 974-81
- PILLER NB (1990). Macrophage and tissue changes in the developmental phases of secondary lymphoedema and during conservative therapy with benzopyrone. *Arch Histol Cytol*, **53**, 209-18
- PILLER NB (1980). Lymphoedema, macrophages and benzopyrones. *Lymphology*, **13**, 109-19
- PINZANI M (1999). Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol*, **21**, 475-90
- PREVO R, BANERJI S, FERGUSON DJ, CLASPER S, JACKSON DG (2001). Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem*, **276**, 19420-30
- PUSZTASZERI MP, SEELENTAG W, BOSMAN FT (2006). Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, **54**, 385-95
- RAGHU G, COLLARD HR, EGAN JJ, MARTINEZ FJ, BEHR J, BROWN KK, COLBY TV, CORDIER JF, FLAHERTY KR, LASKY JA, LYNCH DA, RYU JH, SWIGRIS JJ, WELLS AU, ANCOCHEA J, BOUROS D, CARVALHO C, COSTABEL U, EBINA M, HANSELL DM, JOHKOH T, KIM DS, KING TE, KONDOH Y, MYERS J, MÜLLER NL, NICHOLSON AG, RICHELDI L, SELMAN M, DUDDEN RF, GRISS BS, PROTZKO SL, SCHÜNEMANN HJ (2011). An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*, **183**, 788-824

- RAGHU ET AL RAGHU G, BROWN KK, COSTABEL U, COTTIN V, DU BOIS RM, LASKY JA, THOMEER M, UTZ JP, KHANDKER RK, MCDERMOTT L, FATENEJAD S (2008). Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with etanercept: an exploratory, placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, **178**, 948-55
- RAGHU G, WEYCKER D, EDELSBERG J, BRADFORD WZ, OSTER G (2006). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, **174**, 810-6
- RATEL D, MIHOUBI S, BEAULIEU E, DUROCHER Y, RIVARD GE, GINGRAS D, BÉLIVEAU R (2007). VEGF increases the fibrinolytic activity of endothelial cells within fibrin matrices: involvement of VEGFR-2, tissue type plasminogen activator and matrix metalloproteinases. *Thromb Res*, **121**, 203-12
- RECKNAGEL RO, GLENDE JR EA, DOLAK JA, WALLER RL (1989). Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *J Pharmacol Toxicol*, **43**, 139-54
- REED RK, LAURENT TC, TAYLOR AE (1990). Hyaluronan in prenodal lymph from skin: changes with lymph flow. *Am J Physiol*, **259**, H1097-100
- RENZONI EA (2004). Neovascularization in idiopathic pulmonary fibrosis: too much or too little? *Am J Respir Crit Care Med*, **169**, 1179-80
- RICE AB, MOOMAW CR, MORGAN DL, BONNER JC (1999). Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *J Pathol*, **155**, 213-21
- RICHELDI L, COSTABEL U, SELMAN M, KIM DS, HANSELL DM, NICHOLSON AG, BROWN KK, FLAHERTY KR, NOBLE PW, RAGHU G, BRUN M, GUPTA A, JUHEL N, KLÜGLICH M, DU BOIS RM (2011). Efficacy of a tyrosine kinase inhibitor in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, **365**, 1079-87
- RISTIMÄKI A, NARKO K, ENHOLM B, JOUKOV V, ALITALO K (1998). Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem*, **273**, 8413-8
- ROBINET A, FAHEM A, CAUCHARD JH, HUET E, VINCENT L, LORIMIER S, ANTONICELLI F, SORIA C, CREPIN M, HORNEBECK W, BELLON G (2005). Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci*, **118**, 343-56
- ROCKSON SG (2001). Lymphedema. *Am J Med*, **110**, 288-95

- RODERFELD M, GEIER A, DIETRICH CG, SIEWERT E, JANSEN B, GARTUNG C, ROEB E (2006). Cytokine blockade inhibits hepatic tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression and up-regulates matrix metalloproteinase-9 in toxic liver injury. *Liver Int*, **26**, 579-586
- ROSS R, GLOMSET J, KARIYA B, HARKER L (1974). A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, **71**, 1207-10
- RUDDERS RA, HENSLEY GT (1973). Bleomycin pulmonary toxicity. *Chest*, **63**, 627-8
- RUNDHAUG JE (2005). Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, **9**, 267-85
- RYAN TJ, DE BERKER D (1995). The interstitium, the connective tissue environment of the lymphatic, and angiogenesis in human skin. *Clin Dermatol*, **13**, 451-8
- SABIN F (1909). The lymphatic system in human embryos, with a consideration of the morphology of the system as a whole. *Am J Anat*, **9**, 43-91
- SCHAEFER CJ, RUHRMUND DW, PAN L, SEIWERT SD, KOSSEN K (2011). Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models. *Eur Respir Rev*, **20**, 85-97
- SCHAFFNER F, KLION FM (1968). Chronic hepatitis. *Annu Rev Med*, **19**, 25-38
- SCHIEBLER TH, SCHMIDT W, ZILLES K (1997). Anatomie, 7. Auflage. Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag, S.492-506, 580-588
- SCHIRGER A, HARRISON EG, JANES JM (1962). Idiopathic lymphedema. Review of 131 cases. *JAMA*, **182**, 14-22
- SCHLEDZEWSKI K, FALKOWSKI M, MOLDENHAUER G, METHAROM P, KZHYSHKOWSKA J, GANSS R, DEMORY A, FALKOWSKA-HANSEN B, KURZEN H, UGUREL S, GEGINAT G, ARNOLD B, GOERDT S (2006). Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis. *J Pathol*, **209**, 67-77
- SCHMITS R, FILMUS J, GERWIN N, SENALDI G, KIEFER F, KUNDIG T, WAKEHAM A, SHAHINIAN A, CATZAVELOS C, RAK J, FURLONGER C, ZAKARIAN A, SIMARD JJ, OHASHI PS, PAIGE CJ, GUTIERREZ-RAMOS JC, MAK TW (1997). CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood*, **90**, 2217-33

- SCHULTE-MERKER S, SABINE A, PETROVA TV (2011). Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol*, **193**, 607-18
- SEETHARAM L, GOTOH N, MARU Y, NEUFELD G, YAMAGUCHI S, SHIBUYA M (1995). A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF. *Oncogene*, **10**, 135-47
- SELMAN M, PARDO A (2006). Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc*, **3**, 364-72
- SELMAN M, KING TE, PARDO A (2001). Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med*, **134**, 136-151
- SELMAN M, MONTAÑO M, RAMOS C, CHAPELA R (1986). Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, **41**, 355-9
- SENGER DR, GALLI SJ, DVORAK AM, PERRUZZI CA, HARVEY VS, DVORAK HF (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, **219**, 983-5
- SHI F, SOTTILE J (2011). MT1-MMP regulates the turnover and endocytosis of extracellular matrix fibronectin. *J Cell Sci*, **124**, 4039-50
- SHIMODA H, BERNAS MJ, WITTE MH, GALE NW, YANCOPOULOS GD, KATO S (2007). Abnormal recruitment of periendothelial cells to lymphatic capillaries in digestive organs of angiopoietin-2-deficient mice. *Cell Tissue Res*, **328**, 329-37
- SHIRATORI Y, IMAZEKI F, MORIYAMA M, YANO M, ARAKAWA Y, YOKOSUKA O, KUROKI T, NISHIGUCHI S, SATA M, YAMADA G, FUJIYAMA S, YOSHIDA H, OMATA M (2000). Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med*, **132**, 517-24
- SORIANO P (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev*, **8**, 1888-96
- SPAGNOLO P, DEL GIOVANE C, LUPPI F, CERRI S, BALDUZZI S, WALTERS EH, D'AMICO R, RICHELDI L (2010). Non-steroid agents for idiopathic pulmonary fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, **9**, 1-74
- STERNLICHT MD, WERB Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 463-516

- STEVENS A, LOWE J (1997). Histologie des Menschen, 2. Auflage. London, Chapman & Hall, S.159-176, 215-222
- STOCKMANN C, KERDILES Y, NOMAKSTEINSKY M, WEIDEMANN A, TAKEDA N, DOEDENS A, TORRES-COLLADO AX, IRUELA-ARISPE L, NIZET V, JOHNSON RS (2010). Loss of myeloid cell-derived vascular endothelial growth factor accelerates fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **107**, 4329-34
- STOCKMANN C, DOEDENS A, WEIDEMANN A, ZHANG N, TAKEDA N, GREENBERG JI, CHERESH DA, JOHNSON RS (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor in myeloid cells accelerates tumorigenesis. *Nature*, **456**, 814-8
- STRIETER RM, MEHRAD B (2009). New mechanisms of pulmonary fibrosis. *CHEST*, **136**, 1364-70
- SWYNGHEDAUW B (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*, **79**, 215-62
- TAGER AM, LACAMERA P, SHEA BS, CAMPANELLA GS, SELMAN M, ZHAO Z, POLOSUKHIN V, WAIN J, KARIMI-SHAH BA, KIM ND, HART WK, PARDO A, BLACKWELL TS, XU Y, CHUN J, LUSTER AD (2008). The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nature Medicine*, **14**, 45-54
- TALWALKAR JA (2010). Antifibrotic therapies--emerging biomarkers as treatment end points. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **7**, 59-61
- TAMMELA T, ALITALO K (2010). Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*, **140**, 460-76
- TARABOLETTI G, D'ASCENZO S, BORSOTTI P, GIAVAZZI R, PAVAN A, DOLO V (2002). Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol*, **160**, 673-80
- TAURA K, DE MINICIS S, SEKI E, HATANO E, IWASAKO K, OSTERREICHER CH, KODAMA Y, MIURA K, IKAI I, UEMOTO S, BRENNER DA (2008). Hepatic stellate cells secrete angiopoietin 1 that induces angiogenesis in liver fibrosis. *Gastroenterology*, **135**, 1729-38
- TELES-GRILLO ML, LEITE-ALMEIDA H, MARTINS DOS SANTOS J, OLIVEIRA C, BOAVENTURA P, GRANDE NR (2005). Differential expression of collagens type I and type IV in lymphangiogenesis during the angiogenic process associated with bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat. *Lymphology*, **38**, 130-5

- TORRES-VÁZQUEZ J, KAMEI M, WEINSTEIN BM (2003). Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res*, **314**, 43-59
- TUGUES S, FERNANDEZ-VARO G, MUÑOZ-LUQUE J, ROS J, ARROYO V, RODÉS J, FRIEDMAN SL, CARMELIET P, JIMÉNEZ W, MORALES-RUIZ M (2007). Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology*, **46**, 1919-26
- TZOUVELEKIS A, ANEVLAVIS S, BOUROS D (2006). Angiogenesis in interstitial lung diseases: a pathogenetic hallmark or a bystander? *Respir Res*, **7**, 82
- UMEZAWA H (1965). Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrob Agents Chemother*, **5**, 1079-85
- UMEZAWA H, MAEDA K, TAKEUCHI T, OKAMI Y (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. *J Antibiot*, **19**, 200-9
- VISSE R, NAGASE H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, **92**, 827-839
- VOGTEN JM, DRIXLER TA, TE VELDE EA, SCHIPPER ME, VAN VROONHOVEN TJ, VOEST EE, BOREL RINKES IH (2004). Angiostatin inhibits experimental liver fibrosis in mice. *Int J Colorectal Dis*, **19**, 387-94
- VU TH, SHIPLEY JM, BERGERS G, BERGER JE, HELMS JA, HANAHAHAN D, SHAPIRO SD, SENIOR RM, WERB Z (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*, **93**, 411-22
- WALTERS DM, KLEEBERGER SR (2008). Mouse models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Curr Protoc Pharmacol*, **Chapter 5**, Unit 5.46
- WANG YQ, IKEDA K, IKEBE T, HIRAKAWA K, SOWA M, NAKATANI K, KAWADA N, KANEDA K (2000). Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. *Hepatology*, **32**, 980-9
- WELLS RG (2010). The epithelial-to-mesenchymal transition in liver fibrosis: here today, gone tomorrow? *Hepatology*, **51**, 737-40
- WESTERMARK B, WASTESON A (1976). A platelet factor stimulating human normal glial cells. *Exp Cell Res*, **98** 170-4

- WIGLE JT, OLIVER G (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*, **98**, 769-78
- WRIGHT MC, ISSA R, SMART DE, TRIM N, MURRAY GI, PRIMROSE JN, ARTHUR MJ, IREDALE JP, MANN DA (2001). Gliotoxin stimulates the apoptosis of human and rat hepatic stellate cells and enhances the resolution of liver fibrosis in rats. *Gastroenterology*, **121**, 685-98
- WYNN TA, RAMALINGAM TR (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*, **18**, 1028-40
- WYNN TA (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*, **117**, 524-9
- YAMANE A, SEETHARAM L, YAMAGUCHI S, GOTOH N, TAKAHASHI T, NEUFELD G, SHIBUYA M (1994). A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene*, **9**, 2683-90
- YAMASHITA M, YAMAUCHI K, CHIBA R, IWAMA N, DATE F, SHIBATA N, KUMAGAI H, RISTELI J, SATO S, TAKAHASHI T, ONO M (2009). The definition of fibrogenic processes in fibroblastic foci of idiopathic pulmonary fibrosis based on morphometric quantification of extracellular matrices. *Hum Pathol*, **40**, 1278-87
- YAMASHITA M, IWAMA N, DATE F, CHIBA R, EBINA M, MIKI H, YAMAUCHI K, SAWAI T, NOSE M, SATO S, TAKAHASHI T, ONO M (2009). Characterization of lymphangiogenesis in various stages of idiopathic diffuse alveolar damage. *Hum Pathol*, **40**, 542-51
- YAMAZAKI Y, TAKANI K, ATODA H, MORITA T (2003). Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem*, **278**, 51985-8
- YANCOPOULOS GD, DAVIS S, GALE NW, RUDGE JS, WIEGAND SJ, HOLASH J (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, **407**, 242-8
- YOSHIJI H, KURIYAMA S, YOSHII J, IKENAKA Y, NOGUCHI R, HICKLIN DJ, WU Y, YANASE K, NAMISAKI T, YAMAZAKI M, TSUJINOUE H, IMAZU H, MASAKI T, FUKUI H (2003). Vascular endothelial growth factor and receptor interaction is a prerequisite for murine hepatic fibrogenesis. *Gut*, **52**, 1347-54
- ZAWICKI DF, JAIN RK, SCHMID-SCHOENBEIN GW, CHIEN S (1981). Dynamics of neovascularization in normal tissue. *Microvasc Res*, **21**, 27-47

ZHOU X, HOVELL CJ, PAWLEY S, HUTCHINGS MI, ARTHUR MJ, IREDALE JP, BENYON RC (2004). Expression of matrix metalloproteinase-2 and -14 persists during early resolution of experimental liver fibrosis and might contribute to fibrolysis. *Liver Int*, **24**, 492-501

ZISMAN DA, SCHWARZ M, ANSTROM KJ, COLLARD HR, FLAHERTY KR, HUNNINGHAKE GW, IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS CLINICAL RESEARCH NETWORK (2010). A controlled trial of sildenafil in advanced idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*, **363**, 620-8

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANG1	Angiopoietin 1
ANG2	Angiopoietin 2
ATP	Adenosintriphosphat
Bleo	Bleomycin
BM	<i>Bone Marrow</i> , Knochenmark
BSA	Bovines Serum Albumin
C57/Bl6J	C57/Black 6 Jackson
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCl ₄	Tetrachlormethan
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	<i>day</i> , Tag
DAB	Diaminobenzidin
DAD	<i>Diffuse Alveolar Damage</i> , diffuser alveolarer Schaden
DAG	<i>sn</i> -1,2-Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dd-H ₂ O	Doppelt Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzelle
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale Mesenchymale Transition
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal Bovine Serum, Fötale Rinderserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLT-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
FLT-4	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3

FOXC2	Forkhead Box Protein C2
FSP	Fibroblast Specific Protein
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Grb2	Growth Factor Receptor-bound Protein 2
GTC	Guanidinisothiocyant
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HA	Hyaluronsäure
HCV	Hepatitis C-Virus
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSC	Hepatische Sternzelle, Ito-Zelle
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intratracheal
i.v.	Intravenös
IL-1	Interleukin 1
IPF	<i>Idiopathic pulmonary fibrosis</i> , Idiopathische Lungenfibrose
K	Kontrolle
KCl	Kaliumchlorid
KDR/FLK1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	Knockout
KO/WT	Knockout/Wildtyp
LEC	Lymphendothelzelle
LD	Lymphödem Distichiasis
LN	<i>Lymph Node</i> , Lymphknoten
LPA	Lysophosphatidsäure
Lympe	Lymphflüssigkeit
LysM	LysozymM
Lyve1	Lymphatic Vessel Endothelial Receptor 1
M	Molar
Mac2	Galektin 3
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
mM	Millimolar
mA	Milliampere
MEK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase Kinase</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMTV	Maus-Mammatumovirus

M.O.M.	Mouse-on-Mouse
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NAD	Nicotin-Adenin-Dinukleotid
NAC	N-Acetylcystin
NaN ₃	Natriumazid
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis (Fettleberhepatitis)
NGS	Normal Goat Serum
NO	Stickstoffmonoxid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OT	Objektträger
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphatgepufferte Salzlösung + Tween20
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF-A, -B	Platelet Derived Growth Factor-A,-B
PDGFR- α , - β	Platelet Derived Growth Factor Receptor- α , - β
PFA	Paraformaldehyd
PIGF	Placental Growth Factor
PKC	Proteinkinase C
PI3K	Phosphatidylinositol 3´Kinase p85 subunit
PIP ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphat
PLC γ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Prox 1	Prospero Homeobox 1
PyMT	Polyoma middle T-antigen
qPCR	quantitative Real Time PCR
RasGAP	Ras GTPase-aktivierendes Protein
Recovery, Rec	Rückbildungsphase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAM	<i>Scar associated Macrophages</i> , Narben-assozierte Makrophagen
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMA	Smooth Muscle Actin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TBS-T	Trisgepufferte Kochsalzlösung + Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue Inhibitor Metalloproteinases

TNF- α , - β	Tumornekrosefaktor- α , - β
Tris HCL	Trisaminomethan Chlorwasserstoff
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor A
VEGF B,C,D,E,F	Vascular Endothelial Growth Factor B, C, D, E, F
VEGFR1,2,3	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1, 2, 3
VE-H ₂ O	Demineralisiertes Wasser
VPF	Vascular Permeability Factor
Wo	Wochen
WT	Wildtyp
WT/KO	Wildtyp/Knockout

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Architektur der Lunge.....	1
Abb. 1.2 Anatomie der Leber und der Leberläppchen	3
Abb. 1.3 Schematische Darstellung einer Blutkapillare	5
Abb. 1.4 Flüssigkeitsaustausch zwischen einer Blut- und einer Lymphkapillare.....	6
Abb. 1.5 Schematische Darstellung der VEGFR-Liganden VEGF-A, -B, -C, -D, -E und PlGF sowie der gewebsspezifischen VEGFR-Expressionsmuster und ihrer Ligandenspezifität.....	8
Abb. 1.6 Schematische Darstellung der PDGF/PDGFR-Interaktion in vivo.....	10
Abb. 1.7 Physiologische Wundheilung und pathophysiologische Entstehung einer Lungenfibrose infolge einer Gewebsverletzung.....	13
Abb. 1.8 Möglicher Ursprung von Lungenfibroblasten.....	14
Abb. 1.9 Veränderung der Leberarchitektur im Rahmen einer Leberfibrose	19
Abb. 3.1 Versuchsaufbau CD44-BM: Transplantation von Knochenmark CD44-defizienter Mäuse mit einer folgenden Induktion einer Lungenfibrose.....	46
Abb. 3.2 Versuchsaufbau VEGF-BM: Induktion einer reversiblen Leberfibrose mit Wechsel der Genotypen vor Beginn der Rückbildungsphase (Recovery).....	47
Abb. 4.1 Bleomycin-Behandlung von Mäusen führt zum fibrotischen Umbau des Lungen-parenchyms	63
Abb. 4.2 Entstehung perilymphatischer Läsionen im Rahmen einer Lungenfibrose	64
Abb. 4.3 Charakterisierung pulmonaler Lymphgefäße.....	65
Abb. 4.4 Identifikation Lyve1-positiver Gefäße als Lymphgefäße.....	66
Abb. 4.5 Keine gesteigerte Lymphangiogenese in Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse.....	66
Abb. 4.6 Ansammlung muraler Zellen um Lymphgefäße im Rahmen einer Lungenfibrose	67
Abb. 4.7 Lungenfibrose geht mit einer Zunahme an Lymphgefäßen, die mit muralen Zellen assoziiert sind, einher.....	68
Abb. 4.8 Charakterisierung der Lymphgefäße, die im Rahmen einer Lungenfibrose eine Ansammlung muraler Zellen aufweisen	69
Abb. 4.9 Assoziation pulmonaler Lymphgefäße mit muralen Zellen tritt früh in der Entstehung der Lungenfibrose auf	70
Abb. 4.10 Assoziation pulmonaler Lymphgefäße mit muralen Zellen tritt unabhängig der Injektionsroute für Bleomycin auf.....	70
Abb. 4.11 Lymphgefäße in fibrotischem Lungengewebe sind von Basalmembran umgeben	71
Abb. 4.12 Lymphgefäße in murinem Tumor und murinem, kutanem Narbengewebe sind frei von muralen Zellen	72
Abb. 4.13 PDGF-B- und PDGFR- β -mRNA-Expression in fibrotischen Mauslungen erhöht.....	73
Abb. 4.14 Charakterisierung isolierter Lungenlymphendothelzellen	74
Abb. 4.15 Erhöhte PDGF-B-mRNA-Expression in isolierten LECs infolge der Bleomycin-Behandlung	75
Abb. 4.16 Lymphgefäße in fibrotischen Lungen weisen ein PDGF-B-positives, assoziierte murale Zellen ein PDGFR- β -positives Fluoreszenzsignal auf	76
Abb. 4.17 Lungenfibrose geht mit erhöhter PDGFR- β -Aktivität im Lungengewebe einher	77
Abb. 4.18 Perilymphatische Detektion von phospho-PDGFR- β in Lungen Bleomycin-behandelter Mäuse.....	77
Abb. 4.19 Hemmung der PDGF-B/PDGFR- β -Signaltransduktion führt zu vermindertem fibrotischem Umbau des Lungenparenchyms	78
Abb. 4.20 Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges geht mit Reduktion der Anzahl an Lymphgefäßen, die mit muralen Zellen assoziiert sind, einher.....	79
Abb. 4.21 Reduktion der perilymphatischen PDGFR- β -Aktivität in fibrotischem Lungengewebe infolge der Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges	80
Abb. 4.22 Albumin akkumuliert in murinem Lungengewebe perilymphatisch mit voranschreitender Lungenfibrose	81
Abb. 4.23 Hyaluronsäure akkumuliert perilymphatisch in murinem Lungengewebe mit voranschreitender Lungenfibrose.....	82
Abb. 4.24 Fibroblasten akkumulieren perilymphatisch im Lungengewebe mit voranschreitender Lungenfibrose und reduzieren sich infolge der Hemmung des PDGF-B/PDGFR- β -Signalweges.....	83
Abb. 4.25 HA-Gehalt steigt in fibrotischen Lungen und sinkt infolge der Inhibierung von PDGFR- β	84

Abb. 4.26 HA-Gehalte im Blutplasma und in den Lungen gesunder und Bleomycin-behandelter WT- sowie CD44-defizienter Mäuse und in Lungen Bleo+Lyve1-AB-behandelter Mäuse.....	85
Abb. 4.27 Neutralisierung von Lyve1 in fibrotischen Lungen geht mit verstärktem fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms und erhöhter Zahl an Fibroblasten einher	86
Abb. 4.28 Lokalisierung von CD44 und Mac2-positiven Makrophagen in gesunden und fibrotischen Mauslungen.....	87
Abb. 4.29 Transplantation von CD44-defizientem Knochenmark führt zu signifikant geringerer Zunahme der Fibroblasten.....	88
Abb. 4.30 Schwere der Lungenfibrose änderte sich nach Transplantation CD44-defizienten Knochenmarks nicht.....	88
Abb. 4.31 Transportkapazität der Lymphgefäße in Lungen PBS-, Bleomycin-, oder Bleomycin+AG-1296-behandelter Mäuse	91
Abb. 4.32 Keine erhöhte Permeabilität pulmonaler Blutgefäße infolge der Bleomycin-Behandlung....	92
Abb. 4.33 Lymphangiogenese in Lungen von IPF-Patienten.....	93
Abb. 4.34 Lymphgefäße in Lungen von IPF-Patienten weisen Ansammlung muraler Zellen auf.....	94
Abb. 4.35 Versuchsaufbau: Induktion und Rückbildung einer reversiblen Leberfibrose.....	95
Abb. 4.36 Distribution von Kollagen im murinen Lebergewebe vor und nach Induktion einer Leberfibrose sowie nach der Rückbildungsphase in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen	96
Abb. 4.37 Quantifizierung des Kollagens in Lebern von WT- und KO-Mäusen vor und nach der Induktion der Fibrose sowie nach der Rückbildungsphase	97
Abb. 4.38 Distribution und Quantifizierung von Mac2-positiven Makrophagen im Lebergewebe der WT- und KO-Mäuse vor und nach der Entstehung sowie nach der Rückbildung einer Leberfibrose	98
Abb. 4.39 Leberwerte im Serum von Mäusen nach der Induktion und Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen	99
Abb. 4.40 VEGF-A-mRNA-Expression in Mauslebern während der Entstehung und der Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen.....	100
Abb. 4.41 Quantifizierung und Distribution der Lebersinusoide in Lebergewebe der WT- und KO-Mäuse vor und nach der Induktion der Fibrose sowie nach der Rückbildungsphase	102
Abb. 4.42 Genexpressionsanalyse fibroseassoziiierter MMPs und TIMPs während der Entwicklung und Rückbildung einer Fibrose in Leberlysaten von WT- und KO-Mäusen.....	104
Abb. 4.43 MMP-Aktivität vor und nach der Entstehung sowie nach der Rückbildung einer Leberfibrose in Abhängigkeit von VEGF aus myeloischen Zellen	106
Abb. 4.44 Quantifizierung des Kollagens in Lebern von Mäusen, denen für die Dauer der Rückbildung VEGF aus myeloischen Zellen hinzugefügt (KO/WT) oder entzogen (WT/KO) wurde	107
Abb. 4.45 Quantifizierung und Distribution der Lebersinusoide in Lebergewebe von Mäusen, denen VEGF aus myeloischen Zellen für die Dauer der Rückbildungsphase zugefügt bzw. entzogen wurde.....	109
Abb. 4.46 Wiedereinführung von VEGF aus myeloischen Zellen vor der Rückbildungsphase führt zu gesteigerter Expression fibroseassoziiierter MMPs durch lebersinusoidale Endothelzellen	111
Abb. 4.47 Erhöhte MMP-Aktivität in der Leber infolge der Wiedereinführung von Myeloidzell-spezifischem VEGF.....	112

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Verwendete Geräte	30
Tabelle 3.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 3.3 Verwendete Chemikalien.....	32
Tabelle 3.4 Primärantikörper	34
Tabelle 3.5 Sekundärantikörper	35
Tabelle 3.6 Western Blot-Antikörper	35
Tabelle 3.7 Murine Primer	36
Tabelle 3.8 Reagenzien und Zusätze.....	37
Tabelle 3.9 Verwendete Puffer und Lösungen	38
Tabelle 3.10 Verwendete Zellkulturmedien	39
Tabelle 3.11 Verwendete Kits.....	39
Tabelle 8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	157

8.4 Publikationsliste

Publikationen

1. **Meinecke A.-K.**, Nagy N., D'Amico Lago G., Kirmse S., Klose R., Schrödter K., Zimmermann A., Helfrich I., Rundqvist H., Theegarten D., Anhenn O., Orian-Rousseau V., Johnson R.S., Alitalo K., Fischer J.W., Fandrey J., Stockmann C. (2012). *Aberrant mural cell recruitment to lymphatic vessels and impaired lymphatic drainage in a murine model of pulmonary fibrosis*. Blood 119: 5931-5942
2. Klose R., Gotthardt D., Putz E. M., **Meinecke A.-K.**, Schrödter K., Helfrich I., Johnson R. S., Fandrey J, Sexl V., Stockmann C, (2013). *Targeting VEGF in myeloid cells delays tumor relapse by enhancing chemotherapy-induced tumor cell senescence and NK cell-dependent immune surveillance*. (in Revision)

Kongressbeiträge

1. **Meinecke A.-K.**, Kirmse S., Klose R., Schrödter K., Helfrich I., Rundqvist H., Fandrey J., Stockmann C. (2011). *Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße während der Entstehung einer Lungenfibrose*. (Vortrag) Annual Biome Symposia *Cell and Tissue Damage: Mechanisms, Protection and Treatment*, 17th Xanten Workshop
2. **Meinecke A.-K.**, Nagy N., Kirmse S., Klose R., Schrödter K., Helfrich I., Rundqvist H., Theegarten D., Anhenn O., Johnson R.S., Fischer J.W., Fandrey J., Stockmann C. (2011). *Aberrant mural cell recruitment and impaired lymphatic drainage contribute to pulmonary fibrosis*. (Poster) 10. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen, Abstractband S. 90
3. **Meinecke A.-K.**, Stockmann C. (2011). *Aberrant mural cell recruitment to lymphatic vessels and impaired lymphatic drainage in a murine model of pulmonary fibrosis*. Biome, Universität Duisburg-Essen, Annual Report Nr. 1, S. 38

4. **Meinecke A.-K.**, Nagy N., D'Amico Lago G., Kirmse S., Klose R., Schrödter K., Zimmermann A., Helfrich I., Rundqvist H., Theegarten D., Anhenn O., Orian-Rousseau V., Johnson R.S., Alitalo K., Fischer J.W., Fandrey J., Stockmann C. (2012). *Aberrant mural cell recruitment to lymphatic vessels and impaired lymphatic drainage in a murine model of pulmonary fibrosis.* (Poster) Keystone Meeting Angiogenesis: Advances in Basic Science and Therapeutic Applications A3, Snowbird, Utah
5. **Meinecke A.-K.**, Nagy N., D'Amico Lago G., Kirmse S., Klose R., Schrödter K., Zimmermann A., Helfrich I., Rundqvist H., Theegarten D., Anhenn O., Orian-Rousseau V., Johnson R.S., Alitalo K., Fischer J.W., Fandrey J., Stockmann C. (2012). *Aberrant mural cell recruitment to lymphatic vessels and impaired lymphatic drainage in a murine model of pulmonary fibrosis.* (Poster) Hypoxianet, Sensing Hypoxia in the Cell and the Organism, Abstractband S. 76
6. **Meinecke A.-K.**, Nagy N., D'Amico Lago G., Kirmse S., Klose R., Schrödter K., Zimmermann A., Helfrich I., Rundqvist H., Theegarten D., Anhenn O., Orian-Rousseau V., Johnson R.S., Alitalo K., Fischer J.W., Fandrey J., Stockmann C. (2012). *Die Bedeutung der Remodellierung pulmonaler Lymphgefäße für die Entstehung einer Lungenfibrose.* (Poster) 11. Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Essen, Abstractband S. 92
7. **Meinecke A.-K.**, Stockmann C. (2012). *Der Einfluss von VEGF aus myeloischen Zellen auf die Entstehung und Rückbildung einer Leberfibrose.* (Vortrag) Annual Biome Symposia *Cell and Tissue Damage: Mechanisms, Protection and Treatment*, 18th Xanten Workshop

8.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.6 Erklärung

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Der Einfluss der Gefäßremodellierung auf die Entstehung und Rückbildung von Gewebsfibrosen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Anna-Katharina Meinecke* befürworte.

Essen, den _____

Unterschrift eines Mitglieds der Universität Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in (Anna-Katharina Meinecke)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Unterschrift des/r Doktoranden/in (Anna-Katharina Meinecke)

8.7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Stockmann für die intensive Betreuung meiner Arbeit und die geduldige Einführung in fach- und methodenspezifisches Wissen. Ich danke ihm für das in mich gesetzte Vertrauen und die umfangreiche Unterstützung, die er mir bei der Durchführung der Laborarbeit sowie beim Verfassen dieser Arbeit entgegengebracht hat. Vielen Dank!

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Joachim Fandrey, der die Entstehung dieser Arbeitsgruppe ermöglicht und meine Arbeit durch fachliche Diskussionen und die Bereitstellung von vielfältigem Laborequipment unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt unserer Arbeitsgruppe. Katrin Schrödter danke ich für die vielen kleinen und großen Aufgaben, die es im Laboralltag zu bewältigen galt, die Unterstützung bei jeder Form von Problemen, viele gemeinsame Stunden an der Bench sowie für die sorgfältige Rechtschreibkorrektur meiner Arbeit. Ralph Klose danke ich für die tapfere Hilfe beim Troubleshooting, sowohl bei Labor- als auch PC-Problemen, für die geduldige Beantwortung aller meiner Fragen und eine unvergessliche Konferenz mit Panoramablick. Beiden sowie Prof. Dr. Stockmann möchte ich für die fantastische Zeit danken. Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie, vor allem aber Dr. Teresa Otto und Anika Thiel, danke ich für die Hilfe und Unterstützung, die auch über die wissenschaftliche Zusammenarbeit hinausging.

Der *Internen Forschungsförderung Essen (IFORES)* (STO/787 3-1) danke ich für die Finanzierung des Projektes.

Ich danke Frau Dr. Iris Helfrich für wissenschaftliche Diskussionen und die Bereitstellung von Laborequipment und -reagenzien, Herrn Dr. Dirk Theegarten und Dr. Olaf Anhenn für die Bereitstellung humaner Lungenproben, Frau Dr. Véronique Orian-Rousseau für die Bereitstellung CD44-defizienter Mäuse sowie Herrn Dr. Jens Fischer, Frau Dr. Nadine Nagy und Frau Annika Zimmermann für die Unterstützung bei der Durchführung der Hyaluronsäure-Messungen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter, Jan sowie meinen Brüdern Matthias, Thomas und besonders Michael, die jederzeit für mich da waren, mich beim Schreiben dieser Arbeit und natürlich darüber hinaus stets unterstützten, motivierten und meine Stimmungsschwankungen mit Gelassenheit hinnahmen. Ohne meine Familie und Freunde wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.