

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität
Direktor: Prof. Dr. med. S. Massberg

*Mikrozirkulatorische und hämodynamische Veränderungen durch
pan-endotheliale Angiopoietin-2 Überexpression*

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

Tilman Ziegler

aus Frankfurt / Main

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. André Brändli

Prof. Dr. Jens Waschke

Priv. Doz. Dr. Kai Hell

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Jan Horstkotte

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Angiopoietine und die Tie Rezeptor Tyrosinkinasen	1
1.1.1. Die Tie Rezeptor Tyrosinkinasen	1
1.1.2. Bindung der Angiopoietine an die Tie-Rezeptoren	2
1.1.3. Bedeutung der Angiopoietine in Embryogenese und Inflammation	3
1.2. Perizyten und glatte Muskelzellen	5
1.2.1. Biologische Funktion von Perizyten	6
1.3. Familie der Platelet Derived Growth Factors (PDGF)	8
1.3.1. Die Rolle von PDGF-B in Embryogenese und Inflammation	9
1.4. Die Sepsis	10
1.4.1. Epidemiologie der Sepsis	12
1.4.2. Pathophysiologie	12
1.4.3. Aktuelle Therapiekonzepte der Sepsis	15
1.5. Charakterisierung adenoassozierter Viren	15
1.6. Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Versuchstiere	17
2.2. Versuchsablauf	19
2.3. Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis	20
2.4. Virenproduktion und Transduktion	21
2.4.1. Tripletransfektion von HEK293-Zellen	21
2.4.2. Ernte und Aufreinigung von AAV-Vektoren über Caesiumchloridgradienten ..	23
2.4.3. Konzentrationsbestimmung mittel qPCR	24
2.5. Messung der Funktionsdaten	25
2.5.1. Narkotisierung und Antagonisierung	25
2.5.2. Messung der Gefäßpermeabilität	26
2.5.3. Nicht-invasive Blutdruckmessung	28
2.5.4. Echokardiographie	28

2.5.5. Invasive Hämodynamikmessung	29
2.6. Organentnahme und Aufbereitung	31
2.7. Histologie.....	31
2.7.1. PECAM-1/NG2 Doppelfärbung	31
2.7.2. X-Gal Färbung	32
2.7.3. Masson Trichrom Färbung.....	32
2.8. Mikroskopie	32
2.9. Angiogenese-Assay.....	33
2.10. PCR.....	34
2.10.1. Probenaufbereitung	34
2.10.2. Herstellung der cDNA	35
2.10.3. rtPCR	35
2.11. Verwendete Materialien	36
2.11.1. Chemikalien.....	36
2.11.2. Histologie.....	37
2.11.3. Operationszubehör / Tierhaltung.....	37
2.11.4. Geräte	38
2.11.5. Software	39
2.11.6. Lösungen.....	39
2.11.7. Kits	40
2.11.8. Zellkultur.....	41
2.11.9. Primer.....	41
2.11.10. Antikörper.....	42
2.12. Statistik.....	42
3. Ergebnisse	43
3.1. Charakterisierung der mikrozirkulatorischen Veränderungen und kardiovaskulären Funktion in EC-Ang2-on Tieren.....	43
3.1.1. Makroskopische Auffälligkeiten in EC-Ang2-on Tieren.....	43
3.1.2. Kapillar- und Perizytendichte in EC-Ang2-on Tieren	43

3.1.3.	Perizytenverlust in X-LacZ-4 Tieren nach Ang2 Transduktion.....	45
3.1.4.	Gefäßpermeabilität in EC-Ang2-on Tieren	45
3.1.5.	Änderung der kardiovaskulären Funktion in EC-Ang2-on Tieren.....	46
3.1.6.	Myokardiale Hypertrophie in EC-Ang2-on Tieren.....	49
3.2.	Effekt einer myokardial restringierten Ang2 Überexpression	50
3.2.1.	Kapillar- und Perizytendichte in CM-Ang2-on Tieren.....	50
3.2.2.	Änderung der kardiovaskulären Funktion bei transgener myokardialer Ang-2 Überexpression	51
3.2.3.	Herzmorphologie bei kardialer Angiopoietin-2 Überexpression	53
3.2.4.	Expressionsmuster in rAAV-CM Tieren.....	53
3.2.5.	Entwicklung systemischer und linksventrikulärer Drücke bei herzspezifischer AAV-Ang-2 Überexpression.....	54
3.2.6.	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser bei herzspezifischer AAV-Ang-2 Überexpression	55
3.3.	Kardiovaskuläre Funktion in Tieren mit peripherer Ang2 Überexpression	56
3.3.1.	Verteilungsmuster der Expression in rAAV2/7 transduzierten Tieren	56
3.3.2.	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser und entwickelter Druck in rAAV2/7.Ang2 Tieren.....	56
3.4.	Antagonisierung der endothelialen Angiopoietin-2 Überexpression durch Ang-1 und PDGF-B	57
3.4.1.	Expressionsmuster in rAAV2/9 transduzierten Tieren	57
3.4.2.	Kapillar- und Perizytendichte	58
3.4.3.	Gefäßpermeabilität	59
3.4.4.	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser	60
3.5.	Einfluss einer Inhibierung der Stickoxid-Bildung in EC-Ang2-on Mäusen.....	60
3.6.	Effekt von Ang-2 auf die Perizytenanlagerung <i>in vitro</i>	62
3.7.	Angiopoietin-2 im Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis	62
4.	Diskussion.....	64
4.1.	Veränderungen der Gefäßstruktur und Funktion unter moderater endothelialer Ang-2 Überexpression	64

4.2. Einfluss der Ang-2 vermittelten Gefäßdestabilisierung auf die kardiovaskuläre Funktion.....	66
4.3. Vergleich der kardiovaskulären Veränderungen in Mäusen mit herzspezifischer und herzaussparender Ang-2 Überexpression.....	68
4.4. Effekt einer Antagonisierung der Ang-2 Überexpression durch rAAV2/9 vermittelte Ang-1 und PDGF-B Transduktion	68
4.5. Hemmung der Stickstoffmonoxid Synthase im Mausmodell der endothelialen Ang-2 Überexpression	71
4.6. Angiopoietin-2 im Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis und klinischer Ausblick	71
5. Zusammenfassung.....	74
Abkürzungsverzeichnis.....	76
Literaturverzeichnis	80
Danksagung	91
Curriculum vitae	92

1. Einleitung

1.1. Die Angiopoietine und die Tie Rezeptor Tyrosinkinasen

Die Angiopoietine stellen eine Gruppe von Wachstumsfaktoren dar, die eine entscheidende Rolle in der Regelung der Endothelzellaktivität spielen. Die Familie der Angiopoietine besteht aus vier Glykoproteinen: Angiopoietin-1 (Ang-1), Angiopoietin-2 (Ang-2), Angiopoietin-3 (Ang-3) und Angiopoietin-4 (Ang-4). Bei Ang-3 und Ang-4 handelt es sich um orthologe Gene, die in Mäusen (Ang-3) und Menschen (Ang-4) gefunden wurden und, anders als andere strukturähnliche Proteine (Ang-x, Ang-y), auch an Tie-2 binden¹⁵⁹. Über die Wirkung dieser zwei Mitglieder der Angiopoietin Familie ist bisher jedoch wenig bekannt, anders als bei Ang-1 und Ang-2, die in den letzten Jahren intensiv untersucht wurden.

Angiopoietin-1 besteht aus 498 Aminosäuren und ist auf Chromosom 8q22 lokalisiert, Angiopoietin-2 besteht aus 496 Aminosäuren und ist auf Chromosom 8q23 lokalisiert. Die Aminosäuresequenzen von Ang-1 und Ang-2 besitzen eine Homologie von 60% und einen ähnlichen Aufbau: Beide Moleküle bestehen aus einer N-terminalen coiled-coil-Domäne und einer C-terminalen fibrinogen-like-Domäne^{24, 92}. Während Ang-1 von perivaskulären Zellen, wie smooth-muscle-cells und Perizyten produziert und sezerniert wird²⁴, wird Ang-2 in den Endothelzellen selbst produziert und in sogenannten Weibel-Palade-Körperchen (Weibel-Palade bodies, WPBs) gespeichert. Durch verschiedene Zytokine (z.B. Histamin und Thrombin) kommt es zur raschen Ausschüttung von Angiopoietin-2 aus den Endothelzellen⁴¹.

1.1.1. Die Tie Rezeptor Tyrosinkinasen

Die Tie-Rezeptor-Kinasen Tie-1 und Tie-2 (Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains) sind Endothelzell-spezifische Transmembranproteine mit einem Molekulargewicht von 135 (Tie-1) bzw. 150 (Tie-2) kDa. Sie werden auf den Endothelzellen von Lymph- und Blutgefäßen exprimiert. Tie-1 und Tie-2 sind zu 90% homolog und besitzen einen gleichen Aufbau: Der extrazelluläre Teil der Tie-Rezeptoren besteht aus drei zentralen „epidermal growth factor-like repeats“ (EGF-like repeats). Sogenannte EGF-Module finden sich in vielen Membranproteinen¹⁴⁵ und dienen bei den Tie-Rezeptoren als Angiopoietin-Bindungsstellen (siehe Abbildung 1). Die EGF-like repeats sind umgeben von drei immunoglobulinähnlichen (Ig-like) Motiven, zwei in N- und eines in C-terminaler Richtung. Daran schließen sich weiter in C-terminaler Richtung drei fibronectin type III Domänen an^{33, 91, 131}. Der intrazelluläre Teil beider Rezeptoren besteht aus zwei Tyrosin Kinase Domänen.

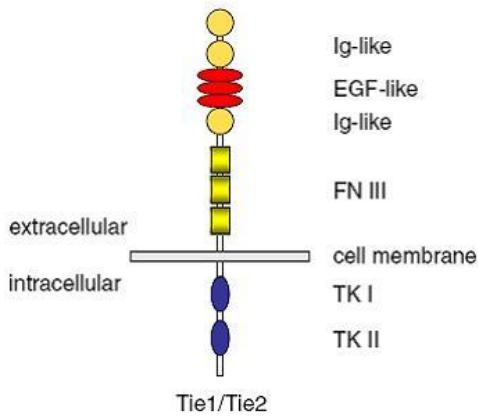


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Tie-Rezeptor Tyrosinkinasen mit der extrazellulären Domäne bestehend aus EGF- und Ig-like Motiven, fibtonectin type III Domänen und der intrazellulären Domäne mit den Tyrosinkinasen Motiven

1.1.2. Bindung der Angiopoietine an die Tie-Rezeptoren

Sowohl Ang-1 als auch Ang-2 binden an den Tie-2 Rezeptor, wobei nur die Bindung von Ang-1 zur Autophosphorylierung des Rezeptors und somit zur Signaltransduktion führt. Als kompetitiver Antagonist von Ang-1 bindet Ang-2 zwar auch an den Tie-2 Rezeptor, führt aber in der Regel nicht zu dessen Aktivierung⁹².

Um an den Tie-2 Rezeptor zu binden und ihn zu aktivieren, ist es notwendig, dass Ang-1 mindestens als Tetramer vorliegt⁷⁸. Die coiled-coil Struktur von Ang-1 ist hierbei unerlässlich, um mehrere Ang-1 Moleküle über Disulfidbrücken zu verbinden, während die fibrinogen-like Domäne für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich ist¹²⁰. An dem Tie-2-Rezeptor bindet Ang-1 sowohl an die erste Ig-like-Domäne als auch an die EGF-Repeats, wobei beide Domänen einzeln nicht ausreichen, um Ang-1 zu binden³⁹. Durch die Bindung von Ang-1 an den Tie-2 Rezeptor wird dieser dimerisiert und es kommt zur Autophosphorylierung des Rezeptors.

Ang-2 formt zwar auch Multimere und bindet an den Tie-2 Rezeptor mit gleicher Affinität wie Ang-1, induziert aber in der Regel nicht dessen Autophosphorylierung⁹². Unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel in vitro unter hohen Konzentrationen, kann Ang-2 jedoch zu einer Autophosphorylierung des Tie-2-Rezeptors führen⁷⁴. Bisher ist noch nicht bekannt, wo die molekulare Grundlage für den agonistischen - im Gegensatz zum antagonistischen - Effekt von Ang-2 auf den Tie-2-Rezeptor liegt. Mehrere Faktoren wurden mit der unterschiedlichen Wirkung von Ang-2 auf den Tie-2-Rezeptor in Verbindung gebracht. Bei dieser Frage spielen Überlegungen bezüglich konzentrationsabhängiger und zelltypspezifischer Effekte, der Dauer der Ang-2 Stimulation, der Anwesenheit von Corezeptoren und anderer Faktoren eine Rolle¹⁵⁰.

Für den Tie-1-Rezeptor fehlt bis heute ein Ligand, wobei eine neuere Arbeit von Saharinen et. al. andeutet, dass COMP-Ang-1, eine pentamerische Form von Ang-1, unter bestimmten Bedingungen an Tie-1 bindet¹²⁶. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Tie-1 mit Tie-2 heterodimerisiert⁹⁷ und die Signaltransduktion von Tie-2 beeinflusst^{97, 98, 157}. Tie-1 bleibt dennoch ein Rezeptor, über den wenig bekannt ist und dessen Wirkung und Rolle weiterer Aufklärung bedarf.

1.1.3. Bedeutung der Angiopoietine in Embryogenese und Inflammation

Tie-2 defiziente Mäuse zeigen eine deutlich gestörte Gefäßmorphologie mit einer geringeren Organisierung des Gefäßbaumes und einer Reduktion der Perizytendichte in den subendothelialen Schichten der kleinen Gefäße, bei einer embryonalen Letalität am Tag E10,5^{32, 129}. Ein ähnlicher, wenn auch geringer ausgeprägter Effekt konnte durch einen Knockout von Angiopoietin-1 erreicht werden¹⁴⁶. Interessanterweise führt auch eine (kardiale) Überexpression von Angiopoietin-1 zu schweren Defekten in der Entwicklung von Herz und Gefäßsystem. So sterben 90% der Tiere zwischen E12,5 und E15,5 mit fehlgeformten Herzen (dünne Herzwände, kardiale Hämorrhagien, vergrößerte Vorhöfe)¹⁶³. Die Überlebensfähigkeit Angiopoietine-2 defizienter Mäuse ist abhängig vom genetischen Hintergrund der knockout-Tiere. Grundsätzlich zeigen die Tiere eine Störung der Lymphangiogenese mit schwächer ausgeprägten Gefäßabnormalitäten¹³⁵. Bei der Untersuchungen der Linsen Ang-2 defizienter Mäuse konnten Gale et al. zeigen, dass ein Knockout von Ang-2 zunächst keine Auffälligkeiten in der Blutversorgung durch die A. Hyaloidea zur Folge hatte. In der Maus kommt es postnatal zu einer Rückbildung dieser Gefäße, welche in den Ang-2 Knockoutmäusen ausblieb. Dass die Veränderungen des lymphatischen Systems durch einen Knockin von Angiopoietin-1 in den Ang-2 Lokus unterdrückt werden konnten, die vaskulären Defekte aber weiterhin bestanden, deutet auf eine kontextabhängige Wirkung von Ang-2 hin^{45, 150}. Zuletzt zeigen transgene Tiere, die Angiopoietin-2 überexprimieren, erneut einen vergleichbaren Phänotyp wie Ang-1 und Tie-2 defiziente Tiere, mit einer noch früheren embryonalen Letalität am Tag E9,5-E10,5 und ausgeprägteren Gefäßdefekten⁹².

Im adulten Organismus herrscht ein Übergewicht von Ang-1 gegenüber Ang-2. So wird Ang-1 von mesenchymalen Zellen konstitutiv exprimiert¹⁴⁶, während die Ausschüttung von Ang-2 aus den Endothelzellen eines pathologischen Stimulus bedarf⁴¹. Unter physiologischen Bedingungen steht also die Aktivierung des Tie-2 Rezeptors und der folgenden Signalwege im Vordergrund. So wird im adulten Organismus das Überleben der Endothelzellen über die Aktivierung des PI3-Kinase-Akt Signalwegs gefördert⁸⁰. Die phosphorylierte Akt (Phospho-AKT) phosphoryliert ihrerseits diverse pro-apoptotische Proteine (z.B. BAD und Procaspase-

9), welche hierdurch inaktiviert werden¹⁶. Phospho-Akt aktiviert des Weiteren den anti-apoptotisch wirkenden Mediator Survivin¹¹⁵.

Weiterhin fördert Angiopoietin-1 die Anlagerung von Perizyten/SMCs, wie in den Ko-Kulturversuchen von Kobayashi et al. demonstriert wurde⁷⁹. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Rekrutierung muraler Zellen durch Ang-1 abhängig ist von den Wachstumsfaktoren HB-EGF (heparin binding EGF like growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor)^{62, 79}. Neben den Effekten von Ang-1 auf das Überleben von Endothelzellen und die Anlagerung muraler Zellen stabilisiert Ang-1 zudem die Kontakte zwischen den Endothelzellen. Unter anderem hindert Ang-1 die Internalisierung von VE-Cadherin, einem Ankermolekül, welches die Verbindung von Endothelzellen untereinander vermittelt und parazelluläre Permeabilität verringert²⁵. Dies geschieht über eine RhoA vermittelte Inaktivierung von Src, welches die VEGF-vermittelte Phosphorylierung und Internalisierung von VE-Cadherinen hemmt⁴⁶. Die antiinflammatorische Wirkung von Ang-1 wird weiterhin über eine ABIN-2 (A20 binding inhibitor of NF-κB activation-2) vermittelte Inhibierung des NF-κB Signalings bewirkt (siehe auch 1.4.1)⁶¹.

Durch die Ausschüttung von Ang-2 wird der kompetitive Antagonist Ang-1 von seiner Bindungsstelle am Tie-2 Rezeptor verdrängt, wodurch eine Reihe Ang-1 induzierter Effekte unterdrückt wird. Ang-1 ist in der Lage, die Gefäße gegen eine LPS-vermittelte Hyperpermeabilität zu schützen¹⁶⁶, wozu jedoch die Anwesenheit von Perizyten notwendig ist⁴⁴. Auch kann Ang-1 die Expression des Tissue Factor inhibieren, der eine zentrale Rolle in der Aktivierung der Gerinnungskaskade spielt und zur disseminierten intravasalen Koagulopathie beiträgt⁷⁷. Die VEGF-vermittelte Induktion der Leukozytenadhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin kann in Zellkulturversuchen von Ang-1 reduziert werden^{75, 76}. In - durch den plötzlichen Anstieg der Ang-2 Spiegel - aktivierte Endothelzellen kommt es zudem zu einer Gefäßregression, wenn kein weiterer Angiogenese fördernder Faktor (z.B. VEGF) vorhanden ist⁵⁸. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Signalwege und Effekte des Angiopoietin-Tie-2 Systems.

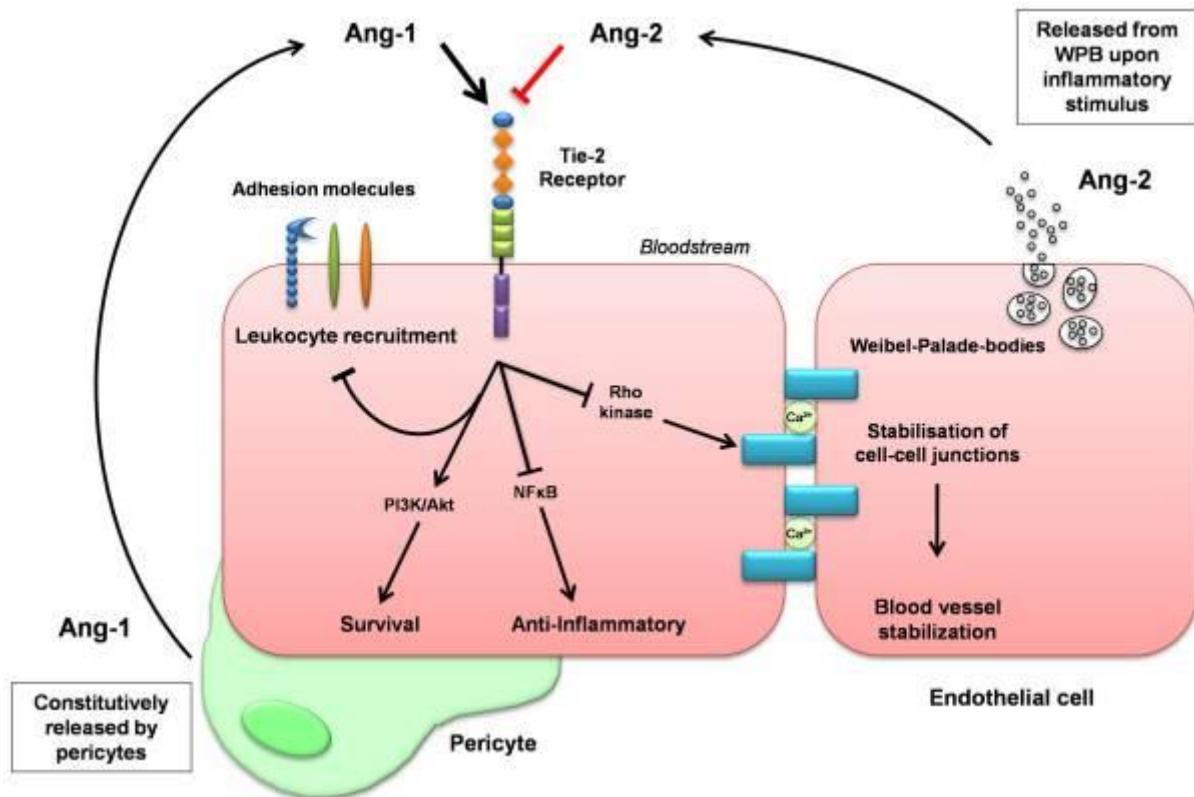


Abbildung 2: Darstellung der Wirkung des Angiopoietin-Tie-2 Systems. Ang-1 wird konstitutiv von Perizyten exprimiert und aktiviert den Tie-2 Rezeptor, was das Endothelzelleüberleben unterstützt, antiinflammatorische Wirkung (über NF-κB) entfaltet und die Zell-Zell Kontakte stabilisiert. Van Meurs et al.¹⁶⁰

1.2. Perizyten und glatte Muskelzellen

Perizyten sind Zellen, die sich aus mesenchymalen Stammzellen und Zellen der Neuralleiste entwickeln^{17, 19}. Zusammen mit den Endothelzellen sind sie an der Produktion der Extrazellulärmatrix beteiligt⁹³. Perizyten liegen nicht nur in der Nähe von Endothelzellen, sondern stehen über Gap Junctions, Adhesion Plaques und Peg-and-Socket Kontakte in direkter Verbindung mit den Endothelzellen. Bei Gap Junctions handelt es sich um Kontakte, über welche ein direkter Austausch zwischen dem Zytoplasma der Endothelzelle und des Perizyten erfolgen kann⁸⁷. Die Adhesion Plaques vermitteln eine Verankerung zwischen Endothelzellen und Perizyten, während es sich bei Peg-and-Socket Verbindungen um Stellen gegenseitiger Verzahnung handelt^{56, 125}. Über diese Verbindungen kann ein Perizyt über seine Zellausläufer Kontakt zu mehreren Endothelzellen aufbauen (siehe Abbildung 3)¹⁶⁵.

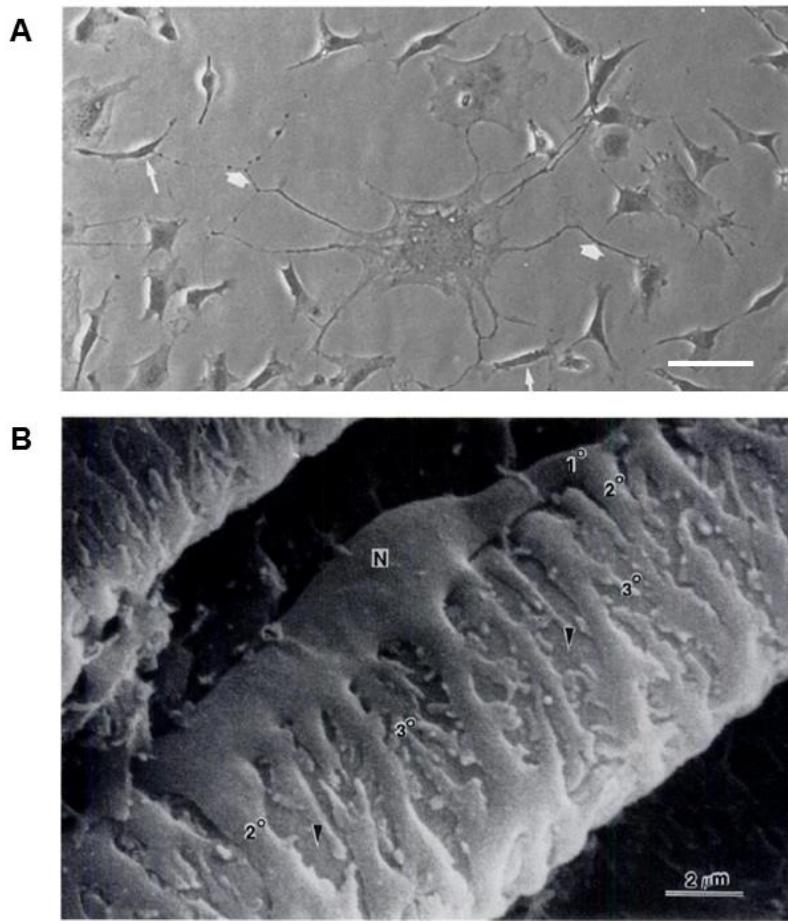


Abbildung 3: **A** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines Perizyten (Mitte) in Ko-Kultur mit Endothelzellen. Der Perizyt steht über lange Zellausläufer (kurze Pfeile) in Verbindung mit mehreren Endothelzellen. Endothelzellen in Kontakt mit Perizyten zeigen weniger Fortsätze (lange Pfeile). Maßstab 10 µm, modifiziert nach Orlidge und D'Amore¹¹¹ **B** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Perizyten, der die Oberfläche einer arteriellen Kapillare bedeckt. Die Markierungen 1°, 2° und 3° zeigen auf die Verzweigungen der Perizytenfortsätze, N markiert den Perizytenkern, der Pfeil die darunterliegenden Endothelzelle (aus Shepro und Morel¹³⁴).

Die glatten Muskelzellen der Gefäße (vascular smooth muscle cells, vSMC) umgeben größere Gefäße wie Venen und Arterien. Während die Endothellschicht der Kapillaren nur vereinzelt durch Perizyten besetzt ist, besitzen die großen Gefäße eine smooth-muscle-cell-Schicht aus mehreren Lagen²¹. Anders als die Perizyten sind vSMCs nicht in den Extrazellulärmatrix eingebettet⁴⁷. Ob es sich bei beiden Zelltypen um Varianten derselben Zelllinie handelt oder um unterschiedliche Zelltypen, ist bisher unbekannt¹¹.

1.2.1. Biologische Funktion von Perizyten

Obwohl Perizyten bereits zum Ende des 19. Jahrhunderts von Charles Rouget erstmalig beschrieben wurden, blieb ihre biologische Relevanz und Funktion lange Zeit unklar. In letzter Zeit rückten Perizyten jedoch in den Fokus von wissenschaftlichen Studien.

So scheinen Perizyten einen Einfluss auf die vaskuläre Permeabilität auszuüben. Diese Vermutung stammt zunächst von der Beobachtung, dass Perizyten in verschiedenen Geweben in unterschiedlicher Zahl vorliegen, wobei Gewebe mit wenig bis keinen Perizyten (Niere, Knochenmark, Leber) eine hohe Gefäßpermeabilität aufweisen, während z.B. im Gehirn ein ausgeprägter Perizytenbesatz vorhanden ist. Dort besteht mit der Blut-Hirn-Schranke eine Barriere zwischen Gefäßsystem und umgebendem Gewebe²⁸. Weiterhin konnten Daneman et al. zeigen, dass Perizyten zusammen mit Endothelzellen essentieller Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke sind. In ihrer Arbeit konnte anhand von PDGF-Rezeptor knockout Mäusen, welche eine gestörte embryonale Entwicklung von Perizyten aufweisen (siehe auch 1.3), gezeigt werden, dass eine transkardiale Perfusion mit Biotin zu einer deutlich gesteigerten zerebralen Extravasation dieses Markers führt²³.

Weiterhin enthalten Perizyten sowohl Actin- als auch Myosin-Filamente, welche für Zellmobilität und Kontraktion essentiell sind^{65, 161}. Diese finden sich in den Perizyten der präkapillären Arteriolen und postkapillären Venolen, jedoch nicht im Bereich der Kapillaren selbst¹⁰⁷. Dies legt die Vermutung nahe, dass Perizyten in der Lage sind, zu kontrahieren, was tatsächlich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte^{71, 155}. Die Kontraktion der Perizyten kann u. a. durch Serotonin und Histamin hervorgerufen werden, Stickstoffmonoxid führt zu einer Relaxation der Perizyten^{52, 72}. Perizyten scheinen somit in der Lage, den Blutfluss im Bereich der Kapillaren zu beeinflussen.

Neben der Fähigkeit zu kontrahieren und möglicherweise so den kapillären Blutfluss zu regulieren, nehmen Perizyten tiefgreifenden Einfluss auf die assoziierte Endothelzellschicht. So unterdrücken Perizyten auf der einen Seite über eine Aktivierung des Transforming Growth Factor-β (TGF-β) die Proliferation von Endothelzellen, wozu sie direkten Zell-Zell-Kontakt zu den Endothelzellen benötigen, wie in Abbildung 3 zu sehen^{96, 111}. Auf der anderen Seite produzieren Perizyten Faktoren, die zu Endothellproliferation und Bildung von neuen Gefäßen (tube formation) führen, wie zum Beispiel VEGF (vascular endothelial growth factor) und den bFGF (basic fibroblast growth factor)^{149, 164}. Diese Wachstumsfaktoren haben zudem einen ähnlichen Effekt auf die Perizyten selber. So reduziert TGF-β die Proliferation von Perizyten¹⁶⁹, während VEGF die Proliferationsrate in bovinen retinalen Perizyten (BRPCs) erhöht¹⁴⁸.

Perizyten sind demnach essentieller Bestandteil der Kapillaren und haben über die Produktion der Extrazellulärmatrix, über die Fähigkeit zur Kontraktion von Gefäßen und über die Regulation der Endothellproliferation einen tiefgreifenden Einfluss auf die Struktur und Aktivität der Endothelzellen im Bereich der Arteriolen, Venolen und Kapillaren.

1.3. Familie der Platelet Derived Growth Factors (PDGF)

Die Familie der Platelet Derived Growth Factors (PDGFs) besteht im Menschen aus fünf Proteinen, wobei es sich um Dimere handelt, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind⁵³. Es gibt vier verschiedene Polypeptidketten (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D), die sich zu Homodimeren und einem Heterodimer (PDGF-AB) verbinden. Die PDGFs wirken über zwei Rezeptor Tyrosin Kinasen: PDGF-Rezeptor α und PDGF-Rezeptor β (PDGFR- α / PDGFR- β)³. Hierbei binden die zwei Untereinheiten der PDGFs je einen Rezeptor, wodurch dieser dimerisiert, autophosphoryliert und die intrazelluläre Signalkaskade induziert (siehe Abbildung 4)¹³.

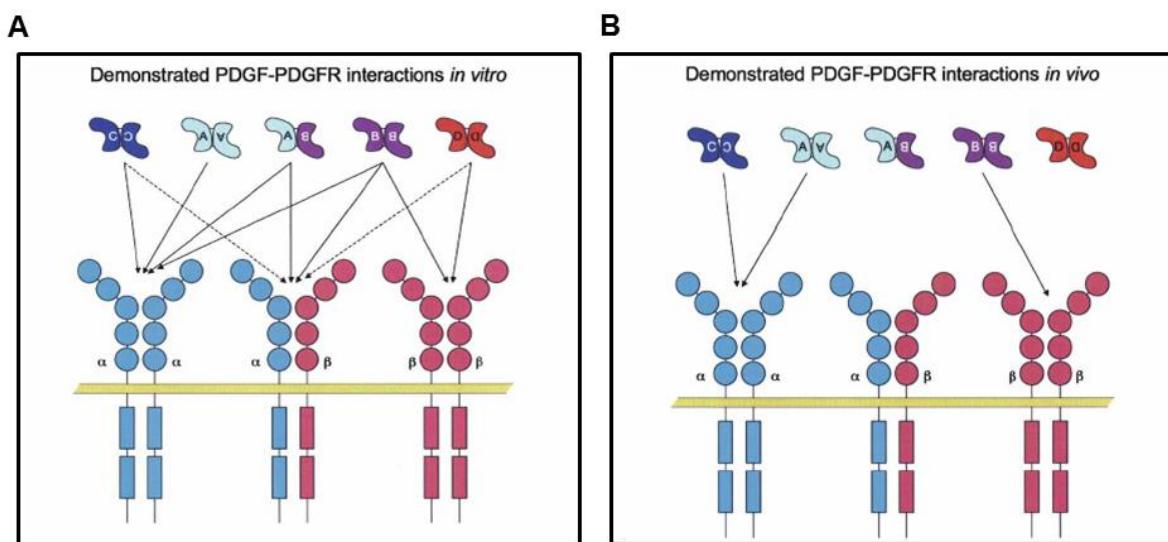


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interaktion der PDGFs und deren Rezeptoren. **Abb. A** zeigt die *in vitro* demonstrierten Interaktionen mit den entstehenden Rezeptordimeren (die gestrichelten Linien zeigen schwache Interaktionen oder widersprüchliche Ergebnisse). **Abb. B** zeigt relevante Interaktionen der PDGFs und der Rezeptoren *in vitro*, modifiziert nach Andrae et al.³

PDGFs werden von einer Reihe verschiedener Zelllinien exprimiert, darunter Fibroblasten¹¹⁶, SMCs¹⁰⁸, Endothelzellen²⁹, Neuronen¹²⁸, Makrophagen¹¹⁴ und den (namensgebenden) Thrombozyten (Platelets)⁶⁸. Die PDGFRs werden auf Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und auf Perizyten und vSMCs exprimiert⁵³. Hierbei werden zwar auf vSMCs beide Subtypen des Rezeptors exprimiert, auf Perizyten jedoch nur der PDGF-Rezeptor β ¹⁰, ¹³⁹. Der entsprechende Ligand, PDGF-B, wird hauptsächlich in Megakaryozyten, vSMCs und Endothelzellen exprimiert.

PDGFs lösen über ihre Rezeptoren einen starken Proliferationsreiz aus, welcher über verschiedene Signalwege vermittelt werden kann, unter anderem über den Ras-MAP Kinase¹⁰², den PI3 Kinase⁶⁰ und den PLC- γ Signalweg⁸⁵. Weitere Interaktionspartner des

PDGF-Rezeptors sind die Integrine, welche über zwischengeschaltete Proteine, z.B. Talin und Paxillin¹⁷¹, eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der Extrazellulärmatrix herstellen¹¹⁰. Über das Adaptorprotein NHERF unterstützt die Aktivierung der PDGF-Rezeptoren die Zellausbreitung und Migration.

1.3.1. Die Rolle von PDGF-B in Embryogenese und Inflammation

Sowohl ein Knockout von PDGF-B als auch von PDGFR-β geht mit massiven Hämorrhagien, Ödemen und einer embryonalen Letalität einher (Tag E11,5-E19 bei PDGF-B Defizienz, Tag E16-18 bei PDGFR-β Defizienz)^{88, 141}. In diesen Tieren wird ein Fehlen von Perizyten und vSMCs um die Gefäße herum beobachtet, welches, abhängig von dem jeweiligen Gefäßbett, unterschiedlich schwer ausfallen kann^{47, 82}. Auffällig ist hierbei, dass die ersten Schritte der Perizytenrekrutierung in der Embryogenese unabhängig von PDGF-B und dessen Rezeptor ablaufen und nur die weitere Proliferation und Anlagerung gestört ist. Die initiale Rekrutierung scheint über eine TGF-β vermittelte Differenzierung mesenchymaler Stammzellen herbeigeführt zu werden¹⁸. Die Rolle von PDGF-B in der Initiierung der Perizytenproliferation und Migration wird durch die Arbeit von Hellström et al. verdeutlicht. Dort konnte gezeigt werden, dass ein PDGF-B Knockout insbesondere im zentralen Nervensystem zu einem Verlust der Perizyten führt. Das initial avaskuläre zentrale Nervensystem ist hierbei abhängig von einer Ko-Migration der Perizyten zusammen mit einwachsenden Gefäßen, wobei dieser Prozess bei PDGF-B defizienten Tieren gestört ist (siehe Abbildung 5)⁵⁴.

Interessanterweise ist der Perizytenverlust bei PDGF-B Defizienz durch eine Steigerung der Ang-1 Spiegel reversibel. So konnten Uemura et al. in einem Modell der retinalen Angiogenese zeigen, dass die Blockierung des PDGFR-β durch einen Antikörper (APB5) einen ähnlichen Phänotyp wie eine Tie-2 oder Ang-1 Defizienz hervorruft, wobei die Applikation von Ang-1 zu einer deutlichen Stabilisierung der Gefäßstruktur führte. Die intravitreale Injektion von rekombinantem Ang-1 führte zu einer fast vollständigen Normalisierung der Gefäßdichte, des Radius des Gefäßnetzwerkes und der Durchmesser von Arterien, Venen und Kapillaren, wobei der APB5 vermittelte Verlust muraler Zellen nicht beeinflusst wurde¹⁵⁸. Weiterhin erscheinen die Veränderungen in Ang-1 oder Tie-2 defizienten Mäusen zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung als in PDGF-B defizienten Mäusen, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um zwei unterschiedliche, wenn auch eng verknüpfte Systeme handelt^{32, 88, 128, 139, 144}.

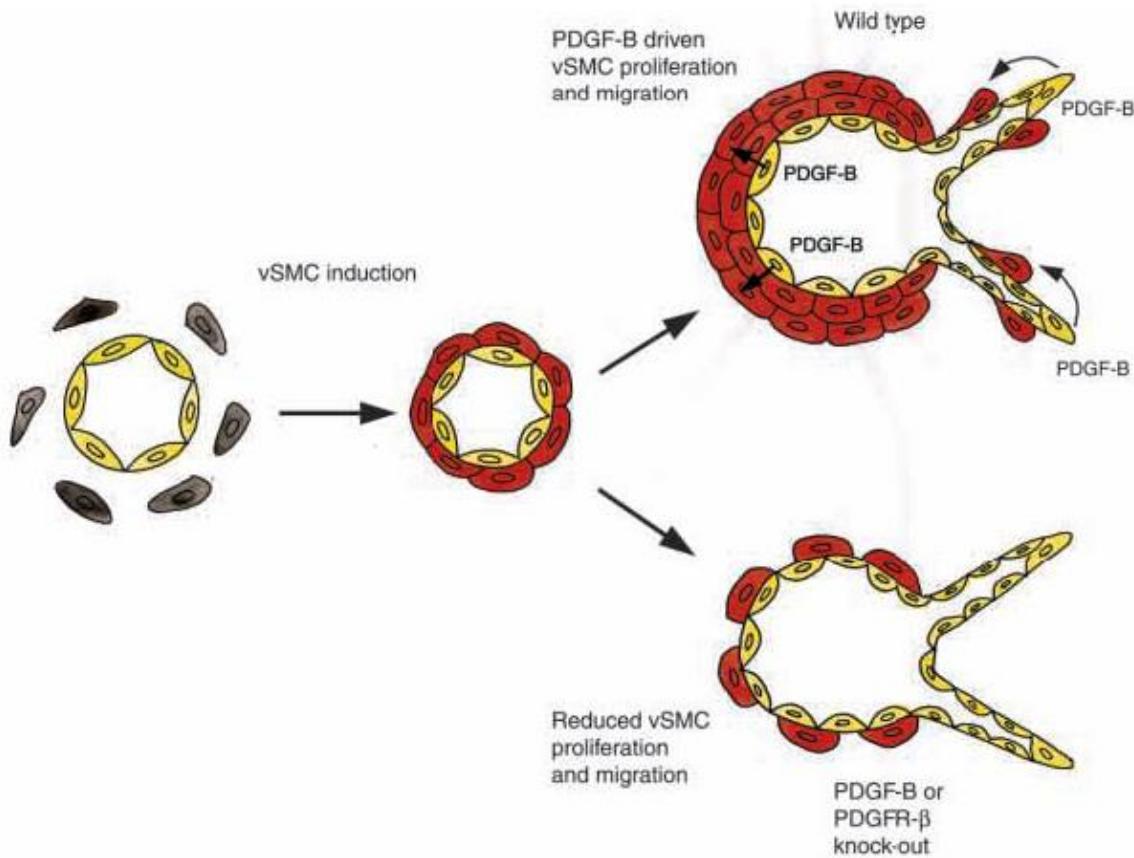


Abbildung 5: Darstellung der Induktion, Proliferation und Migration von SMCs während der Embryogenese. Die mesenchymalen Stammzellen (grau) differenzieren, u. a. durch Wirkung von TGF- β , zu glatten Gefäßmuskelzellen (rot), die die Endothelzellen (gelb) zunächst primitiver Gefäße umgeben. Endotheliales PDGF-B treibt eine Proliferation der SMCs und eine Ko-Migration an sprossenden Gefäßen an. Dieser Effekt wird durch einen Knockout von PDGF-B und dessen Rezeptor (PDGFR- β) gestört. Hellström et al.⁵⁴

Fuxé et al. konnten in einer kürzlich erschienenen Publikation zeigen, dass es während der Frühphase einer akuten Inflammation zu einer zahlenmäßigen Reduktion des Perizytenbesatzes der Kapillaren kommt und die verbleibenden Perizyten eine veränderte Morphologie mit einem plumpen Zellkörper und wenigen Zellfortsätzen im Vergleich zum ruhenden Zustand (dort liegen die Perizyten eng an mit einer Vielzahl von Ausläufern) zeigen⁴⁴. Dies ging einher mit einer Reduktion der PDGF-B Expression. Die Blockierung von PDGF-B verstärkt den Verlust der Perizyten, zudem nahm die Expression von M. pulmonis Genen (welche in dem benutzen Modell als Pathogen dienten) unter PDGF-B Inhibition zu, einer Verschlechterung der Infektionslage entsprechend⁴⁴.

1.4. Die Sepsis

Bei der Sepsis handelt es sich um eine systemische inflammatorische Reaktion des Körpers auf eine Infektion. Es besteht ein fließender Übergang von einer Sepsis über die schwere Sepsis bis hin zum septischen Schock als maximale Ausprägung. Definiert wird die Sepsis

über eine Reihe von Laborparametern, Vitalparametern, hämodynamischen Daten und Parametern zur Bestimmung einzelner Organfunktionen. Um die Diagnose einer Sepsis stellen zu können, müssen laut Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und Deutschen interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin e.V. folgende Kriterien erfüllt sein⁶⁶:

- I Nachweis der Infektion:
 - Durch mikrobiologischen Nachweis oder klinische Kriterien
- II Severe inflammatory response syndrome (mind. 2 Kriterien):
 - Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$)
 - Tachykardie $\geq 90/\text{min}$
 - Tachypnoe ($\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{pCO}_2 \leq 33 \text{ mmHg}$)
 - Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder –penie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$) oder unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Wenn die Diagnose einer Sepsis besteht und zusätzlich zu den oben genannten Kriterien Zeichen der Organdysfunktion bestehen, so spricht man vom Bild einer schweren Sepsis. Zeichen der Organdysfunktion sind hierbei:

- Akute Enzephalopathie (eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium)
- Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$.
- Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 75 \text{ mmHg}$ unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von $\leq 250 \text{ mmHg}$ unter Sauerstoffapplikation.
- Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0.5 \text{ ml/kg/h}$ für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein
- Anstieg des Serumkreatinins $> 2\times$ oberhalb des Referenzbereiches.
- Metabolische Azidose: Base Excess $\leq -5 \text{ mmol/l}$ oder eine Laktatkonzentration $> 1,5\times$ oberhalb des Referenzbereiches.

Von einem septischen Schock spricht man, wenn die Kriterien einer Sepsis erfüllt sind und zusätzlich trotz einer adäquaten Volumensubstitution eine systemische Hypotonie mit einem systolischen Blutdruck $\leq 90 \text{ mmHg}$ / mittlerem arteriellen Blutdruck $\leq 65 \text{ mmHg}$ besteht oder der Einsatz von Vasopressoren notwendig ist, um einen Blutdruck über diesen Werten zu halten.

1.4.1. Epidemiologie der Sepsis

Die Sepsis stellt eine der führenden Todesursachen weltweit dar, wobei die Inzidenz der Sepsis zunimmt. Lag diese in den Vereinigten Staaten von Amerika im Jahr 1979 bei 82,7 Fällen pro 100.000 Einwohnern, so erkrankten im Jahr 2000 bereits 240,4 von 100.000 Einwohnern, die Inzidenz hatte sich somit in diesem Zeitraum fast verdreifacht⁹⁹. In einer weiteren Studie von Angus et al. wurde u. a. untersucht, wie häufig die schwere Sepsis zu einer Hospitalisierung führt. Es konnte gezeigt werden, dass die schwere Sepsis für 2,1% – 4,3% aller Aufnahmen in die untersuchten Krankenhäuser und 11% aller Verlegungen auf eine Intensivstation verantwortlich war⁴. Ähnliche Zahlen existieren für Deutschland: In einer Studie, die 2007 publiziert wurde, untersuchten Engel et al. die Prävalenz und Mortalität der Sepsis und schweren Sepsis in 454 deutschen Intensivstationen. Die Prävalenz der Sepsis lag hier bei 12,4% bzw. 11% für die schwere Sepsis. Von den untersuchten 415 Patienten lagen für 382 adäquate Informationen zum weiteren Verlauf vor. Von dieser Patientengruppe starben 48,4% auf der Intensivstation und weitere 6,8% auf der Normalstation³⁵.

Die Sepsis stellt somit ein Krankheitsbild mit hoher Inzidenz und Mortalität dar. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte im Bereich der Sepsis-Forschung erzielt wurden, bleibt die Mortalität des Krankheitsbildes weiterhin sehr hoch.

1.4.2. Pathophysiologie

Am Anfang einer systemischen Entzündungsreaktion steht die Infektion des Körpers mit einem Erreger. Dies können Bakterien und Viren sein, aber auch Pilze und Parasiten. Die initiale Immunantwort auf Bestandteile der Erreger (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) wird durch eine Gruppe von Rezeptoren vermittelt (pattern recognition receptors, PRRs). Eine Untergruppe dieser PRRs stellen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) dar. Die meisten TLRs sind auf der Zellmembran von Makrophagen und dendritischen Zellen lokalisiert, wobei einzelne TLRs bestimmte Bestandteile der Erreger als Liganden besitzen. So dienen Peptidoglykane (Bestandteile grampositiver Bakterien) als Liganden für den TLR2, Lipopolysaccharide (Bestandteile gramnegativer Bakterien) als Liganden für den TLR4 und doppelsträngige DNA, welche im Lebenszyklus von RNA-Viren entstehen, als Liganden für den TLR3¹⁶⁸. Durch die Aktivierung der TLRs kommt es zur Produktion proinflammatorischer Zytokine. Hierbei können zwei getrennte Signalkaskaden unterschieden werden (siehe Abbildung 6). Über den MyD88 (myeloid differentiation protein 88)-abhängigen Signalweg kommt es zu einer NF-κB vermittelten Produktion von Zytokinen wie TNF-α, IL-6 und IL-12⁴⁸,¹⁴⁷. Über einen MyD88-unabhängigen Signalweg kommt es zur Induktion von Interferon-abhängigen Genen^{67, 70}.

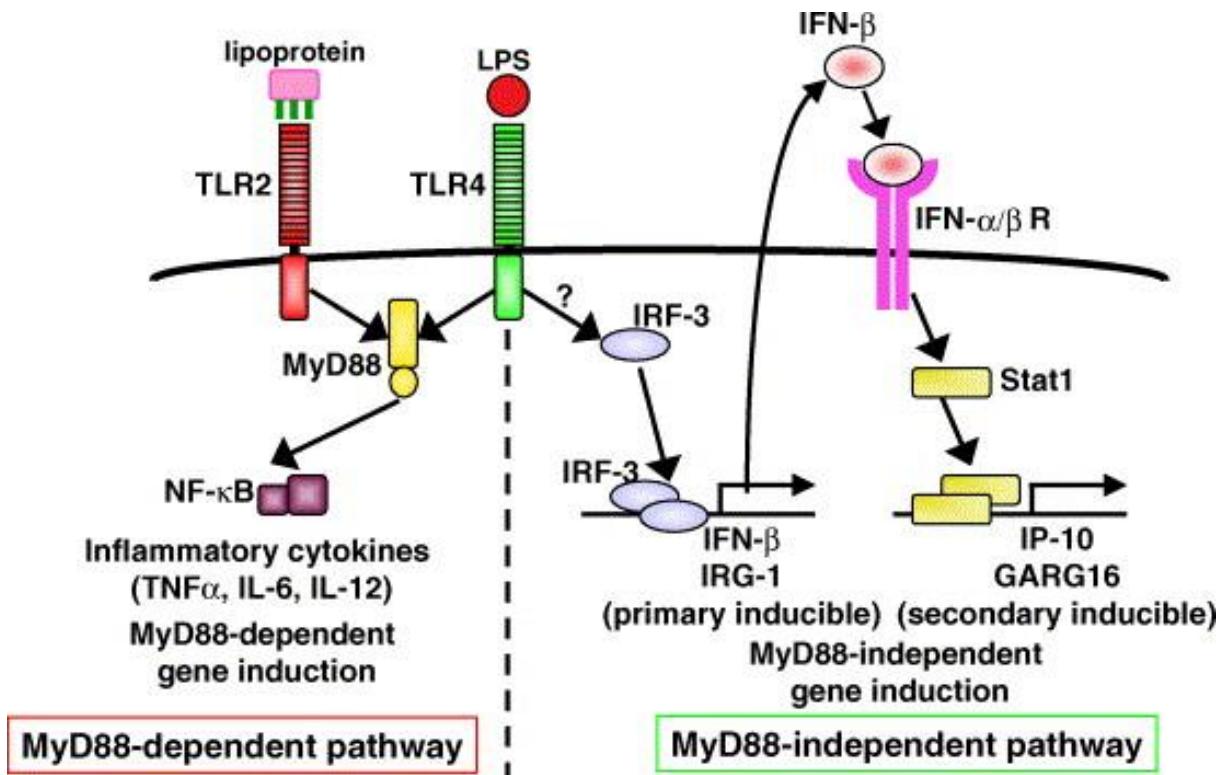


Abbildung 6: Darstellung der MyD88-abhängigen und -unabhängigen Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen nach Ligandenbindung an Toll-like Rezeptoren (Yamamoto et al.¹⁶⁸)

Eine weitere Gruppe von PRRs besteht aus den nucleotide oligomerization domain Rezeptoren, zum Beispiel NOD1 und NOD2⁴⁹, deren Liganden die Peptidoglykane sind. Eine dritte Gruppe von PRRs stellen die peptidoglykan recognition Proteine (PGRPs). Diese Familie besteht aus den membrangebundenen Proteinen PGRP-1α, PGRP-1β und PGRP-L sowie dem löslichen PGRP-S⁵.

Neben den oben beschriebenen, proinflammatorischen Stimuli kommt es im Rahmen einer Sepsis auch zur Aktivierung antiinflammatorischer Prozesse. So kann es in septischen Patienten zu einer Apoptose immunkompetenter Zellen kommen⁵⁹. Weiterhin zeigen neutrophile Granulozyten und Monozyten eine reduzierte Zytokinproduktion nach Stimulation mit Lipopolysacchariden^{95, 101, 106}.

Während der Sepsis kommt es zu einer Reihe von Veränderungen der Funktion von Endothelzellen und des kardiovaskulären Systems. Zum Beispiel wird im Rahmen einer Sepsis die Expression des Tissue Factors^{31, 112} auf zirkulierenden Monozyten gesteigert, was zu einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (disseminated intravascular coagulation, DIC) führt¹¹⁷.

Eine weitere Beeinträchtigung der kardiovaskulären Funktion besteht in der septischen Kardiomyopathie. Verschiedene Zytokine, wie z.B. TNF-α und Interleukin-1β, besitzen selbst ein kardiodepressives Potential⁸². Neben der Verschlechterung der kardialen Funktion durch

Zytokine wird außerdem die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) gesteigert, welches ebenfalls die myokardiale Funktion stört¹⁰⁵. NO ist weiterhin ein potenter Vasodilatator, welcher zu einer systemischen Hypotension führt¹¹⁸. Eine letzte schwere Beeinflussung der Kreislauffunktion besteht in der Entwicklung eines Kapillarlecks. Im Rahmen der Sepsis kommt es zur vermehrten Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und E-Selectin, welche durch TNF- α über den NF- κ B Signalweg vermittelt wird¹²¹. Diese führen zu einer Aktivierung von Leukozyten, welche eine Reihe zytotoxischer Substanzen, unter anderem Sauerstoffradikale, freisetzen¹³³. Weiterhin kann ein Kapillarleck im Rahmen einer Sepsis bereits durch die Erreger selbst hervorgerufen werden. So sind Lipopolysaccharide in der Lage, eine Endothelzellapoptose zu induzieren². Durch den entstehenden Endothelzellschaden kommt es zur Ausbildung eines Kapillarlecks und einer Flüssigkeitsverschiebung in das Intersititium.

Neben den hier beschriebenen Zytokinen kommt es im Rahmen einer Sepsis ebenfalls zu einer Ausschüttung von Angiopoietin-2. Durch inflammatorische Stimuli wird Angiopoietin-2 aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen freigesetzt⁴¹. Dementsprechend steigen die Blutspiegel von Ang-2 im Rahmen einer Sepsis an. So konnte ein Anstieg der Ang-2 Spiegel in gesunden Probanden durch eine Injektion von Lipopolysacchariden provoziert werden⁸⁴. Weiterhin gehen erhöhte Ang-2 Spiegel mit einer deutlich erhöhten Mortalität in septischen Patienten einher (siehe Abbildung 7)⁸³. Die zentrale Rolle von Ang-2 bei der Auslösung einer inflammatorischen Antwort wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Ang-2 defiziente Tiere nicht in der Lage sind, eine Reaktion auf inflammatorische Stimuli (Thioglycolat, Staph. aureus) zu generieren⁴⁰.

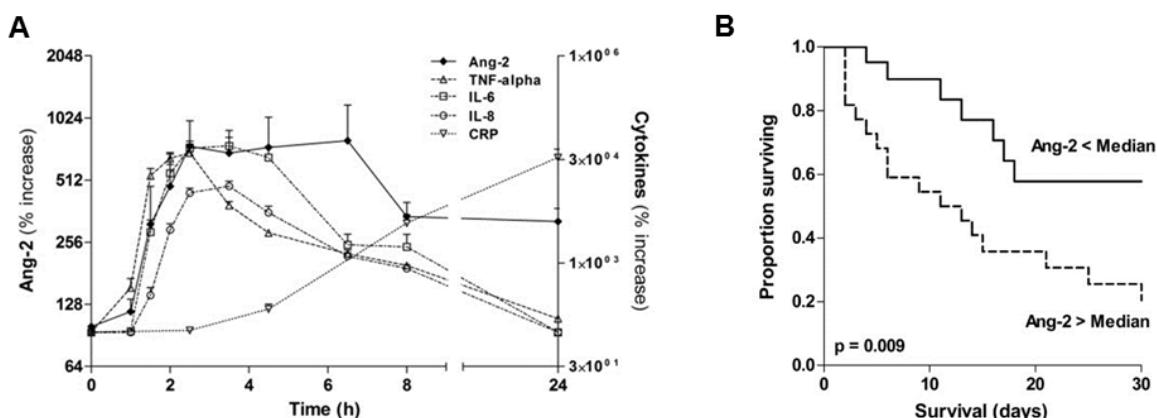


Abbildung 7: Abb. A zeigt den Verlauf des Anstiegs von Ang-2 und anderen Zytokinen nach i.v. Applikation von Lipopolysacchariden (4 ng/kg KG). Abb. B demonstriert die Steigerung der Mortalität, welche mit erhöhten Ang-2 Spiegeln in septischen Patienten einhergeht. Modifiziert nach Kümpers et al.^{83, 84}

1.4.3. Aktuelle Therapiekonzepte der Sepsis

Bei der Therapie der Sepsis muss die kausale von der supportiven Therapie unterschieden werden.

Die kausale Therapie konzentriert sich auf die Beseitigung der Sepsisursache. Hierbei steht neben der Sanierung eines möglichen Infektfokus (Wunde, Implantate, Abszesse) die antimikrobielle Therapie im Vordergrund, die (abhängig vom Erreger) aus Antibiotika, Virustatika oder Antimykotika besteht.

Bei der supportiven Therapie spielt die Aufrechterhaltung der hämodynamischen und respiratorischen Funktion eine Schlüsselrolle. Die wichtigste Maßnahme zur hämodynamischen Stabilisierung stellt die ausreichende Volumensubstitution dar, insbesondere durch kristalloide Lösungen (NaCl-Lösung, Ringer-Lösung). Sollte trotz der Volumensubstitution keine Stabilisierung eintreten, so kann eine Therapie mit vasoaktiven Substanzen (insb. Dobutamin) begonnen werden. Eine frühzeitige Beatmung wird empfohlen. Weitere Maßnahmen zur unterstützenden Behandlung bestehen aus der Durchführung von Nierenersatzverfahren (kontinuierliche venovenöse Hämofiltration, CVVH / intermittierende Hämodialyse, IHD), einer Thromboseprophylaxe, einer Ulkusprophylaxe und Transfusion von Erythrozytenkonzentraten bei Bedarf⁶⁶.

Durch die Volumensubstitution und Gabe von vasoaktiven Substanzen wird bereits die Problematik der systemischen Hypotension adressiert, eine Behandlungsmöglichkeit der kapillären Leckage besteht aktuell nicht, da die Wirkungsmechanismen nicht ausreichend verstanden sind.

1.5. Charakterisierung adenoassozierter Viren

Um die Genexpression in den EC-Ang2-on Tieren und C57BL/6 Mäusen zu verändern, wurden in der vorliegenden Arbeit adenoassoziierte Viren (AAVs) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Viren, die der Familie der Parvoviridae (Gattung der Dependoviren) angehören und von welcher aktuell 14 verschiedenen Serotypen bekannt sind¹⁵. Entdeckt wurden diese initial als Verunreinigung von Adenovirus-Isolaten^{8, 100}. Das Genom adenoassozierter Viren besteht aus einer Einzelstrang DNA mit 4,7 Kilobasen¹⁴³. Das Genom des Virus ist in einer Hülle aus drei verschiedenen Proteinen, die sich zu einem Partikel bestehend aus 60 Untereinheiten zusammensetzen, eingeschlossen. Die drei Hüll-Proteine (Vp1, Vp2 und Vp3) werden aus einem Gen durch alternatives Splicen und unterschiedliche Start-Codons hergestellt¹²⁷. Adenoassoziierte Viren (AAVs) sind nicht eigenständig replikationsfähig, sondern benötigen Helperviren, in der Regel Adenoviren. AAVs sind aber auch in der Lage, sich unter einer Koinfektion mit Herpesviren und humanen

Papillomaviren zu vermehren^{8, 152, 162}. Darüber hinaus besitzen AAVs eine deutlich geringere Immunogenität und Toxizität und führen, im Gegensatz zu Adenoviren, zu einer deutlich geringeren Immunantwort^{172, 173}. Zirka eine Woche nach Injektion von adenoassoziierten Viren erreicht die Expression des eingebrachten Transgens ein stabiles Niveau, welches über einen langen Zeitraum (Monate bis Jahre) hinweg gehalten werden kann^{73, 140}. Aufgrund der positiven Eigenschaften bezüglich Effizienz (Transduktion proliferierender und ruhender Zellen, Expression des Zielgens über einen langen Zeitraum) und Sicherheit (geringe Immunogenität, nicht replikationsfähig) wurde in den letzten Jahren begonnen, adenoassoziierte Viren im Rahmen klinischer Studien einzusetzen. Aktuell wird ein AAV-vermittelter Gen-Transfer in 105 klinischen Studien (bis Phase II) zur Behandlung diverser Krankheiten eingesetzt, u. a. Hämophilie B⁹⁴, Lebersche Kongenitale Amaurose¹³⁸, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel⁴² und zuletzt im Rahmen der CUPID-Studie bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz⁶⁴.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten adenoassoziierten Viren basieren auf dem AAV Serotyp 2. Die Einzelstrang-DNA dieses Virus besitzt zwei ORFs (open reading frame), welche für die Proteine rep (Replikation) und cap (Kapsid) codieren, sowie für zwei „ITR“ genannte Sequenzen, welche diese an beiden Seiten abschließen²⁷. Bei den rekombinanten adenoassoziierten Viren werden die zwei ORFs durch eine Kassette ersetzt, die für das Zielgen und einen Promoter (hier ein CMV-Promoter) codiert, sodass von dem ursprünglichen Genom lediglich die ITR-Sequenzen verbleiben.

1.6. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Angiopoietin-2 für das Herz-Kreislaufsystem zu untersuchen. Hierzu wurden transgene Mausstämme untersucht, die eine endotheliale, induzierbare oder aber eine kardiospezifische Ang-2 Expression aufwiesen.

Zur Bestimmung der kardiovaskulären Dysregulation wurden die Herzfunktion und Herzmorphologie untersucht. Weiterhin wurden Veränderungen der vaskulären Permeabilität ermittelt und der Status der Mikrogefäße histologisch beurteilt.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob eine zusätzliche AAV-vermittelte Transduktion mit Angiopoietin-1 (kompetitiver Antagonist von Ang-2) oder PDGF-B (Perizyten-rekrutierender Wachstumsfaktor) in transgenen Ang-2 übereexprimierenden Tieren einen Effekt auf Perizytenzahl, Kreislauffunktion und Herzmorphologie hat.

Zuletzt wurde in Pilotexperimenten untersucht, ob eine Blockade von endogenem Angiopoietin-2 mittels eines Ang-2 Antikörpers eine Reduktion der Mortalität im Rahmen einer LPS-induzierten Sepsis bewirken kann.

2. Material und Methoden

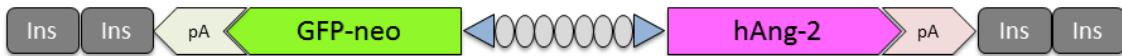
2.1. Versuchstiere

Für die Untersuchung der Angiopoietin-2 Wirkung wurden teils transgene Mausstämme verwendet.

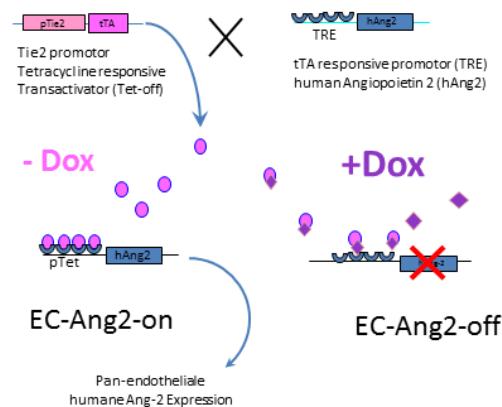
Bei den Tieren, die Angiopoietin-2 endothelzellspezifisch und induzierbar überexprimieren, handelt es sich um einen transgenen Mausstamm mit einem C57BL/6 Hintergrund. Dieser wurde freundlicherweise von Urban Deutsch aus dem Theodor Kocher Institut der Universität Bern zur Verfügung gestellt. Dort wurden auch die im Folgenden beschriebenen Konstrukte generiert und die Tiere verpaart und genotypisiert. Zunächst wurden zwei transgene Mausstämme durch Mikroinjektion eines Aktivatorkonstrukts oder eines Responderkonstrukts in befruchtete Eizellen von C57BL/6 Mäusen generiert^{57, 130}. Für das Aktivatorkonstrukt wurde ein Tetrazyklin-abhängiger Transaktivator zwischen ein 2,1 kB großes Tie-2 Promoterfragment und das darauf folgende erste Intron des Tie-2 Gens kloniert (Tie-2 tTA)²⁶. Das Responderkonstrukt enthält zunächst ein Tetrazyklin-response-element (TRE) bestehend aus sieben Wiederholungen der E. coli tet-operator sequence, flankiert von zwei 30 Basenpaar großen Fragmenten des CMV immediate early minimal promoter. Auf diese folgt wiederum zum einen der open reading frame von humanem Angiopoietin-2 und GFP (fusioniert mit dem ORF für die Neomycin Phosphotransferase). Zu beiden Seiten wird das Konstrukt abgeschlossen von poly(A) Signal des bovinen Wachstumshormons und zwei Wiederholungen der HS4 insulator Sequence des chicken β-Globulin (TRE-hAng2, siehe Abbildung 8 A)²⁶. Durch Paarung beider Mausstämme wurden im Anschluss doppeltransgene Mäuse generiert, welche sowohl das Aktivator- als auch das Responderkonstrukt tragen. Hierdurch kommt es durch das Aktivatorkonstrukt zu einer Expression des Tetrazyklin-Transaktivators, wobei durch die Kopplung an den Tie-2 Promoter der Transaktivator nur in Endothelzellen exprimiert wird. Dieser bindet an das TRE, wodurch die CMV-Promoter vermittelte Expression des humanen Angiopoietin-2 gestartet wird. Werden die Tiere mit Dozyzyklin-haltigem Futter gefüttert, so bindet das Dozyzyklin an den tTA, wodurch dieser vom Tetrazyklin-response element dissoziiert, was zu einer Beendigung der Überexpression führt (siehe Abbildung 8 B). Da eine Angiopoietin-2 Überexpression zu einer embryonalen Letalität führt⁹², wurden die Weibchen während der Schwangerschaft mit Dozyzyklin behandelt. Bei dem Nachwuchs der Verpaarung wurden Gewebeproben entnommen, um mittels PCR die Anwesenheit der Transgene zu überprüfen (hANG2 FW3, hANG2 REV3, tTA-FW2, tTA-REV1, für Primer-Sequenzen siehe Kapitel 2.11.9). Zur Geburt wurde Dozyzyklin abgesetzt, wodurch die Ang-2 Expression gestartet wurde. Mittels ELISA wurden die zirkulierenden hAng-2 Spiegel gemessen, wobei sich eine

progrediente Steigerung der Ang-2 Expression darstellte, die wie erwartet durch Gabe von Dozyzyklin auf normale Werte reduziert werden konnte (siehe Abbildung 8 C).

A



B



C

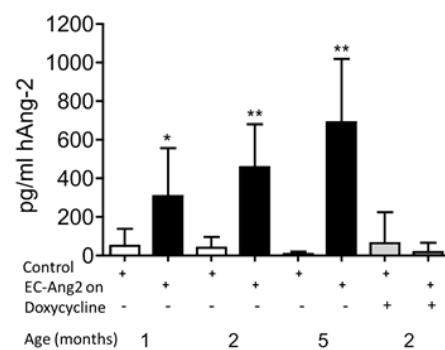


Abbildung 8: **A** Schematische Darstellung des Responderkonstrukt. *E. coli* tet-operator sequence (hellgraue Kreise), CMV immediate early minimal promoter (blaue Dreiecke). hAng-2 open reading frame (pink), GFP open reading frame (grün), bovine growth hormone poly(A) (rosa), HS4 insulator sequences (dunkelgrau). **Abb. B** beschreibt die Wirkung der Konstrukte im doppeltransgenen Tier. So führt die Gabe von Dozyzyklin zu einer Dissoziation des Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators von dem korrespondierenden Response Element (TRE) und somit zu einer Beendigung der transgenen Überexpression von hAng-2 **C** ELISA von Maus Serum in EC-Ang2-on Tieren und Kontrollen. Es zeigt sich eine progrediente Überexpression von hAng-2 in EC-Ang2-on Tieren, welche durch Gabe von Dozyzyklin beendet werden kann.

In einem weiteren transgenen Mausstamm, welcher eine auf Kardiomyozyten restriktierte Überexpression aufwies, stand die Expression des Tetrazyklin-Transaktivators nicht unter der Kontrolle eines Tie-2 Promoters, sondern unter der Kontrolle eines α -MHC Promoters.

Bei dem letzten transgenen Tierstamm, in welchem die Wirkung einer Angiopoietin-2 Transduktion auf den Perizytenbesatz untersucht wurde, handelte es sich um den X-LacZ-4 Mausstamm (zur Verfügung gestellt von Urban Deutsch, Theodor Kocher Institut Bern). Bei der Generierung dieser Mauslinie wurde das nsLacZ Reportergen in das Adipozyten-spezifische Gen adipocyte P2 (aP2) kloniert. Das Expressionsmuster in verschiedenen transgenen Mauslinien folgte jedoch keinem einheitlichen Muster, weshalb von einer zufälligen Integration in das Mausgenom ausgegangen wird. Wie die Expression des Konstrukt in den hier benutzten Tieren reguliert wird, ist aktuell unbekannt. In der Arbeit von Tidhar et al. wurde dennoch das LacZ-Expressionmuster im Rahmen der Embryogenese und im adulten Organismus untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass LacZ während der Embryogenese zunächst im Bereich des ventro-lateralen Dermatomyotom exprimiert, in der adulten Maus wird LacZ von glatten Muskelzellen und Perizyten kleinerer Gefäße produziert,

weshalb sich dieser Mausstamm zur Untersuchung von Perizyten eignet und in dieser Studie Verwendung fand^{50, 153}.

Die Tiere wurden in Gruppen von 2-4 Tieren in Makrolon-Käfigen (Type II L) gehalten, bei freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter unter kontrolliertem Tag-Nacht-Zyklus.

2.2. Versuchsablauf

Der Versuchsablauf für die EC-Ang2-on Tiere und deren Kontrollen wird in der Abbildung 9 dargestellt. Im Alter von zwölf Wochen begannen die Versuche zunächst mit einer Messung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers mittels Echokardiographie (siehe 2.5.4) und des systemischen Blutdrucks (siehe 2.5.3). Am Folgetag dieser Messungen wurden die Ang-2 überexprimierenden Tiere in fünf Gruppen eingeteilt. Während ein Teil der Tiere unbehandelt blieb und somit weiterhin eine endotheliale Überexpression von Ang-2 aufwies, wurde ein Teil der Tiere mit Dozyzyklin-Futter gefüttert, wodurch in dem Tet-Off-Promotersystem die endotheliale Ang-2 Überexpression ausgeschaltet werden konnte („EC-Ang2-off“).

Ein weiterer Teil der EC-Ang2-on Tiere wurde nach Durchführung der initialen Messungen im Alter von zwölf Wochen mit L-NAME behandelt. Dies wurde dem Trinkwasser zugefügt (1mg/ml) und, aufgrund der geringen Haltbarkeit von L-NAME, jeden Tag ersetzt (EC-Ang2-on + L-NAME). In zwei weiteren Gruppen wurde eine Transduktion mittels eines adenoassoziierten Virus, welcher das Gen für Ang-1 oder PDGF-B enthielt, durchgeführt („EC-Ang2-on + Ang1“ / „EC-Ang2-on + PDGF-B“). Hierzu wurden 5×10^{12} Partikel des AAV 2/9 CMV Ang-1 oder AAV 2/9 CMV PDGF-B in die Schwanzvene der Tiere injiziert.

Im Alter von 18 Wochen wurde eine erneute Echokardiographie und Blutdruckmessung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurde zudem die Messung der Gefäßpermeabilität durchgeführt (siehe 2.5.2). Im Alter von 24 Wochen wurde nach einer erneuten Durchführung der Echokardiographie und Blutdruckmessung die invasive Hämodynamikmessung durchgeführt (siehe 2.5.5), im Anschluss wurden die Organe entnommen und der Versuch beendet (siehe 2.6).

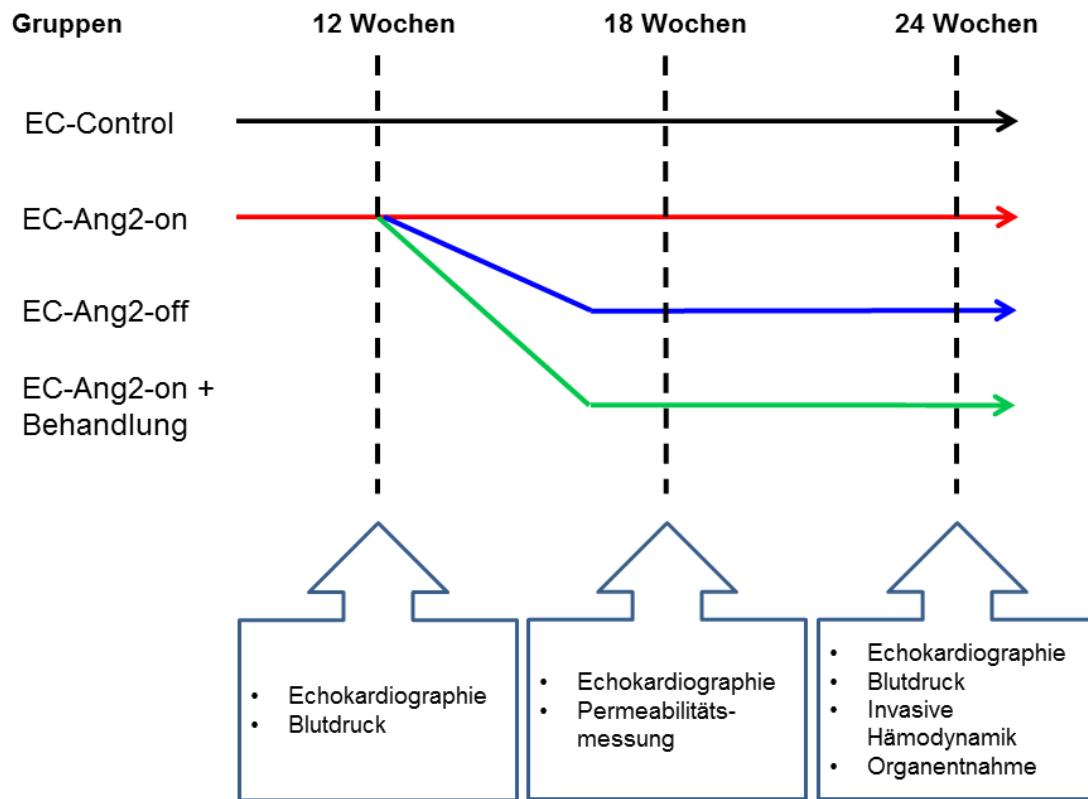


Abbildung 9: Darstellung des Versuchsablaufs für Versuchstiere mit endothelialer Angiopoietin-2 Überexpression. Nach einer initialen Messung des Blutdruckes und des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers wurden die Ang-2 überexprimierenden Tiere in vier Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde unbehandelt weiter beobachtet (EC-Ang2-on), während in einer zweiten Gruppe die Überexpression durch Gabe dozyzyklinhaltigen Futters ausgesetzt wurde (EC-Ang2-off). Neben der Abschaltung der Überexpression wurde ein Teil der Tiere mit L-Name behandelt, in zwei weiteren Gruppen wurden die Gene für Angiopoietin-1 und PDGF-B mithilfe eines rekombinannten adenoassoziierten Virus eingebracht (EC-Ang2-on + Behandlung). Die Tiere wurden einer erneuten Blutdruckmessung und einer Messung der Gefäßpermeabilität im Alter von 18 Wochen unterzogen, gefolgt von einer letzten Messung des LvEDD, des Blutdruckes und einer invasiven Hämodynamik-Messung. Im Anschluss wurden die Organe der Tiere entnommen.

Der Versuchsablauf für die Tiere mit myokardialer Ang-2 Überexpression wurde analog zu dem vorher beschriebenen Ablauf gestaltet. Hierbei entfielen jedoch die Messung der Gefäßpermeabilität und die Behandlung nach zwölf Wochen. In einer weiteren Reihe von Versuchen wurden C57BL/6 Mäuse mit Ang-2 codierenden Viren transduziert. Zum einen wurde der Sub-Serotyp AAV2/7 in einer Konzentration von 5×10^{12} Viruspartikel verwendet (rAAV2/7.Ang2), zum anderen der Sub-Serotyp AAV2/9 in einer Konzentration von 1×10^{12} (rAAV-CM-Ang2). Die Transduktion wurde ebenfalls nach der ersten Messung durchgeführt, verglichen wurden Ang-2 transduzierte Tiere mit ihren LacZ transduzierten Kontrollen (rAAV2/7.LacZ, bzw. rAAV-CM-LacZ).

2.3. Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis

Um den Effekt von Angiopoietin-2 im Rahmen einer LPS-induzierten Sepsis zu untersuchen, wurde zum einen eine systemische Inflammation durch intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden aus *E. coli* (20 mg/kg KG) in EC-Ang2-on und EC-Control Tieren

ausgelöst. Zum anderen wurden C57BL/6 Mäuse mit einem Kontrollantikörper (AP112, 20 mg/kg KG) oder einem Angiopoietin-2 Antikörper vorbehandelt. Der hier verwendete Angiopoietin-2 Antikörper (LC10, RO5485202, 20 mg/kg KG) wurde von Markus Thomas (Fa. Roche) zur Verfügung gestellt. 24 Stunden nach der Antikörperbehandlung wurden ebenfalls Lipopolysaccharide injiziert. Zu Beginn der Sepsis und alle zwölf Stunden im folgenden Beobachtungszeitraum wurde den Tieren zur Analgesie Buprenorphin i.p. verabreicht. Nach Beginn der Sepsis wurden die Tiere alle zwölf Stunden untersucht, um die Schwere der Sepsis zu beurteilen. Hierzu wurde ein Punktesystem verwendet, welches die Parameter Gewicht, Verhalten, Schmerz, Dyspnoe und Aszites beinhaltete. Die Punktevergabe für die einzelnen Kategorien ist in Tabelle 1 aufgeführt. Wenn ein Tier eine Gesamtpunktzahl von 20 oder mehr erreicht hatte, so wurde der Versuch beendet und das Tier wurde als verstorben registriert.

	0	5	10	20
Verhalten	Maus bewegt sich normal, Fluchtreflexe vorhanden	Maus verlangsamt, bewegt sich von allein	keine spontane Bewegung, nur nach Antippen	Maus regungslos, komatos
Gewichtsverlust	0-5%	5-10%	10-15%	>15%
Aszites	kein	mild	moderat	schwer
Dyspnoe	kein	mild	moderat	schwer
Schmerz	keine Anzeichen von Schmerz	gekrümmter Rücken, eingeschränktes Putzverhalten	verändertes Gangbild, Zittern	schwer

Tabelle 1: Zur Beurteilung der Sepsisschwere wurde ein Punktesystem verwendet, in dem in fünf Kategorien zwischen 0 und 20 Punkte vergeben wurden. Ab einer Punktzahl von 20 oder mehr wurde der Versuch abgebrochen.

2.4. Virenproduktion und Transduktion

2.4.1. Tripletransfektion von HEK293-Zellen

Zur Herstellung adenoassozierter Viren wurden HEK293-Zellen mit drei Plasmiden transfiziert (siehe Abbildung 10). Zunächst benötigt man ein Plasmid, welches die genetische Information des Helfervirus codiert (Adenovirus Helperplasmid). Dies ist notwendig, da adenoassoziierte Viren an sich nicht replikationsfähig sind. Hierbei handelt es sich um

adenovirale Gene zur Vervollständigung des späteren Virus. Weiterhin wird ein sogenanntes Transplasmid benötigt, welches die nötigen AAV-Anteile, inklusive der Rep- und Cap-Strukturen, codiert. Das letzte Plasmid codiert für das Transgen (in diesem Fall Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, PDGF-B, LacZ und GFP), den für die Transkription benötigten Promoter und die Inverted Terminal Repeat Sequenzen (ITRs), welche für die DNA Replikation und Enkapsulierung essentiell sind^{51, 176}.

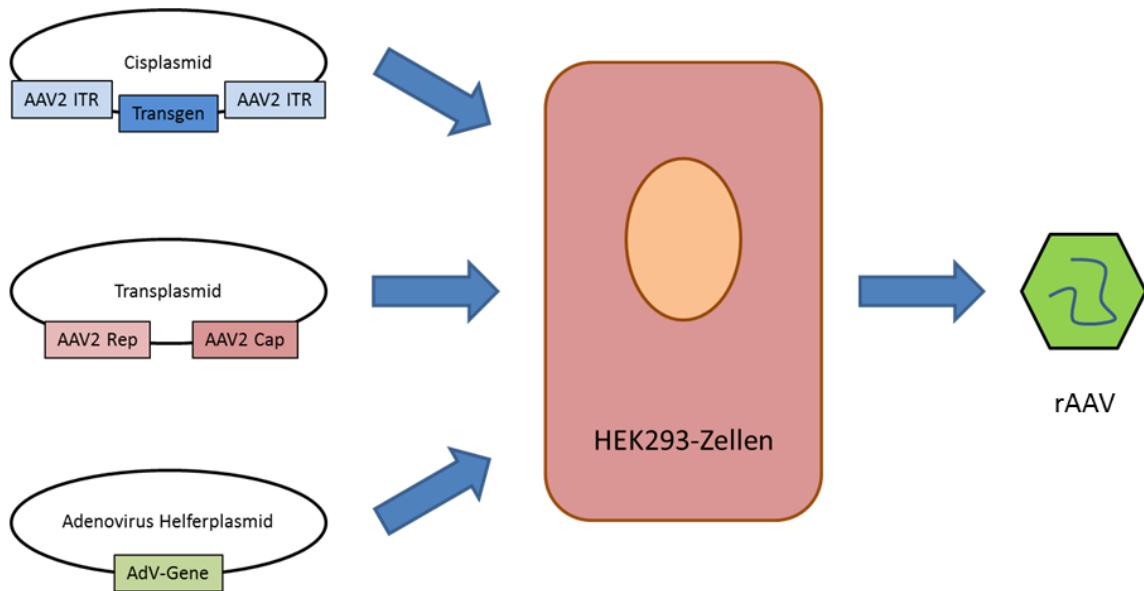


Abbildung 10: graphische Darstellung der Triple-Transfektion zur Herstellung rekombinanter adenoassozierter Viren in HEK293-Zellen.

Bei den Zellen zur Virenproduktion handelte es sich um Human Embryonic Kidney Zellen (HEK293). Diese wurden in Kulturmedium bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 10 % FCS und 1% Penicillin / Streptomycin in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Splitten der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen wurden mit einem 1 ml PBS gewaschen, im Anschluss wurden die Zellen bei 37 °C ca. zwei Minuten in 1 ml Trypsin inkubiert, wodurch sich die Zellen von der Kulturflasche lösten. Das Gemisch aus Trypsin und den Zellen wurde in Falcon Tubes überführt und mit 8 ml Kulturmedium aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation für fünf Minuten bei 2000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet im Kulturmedium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt und erneut im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

Die HEK293-Zellen wurden zunächst aus den Zellkulturflaschen in Zellkulturschalen überführt (147,8 cm²) und im Verlauf gesplittet und auf weitere Schalen verteilt, bis in 50 Zellkulturschalen eine Konfluenz von 70-80 % erreicht wurde. Das Medium wurde abgesaugt

und durch frisches, serumfreies Medium ersetzt. Nach einer Wartezeit von zwei Stunden wurde die Transfektionslösung hinzugegeben. Diese wurde wie folgt hergestellt: Für 50 Platten wurde zunächst 40 ml serumfreies Medium in einem 50 ml Falcon bereitgestellt. Dem Medium wurden 1300 µg des Adenovirus Helperplasmids (pA Δ F6), 650 µg des Transplasmids (p600) und 650 µg des Cisplasmids hinzugegeben und durch Vortexen vermischt. Die sich ergebende Lösung wurde auf vier Falcons verteilt (je 10 ml), 15 ml des serumfreien Mediums wurden in jedes Falcon hinzugegeben. In jedes der vier Falcon-Tubes wurden 1300 µg Polyethylenimin (PEI) pipettiert. Bei PEI handelt es sich um ein Polymer, welches positiv geladene DNA-Partikel umgibt und die Endozytose durch die negativ geladene Zellmembran erleichtert¹⁴. Nach erneutem Vortexen und einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2,1 ml der Lösung auf jede der Platten verteilt. Nach einer Wartezeit von vier Stunden im Inkubator wurde zu dem Medium 5 ml DMEM mit 50% FBS und 1% Pen/Strep hinzugefügt.

2.4.2. Ernte und Aufreinigung von AAV-Vektoren über Caesiumchloridgradienten

24 Stunden nach Beginn der Transfektion wurde das Zellmedium gewechselt, 72 Stunden nach Beginn der Transfektion konnten die Viren geerntet werden. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Falcon-Tube überführt. Das nach einer Zentrifugation bei 4000 rpm für 15 Minuten entstandene Pallet wurde über Nacht bei -80 °C gefroren.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Pellets bei 37 °C für zehn Minuten aufgetaut. Im Anschluss wurden die Pallets in 27 ml TMN-Puffer resuspendiert, auf ein Endvolumen von 35 ml aufgefüllt und auf Eis gelegt. Zur Lösung der Zellen wurde die Zellsuspension 3 x 30 Sekunden im Eisschrank sonifiziert. Zum Abbau freier RNA und DNA wurden anschließend 3 µl Benzonase zum Erreichen einer Endkonzentration von 25 U/ml hinzugefügt und die Suspension für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurden die Lysate alle fünf Minuten gewendet. Im Anschluss wurde 1,25 ml Desoxycholsäure (10 %) zum Aufschluss der Zellen hinzugefügt und zunächst zehn Minuten bei 37 °C und darauf 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der Inkubation folgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 15 Minuten bei 4 °C zur Reinigung des Lysats. Der Überstand wurde in ein frisches Falcon-Tube überführt. Zur Aufreinigung der Viruspartikel wurde eine Ultrazentrifugation und Dichtebestimmung über einen Caesiumchloridgradienten durchgeführt. Hierfür wurde zunächst Caesiumchlorid (CsCl) in die zuvor abpipettierten Überstände hinzugefügt (0,454g/ml Überstand / Endvolumen 32-34 ml). Als Nächstes wurde ein 2-Phasen Caesiumchloridgradient hergestellt. Hierzu wurden zunächst 9 ml einer CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1,41 p in 2 SW-28 Tubes pipettiert. Eine weitere Schicht aus 9 ml einer

CsCl-Lösung mit der Dichte 1,61 ρ wurde vorsichtig unter die erste Schicht pipettiert. Im Anschluss wurden je 16-17 ml des Zellysats hinzugegeben, ohne den hergestellten Dichtegradienten zu zerstören. Die durchschnittliche Dichte des CsCl-Gradienten entspricht bei diesem Ansatz der Dichte der Viruspartikel. Diese Mischung wurde nun für 18-20 Stunden bei 15 °C und 25.000 rpm zentrifugiert, wobei die Viruspartikel nach unten sinken. Nach der Zentrifugation wurde jeder Ansatz in 1 ml Schritten auf Eppendorf-Tubes verteilt.

Um zu bestimmen, welche Tubes AAV-Partikel enthalten, wurde aus 5 μ l jedes Tubes der Refraktionsindex mittels eines Refraktometers bestimmt. Befanden sich AAVs in den Proben, so lag dieser bei 1,362 – 1,373. Nur Fraktionen in diesem Zielbereich wurden für die folgenden Schritte verwendet, der übrige Anteil der Proben wurde verworfen. Fraktionen im Zielbereich wurden zunächst vereinigt, in zwei 70 Ti-quick-seal Röhrchen gegeben und bei Bedarf mit CsCl 1,41 ρ aufgefüllt. Die Röhrchen wurden verschlossen und bei 60.000 rpm für 20-24 Stunden bei 15 °C ultrazentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die verschlossenen Tubes mit einer 16G Nadel punktiert, 1 ml der Lösung wurde abgezogen und auf zwei Eppendorf-Tubes verteilt. Im Anschluss wurden die Tubes eröffnet, der Inhalt wurde in Fraktionen von 500 μ l auf Eppendorf-Tubes verteilt. Aus diesen Proben wurde erneut der Refraktionsindex bestimmt, wobei erneut Proben außerhalb des Refraktionsindex verworfen wurden. Es folgte eine erneute Ultrazentrifugation, im Anschluss wurden die Proben erneut in 500 μ l Fraktionen unterteilt. Der Brechungsindex wurde ein letztes Mal bestimmt und Proben, die außerhalb des Brechungsindex lagen, wurden verworfen. Für die letzte Messung des Brechungsindexes lag der Zielbereich bei 1,364 – 1,371.

Als letzten Schritt der Virenaufreinigung musste nun das Caesiumchlorid aus der Lösung entfernt werden. Hierfür kamen Zentrifugationsfilter zum Einsatz (Amicon Ultra-15). Diese wurden zunächst mit PBS angefeuchtet, gefolgt von 4-5 ml PBS und der Viruslösung. So entstand ein Endvolumen von ca. 12 ml, welches bei 3000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert wurde. Das resultierende Konzentrat wurde weitere 12-mal mit PBS gewaschen und zuletzt auf ein Endvolumen von 2 ml eingestellt.

2.4.3. Konzentrationsbestimmung mittel qPCR

Zur Bestimmung der Virenkonzentration in der Lösung wurde eine quantitative real-time PCR durchgeführt.

Zunächst wurde eine DNase Verdau der Viruslösungen durchgeführt, wozu das DNase Amplification Grade Kit verwendet wurde. Eine Mischung aus 10 μ l Probe, 4 μ l DNase, 10 μ l DNase-Puffer und 76 μ l dH₂O wurde hergestellt, welche 15 Minuten bei Raumtemperatur

inkubierte. Zur Inaktivierung der DNase wurden 2 µl 25 mM EDTA hinzugegeben, die Mischung wurde bei 65 °C für zehn Minuten inkubiert und im Anschluss auf Eis gelegt. Für die PCR wurde eine Standardserie aus einem CMV-Vektor Plasmid erstellt, welche aus vier seriellen Verdünnungen von 0,001 ng bis 1 ng bestand. Der Standard und die Proben wurden mit dem TaqMan-Mix und Primern für das viruspezifische bGH-Gen in die PCR-Gefäße pipettiert. Durch einen Vergleich der PCR-Kurven der Proben mit den Standard-Kurven konnte die Viruskonzentration bestimmt werden. Im Anschluss wurden die Viren bei 4 °C bis zu ihrer Benutzung gelagert.

2.5. Messung der Funktionsdaten

2.5.1. Narkotisierung und Antagonisierung

Zur Narkotisierung der Tiere wurde eine Mischung aus Midazolam, Medetomidin und Fentanyl verwendet („MMF“). Die Zusammensetzung der Narkosemischung ist in der unten dargestellten Tabelle zusammengefasst. Nach dem Wiegen der Tiere wurde die entsprechende Menge intraperitoneal injiziert.

MMF

Wirkstoff	Medetomidin (Dorbene vet.®)	Midazolam (Midazolam-ratiopharm®)	Fentanyl (Fentanyl-Janssen®)
mg/ml	1	1	0,05
ml	0,5	5	1
mg/kg KG	0,5	0,05	0,005

Nach Durchführung der Echokardiographie / Blutdruckmessung und der Permeabilitätsmessung wurde die Wirkung der MMF-Narkose durch eine gewichtsadaptierte Injektion des Antagonisten aufgehoben. Da die Halbwertszeit der Narkosemittel höher ist als die der Antagonisten wurden 2/3 der Menge intraperitoneal und 1/3 subkutan injiziert.

Antagonist

Wirkstoff	Atipamezol (Revertor®)	Flumazenil (Anexate®)	Naloxon (Naloxon Inresa®)
mg/ml	5	0,1	0,4
ml	0,5	5	3
mg/kg KG	2,5	0,5	1,2

2.5.2. Messung der Gefäßpermeabilität

2.5.2.1. *Die Multi Photonen Laser Scanning Mikroskopie*

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden sogenannte Fluorophore verwendet, bei denen es sich um Moleküle handelt, die nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, typischerweise zwischen 300 und 800 nm, Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Das Licht für die Anregung der Fluorophore stammt in der Regel aus Quecksilberdampflampen oder Lasern.

Bei der 2-Photonen-Mikroskopie werden die Fluorophore nicht durch Licht angeregt, welches im Exitationsmaximum des Fluorophors liegt, sondern durch Photonen, deren Wellenlänge im infraroten Bereich liegt (bis 1000 nm). Um mit diesen Photonen, die energieärmer sind als Photonen mit geringerer Wellenlänge, die Fluorophore anzuregen, müssen zwei dieser Photonen im Abstand weniger Femtosekunden auf das Fluorophor treffen. Dies geschieht nur in einem Fokuspunkt, in dem die Photonendichte hoch genug ist. Die 2-Photonen-Mikroskopie erlaubt eine um vielfaches größere Eindringtiefe in das Gewebe, des Weiteren ist die Phototoxizität für das Gewebe geringer und Fluorophore, die nicht in der Fokusebene liegen, werden nur sehr begrenzt angeregt.

2.5.2.2. *Durchführung der Permeabilitätsmessung*

Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer Injektion der MMF-Lösung zunächst narkotisiert (siehe 2.5.1). Ein Polyethylen-Schlauch (Innendurchmesser 0,28 mm) wurde an beiden

Enden mit einer 30G-Kanüle versehen, mit isotoner Kochsalzlösung gefüllt und in der Schwanzvene der Maus platziert und fixiert. Danach wurde das Mausohr flach unter das 2-Photonen-Mikroskop gelegt und eine beispielhafte Gefäßregion wurde aufgesucht. Angeregt wurde mit einer Wellenlänge von 860 nm, wodurch unter Benutzung eines 580/60 nm Filters das Fluoreszenzmolekül TRITC dargestellt werden konnte. Weiterhin kommt es bei Anregung mit hohen Wellenlängen zu dem Effekt der Frequenzverdopplung (second harmonics generation). Durch diesen Effekt gelingt die Darstellung von Kollagenfasern unter Benutzung eines 447/60 nm Filters ohne die Zugabe weiterer Fluorophore. Das zu untersuchende Areal wurde zunächst mithilfe der Autofluoreszenz aufgesucht und genauer durch die Benutzung von SHG festgelegt. Ein Bildausschnitt von 200 x 200 μm wurde in zehn Ebenen mit 4 μm Abstand aufgenommen. Dies wurde alle 15 Sekunden für insgesamt zehn Minuten durchgeführt (siehe Abbildung 11). Durch die Anfertigung dieser Schichtaufnahmen (Stacks) konnte der gewählte Bildausschnitt über den gesamten Zeitraum trotz der Atembewegungen des narkotisierten Tieres nachverfolgt werden. Nach der Anfertigung der ersten Aufnahme (Leeraufnahme), wurden 150 μl einer Mischung aus 4 kDa Dextran gelabelt mit TRITC und sterilem PBS (50mg/ml) in die Schwanzvene der Maus injiziert. Im Anschluss wurde die Narkose durch Gabe des Antagonisten beendet.

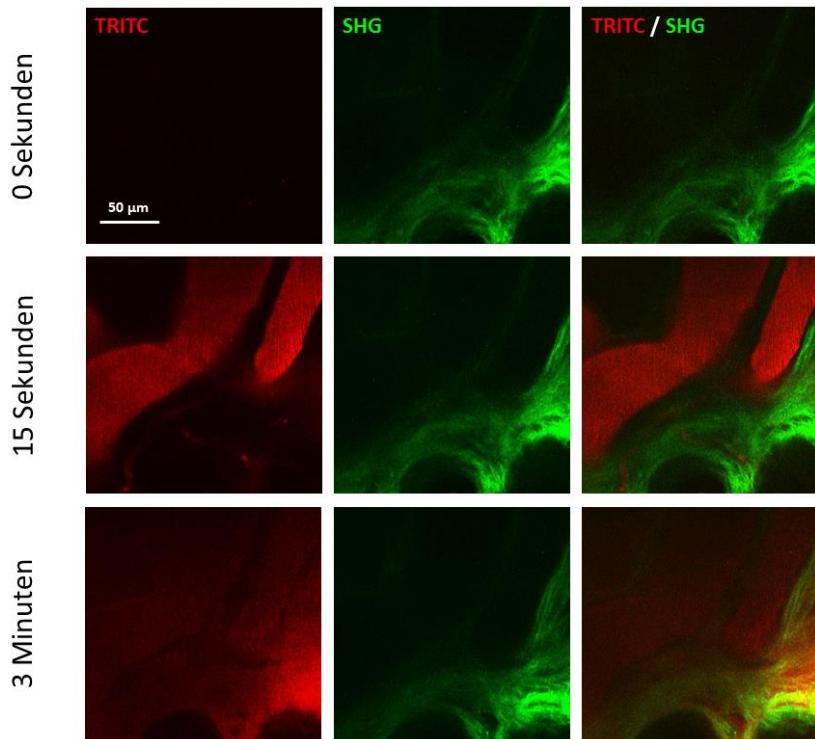


Abbildung 11: Darstellung der Fluoreszenz im Fluoreszenzbereich von TRITC, Second Harmonic Generation um Überlagerung beider Kanäle im Mausohr vor Injektion mit TRITC-Dextran, nach 15 Sekunden und drei Minuten.

Zur Analyse der Farbintensität wurde die Bildanalysesoftware ImageJ verwendet (W.S. Rasband, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Md, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2012). Analysiert wurden die mittleren Grauwerte (mean grey value / MGV) in drei repräsentativen, ca. $100 \mu\text{m}^2$ großen Arealen in direkter Nachbarschaft zum dargestellten Gefäß. Als Referenzpunkt diente die extravasale Fluoreszenz zum Zeitpunkt der maximalen intravasalen Fluoreszenz nach Injektion von TRITC-Dextran (in der Regel nach 15–45 Sekunden). Dieser MGV wurde als 100% extravasale Fluoreszenz definiert, die folgenden Werte wurden als Prozent des Startwertes berechnet.

2.5.3. Nicht-invasive Blutdruckmessung

Zu Beginn der Messungen wurden die Mäuse narkotisiert (siehe 2.5.1) und auf eine Wärmeplatte gelegt. Die nicht-invasive Blutdruckmessung erfolgte mithilfe eines Messsystems für Nagetiere. Zuerst wurde ein sog. Occlusion-Cuff (O-Cuff) über den Schwanz der Maus bis zur Schwanzwurzel gestreift, gefolgt von einem Volume-Pressure-Recording Cuff (VPR-Cuff). Bei der Messung wird im Occlusion-Cuff Druck aufgebaut und schrittweise wieder abgelassen. Mithilfe des VPR-Cuffs wird die wieder einsetzende Durchblutung des Schwanzes gemessen. Mithilfe der Systemsoftware konnte so der systolische Blutdruck, diastolische Blutdruck und Mitteldruck bestimmt werden (siehe Abbildung 12). Auf die Blutdruckmessung folgte die echokardiographische Vermessung des linken Ventrikels.



Abbildung 12: Darstellung einer Messung des Blutdrucks mithilfe des Coda Systems.

2.5.4. Echokardiographie

Die Vermessung des Herzens mittels Ultraschall erfolgte direkt nach der nicht-invasiven Blutdruckmessung, also bei noch narkotisierten Tieren. Die Mäuse wurden auf einer Wärmeplatte fixiert, wobei sie leicht auf die linke Seite gedreht wurden und der linke

Vorderlauf über dem Kopf fixiert wurde, um so die Rippen auseinander zu spreizen. Bei der so fixierten Maus wurden die Haare des linken Brustkorbs mit einer Enthaarungscreme entfernt. An das Echo-Gerät wurde ein 15 Mhz Schallkopf angeschlossen, welcher eine hohe Auflösung bei geringer Eindringtiefe erlaubt. Der Schallkopf mit dem Ultraschallgel wurde zuerst auf den Brustkorb aufgesetzt, um eine Querschnittsaufnahme des linken Ventrikels zu erhalten. Nachdem der linke Ventrikel so eingestellt war, dass er möglichst rund und in der Ebene der Papillarmuskeln zu sehen war, wurde ein Video von ca. drei Sek. aufgenommen und drei M-Mode Aufnahmen durch den linken Ventrikel. Danach wurde der Schallkopf um 90° gedreht, um einen Längsschnitt durch den linken Ventrikel zu erhalten, wovon dann auch ein ca. drei Sekunden langes Video aufgenommen wurde. Die Narkose der Maus wurde nach Beendigung der Aufnahmen antagonisiert (siehe 2.5.1). Bei einer späteren Auswertung konnte der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser in den gespeicherten Aufnahmen mithilfe der Systemsoftware ausgemessen werden.

2.5.5. Invasive Hämodynamikmessung

Nach dem Beobachtungszeitraum von sechs Monaten wurden die Herzfunktionen mittels invasiver linksventrikulärer Druckmessung bestimmt. Hierzu wurden die Mäuse gewogen, narkotisiert (siehe 2.5.1) und auf einer Wärmeplatte fixiert. Außerdem wurde den Mäusen eine Temperatursonde rektal eingeführt, um die Körperkerntemperatur konstant bei 37°C zu halten. Nach einem Hautschnitt etwas rechts der Trachea wurde diese frei präpariert. Ein Knoten wurde am kaudalen Ende der Trachea vorgelegt und ein PE-Schlauch wurde nach Einschnitt der Bänder in die Trachea vorgeschoben und mit dem vorgelegten Knoten fixiert, um die Atmung zu erleichtern. Darauf folgte die Freilegung der rechten A. carotis. Nach vorsichtiger Trennung der A. carotis vom N. vagus wurde die A. carotis kranial mit einem Faden ligiert und unter leichten Zug gebracht. Kaudal wurde eine Schlaufe um die Arterie gelegt und unter Zug gebracht, bis der Blutfluss in die Arterie versiegte. Außerdem wurde ein weiterer Knoten vorgelegt. Nach einer kleinen Inzision im kranialen Drittel wurde ein 1,4 french Millar Tip Pressure-Transducer mithilfe einer abgebogenen Kanüle in die A. carotis eingeführt. Nach Fixierung mit dem vorgelegten Knoten wurde der Zug von der distalen Schlaufe genommen und der Katheter in den linken Ventrikel vorgeschoben. Der richtige Sitz des Katheters konnte durch Überwachung der Druckkurve überprüft werden (siehe Abbildung 13 A). Der Messkatheter war über eine Transducer Control Unit (Model Tc-510) an einen Signalverstärker (DC Bridge Amplifier, Type 660) angeschlossen, von dem das Signal über einen BNC-Connectorblock (BNC Connector Block) und eine A/D-Wandler-Messkarte (DT301) auf einen Messrechner übertragen und aufgezeichnet werden konnte. Zur Darstellung und Analyse des Signals wurde das Programm DASYLAB verwendet. Mithilfe dieser Software konnte der linksventrikulär entwickelte Druck (als Differenz zwischen

maximalem systolischen und dem enddiastolischen Druck), die Anstiegsgeschwindigkeit (dP/dT_{max} und dP/dT_{min}) als Parameter für die globale Kontraktilität und Relaxation des Myokards und der linksventrikuläre enddiastolische Druck gemessen werden. Im Anschluss an die Messung dieser Parameter unter Ruhe wurde die rechte V. jugularis kanüliert. Die Vorbereitung der Vene wurde genauso vorgenommen wie schon bei der A. carotis. Nach Inzision der V. jugularis wurde eine Venenverweilkanüle in die Vene eingeführt, vorgeschnitten und fixiert, welche vorher an der Spitze gekürzt und mit 0,9% NaCl gefüllt wurde. Nun wurde mittels einer Mikroliterspritze 10 μ l einer Noradrenalin-Lösung in den Konzentrationen 10 ng, 25 ng, 50 ng und 100 ng injiziert, um neben der Baseline-Messung auch die Reservekapazität zu überprüfen (siehe Abbildung 13 B). Nach den Messungen wurde zur Beendigung des Versuchs über den Jugulariskatheter eine Kalium-Chlorid-Lösung appliziert. Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgte bei gleicher Operationstechnik (ohne Stimulation) unter Verwendung des Millar Aria Pressure Volume Conductance Systems.

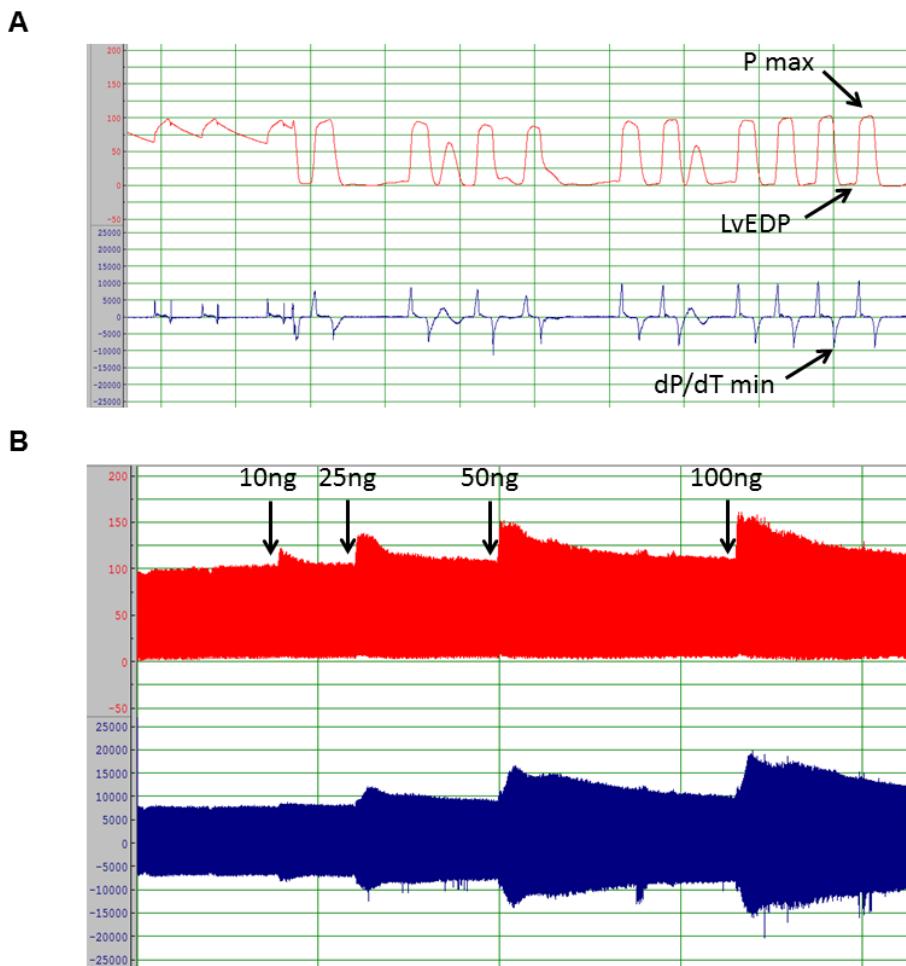


Abbildung 13: A Vergrößerung des Übergangs zwischen Aortendruckkurve und Druckkurve des linken Ventrikels. Die Beschriftung zeigt an, an welcher Stelle die Parameter gemessen wurden. Der entwickelte Druck (dP) ist hierbei die Differenz zwischen LvEDP und P_{max} . B Beispiel einer Stimulation mit Noradrenalin nach Platzierung des Katheters im linken Ventrikel mit aufsteigenden Dosen (10 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng).

2.6. Organentnahme und Aufbereitung

Nach der Durchführung der invasiven Hämodynamikmessung wurden bei den Tieren Herz und Schwanz entnommen, zum Zwecke des Virusnachweises bei den transfizierten Tieren und deren Kontrollen auch Leber, Milz, Niere und der M. quadriceps femoris. Die Organe wurden entnommen, gewogen und je nach weiterem Vorgehen entweder in Tissue Tek eingebettet und sofort auf Trockeneis gelegt, um Cryoschnitte anzufertigen, oder in 2 ml Eppendorf-Tubes überführt und auf Trockeneis gelagert, um für die PCR zur Verfügung zu stehen. Danach wurden alle Organe in einem Gefrierschrank bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Die für die Histologie bestimmten Organe wurden mit einem Gefriermikrotom in 7 µm dicke Präparate geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie in Objektträgerboxen bei -40°C gelagert.

2.7. Histologie

2.7.1. PECAM-1/NG2 Doppelfärbung

Durch immunhistochemische Färbungen ist es möglich, durch Anfärbung von zellreihenspezifischen Antigenen diese in einem histologischen Präparat darzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurden Färbungen für die Antigene PECAM-1 und NG2 durchgeführt. Bei PECAM-1 (Platelete endotheliale cell adhesion molecule-1, auch CD31) handelt es sich um ein Endothelzellmarker, bei NG2 (neuron-glial antigen 2, auch Chondroitinsulfat Proteoglykan) um einen Marker für Perizyten.

Zur Anfärbung von Endothelzellen und Perizyten wurden die gefrorenen Präparate zunächst aufgetaut und im Anschluss 15 Minuten in Aceton bei -15 °C fixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte in PBS gewaschen (3 x 5 Minuten). Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur in Antibody Diluent geblockt. Dieser wurde durch Abklopfen entfernt, der PECAM-1 Antikörper, verdünnt in Antibody Diluent, wurde auf die Schnitte gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C (mindestens acht Stunden) wurde der erste Primärantikörper durch Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss wurden die Präparate in dem Cy3-markiertem Sekundärantikörper zwei Stunden bei Raumluft inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt mit PBS (3 x 5 Minuten) wurde mit dem NG2 ebenso verfahren. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert, der zweite Sekundärantikörper (Alexa 488 markiert) zwei Stunden bei Raumluft. Nach einem letzten Waschschritt wurden die Schnitte getrocknet und in einem Mounting Medium, welches den blauen Kernfarbstoff DAPI enthält, unter einem Deckglas eingebettet.

2.7.2. X-Gal Färbung

Die X-Gal Färbung dient als Nachweis einer Transduktion mit dem Reportergen LacZ, welches für das Enzym β -Galaktosidase codiert. Durch die Spaltung von X-Gal entsteht Galaktose und 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindol, welches dimerisiert und zu 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo oxydiert, einem blauen Farbstoff.

Proben von LacZ-transduzierten Tieren und den X-LacZ-4 Tieren wurden aufgetaut und in einer 0,5%-igen Glutaraldehydlösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde die Fixierlösung durch Waschen (3 x 5 Minuten in PBS) entfernt. Die filtersterilisierte X-Gal Färbelösung wurde im Anschluss auf die Objektträger pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Objektträger wurden im Anschluss gewaschen und luftgetrocknet.

2.7.3. Masson Trichrom Färbung

Nachdem die Schnitte aufgetaut waren, wurden sie zunächst zehn Minuten bei 37 °C in Bouins-Lösung fixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gewaschen, bis die Gelbfärbung nachließ. Im Anschluss folgte eine Färbung mit *Weigerts* Eisen-Hämatoxylin-Lösung für 3-4 Minuten. Nach einer erneuten Waschung unter Leitungswasser für fünf Minuten, gefolgt von einer Spülung in deionisiertem Wasser, folgte ein weiterer Färbeschritt in Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung für 15 Sekunden, gefolgt von einer erneuten Spülung in deionisiertem Wasser. Als nächsten Schritt wurden die Schnitte zehn Minuten in Phosphowolfram-/Phosphomolybdänsäure-Lösung inkubiert, im Anschluss wurden die Schnitte in Anilinblau-Lösung für 15 Sekunden gefärbt. Nach einem Inkubationsschritt in 1%-iger Essigsäure für fünf Minuten und einer erneuten Spülung in deionisiertem Wasser erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkohollösung. Zunächst für fünf Minuten in 70%-igem Alkohol, gefolgt von einer Minute in 90%-igem Alkohol. Nach dem letzten Schritt (eine Minute in reinem Alkohol) wurden die Schnitte in Xylol geklärt, fixiert und getrocknet.

2.8. Mikroskopie

Die Aufnahmen der X-Gal und Masson Trichrom Färbung wurden an einem Axiovert 100 Mikroskop angefertigt, an welches eine Axiocam-Kamera angeschlossen war. Die Bildverarbeitung wurde an der systemeigenen Software (Axiovision) durchgeführt.

Für die Ablichtung der immunhistochemischen Aufnahmen wurde ein Axiovert 200M Mikroskop gekoppelt an das LSM510 META System verwendet. Die Bearbeitung der Bilder wurde in der Software LSM Image Browser durchgeführt.

Das verwendete System zur Durchführung der Permeabilitätsmessung besteht aus einem TriMScope, aufgebaut um ein Olympus BX 51 Mikroskop, ausgestattet mit einem einstellbaren Ultra II Titan : Saphir-Laser und einem optischen parametrischen Oszillator (typische Pulsbreite 200 fs, Repetitionsrate 80 MHz)¹²².

2.9. Angiogenese-Assay

Zur Untersuchung der Interaktion von Endothelzellen und Perizyten *in vitro* wurden Endothelzellen (mouse brain endothelial cells, bEnd3) und murine mesenchymale Zellen (ATCC-CCL-226) in einer Kokultur auf einer simulierten Extrazellulärmatrix, bestehend aus Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat Proteoglykan und Entactin, kultiviert (BD Matrigel®).

Bis zu ihrer Verwendung wurden die bEnd3-Zellen in Zellkulturflaschen in DMEM-Medium kultiviert, welches mit 10 % FCS und 1% Penicillin / Streptomycin versetzt wurde. Die ATCC-CCL-226 Zellen wurden in Gibco Basal Medium Eagle (BME) mit 1% Penicillin / Streptomycin und 10% FCS kultiviert.

Zu Beginn des Experiments wurden zunächst die bEnd3-Zellen auf eine 6-Well Platte ausplattiert und kultiviert, bis eine 70-80%-ige Bedeckung des Bodens erreicht wurde (in der Regel über Nacht). Im Anschluss wurden die Zellen mit Plasmiden transfiziert, welche das Gen für Ang-1, Ang-2 oder PDGF-B unter der Kontrolle eines CMV-Promoters enthielten. Als Kontrolltransfektion wurde pcDNA verwendet. Für jede Transfektion wurden 3 µl SatisFection® in 100 µl DMEM ohne FCS und ohne Antibiotikazumischung gelöst. In einem weiteren Ansatz wurden 2 µg der entsprechenden Plasmid-DNA ebenfalls in DMEM ohne FCS / Antibiotika gelöst. Beide Mischungen wurden zusammengeführt und inkubierten 15 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde das Gemisch auf die Zellen verteilt (ein Ansatz pro Well), die Zellen wurden zurückgestellt in den Brutschrank und verblieben dort für weitere 24 Stunden.

Vor der Ausplattierung der Endothelzellen wurden die Angiogenese µ-Slides vorbereitet. Hierzu wurden 12 µl Matrigel / Well von Angiogenese µ-Slides pipettiert. Im Anschluss wurden die Slides im Brutschrank inkubiert. Bevor die Zellen auf das Matrigel ausplattiert werden konnten, wurde das Medium abpipettiert und die Zellen wurden nach einem Waschschritt in sterilem PBS durch Trypsinierung (2 ml) von den Platten gelöst. Nach einer Resuspension des Trypsin / Zellen-Gemisches in 8 ml Endothelial Growth Medium (EGM) wurden die Zellen zunächst bei 2000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und in 1 ml EGM resuspendiert. Im Anschluss wurde zur Färbung der Zellen DiD (5µl/ml) hinzugegeben. Dieser lipophile Fluoreszenzmarker bindet an die Zellmembran und liegt im roten Fluoreszenzbereich. Nach einer Inkubation von 20 Minuten wurde das übrige DiD durch 3-

malige Zentrifugation (2000 rpm / fünf Minuten) und Resuspendierung in 1 ml EGM ausgewaschen. Die gefärbten Zellen wurden gezählt und 10.000 Zellen pro Well auf die μ -Slides pipettiert.

Nachdem die Endothelzellen im Matrikel Ringe geformt hatten (in der Regel nach 18 bis 22 Stunden), wurden die mesenchymalen Zellen hinzugegeben. Die Markierung mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff DiO erfolgte wie für die Endothelzellen beschrieben. Im Anschluss wurden 2500 Zellen / Well zu den Endothelzellen hinzupipettiert. Nach 24 Stunden wurden Bilder angefertigt und im Anschluss ausgewertet. Für die Quantifizierung wurden die Perizyten pro Ring ausgezählt.

2.10. PCR

Die PCR diente in der vorliegenden Studie zur Bestätigung der Virustransduktion. Hierfür wurden C57BL/6 Tiere mit dem entsprechenden Virus transduziert (Ang-1, Ang-2, PDGF-B) und die Organe wurden 14 Tage nach der Transduktion entnommen. Als Kontrolle dienten Tiere, die LacZ transduziert wurden.

2.10.1. Probenaufbereitung

Zur Aufreinigung von RNA aus den Gewebeproben wurde die RNA Isolations Reagenz Tri Reagent der Firma Sigma-Aldrich verwendet, welche sich an der Methode nach Chomczynski und Sacchi orientiert²⁰. Von den für die PCR bestimmten Proben wurden zunächst 100 mg abgewogen, in Tri Reagent gelöst und durch einen Ultra-Turrax homogenisiert. Das im Tri Reagent enthaltenen Guanidiniumthiocyanat führt hierbei zu einer Lyse der Zellen und Inaktivierung von Enzymen, insbesondere RNAsen. Das im Tri Reagent enthaltene Phenol löst Proteine und DNA. In dieser Lösung inkubierte die Probe fünf Minuten bei Raumtemperatur. Zur Phasentrennung wurde 200 μ l Chloroform hinzugegeben, gemischt und 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer Zentrifugation des Gemisches bei 4 °C und 12.000 g für 15 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert und in 500 μ l Isopropanol überführt. Eine Inkubation von zehn Minuten bei Raumtemperatur diente der Präzipitation der RNA, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g für zehn Minuten. Der nun entstandene Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-100 μ l resuspendiert.

Im Anschluss konnte der RNA-Gehalt der Mischung durch Photometrie bestimmt werden. Hierzu wurden 5 μ l RNA-Gemisch in 95 μ l H₂O verdünnt und in eine Küvette pipettiert. Die Absorption wurde bei 260 nm bestimmt und in ein Verhältnis mit der bei 280 nm gemessenen Proteinmenge gesetzt. Wenn das Verhältnis zwischen 1,9 und 2,1 lag, wurde die bestimmte RNA Menge mit vier multipliziert, auf 1 μ g/ μ l eingestellt und erneut gemessen.

Vor dem Umschreiben der RNA in cDNA musste die noch in dem Gemisch enthaltene DNA zunächst verdaut werden. Hierzu wurde eine DNase verwendet. 1 µl der Probe wurde mit 1 µl DNase Puffer, 1 µl DNase und 7 µl destilliertem Wasser vermischt. Die Probe wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA gestoppt (1 µl 25 mM EDTA). Zur Vorbereitung auf die Umschreibung der RNA in cDNA wurde die Probe zehn Minuten bei 70 °C inkubiert und im Anschluss auf Eis gelegt.

2.10.2. Herstellung der cDNA

Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde eine reverse Transkriptase der Firma Promega verwendet. Hierzu wurden folgende Bestandteile in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

	Menge
MgCl ₂ 25 mM	4 µl
Reverse Transkriptase 10x Puffer	2 µl
dNTO Mischung 10 mM	2 µl
Recombinant RNasin Ribonuklease Inhibitor	0,5 µl
AMV Reverse Transkriptase	0,5 µl
Primer	0,5 µg
RNA	1 µg

Diese Mischung wurde für 45 Minuten bei 42 °C inkubiert, für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und zuletzt fünf Minuten auf Eis gelegt. Die hieraus entstandene cDNA Lösung konnte bei -20 °C bis zur Durchführung der PCR gelagert werden.

2.10.3. rtPCR

Für die PCR wurde folgender Ansatz pro PCR-Tube pipettiert:

	Menge
cDNA	2 μ l
Primer forward	1 μ l
Primer reverse	1 μ l
Aqua dest.	6 μ l
Farbstoff SYBR Green [®]	10 μ l

Bei der quantitativen realtime PCR wird eine reguläre PCR durchgeführt, wobei sich der hinzugefügte Farbstoff mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Bei dem Farbstoff SYBR Green[®] handelt es sich um einen asymmetrischen Cyanin-Farbstoff, welcher nach Bindung an DNA blaues Licht absorbiert (λ 494 nm) und grünes Licht der Wellenlänge $\lambda = 521$ nm emittiert. In jedem Zyklus der PCR nimmt somit die Fluoreszenz des SYBR Green[®] zu, die Menge an PCR Produkten wurde als relatives Expressionslevel des Zielgens im Vergleich zu dem housekeeping-Gen GAPDH gemessen.

Für die Durchführung der PCR wurde das My IQ single color real-time PCR detection system der Firma Biorad verwendet.

2.11. Verwendete Materialien

2.11.1. Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Benzonase, Nuclease	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Bupernorphin (Temgesic [®])	Essex Pharma GmbH, München, DE
Caesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
EDTA	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Eisessig	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Ethanol \geq 99,5%	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Kaliumhexacyanidoferat(II)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Kaliumhexacyanidoferat(III)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
KCl	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
L-NAME	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
LPS aus E. coli	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
NaCl	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Trizma® base	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Xylol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE

2.11.2. Histologie

5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Acrodisc® Filter	Pall, Dreieich, DE
Antibody Diluent	Dako Cytomation, Hamburg, DE
Deckgläser	Gerhard Menzel, Braunschweig, DE
Glutaraldehyd, 25 % in H ₂ O	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Vecta Shield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.11.3. Operationszubehör / Tierhaltung

1M Kaliumchlorid	Baxter, Unterschleißheim, DE
4kDa TRITC-Dextran	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Anexate®	Roche, Mannheim, DE
Dorbene Vet®	Pfizer Tiergesundheit, Berlin, DE
Durapore Pflaster 1,25 cm	3M Deutschland GmbH, Neuss, DE
Fentanyl	Janssen-Cilag, Neuss, DE
Futter Dox S8031-P001 PS M-Z	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE
Futter Standard Mäuse	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE
Käfig Eurostandard Type II L	Tecniplast S.p.A., Buguggiate, IT
Lignocel Einstreu	J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, DE
Midazolam	Ratiopharm, Ulm, DE

Mikroliterspritze 710N	Hamilton, Reno, USA
Millar Tip Pressure-Transducer	Millar Instruments, Huston, USA
Millar Aria Pressure-Volume Conductance System	Millar Instruments, Huston, USA
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Naloxon	Inresa, Freiburg, DE
Noradrenalin (Arterenol®)	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, DE
Pilca Med	ASID BONZ, Herrenberg, DE
Portex® Fine Bore Polythene Tubing	Smiths Medical, Grasbrunn, DE
Revertor®	CP-Pharma, Burgdorf, DE
Sonosid Ultraschallgel	ASID BONZ, Herrenberg, DE
Sterican® 30 G x ½	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Tissue Tek Einbettmedium	Sakure Fintek Europe, Zoeterwoude, NL
Vialon 22G Kanüle	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE

2.11.4. Geräte

15L8 Schallkopf	Siemens, München, DE
Acuson Sequoia 512	Siemens, München, DE
Axiocam HRc	Carl Zeiss, Jena, DE
Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena, DE
Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena, DE
BNC Connector Block	HSE, Hugstetten, DE
BX 51 Mikroskop	Olympus, Hamburg, DE
CODA 2 Blutdruckgerät	Kent Scientific Corporation, Torrington, USA
DC Bridge Amplifier	HSE, Hugstetten, DE
DT301 A/D-Wandler-Messkarte	Data Translation, Bietigheim Bissingen, DE
Flow MSC.12	Jouan GmbH, Unterhaching, DE
Heizblock	Perkin Elmer, Überlingen, DE
Inkubator Binder CB150	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Inkubator EB55	Jouan GmbH, Unterhaching, DE
Laboport Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Leica Cryostat 3050	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
LSM510 META	Carl Zeiss, Jena, DE
My IQ real-time PCR detection system	Biorad Laboraties GmbH, München, DE
OPO Chameleon Oszillatator	APE, Berlin, DE

Optima ® L-80XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Refraktometer	PCE Instruments, Meschede, DE
Rotor Ti 70	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, DE
SW-28 Rotor	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Tiefkühlschrank (-80) Colora UF80 450-S	Colora Messtechnik GmbH, Lorch, DE
Transducer Control Unit	Millar Instruments, Huston, USA
TriMScope	LaVision Biotec, Bielefeld, DE
Ultra II Titan : Saphir-Laser	Coherent, Dieburg, DE
Ultraschallbad (Sonorex TK52H)	Bandelin electronic, Berlin, DE
Vortex-Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waage Scout	Ohaus Europa, Nänikon, CH
Wärmeplatte	FMI Föhr Medical Instruments, Seeheim, DE
Zentrifuge: Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, DE

2.11.5. Software

DASYLAB	National Instruments Germany GmbH, München, DE
ImageJ	U. S. National Institutes of Health, Bethesda, USA
LSM 5 Image Browser	Carl Zeiss, Jena, DE
MyIQ exe. Version: 1.0.410	Biorad Laboraties GmbH, München, DE
Software Axiovision Version 4.7	Carl Zeiss, Jena, DE

2.11.6. Lösungen

20x KC	Menge
K ₃ Fe(Cn) ₆ 0,5M	250 µl
K ₄ Fe(Cn) ₆ 0,5M	250 µl
PBS	25 ml

Bouins-Lösung	Menge
Formaldehyd 37%	25 ml
Pikrinsäure	75 ml
Eisessig	5 ml

PBS	Menge
NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
dH ₂ O	auf 1000ml
pH	7,4

PBS +	Menge
MgCl ₂ 1M	100 µl
PBS	100 ml

TMN-Puffer	Menge
MgCl	1 mM
Tris	50 mM
pH	7,4

X-Gal Lösung	Menge
PBS +	20 ml
X-Gal 40 mg/ml	500 µl
20x KC	1 ml

2.11.7. Kits

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
GoScript® Reverse Transcriptase	Promega GmbH, Mannheim, DE
Masson Trichrom	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
RNAeasy Mini Kit 50	Qiagen GmbH, Hilden, DE
SYBR Green®	Biorad Laboratories GmbH, München, DE
TaqMan Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE

2.11.8. Zellkultur

µ-Slide, Angiogenesis	Ibidi, München, DE
Amicon Ultra-15, Zentrifugationsfilter	Millipore GmbH, Schwalbach, DE
BD Matrigel®	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Eppendorf Tubes 1,5 ml	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Falcon Blue Max 15 ml	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Falcon Blue Max 50 ml	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Fetal calf serum	Biochrom AG, Berlin, DE
Gibco® DMEM Medium	Biochrom AG, Berlin, DE
Gibco® BME Medium	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Penicillin / Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, DE
Satisfaction® Transfection Reagent	TPP AG, Trasadingen, CH
Sterican 16G Kanüle	B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen, DE
SW28 Ultrazentrifugations-Tubes	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Ti 70 Ultrazentrifugations-Tubes	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Trypsin / EDTA 0,05% / 0,02%	Biochrom AG, Berlin, DE
Vibrant DiD	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Vibrant DiO	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Zellkulturflaschen 25 cm ²	Biochrom AG, Berlin, DE
Zellkulturplatten, 6-well	Biochrom AG, Berlin, DE
Zellkulturschalen 147,8 cm ²	Biochrom AG, Berlin, DE
Zellschaber, 25cm, Klinge 17cm	Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht, DE

2.11.9. Primer

Ang1 fw	5'GGCCACAAGCATCAAACAC
Ang1 rev	5'AATGGACTGGGAAGGGAACC
Ang2 fw	5'TAGCATCAGCCAACCAGGAA
Ang2 rev	5'TAGTACTGTCCATTCAAGTT
bGH fw	5'TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
bGH rev	5'TGGGAGTGGCACCTTCA
GAPDH fw	5'ACCAGGAAATGAGCTTGACA
GAPDH rev	5'TCTTGGGCTACACTGAGGAC
hANG2 FW3	5'TGCCACGGTGAATAATTCA
hANG2 REV3	5'TTCTTCTTAGAACAGTGGG
PDGF-B fw	5'CCTCATAGACCGCACCAA

PDGF-B rev	5'CGCACAAATCTCGATCTTCT
tTA-FW2	5'GACGCCCTAGCCATTGAGATG
tTA-REV2	5'CAGTAGTAGGTGTTCCCTTC

2.11.10. Antikörper

Antikörper	Bestell-Nr	Hersteller
Goat Anti-Rabbit Alexa 488	A11008	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Cy3 Donkey Anti-Rat	712-165-153	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Kontrollantikörper	AP112	Merck Millipore, Billerica, USA
LC10	RO5485202	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, DE
NG2	AB5320	Merck Millipore, Billerica, USA
PECAM-1	BM4086	Acris, Herford, DE

2.12. Statistik

Alle Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (standard error of the mean, SEM). Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurden ungepaarte t-tests, ANOVA-Analysen und Bonferroni-Tests durchgeführt. Als Grenzwert für die Signifikanz wurde ein p-Wert von $<0,05$ gewählt (markiert mit *), hochsignifikante Unterschiede ($p<0,001$) wurden mit ** markiert.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der mikrozirkulatorischen Veränderungen und kardiovaskulären Funktion in EC-Ang2-on Tieren

3.1.1. Makroskopische Auffälligkeiten in EC-Ang2-on Tieren

Die hier verwendeten, Ang-2 überexprimierenden EC-Ang2-on Tiere zeigten eine ausgeprägte Ödemneigung, welche insbesondere im Bereich der Schnauze und der Lider deutlich wurde (Abbildung 14 A und C oberes Panel). Hierbei war auch das Körpergewicht signifikant höher im Vergleich zu den Kontrolltieren (EC-Ang2-on: $30,0 \pm 1,8$ vs. EC-Control: $25,8 \pm 1,0$ g, Abbildung 14 B). Die EC-Ang2-on Mäuse wiesen weiterhin Gefäßabnormalitäten auf, die in Abbildung 14 C dargestellt werden. So waren die Gefäße im Bereich der Ohren vergrößert im Vergleich zu EC-Control Tieren und demonstrierten eine geschlängelte Konfiguration.

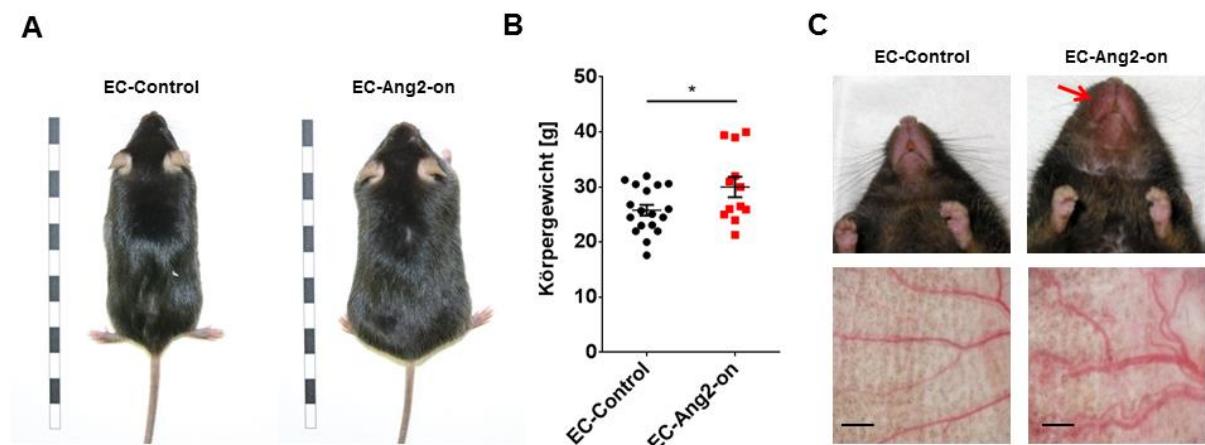


Abbildung 14: A / B EC-Ang-2 on Mäuse zeigten im Alter von 24 Wochen eine deutliche Zunahme der Körpergröße und des Körpergewichts. Abb. C demonstriert die ödematöse Aufschwemmung im Bereich der Nase von EC-Ang2-on Mäusen und die vergrößerten und geschlängelten Gefäße der Ohren im Vergleich zu Kontrolltieren (Maßstab in A: 1 cm, Maßstab in C: 200 µm, * $p < 0,05$, n = 18 für EC-Control, n = 12 für EC-Ang2-on).

3.1.2. Kapillar- und Perizytendichte in EC-Ang2-on Tieren

Auf der Suche nach einem histologischen Korrelat der makroskopischen Gefäßveränderungen wurden Färbungen für PECAM-1 (Endothelzellen) und NG2 (Perizyten) durchgeführt. In den EC-Ang2-on Mäusen zeigte sich hierbei eine signifikante Reduktion der Perizytenzahl im Bereich kleiner Kapillaren (EC-Ang2-on: 1482 ± 391 vs. EC-Control: 4936 ± 748 NG2-pos. Zellen/mm², Abbildung 15, Abbildung 16), bei gleichzeitiger Reduktion der Endothelzelldichte (EC-Ang2-on: 3825 ± 645 vs. EC-Control: 6088 ± 561 PECAM-1-pos. Zellen/mm²).

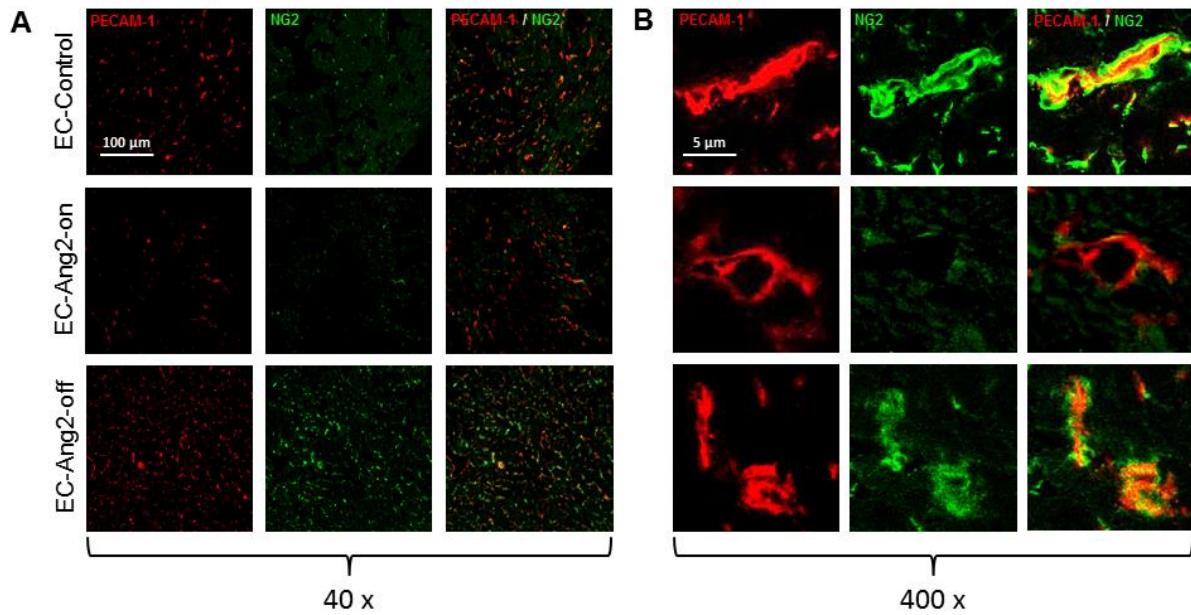


Abbildung 15: Beispielbilder einer PECAM/NG2 Doppelfärbung von Kryoschnitten des Herzens. In **Abb. A** zeigt sich in der 40-fachen Vergrößerung eine Abnahme der Perizytendichte in EC-Ang2-on Tieren, welche sich durch die Beendigung der Überexpression von Ang-2 im Alter von zwölf Wochen normalisierte. In **Abb. B** werden Vergrößerungen aus den Übersichtsaufnahmen dargestellt, in denen ein verminderter Perizytenbesatz in EC-Ang2-on Tieren im Vergleich zu den EC-Ang2-off und EC-Control Tieren deutlich wird.

Perizytenbesatz und Dichte der Endothelzellen konnte durch eine Behandlung mit Dozyzyklin und somit einer Beendigung der Überexpression von Ang-2 ab dem Alter von zwölf Wochen wiederhergestellt werden (EC-Ang2-on: 1482 ± 391 vs. EC-Ang2-off: 4884 ± 215 NG2-pos. Zellen/ mm^2 / EC-Ang2-on: 3825 ± 645 vs. EC-Ang2-off: 7277 ± 135 PECAM-1-pos. Zellen/ mm^2 , Abbildung 15, Abbildung 16).

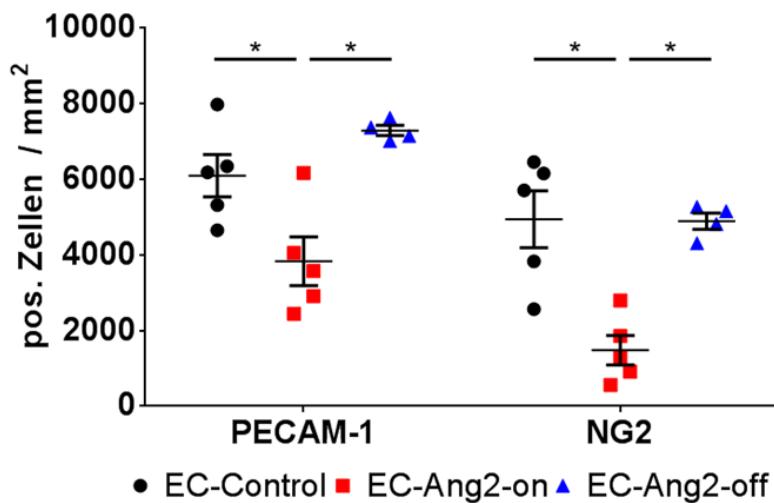


Abbildung 16: Die Quantifizierung der PECAM/NG2 Färbung zeigt eine signifikante Reduktion der Perizytenanzahl pro mm^2 in EC-Ang2-on Tieren bei weiterhin signifikanter Reduktion der Endothelzelldichte. In den EC-Ang2-off Tieren gelang eine Wiederherstellung sowohl des Perizytenbesatzes als auch der Endothelzelldichte (* $p < 0,05$ vs. EC-Ang2-on, $n = 5$ für EC-Control + EC-Ang2-on, $n = 4$ für EC-Ang2-off).

3.1.3. Perizytenverlust in X-LacZ-4 Tieren nach Ang2 Transduktion

In einem weiteren Versuch wurden X-LacZ-4 Mäuse, welche das Reportergen LacZ in Perizyten exprimieren (siehe 2.1), mit einem adenoassoziierten Virus (AAV-2/9) transduziert, der entweder für Ang-2 oder das Reportergen GFP codiert. Nach vier Wochen wurden die Diaphragmen der Tiere entnommen und es wurde eine LacZ-Färbung des gesamten Diaphragmas (whole-mount) durchgeführt.

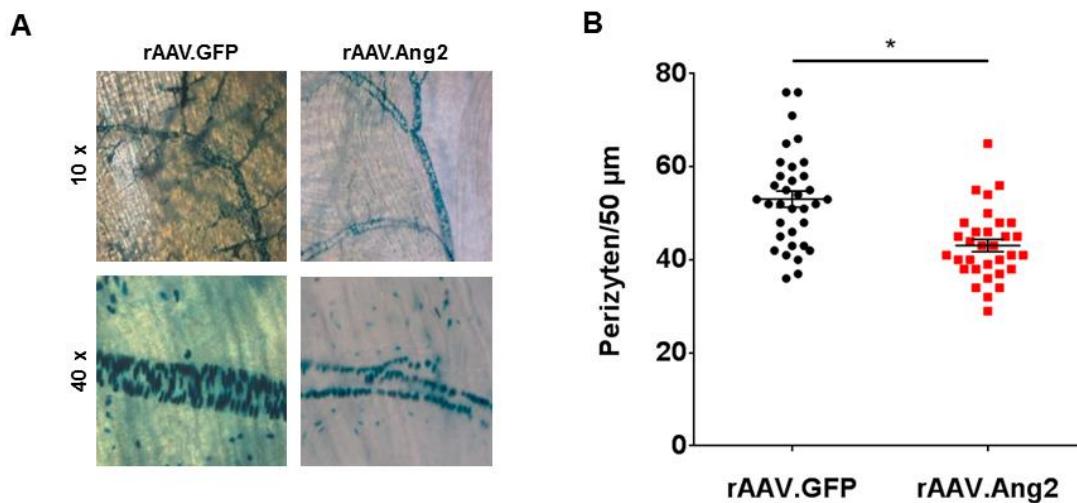


Abbildung 17: Whole-Mount Färbung von Diaphragmen transduzierter X-LacZ-4 Tiere. Bereits **Abb. A** zeigt eine deutliche Reduktion angefärbter Zellen in rAAV.Ang2 Tieren, sowohl in 10x, als auch in 40x Vergrößerung. Die Quantifizierung (als Perizyten pro 50 µm Gefäß) in **Abb. B** bestätigt eine signifikante Reduktion der Perizytenzahl (* p < 0,001, ausgezählt wurden je zehn Schnitte von drei Tieren pro Gruppe).

In den Färbungen der Diaphragmen zeigte sich eine deutliche Reduktion in der Beschichtung der Endothelzellen mit Perizyten in den Ang-2 transduzierten Tieren (rAAV.Ang2: $43,09 \pm 1,3$ vs. rAAV.GFP: $53,06 \pm 1,7$ Perizyten / 50 µm, Abbildung 17).

3.1.4. Gefäßpermeabilität in EC-Ang2-on Tieren

Zur Bestimmung der Gefäßpermeabilität wurde Dextran, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff TRITC markiert war, i.v. appliziert und die Veränderung der extravasalen Fluoreszenzintensität im Vergleich zu einem vorher definierten Nullwert mittels MPLSM untersucht. Hierbei zeigte sich zunächst, wie bereits im Kapitel 3.1.1 beschrieben, eine Vergrößerung der Gefäße in EC-Ang2-on Mäusen. Nach Beginn der Messung war die extravasale Fluoreszenz in EC-Ang2-on Tieren im Vergleich mit Kontrolltieren signifikant höher (180 Sekunden: EC-Ang-2 on: $191,6 \pm 24,0$ vs. EC-Control: $116,6 \pm 5,8$ Prozent des Nullwerts, Abbildung 18).

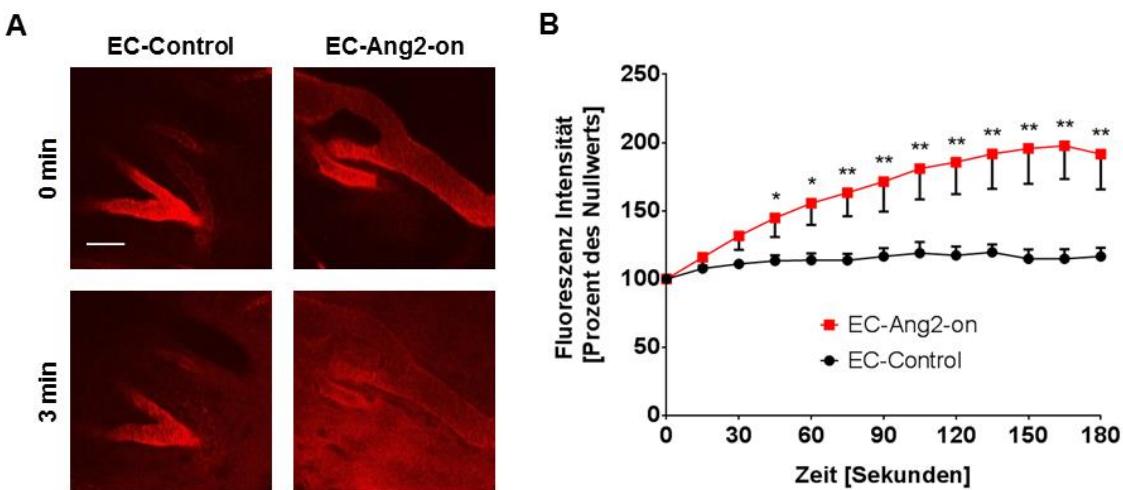


Abbildung 18: Abb. A Beispielbilder der Fluoreszenzmessung im Mausohr zum Zeitpunkt 0 (Zeitpunkt der maximalen Anflutung des Fluoreszenzfarbstoffes) und drei Minuten mit deutlichem Anstieg der extravasalen Fluoreszenz in EC-Ang2-on Tieren. Abb. B zeigt den signifikanten Anstieg der extravasalen Fluoreszenz im Vergleich zu Kontrolltieren (* p<0,05 vs. EC-Control, ** p<0,001 vs. EC-Control, n = 4 pro Gruppe).

3.1.5. Änderung der kardiovaskulären Funktion in EC-Ang2-on Tieren

Zur Charakterisierung der hämodynamischen Funktion in EC-Ang2-on Mäusen wurden eine Reihe hämodynamischer Parameter erhoben, nämlich der nicht-invasiv gemessene arterielle Mitteldruck (MAP), die Druckänderung pro Zeiteinheit als Maß für die myokardiale Relaxation (dP/dT min), der linksventrikulär entwickelte Druck (dP), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP), das Herzzeitvolumen (CO) und der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVEDD).

3.1.5.1. *Nicht-invasiver Blutdruck*

Die nicht-invasiven Blutdruckmessungen ergaben, dass die EC-Ang2-on Tiere im Alter von zwölf Wochen eine Tendenz zu einem niedrigeren arteriellen Mitteldruck (mean arterial pressure, MAP) zeigten (EC-Ang2-on: $95,16 \pm 4,1$ vs. EC-Control: $100,9 \pm 4,3$ mmHg). Während die EC-Control Tiere nach 24 Wochen ein vergleichbares Mitteldurckniveau zu 12 Wochen aufwiesen, nahm der MAP in EC-Ang2-on Tieren im Verlauf ab (EC-Ang2-on: $84,1 \pm 2,7$ vs. EC-Control: $101,6 \pm 3,7$ mmHg, siehe Abbildung 19).

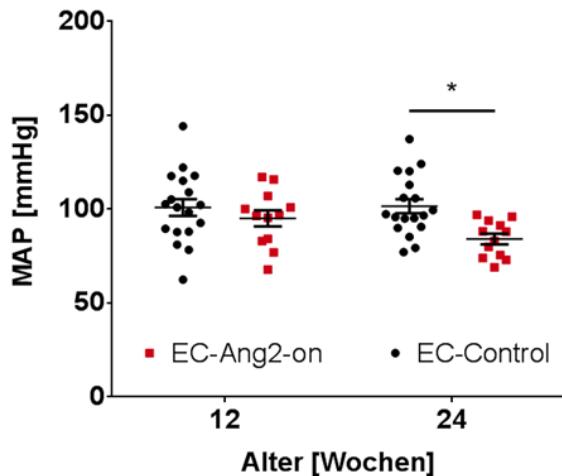


Abbildung 19: Die Bestimmung des arteriellen Mitteldrucks (mean arterial pressure / MAP) zeigt eine systemische Hypotension der EC-Ang2-on Tiere im Alter von 24 Wochen (* $p < 0,05$, $n = 18$ für EC-Control, $n = 12$ für EC-Ang2-on).

3.1.5.2. Linksventrikulär entwickelte Drücke und Cardiac Output

In der invasiven linksventrikulären Druckmessung im Alter von 24 Wochen wurden die Parameter entwickelter Druck (developed pressure / dP), Relaxationsgeschwindigkeit (Druckveränderung pro Sekunde / dP/dT min in mmHg/sek) und linksventrikulärer enddiastolischer Druck (left ventricular enddiastolic Pressure / LvEDP) gemessen. Diese Parameter wurden in Ruhe und unter Stimulation mit steigenden Dosen Noradrenalin bestimmt, um die Reservekapazität der Herzen zu testen. Hier waren EC-Ang-2 on Tiere weder in Ruhe, noch unter Stimulation mit steigenden Dosen Noradrenalin in der Lage, vergleichbare Drücke aufzubauen, wie die EC-Control Tiere. Weiterhin resultierte das Aussetzen der Ang-2 Überexpression in den EC-Ang2-off Tieren in einer Normalisierung der entwickelten Drücke mit einem angedeuteten Defizit in der Reservekapazität (Baseline: EC-Ang2-on: $87,35 \pm 3,2$ vs. EC-Ang2-off: $107,12 \pm 1,9$ vs. EC-Control: $98,24 \pm 2,9$ mmHg, 100ng Noradrenalin: EC-Ang2-on: $126,39 \pm 5,4$ vs. EC-Ang2-off: $143,5 \pm 2,5$ vs. EC-Control: $161,2 \pm 5,5$ mmHg, siehe Abbildung 20 A). Darüber hinaus zeigte sich tendenziell eine verminderte Relaxationsgeschwindigkeit in EC-Ang2-on Tieren im Vergleich zu Kontroll- und EC-Ang2-off Tieren, welche unter Gabe von 10, 25 und 50 ng Noradrenalin statistisch signifikant war (Baseline: EC-Ang2-on: $-8097,9 \pm 699$ vs. EC-Ang2-off: $-9531,1 \pm 701$ vs. EC-Control: $-10338,8 \pm 596$ mmHg/Sec, 50ng Noradrenalin: EC-Ang2-on: $-11028,2 \pm 953$ vs. EC-Ang2-off: -14860 ± 1830 vs. EC-Control: -14514 ± 792 mmHg/Sec, siehe Abbildung 20 B).

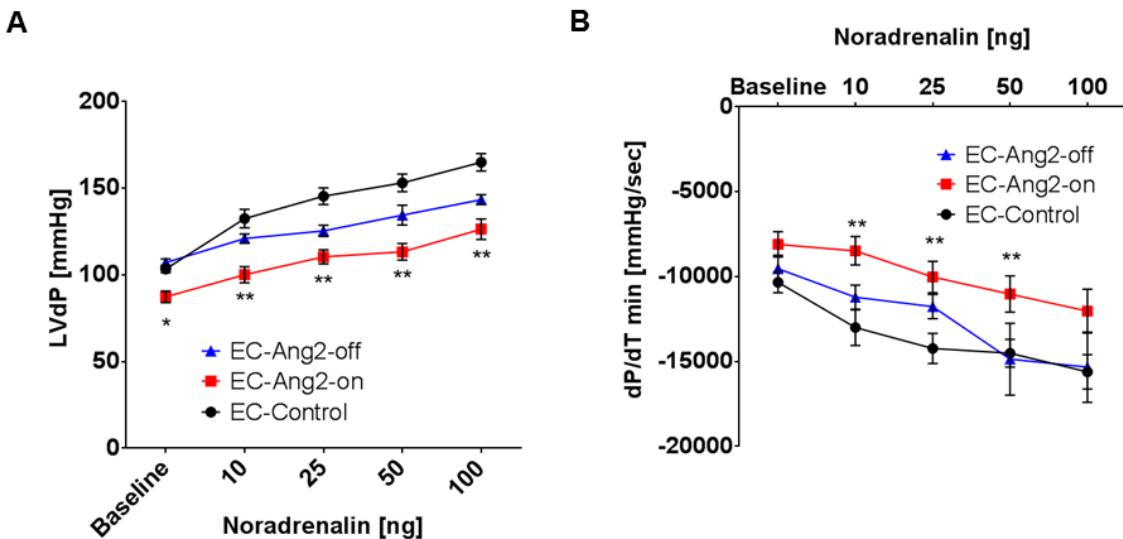


Abbildung 20: Abb A zeigt den linksventrikulär entwickelten Druck (developed pressure / dP) in Ruhe (Baseline) und unter Stimulation mit steigenden Dosen Noradrenalin. Hierbei entwickeln EC-Ang2-on Tiere einen signifikant niedrigeren Druck als EC-Control und EC-Ang2-off Tiere. Ebenso zeigt sich eine Reduktion der Relaxationsfähigkeit in EC-Ang2-on Tieren, zumindest im Rahmen der Stimulation mit Noradrenalin (Abb B) (* p<0,05 vs EC-Control & EC-Ang2-off, **p<0,05 vs. EC-Control, n = 18 für EC-Control, n = 10 für EC-Ang2-on, n = 5 für EC-Ang2-off).

Trotz der deutlichen Einschränkung in der Entwicklung linksventrikulärer Drücke und der linksventrikulären Relaxationsstörung zeigten die EC-Ang2-on Tiere keine Steigerung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes unter Stimulation mit Noradrenalin (Abbildung 21 A). Weiterhin entwickelten die EC-Ang2-on Tiere ein deutlich gesteigertes Herzminutenvolumen (cardiac output) im Vergleich zu ihren Kontrolltieren (EC-Ang2-on: $6,6 \pm 1,2$ vs. EC-Control: $3,3 \pm 0,3$ ml/min).

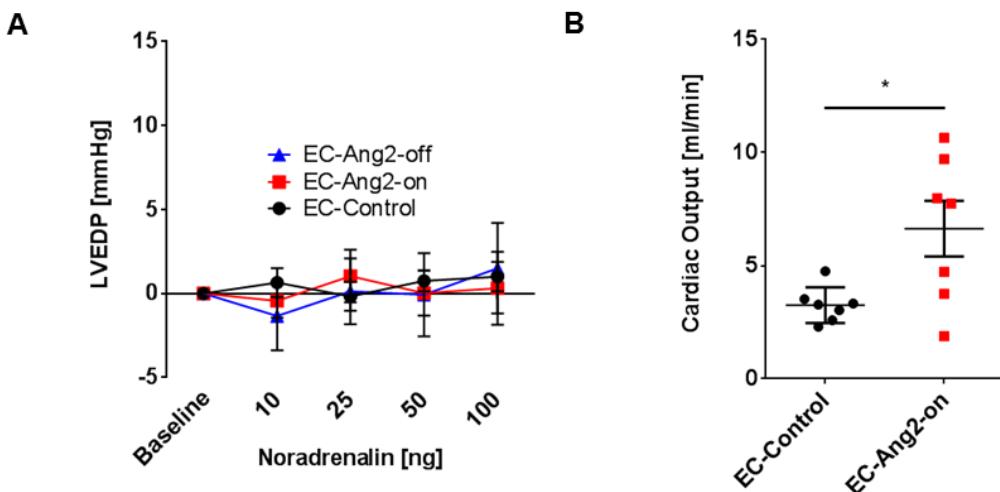


Abbildung 21: Abb. A stellt vergleichbare linksventrikuläre enddiastolische Drücke bei EC-Ang2-on, EC-Ang2-off und EC-Control Mäusen dar. Abb. B zeigt das signifikant erhöhte Cardiac Output in EC-Ang2-on Tieren im Vergleich zur Kontrolle (* p<0,05 vs. EC-Control, n = 18 für EC-Control, n=12 für EC-Ang2-on, n = 5 für EC-Ang2-off in Abb. A, n = 7 pro Gruppe in Abb. B).

3.1.5.3. Echokardiographie

Zu Beginn des Untersuchungszeitraumes (im Alter von zwölf Wochen) zeigten die zwei Gruppen mit Ang-2 Überexpression (EC-Ang2-on, EC-Ang2-off) bereits eine deutliche Dilatation des linken Ventrikels im Vergleich zu Kontrolltieren. Nach der initialen Messung wurden die EC-Ang2-off Tiere mit Dozyzyklin behandelt, um die endotheliale Ang-2 Überexpression zu beenden. Während die EC-Ang2-on Mäuse mit fortgesetzter Ang-2 Überexpression eine weitere Dilatation boten, normalisierten sich die Durchmesser der linken Ventrikel in EC-Ang2-off Tieren im Verlauf der nächsten zwölf Wochen auf Kontrollniveau (12 Wochen: EC-Ang2-on: $0,41 \pm 0,017$ vs. EC-Ang2-off: $0,43 \pm 0,016$ vs. EC-Control: $0,36 \pm 0,004$ cm, 24 Wochen: EC-Ang2-on: $0,47 \pm 0,025$ vs. EC-Ang2-off: $0,39 \pm 0,011$ vs. EC-Control: $0,38 \pm 0,005$ cm, siehe Abbildung 22).

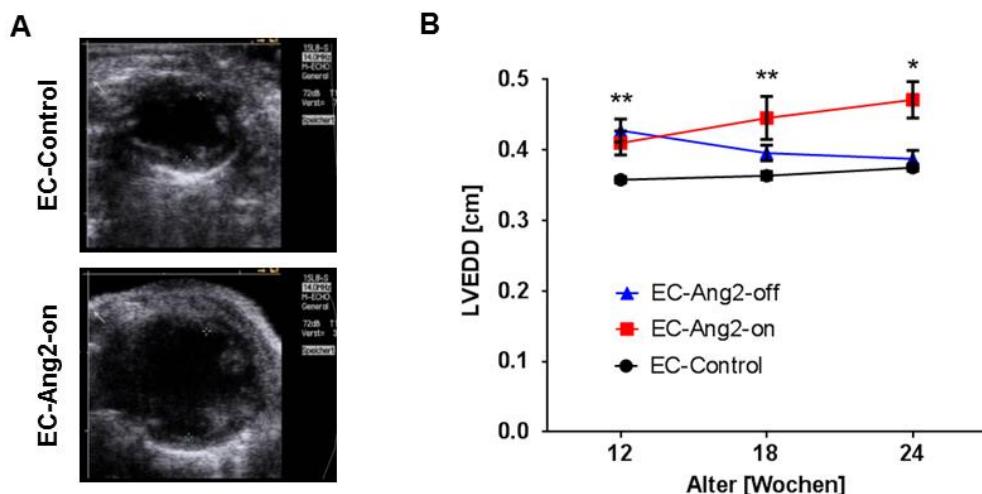


Abbildung 22: Abb. A Echokardiographische Beispiele eines Querschnittes (parasternal, kurze Achse) durch den linken Ventrikel in EC-Ang2-on und EC-Control Tieren. Abb. B Die Auswertung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers zeigt bereits initial eine Vergrößerung der linken Ventrikel in EC-Ang2-on und EC-Ang2-off Tieren. Im Verlauf dilatieren die linken Ventrikel der EC-Ang2-on Tiere weiter, während eine Aussetzung der Ang-2 Überexpression nach der initialen Messung in den EC-Ang2-off Tieren zu einer Normalisierung des LVEDD führt (** p<0,001 für EC-Ang2-on vs. EC-Control / * p<0,001 für EC-Ang2-off vs. EC-Ang2-off und EC-Control, n = 18 für EC-Control, n=12 für EC-Ang2-on, n = 5 für EC-Ang2-off).

3.1.6. Myokardiale Hypertrophie in EC-Ang2-on Tieren

In der folgenden histologischen Analyse des Myokards zeigte sich ebenfalls eine Dilatation des linken Ventrikels, wie in Abbildung 23 A zu sehen ist. Weiterhin führte die kontinuierliche Ang-2 Überexpression über einen Zeitraum von 24 Wochen zu einer merklichen linksventrikulären Fibrosierung (EC-Ang2-on: $8,6 \pm 1,1$ vs. EC-Control: $3,2 \pm 0,8$ % fibrotisches Areal des linken Ventrikels, Abbildung 23 B). Dieser Effekt trat in den Tieren, die Ang-2 nur die ersten zwölf Lebenswochen überexprimierten, nicht auf. Die Vergrößerung der linken Ventrikel in EC-Ang2-on Tieren schlug sich auch in einer deutlichen Zunahme des Herzgewichts (normalisiert auf das Körpermengen, heart weight / body weight ratio in mg/g)

nieder. Die Beendigung der Ang-2 Überexpression in EC-Ang2-off Tieren normalisierte das Herzgewicht zwar in der Tendenz, jedoch nicht signifikant (EC-Ang2-on: $7,0 \pm 0,7$ vs. EC-Ang2-off: $5,5 \pm 0,7$ vs. EC-Control: $4,5 \pm 0,2$ mg/g, Abbildung 23 C).

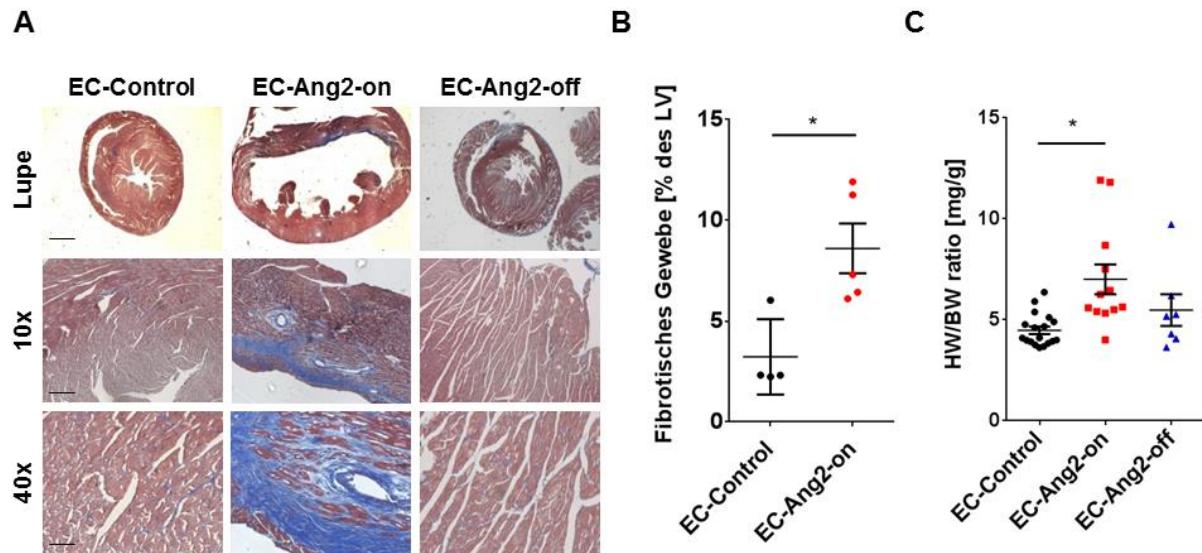


Abbildung 23: Abb. A Masson Trichrom Färbungen von histologischen Präparaten der Mäuseherzen zeigen die bereits echokardiographisch bestimmte linksventrikuläre Dilatation und weiterhin eine myokardiale Fibrosierung in EC-Ang2-on Tieren, die nicht in EC-Ang2-off Tieren beobachtet wurde, was auch die Quantifizierung des Fibroseareals in Abb. B bestätigt. Abb. C EC-Ang2-on Tiere entwickeln, neben der linksventrikulären Dilatation, eine Zunahme des Herzgewichts (*p<0,05 vs. EC-Control / Maßstab Abb. A: Lupe = 1000 µm, 10x = 200 µm, 40x = 50 µm, n = 4 für EC-Control, n=5 für EC-Ang2-on, n = 5 für Abb. B, n = 18 für EC-Control, n=12 für EC-Ang2-on, n = 5 für EC-Ang2-off für Abb. C).

3.2. Effekt einer myokardial restringierten Ang2 Überexpression

Neben den Mäusen mit panendothelialer Ang-2 Überexpression wurden auch Tiere untersucht, in welchen die Überexpression von Ang-2 auf das Myokard beschränkt war. Hierzu wurde ein weiterer transgener Mausstamm verwendet, in dem Ang-2 unter der Kontrolle eines α -myosin heavy chain promoters im Rahmen eines Tet-Off Promotersystems exprimiert wurde. Es wurden Ang-2 überexprimierende Tiere (CM-Ang2-on) mit den entsprechenden Kontrolltieren verglichen (CM-Control). Weiterhin wurde eine myokardiale Überexpression durch AAV2/9 vermittelte Ang-2 Transduktion erreicht (1×10^{12} Viruspartikel). Diese Tiere wurden mit ihren Kontrolltieren (AAV2/9.LacZ transduzierte Tiere) verglichen.

3.2.1. Kapillar- und Perzytendichte in CM-Ang2-on Tieren

Analog zu den Tieren mit endothelialer Ang-2 Überexpression wurden zunächst histologische Schnitte angefertigt, um den Besatz der Endothelzellen mit Perzyten zu untersuchen. In den CM-Ang2-on Tieren zeigte sich hierbei eine Reduktion des

Verhältnisses zwischen Perizyten und Endothelzellen (NG2/PECAM-1 ratio) im Herzen im Vergleich zu den Kontrolltieren (CM-Ang2-on: $0,22 \pm 0,04$ vs. CM-Control: $0,46 \pm 0,02$ NG2/PECAM-1, Abbildung 24 B). Dieser Verlust von Perizyten konnte jedoch nicht in peripheren Muskeln demonstriert werden (CM-Ang2-on: $0,59 \pm 0,04$ vs. CM-Control: $0,66 \pm 0,1$ NG2/PECAM-1, Abbildung 24 C).

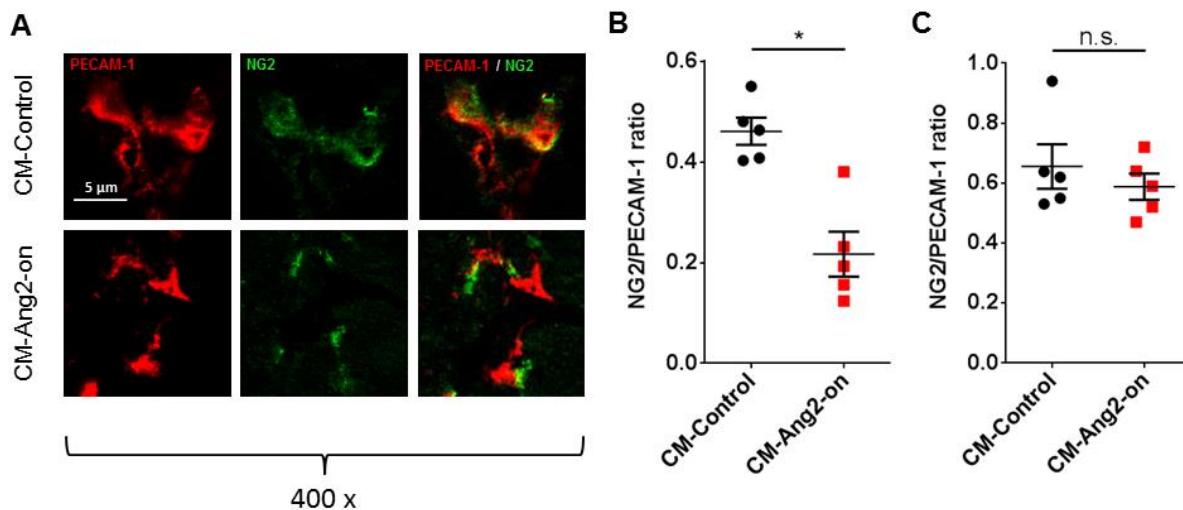


Abbildung 24: **Abb. A** Beispielbilder einer PECAM-1/NG2 Färbung histologischer Schnitte (Herz) von CM-Ang2-on und CM-Control Tieren. **Abb. B** NG2/PECAM-1 ratio im Herz zeigt eine Reduktion der Perizytenbedeckung in CM-Ang2-on Tieren im Vergleich zu CM-Control Tieren, während keine Veränderung der Ratio im peripheren Muskel (M. quadriceps femoris) vorliegt (**Abb. C**). (*p<0,001 vs. CM-Control, n.s. = nicht signifikant, n=5).

3.2.2. Änderung der kardiovaskulären Funktion bei transgener myokardialer Ang-2 Überexpression

Wie bereits bei den EC-Ang2-on Tieren beschrieben, wurden auch in CM-Ang2-on Tieren und deren Kontrollen eine Reihe häodynamischer Parameter bestimmt.

3.2.2.1. Entwickelte Drücke

In der nicht-invasiven Blutdruckmessung zeigten die CM-Ang2-on Tiere trotz der histologischen Veränderungen keine Unterschiede bezüglich des arteriellen Mitteldrucks im Vergleich zu den Kontrolltieren (24 Wochen: CM-Ang2-on: $117,60 \pm 6,0$ vs. CM-Control: $116,0 \pm 4,6$ mmHg, Abbildung 25 A). Dieser Befund bestätigte sich in der invasiven linksventrikulären Druckmessung: CM-Ang2-on Tiere waren hierbei in der Lage, mit den Kontrolltieren vergleichbare Drücke aufzubauen und zeigten auch unter Ausreizung der Reservekapazität keine Einschränkung der linksventrikulären Funktion (Abbildung 25 B).

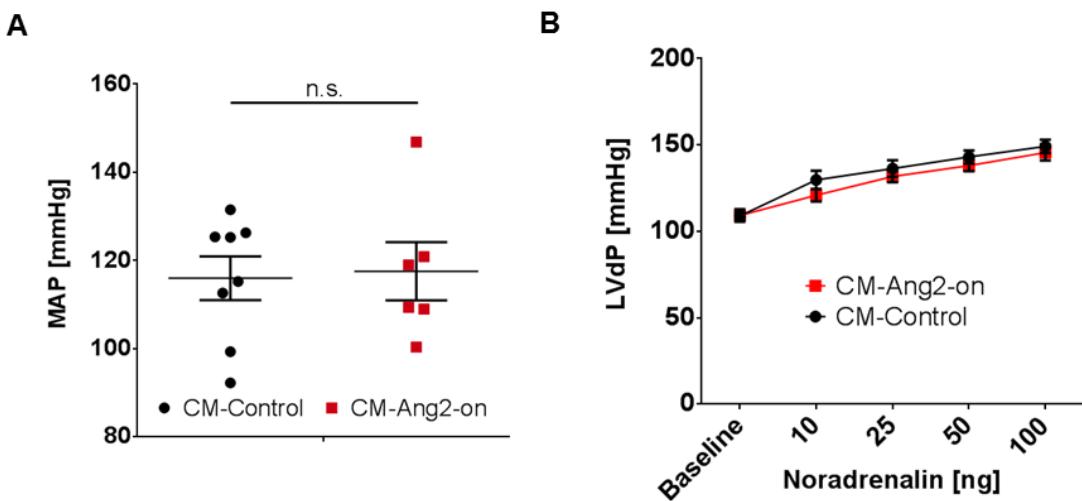


Abbildung 25: **Abb. A** Der arterielle Mitteldruck in CM-Ang2-on Tieren zeigt im Alter von 24 Wochen keinen Unterschied zu den Kontrolltieren (CM-Ang2-on vs. CM-Control, nicht signifikant). **Abb. B** Ebenso zeigt sich keine Veränderung des linksventrikulär entwickelten Drucks in Ruhe und unter Stimulation mit Noradrenalin (n.s. = nicht signifikant, n = 8 für CM-Control, n = 6 für CM-Ang2-on).

3.2.2.2. Echokardiographie

Zur Bestimmung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers wurden auch in den CM-Ang2-on Tieren und ihren Kontrolltieren echokardiographische Aufnahmen im Alter von 12, 18 und 24 Wochen angefertigt. Hierbei ergab sich kein Hinweis auf eine linksventrikuläre Dilatation. Weder zu Beginn der Messungen noch im weiteren Verlauf entwickelten die CM-Ang2-on Tiere eine linksventrikuläre Dilatation, wie sie in den EC-Ang2-on Tieren beobachtet wurde.

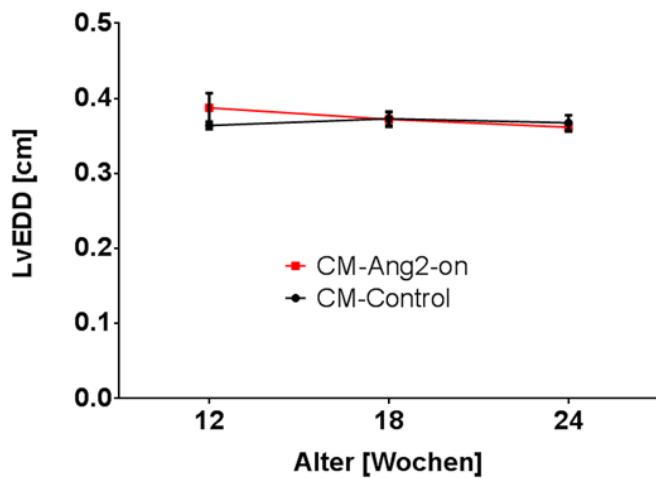


Abbildung 26: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LvEDD) bestimmt durch echokardiographischen Analyse im Alter von 12, 18 und 24 Wochen. In den CM-Ang2-on Tieren ergab sich kein Anhalt für eine linksventrikuläre Dilatation (n = 8 für CM-Control, n = 6 für CM-Ang2-on).

3.2.3. Herzmorphologie bei kardialer Angiopoietin-2 Überexpression

Zuletzt wurden von den CM-Ang2-on Tieren ebenfalls Masson Trichrom Färbungen angefertigt, um eine mögliche myokardiale Fibrosierung zu visualisieren. Wie in Abbildung 27 A zu sehen ist, entwickelten die Tiere bis zum Alter von 24 Wochen eine dezente myokardiale Fibrose, jedoch ohne signifikante linksventrikuläre Dilatation. Es ergab sich hierbei kein Unterschied im Grad der Fibrose zwischen CM-Ang2-on Tieren und deren Kontrolle (CM-Ang2-on: $6,5 \pm 0,6$ vs. CM-Control: $4,5 \pm 0,8$ % fibrotisches Areal des linken Ventrikels, Abbildung 27 B). Auch das Herzgewicht war im Vergleich zu den CM-Control Tieren nur in der Tendenz angestiegen (CM-Ang2-on: $5,2 \pm 0,2$ vs. CM-Control: $4,5 \pm 0,2$ mg/g, Abbildung 27 C).

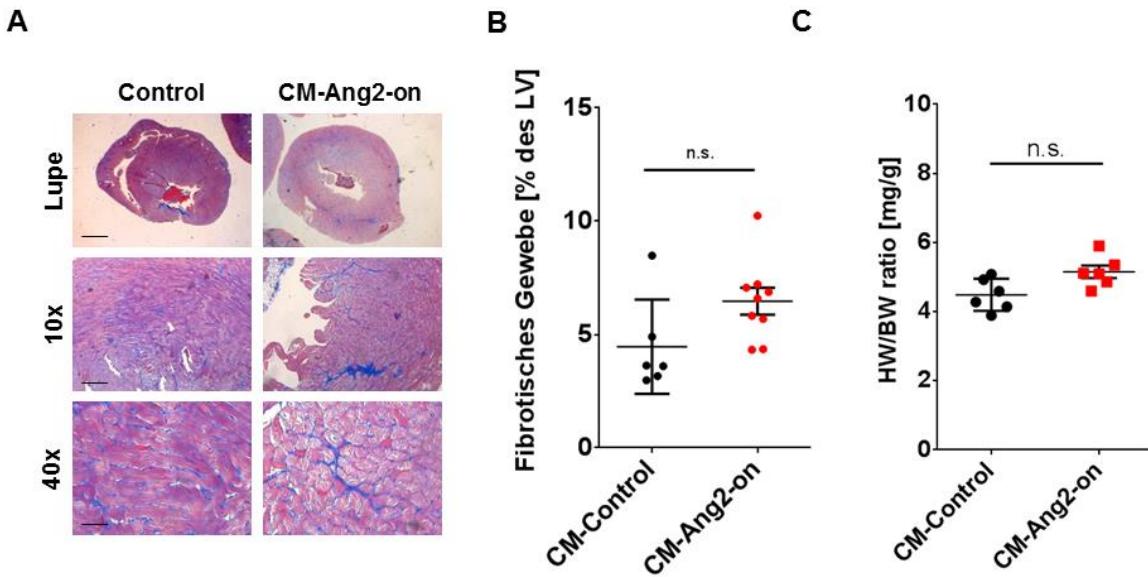


Abbildung 27: Abb. A Masson Trichrom Färbung von Herzschnitten der CM-Ang2-on Tiere und deren Kontrollen zeigen eine geringe Fibrosierung des Myokards, welche in der Quantifizierung des fibrotischen Areals (**Abb. B**) keine Unterschiede zwischen den Gruppen aufwies. **Abb. C** die Zunahme des auf das Körpergewicht normalisierten Herzgewichts in CM-Ang2-on Tieren war ohne statistische Signifikanz (Maßstab Abb. A: Lupe = 200 µm, 10x = 100 µm, 40x = 50 µm, n.s. = nicht signifikant, n = 6 für CM-Control, n = 9 für CM-Ang2-on für Abb. B, n = 6 für CM-Control, n = 6 für CM-Ang2-on für Abb. C).

3.2.4. Expressionsmuster in rAAV-CM Tieren

In einem zweiten Ansatz wurde eine auf das Herz beschränkte Überexpression durch eine AAV-vermittelte Transduktion mit Ang-2 oder dem Kontrollgen LacZ herbeigeführt (je 1×10^{12} Viruspartikel / Maus). Ein Teil der rAAV-CM-LacZ Tiere wurde nach zwei Wochen geopfert, um zur Bestimmung der Expressionverteilung, X-Gal Färbungen durchzuführen. Hierbei zeigte sich eine deutliche Färbung im Bereich des Myokards, welche in den übrigen Organen (Milz, Niere, Muskel) nicht demonstriert werden konnte, wie in Abbildung 28 A zu sehen ist. Die PCR zeigte vergleichbare Ergebnisse mit gesteigerter Expression von Angiopoietin-2 im Herzen von rAAV-CM-Ang2 transfizierten Tieren (rAAV-CM-Ang2: $12 \times 10^{-4} \pm 4,8 \times 10^{-4}$ vs.

rAAV-CM-LacZ: $1,1 \times 10^{-4} \pm 13 \times 10^{-4} \Delta\Delta CT$ Ang2), jedoch ohne Expression im peripheren Muskel in Vergleich zu kontrolltransfizierten Tieren (rAAV-CM-Ang2: $8,7 \times 10^{-6} \pm 9 \times 10^{-11}$ vs. rAAV-CM-LacZ: $12,1 \times 10^{-6} \pm 2,7 \times 10^{-6} \Delta\Delta CT$ Ang2, siehe Abbildung 28 B).

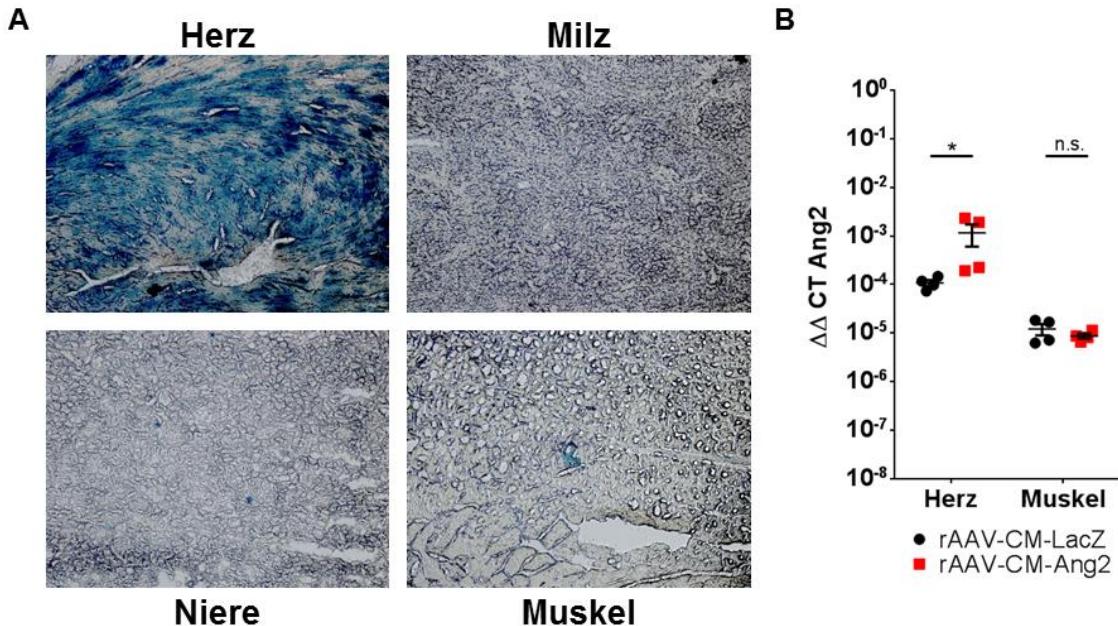
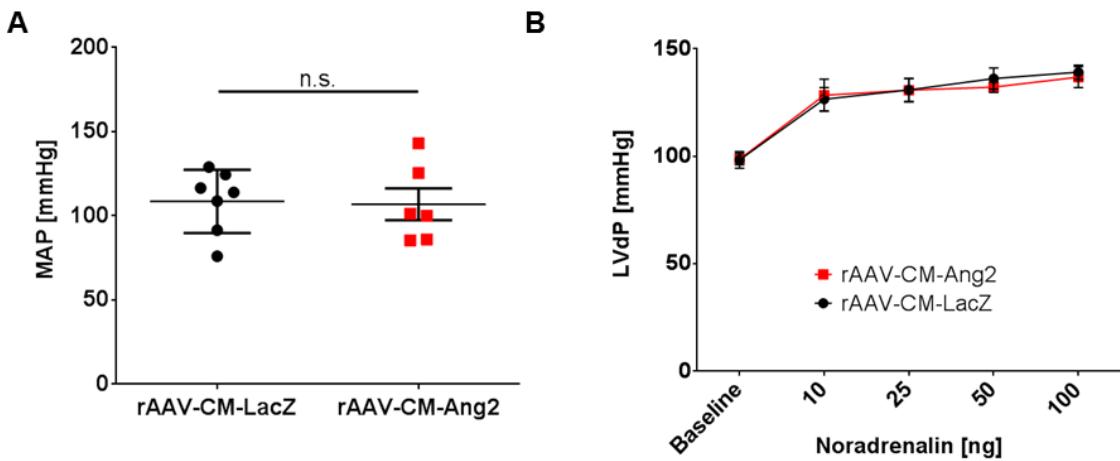


Abbildung 28: Abb. A Die X-Gal Färbung 14 Tage nach Transduktion von C57BL/6 Mäusen mit 1×10^{12} Viruspartikeln des rAAV2/9.LacZ Virus zeigt eine deutliche Färbung im Myokard, jedoch nur eine sehr geringe Färbung im Bereich der übrigen Organe. **Abb. B** Die PCR für Angiopoietin-2 demonstriert gesteigerte Ang-2 mRNA Level im Herzen, ohne Änderung der Ang-2 Spiegel im peripheren Muskel (* $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant, $n = 4$).

3.2.5. Entwicklung systemischer und linksventrikulärer Drücke bei herzspezifischer AAV-Ang-2 Überexpression

Analog zu den Versuchen in CM-Ang2-on Tieren erzeugte eine virusvermittelte myokardiale Überexpression von Ang-2 keine systemische Hypotension in der nicht-invasiven Blutdruckmessung (rAAV-CM-Ang2: $106,9 \pm 8,5$ vs. rAAV-CM-LacZ: $108,6 \pm 6,6$ mmHg, Abbildung 29 A). Dieser Befund konnte in der invasiven linksventrikulären Druckmessung bestätigt werden. So zeigten die rAAV-CM-Ang2 Tiere eine normale Entwicklung des linksventrikulären Druckes im Alter von 24 Wochen (zwölf Wochen nach Virustransduktion) in Ruhe und unter Stimulation mit steigenden Dosen Noradrenalin (Baseline: rAAV-CM-Ang2: $98,7 \pm$ vs. rAAV-CM-LacZ: $98,3 \pm 3,4$ mmHg, 100ng Noradrenalin: rAAV-CM-Ang2: $137,0 \pm 4,0$ vs. rAAV-CM-LacZ: $139,2 \pm 3,0$ mmHg, Abbildung 29 B).



3.2.6. Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser bei herzspezifischer AAV-Ang-2 Überexpression

Im Alter von zwölf Wochen (vor Transduktion) zeigten sich erwartungsgemäß keine Unterschiede im linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (rAAV-CM-Ang2: $0,43 \pm 0,01$ vs. rAAV-CM-LacZ: $0,44 \pm 0,01$ cm). Auch zwölf Wochen nach Transduktion kam es in rAAV-CM-Ang2 Tieren nicht zu einer linksventrikulären Dilatation (rAAV-CM-Ang2: $0,40 \pm 0,01$ vs. rAAV-CM-LacZ: $0,40 \pm 0,01$ cm, Abbildung 30).

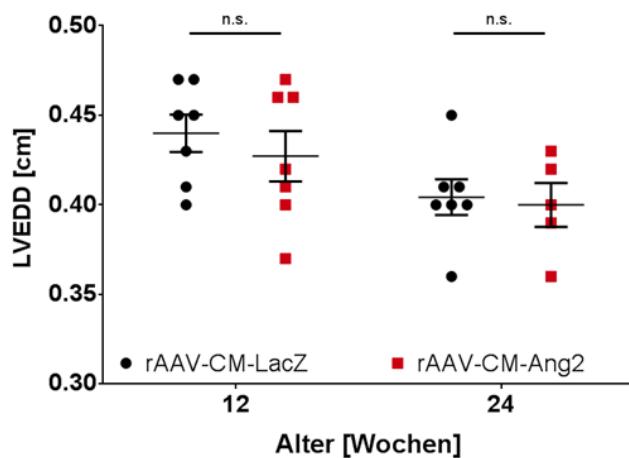


Abbildung 30: Die echokardiographische Auswertung des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers zeigt keinen Unterschied zwischen den rAAV-CM-Ang2 Tieren und deren Kontrollen zwölf Wochen nach Transduktion (n.s. = nicht signifikant, n = 7 für rAAV-CM-LacZ, n = 6 für rAAV-CM-Ang2 bei 12 Wochen, n = 7 für rAAV-CM-LacZ, n = 5 für rAAV-CM-Ang2 bei 24 Wochen).

3.3. Kardiovaskuläre Funktion in Tieren mit peripherer Ang2 Überexpression

3.3.1. Verteilungsmuster der Expression in rAAV2/7 transduzierten Tieren

Um den Effekt einer peripheren Ang-2 Überexpression zu untersuchen, wurden C57BL/6 Tiere mittels eines rekombinanten adenoassoziierten Virus, welcher entweder das Gen für Ang-2 (rAAV2/7.Ang2) oder LacZ (rAAV2/7.LacZ) enthielt, transduziert. Aus den histologischen Präparaten der LacZ transduzierten Tiere wurde zunächst eine X-Gal Färbung durchgeführt, um das Verteilungsmuster der Transduktion zu überprüfen. Hierbei zeigte sich eine lediglich geringe myokardiale Expression bei einer deutlich höheren Expression in Milz und Niere. Die Transduktion peripherer Muskel (M. quadriceps femoris) war ebenfalls nur gering.

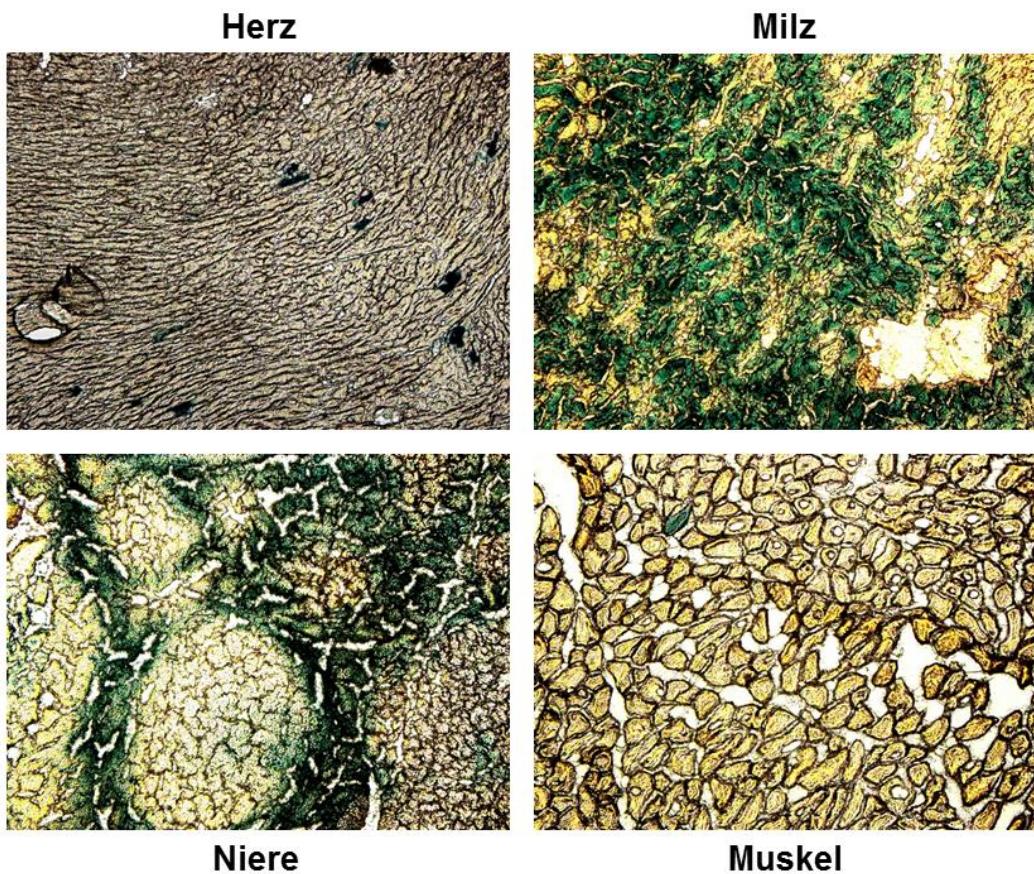


Abbildung 31: Die X-Gal Färbung von histologischen Präparaten der rAAV2/7.LacZ Tiere zeigte eine geringe myokardiale Expression bei einer deutlichen Anfärbung von Milz und Niere.

3.3.2. Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser und entwickelter Druck in rAAV2/7.Ang2 Tieren

Der linksventrikulär entwickelte Druck, welcher im Alter von 24 Wochen mittels invasiver linksventrikulärer Druckmessung gemessen wurde, zeigte bereits unter Ruhebedingungen deutlich niedrigere Werte als in den rAAV2/7.Ang2 Tieren (Baseline: rAAV2/7.Ang2: $107,9 \pm$

2,8 vs. rAAV2/7.LacZ $128,9 \pm 2,9$ mmHg). Dieser Unterschied nahm unter Stimulation mit Noradrenalin noch zu (100 ng Noradrenalin: rAAV2/7.Ang2: $134,7 \pm 5,8$ vs. rAAV2/7.LacZ $164,5 \pm 5,6$ mmHg, Abbildung 32 A).

Die echokardiographischen Bestimmungen des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers ergaben im Alter von zwölf Wochen, also vor Virustransduktion, keine Unterschiede (12 Wochen: rAAV2/7.Ang2: $0,35 \pm 0,01$ vs. rAAV2/7.LacZ $0,36 \pm 0,01$ cm). Im weiteren Verlauf entwickelten die Ang-2 überexprimierenden Tiere eine progrediente linksventrikuläre Dilatation (24 Wochen: rAAV2/7.Ang2: $0,38 \pm 0,01$ vs. rAAV2/7.LacZ $0,34 \pm 0,01$ cm, Abbildung 32 B).

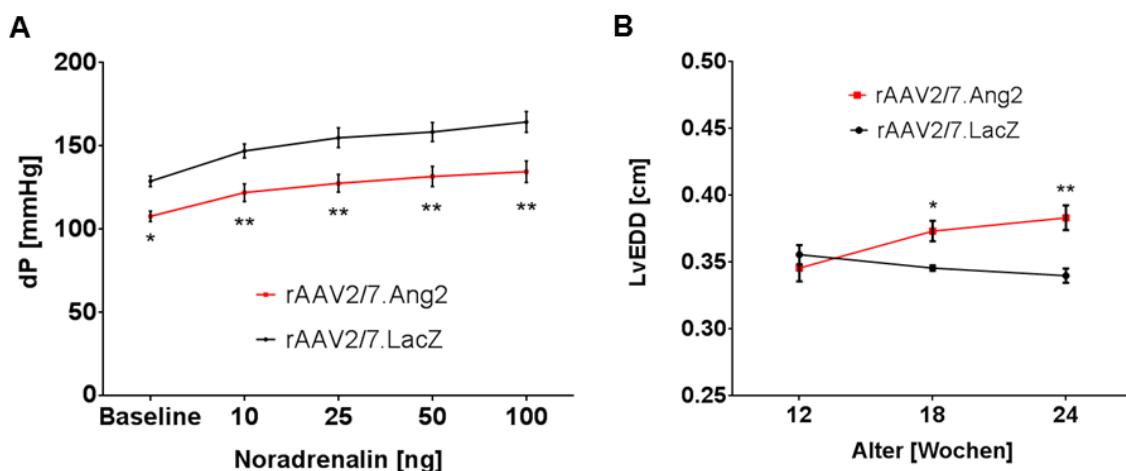


Abbildung 32: Abb. A zeigt den linksventrikulär entwickelten Druck in Tieren mit peripherer Ang-2 Überexpression, wobei sich sowohl in Ruhe als auch unter Stimulation mit Noradrenalin erniedrigte Drücke in den rAAV2/7.-Ang2 Tieren zeigten. In Abb. B stellte sich der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser in Ang-2 überexprimierenden Tieren im Alter von zwölf Wochen unverändert zu den Kontrolltieren dar. Nach Injektion der Viren entwickelte sich eine progrediente linksventrikuläre Dilatation (* $p < 0,05$ vs. rAAV2/7.LacZ / ** $p < 0,001$ vs. rAAV2/7.LacZ, $n = 7$ pro Gruppe).

3.4. Antagonisierung der endothelialen Angiopoietin-2 Überexpression durch Ang-1 und PDGF-B

3.4.1. Expressionsmuster in rAAV2/9 transduzierten Tieren

Eine X-Gal Färbung 14 Tage nach Transduktion von C57BL/6 Tieren mit 5×10^{12} Viruspartikeln eines rAAV2/9, welcher das LacZ-Reportergen trug, zeigte eine deutliche Anfärbung in Herz, Niere und Milz bei geringerer Farbintensität im peripheren Muskel (siehe Abbildung 33 A). Die globale Expression von Angiopoietin-1 und PDGF-B konnte auf Ebene der mRNA bestätigt werden. So zeigte sich eine signifikante Steigerung sowohl der Ang-1 Expression (Herz: rAAV-Ang1: $150 \times 10^{-5} \pm 47 \times 10^{-5}$ vs. rAAV-LacZ: $8,2 \times 10^{-5} \pm 6,3 \times 10^{-5}$, Muskel: rAAV-Ang1: $96 \times 10^{-6} \pm 45 \times 10^{-6}$ vs. rAAV-LacZ: $6,7 \times 10^{-6} \pm 2,1 \times 10^{-6}$ $\Delta\Delta CT$ Ang1, siehe Abbildung 33 B) als auch der PDGF-B Expression in Herz und peripherem Muskel im

Vergleich zu kontrolltransduzierten Tieren (Herz: rAAV-PDGF-B: $110 \times 10^{-5} \pm 230 \times 10^{-6}$ vs. rAAV-LacZ: $1,3 \times 10^{-5} \pm 4,7 \times 10^{-6}$, Muskel: rAAV-PDGF-B: $1300 \times 10^{-7} \pm 4,2 \times 10^{-5}$ vs. rAAV-LacZ: $8,4 \times 10^{-7} \pm 2,5 \times 10^{-8}$ $\Delta\Delta CT$ PDGF-B, siehe Abbildung 33 C).

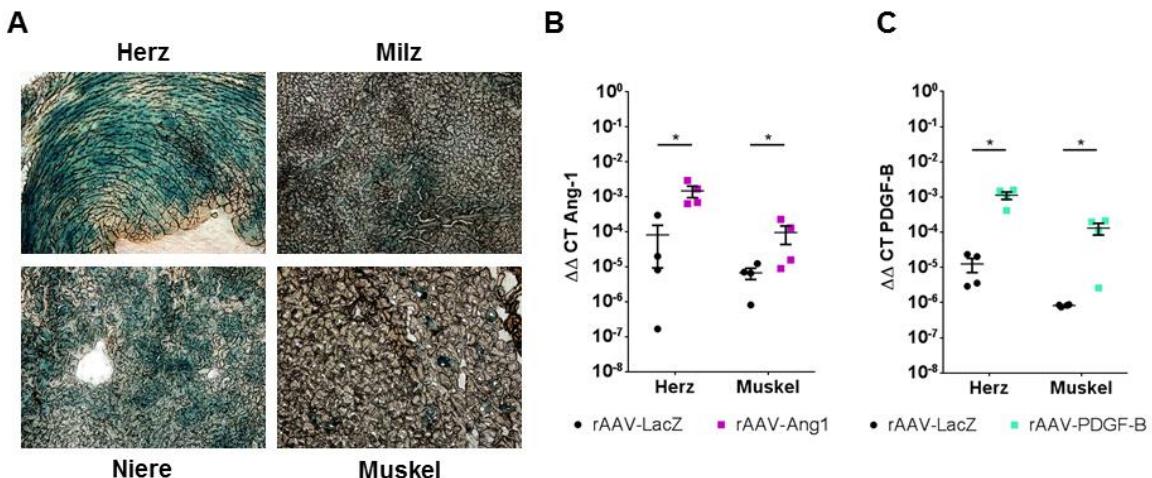


Abbildung 33: Abb. A X-Gal-Färbungen von histologischen Präparaten LacZ-transduziert C57BL/6 Tiere (rAAV-2/9.LacZ, 5×10^{12} Viruspartikel). Es zeigt sich eine deutliche Anreicherung der LacZ-Expression im Herzen und etwas geringer in Milz, Niere und Muskel. **Abb. B und C** Die Steigerung der Angiopoietin-1 und PDGF-B mRNA Spiegel konnte mittels PCR nach Transduktion mittels eines adenoassoziierten Virus, welcher für Ang-1 oder PDGF-B codiert, gezeigt werden (* p<0,05 vs rAAV-LacZ, n = 4).

3.4.2. Kapillar- und Perizytendichte

Durch eine rAAV-vermittelte Transduktion der EC-Ang-2-on Tiere mit Ang-1 oder PDGF-B konnte der Perizytenbesatz der Endothelzellen wiederhergestellt werden. Dies wird zum einen in den Beispielbildern in Abbildung 34 A deutlich, in denen eine deutliche Zunahme der Perizytendeckung einzelner Gefäße in EC-Ang2-on + Ang1 und EC-Ang2-on + PDGF-B Tieren zu beobachten ist. Die Quantifizierung der PECAM-1 und NG2 positiven Zellen in Herzschnitten verdeutlicht diese Zunahme in der Perizytenzahl (EC-Ang2-on 1493 ± 346 vs. EC-Ang2-on + Ang1 4036 ± 358 vs. EC-Ang2-on + PDGF-B 3967 ± 170 NG2 pos. Zellen / mm^2). Neben der Zunahme der Perizytenzahl wurde sowohl in der Ang-1, als auch in der PDGF-B transduzierten Gruppe ein signifikanter Anstieg der Endothelzelldichte festgestellt (EC-Ang2-on 3875 ± 555 vs. EC-Ang2-on + Ang1 7534 ± 367 vs. EC-Ang2-on + PDGF-B 7622 ± 179 PECAM-1 pos. Zellen / mm^2).

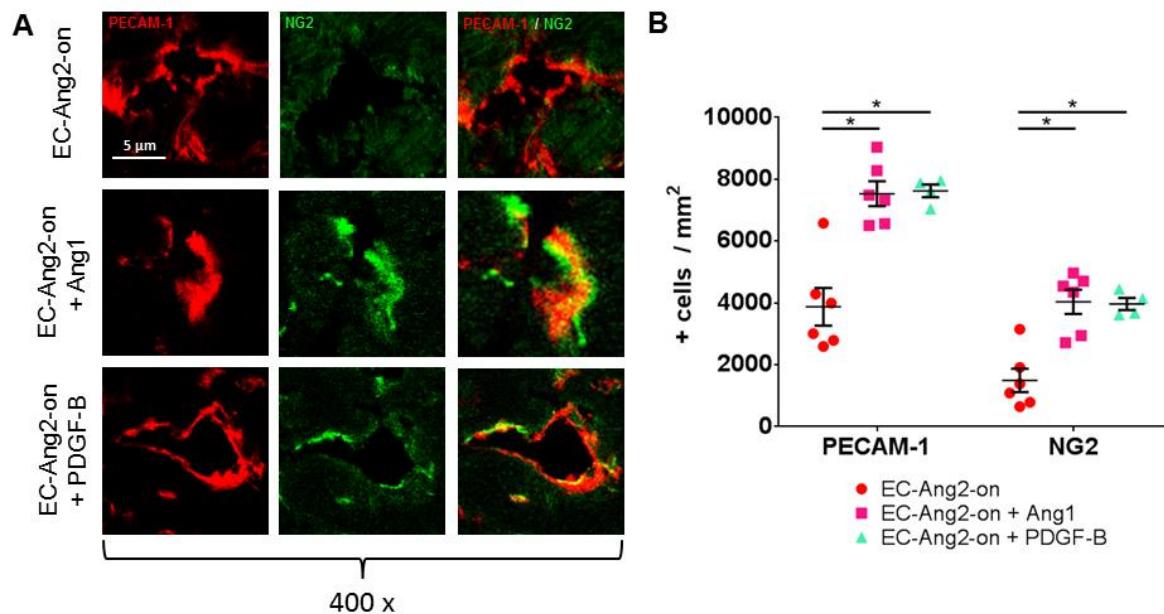


Abbildung 34: Die PECAM/NG2-Doppelfärbung zeigt in den Beispielbildern (**Abb. A**) und der Quantifizierung (**Abb. B**) eine signifikante Zunahme Perizytenanzahl im Gewebe (Herz). Im Übrigen demonstriert die Auszählung der Endothelzeldichte eine signifikante Zunahme im Vergleich zu den EC-Ang2-on Tieren (* $p<0,05$ vs. EC-Ang2-on, n = 6 für EC-Ang2-on, n = 6 für EC-Ang2-on + Ang1, n = 4 für EC-Ang2-on + PDGF-B).

3.4.3. Gefäßpermeabilität

In der Permeabilitätsmessung zeigt sich eine erhöhte Permeabilität in den EC-Ang2-on Tieren, welche durch eine rAAV2/9 vermittelte Transduktion der Ang-1 oder PDGF-B Gene normalisiert werden konnte (180 Sekunden: EC-Ang2-on $191,6 \pm 24$ vs. EC-Ang2-on + Ang1 $107,7 \pm 2,3$ vs. EC-Ang2-on + PDGF-B $123,8 \pm 6$ Prozent des Nullwerts).

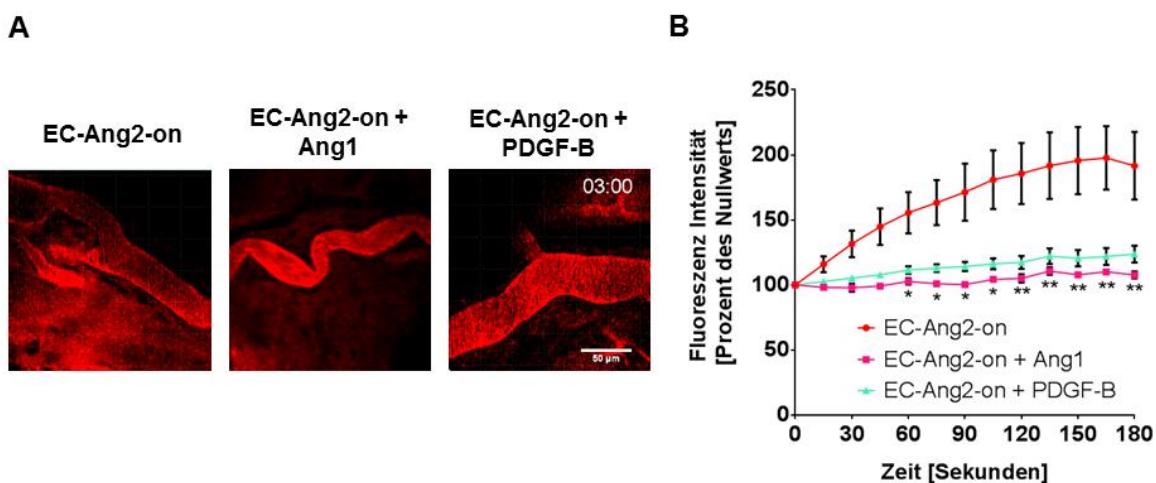


Abbildung 35: In **Abb. A** sind Beispielbilder der Permeabilitätsmessung drei Minuten nach Injektion von 4 kD TRITC-Dextran dargestellt, die bereits eine geringere Extravasation des Dextrans demonstrieren. In der Quantifizierung (**Abb. B**) bestätigt sich die signifikante Reduktion der Permeabilität nach Transduktion Ang-1 und PDGF-B (* $p<0,05$ vs. EC-Ang2-on, ** $p<0,001$ vs. EC-Ang2-on).

3.4.4. Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser

Sowohl die EC-Ang2-on + Ang1 Tiere, als auch die PDGF-B transduzierten Mäuse entwickelten im Verlauf nicht die linksventrikuläre Dilatation, die in EC-Ang2-on Tieren beobachtet wurde, wie die linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser im Alter von 24 Wochen demonstrieren (24 Wochen: EC-Ang2-on $0,53 \pm 0,04$ vs. EC-Ang2-on + Ang1 $0,37 \pm 0,02$ vs. EC-Ang2-on + PDGF-B $0,35 \pm 0,01$ cm).

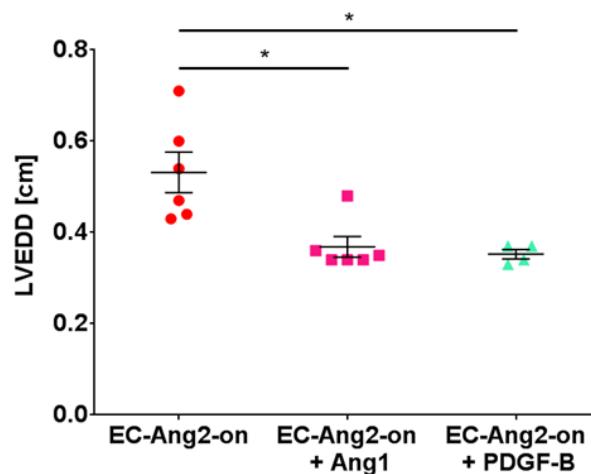


Abbildung 36: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser im Alter von 24 Wochen. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion des Durchmessers in EC-Ang2-on + Ang1 und EC-Ang2-on + PDGF-B Tieren im Vergleich zu den EC-Ang2-on Tieren (* $p<0,05$ vs. EC-Ang2-on, n = 6 für EC-Ang2-on, n = 6 für EC-Ang2-on + Ang1, n = 4 für EC-Ang2-on + PDGF-B).

3.5. Einfluss einer Inhibierung der Stickoxid-Bildung in EC-Ang2-on Mäusen

Zur Untersuchung des Effekts von Stickstoffmonoxid (NO) im transgenen Mausmodell der endothelialen Ang-2 Überexpression wurden EC-Ang2-on Tiere mit L-NAME, einem unselektiven Inhibitor aller Stickoxidsynthasen, im Alter von zwölf Wochen behandelt. Bereits im Alter von 18 Wochen zeigte sich in den so behandelten Tieren eine Normalisierung der Gefäßpermeabilität (180 Sekunden: EC-Ang2-on: $191,6 \pm 24$ vs. EC-Ang2-on + L-NAME: $112,4 \pm 4,3$ Prozent des Nullwertes, Abbildung 37 A). Weiterhin konnte die systemische Hypotension der EC-Ang2-on Tiere, die sich im Verlauf des Beobachtungszeitraumes entwickelte, durch eine Inhibierung der NOS verhindert werden (24 Wochen: EC-Ang2-on: $84,1 \pm 2,8$ vs. EC-Ang2-on + L-NAME: $108,3 \pm 12,9$ mmHg, Abbildung 37 B).

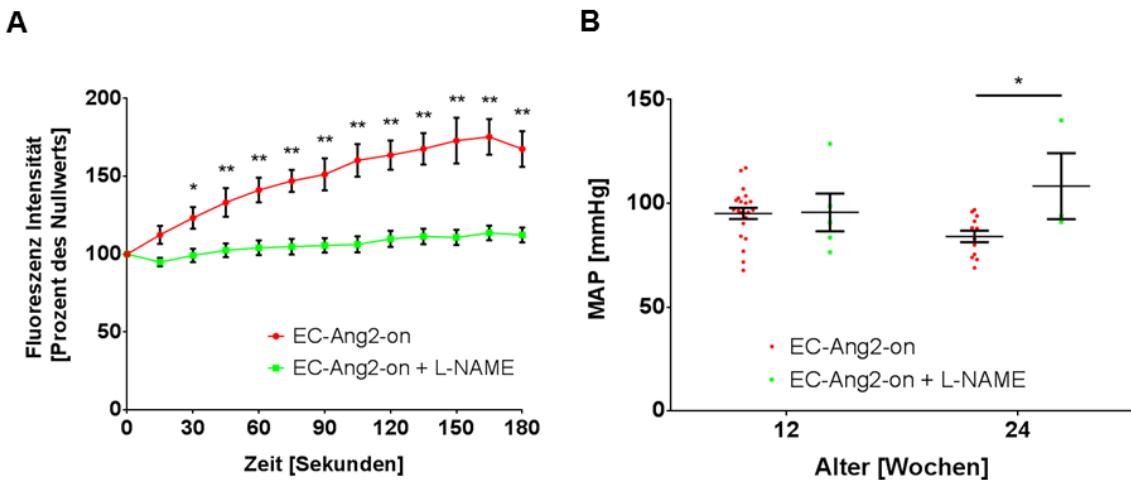


Abbildung 37: **Abb. A** zeigt den Verlauf der TRITC-Dextran Extravasation mit einer reduzierten Gefäßpermeabilität in L-NAME behandelten Tieren. **Abb. B** stellt den arteriellen Mitteldruck in EC-Ang2-on Tieren und L-NAME behandelten Tieren dar. Es zeigt sich ein signifikant reduzierter arterieller Mitteldruck (*p<0,05 vs. EC-Ang2-on, **p<0,001 vs. EC-Ang2-on).

Auch konnte in den L-NAME behandelten Ang-2 überexprimierenden Tieren die Dilatation des linken Ventrikels im Vergleich zu den unbehandelten EC-Ang2-on Mäusen verhindert werden. So zeigten diese Tiere einen niedrigeren linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (EC-Ang2-on: $0,47 \pm 0,03$ vs. EC-Ang2-on + L-NAME: $0,33 \pm 0,01$ cm, Abbildung 38 A) und eine Reduktion des auf das Körpergewicht normalisierten Herzgewichts (EC-Ang2-on: $7,2 \pm 1,1$ vs. EC-Ang2-on + L-NAME: $4,8 \pm 0,14$ mg/g, Abbildung 38 B).

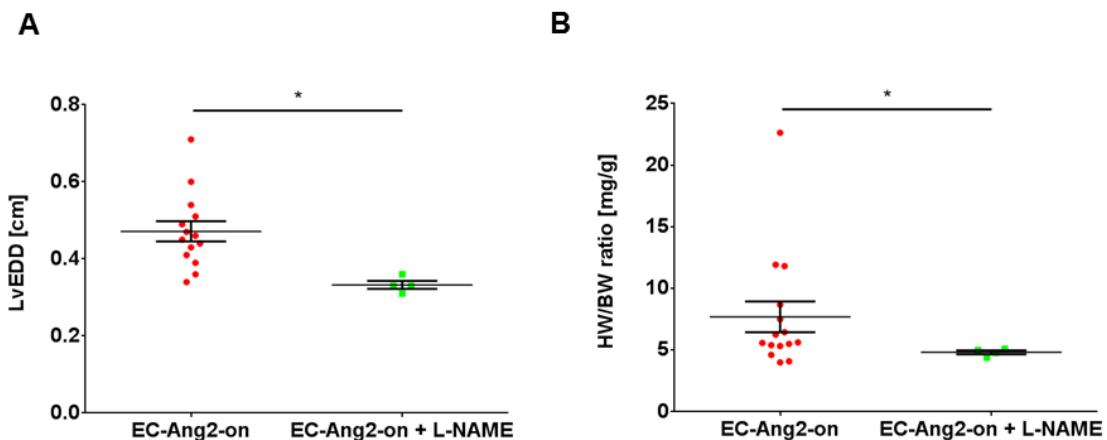


Abbildung 38: **Abb. A** Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser ist in L-NAME behandelten EC-Ang2-on Tieren nach 24 Wochen nicht erhöht im Vergleich zu unbehandelten Ang-2 überexprimierenden Tieren. **Abb. B** Weiterhin ist das auf das Körpergewicht normalisierte Herzgewicht niedriger (*p<0,05 vs. EC-Ang2-on).

3.6. Effekt von Ang-2 auf die Perizytenanlagerung *in vitro*

In den Ko-Kulturversuchen von murinen Endothelzellen (mouse brain endothelial cells, bEnd3) mit Perizyten (ATCC-CCL-226) auf Matrigel wurde die Anzahl von Perizyten pro Endothelzellring bestimmt. Hierbei zeigte sich nach 24 Stunden eine Verringerung der Perizytenzahl pro Endothelzellring (Ang2: $3,4 \pm 0,39$ vs. pcDNA: $7,0 \pm 0,39$ Perizyten / Ring). Durch eine gleichzeitige Transfektion der Endothelzellen mit Ang-2 und entweder Ang-1 oder PDGF-B konnte die Reduktion der Perizytenanlagerung, welche in Ang-2 transfizierten Zellen vorlag, aufgehoben werden (Ang2: $15,3 \pm 0,4$ vs. Ang2 + Ang-1: $24,4 \pm 0,9$ vs. Ang2 + PDGF-B: $28,0 \pm 3,4$ vs. pcDNA: $24,2 \pm 1,7$ Perizyten / Ring, Abbildung 39).

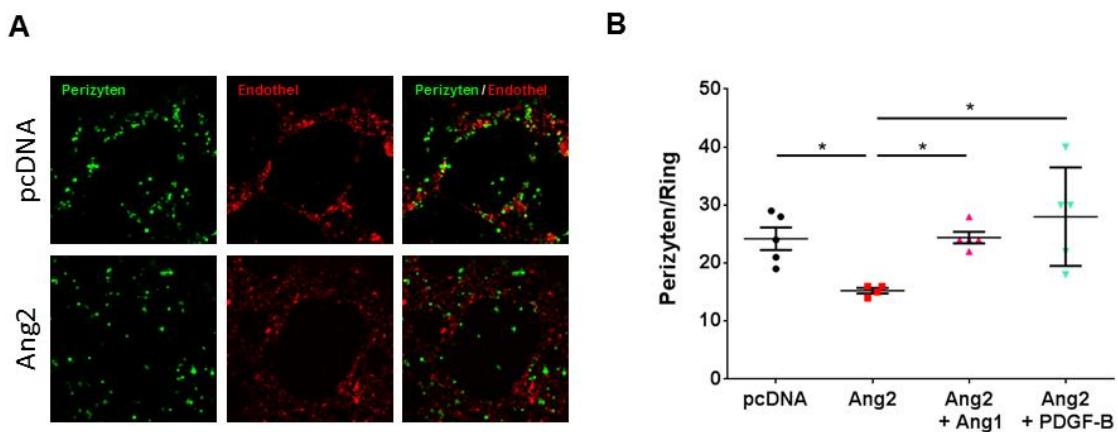


Abbildung 39: Abb. A zeigt Beispielbilder der Perizyten und Endothelzellen acht Stunden nach Zugabe der Perizyten. Die Quantifizierung in Abb. B demonstriert eine signifikante Reduktion der Perizyten in Ang-2 behandelten Ansätzen im Vergleich zu den pcDNA behandelten Zellen sowohl nach acht als auch nach 24 Stunden. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Batimastat aufgehoben (*p<0,05).

3.7. Angiopoietin-2 im Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis

Nach Induktion einer systemischen Inflammation mittels intraperitonealer Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) wurde das Überleben in EC-Ang2-on Tieren und deren Kontrollen untersucht. Hierbei zeigte sich insbesondere in der Frühphase der Sepsis eine deutlich höhere Sterblichkeit in EC-Ang2-on Tieren im Vergleich zu EC-Control Tieren (EC-Ang2-on: 12,5% vs. EC-Control: 62,5% Überleben nach 24 Stunden, siehe Abbildung 40 A). Weiterhin wurden, um den Effekt einer Ang-2 Antikörperbehandlung im Rahmen einer LPS-induzierten Sepsis zu untersuchen, C57BL/6 Tiere nach Injektion mit einem Ang-2 Antikörper (LC10) oder einem Kontrollantikörper Lipopolysaccharide intraperitoneal injiziert. Hierbei zeigte sich 36 Stunden nach Beginn der Sepsis eine Reduktion der Mortalität in Ang-2 Antikörper behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrollantikörper behandelten Tieren (LC10: 50% vs. Kontroll-Ak: 17% Überleben, siehe Abbildung 40 B).

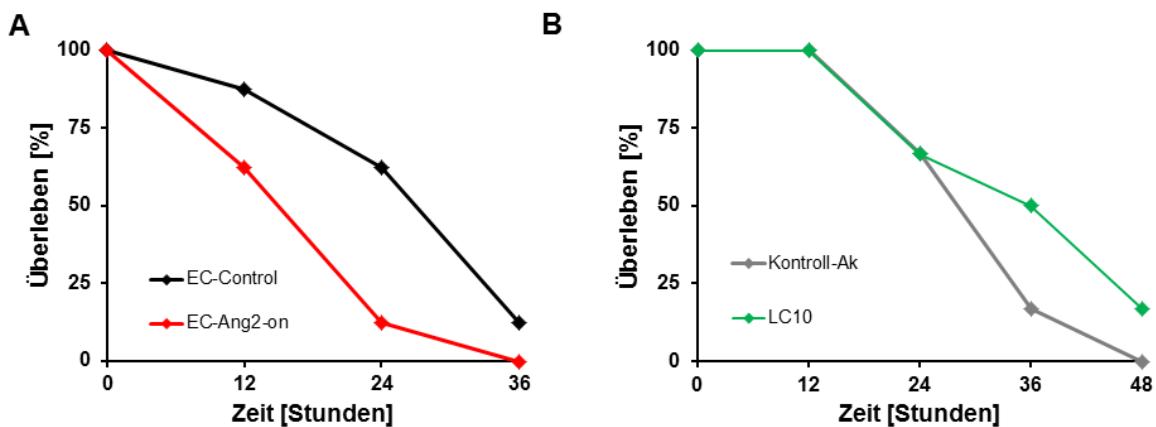


Abbildung 40: **A** EC-Ang2-on Tiere zeigen nach Sepsisinduktion eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu Kontrolltieren (n=8) **B** Die Behandlung mit einem Ang-2 Antikörper reduziert die Mortalität in der LPS-induzierten Sepsis im Vergleich zu Kontrolltieren nach 36 Stunden (n=6).

4. Diskussion

Obwohl das System aus den Angiopoietinen 1 und 2 und ihrem Rezeptor Tie-2 nunmehr seit fast 20 Jahren erforscht wird, in denen die zentrale Rolle von Angiopoietinen in der Regulation des endothelialen Aktivitätszustandes und der embryonalen Vaskulogenese gut demonstriert werden konnte, wurde bisher noch nicht untersucht, welchen Einfluss Angiopoietin-2 auf die kardiovaskuläre Funktion im adulten Organismus ausübt. Der Grund hierfür lag hauptsächlich in der hohen embryonalen Letalität in Ang-2 überexprimierenden Tieren. Durch die Verwendung eines transgenen Mausmodells mit induzierbarer Ang-2 Überexpression bietet sich nun die Möglichkeit, diesen Einfluss zu untersuchen.

4.1. Veränderungen der Gefäßstruktur und Funktion unter moderater endothelialer Ang-2 Überexpression

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine auf das Endothel beschränkte, moderate Überexpression von Angiopoietin-2 zu einer Reihe von Gefäßabnormalitäten führt. So zeigten die Tiere bereits makroskopisch vergrößerte und geschlängelte konfigurierte Gefäße. Dieser Befund bestätigte sich auch in der *in vivo* Fluoreszenzangiographie (Abbildung 14 C, Abbildung 18 A). Gefäßabnormalitäten in Tieren mit Ang-2 Überexpression wurden bereits in der Arbeit von Maisonpierre et al. aus dem Jahr 1997 beschrieben⁹². Die konstitutive endotheliale Überexpression führte embryonal zur Ausbildung eines lediglich rudimentären Gefäßbaums mit zahlreichen Gefäßabbrüchen. Adulte Mäuse wurden in dieser Studie aufgrund der embryonalen Letalität nicht untersucht. In der hier vorliegenden Studie konnte somit zum ersten Mal der Effekt einer chronischen, moderaten Ang-2 Überexpression auf die Gefäßmorphologie im adulten Organismus untersucht werden. Neben den makroskopischen Veränderungen zeigte sich ein Verlust der Perizyten und eine Rarifizierung der Gefäße (demonstriert an der reduzierten Endothelzellzahl), wie in Abbildung 15 und der dazugehörigen Quantifizierung (Abbildung 16) zu sehen ist. Interessanterweise konnte der Ang-2 vermittelte Verlust an Perizyten durch eine Aussetzen der Überexpression im Alter von zwölf Wochen komplett aufgehoben werden.

Da es sich bei Perizyten um Zellen handelt, die eine große Variabilität in ihrer Morphologie und der Expression ihrer Marker aufweisen⁶, wurde zur Bestätigung des Perizytenverlustes in der PECAM/NG2 Färbung ein weiterer Versuch durchgeführt, um den Effekt von Ang-2 auf Perizyten zu überprüfen. In den Ang-2 transfizierten X-LacZ-4 Reportermäusen kam es analog zu den Versuchen in transgenen EC-Ang2-on Tieren zu einer signifikanten Reduktion des Perizytenbesatzes im Bereich des Diaphragmas (siehe Abbildung 17).

Der Verlust von Perizyten durch Ang-2 wurde bereits in anderen Publikationen beschrieben. So zeigten z.B. Feng et al. in einem Modell der sauerstoffinduzierten Retinopathie (oxygen induced retinopathy / OIR) einen Verlust an Perizyten in Tieren mit einer retinalen Ang-2 Überexpression³⁸. Über den Verbleib der Perizyten unter Ang-2 Stimulation ist bisher wenig bekannt. Zum einen konnten Zehendner et al. zeigen, dass sowohl die Induktion einer inflammatorischen Reaktion durch IL-1 β als auch eine moderate Hypoxie im Modell einer zerebralen Gewebskultur zur Aktivierung von Caspase-3 in Perizyten führt¹⁷⁴. Bei Caspase-3 handelt es sich um einen Bestandteil der Signalkaskade, über die der Cytochrom c induzierte programmierte Zelltod (Apoptose) vermittelt wird²². Für beide pathologischen Zustände – Hypoxie und Inflammation – wurde eine Steigerung der Angiopoietin-2 Expression gezeigt^{84, 137}, sodass der hier beschriebene Ang-2 vermittelte Perizytenverlust eventuell auf einer Apoptose der Perizyten beruht. Andererseits demonstrierten Pfister et al., dass es im Mausmodell der diabetischen Retinopathie zu einer Zunahme der Perizytenmigration kommt, welche in Angiopoietin-2 defizienten Mäusen ausblieb¹¹⁹. Ein weiteres mögliches Schicksal der Perizyten unter Ang-2 Stimulation könnte zudem in der Dedifferenzierung liegen. Diese Möglichkeit wurde bislang für Perizyten nicht gezeigt, in primären vaskulären glatten Muskelzellen jedoch wurde durch Behandlung mit Matrix-Metalloprotease-1 (MMP-1) eine Dedifferenzierung induziert⁹, welche durch einen Verlust vSMC spezifischer Marker und einer Reduktion des kontraktilen Phänotyps gekennzeichnet war. Bei MMP-1 handelt es sich um eine Protease, deren Expression durch Ang-2 (im Zusammenspiel mit VEGF) angestossen werden kann³⁶. Diese mögliche Ang-2 vermittelte Dedifferenzierung – über eine Aktivierung der MMP-1 – könnte insbesondere unter Berücksichtigung der nahen Verwandschaft zwischen vSMCs und Perizyten verantwortlich für den hier demonstrierten Perizytenverlust sein. Über welchen der hier diskutierten Wege (Migration, Dedifferenzierung, Apoptose) der Perizytenverlust vermittelt wird, oder ob mehrere Mechanismen verantwortlich sind, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt.

Erhöhte Angiopoietin-2 Spiegel und ein Verlust an Perizyten sind in früheren Arbeiten mit einer gesteigerten Gefäßpermeabilität assoziiert worden^{44, 124}. Darüber hinaus wurde eine starke Ödemneigung in EC-Ang2-on Tieren beobachtet, als Hinweis auf eine gesteigerte Gefäßpermeabilität. Um zu untersuchen, ob die makroskopischen und histologischen Veränderungen in diesem transgenen Mausmodell der endothelialen Überexpression ebenfalls einen Einfluss auf die Gefäßpermeabilität ausüben, wurden im Alter von 18 Wochen Permeabilitätsmessungen durchgeführt, in denen sich tatsächlich eine signifikante Steigerung der Extravasation TRITC-markierter Dextranmoleküle fand (Abbildung 18). Die Zunahme der Gefäßpermeabilität ist zum einen durch eine Destabilisierung der Adherens Junctions erklärbar. Die Verschiebung des Ang-1/Ang-2 Gleichgewichts zu Gunsten von

Angiopoietin-2 reduziert die Ang-1 abhängige Stabilisierung von VE-Cadherin an der Zelloberfläche, wodurch der parazelluläre Übertritt von Flüssigkeit begünstigt wird²⁵. Ein weiterer möglicher Mechanismus besteht im Ang-2 vermittelten Abbau der Extrazellulärmatrix. So ist Ang-2 in der Lage, die Expression diverser Matrix-Metalloproteasen zu induzieren, darunter MMP-2 und MMP-9, welche zunächst einen Abbau der Extrazellulärmatrix bewirken. Weiterhin sind diese MMPs in der Lage über einen Abbau von Talin (durch MMP-2) die Aktivität von Integrinen zu reduzieren^{90, 142, 175}, die die Verankerung von Zellen mit der Extrazellulärmatrix vermitteln. In Perizyten spielt hierbei hauptsächlich das Integrin Heterodimer $\alpha 5\beta 1$ (Fibronectin-Rezeptor) eine Rolle¹⁵⁴, für welche die Aktivierung durch Talin gut dokumentiert ist¹⁰⁴.

Wie der genaue Mechanismus des Ang-2 vermittelten Perizytenverlusts verläuft, wird in zukünftigen Studien geklärt werden.

4.2. Einfluss der Ang-2 vermittelten Gefäßdestabilisierung auf die kardiovaskuläre Funktion

Da eine Zunahme des Herzgewichts in den hier verwendeten EC-Ang2-on Tieren beschrieben ist¹³² und sich die oben dargelegten vaskulären Auffälligkeiten zeigten, wurde in einem weiteren Schritt die hämodynamische Funktion der EC-Ang2-on Tiere untersucht.

In der nicht-invasiven Blutdruckmessung zeigte sich hierbei eine im Alter von 24 Wochen signifikante systemische Hypotension. Dieser Befund bestätigte sich in der invasiven linksventrikulären Druckmessung im Anschluss an den letzten Messzeitpunkt. Sowohl in Ruhe, als auch unter Stimulation mit steigenden Dosen Noradrenalin, demonstrierten die EC-Ang2-on Tiere die Unfähigkeit, Drücke - vergleichbar mit den Kontrolltieren - zu entwickeln. Weiterhin war die Relaxation in EC-Ang2-on Mäusen gestört. Sowohl die systemische Hypotension als auch die gestörte Relaxation konnte durch ein Aussetzen der Ang-2 Überexpression im Alter von zwölf Wochen zumindest teilweise verhindert werden.

Eine Beeinflussung der Blutdruckregulation über die Kontraktion von Perizyten konnte bereits in den 1980er Jahren erstmalig beschrieben werden^{71, 155}. So konnte z.B. von Haefliger et al. gezeigt werden, dass Perizyten in der Lage sind, zu kontrahieren und zu relaxieren^{52, 72}, was einen Einfluss von Perizyten auf die Regulation des Blutflusses im Bereich der Kapillaren möglich macht.

Der Großteil der Blutdruckregulation findet jedoch im Bereich der Arterien und präkapillären Arteriolen statt, durch Kontraktion der in der Tunica media befindlichen glatten Muskelzellen. Die Wirkung von Ang-2 auf glatte Muskelzellen der Gefäße und den Vasotonus ist in letzter

Zeit in den Fokus der Forschung gerückt. So konnte von Molnar und Siemann gezeigt werden, dass Angiopoietin-2 *in vitro* zu einer Loslösung von Endothelzellen und glatten Muskelzellen führt¹⁰³. Auch *in vivo* konnte ein Einfluss von Ang-2 auf die glatten Muskelzellen der Gefäße demonstriert werden. In einem Modell der Hinterlaufischämie führte eine Überexpression von Ang-2 zu einer Reduktion der Kollateralbildung und Hinterlaufdurchblutung bei einem Defizit in der Anlagerung von glatten Muskelzellen¹²³. Ein möglicher Einfluss von Ang-2 auf das Gefäßremodelling während einer Hypertension wurde in 2012 von Korff et al. nahegelegt⁸¹. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in Mäusen eine Hypertensionsinduktion eine kalziumvermittelten Ausschüttung von Ang-2 aus den Endothelzellen bewirkte, wobei eine Behandlung isolierter Arterien mit Ang-1 diese Ausschüttung unter erhöhten Drücken verhindern konnte.

Zusammengenommen legen die Ergebnisse dieser Studie den Schluss nahe, dass Angiopoietin-2 zum einen über eine Destabilisierung der Mikrozirkulation gefolgt von einer gesteigerten Gefäßpermeabilität zu dem hier gezeigten linksventrikulären Pumpversagen führt. Zum anderen deuten die hier besprochenen Befunde darauf hin, dass Ang-2 in der Lage ist, neben den Perizyten der Mikrogefäßse auch die Funktion von glatten Muskelzellen zu beeinflussen, wobei dieser Ang-2 Effekt bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Das klinische Bild der Herzinsuffizienz lässt sich anhand des Herzzeitvolumens in zwei Kategorien unterteilen: Das Low-output-failure, zum Beispiel im Rahmen einer ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie und das High-output-failure, welches durch ein hohes Herzzeitvolumen gekennzeichnet ist⁵⁵. Üblicherweise geht eine systolische Funktionsstörung des Herzens im Rahmen eines Low-output-failures mit einer Steigerung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes einher. Durch fibrotische Umbauprozesse im Herzen nimmt die Dehnbarkeit (Compliance) des Myokards ab, sodass die Drücke im linken Ventrikel zum Ende der Diastole ansteigen¹³⁶. EC-Ang2-on Tiere zeigten jedoch keinen Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Druckes im Alter von 24 Wochen. Weiterhin führte die endotheliale Ang-2 Überexpression zu einer signifikanten Steigerung des Herzzeitvolumens.

Eine moderate Angiopoietin-2 Überexpression führt demnach, neben den Veränderungen in Aufbau und Funktion der Kapillaren, bedingt durch einen Verlust der Perizyten, zu einer systemischen Hypotension mit folgender linksventrikulärer Dilatation und einem kardialen Remodelling im Verlauf des Beobachtungszeitraumes.

4.3. Vergleich der kardiovaskulären Veränderungen in Mäusen mit herzspezifischer und herzaussparender Ang-2 Überexpression

Um zu überprüfen, ob die hämodynamischen Veränderungen auf einer Anpassung an eine Ang-2 vermittelte periphere Gefäßdestabilisierung beruhen, oder ob es sich um einen direkten Effekt von Ang-2 auf das Myokard handelt, wurde ein zweiter transgener Mausstamm untersucht. Hier stand Ang-2 in einem Tet-Off Promotersystem unter der Kontrolle eines α -MHC Promoter. Hierdurch konnte die Ang-2 Überexpression auf das Myokard beschränkt werden. Die überexprimierenden Tiere („CM-Ang2-on“) wurden mit ihren singletransgenen Geschwistern („CM-Control“) verglichen.

Wie in Abbildung 25 und Abbildung 26 gezeigt, fand sich keine hämodynamische Veränderung in den CM-Ang2-on Mäusen. Durch Injektion von 1×10^{12} Viruspartikeln (AAV2.9), welche für Ang-2 codierten konnte in C57BL/6 Mäusen ebenfalls eine kardial beschränkte Ang-2 Expression herbeigeführt werden. Auch in diesem Modell der myokardialen Ang-2 Überexpression entwickelte sich keine Herzinsuffizienz (siehe 3.2.5 und 3.2.6).

Zuletzt wurden die Veränderungen im Rahmen einer herzaussparenden Angiopoietin-2 Überexpression untersucht. Hierzu wurden erneut C57BL/6 Mäuse im Alter von zwölf Wochen mit einem LacZ und einem Ang-2 codierenden Virus transduziert. Um die systemische, aber herzaussparende, Überexpression zu gewährleisten, wurde der AAV-Serotyp 2/7 verwendet. Bereits von Bish et al. konnte eine gute extrakardiale Transduktion gezeigt werden¹², die hier durch eine LacZ Färbung der Kontrolltiere bestätigt wurde (siehe Abbildung 31). In der linksventrikulären Druckmessung zeigten die Ang-2 transduzierten Tiere (rAAV2/7.Ang2) eine Hypotension mit eingeschränkter Reservekapazität (unter Stimulation mit Noradrenalin) und eine progrediente Vergrößerung des linken Ventrikels im Vergleich zu den Kontrolltieren (rAAV2/7.LacZ, siehe Abbildung 32).

Diese Befunde unterstreichen die Vermutung, dass die Ang-2 vermittelte Herzinsuffizienz auf einer Anpassung an eine veränderte hämodynamische Situation beruht und nicht auf einem primären Effekt von Ang-2 auf das Myokard oder die myokardiale Durchblutung.

4.4. Effekt einer Antagonisierung der Ang-2 Überexpression durch rAAV2/9 vermittelte Ang-1 und PDGF-B Transduktion

Um die Interaktionen zwischen Ang-2, dem kompetitiven Antagonisten Ang-1 und dem Wachstumsfaktor PDGF-B zu untersuchen, wurden EC-Ang2-on Tiere nach Durchführung der ersten Messung im Alter von zwölf Wochen mithilfe eines AAV2/9, welcher das Gen für entweder Ang-1 oder PDGF-B enthielt, transduziert. Der AAV Serotyp 2/9 in hoher

Dosierung (5×10^{12} Viruspartikel pro Tier) wurde im Rahmen dieser Versuche ausgewählt, weil dieser eine breite Transduktion verschiedener Gewebe mit einer hohen Effektivität erlaubt, um der systemischen Ang-2 Überexpression effektiv entgegen zu wirken¹⁷⁸.

Die Ang-1 Transduktion war in dem Modell der endothelialen Ang-2 Überexpression in der Lage, sowohl den Perizytenverlust und die gesteigerte Gefäßpermeabilität, als auch die progrediente linksventrikuläre Dilatation unter Ang-2 Überexpression zu verhindern. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass nicht die absolute Menge an Ang-1 oder Ang-2 entscheidend für die Stabilität der Gefäße ist, sondern dass insbesondere das Verhältnis der beiden Wachstumsfaktoren zueinander über die Stabilität der Gefäße entscheidet.

Um die zentrale Rolle von Perizyten in der Stabilisierung der Gefäße zu demonstrieren, wurden in einem weiteren Versuch EC-Ang2-on Tiere mit dem perizytenrekrutierenden Faktor PDGF-B transduziert. Für PDGF-B zeigten die Arbeiten von Lindblom et al. und Nystro et al, dass eine Deletion des PDGF-B retention motifs, welches die Bindung von Perizyten an die Extrazellulärmatrix vermittelt, in einem transgenen Mausstamm (PDGF-B^{ret/ret}) zu ähnlichen Veränderungen führt, wie sie hier für die EC-Ang2-on Tiere demonstriert wurden. So zeigten die PDGF-B^{ret/ret} Tiere einen Perizytenverlust und eine Rarifizierung der Kapillaren, gefolgt von einem Anstieg des Herzzeitvolumens und des Herzgewichts^{89, 109}. In Übereinstimmung mit diesen Befunden verhinderte eine PDGF-B Transduktion in EC-Ang2-on Tieren die Perizytenrarifizierung, die Hyperpermeabilität und letztlich die Ausbildung der linksventrikulären Dilatation, welche für die EC-Ang2-on Tiere demonstriert werden konnte.

Die im Tiermodell erhobenen Befunde konnten ebenso im Rahmen eines *in vitro* Experiments bestätigt werden. Hierzu wurden Endothelzellen (bEnd3) und Perizyten (ATCC-CCL-26) auf einer simulierten Extrazellulärmatrix kokultiviert. In diesem Versuch führte eine Transfektion von bEnd3 Endothelzellen mit Angiopoietin-2 zu einer Reduktion der Perizytenzahl pro Endothelzellring. Dieser Effekt konnte analog zu den Versuchen in transgenen Tieren durch eine zusätzliche Transfektion mit Ang-1 oder PDGF-B verhindert werden.

Zusammengenommen lassen die hier dargelegten Befunde folgende Schlussfolgerung zu: In ruhenden Gefäßen besteht, durch eine konstante Freisetzung von Ang-1 aus den Perizyten, ein Übergewicht von Ang-1 gegenüber Ang-2. Hieraus resultiert eine stabile Aktivierung des Tie-2 Rezeptors, wodurch eine weitere Rekrutierung muraler Zellen (unter anderem über die Wachstumsfaktoren HB-EGF und HGF^{62, 79}) gefördert wird. Im Rahmen von z.B. Inflammation, Hypoxie und Neoplasie kommt es zu einer rapiden Ausschüttung von Ang-2 aus den Endothelzellen⁴¹, wodurch Ang-1 von dem gemeinsamen Rezeptor verdrängt wird.

Die Signaltransduktion am Tie-2 Rezeptor wird unterbrochen und es kommt zu einer Loslösung der Perizyten und einer Destabilisierung der Gefäßstruktur. Durch die folgende Hyperpermeabilität entwickelt sich im Verlauf eine linksventrikuläre Dilatation mit kardialem Remodelling im Rahmen eines High-output-failure. Eine zusätzliche Überexpression von Angiopoietin-1 verschiebt das Gleichgewicht zwischen Ang-1 und Ang-2 zugunsten von Ang-1. Weiterhin ist PDGF-B in dieser Situation in der Lage, Perizyten zu rekrutieren, welche durch ihre Ausschüttung von Ang-1 in der Lage sind, das Ang-1/Ang-2 Verhältnis in Richtung von Ang-1 zu verschieben. Beide Faktoren erhöhen somit das vorhandene Angiopoietin-1, wodurch eine Stabilisierung der Gefäße und eine Minderung der Ang-2 vermittelten Desintegration bewirkt wird. Diese Stabilisierung verhindert im Verlauf das durch die Hyperzirkulation bedingte Linksherzversagen (siehe Abbildung 41).

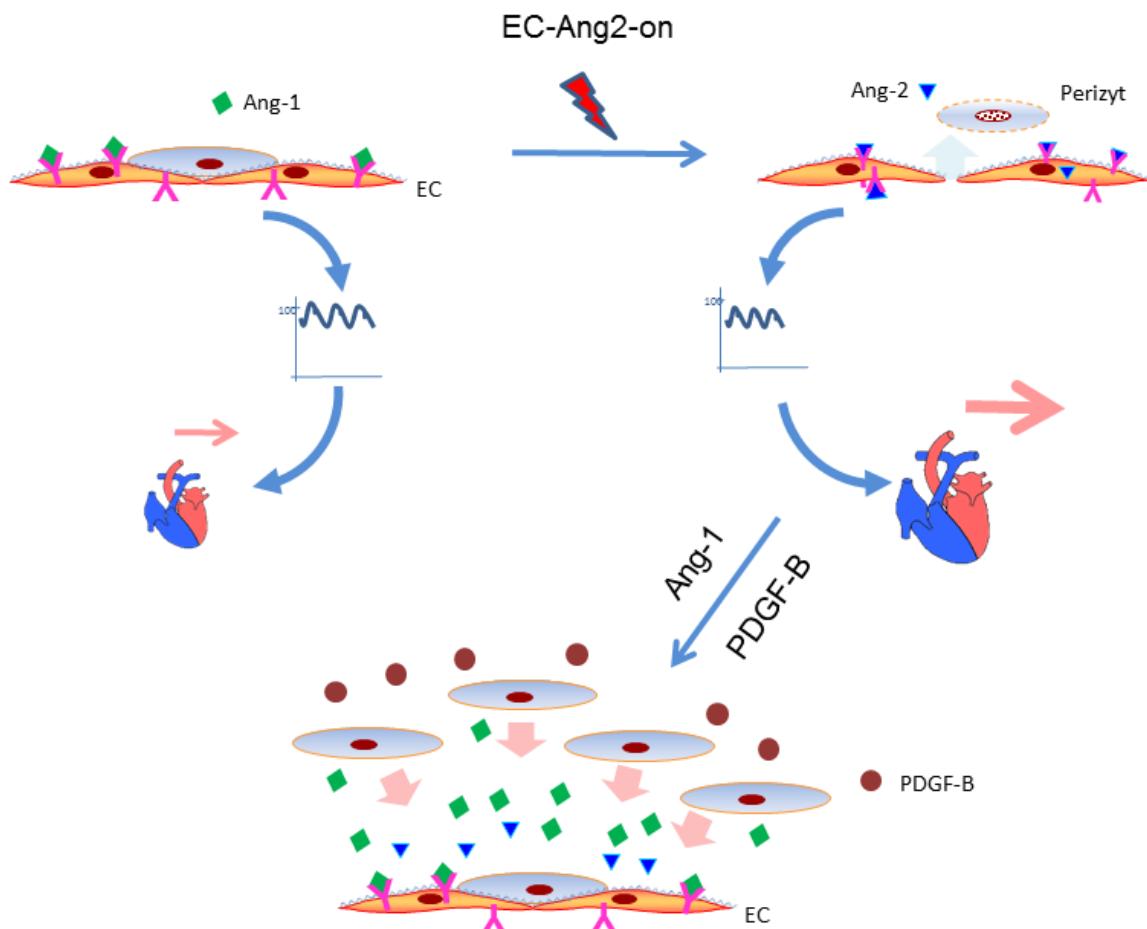


Abbildung 41: Im ruhenden Zustand besteht ein Übergewicht von Ang-1, welches in EC-Ang2-on Tieren zugunsten von Ang-2 verschoben wird. Dies führt nach einer Loslösung der Perizyten zu einer Steigerung der Gefäßpermeabilität, was letztlich in einer Reduktion des systemischen Blutdrucks und zu einem High-Output Heartfailure führt. Wird in diesem Zustand Ang-1 überexprimiert, so verdrängt dieses vermehrt Ang-2 vom gemeinsamen Rezeptor; es kommt zu einer Rekrutierung von Perizyten und einer Stabilisierung die Gefäße. Durch die zusätzliche Expression von PDGF-B werden vermehrt Perizyten rekrutiert, die ihrerseits Ang-1 produzieren, was das Ang-1/Ang-2 Gleichgewicht in Richtung Ang-1 verschiebt. Hierdurch normalisiert sich die häodynamische Situation und die Ausbildung des Linksherzversagens bleibt aus.

4.5. Hemmung der Stickstoffmonoxid Synthase im Mausmodell der endothelialen Ang-2 Überexpression

Da es sich bei Stickstoffmonoxid um einen starken Vasodilatator handelt⁴³, der zudem ein Teil der Signalkaskade ist, über welche der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die Gefäßpermeabilität steigert¹⁶⁷, wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss einer Hemmung der NO-Synthase (NOS) in EC-Ang2-on Tieren durch den NOS Inhibitor L-NAME untersucht. Die Behandlung der EC-Ang2-on Tiere mit L-NAME begann im Alter von zwölf Wochen. Bereits sechs Wochen später zeigte sich erwartungsgemäß eine Normalisierung der Gefäßpermeabilität. Weiterhin stieg der nicht-invasiv gemessene Blutdruck bis zum Alter von 24 Wochen an im Vergleich zu unbehandelten EC-Ang2-on Tieren. Diese Normalisierung von Gefäßpermeabilität und Blutdruck konnte auch die Ausbildung der linksventrikulären Dilatation und myokardialen Hypertrophie verhindern (siehe 3.5).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Angiopoietin-2 und Stickstoffmonoxid funktionelle Ähnlichkeiten besitzen und evtl. über dieselben Signalwege wirken. Zudem konnten Ahmed et al. zeigen, dass die adenovirale Transduktion von Angiopoietin-2 in Apoe^{-/-} Mäusen, welche mit Tiernahrung gefüttert wurden, die einen hohen Anteil an Fett und Cholesterin enthält, die Ausbildung einer Arteriosklerose abmildert, und dass dieser Effekt durch Blockierung der NO Synthese gehemmt werden kann¹. Andererseits ist die Rekrutierung muraler Zellen im Mausmodell der Hinterlaufischämie abhängig von Stickstoffmonoxid¹⁷⁰, während Angiopoietin-2 in der vorliegenden Studie zu einem Perizitenverlust führt. Folglich scheinen die Effekte und Signalwege von Angiopoietin-2 und NO nicht identisch zu sein, obwohl eine gegenseitige Beeinflussung nicht auszuschließen ist.

4.6. Angiopoietin-2 im Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis und klinischer Ausblick

In der vorliegenden Studie wurde bisher der Effekt einer chronischen Angiopoietin-2 Überexpression auf das kardiovaskuläre System besprochen. Im Menschen sind eine Reihe chronischer Krankheiten beschrieben, die mit einer Erhöhung der Angiopoietin-2 Spiegel assoziiert sind. So zeigen Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA)³⁷ und Psoriasis⁸⁶ eine erhöhte Expression von Angiopoietin-2. Im Falle der Psoriasis zeigte sich jedoch keine Veränderung in der Inzidenz einer Herzinsuffizienz³⁰. Bei der rheumatoiden Arthritis wurde eine erhöhte Inzidenz der Herzinsuffizienz festgestellt, wobei RA Patienten keine systemische Hypotension boten, sondern eine signifikant höhere Inzidenz von arteriellem Hypertonus, sodass in den Fällen von Herzinsuffizienz im Rahmen einer rheumatoiden Arthritis am ehesten von einem Low-Output Heartfailure auszugehen ist¹⁵⁶.

Eine linksventrikuläre Dilatation und myokardiale Hypertrophie im Rahmen einer chronischen Volumenbelastung des Herzens wurde bisher in Tiermodellen beschrieben, zeigt sich aber auch als Folge einer Reihe von Krankheiten, welche mit einer Reduktion des Gefäßwiderstandes einhergehen. So konnten Ozek et al. in einem Rattenmodell durch End-zu-Seit-Anastomosierung der Femoralarterie an die Femoralvene eine linksventrikuläre Dilatation und eine Zunahme der linksventrikulären Wanddicken induzieren¹¹³. Zu den chronischen Zuständen, die mit einer Reduktion des systemischen Widerstandes einhergehen, zählen vor allem solche, die zu einer Bildung von arteriovenösen Fisteln führen. Diese können kongenital (Osteodystrophia deformans, Morbus Osler, Klippel-Trenaunay-Weber-Syndrom) oder iatrogen sein (Cimino-Brescia-Shunt zur Hämodialyse) und im Rahmen von Traumen entstehen. Bei großen arteriovenösen Fisteln wurde bereits die Entstehung einer linksventrikulären Dilatation/Kardiomegalie und ein erhöhtes Herzzeitvolumen beschrieben^{7, 63}. Für keine dieser Erkrankungen konnte jedoch bisher eine Assoziation mit Angiopoietin-2 hergestellt werden. Somit kann zum aktuellen Zeitpunkt keine chronische Krankheit identifiziert werden, die dem hier präsentierten Phänotyp bei prolongierter Ang-2 Überexpression entspricht.

Die Sepsis jedoch, als akute, selbstlimitierende Erkrankung, stellt ein Krankheitsbild dar, in welchem ein Großteil der hier beschriebenen Veränderungen vorhanden sind. So kann es im Rahmen systemischer Inflammationen zur Ausbildung eines Kapillarlecks^{2, 124}, einer systemische Hypotension^{59, 110} und einem linksventrikulären Pumpversagen im Rahmen eines High-Output Heartfailure kommen. Weiterhin zeigten Kümpers et al. eine Steigerung der Ang-2 Spiegel im Rahmen einer Sepsis, wobei die Höhe der Spiegel mit der Mortalität korreliert^{83, 84}. Umgekehrt konnten Witzenbichler et al. zeigen, dass eine Angiopoietin-1 Behandlung im Rahmen einer LPS-induzierten Sepsis die Hyperpermeabilität und Mortalität im Mausmodell senken konnte¹⁶⁶.

Um die Rolle von Angiopoietin-2 in der Sepsis zu untersuchen wurde in EC-Ang2-on Tieren und deren Kontrollen eine Sepsis induziert. Hierbei zeigte sich eine Steigerung der Mortalität in EC-Ang2-on Tieren, insbesondere in der frühen Phase der Sepsis. Durch eine Blockade von Ang-2 mithilfe eines Angiopoietin-2 Antikörpers konnte das Überleben in C57BL/6 Tieren im Vergleich zu Kontrollantikörper behandelten Tieren deutlich gesteigert werden, wie in Abbildung 40 zu sehen ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Behandlung mit Ang-2 Antikörpern zu einer Reduktion des Perizytenverlusts und der sepsisinduzierten Hyperpermeabilität, zu einer Normalisierung des Blutdrucks und zu einer Verbesserung des Überlebens führt¹⁷⁷.

Insbesondere in den letzten Jahren ist die Hemmung von Angiopoietin-2 vermehrt in den Fokus klinischer Studien gerückt. Der Schwerpunkt dieser Studien liegt jedoch auf der Hemmung von Angiopoietin-2 in Kombination mit einer herkömmlichen Chemotherapie bei Patienten mit soliden Tumoren. Bei AMG386 (Trebananib) handelt es sich zum Beispiel um einen Antikörper gegen Angiopoietin-1 und -2, welcher im Rahmen klinischer Studien bei metastasierten gastro-ösophagealen Karzinomen und im Rahmen von Rezidiven bei Ovarialkarzinomen eingesetzt wird^{34, 69}. Neben einigen Antikörpern, die mehrere angiogenetische Signalwege angreifen, wie z.B. CVX-241 (Angiopoietin-2/VEGF), stehen auch eine Reihe von Ang-2 spezifischen Antikörpern zur Verfügung, wie z.B. der Antikörper CVX-060 und der kürzlich erstbeschriebene Antikörper LC06¹⁵¹. Bisher wurden keine klinischen Studien zu Untersuchung einer antikörpervermittelten Inhibierung von Ang-2 im Rahmen inflammatorischer Prozesse durchgeführt.

Die hier besprochenen Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Angiopoietin-2 eine mögliche Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung einer septischen Hyperzirkulation spielt. Weiterhin konnte in einem Pilotversuch demonstriert werden, dass eine Hemmung von Angiopoietin-2 durch einen Angiopoietin-2 Antikörper zu einer Verbesserung des Überlebens im Rahmen einer LPS-induzierten Sepsis im Mausmodell führt. Zusammengenommen identifizieren diese Befunde Angiopoietin-2 als mögliches therapeutisches Ziel in der Behandlung der Sepsis / des septischen Schocks.

5. Zusammenfassung

In einer Vielzahl von Publikationen der letzten Jahre wurden die Angiopoietine als zentrale Regulatoren des endothelialen Aktivitätszustandes charakterisiert. Die kompetitiven Antagonisten Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 spielen eine wichtige Rolle in diversen pathologischen Prozessen, wie Angiogenese, Tumorangiogenese und Inflammation. Während Ang-1 zusammengefasst stabilisierend auf die Struktur der Gefäße und der umgebenden muralen Zellen wirkt, führt die rapide Ausschüttung von Ang-2 zu einer Destabilisierung.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine moderate endotheliale Ang-2 Überexpression (EC-Ang2-on) zunächst zu einem Verlust von Perizyten im Bereich der kleinen Gefäße führt. Dieser Verlust hat eine deutliche Steigerung der Gefäßpermeabilität zur Folge, wodurch sich im Verlauf des prolongierten Beobachtungszeitraums eine systemische Hypotension entwickelt. Diese konnte sowohl nicht-invasiv, als auch invasiv gemessen werden. Interessanterweise zeigten die Angiopoietin-2 überexprimierenden Mäuse ein erhöhtes Herzzeitvolumen, wobei der linksventrikuläre enddiastolische Druck unverändert blieb, sodass von dem Vorliegen eines High-Output Heartfailure auszugehen ist. Letztlich bildeten EC-Ang2-on Tiere eine progrediente linksventrikuläre Dilatation mit myokardialer Hypertrophie und Fibrose aus. Da dieser Phänotyp durch eine periphere Ang-2 Überexpression (rAAV2/7-Ang2) kopiert werden konnte, eine auf das Myokard beschränkte Überexpression (CM-Ang2-on, rAAV-CM-Ang2) jedoch keinen Einfluss auf Funktion und Morphologie des Herzens ausübt, ist bei den Herzveränderungen von einem sekundären Anpassungsprozess an eine hyperzirkulatorische Hypotension auszugehen. Weiterhin konnte die mikrovaskuläre Desintegration, gefolgt von Hypotension und Linksherzversagen, durch gleichzeitige Überexpression von sowohl Angiopoietin-1, als auch dem perizytenrekrutierenden Faktor PDGF-B verhindert werden. Da der Phänotyp der EC-Ang2-on Tiere (Hyperpermeabilität, Hypotension, Hyperzirkulation) den pathologischen Veränderungen im Rahmen einer Sepsis ähnelt und da ein Zusammenhang zwischen erhöhten Angiopoietin-2 Spiegeln und der Schwere einer Sepsis bereits demonstriert werden konnte, wurde in einem Pilotversuch der Effekt einer antikörpervermittelten Blockierung von Angiopoietin-2 im Mausmodell einer LPS-induzierten Sepsis untersucht. Hierbei konnte demonstriert werden, dass eine Behandlung mit Angiopoietin-2 Antikörpern einen positiven Einfluss auf das Überleben im Rahmen einer LPS-induzierten Sepsis ausübt.

Eine Angiopoietin-2 Überexpression führt demnach zu einer Hyperzirkulation mit progredientem Linksherzversagen auf dem Boden einer mikrovaskulären Destabilisierung, charakterisiert durch Perizytenverlust und gesteigerte Gefäßpermeabilität. Diese

5 Zusammenfassung

Veränderungen, die in der Sepsis zusammen mit erhöhten Ang-2 Spiegeln vorliegen, können durch eine Ang-2 Antikörperbehandlung im Tierversuch zumindest partiell antagonisiert werden. Die Ergebnisse dieser Experiments legen den Schluss nahe, dass die Antagonisierung von Ang-2 ein attraktives therapeutisches Ziel in der beginnenden Sepsis darstellt.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziierter Virus
ABIN-2	A20 binding inhibitor of NF- κ B activation 2
AdV	Adenovirus
Akt	Proteinkinase B
Ang	Angiopoietin
ATTC-CCL-226	Murine mesenchymale Zelllinie
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BRCP	Bovine retinal pericyte
bEnd3	Murine Endothelzelllinie, mouse brain endothelial cells
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BRPC	Bovine retinal pericyte
C57BL/6	Wildtyp Mausstamm
CMV	Cytomegalievirus
CO	Cardiac output, Herzzeitvolumen
COMP-Ang-1	Cartilage oligomeric matrix protein Angiopoietin-1
CRP	C-Reaktives Protein
CVVH	Kontinuierliche venovenöse Hämofiltration
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DIC	Disseminated intravascular coagulation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dP	Entwickelter Druck
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	Epidermal growth factor
EGM	Endothelial Growth Medium
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HB-EGF	Heparin binding EGF like growth factor
HEK293	Human embryonic kidney Zellen
HGF	Hepatocyte growth factor
HMEC	Humam Mammary Epithelial Cell
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IHD	Intermittierende Hämodialyse
IL-12	Interleukin-12
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
ITR	Inverted terminal repeat sequence
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
LacZ	Lactose-operon Z
L-NAME	N ω -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
LPS	Lipopolysaccharide
LvEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LvEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MAP	Mean arterial pressure, arterieller Mitteldruck

MGV	Mean grey value
Mhz	Megaherz
MMP	Matrix-Metalloprotease
MPLSM	Multi photon laser scanning Mikroskopie
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
MyD88	Myeloid differentiation protein 88
NF-κB	Nuclear factor-κB
NG2	Neuron-glial antigen-2
NHERF	Na+/H+ exchanger regulatory factor
NO	Stickstoffmonoxid
NOD1	Nucleotide oligomerization domain Rezeptor 1
NOD2	Nucleotide oligomerization domain Rezeptor 2
OIR	Oxygen induced retionpathy
ORF	Open reading frame
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffer saline
pCO2	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PE	Polyethylen
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PEI	Polyethylenemin
PGRP	Peptidoglykan recognition Protein

Abkürzungsverzeichnis

PI3-Kinase	Phosphatidylinositide 3-kinase
PLC-γ	Phospholipase C-γ
pO2	Sauerstoffpartialdruck
PRR	Pattern recognition receptor
rAAV	rekombinanter adenoassozierter Virus
RhoA	Ras homolog gene family member A
RNA	Ribonucleinsäure
SHG	Second harmonics generation
SMC	Smooth muscle cell
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
TGF-β	Transforming growth factor
Tie	Tyrosine kinase with immunglobulin-like and EGF-like domains
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor α
TRITC	Tetramethylrhodamine-Isothiocyanat
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vp1-3	Hüllproteine des AAV
WPB	Weibel-Palade Körperchen
α-MHC	α-myosine heavy chain

Literaturverzeichnis

- 1 A. Ahmed, T. Fujisawa, X. L. Niu, S. Ahmad, B. Al-Ani, K. Chudasama, A. Abbas, R. Potluri, V. Bhandari, C. M. Findley, G. K. Lam, J. Huang, P. W. Hewett, M. Cudmore, and C. D. Kontos, 'Angiopoietin-2 Confers Atheroprotection in Apoe-/- Mice by Inhibiting Ldl Oxidation Via Nitric Oxide', *Circ Res*, 104 (2009), 1333-6.
- 2 A. O. Aliprantis, R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky, 'Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins through Toll-Like Receptor-2', *Science*, 285 (1999), 736-9.
- 3 J. Andrae, R. Gallini, and C. Betsholtz, 'Role of Platelet-Derived Growth Factors in Physiology and Medicine', *Genes Dev*, 22 (2008), 1276-312.
- 4 D. C. Angus, W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. R. Pinsky, 'Epidemiology of Severe Sepsis in the United States: Analysis of Incidence, Outcome, and Associated Costs of Care', *Crit Care Med*, 29 (2001), 1303-10.
- 5 D. Annane, E. Bellissant, and J. M. Cavaillon, 'Septic Shock', *Lancet*, 365 (2005), 63-78.
- 6 A. Armulik, A. Abramsson, and C. Betsholtz, 'Endothelial/Pericyte Interactions', *Circ Res*, 97 (2005), 512-23.
- 7 F. Arnalich, I. Plaza, J. A. Sobrino, J. Oliver, J. Barbado, J. M. Pena, and J. J. Vazquez, 'Cardiac Size and Function in Paget's Disease of Bone', *Int J Cardiol*, 5 (1984), 491-505.
- 8 R. W. Atchison, B. C. Casto, and W. M. Hammon, 'Adenovirus-Associated Defective Virus Particles', *Science*, 149 (1965), 754-6.
- 9 K. M. Austin, N. Nguyen, G. Javid, L. Covic, and A. Kuliopoulos, 'Noncanonical Matrix Metalloprotease-1-Protease-Activated Receptor-1 Signaling Triggers Vascular Smooth Muscle Cell Dedifferentiation and Arterial Stenosis', *J Biol Chem*, 288 (2013), 23105-15.
- 10 R. S. Bar, M. Boes, B. A. Booth, B. L. Dake, S. Henley, and M. N. Hart, 'The Effects of Platelet-Derived Growth Factor in Cultured Microvessel Endothelial Cells', *Endocrinology*, 124 (1989), 1841-8.
- 11 G. Bergers, and S. Song, 'The Role of Pericytes in Blood-Vessel Formation and Maintenance', *Neuro Oncol*, 7 (2005), 452-64.
- 12 L. T. Bish, K. Morine, M. M. Sleeper, J. Sanmiguel, D. Wu, G. Gao, J. M. Wilson, and H. L. Sweeney, 'Adeno-Associated Virus (Aav) Serotype 9 Provides Global Cardiac Gene Transfer Superior to Aav1, Aav6, Aav7, and Aav8 in the Mouse and Rat', *Hum Gene Ther*, 19 (2008), 1359-68.
- 13 S. Bishayee, S. Majumdar, J. Khire, and M. Das, 'Ligand-Induced Dimerization of the Platelet-Derived Growth Factor Receptor. Monomer-Dimer Interconversion Occurs Independent of Receptor Phosphorylation', *J Biol Chem*, 264 (1989), 11699-705.
- 14 O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr, 'A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1995), 7297-301.
- 15 H. Buning, L. Perabo, O. Coutelle, S. Quadt-Humme, and M. Hallek, 'Recent Developments in Adeno-Associated Virus Vector Technology', *J Gene Med*, 10 (2008), 717-33.
- 16 M. H. Cardone, N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed, 'Regulation of Cell Death Protease Caspase-9 by Phosphorylation', *Science*, 282 (1998), 1318-21.
- 17 P. Carmeliet, 'Manipulating Angiogenesis in Medicine', *J Intern Med*, 255 (2004), 538-61.
- 18 R. L. Carvalho, L. Jonker, M. J. Goumans, J. Larsson, P. Bouwman, S. Karlsson, P. T. Dijke, H. M. Arthur, and C. L. Mummery, 'Defective Paracrine Signalling by Tgfbeta in Yolk Sac Vasculature of Endoglin Mutant Mice: A Paradigm for Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia', *Development*, 131 (2004), 6237-47.

- 19 H. Cho, T. Kozasa, C. Bondjers, C. Betsholtz, and J. H. Kehrl, 'Pericyte-Specific Expression of Rgs5: Implications for Pdgf and Edg Receptor Signaling During Vascular Maturation', *FASEB J*, 17 (2003), 440-2.
- 20 P. Chomczynski, and N. Sacchi, 'Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction', *Anal Biochem*, 162 (1987), 156-9.
- 21 O. Cleaver, and D. A. Melton, 'Endothelial Signaling During Development', *Nat Med*, 9 (2003), 661-8.
- 22 E. M. Creagh, and S. J. Martin, 'Caspases: Cellular Demolition Experts', *Biochem Soc Trans*, 29 (2001), 696-702.
- 23 R. Daneman, L. Zhou, A. A. Kebede, and B. A. Barres, 'Pericytes Are Required for Blood-Brain Barrier Integrity During Embryogenesis', *Nature*, 468 (2010), 562-6.
- 24 S. Davis, T. H. Aldrich, P. F. Jones, A. Acheson, D. L. Compton, V. Jain, T. E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P. C. Maisonpierre, and G. D. Yancopoulos, 'Isolation of Angiopoietin-1, a Ligand for the Tie2 Receptor, by Secretion-Trap Expression Cloning', *Cell*, 87 (1996), 1161-9.
- 25 E. Dejana, F. Orsenigo, and M. G. Lampugnani, 'The Role of Adherens Junctions and Ve-Cadherin in the Control of Vascular Permeability', *J Cell Sci*, 121 (2008), 2115-22.
- 26 U. Deutsch, T. M. Schlaeger, B. Dehouck, A. Doring, S. Tauber, W. Risau, and B. Engelhardt, 'Inducible Endothelial Cell-Specific Gene Expression in Transgenic Mouse Embryos and Adult Mice', *Exp Cell Res*, 314 (2008), 1202-16.
- 27 D. R. Deyle, and D. W. Russell, 'Adeno-Associated Virus Vector Integration', *Curr Opin Mol Ther*, 11 (2009), 442-7.
- 28 L. Diaz-Flores, R. Gutierrez, H. Varela, N. Rancel, and F. Valladares, 'Microvascular Pericytes: A Review of Their Morphological and Functional Characteristics', *Histol Histopathol*, 6 (1991), 269-86.
- 29 P. E. DiCorleto, and D. F. Bowen-Pope, 'Cultured Endothelial Cells Produce a Platelet-Derived Growth Factor-Like Protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (1983), 1919-23.
- 30 E. A. Dowlatshahi, M. Kavousi, T. Nijsten, M. A. Ikram, A. Hofman, O. H. Franco, and M. Wakkee, 'Psoriasis Is Not Associated with Atherosclerosis and Incident Cardiovascular Events: The Rotterdam Study', *J Invest Dermatol*, 133 (2013), 2347-54.
- 31 T. A. Drake, W. Ruf, J. H. Morrissey, and T. S. Edgington, 'Functional Tissue Factor Is Entirely Cell Surface Expressed on Lipopolysaccharide-Stimulated Human Blood Monocytes and a Constitutively Tissue Factor-Producing Neoplastic Cell Line', *J Cell Biol*, 109 (1989), 389-95.
- 32 D. J. Dumont, G. Gradwohl, G. H. Fong, M. C. Puri, M. Gertsenstein, A. Auerbach, and M. L. Breitman, 'Dominant-Negative and Targeted Null Mutations in the Endothelial Receptor Tyrosine Kinase, Tek, Reveal a Critical Role in Vasculogenesis of the Embryo', *Genes Dev*, 8 (1994), 1897-909.
- 33 D. J. Dumont, T. P. Yamaguchi, R. A. Conlon, J. Rossant, and M. L. Breitman, 'Tek, a Novel Tyrosine Kinase Gene Located on Mouse Chromosome 4, Is Expressed in Endothelial Cells and Their Presumptive Precursors', *Oncogene*, 7 (1992), 1471-80.
- 34 M. M. Eatock, N. C. Tebbutt, C. L. Bampton, A. H. Strickland, M. Valladares-Ayerbes, A. Swieboda-Sadlej, E. Van Cutsem, N. Nanayakkara, Y. N. Sun, Z. D. Zhong, M. B. Bass, A. H. Adewoye, and G. Bodoky, 'Phase II Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Amg 386 (Trebananib) in Combination with Cisplatin and Capecitabine in Patients with Metastatic Gastro-Oesophageal Cancer', *Ann Oncol* (2012).
- 35 C. Engel, F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, and K. Reinhart, 'Epidemiology of Sepsis in Germany: Results from a National Prospective Multicenter Study', *Intensive Care Med*, 33 (2007), 606-18.

- 36 T. Etoh, H. Inoue, S. Tanaka, G. F. Barnard, S. Kitano, and M. Mori, 'Angiopoietin-2 Is Related to Tumor Angiogenesis in Gastric Carcinoma: Possible in Vivo Regulation Via Induction of Proteases', *Cancer Res*, 61 (2001), 2145-53.
- 37 U. Fearon, K. Griosios, A. Fraser, R. Reece, P. Emery, P. F. Jones, and D. J. Veale, 'Angiopoietins, Growth Factors, and Vascular Morphology in Early Arthritis', *J Rheumatol*, 30 (2003), 260-8.
- 38 Y. Feng, F. vom Hagen, F. Pfister, S. Djokic, S. Hoffmann, W. Back, P. Wagner, J. Lin, U. Deutsch, and H. P. Hammes, 'Impaired Pericyte Recruitment and Abnormal Retinal Angiogenesis as a Result of Angiopoietin-2 Overexpression', *Thromb Haemost*, 97 (2007), 99-108.
- 39 U. Fiedler, T. Krissl, S. Koidl, C. Weiss, T. Koblizek, U. Deutsch, G. Martiny-Baron, D. Marme, and H. G. Augustin, 'Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 Share the Same Binding Domains in the Tie-2 Receptor Involving the First Ig-Like Loop and the Epidermal Growth Factor-Like Repeats', *J Biol Chem*, 278 (2003), 1721-7.
- 40 U. Fiedler, Y. Reiss, M. Scharpfenecker, V. Grunow, S. Koidl, G. Thurston, N. W. Gale, M. Witzenrath, S. Rousseau, N. Suttorp, A. Sobke, M. Herrmann, K. T. Preissner, P. Vajkoczy, and H. G. Augustin, 'Angiopoietin-2 Sensitizes Endothelial Cells to Tnf-Alpha and Has a Crucial Role in the Induction of Inflammation', *Nat Med*, 12 (2006), 235-9.
- 41 U. Fiedler, M. Scharpfenecker, S. Koidl, A. Hegen, V. Grunow, J. M. Schmidt, W. Kriz, G. Thurston, and H. G. Augustin, 'The Tie-2 Ligand Angiopoietin-2 Is Stored in and Rapidly Released Upon Stimulation from Endothelial Cell Weibel-Palade Bodies', *Blood*, 103 (2004), 4150-6.
- 42 T. R. Flotte, M. L. Brantly, L. T. Spencer, B. J. Byrne, C. T. Spencer, D. J. Baker, and M. Humphries, 'Phase I Trial of Intramuscular Injection of a Recombinant Adeno-Associated Virus Alpha 1-Antitrypsin (Raav2-Cb-Haat) Gene Vector to Aat-Deficient Adults', *Hum Gene Ther*, 15 (2004), 93-128.
- 43 R. F. Furchtgott, and J. V. Zawadzki, 'The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine', *Nature*, 288 (1980), 373-6.
- 44 J. Fuxe, S. Tabruyn, K. Colton, H. Zaid, A. Adams, P. Baluk, E. Lashnits, T. Morisada, T. Le, S. O'Brien, D. M. Epstein, G. Y. Koh, and D. M. McDonald, 'Pericyte Requirement for Anti-Leak Action of Angiopoietin-1 and Vascular Remodeling in Sustained Inflammation', *Am J Pathol*, 178 (2011), 2897-909.
- 45 N. W. Gale, G. Thurston, S. F. Hackett, R. Renard, Q. Wang, J. McClain, C. Martin, C. Witte, M. H. Witte, D. Jackson, C. Suri, P. A. Campochiaro, S. J. Wiegand, and G. D. Yancopoulos, 'Angiopoietin-2 Is Required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1', *Dev Cell*, 3 (2002), 411-23.
- 46 J. Gavard, V. Patel, and J. S. Gutkind, 'Angiopoietin-1 Prevents Vegf-Induced Endothelial Permeability by Sequestering Src through Mdia', *Dev Cell*, 14 (2008), 25-36.
- 47 H. Gerhardt, and C. Betsholtz, 'Endothelial-Pericyte Interactions in Angiogenesis', *Cell Tissue Res*, 314 (2003), 15-23.
- 48 S. Ghosh, and M. Karin, 'Missing Pieces in the Nf-Kappab Puzzle', *Cell*, 109 Suppl (2002), S81-96.
- 49 S. E. Girardin, and D. J. Philpott, 'Mini-Review: The Role of Peptidoglycan Recognition in Innate Immunity', *Eur J Immunol*, 34 (2004), 1777-82.
- 50 R. A. Graves, P. Tontonoz, S. R. Ross, and B. M. Spiegelman, 'Identification of a Potent Adipocyte-Specific Enhancer: Involvement of an Nf-1-Like Factor', *Genes Dev*, 5 (1991), 428-37.
- 51 J. C. Grieger, V. W. Choi, and R. J. Samulski, 'Production and Characterization of Adeno-Associated Viral Vectors', *Nat Protoc*, 1 (2006), 1412-28.

- 52 I. O. Haefliger, A. Zschauer, and D. R. Anderson, 'Relaxation of Retinal Pericyte Contractile Tone through the Nitric Oxide-Cyclic Guanosine Monophosphate Pathway', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35 (1994), 991-7.
- 53 C. H. Heldin, and B. Westermark, 'Mechanism of Action and in Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor', *Physiol Rev*, 79 (1999), 1283-316.
- 54 M. Hellstrom, M. Kalen, P. Lindahl, A. Abramsson, and C. Betsholtz, '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 (1999), 3047-55.
- 55 G Herold, *Innere Medizin* (Herold, 2011).
- 56 K. L. Ho, 'Ultrastructure of Cerebellar Capillary Hemangioblastoma. Iv. Pericytes and Their Relationship to Endothelial Cells', *Acta Neuropathol*, 67 (1985), 254-64.
- 57 Brigid Hogan, Frank Costantini, and Elizabeth Lacy, *Manipulating the Mouse Embryo : A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986), pp. ix, 332 p.
- 58 J. Holash, P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos, and S. J. Wiegand, 'Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and Vegf', *Science*, 284 (1999), 1994-8.
- 59 R. S. Hotchkiss, K. W. Tinsley, P. E. Swanson, R. E. Schmieg, Jr., J. J. Hui, K. C. Chang, D. F. Osborne, B. D. Freeman, J. P. Cobb, T. G. Buchman, and I. E. Karl, 'Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and Cd4+ T Lymphocytes in Humans', *J Immunol*, 166 (2001), 6952-63.
- 60 Q. Hu, A. Klipper, A. J. Muslin, W. J. Fantl, and L. T. Williams, 'Ras-Dependent Induction of Cellular Responses by Constitutively Active Phosphatidylinositol-3 Kinase', *Science*, 268 (1995), 100-2.
- 61 D. P. Hughes, M. B. Marron, and N. P. Brindle, 'The Antiinflammatory Endothelial Tyrosine Kinase Tie2 Interacts with a Novel Nuclear Factor-Kappab Inhibitor Abin-2', *Circ Res*, 92 (2003), 630-6.
- 62 E. Iivanainen, L. Nelimarkka, V. Elenius, S. M. Heikkinen, T. T. Junttila, L. Sihombing, M. Sundvall, J. A. Maatta, V. J. Laine, S. Yla-Herttuala, S. Higashiyama, K. Alitalo, and K. Elenius, 'Angiopoietin-Regulated Recruitment of Vascular Smooth Muscle Cells by Endothelial-Derived Heparin Binding Egf-Like Growth Factor', *FASEB J*, 17 (2003), 1609-21.
- 63 Y. Iwashima, T. Horio, Y. Takami, T. Inenaga, T. Nishikimi, S. Takishita, and Y. Kawano, 'Effects of the Creation of Arteriovenous Fistula for Hemodialysis on Cardiac Function and Natriuretic Peptide Levels in Crf', *Am J Kidney Dis*, 40 (2002), 974-82.
- 64 M. Jessup, B. Greenberg, D. Mancini, T. Cappola, D. F. Pauly, B. Jaski, A. Yaroshinsky, K. M. Zsebo, H. Dittrich, R. J. Hajjar, and Investigators Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease, 'Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (Cupid): A Phase 2 Trial of Intracoronary Gene Therapy of Sarcoplasmic Reticulum Ca2+-Atpase in Patients with Advanced Heart Failure', *Circulation*, 124 (2011), 304-13.
- 65 N. C. Joyce, M. F. Haire, and G. E. Palade, 'Contractile Proteins in Pericytes. II. Immunocytochemical Evidence for the Presence of Two Isomyosins in Graded Concentrations', *J Cell Biol*, 100 (1985), 1387-95.
- 66 F.M. Brunkhorst K. Reinhart, H.-G. Bone, J. Bardutzky, C.-E. Dempfle, H. Forst, P. Gastmeier, H. Gerlach, M. Gründling, S. John, W. Kern, G. Kreymann, W. Krüger, P. Kujath, G. Marggraf, J. Martin, K. Mayer, A. Meier-Hellmann, M. Oppert, C. Putensen, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, H. Seifert, C. Spies, F. Stüber, N. Weiler, A. Weimann, K. Werdan and T. Welte, 'Prävention, Diagnose, Therapie Und Nachsorge Der Sepsis - Leitlinien Der Deutschen Sepsis-Gesellschaft Und Der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung Für Intensiv- Und Notfallmedizin', (2010).

- 67 T. Kaisho, O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino, and S. Akira, 'Endotoxin-Induced Maturation of Myd88-Deficient Dendritic Cells', *J Immunol*, 166 (2001), 5688-94.
- 68 D. R. Kaplan, F. C. Chao, C. D. Stiles, H. N. Antoniades, and C. D. Scher, 'Platelet Alpha Granules Contain a Growth Factor for Fibroblasts', *Blood*, 53 (1979), 1043-52.
- 69 B. Y. Karlan, A. M. Oza, G. E. Richardson, D. M. Provencher, V. L. Hansen, M. Buck, S. K. Chambers, P. Ghatare, C. H. Pippitt, Jr., J. V. Brown, 3rd, A. Covens, R. V. Nagarkar, M. Davy, C. A. Leath, 3rd, H. Nguyen, D. E. Stepan, D. M. Weinreich, M. Tassoudji, Y. N. Sun, and I. B. Vergote, 'Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase II Study of Amg 386 Combined with Weekly Paclitaxel in Patients with Recurrent Ovarian Cancer', *J Clin Oncol*, 30 (2012), 362-71.
- 70 T. Kawai, O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Muhlradt, S. Sato, K. Hoshino, and S. Akira, 'Lipopolysaccharide Stimulates the Myd88-Independent Pathway and Results in Activation of Ifn-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes', *J Immunol*, 167 (2001), 5887-94.
- 71 C. Kelley, P. D'Amore, H. B. Hechtman, and D. Shepro, 'Microvascular Pericyte Contractility in Vitro: Comparison with Other Cells of the Vascular Wall', *J Cell Biol*, 104 (1987), 483-90.
- 72 C. Kelley, P. D'Amore, H. B. Hechtman, and D. Shepro, 'Vasoactive Hormones and Camp Affect Pericyte Contraction and Stress Fibres in Vitro', *J Muscle Res Cell Motil*, 9 (1988), 184-94.
- 73 P. D. Kessler, G. M. Podskaloff, X. Chen, S. A. McQuiston, P. C. Colosi, L. A. Matelis, G. J. Kurtzman, and B. J. Byrne, 'Gene Delivery to Skeletal Muscle Results in Sustained Expression and Systemic Delivery of a Therapeutic Protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996), 14082-7.
- 74 I. Kim, J. H. Kim, S. O. Moon, H. J. Kwak, N. G. Kim, and G. Y. Koh, 'Angiopoietin-2 at High Concentration Can Enhance Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway', *Oncogene*, 19 (2000), 4549-52.
- 75 I. Kim, S. O. Moon, S. H. Kim, H. J. Kim, Y. S. Koh, and G. Y. Koh, 'Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (Icam-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (Vcam-1), and E-Selectin through Nuclear Factor-Kappa B Activation in Endothelial Cells', *J Biol Chem*, 276 (2001), 7614-20.
- 76 I. Kim, S. O. Moon, S. K. Park, S. W. Chae, and G. Y. Koh, 'Angiopoietin-1 Reduces Vegf-Stimulated Leukocyte Adhesion to Endothelial Cells by Reducing Icam-1, Vcam-1, and E-Selectin Expression', *Circ Res*, 89 (2001), 477-9.
- 77 I. Kim, J. L. Oh, Y. S. Ryu, J. N. So, W. C. Sessa, K. Walsh, and G. Y. Koh, 'Angiopoietin-1 Negatively Regulates Expression and Activity of Tissue Factor in Endothelial Cells', *FASEB J*, 16 (2002), 126-8.
- 78 K. T. Kim, H. H. Choi, M. O. Steinmetz, B. Maco, R. A. Kammerer, S. Y. Ahn, H. Z. Kim, G. M. Lee, and G. Y. Koh, 'Oligomerization and Multimerization Are Critical for Angiopoietin-1 to Bind and Phosphorylate Tie2', *J Biol Chem*, 280 (2005), 20126-31.
- 79 H. Kobayashi, L. M. DeBusk, Y. O. Babichev, D. J. Dumont, and P. C. Lin, 'Hepatocyte Growth Factor Mediates Angiopoietin-Induced Smooth Muscle Cell Recruitment', *Blood*, 108 (2006), 1260-6.
- 80 C. D. Kontos, T. P. Stauffer, W. P. Yang, J. D. York, L. Huang, M. A. Blanar, T. Meyer, and K. G. Peters, 'Tyrosine 1101 of Tie2 Is the Major Site of Association of P85 and Is Required for Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt', *Mol Cell Biol*, 18 (1998), 4131-40.
- 81 T. Korff, E. Ernst, R. Nobiling, A. Feldner, Y. Reiss, K. H. Plate, U. Fiedler, H. G. Augustin, and M. Hecker, 'Angiopoietin-1 Mediates Inhibition of Hypertension-Induced Release of Angiopoietin-2 from Endothelial Cells', *Cardiovasc Res*, 94 (2012), 510-8.
- 82 A. Kumar, V. Thota, L. Dee, J. Olson, E. Uretz, and J. E. Parrillo, 'Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 1beta Are Responsible for in Vitro Myocardial Cell Depression Induced by Human Septic Shock Serum', *J Exp Med*, 183 (1996), 949-58.

- 83 P. Kumpers, A. Lukasz, S. David, R. Horn, C. Hafer, R. Faulhaber-Walter, D. Fliser, H. Haller, and J. T. Kielstein, 'Excess Circulating Angiopoietin-2 Is a Strong Predictor of Mortality in Critically Ill Medical Patients', *Crit Care*, 12 (2008), R147.
- 84 P. Kumpers, M. van Meurs, S. David, G. Molema, J. Bijzet, A. Lukasz, F. Bieritz, H. Haller, and J. G. Zijlstra, 'Time Course of Angiopoietin-2 Release During Experimental Human Endotoxemia and Sepsis', *Crit Care*, 13 (2009), R64.
- 85 V. Kundra, J. A. Escobedo, A. Kazlauskas, H. K. Kim, S. G. Rhee, L. T. Williams, and B. R. Zetter, 'Regulation of Chemotaxis by the Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Beta', *Nature*, 367 (1994), 474-6.
- 86 K. Kuroda, A. Sapadin, T. Shoji, R. Fleischmajer, and M. Lebwohl, 'Altered Expression of Angiopoietins and Tie2 Endothelium Receptor in Psoriasis', *J Invest Dermatol*, 116 (2001), 713-20.
- 87 D. M. Larson, M. P. Carson, and C. C. Haudenschild, 'Junctional Transfer of Small Molecules in Cultured Bovine Brain Microvascular Endothelial Cells and Pericytes', *Microvasc Res*, 34 (1987), 184-99.
- 88 P. Leveen, M. Pekny, S. Gebre-Medhin, B. Swolin, E. Larsson, and C. Betsholtz, 'Mice Deficient for Pdgf B Show Renal, Cardiovascular, and Hematological Abnormalities', *Genes Dev*, 8 (1994), 1875-87.
- 89 P. Lindblom, H. Gerhardt, S. Liebner, A. Abramsson, M. Enge, M. Hellstrom, G. Backstrom, S. Fredriksson, U. Landegren, H. C. Nystrom, G. Bergstrom, E. Dejana, A. Ostman, P. Lindahl, and C. Betsholtz, 'Endothelial Pdgf-B Retention Is Required for Proper Investment of Pericytes in the Microvessel Wall', *Genes Dev*, 17 (2003), 1835-40.
- 90 S. Loukovaara, A. Robciuc, J. M. Holopainen, K. Lehti, T. Pessi, J. Liinamaa, K. T. Kukkonen, M. Jauhainen, K. Koli, J. Keski-Oja, and I. Immonen, 'Ang-2 Upregulation Correlates with Increased Levels of Mmp-9, Vegf, Epo and Tgfbeta1 in Diabetic Eyes Undergoing Vitrectomy', *Acta Ophthalmol*, 91 (2013), 531-9.
- 91 P. R. Macdonald, P. Progias, B. Ciani, S. Patel, U. Mayer, M. O. Steinmetz, and R. A. Kammerer, 'Structure of the Extracellular Domain of Tie Receptor Tyrosine Kinases and Localization of the Angiopoietin-Binding Epitope', *J Biol Chem*, 281 (2006), 28408-14.
- 92 P. C. Maisondieu, C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato, and G. D. Yancopoulos, 'Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in Vivo Angiogenesis', *Science*, 277 (1997), 55-60.
- 93 L. J. Mandarino, N. Sundarraj, J. Finlayson, and H. R. Hassell, 'Regulation of Fibronectin and Laminin Synthesis by Retinal Capillary Endothelial Cells and Pericytes in Vitro', *Exp Eye Res*, 57 (1993), 609-21.
- 94 C. S. Manno, G. F. Pierce, V. R. Arruda, B. Glader, M. Ragni, J. J. Rasko, M. C. Ozello, K. Hoots, P. Blatt, B. Konkle, M. Dake, R. Kaye, M. Razavi, A. Zajko, J. Zehnder, P. K. Rustagi, H. Nakai, A. Chew, D. Leonard, J. F. Wright, R. R. Lessard, J. M. Sommer, M. Tigges, D. Sabatino, A. Luk, H. Jiang, F. Mingozzi, L. Couto, H. C. Ertl, K. A. High, and M. A. Kay, 'Successful Transduction of Liver in Hemophilia by Aav-Factor IX and Limitations Imposed by the Host Immune Response', *Nat Med*, 12 (2006), 342-7.
- 95 C. Marie, J. Muret, C. Fitting, M. R. Losser, D. Payen, and J. M. Cavaillon, 'Reduced Ex Vivo Interleukin-8 Production by Neutrophils in Septic and Nonseptic Systemic Inflammatory Response Syndrome', *Blood*, 91 (1998), 3439-46.
- 96 F. Marra, L. F. Bonewald, S. Park-Snyder, I. S. Park, K. A. Woodruff, and H. E. Abboud, 'Characterization and Regulation of the Latent Transforming Growth Factor-Beta Complex Secreted by Vascular Pericytes', *J Cell Physiol*, 166 (1996), 537-46.
- 97 M. B. Marron, D. P. Hughes, M. D. Edge, C. L. Forder, and N. P. Brindle, 'Evidence for Heterotypic Interaction between the Receptor Tyrosine Kinases Tie-1 and Tie-2', *J Biol Chem*, 275 (2000), 39741-6.

- 98 M. B. Marron, H. Singh, T. A. Tahir, J. Kavumkal, H. Z. Kim, G. Y. Koh, and N. P. Brindle, 'Regulated Proteolytic Processing of Tie1 Modulates Ligand Responsiveness of the Receptor-Tyrosine Kinase Tie2', *J Biol Chem*, 282 (2007), 30509-17.
- 99 G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss, 'The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000', *N Engl J Med*, 348 (2003), 1546-54.
- 100 H. D. Mayor, R. M. Jamison, L. E. Jordan, and J. L. Melnick, 'Structure and Composition of a Small Particle Prepared from a Simian Adenovirus', *J Bacteriol*, 90 (1965), 235-42.
- 101 C. E. McCall, L. M. Grossos-Wilmeth, K. LaRue, R. N. Guzman, and S. L. Cousart, 'Tolerance to Endotoxin-Induced Expression of the Interleukin-1 Beta Gene in Blood Neutrophils of Humans with the Sepsis Syndrome', *J Clin Invest*, 91 (1993), 853-61.
- 102 S. J. Moeller, E. D. Head, and R. J. Sheaff, 'P27kip1 Inhibition of Grb2-Sos Formation Can Regulate Ras Activation', *Mol Cell Biol*, 23 (2003), 3735-52.
- 103 N. Molnar, and D. W. Siemann, 'Inhibition of Endothelial/Smooth Muscle Cell Contact Loss by the Investigational Angiopoietin-2 Antibody Medi3617', *Microvasc Res*, 83 (2012), 290-7.
- 104 M. Moser, K. R. Legate, R. Zent, and R. Fassler, 'The Tail of Integrins, Talin, and Kindlins', *Science*, 324 (2009), 895-9.
- 105 U. Muller-Werdan, M. Buerke, H. Ebelt, K. M. Heinroth, A. Herklotz, H. Loppnow, M. Russ, F. Schlegel, A. Schlitt, H. B. Schmidt, G. Soffker, and K. Werdan, 'Septic Cardiomyopathy - a Not yet Discovered Cardiomyopathy?', *Exp Clin Cardiol*, 11 (2006), 226-36.
- 106 C. Munoz, B. Misset, C. Fitting, J. P. Blieriot, J. Carlet, and J. M. Cavaillon, 'Dissociation between Plasma and Monocyte-Associated Cytokines During Sepsis', *Eur J Immunol*, 21 (1991), 2177-84.
- 107 V. Nehls, and D. Drenckhahn, 'Heterogeneity of Microvascular Pericytes for Smooth Muscle Type Alpha-Actin', *J Cell Biol*, 113 (1991), 147-54.
- 108 J. Nilsson, M. Sjolund, L. Palmberg, J. Thyberg, and C. H. Heldin, 'Arterial Smooth Muscle Cells in Primary Culture Produce a Platelet-Derived Growth Factor-Like Protein', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82 (1985), 4418-22.
- 109 H. C. Nystrom, P. Lindblom, A. Wickman, I. Andersson, J. Norlin, J. Falldt, P. Lindahl, O. Skott, M. Bjarnegard, S. M. Fitzgerald, K. Caidahl, L. M. Gan, C. Betsholtz, and G. Bergstrom, 'Platelet-Derived Growth Factor B Retention Is Essential for Development of Normal Structure and Function of Conduit Vessels and Capillaries', *Cardiovasc Res*, 71 (2006), 557-65.
- 110 J. E. Olberding, M. D. Thouless, E. M. Arruda, and K. Garikipati, 'The Non-Equilibrium Thermodynamics and Kinetics of Focal Adhesion Dynamics', *PLoS One*, 5 (2010), e12043.
- 111 A. Orlidge, and P. A. D'Amore, 'Inhibition of Capillary Endothelial Cell Growth by Pericytes and Smooth Muscle Cells', *J Cell Biol*, 105 (1987), 1455-62.
- 112 L. T. Osnes, A. B. Westvik, G. B. Joo, C. Okkenhaug, and P. Kierulf, 'Inhibition of IL-1 Induced Tissue Factor (Tf) Synthesis and Procoagulant Activity (Pca) in Purified Human Monocytes by IL-4, IL-10 and IL-13', *Cytokine*, 8 (1996), 822-7.
- 113 C. Ozek, F. Zhang, W. C. Lineaweaver, B. T. Chin, T. Eiman, L. Newlin, and H. J. Buncke, 'A New Heart Failure Model in Rat by an End-to-Side Femoral Vessel Anastomosis', *Cardiovasc Res*, 37 (1998), 236-8.
- 114 P. Pantazis, S. Kharbanda, A. S. Goustin, T. Galanopoulos, and D. Kufe, 'Coexpression of the Genes for Platelet-Derived Growth Factor B-Chain Receptor and Macrophage Colony-Stimulating Factor 1 Receptor During Monocytic Differentiation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (1991), 2481-5.
- 115 A. Papapetropoulos, D. Fulton, K. Mahboubi, R. G. Kalb, D. S. O'Connor, F. Li, D. C. Altieri, and W. C. Sessa, 'Angiopoietin-1 Inhibits Endothelial Cell Apoptosis Via the Akt/Survivin Pathway', *J Biol Chem*, 275 (2000), 9102-5.
- 116 Y. Paulsson, A. Hammacher, C. H. Heldin, and B. Westermark, 'Possible Positive Autocrine Feedback in the Prereplicative Phase of Human Fibroblasts', *Nature*, 328 (1987), 715-7.

- 117 R. Pawlinski, and N. Mackman, 'Cellular Sources of Tissue Factor in Endotoxemia and Sepsis', *Thromb Res*, 125 Suppl 1 (2010), S70-3.
- 118 A. Petros, D. Bennett, and P. Vallance, 'Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Hypotension in Patients with Septic Shock', *Lancet*, 338 (1991), 1557-8.
- 119 F. Pfister, Y. Feng, F. vom Hagen, S. Hoffmann, G. Molema, J. L. Hillebrands, M. Shani, U. Deutsch, and H. P. Hammes, 'Pericyte Migration: A Novel Mechanism of Pericyte Loss in Experimental Diabetic Retinopathy', *Diabetes*, 57 (2008), 2495-502.
- 120 W. N. Procopio, P. I. Pelavin, W. M. Lee, and N. M. Yeilding, 'Angiopoietin-1 and -2 Coiled Coil Domains Mediate Distinct Homo-Oligomerization Patterns, but Fibrinogen-Like Domains Mediate Ligand Activity', *J Biol Chem*, 274 (1999), 30196-201.
- 121 M. A. Read, A. S. Neish, F. W. Luscinskas, V. J. Palombella, T. Maniatis, and T. Collins, 'The Proteasome Pathway Is Required for Cytokine-Induced Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule Expression', *Immunity*, 2 (1995), 493-506.
- 122 M. Rehberg, F. Krombach, U. Pohl, and S. Dietzel, 'Label-Free 3d Visualization of Cellular and Tissue Structures in Intact Muscle with Second and Third Harmonic Generation Microscopy', *PLoS One*, 6 (2011), e28237.
- 123 Y. Reiss, J. Droste, M. Heil, S. Tribulova, M. H. Schmidt, W. Schaper, D. J. Dumont, and K. H. Plate, 'Angiopoietin-2 Impairs Revascularization after Limb Ischemia', *Circ Res*, 101 (2007), 88-96.
- 124 F. Roviezzo, S. Tsigkos, A. Kotanidou, M. Bucci, V. Brancaleone, G. Cirino, and A. Papapetropoulos, 'Angiopoietin-2 Causes Inflammation in Vivo by Promoting Vascular Leakage', *J Pharmacol Exp Ther*, 314 (2005), 738-44.
- 125 H. K. Rucker, H. J. Wynder, and W. E. Thomas, 'Cellular Mechanisms of Cns Pericytes', *Brain Res Bull*, 51 (2000), 363-9.
- 126 P. Saharinen, K. Kerkela, N. Ekman, M. Marron, N. Brindle, G. M. Lee, H. Augustin, G. Y. Koh, and K. Alitalo, 'Multiple Angiopoietin Recombinant Proteins Activate the Tie1 Receptor Tyrosine Kinase and Promote Its Interaction with Tie2', *J Cell Biol*, 169 (2005), 239-43.
- 127 R. J. Samulski, L. S. Chang, and T. Shenk, 'Helper-Free Stocks of Recombinant Adeno-Associated Viruses: Normal Integration Does Not Require Viral Gene Expression', *J Virol*, 63 (1989), 3822-8.
- 128 M. Sasahara, J. W. Fries, E. W. Raines, A. M. Gown, L. E. Westrum, M. P. Frosch, D. T. Bonthon, R. Ross, and T. Collins, 'Pdgf B-Chain in Neurons of the Central Nervous System, Posterior Pituitary, and in a Transgenic Model', *Cell*, 64 (1991), 217-27.
- 129 T. N. Sato, Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, M. Gendron-Maguire, T. Gridley, H. Wolburg, W. Risau, and Y. Qin, 'Distinct Roles of the Receptor Tyrosine Kinases Tie-1 and Tie-2 in Blood Vessel Formation', *Nature*, 376 (1995), 70-4.
- 130 T. M. Schlaeger, Y. Qin, Y. Fujiwara, J. Magram, and T. N. Sato, 'Vascular Endothelial Cell Lineage-Specific Promoter in Transgenic Mice', *Development*, 121 (1995), 1089-98.
- 131 H. Schnurch, and W. Risau, 'Expression of Tie-2, a Member of a Novel Family of Receptor Tyrosine Kinases, in the Endothelial Cell Lineage', *Development*, 119 (1993), 957-68.
- 132 C. Schwab, O. Steiner, R. Lyck, B. Engelhardt, and U. Deutsch, 'Long Lasting Moderate over-Expression of Ang-2 Leads to Systemic Chronic Inflammation', (Joint Meeting 2009 of the Society for Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB) and the Swiss Society for Microcirculation (SSM): 2009).
- 133 H. Sengelov, P. Follin, L. Kjeldsen, K. Lollike, C. Dahlgren, and N. Borregaard, 'Mobilization of Granules and Secretory Vesicles During in Vivo Exudation of Human Neutrophils', *J Immunol*, 154 (1995), 4157-65.
- 134 D. Shepro, and N. M. Morel, 'Pericyte Physiology', *FASEB J*, 7 (1993), 1031-8.
- 135 H. Shimoda, M. J. Bernas, M. H. Witte, N. W. Gale, G. D. Yancopoulos, and S. Kato, 'Abnormal Recruitment of Periendothelial Cells to Lymphatic Capillaries in Digestive Organs of Angiopoietin-2-Deficient Mice', *Cell Tissue Res*, 328 (2007), 329-37.

- 136 W Siegenthaler, and H.E. Blum, *Klinische Pathologie*. 9th edn (Thieme Verlag, 2006).
- 137 M. P. Simon, R. Tournaire, and J. Pouyssegur, 'The Angiopoietin-2 Gene of Endothelial Cells Is up-Regulated in Hypoxia by a Hif Binding Site Located in Its First Intron and by the Central Factors Gata-2 and Ets-1', *J Cell Physiol*, 217 (2008), 809-18.
- 138 F. Simonelli, A. M. Maguire, F. Testa, E. A. Pierce, F. Mingozzi, J. L. Bennicelli, S. Rossi, K. Marshall, S. Banfi, E. M. Surace, J. Sun, T. M. Redmond, X. Zhu, K. S. Shindler, G. S. Ying, C. Zivello, C. Acerra, J. F. Wright, J. W. McDonnell, K. A. High, J. Bennett, and A. Auricchio, 'Gene Therapy for Leber's Congenital Amaurosis Is Safe and Effective through 1.5 Years after Vector Administration', *Mol Ther*, 18 (2010), 643-50.
- 139 A. Smits, K. Funa, F. S. Vassbotn, M. Beausang-Linder, F. af Ekenstam, C. H. Hedin, B. Westermark, and M. Nister, 'Expression of Platelet-Derived Growth Factor and Its Receptors in Proliferative Disorders of Fibroblastic Origin', *Am J Pathol*, 140 (1992), 639-48.
- 140 R. O. Snyder, 'Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Delivery', *J Gene Med*, 1 (1999), 166-75.
- 141 P. Soriano, 'Abnormal Kidney Development and Hematological Disorders in Pdgf Beta-Receptor Mutant Mice', *Genes Dev*, 8 (1994), 1888-96.
- 142 G. Soslau, C. Mason, S. Lynch, J. Benjamin, D. Ashak, J. M. Prakash, A. Moore, P. Bagsiyao, T. Albert, L. M. Mathew, and M. Jost, 'Intracellular Matrix Metalloproteinase-2 (Mmp-2) Regulates Human Platelet Activation Via Hydrolysis of Talin', *Thromb Haemost*, 111 (2014), 140-53.
- 143 A. Srivastava, E. W. Lusby, and K. I. Berns, 'Nucleotide Sequence and Organization of the Adeno-Associated Virus 2 Genome', *J Virol*, 45 (1983), 555-64.
- 144 J. Stenflo, Y. Stenberg, and A. Muranyi, 'Calcium-Binding Egf-Like Modules in Coagulation Proteinases: Function of the Calcium Ion in Module Interactions', *Biochim Biophys Acta*, 1477 (2000), 51-63.
- 145 Johan Stenflo, Yvonne Stenberg, and Andreas Muranyi, 'Calcium-Binding Egf-Like Modules in Coagulation Proteinases: Function of the Calcium Ion in Module Interactions', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477 (2000), 51-63.
- 146 C. Suri, P. F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P. C. Maisondieu, S. Davis, T. N. Sato, and G. D. Yancopoulos, 'Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the Tie2 Receptor, During Embryonic Angiogenesis', *Cell*, 87 (1996), 1171-80.
- 147 N. Suzuki, S. Suzuki, and W. C. Yeh, 'Irak-4 as the Central Tir Signaling Mediator in Innate Immunity', *Trends Immunol*, 23 (2002), 503-6.
- 148 H. Takagi, G. L. King, and L. P. Aiello, 'Identification and Characterization of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (Flt) in Bovine Retinal Pericytes', *Diabetes*, 45 (1996), 1016-23.
- 149 H. Takagi, G. L. King, G. S. Robinson, N. Ferrara, and L. P. Aiello, 'Adenosine Mediates Hypoxic Induction of Vascular Endothelial Growth Factor in Retinal Pericytes and Endothelial Cells', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37 (1996), 2165-76.
- 150 M. Thomas, and H. G. Augustin, 'The Role of the Angiopoietins in Vascular Morphogenesis', *Angiogenesis*, 12 (2009), 125-37.
- 151 M. Thomas, Y. Kienast, W. Scheuer, M. Bahner, K. Kaluza, C. Gassner, F. Herting, U. Brinkmann, S. Seeber, A. Kavlie, M. Welschof, S. Ries, K. M. Weidner, J. T. Regula, and C. Klein, 'A Novel Angiopoietin-2 Selective Fully Human Antibody with Potent Anti-Tumoral and Anti-Angiogenic Efficacy and Superior Side Effect Profile Compared to Pan-Angiopoietin-1/-2 Inhibitors', *PLoS One*, 8 (2013), e54923.
- 152 B. J. Thomson, F. W. Weindler, D. Gray, V. Schwaab, and R. Heilbronn, 'Human Herpesvirus 6 (Hhv-6) Is a Helper Virus for Adeno-Associated Virus Type 2 (Aav-2) and the Aav-2 Rep Gene Homologue in Hhv-6 Can Mediate Aav-2 DNA Replication and Regulate Gene Expression', *Virology*, 204 (1994), 304-11.

- 153 A. Tidhar, M. Reichenstein, D. Cohen, A. Faerman, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, and M. Shani, 'A Novel Transgenic Marker for Migrating Limb Muscle Precursors and for Vascular Smooth Muscle Cells', *Dev Dyn*, 220 (2001), 60-73.
- 154 U. Tigges, A. Boroujerdi, J. V. Welser-Alves, and R. Milner, 'Tnf-Alpha Promotes Cerebral Pericyte Remodeling in Vitro, Via a Switch from Alpha1 to Alpha2 Integrins', *J Neuroinflammation*, 10 (2013), 33.
- 155 R. G. Tilton, C. Kilo, J. R. Williamson, and D. W. Murch, 'Differences in Pericyte Contractile Function in Rat Cardiac and Skeletal Muscle Microvasculatures', *Microvasc Res*, 18 (1979), 336-52.
- 156 L. Tomas, I. Lazurova, M. Oetterova, L. Pundova, D. Petrasova, and M. Studencan, 'Left Ventricular Morphology and Function in Patients with Rheumatoid Arthritis', *Wien Klin Wochenschr*, 125 (2013), 233-8.
- 157 A. C. Tsiamis, P. N. Morris, M. B. Marron, and N. P. Brindle, 'Vascular Endothelial Growth Factor Modulates the Tie-2:Tie-1 Receptor Complex', *Microvasc Res*, 63 (2002), 149-58.
- 158 A. Uemura, M. Ogawa, M. Hirashima, T. Fujiwara, S. Koyama, H. Takagi, Y. Honda, S. J. Wiegand, G. D. Yancopoulos, and S. Nishikawa, 'Recombinant Angiopoietin-1 Restores Higher-Order Architecture of Growing Blood Vessels in Mice in the Absence of Mural Cells', *J Clin Invest*, 110 (2002), 1619-28.
- 159 D. M. Valenzuela, J. A. Griffiths, J. Rojas, T. H. Aldrich, P. F. Jones, H. Zhou, J. McClain, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, T. Huang, N. Papadopoulos, P. C. Maisonpierre, S. Davis, and G. D. Yancopoulos, 'Angiopoietins 3 and 4: Diverging Gene Counterparts in Mice and Humans', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (1999), 1904-9.
- 160 M. van Meurs, P. Kumpers, J. J. Ligtenberg, J. H. Meertens, G. Molema, and J. G. Zijlstra, 'Bench-to-Bedside Review: Angiopoietin Signalling in Critical Illness - a Future Target?', *Crit Care*, 13 (2009), 207.
- 161 I. H. Wallow, and B. Burnside, 'Actin Filaments in Retinal Pericytes and Endothelial Cells', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 19 (1980), 1433-41.
- 162 C. Walz, A. Deprez, T. Dupressoir, M. Durst, M. Rabreau, and J. R. Schlehofer, 'Interaction of Human Papillomavirus Type 16 and Adeno-Associated Virus Type 2 Co-Infecting Human Cervical Epithelium', *J Gen Virol*, 78 (Pt 6) (1997), 1441-52.
- 163 N. L. Ward, P. Van Slyke, C. Sturk, M. Cruz, and D. J. Dumont, 'Angiopoietin 1 Expression Levels in the Myocardium Direct Coronary Vessel Development', *Dev Dyn*, 229 (2004), 500-9.
- 164 S. Watanabe, N. Morisaki, M. Tezuka, K. Fukuda, S. Ueda, N. Koyama, K. Yokote, T. Kanzaki, S. Yoshida, and Y. Saito, 'Cultured Retinal Pericytes Stimulate in Vitro Angiogenesis of Endothelial Cells through Secretion of a Fibroblast Growth Factor-Like Molecule', *Atherosclerosis*, 130 (1997), 101-7.
- 165 J. R. Williamson, R. G. Tilton, C. Kilo, and S. Yu, 'Immunofluorescent Imaging of Capillaries and Pericytes in Human Skeletal Muscle and Retina', *Microvasc Res*, 20 (1980), 233-41.
- 166 B. Witzenbichler, D. Westermann, S. Knueppel, H. P. Schultheiss, and C. Tschope, 'Protective Role of Angiopoietin-1 in Endotoxic Shock', *Circulation*, 111 (2005), 97-105.
- 167 H. M. Wu, Q. Huang, Y. Yuan, and H. J. Granger, 'Vegf Induces No-Dependent Hyperpermeability in Coronary Venules', *Am J Physiol*, 271 (1996), H2735-9.
- 168 M. Yamamoto, K. Takeda, and S. Akira, 'Tir Domain-Containing Adaptors Define the Specificity of Tlr Signaling', *Mol Immunol*, 40 (2004), 861-8.
- 169 Q. Yan, and E. H. Sage, 'Transforming Growth Factor-Beta1 Induces Apoptotic Cell Death in Cultured Retinal Endothelial Cells but Not Pericytes: Association with Decreased Expression of P21waf1/Cip1', *J Cell Biochem*, 70 (1998), 70-83.
- 170 J. Yu, E. D. deMuinck, Z. Zhuang, M. Drinane, K. Kauser, G. M. Rubanyi, H. S. Qian, T. Murata, B. Escalante, and W. C. Sessa, 'Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Critical for Ischemic Remodeling, Mural Cell Recruitment, and Blood Flow Reserve', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005), 10999-1004.

- 171 R. Zaidel-Bar, C. Ballestrem, Z. Kam, and B. Geiger, 'Early Molecular Events in the Assembly of Matrix Adhesions at the Leading Edge of Migrating Cells', *J Cell Sci*, 116 (2003), 4605-13.
- 172 A. K. Zaiss, and D. A. Muruve, 'Immune Responses to Adeno-Associated Virus Vectors', *Curr Gene Ther*, 5 (2005), 323-31.
- 173 A. K. Zaiss, S. Son, and L. J. Chang, 'Rna 3' Readthrough of Oncoretrovirus and Lentivirus: Implications for Vector Safety and Efficacy', *J Virol*, 76 (2002), 7209-19.
- 174 C. M. Zehendner, H. E. Wedler, and H. J. Luhmann, 'A Novel in Vitro Model to Study Pericytes in the Neurovascular Unit of the Developing Cortex', *PLoS One*, 8 (2013), e81637.
- 175 Z. X. Zhang, J. Zhou, Y. Zhang, D. M. Zhu, D. C. Li, and H. Zhao, 'Knockdown of Angiopoietin-2 Suppresses Metastasis in Human Pancreatic Carcinoma by Reduced Matrix Metalloproteinase-2', *Mol Biotechnol*, 53 (2013), 336-44.
- 176 X. Zhou, and N. Muzyczka, 'In Vitro Packaging of Adeno-Associated Virus DNA', *J Virol*, 72 (1998), 3241-7.
- 177 T. Ziegler, J. Horstkotte, C. Schwab, V. Pfetsch, K. Weinmann, S. Dietzel, I. Rohwedder, R. Hinkel, L. Gross, S. Lee, J. Hu, O. Soehnlein, W. M. Franz, M. Sperandio, U. Pohl, M. Thomas, C. Weber, H. G. Augustin, R. Fassler, U. Deutsch, and C. Kupatt, 'Angiopoietin 2 Mediates Microvascular and Hemodynamic Alterations in Sepsis', *J Clin Invest* (2013).
- 178 C. Zincarelli, S. Soltys, G. Rengo, and J. E. Rabinowitz, 'Analysis of Aav Serotypes 1-9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice after Systemic Injection', *Mol Ther*, 16 (2008), 1073-80.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Kupatt danken. Zum einen für die Bereitstellung des spannenden Dissertationsthemas und zum anderen für die stets konstruktiven und lebhaften Diskussionen sowie die intensive Betreuung, die ich während meiner Zeit in seiner Arbeitsgruppe erfahren durfte.

Mein weiterer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Jan Horstkotte und Frau Dr. Rabea Hinkel, die sich viel Zeit nahmen mich einzuarbeiten und die mir auch im weiteren Verlauf stets mit Rat und Tat zur Seite standen und ohne welche das Gelingen dieser Arbeit schwer gewesen wäre.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danken, die mich über die Jahre begleitet haben und die mich in der Entstehung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben. Herauszuhoben sind hierbei Herr Cuong Kieu und Frau Elisabeth Raatz, welchen ich für ihre Hilfe bei technischen Fragen und für die Unterstützung beim Erlernen neuer Methoden danken möchte.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mitdoktorandin Frau Teresa Trenkwalder für die lebhaften Diskussionen und den gelegentlichen Austausch aufmunternder Worte. Weiterhin möchte ich meinen zwei Nachfolgerinnen, Frau Vanessa Pfetsch und Frau Karolina Weinmann, für die gewissenhafte Fortführung dieses Projektes danken.

Ein weiterer Dank gilt Frau Katharina Gorontzi, Herrn Peter René Baumann und Herrn Alexander Dierks für ihre Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit und für ihre langjährige Freundschaft.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern Wolfgang und Gertrud Ziegler und meinen beiden Schwestern Johanna und Ulrike für ihre kontinuierliche Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

Curriculum vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Ziegler, Tilman
geb. am 22. Februar 1984 in Frankfurt am Main
Nationalität: deutsch
ledig, keine Kinder

PRAKTISCHE TÄTIGKEIT

01. Februar 2013 - heute	Wissenschaftlicher Assistent, Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Molekulare Medizin, Martinsried
1. Juli 2011 – 31. Januar 2013	Assistenzarzt der Medizinischen Klinik & Poliklinik I, Klinikum der Universität München, Campus Großhadern

Praktisches Jahr (Auszug)

Oktober 2010 – November 2010	Department of Pediatrics, Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand
Februar 2010 – Juni 2010	Chirurgische Klinik, Kantonsspital Luzern, Luzern, Schweiz

Weitere Tätigkeit

Mai 2005 – November 2009	Studentische Hilfskraft in der Pflege im Klinikum der Universität München, Ziemssenstrasse
September 2003 – Mai 2004	Zivildienst als Rettungssanitäter beim DRK Rettungsdienst im Landkreis Osnabrück e.V.

STUDIUM & SCHULAUSBILDUNG

09. Mai 2011	Erteilung der ärztlichen Approbation
September 2006	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Oktober 2004 – Mai 2011	Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität München
28. Juni 2003	Abitur am Ratsgymnasium Osnabrück, Durchschnittsnote 1,9 Prüfungskurse: Griechisch, Biologie, Geschichte, Englisch

PUBLIKATIONEN

Fenske S, Krause SC, Hassan SI, Becirovic E, Auer F, Bernard R, Kupatt C, Lange P, Ziegler T, Wotjak CT, Zhang H, Hammelmann V, Paparizos C, Biel M, Wahl-Schott CA.
Sick Sinus Syndrome in HCN1-Deficient Mice. Circulation. 2013 Nov 11. [Epub ahead of print]

Ziegler T, Horstkotte J, Schwab C, Pfetsch V, Weinmann K, Dietzel S, Rohwedder I, Hinkel R, Gross L, Lee S, Hu J, Soehnlein O, Franz WM, Sperandio M, Pohl U, Thomas M, Weber C, Augustin HG, Fässler R, Deutsch U, Kupatt C. Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis. *J Clin Invest.* 2013 Jul 1. doi:pii: 66549. 10.1172/JCI66549

Horstkotte J, Perisic T, Schneider M, Lange P, Schroeder M, Kiermayer C, Hinkel R, **Ziegler T**, Kumar P, David R, Schulz S, Schmitt S, Widder J, Sinowatz F, Becker B, Bauersachs J, Naebauer M, Franz WM, Jeremias I, Brielmeier M, Zischka H, Conrad M, **Kupatt C**: Mitochondrial thioredoxin reductase is essential for postischemic myocardial protection in vivo, Circulation. 2011 Dec 20;124(25):2892-902. Epub 2011 Dec 5.

STIPENDIEN & PREISE

April 2009 – März 2010 Stipendiat der Rudolf und Brigitte Zenner Stiftung

30. März 2012 „Best poster presentation in subtopic: Circulation, Vascular biology & Genetics, Epigenetics and Genomics”, Frontiers in Cardio Vascular Biology, second meeting of the ESC council on basic cardiovascular science, London, März 2012

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

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

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

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

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand