

**Molekulare und zelluläre Mechanismen  
der Angiogenese im Rahmen entzündlicher  
Prozesse: Die Rolle neutrophiler Granulozyten**

DISSERTATION

**an der Fakultät für Biologie  
durchgeführt am Institut für Vegetative Physiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

vorgelegt von  
**Ruth Schrüfer**  
2006



## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Doktorarbeit am Institut für Vegetative Physiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München bei Frau Prof. Dr. Barbara Walzog selbstständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

München,

.....

(Ruth Schrüfer)

***Tag des Rigorosums: 14.6.2006***

**Dekan: Prof. Dr. Jürgen Soll**

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Charles David**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiss**

Zwei Teilbereiche dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schruefer R, Lutze N, Schymeinsky J, Walzog B. Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin 8. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1186-H1192.

Schruefer R, Sulyok S, Schymeinsky J, Peter T, Scharffetter-Kochanek K, Walzog B. The proangiogenic capacity of human polymorphonuclear neutrophils delineated by microarray technique and by measurement of neovascularization in wounded skin of CD18 deficient mice. *J Vasc Res* 2006; 43: 1-11.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b> .....	1
<b>1. Einleitung</b>	
<b>1.1. Die akute Entzündung</b> .....	3
1.1.1. Physiologischer Ablauf einer akuten Entzündung: Die Rolle neutrophiler Granulozyten.....	3
1.1.2. Das entzündliche Gewebe und die Wundheilung.....	8
<b>1.2. Die Angiogenese</b> .....	10
1.2.1. Zelluläre Mechanismen der Angiogenese.....	10
1.2.2. Molekulare Mechanismen der Angiogenese.....	12
<b>1.3. Die entzündliche Angiogenese</b> .....	17
1.3.1. Physiologische Relevanz der entzündlichen Angiogenese.....	17
1.3.2. Defekte der entzündlichen Angiogenese.....	19
1.3.3. Die Rolle neutrophiler Granulozyten bei der entzündlichen Angiogenese.....	20
<b>1.4. Zielsetzung</b> .....	22
<b>2. Material und Methoden</b>	
<b>2.1. Material</b> .....	23
2.1.1. Reagenzien.....	23
2.1.2. Puffer, Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	23
2.1.3. Antikörper.....	23
<b>2.2. Methoden</b> .....	25
2.2.1. Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten.....	25
2.2.2. Stimulierung humaner neutrophiler Granulozyten.....	25
2.2.3. Isolierung und Kultivierung humaner Endothelzellen.....	25
2.2.4. Stimulierung humaner Endothelzellen.....	26
2.2.5. Kultivierung und Differenzierung von HL-60-Zellen.....	27
2.2.6. mRNA-Isolation.....	27
2.2.7. cDNA-Synthese.....	28
2.2.8. Polymerase Kettenreaktion.....	28
2.2.9. DNA-Agarosegelelektrophorese.....	29
2.2.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
2.2.11. Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose.....	31
2.2.12. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose.....	31
2.2.13. Bestimmung der Konzentration von Zytokinen.....	32
2.2.14. Genarray für Angiogenese-relavante Gene.....	32

2.2.15.	In vitro-Angiogenese-Modell.....	33
2.2.16.	In vivo-Angiogenese-Modell.....	34
2.2.17.	Statistische Analyse.....	35
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>3.1.</b>	<b>Das proangiogenetische Potenzial von humanen neutrophilen Granulozyten.....</b>	<b>36</b>
3.1.1.	Mikroarray für Angiogenese-relevante Gene in humanen neutrophilen Granulozyten.....	36
3.1.2.	Nachweis der neu identifizierten Gene auf mRNA-Ebene mit Hilfe der RT-PCR.....	38
3.1.3.	Expression von Midkine in humanen neutrophilen Granulozyten....	39
<b>3.2.</b>	<b>Die Induktion Angiogenese-relevanter Faktoren in humanen neutrophilen Granulozyten durch Stimulation mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP.....</b>	<b>40</b>
3.2.1.	Regulation von Angiogenese-relevanten Genen in humanen neutrophilen Granulozyten.....	40
3.2.2.	Freisetzung proangiogenetisch wirksamer Zytokine durch humane neutrophile Granulozyten.....	44
3.2.3.	Der proangiogenetische Effekt von humanen neutrophilen Granulozyten in vitro.....	47
3.2.4.	Der Einfluss von humanen neutrophilen Granulozyten auf die endotheliale IL-8 mRNA-Expression.....	48
3.2.5.	Auslöser des proangiogenetischen Effektes von humanen neutrophilen Granulozyten in vitro.....	53
<b>3.3</b>	<b>Die Induktion von Angiogenese-relevanten Faktoren in humanen neutrophilen Granulozyten durch Hypoxie.....</b>	<b>54</b>
3.3.1.	Die HIF-1 $\alpha$ -Expression in humanen neutrophilen Granulozyten....	54
3.3.2.	Expression proangiogenetischer Gene in humanen neutrophilen Granulozyten unter hypoxischen Bedingungen.....	56
3.3.3.	Freisetzung proangiogenetischer Faktoren unter hypoxischen Bedingungen.....	58
3.3.4.	Der proangiogenetische Effekt von humanen neutrophilen Granulozyten nach Hypoxie in vivo.....	61
3.3.5.	Humane neutrophile Granulozyten induzieren einen angiogenetischen <i>Switch</i> in HUVEC.....	63
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
<b>4.1.</b>	<b>Die Rolle von neutrophilen Granulozyten bei der entzündlichen Angiogenese.....</b>	<b>66</b>
4.1.1.	Das proangiogenetische Potenzial humaner neutrophiler Granulozyten .....	66
4.1.2.	Die Expression Angiogenese-relevanter Gene.....	72

<b>4.2.</b>	<b>Die Induktion der entzündlichen Angiogenese durch humane neutrophile Granulozyten.....</b>	<b>75</b>
4.2.1.	Einfluss der neutrophilen Granulozyten auf die mRNA-Expression in HUVEC.....	75
4.2.2.	Die biologische Relevanz des proangiogenetischen Potenzials humaner neutrophiler Granulozyten.....	76
<b>4.3.</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>77</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>84</b>

**Lebenslauf**

**Danksagung**

## Verzeichnis der Abkürzungen

ANG	Angiogenin
ANG1	Angiopoietin1
ANG2	Angiopoietin2
APS	Ammoniumperoxodisulfid
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHGA	Chromogranin A
COX	Cyclooxygenase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ENG	Endoglin
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxid Synthase</i>
EPC	Endotheliale Vorläuferzelle
erb-B2	<i>Avian erythroblastic leukaemia viral oncogene homolog 2</i>
FCS	Fötale Kälberserum
Flk-1	<i>Tyrosinkinase growth factor receptor</i>
FLT-1	FMS-related Tyrosinkinase 1
FK	Fibronektin
FN	Fibrinogen
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
fMLP	N-formyl Met-Leu-Phe
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony-Stimulating Factor</i>
GRO- $\alpha$	<i>Growth Related Oncogene-<math>\alpha</math></i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HEPES	N-( 2-Hydroxymethyl) Peperazin-N'-Ethansulfonsäure
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF	<i>Hypoxia inducible Factor</i>
HPSE	Heparanase
HRE	<i>Hypoxia Responsible Element</i>
HUVEC	<i>Human Vascular Endothelial Cells</i>
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i>
IFN	Interferon
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	Interleukin
ITG	Integrin
KDR	<i>Kinase insert domain receptor</i>
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Proteinkinase</i>
MCP	<i>Macrophage Chemotactic Protein</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MDK	<i>Midkine</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
p38	38-kD Protein, MAPK
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PDGF	<i>Platelet derived Growth Factor</i>
PECAM	<i>Pericellular Adhesion Molecule</i>
PGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3- Kinase</i>
PKC	Proteinkinase C
PMN	polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
ROS	Reactive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
THBS	Thrombospondin
Tie	Tyrosinkinase mit Immunglobulin und EGF Homologiedomänen
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
Timp	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>
uPA	Urokinase
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VE-Cadherin	Cadherin, <i>Vascular Endothelial</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## 1. Einleitung

### 1.1. Die akute Entzündung

Die akute Entzündungsreaktion ist gekennzeichnet durch die Einwanderung von Leukozyten aus dem Blut in das betroffene Gewebeareal<sup>1</sup>. Die klinische Symptomatik kann mit den damit verbundenen Zeichen der Rötung, der Überwärmung, der Schwellung, des Schmerzes und der Fehlfunktion (rubor, calor, tumor, dolor und functio laesa) beschrieben werden. Eine akute Entzündung kann durch Einwirkung physikalischer (z.B. Strahlung), chemischer (z.B. Säureverätzung), oder biologischer Noxen (z.B. Bakterien und Parasiten) ausgelöst werden. Die im Rahmen der Entzündungsreaktion einwandernden Leukozyten eliminieren nun in der Regel die eingedrungenen Mikroorganismen und Fremdkörper bzw. die zerstörten körpereigenen Zellen und Gewebetrümmern. Hierbei handelt es sich im Wesentlichen um polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und Monozyten bzw. Makrophagen. An die Abwehrreaktion schließen sich in der Regel komplexe Wundheilungsprozesse an, die die Integrität des Gewebes wiederherstellen (Restitutio ad integrum). Die effiziente Wundheilung erfordert jedoch die Ausbildung neuer Blutgefäße im betroffenen Gewebeareal. Die Frage, ob PMN nicht nur eine zentrale Bedeutung für die akute Entzündung haben, sondern möglicherweise auch eine Rolle bei der Initiierung der entzündlichen Angiogenese im Rahmen der Wundheilung spielen, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

#### 1.1.1. Physiologischer Ablauf einer akuten Entzündung: Die Rolle neutrophiler Granulozyten

Die PMN sind die Träger der unspezifischen zellulären Abwehr des menschlichen Organismus gegen eingedrungene Mikroorganismen und Fremdkörper. Nach der Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren die PMN etwa 6-10 Stunden im Blutkreislauf. Sie werden anschließend entweder in der Milz sequestriert oder sie werden zuvor in entzündliches Gewebe rekrutiert und überleben dort weitere 1-2 Tage<sup>2</sup>.

Unmittelbar nach Induktion einer Entzündung wandern die PMN im Bereich der postkapillären Venolen aus dem Blut in das betroffene Gewebe ein. Der Prozess der

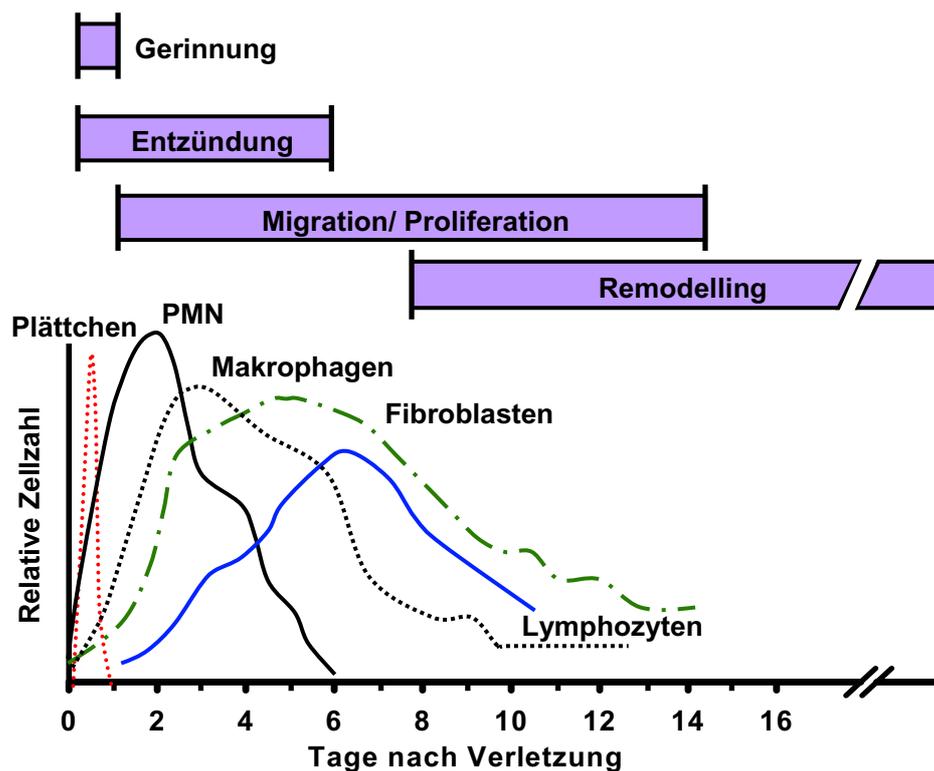
Rekrutierung der PMN ist weitgehend gut dokumentiert<sup>3</sup>. Er ist in mehrere essenzielle Schritte einzuteilen, an denen sowohl das Endothel als auch die PMN aktiv beteiligt sind<sup>3</sup>. Zunächst erfolgt die sogenannte rheologische Margination der frei im Blutkreislauf zirkulierenden PMN an die Gefäßwand. Im entzündeten Gewebe kommt es zu einer Aktivierung der mikrovaskulären Endothelzellen durch z.B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) oder Histamin. Diese Faktoren induzieren nun die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle wie E- und P-Selektin. Die Mediatoren, die das Endothel aktivieren, stammen hierbei von Gewebs-Makrophagen, Mastzellen oder von verletzten Zellen im infizierten bzw. beschädigten Gewebe. Die Aktivierung des Endothels, d.h. die Expression von E- und P-Selektin sowie des L-Selektin-Liganden erlauben nun das sogenannte *Capturing* sowie das Leukozytenrollen (*Rolling*) entlang des Endothels, das insbesondere durch Selektine und ihre Liganden vermittelt wird<sup>4</sup>. Dieser Prozess hat eine Verringerung der Fließgeschwindigkeit von mehr als 2000  $\mu\text{m/s}$  auf weniger als 50  $\mu\text{m/s}$  zur Folge und erhöht somit die Expositionsdauer der PMN für die von den aktivierten Endothelzellen freigesetzten löslichen Entzündungsmediatoren<sup>5</sup>. Diese Faktoren wie *Platelet Activating Factor* (PAF)<sup>6</sup>, Interleukin-8 (IL-8)<sup>7</sup> u.a. sorgen für eine Aktivierung der leukozytären Adhäsionsmoleküle der  $\beta_2$ -Integrinfamilie als erforderliche Voraussetzung für die feste Adhäsion der PMN an das Endothel<sup>5</sup>. Die feste  $\beta_2$ -Integrin-abhängige Adhäsion erfolgt insbesondere durch Bindung an den endothelialen Liganden *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1)<sup>8</sup>, der von aktivierten Endothelzellen auf der Oberfläche exprimiert wird<sup>9</sup>. Die feste  $\beta_2$ -Integrin-abhängige Adhäsion ist die Voraussetzung für die Diapedese der PMN<sup>5</sup>. Die Diapedese erfolgt zu ca. 95 % durch die Bildung eines sogenannten *Transmigratory Cup* im Bereich der Endothelzellkontakte und zu etwa 5 % transzellulär, d.h. durch die Endothelzellen hindurch<sup>10</sup>. Nach Überwindung der vaskulären Endothelzellen erfolgt die Migration durch die Basalmembran<sup>11</sup>. Im Gewebe migrieren die PMN durch lösliche Mediatoren chemotaktisch gesteuert innerhalb der extrazellulären Matrix zum Entzündungsort. Im Falle von PMN können diese Chemotaxine Entzündungsmediatoren wie PAF und Leukotrien B4 (LTB4), Zytokine wie IL-8, der Komplementfaktor C5a oder exogene Faktoren wie das bakterielle Tripeptid N-formyl Met-Leu-Phe (fMLP) sein<sup>3</sup>.

Am Entzündungsort angelangt, erfüllen die PMN zunächst ihre Rolle in der unspezifischen zellulären Abwehr insbesondere gegen eingedrungene Mikroorganismen und Fremdkörper<sup>1</sup>. PMN haben verschiedenste Faktoren in ihren Granula und Vesikeln gespeichert. Es existieren in PMN drei Arten von Granula: Die primären azurophilen, die sekundären spezifischen und die tertiären Gelatinasehaltigen Granula. Die Mobilisierung der Granula ist vom Aktivierungsgrad der PMN abhängig. Zuerst werden die Gelatinasehaltigen tertiären Granula intrazellulär ins Phagosom entleert oder extrazellulär freigesetzt. Anschließend die sekundären und zuletzt die primären Granula<sup>12</sup>. Die Aktivierung der PMN erfolgt über bakterielle Bestandteile oder Entzündungsmediatoren<sup>13</sup>. Zudem setzen PMN am Entzündungsort nach Stimulation lösliche Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$ <sup>7</sup>, PAF<sup>14</sup> und IL-8<sup>15</sup> frei, die nicht nur parakrin auf die Zellen der Umgebung, sondern ebenso autokrin auf die PMN selbst Einfluss nehmen. IL-8 gilt als äußerst potenter Aktivator der PMN<sup>16</sup>. Dieses Zytokin induziert u.a. die Adhäsion, die chemotaktische Migration, die Exozytose sowie die Produktion von Superoxidanionen<sup>16</sup>. Die autokrine Aktivierung der PMN stellt einen positiven Feedback-Mechanismus dar. Parakrin wird durch die IL-8-Freisetzung die Rekrutierung weiterer PMN an den Ort der Entzündung vermittelt<sup>16</sup>.

PMN eliminieren eingedrungene Mikroorganismen durch Phagozytose, die durch Opsonierung der bakteriellen Oberfläche mittels spezifischer Immunglobuline oder Komplementfaktoren unterstützt wird<sup>17</sup>. Bei Kontakt mit dem Fremdkörper bilden PMN Pseudopodien aus und umschließen diesen. Es entsteht ein Phagosom, mit dem die Granula durch Verschmelzung das sogenannte Phagolysosom bilden. In den Phagolysosomen erfolgt der enzymatische und oxidative Abbau des phagozytierten Materials<sup>17</sup>. In den Granula der PMN befinden sich neben verschiedenen hydrolytischen Enzymen auch antimikrobielle Polypeptide<sup>12</sup>. Die Synthese von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS) erfolgt über die Aktivierung der NADPH-Oxidase. Hierbei handelt es sich um einen auf mehreren Ebenen regulierbaren Multienzymkomplex. Er besteht aus einer Cytochrom b-abhängigen membranständigen Komponente (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, Rap1a), die als Elektronenakzeptor fungiert und aus mehreren zytosolischen Proteinen (p47<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, Rac2, p67<sup>phox</sup>, p29)<sup>18</sup>. In unstimulierten PMN liegen die einzelnen Komponenten dissoziiert und damit inaktiv vor. Nach adäquater Stimulation der Zelle

findet eine Translokation der zytosolischen Proteine an die Membran und eine Assoziation mit der membranständigen Komponente statt. Die Folge ist eine Aktivierung der NADPH-Oxidase<sup>19</sup>, die den Transfer eines Elektrons zum Sauerstoff katalysiert, wodurch unter Verwendung von NADPH Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) entstehen. Diese primären Produkte dienen als Vorstufe wesentlich reaktiveren Sauerstoffspezies<sup>20</sup>. Im weiteren Verlauf erfolgt die spontane Dismutation zum Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) als molekulare Vorstufe des hochtoxischen Hydroxylradikals  $OH^\bullet$ . In Gegenwart von Hydrogenperoxid wird Chlorid mit Hilfe der sogenannten Myeloperoxidase oxidiert und es kommt zur Bildung von Hypochlorsäure (HOCl). Dieses starke Oxidationsmittel reagiert mit Ammonium oder Aminen zu reaktionsfähigen Chloraminen<sup>21</sup>. Die über diesen Reaktionsweg entstehenden reaktiven Komponenten ermöglichen den oxidativen Abbau des phagozytierten Materials<sup>21</sup>. Insgesamt wird den reaktiven Sauerstoffspezies sowie den granulozytären Proteasen eine Schlüsselrolle bei der Gewebsdestruktion bei entgleisenden Entzündungsreaktionen zugeschrieben<sup>22</sup>, da im Falle nicht zu phagozytierenden Partikel der Granulainhalt extrazellulär entleert wird<sup>17</sup>. In der Regel jedoch klingen entzündliche Prozesse nach Elimination der eingedrungenen Fremdkörper wieder ab und die im Gewebe befindlichen PMN sterben durch Apoptose<sup>23</sup>. Im Gegensatz zu Nekrose, die zur Freisetzung der proinflammatorischen Inhaltsstoffe der PMN führt, erlaubt die Apoptose die nicht-phlogistische, d.h. „entzündungsneutrale“ Elimination der PMN. Bei der Apoptose bleibt die Zellmembran intakt und die apoptotischen PMN werden von Makrophagen und anderen Gewebezellen phagozytiert<sup>2</sup>. Die Makrophagen bilden die zweite große Zellfraktion im entzündeten Gewebe und erreichen ihre Konzentrationsspitze nach 48 bis 72 Stunden (Abbildung 1)<sup>24</sup>. Die Rekrutierung von Monozyten, die sich im Wundgebiet zu Makrophagen differenzieren, erfolgt durch Zytokine wie *Macrophage Chemotactic Protein-1* (MCP-1) und *Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ ) und verläuft auf zellulärer Ebene nach dem gleichen Prinzip wie die Rekrutierung der PMN<sup>25,26</sup>. Die genannten Zytokine werden hierbei von PMN<sup>27</sup>, Gewebemakrophagen, bereits rekrutierten Makrophagen<sup>28</sup> und aktivierten Endothelzellen freigesetzt<sup>29</sup>. Die feste Adhäsion an das Endothel erfolgt hier hauptsächlich über das VLA-4<sup>30,31</sup>. Makrophagen sind in ihrer Funktion als professionelle Phagozyten für die Elimination von apoptotischen PMN, Mikroorganismen sowie Matrix- und Zellresten verantwortlich. Sie verfügen jedoch aufgrund ihrer Fähigkeit zur Freisetzung von z.B.

Stickstoffmonoxid (NO) und  $H_2O_2$  auch über antimikrobielle Funktionen<sup>24</sup>. Makrophagen sind in der Lage, die durch Phagozytose aufgenommene Fremdproteine nach Abbau zu Peptidfragmenten den nachfolgend einwandernden Lymphozyten zu präsentieren und so spezifische Abwehrreaktionen einzuleiten<sup>32,24</sup>. Die Abbildung 1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Entzündungsreaktion im Bezug auf die in das entzündliche Gewebe einwandernden Zellpopulationen. Bei Schädigung der Gefäße akkumulieren zunächst Plättchen im Rahmen der Hämostasereaktion im Wundgebiet. Anschließend erfolgt die Einwanderung der PMN und der Monozyten bzw. Makrophagen. Im Anschluss an die akute Abwehrreaktion erfolgt u.U. die Aktivierung der spezifischen Abwehr, die charakterisiert ist durch die Einwanderung von Lymphozyten. Bereits in der frühen Phase der Entzündung werden Wundheilungsprozesse eingeleitet, die u.a. durch die Einwanderung bzw. Proliferation von Fibroblasten gekennzeichnet ist.



**Abbildung 1: Die Einwanderung verschiedener Zellpopulationen in das entzündliche Gewebe** im Zusammenhang mit den verschiedenen Entzündungs- bzw. Wundheilungsphasen. Abbildung modifiziert nach 24.

Im Folgenden soll näher auf die physiologischen Bedingungen im entzündeten Gewebe und den weiteren Ablauf der Wundheilung eingegangen werden.

### 1.1.2. Das entzündliche Gewebe und die Wundheilung

Das Anfangsstadium einer Entzündung ist, wie bereits beschrieben, durch massive Einwanderung von PMN und Makrophagen gekennzeichnet. Unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors *Hypoxia Inducible Factor-1* (HIF-1), gewinnen diese Immunzellen ihre Energie durch anaerobe Glykolyse<sup>33</sup>. HIF-1 $\alpha$  ist eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1. Die Expression von HIF-1 $\alpha$  wird unter Sauerstoffmangelbedingungen<sup>34</sup> aber auch durch bestimmte Faktoren wie Thrombin, *Transforming Growth Factor*  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), *Platelet-Derived-Growth-Factor*  $\alpha/\beta$  (PDGF- $\alpha/\beta$ ), IL-1 $\beta$  und ROS stabilisiert<sup>35</sup>. Bei HIF-1 $\alpha$ -*knock-out*-Mäusen, bleiben typische Entzündungssymptome aus, da die von den Entzündungsmediatoren vermittelte Aktivierung der Immunzellen und damit korrespondierende Funktionen wie die Adhäsion, die Extravasation und die Migration inhibiert wird<sup>36</sup>. Während normoxischer Bedingungen wird das HIF-1 $\alpha$  Protein durch Ubiquitinierung und proteosomale Degradierung rasch und kontinuierlich abgebaut<sup>34</sup>. Dieser Vorgang ist abhängig von der Bindung des „von Hippel-Lindau“ Faktors und der Hydroxylierung von Prolin 564 mittels einer enzymatischen sauerstoff- und eisenabhängigen Reaktion. Durch Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  unter Sauerstoffmangelbedingungen und/oder durch Induktion der HIF-1 $\alpha$ -mRNA-Expression durch die oben genannten Faktoren akkumuliert das HIF-1 $\alpha$  Protein und bildet im Nukleus den aktiven HIF-1-Komplex mit dem konstant exprimierten HIF-1 $\beta$ <sup>34</sup>. Dieser Faktor induziert durch die Bindung an die Konsensussequenz 5'-RCGTG-3', das *Hypoxia Responsible Element* HRE, die Transkription von Zielgenen wie Erythropoietin, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), Glukosetransportern, glykolytischen Enzymen sowie Genen des Eisenmetabolismus und des Zell-Signalings<sup>34</sup>.

Für die Wundheilung entscheidend ist hierbei u. a. der proangiogenetische Faktor VEGF, dessen Expression nicht nur unter Hypoxie induziert wird, sondern auch durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie *Epithelial Growth Factor* (EGF), TGF- $\beta$ 1, *Tumor Growth Factor*  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), *Keratinocyte Growth Factor* (KGF), *Insulin-like*

*Growth Factor 1* (IGF 1), PDGF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Interleukin 6 (IL-6)<sup>37</sup>. Des Weiteren sind reaktive Sauerstoffmetabolite (*Reactive Oxygen Species*, ROS)<sup>38</sup> und erhöhte Laktat-Werte<sup>39</sup> für die Induktion von VEGF beschrieben. Insgesamt hat somit eine Vielzahl verschiedener Faktoren einen Einfluss auf das entzündliche Gewebe und die Wundheilung. So besteht entgegen ursprünglicher Annahmen keine klare Trennung zwischen entzündlichen Zytokinen und wachstumsmodulierenden Faktoren. Es handelt sich vielmehr um eine heterogene Gruppe, die je nach Konzentration und Zielzelle verschiedene Wirkungen hervorruft<sup>40</sup>. Die normale Wundheilung erfordert darüber hinaus ein Gleichgewicht synthetisierender und abbauender Mechanismen. Matrix abbauende Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind notwendig beim initialen Wunddébridement und während des kontinuierlichen Matrixumsatzes während der Wundheilung. Kontrollierte Fragmentation von Basalmembranen und Extrazellulärmatrix-komponenten entfernt Matrixbarrieren während des Gewebeumbaus<sup>41</sup>. Die Infiltration der Wunde mit Entzündungszellen überschneidet sich mit der Phase der Wundheilung, die durch die Bildung des Granulationsgewebes gekennzeichnet ist. Das Granulationsgewebe besteht aus einem losen Netzwerk von einwandernden bzw. proliferierenden Fibroblasten, die die extrazelluläre Matrix (ECM) bilden sowie Entzündungszellen und Endothelzellen<sup>24</sup>. Das Granulationsgewebe ist gekennzeichnet durch Gefäßeinsprossungen entlang des chemotaktischen Gradienten der proangiogenetischen Stimuli bzw. in Richtung auf das hypoxische und mit hohen Laktatwerten belastete Wundgebiet<sup>39</sup>. Die Gefäßeinsprossungen ermöglichen die Versorgung des Wundbetts mit den für die Wundheilung erforderlichen Nährstoffen. Somit stellt die Gefäßneubildung im Rahmen des Entzündungsprozesses eine wesentliche Voraussetzung für die effiziente und erfolgreiche Wundheilung dar.

Das Granulationsgewebe, das als provisorisches Ersatzgewebe angelegt wird, wird während des Heilungsprozesses zum endgültigen Ersatzgewebe umgebaut. Um den 14. Tag hat die Menge an neu gebildeten Kollagen Typ III, eine Vorstufe des festeren Kollagens Typ I des Bindegewebes, ihren Höhepunkt erreicht. Die letzte Phase beginnt etwa 21 Tage nach der Verletzung und kann bis zu einem Jahr oder länger anhalten. Sie wird in eine Konsolidierungsphase (ca. 21. bis 60. Tag) und eine Organisationsphase (ca. 60. bis 360. Tag) eingeteilt. Innerhalb der sogenannten

Konsolidierungsphase erfolgt die abschließende Heilung (*Restitutio ad integrum*) bzw. die Bildung einer Narbe. Hierzu wird ein Teil der neu entstanden Gefäße dezimiert und die neu gebildeten Bindegewebszellen und die Bindegewebsubstanz reifen aus. Während der Organisationsphase wird das ursprünglich angelegte Kollagen Typ III durch das stabilere Kollagen Typ I ersetzt<sup>41,42</sup>.

## 1.2. Die Angiogenese

Bei der Gefäßbildung unterscheidet man die zwei grundsätzlich verschiedenen Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese. Die Bildung des Blutgefäßsystems des Embryos wird als Vaskulogenese bezeichnet. Während der Embryonalentwicklung differenzieren aus Vorläuferzellen (Angioblasten) Endothelzellen, die sich anschließend zu einem Gefäßnetz anordnen<sup>43</sup>. Als Angiogenese wurde zunächst der Prozess kapillärer Aussprossung von Endothelzellen der postkapillären Venolen definiert. Inzwischen umfasst der Begriff Angiogenese jedoch sowohl das Gefäßwachstum als auch das Remodelling präexistierender Gefäße innerhalb eines Gefäßnetzes<sup>44</sup>. In bestimmten physiologischen und pathophysiologischen Situationen wie beim Wachstum, beim hormonellen Zyklus, bei Funktionsänderungen durch Muskeltraining, bei der Wundheilung, bei chronischen Entzündungen oder auch beim Anschluss von Tumoren an die Blutversorgung kommt es zur Angiogenese. Die Angiogenese gewährleistet somit eine Anpassung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung an die Bedürfnisse des Zielgewebes. Von der Angiogenese unterscheidet man den Vorgang der Arteriogenese. Hierbei kommt es z.B. nach Verschluss einer Arterie zur Bildung von funktionellen Kollateralgefäßen durch Wachstum bereits existierender Gefäße<sup>44</sup>.

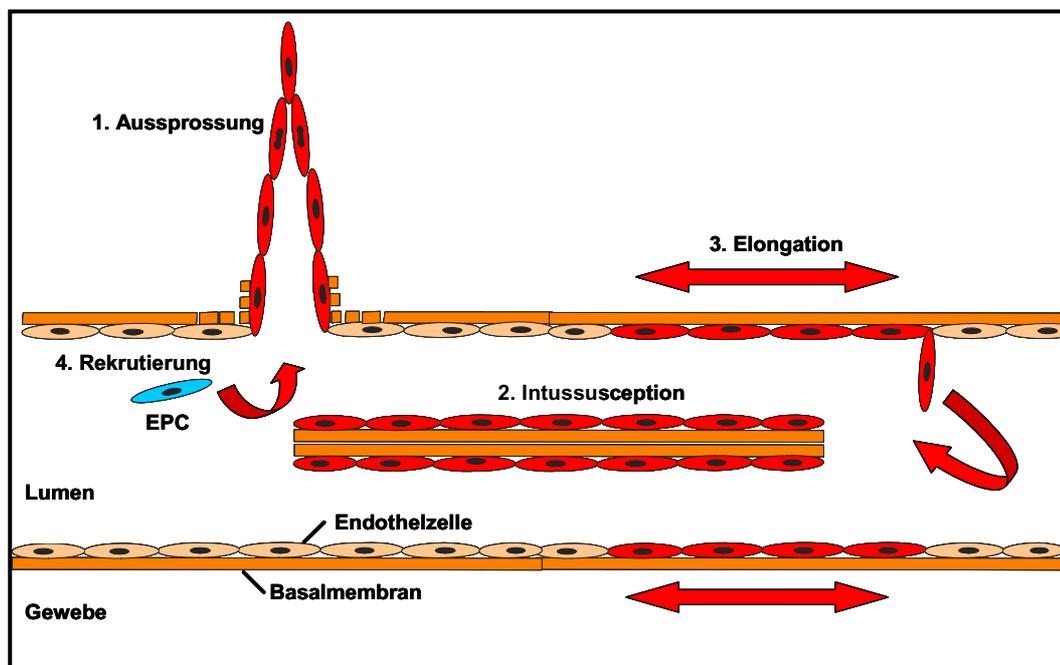
### 1.2.1. Zelluläre Mechanismen der Angiogenese

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der ein intensives Zusammenspiel zwischen den beteiligten Zellen, löslichen Faktoren und extrazellulären Matrixkomponenten erfordert. Man unterscheidet vier verschiedene Angiogenese-Mechanismen<sup>45</sup>, die sich gegenseitig nicht ausschließen (Abbildung 2):

- (1) Die Aussprossung von bereits existierenden Gefäßen wird auch als klassische Angiogenese bezeichnet. Diese Form der Angiogenese kommt insbesondere

beim Anschluss von avaskulärem Gewebe an das Gefäßnetzwerk sowie im Rahmen der Wundheilung zum Einsatz und verläuft in Richtung des proangiogenetischen Stimulus.

- (2) Die sogenannte *Intussusception* findet insbesondere bei der Bildung eines Gefäßnetzes in der sich entwickelten Lunge statt. Dabei wird durch die Entstehung einer Säule von periendothelialen Zellen oder über transendotheliale Zellbrücken das Lumen von bereits existierenden Blutgefäßen der Länge nach zweigeteilt.
- (3) Die Gefäßverlängerung und/oder –erweiterung (*Remodelling* und *Pruning*) ereignet sich in wachsendem Gewebe, da sich Blutgefäße durch andauernde Reorganisation an die metabolischen Erfordernisse der umgebenden Zellen anpassen.
- (4) Die Rekrutierung, Integration und Proliferation endothelialer Vorläuferzellen (*Endothelial Progenitor Cells, EPC*) in bestehende Gefäßstrukturen<sup>45</sup>. Hierfür werden insbesondere die Faktoren *Stromal Cell-Derived Faktor 1 (SDF-1)*<sup>46</sup>, und *VEGF*<sup>47</sup> sowie deren Expressionssteigerung durch Hypoxie verantwortlich gemacht<sup>46</sup>.



**Abbildung 2: Mechanismen der Angiogenese:** Aussprossung (1), Intussusception (2), Elongation (3) und die Rekrutierung von EPC (4). Abbildung modifiziert nach 45.

Die klassische Angiogenese, d.h. die Aussprossung von Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen umfasst auf zellulärer Ebene eine Reihe verschiedener Schritte. Zunächst kommt es zur Aktivierung von Endothelzellen durch proangiogenetische Faktoren und zur Freisetzung von Proteasen, die die lokale Auflösung der Basalmembran einleiten. Die Endothelzellen migrieren und proliferieren in Richtung des proangiogenetischen Stimulus und schließen sich zur Bildung einer kapillären Struktur zusammen. Die Initiierung der Angiogenese kann zwar zunächst allein von aktivierten Endothelzellen bewerkstelligt werden, zur Ausreifung des Blutgefäßes und dessen Erhalt werden allerdings periendotheliale Zellen (z.B. Perizyten, glatte Muskelzellen) benötigt. Hierdurch wird das neu entstandene Gefäß stabilisiert und weitere Migration und Proliferation der Endothelzellen inhibiert<sup>44</sup>. Es kommt zur Ausbildung der Basalmembran. Das neu gebildete Blutgefäß wird rasch wieder rückgebildet, sofern es nicht von Perizyten und in größeren Gefäßen zusätzlich von glatten Muskelzellen ummantelt wird<sup>48</sup>.

### **1.2.2. Molekulare Mechanismen der Angiogenese**

Der komplexe Vorgang der Angiogenese wird von zahlreichen Aktivatoren und etwa ebenso viele Inhibitoren koordiniert (Tabelle 1)<sup>49</sup>. Im gesunden Körper herrscht ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren. Überwiegen die Angiogenese-stimulierenden Faktoren wird die Angiogenese induziert. Im Normalfall ist das Gleichgewicht jedoch auf der Seite der inhibitorischen Faktoren, es findet also keine Angiogenese statt. Die Koordinierung der Angiogenese im Organismus ist sehr komplex. So nehmen zur Entstehung eines funktionellen Gefäßnetzes zu unterschiedlichen Zeitenpunkten und in verschiedenen Dosierungen eine Vielzahl von Faktoren Einfluss. Dennoch lassen sich diverse Schritte der Angiogenese einzelnen Faktoren zuordnen<sup>49</sup>: Der Initiation der Angiogenese geht stets eine von NO-induzierte Vasodilatation voraus<sup>44</sup>. Anschließend erfolgt eine Permeabilitätssteigerung des Blutgefäßes, die u.a. durch VEGF vermittelt wird. Somit wird eine Extravasation von Plasmaproteinen verursacht und die extravaskuläre Gerinnung ermöglicht. So wird ein vorläufiges Gerüst erzeugt, das die Migration von Endothelzellen erlaubt. Dieser Src-Kinase abhängige Prozess geht mit einer Umverteilung von *Platelet Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) und *Vascular Endothelial*

(VE)-Cadherin einher und bewirkt eine Auflockerung der Interendothelialen Kontakte zwischen den benachbarten Endothelzellen<sup>50</sup>.

**Tabelle 1: Übersicht ausgewählter pro- und anti-angiogenetischer Faktoren<sup>49</sup>.**

Proangiogenetisch	Antiangiogenetisch
Angiopoietin-1	Angiopoietin-2
Tyrosinkinase-Rezeptor 2 (TIE-2)	Angiostatin
CXC-Chemokine u.a. IL-8, MCP-1	Antithrombin III Fragment
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	Endostatin
Ephrin, ets-1	Interferon (IFN) $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$
<i>Fibroblast Growth Factors</i> (FGF)	Interferon-Inducible-Protein (IP-10)
<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> (G-CSF)	IL-4, IL-12, IL-18
Heparanase (HPSE), HIF-1 $\alpha$	Meth-1, Meth-2
<i>Hepatocyte Growth Factor</i> (HGF)	Plasminogen <i>Kringles</i>
<i>Insulin-Like Growth Factor</i> (IGF)	<i>Platelet factor-4</i> (PF4)
Integrin $\alpha_5\beta_1$ , Integrin $\alpha_v\beta_3$	<i>Prolactin 16kD fragment</i>
Metalloproteinasen (MMPs),	Prothrombin <i>Kringle-2</i> ,
NO, NO Synthase (NOS)	Restin
<i>Platelet Adhesion Molecule-1</i> (PECAM-1)	<i>Fragment of SPARC</i>
<i>Plasminogen Activator</i> (PA)	Thrombospondin-1 (THBS-1), THBS-2
<i>Placental Growth Factor</i> (PGF), PDGF-BB	<i>Tissue-inhibitors of MMP</i> (TIMPs)
TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$	Vasostatin
<i>Vascular Endothelial</i> (VE)-Cadherin	<i>Vascular Endothelial Growth Inhibitor</i> (VEGI)
VEGF, VEGFB, VEGFC, VEGFD	
VEGF- <i>Receptors</i> (VEGF-R-1, VEGF-R-2, VEGF-R-3)	

VEGF kommt jedoch auch bei den nachfolgenden Schritten der Gefäßausprossung eine wichtige Rolle zu. Die Expression von VEGF wird u.a. über den Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktor HIF-1 reguliert. Hierbei liegt ferner ein Mechanismus vor, der die Angiogenese am Stoffwechselbedarf des Gewebes ausrichten kann<sup>33</sup>. VEGF wirkt chemotaktisch auf Endothelzellen und führt demgemäß zu einer Induktion von Endothelzellmigration und deren Proliferation<sup>51</sup>. Dieser Effekt wird über die Bindung von VEGF an *Kinase Insert Domain Receptor* (KDR)/*VEGF-Receptor-2* (VEGF-R-2) auf Endothelzellen vermittelt<sup>52</sup>. Für die Bildung von neuen Blutgefäßen mit einer intakten Mikrozirkulation ist VEGF allein jedoch nicht ausreichend. So ist das Ergebnis einer primär über VEGF induzierten Angiogenese ein für die Sauerstoffversorgung unzureichendes, unstrukturiertes Gefäßnetz aus Kurzschlussverbindungen und langen Kapillarschleifen<sup>53</sup>. Derartige Gefäßnetzwerke sind insbesondere für die Tumorangio-genese charakteristisch<sup>53</sup>.

Für die Bildung funktioneller Gefäßnetzwerke mit intakter Mikrozirkulation ist unter physiologischen Bedingungen das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren unerlässlich. Ein weitaus funktionelleres Netzwerk wird unter Kombination mit dem Angiotensin (Ang)/ Tyrosinkinase Rezeptor 2 (Tie-2) System gebildet. Bei Aktivierung von Tie-2 auf Endothelzellen durch seinen Liganden Ang-1 wird die Wand des reifen, ruhenden Blutgefäßes stabilisiert<sup>54</sup>. Wird dieser allerdings durch den endogenen Tie-2-Antagonisten Ang-2 blockiert, führt dies zur Inaktivierung der Rezeptortyrosinkinase und zur Gefäßdestabilisierung<sup>55</sup>. Die Expression von Ang-2 wird ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen induziert<sup>56</sup>. Dies führt zur Ablösung glatter Muskelzellen aus der Gefäßwand und damit zu deren Auflockerung und zur Förderung des proangiogenetischen Effekts des gleichzeitig induzierten VEGF<sup>57,55</sup>. Diese Lockerung bzw. Auflösung von interendothelialen Kontakten ist unter physiologischen Bedingungen erforderlich um die Migration und Proliferation von Endothelzellen zu gewährleisten.

Eine weitere Voraussetzung für die Angiogenese ist die Degradierung der Basalmembran und extrazellulären Matrix (ECM), die von verschiedenen Matrixmetalloproteinasen (MMP)<sup>58,59,60</sup> und anderen Proteinasen wie Heparanase (HPSE)<sup>61</sup> bewerkstelligt wird. Dadurch wird einerseits Raum für die auswandernden Endothelzellen geschaffen, gleichzeitig werden die an Matrixproteinen verankerten proangiogenetischen Wachstumsfaktoren wie *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF), VEGF, IGF-1 freigesetzt und deren Verfügbarkeit durch proteolytische Aktivierung erhöht<sup>62,60</sup>. So wurde bereits gezeigt, dass infolge proteolytischer Aktivierung von VEGF durch MMP-9, der sogenannte *Angiogenic Switch* stattfindet, d.h. die Induktion der Tumorangiogenese<sup>63</sup>. Darüber hinaus wurde für MMP-3, MMP-7 und MMP-9 demonstriert, dass sie in der Lage sind, die Angiogenese zu induzieren<sup>64</sup>. Insbesondere die Metalloproteinasen MMP-2, MMP-3 und MMP-9 sind für die proangiogenetische Wirkung von Ang-1 verantwortlich<sup>65</sup>. Außerdem ist die Protease *Urokinase-type Plasminogen Activator* (u-PA) an der Degradierung der ECM und sowie an der Aktivierung von TGF- $\beta$ 1<sup>66</sup> beteiligt. So wurde gezeigt, dass uPA für die Revaskularisierung nach einem myokardialen Infarkt unentbehrlich ist<sup>67</sup>.

Nachdem die physikalischen Hürden beseitigt sind, migrieren Endothelzellen zu dem neu zu vaskularisierenden Gewebe. Dieser Schritt wird hauptsächlich durch ein

Zusammenspiel von Ang-1 und bFGF sowie von verschiedenen Isoformen von VEGF und deren Rezeptoren vermittelt<sup>49</sup>. Insgesamt wurden bisher 6 Isoformen von VEGF beschrieben, VEGF A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und *Placental Growth Factor* (PGF)<sup>68</sup>. VEGF-A wird auch als VEGF bezeichnet und hat im Verlauf der Angiogenese eine essenzielle Rolle<sup>69</sup>. Die Isoform VEGF-B unterstützt durch eine Aktivierung von Plasminogen die Degradierung der ECM<sup>70,71</sup>. Die genaue Funktion eines weiteren Mitglieds der VEGF-Familie, dem Faktor VEGF-C, ist noch nicht im Detail aufgeklärt. Allerdings wurde bereits gezeigt, dass VEGF-C über die Bindung an den VEGF-R-2 die Angiogenese zu stimulieren vermag<sup>72</sup>. Der *VEGF-Receptor-3* (VEGF-R-3) ist besonders während der Embryonalentwicklung exprimiert. Darüber hinaus ist er für die Angiogenese und das vaskuläre Remodelling essenziell<sup>68,72</sup>. Dieser Rezeptor vermittelt bei Aktivierung durch seine Liganden VEGF-C und VEGF-D<sup>73,74</sup> zugleich die Lymphangiogenese<sup>75</sup>. Der Faktor Ang-1 wirkt über die Phosphorylierung von Tie-2 als Chemotaxin für Endothelzellen, er induziert die Aussprossung und die Interaktion zwischen Endothelzellen und periendothelialer Zellen. Ang-2 besitzt in Kooperation mit VEGF proangiogenetische Wirkung, bei Abwesenheit von VEGF induziert Ang-2 die Gefäßrückbildung<sup>54</sup>. FGFs stimulieren das Wachstum von Endothelzellen<sup>76</sup> und sorgen u.a. für die Rekrutierung von mesenchymalen Zellen und Leukozyten, die ein weites Spektrum proangiogenetischer Faktoren freisetzen<sup>77</sup>. Bei der Angiogenese tragen auch mehrere Chemokine zum Endothelzellwachstum bei. Insbesondere die CXC-Chemokine mit ERL Motif<sup>78</sup> wie IL-8 und *Growth Related Oncogene- $\alpha$*  (Gro- $\alpha$ ), aber auch MCP-1<sup>79</sup> sind bedeutende Faktoren in der Angiogenese. Der proangiogenetische Effekt ist u.a. von der Leukozytenrekrutierung abhängig<sup>80</sup>, da die Leukozyten in der Lage sind, ein breites Spektrum proangiogenetischer Faktoren freizusetzen. Diese Eigenschaft wurde ebenso für den proangiogenetischen von Effekt *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF) gezeigt, der durch den Faktor VEGF vermittelt wird, der von PMN freigesetzt wird. Darüber hinaus ist dieser Faktor an der Rekrutierung von EPCs beteiligt<sup>81</sup>. Selbst das multifunktionelle Zytokin TNF- $\alpha$  wurde als ein proangiogenetischer Faktor identifiziert. So trägt es durch Unterstützung der VEGF-R-2-Phosphorylierung zur VEGF-induzierten Endothelzellproliferation bei<sup>82</sup>.

Während der Endothelzellproliferation werden neue Kontakte zwischen Endothelzellen geknüpft. Daraus resultieren Ligand-Rezeptorbindungen verschiedenster Adhäsionsmoleküle und somit die Aktivierung der damit verbundenen Signalwege. Hierbei haben die Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$ <sup>83</sup>, PECAM-1<sup>84</sup> oder auch Ephrine und deren Rezeptoren<sup>85,86</sup> eine Funktion bei der gerichteten Migration und Proliferation der Endothelzellen. Die Integrine unterstützen außerdem durch Induktion der MMP-Expression die Degradierung der ECM<sup>87</sup> und sorgen für die Einbettung des neu entstandenen Gefäßes in die ECM<sup>88</sup>. Die Familie der Ephrine sind Liganden für mindestens 14 Tyrosinkinasen, den Eph-Rezeptoren<sup>86</sup>. Unter den Ephrinen gibt es arterien- und venenspezifische Formen. So findet man in Venen ausschließlich EphB4. Demgegenüber ist Ephrin B2 ausschließlich in Arterien nachzuweisen<sup>89</sup>. Deshalb nimmt man hier einen molekularen Mechanismus für die bisher ungeklärte Differenzierung zu Arterie und Vene an. Die Inaktivierung des Ephrin B2 Gens in Mäusen führt zwar zu einer normalen Vaskularisierung, jedoch liegt eine Störung des Remodellings von Arterien und Venen in kleinere bzw. größere Gefäße vor. Dies wird u.a. durch eine gestörte Assoziation der Gefäße an das Periendothelium verursacht<sup>90</sup>. Die Adhäsionsmoleküle PECAM-1 und VE-Cadherin sind u.a. für das Überleben von Blutgefäßen verantwortlich<sup>49,91</sup>. Die Mitglieder der TGF- $\beta$ 1 Familie sind ebenso für die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten bedeutend<sup>92</sup>. Darüber hinaus sind sie für die Reifung des Gefäßes durch Stimulierung der Differenzierung der glatten Muskelzellen sowie für die Umformung der ECM für die Ausreifung des Gefäßes entscheidend. Patienten, die einen Defekt in dem TGF- $\beta$ -Rezeptor Endoglin besitzen, leiden an vaskulären Blutungen<sup>93</sup>. Die neu entstandenen Endothelzellkontakte werden durch Gap-Junctions und VE-Cadherin stabilisiert<sup>94,95</sup>.

Die Ausreifung der neugebildeten Blutgefäße umfasst im Wesentlichen die Ausbildung eines Lumens, also einer kapillären Struktur sowie die Fusion mit präexistierenden Gefäßen. PDGF wirkt proangiogenetisch auf mikrovaskuläre Endothelzellen und induziert die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen zum Erhalt und zur Stabilisierung von neu entstandenen Gefäßen<sup>96</sup>. Die einzelnen Schritte der Angiogenese unterliegen der Kontrolle durch endogene Inhibitoren. So kann durch *Thrombospondin-1* (THBS-1) die Migration und Proliferation der Endothelzellen gehemmt und die Bildung eines Gefäßlumens

verhindert werden<sup>97</sup>. Darüber hinaus verhindert THBS-1 die proteolytische Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 verhindert werden<sup>98</sup>. Des Weiteren existieren zahlreiche Inhibitoren der MMPs, die sogenannten *Tissue-Inhibitors of MMP* (TIMPs). Die TIMPs inhibieren die Angiogenese u.a. durch Hemmung der Degradierung der ECM und der Hemmung der proteolytischen Aktivierung proangiogenetischer Faktoren<sup>99</sup>. Darüber hinaus greifen zahlreiche Angiogenese-inhibierende Faktoren an der proangiogenetischen Wirkung von VEGF an. So kann der Effekt von VEGF z.B. durch das *Acidic Cysteine-Rich Secreted Protein* (SPARC) Fragment inhibiert werden<sup>100</sup>.

Die genauen Überlebensmechanismen der Blutgefäße sind im Detail bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings spielen hierbei insbesondere die interendothelialen Adhäsionsmoleküle eine besondere Rolle. Das „ruhende“ Blutgefäß wird über das *Signalling* von den VE-Cadherinen vor proapoptischen Stimuli geschützt. Die VE-Cadherine induzieren die Aktivierung der PI3-Kinase (PI3K) durch Rekrutierung des Enzyms an die Membran<sup>101</sup>. Folglich wird in den vaskulären Endothelzellen die AKT/Protein Kinase B (PKB) phosphoryliert und die Apoptose inhibiert<sup>102</sup>. In diesen Zellen wird die Aktivierung der PI3K durch Stimulierung des VEGFR-2 erhöht. Demnach besitzen proangiogenetische, an VEGFR-2 bindende Faktoren einen stabilisierenden Einfluß auf die Endothelzellen im bestehenden Gefäßbett<sup>90</sup>. Aber auch PECAM kann den AKT/PKB Weg aktivieren<sup>103</sup> und unterdrückt so die Mitochondrien-vermittelte Apoptose<sup>104</sup>. Weiterhin wurde bisher gezeigt, dass zum Erhalt der Blutgefäße darüber hinaus hämodynamische Kräfte benötigt werden<sup>105</sup>. Viele Angiogeneseinhibitoren tragen zum Überleben des Endothels bei. Dies wurde z.B. für THBS-2, IL-4, IL-12 und COX-2-Inhibitoren gezeigt<sup>49</sup>.

### **1.3. Die entzündliche Angiogenese**

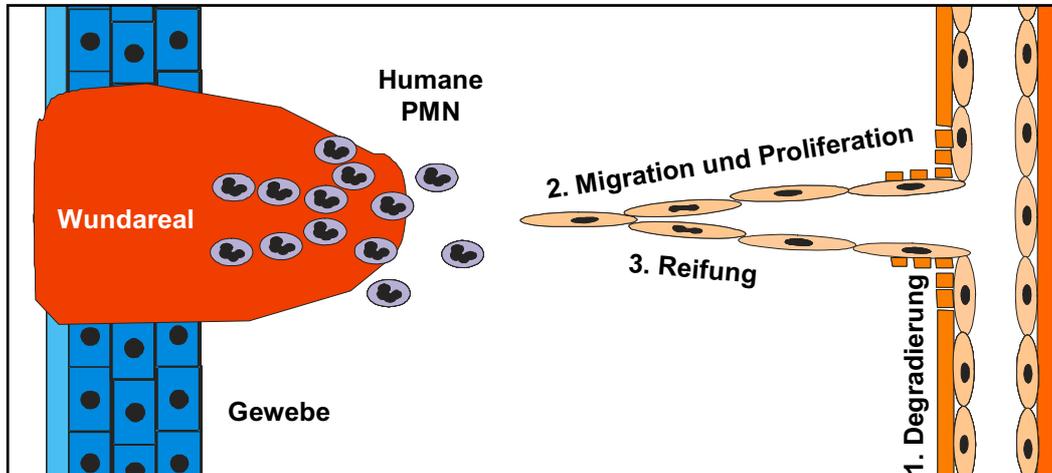
#### **1.3.1. Physiologische Relevanz der entzündlichen Angiogenese**

Die Wiederherstellung bzw. Neubildung der Blutgefäße im Wundgebiet geht vor allem von bereits existierenden Gefäßen des Wundrandes aus. Voraussetzung hierfür ist die Aussprossung von neuen Blutgefäßen durch Induktion der

Angiogenese. Diesem Prozess wird eine zentrale Rolle bei der Wundheilung zugeschrieben, da die hierbei entstehenden Blutgefäße u.a. eine hohe Permeabilität aufweisen und somit Austritt von Plasmabestandteilen wie Fibrinogen ermöglichen. Hierdurch kommt es zur extravasalen Gerinnung und das hierbei entstehende Fibrin bildet die Matrix für die Einwanderung und Proliferation von Gewebezellen im Rahmen der Wundheilung<sup>106</sup>. Die einsprossenden Blutgefäße stellen darüber hinaus den erhöhten Nährstoff- und Sauerstoffbedarf im Wundgewebe sicher. Somit ist die entzündliche Angiogenese eine essenzielle Voraussetzung für die Wundheilung.

Die Frage, welche molekulare Mechanismen im Rahmen der Entzündung bzw. der Wundheilung für die Auslösung der Angiogenese verantwortlich sind, ist bisher im Detail nicht aufgeklärt. Der schematische Ablauf dieses Vorgangs auf zellulärer Ebene ist in Abbildung 3 dargestellt. Vom betroffenen Gewebe aus werden insbesondere von Leukozyten proangiogenetische Faktoren wie VEGF<sup>107</sup>, TGF- $\alpha$ <sup>108</sup>, IL-8<sup>15</sup>, und TGF- $\beta$ <sup>109,18</sup> freigesetzt. Diese diffundieren durch das Gewebe und bilden einen Gradienten, der zur chemotaktischen Proliferation und Migration von Endothelzellen führt. Zusätzlich kommt es zur chemotaktischen Einwanderung von EPCs in Richtung von SDF-1<sup>107</sup> und VEGF<sup>49</sup>. Beide Faktoren werden im hypoxischen Wundgebiet durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 induziert<sup>34</sup>. Es gibt Hinweise, dass die Einwanderung von EPCs für die Wundheilung essenziell ist<sup>110,111</sup>. Zuvor müssen allerdings sowohl Basalmembran als auch ECM degradiert werden, um das Migrieren und Proliferieren der Endothelzellen gewährleisten zu können. Hierbei spielen PMN möglicherweise eine besondere Rolle, da sie Proteasen wie MMP-9<sup>112</sup>, uPA<sup>113</sup> und HPSE<sup>58</sup> freisetzen. Darüber hinaus induzieren sie bei Adhäsion am Gefäßendothel durch Bindung von ICAM-1 einen Signalweg, welcher den Transkriptionsfaktor ets-1 induziert. Dieser ist u.a. für die Transkription von MMPs verantwortlich. Folglich werden die Proteasen MMP-2 und MMP-9 vermehrt freigesetzt<sup>114</sup>, die für die Induktion der entzündlichen Angiogenese essenziell sind. Inzwischen gibt es vermehrt Hinweise auf eine Beteiligung der PMN bei der Induktion der entzündlichen Angiogenese bzw. der Wundheilung<sup>80</sup>. Bisher wurde lediglich für Makrophagen eine Rolle bei der entzündlichen Angiogenese nachgewiesen<sup>115</sup>. So sind diese Zellen in der Lage, nach Differenzierung und Stimulation verschiedene Proteasen und proangiogenetische Faktoren wie bFGF, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ ,

PDGF, VEGF und TGF- $\beta$ 1<sup>116</sup> freizusetzen. Es wurde bereits gezeigt, dass nach Injektion von Makrophagen in Hautwunden bei Mäusen die Wundheilung beschleunigt werden kann<sup>117</sup>.



**Abbildung 3: Schema über die Induktion der entzündlichen Angiogenese:** Nach Degradierung der Basalmembran und Extrazelluläre Matrix (ECM) (1), migrieren und proliferieren die Endothelzellen in Richtung des angiogenetischen Stimulus (2). Zuletzt erfolgt die Lumenbildung und Ausreifung des neuen Blutgefäßes (3).

### 1.3.2. Defekte der entzündlichen Angiogenese

Ein Defekt der entzündlichen Angiogenese kann wie beim Diabetes Mellitus zu Wundheilungsstörung führen<sup>53</sup>. Im Verlauf der Krankheitsgeschichte des Typ-2-Diabetes tritt zunächst eine Insulinresistenz der Körperzellen auf. Die Glukoseaufnahme der Körperzellen kann durch eine übermäßige Insulinproduktion der  $\beta$ -Zellen im Pankreas in einem begrenzten Rahmen gewährleistet werden. Sobald der Insulinbedarf jedoch nicht mehr gedeckt werden kann, manifestiert sich der Typ-2-Diabetes. Charakteristisch sind postprandiale hyperglykämische Schübe im Blut sowie Hypoglykämien in den Körperzellen<sup>118</sup>. Patienten mit Diabetes haben gegenüber gesunden Menschen eine gestörte primäre und sekundäre Wundheilung und ein erhöhtes Infektionsrisiko, insbesondere während der chronischen Hyperglykämie. Histologisch findet man Defekte in Epithelialisierung, Neovaskularisation und Granulationsbildung<sup>119</sup>. Diese Störungen werden u.a. von Durchblutungsstörungen im Bereich der Mikrozirkulation hervorgerufen. Als Folge

wird das Gewebe nur unzureichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und es kommt zur Verlangsamung des Wundheilungsprozesses<sup>119</sup>. Die erhöhte Infektanfälligkeit diabetischer Wunden wird im Zusammenhang mit verminderter Phagozytosefähigkeit von Makrophagen und PMN diskutiert. Der Energiemangel in den hypoglykämischen Zellen verursacht Defekte in Chemotaxis, Adhäsion und Phagozytosefähigkeit der Leukozyten<sup>120-122</sup>. Die eingeschränkte Funktion und verminderte Rekrutierung der Leukozyten tragen möglicherweise zur mangelhaften Induktion der entzündlichen Angiogenese bei<sup>123</sup>.

### **1.3.3. Die Rolle von neutrophilen Granulozyten bei der entzündlichen Angiogenese**

PMN sind die ersten Zellen, die im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion in das betroffene Gewebe einwandern. Lange Zeit wurde angenommen, dass ihre Funktion hierbei auf die Phagozytose sowie die Freisetzung der in den Granula gespeicherten lytischen Enzyme und reaktiven Sauerstoffradikalen zur Beseitigung der eingedrungenen Mikroorganismen beschränkt sei. Außerdem war die gängige Ansicht, dass PMN terminal ausdifferenzierte Zellen sind, die nicht zur de novo Proteinsynthese fähig sind. Mit der Entwicklung von sensitiveren Nachweismethoden wurden diese Ansichten revidiert. So geht man heute davon aus, dass PMN in der Lage sind eine größere Anzahl von Faktoren neu zu synthetisieren. Eine Auswahl Angiogenese-relevanter Gene in humanen PMN ist in Tabelle 6 im Anhang zu finden.

Im Anschluss an die Abwehrreaktion finden komplexe Regenerations- und Umbauprozesse statt, die die Wundheilung ermöglichen. Die Wundheilung ist mit einem erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf für das Gewebe verbunden. Um die entsprechende Versorgung zu gewährleisten ist eine Induktion der Angiogenese erforderlich. Die Frage, ob PMN direkt einen Beitrag zur Induktion der Angiogenese leisten ist bisher nicht im Detail gelöst. PMN exprimieren ein verschiedene Angiogenese-relevante Faktoren<sup>124,125</sup>. Darüber hinaus tragen PMN zur Rekrutierung von Makrophagen bei<sup>126,127</sup>, die ebenfalls proangiogenetisches Potenzial besitzen<sup>128</sup>. Bereits die Adhäsion von PMN am aktivierten Endothel vermittelt in den entsprechenden Endothelzellen die Synthese von Angiogenese-relevanten Faktoren<sup>114</sup>. Aktivierte PMN sezernieren u.a. CXC-Zytokine, die ein ELR-Motiv

aufweisen. Diese Mediatoren (z.B. IL-8) wirken nicht nur proinflammatorisch, sondern induzieren auch die Chemotaxis und Proliferation von Endothelzellen in vitro und die Angiogenese in vivo<sup>78</sup>. Das Zytokin IL-8 ist in der Lage die Apoptose von Endothelzellen zu inhibieren und es induziert die Synthese von MMP-2 und MMP-9<sup>129</sup>, die mit der Degradierung der ECM eine besondere Funktion bei der Induktion der Angiogenese haben<sup>59</sup>. Der proangiogenetische Effekt von IL-8 und weiteren Mitgliedern der CXC-Zytokin-Familie wird durch den endothelialen CXC-Rezeptor-2 (CXCR-2) vermittelt<sup>130</sup>. So wurde bereits gezeigt, dass in CXCR-2-defizienten Mäusen die PMN-Infiltration in das betroffene Gewebe der Thioglykolat-induzierten Peritonitis ausblieb und die Wundheilung bzw. die entzündliche Angiogenese gehemmt war<sup>131</sup>. Weitere Hinweise für eine essenzielle Rolle der PMN bei der Induktion der entzündlichen Angiogenese wurde in neutropenischen Mäusen in vivo gewonnen. Hier war der proangiogenetische Effekt von IL-8 im Vergleich zur Kontrolle komplett gehemmt<sup>132</sup>. Überdies sind bereits eine Reihe von proangiogenetischen Faktoren in PMN beschrieben worden. So ist bereits bekannt, dass PMN VEGF in den Granula speichern und freisetzen<sup>107,133</sup>. VEGF gilt als einer der wichtigsten Faktoren bei der Induktion der Angiogenese<sup>43</sup>. Außerdem sezernieren PMN das proangiogenetische Zytokin *Hepatocyte Growth Factor* (HGF)<sup>134</sup>. Des Weiteren stellt TNF- $\alpha$  einen weiteren wesentlichen Faktor bei der PMN-vermittelten Angiogenese dar<sup>7</sup>. So induziert TNF- $\alpha$  nachweislich die Expression von IL-8, VEGF und bFGF in mikrovaskulären Endothelzellen<sup>135</sup>. Hierzu wurde gezeigt, dass neutralisierende Antikörper gegen IL-8 und VEGF die TNF- $\alpha$ -induzierte Neovaskularisierung in vivo hemmen<sup>135</sup>. Ferner wurde nachgewiesen, dass die von PMN exprimierten Proteasen wie MMP-9<sup>59</sup> und HPSE<sup>58</sup> durch die Aktivierung von Zytokinen (z.B. VEGF und TGF- $\beta$ 1) für deren Verfügbarkeit sorgen<sup>62,136</sup>. Darüber hinaus sind diese Proteasen in der Lage gebundene proangiogenetische Faktoren aus der ECM freizusetzen wie bFGF und VEGF<sup>60,62,136</sup>. Zuletzt sei noch auf einen Gendefekt im Menschen hingewiesen, der die essenzielle Bedeutung für PMN bei der Wundheilung bzw. der entzündlichen Angiogenese darlegt. Patienten mit Leukozytenadhäsionsdefizienz vom Typ-I (LAD-I) besitzen einen genetischen Defekt in der  $\beta$ -Untereinheit der  $\beta_2$ -Integrine. Folglich können  $\beta_2$ -Integrine nicht exprimiert werden und die Infiltration von PMN in das entzündliche Gewebe ist gehemmt. Diese Patienten sterben unbehandelt bereits im Kindesalter an im Grunde harmlosen bakteriellen Infektionen. Die Patienten zeigen

darüber hinaus eine deutliche Wundheilungsstörung<sup>137</sup>. Somit existiert eine Vielzahl von In vivo-Befunden, die darauf hindeuten, dass PMN möglicherweise an der Auslösung der Angiogenese beteiligt sind. Hierbei ist allerdings unklar, ob die PMN direkt einen Einfluss auf die Induktion der Angiogenese haben oder aber weitere Zellen ins Entzündungsgebiet rekrutieren, die ihrerseits die Angiogenese auslösen.

#### **1.4. Zielsetzung**

Die entzündliche Angiogenese ist eine wichtige Voraussetzung für die Wundheilung, da sie die Einsprossung von Blutgefäßen in das Wundbett sicherstellt. Verschiedene In vivo-Untersuchungen deuten darauf hin, dass PMN an der entzündlichen Angiogenese beteiligt sind<sup>132</sup>. In der vorliegenden Arbeit soll die Frage untersucht werden, ob humane PMN direkt einen Beitrag zur Induktion der entzündlichen Angiogenese leisten. Um die molekulare Basis für das proangiogenetische Potenzial humaner PMN zu untersuchen, wird zunächst ein *Microarray* angewendet um Angiogenese-relevante Gene in diesen Zellen zu identifizieren. Die Befunde werden mit Hilfe der RT-PCR bestätigt. Hierbei sind Zytokine von besonderem Interesse, da diese Faktoren bei der Induktion der Angiogenese von entscheidender Bedeutung sind. Aufgrund dessen wird die Expression von proangiogenetischen Zytokinen in PMN ebenso auf Proteinebene untersucht. Außerdem soll der Einfluss von Hypoxie auf die Zytokinsynthese analysiert werden, da im entzündlichen Gewebe in der Regel hypoxische Bedingungen vorliegen. Darüber hinaus soll die Frage geklärt werden, wie die Endothelzellen die PMN-vermittelten Signale umsetzen. Diese Fragestellung wird auf Genexpressionsebene mit Hilfe der *Microarray*-Technik und anhand der semiquantitativen RT-PCR-Technik analysiert. Die biologische Relevanz der Befunde soll in einem In vitro-Angiogenese-Assay untersucht werden. Abschließend soll die proangiogenetische Wirkung von PMN in einem In vivo-Angiogenese-Assay analysiert werden. Insgesamt werden von den geplanten Untersuchungen neue Erkenntnisse über Mechanismen erwartet, die im Rahmen entzündlicher Prozesse die Angiogenese vermitteln.

## 2.1. Material

### 2.1.1. Reagenzien

Acrylamid,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Coomassieblau, Formaldehyd, Natriumdodecylsulfat (SDS), Ponceau S, Tetramethylethyldiamin (TEMED), Tris, Trypanblau und Tween 20 stammten von der Firma Applichem, Darmstadt. Gelatine, L-Glutamin, Natriumpyruvat, wurden von der Firma Biochrom, Berlin bezogen. Das rekombinante humane VEGF stammte von der Firma Biomol, Hamburg und das rekombinante humane IL-8 von der Firma Biosource, Camarillo, USA. Von der Firma Genaxxon, Biberach stammte Borsäure, Diethylpyrokarbonat (DEPC), Ethidiumbromid, Genagarose und Xylenzyanol. Das Trockenmilchpulver wurde von der Firma Naturaflor, Zeven erworben. 6-Aminohexansäure, Ammoniumpersulfat, Ammoniumbikarbonat, Bromphenolblau, Cortisonazetat, fMLP, Glutaraldehyd, Glycin, Hepes, Imidazole, N-Azetylglukosamin, Natriumazid, Natriumorthovanadat, Percoll, Rinderserumalbumin (BSA), Toluidinblau und Triton X-100 wurden von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen. Sonstige Feinchemikalien und Lösungsmittel wurden in größtmöglicher Reinheit von den Firmen Merck, Darmstadt und Roth, Karlsruhe bezogen. Zur Zubereitung aller Puffer wurde destilliertes Wasser aus einer Millipore Milli Q-Wasserreinigungsanlage verwendet.

### 2.1.2. Puffer, Medien und Reagenzien für die Zellkultur

Von der Firma Biochrom, Berlin stammte Bikarbonat, fötales Kälberserum (FCS), Hank's Lösung, Instamedium, Kollagenase, Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline (PBS), Medium 199 mit HEPES, Medium 199 EARLE  $\text{NaHCO}_3^{++}$  (mit Glutamin), Penicillin, RPMI 1640<sup>++</sup> (mit Glutamin), Streptomycin und Trypsin. Fibronectin sowie das Supplement Pack als Medienzusatz für humane Endothelzellen wurde von der Firma Promocell, Heidelberg bezogen. DMSO, Fibrinogen und Thrombin wurde von der Firma Sigma, Deisenhofen erworben.

### 2.1.3. Antikörper

Der gegen das humane IL-8 gerichtete neutralisierende, monoklonale Antikörper von der Maus (Klon B-K8, IgG<sub>1</sub>) wurde von der Firma Biosource, Camarillo, USA

bezogen. Als Isotypkontrolle wurde der gegen das humane CD18 gerichtete monoklonale Antikörper 6.5 E von der Maus (IgG<sub>1</sub>) von Dr. M.K. Robinson verwendet (*Department of Medical Oncology, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA*). Der monoklonale anti-HIF-1 $\alpha$  Antikörper von der Maus (Klon 54, IgG<sub>1</sub>) stammte von BD Transduction Laboratories, San Jose, USA. Der polyklonale anti-Aktin Antikörper (I-19) vom Kaninchen sowie der anti-Midkine (MDK) Antikörper vom Kaninchen (H-65) wurden von der Firma Santa Cruz, Santa Cruz, USA bezogen. Als sekundäre Antikörper wurden der Peroxidase-gekoppelte anti-Maus IgG Antikörper von der Ziege sowie der Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen IgG Antikörper von der Ziege der Firma Sigma, Deisenhofen verwendet.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Humane PMN wurden aus heparinisiertem Blut (10 I.U./ml) von gesunden erwachsenen Probanden entsprechend der Richtlinien der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen. Nach Sedimentierung der Erythrozyten in Anwesenheit von 40% (v/v) autologem Plasma für 1 h, wurde das Leukozyten-reiche Plasma auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (55%/74%) geschichtet und bei 600 x g für 20 min zentrifugiert. Die PMN-enthaltende Schicht wurde gesammelt und in Dulbecco's PBS gewaschen. Anschließend wurden die PMN in PBS<sup>++</sup> in einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  PMN/ml suspendiert.

Isotones Percoll: Percoll mit 0,9 % NaCl

55%/74% Percoll: 55%/74% isotones Percoll in PBS

PBS<sup>++</sup>: PBS mit 0,1% Glukose und 0,25% BSA

### 2.2.2. Stimulierung humaner neutrophiler Granulozyten

Humane PMN ( $5 \times 10^6$ /ml) wurden für die jeweils angegebene Zeitdauer bei 37°C in PBS<sup>++</sup> in Gegenwart von 1,2 mM Ca<sup>2+</sup> und 1 mM Mg<sup>2+</sup> mit 100 nM fMLP stimuliert. Zur Stimulierung der PMN durch Hypoxie wurden die Zellen für die jeweils angegebene Zeitdauer bei 37°C in PBS<sup>++</sup> in einer Hypoxiekammer mit 99% N<sub>2</sub> und 1% O<sub>2</sub> begast. Die Kontrolle wurde bei 37°C unter Normoxie inkubiert. Die PMN-Überstände wurden durch Abzentrifugieren gesammelt und bei -80°C gelagert.

### 2.2.3. Isolierung und Kultivierung humaner Endothelzellen

Die Vene einer frischen humanen Nabelschnur wurde zweimal mit Hank's Lösung gespült und anschließend mit 0,2% Kollagenase in Hank's Lösung gefüllt. Nach Inkubation für 15 min bei 37°C wurden die Endothelzellen (*Human Vascular Endothelial Cells*, HUVEC) durch zweimaliges Spülen mit Hank's Lösung eluiert. Nach

zweimaligem Waschen mit Hank's Lösung wurde das HUVEC-Pellet in Isoliermedium suspendiert und anschließend in Fibronectin-beschichteten Flaschen ausgesät. Nach 2 Tagen wurde das Isoliermedium durch Kulturmedium ersetzt. HUVEC wurden im Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für alle Experimente wurden ausschließlich konfluente Zellen nach der ersten Passage verwendet. Hierzu wurden die HUVEC durch Trypsinierung geerntet und zweimal mit Hank's Lösung gewaschen.

Isoliermedium: 1,3% Instamedium, 0,22% Bikarbonat, 1 x Supplement Pack in H<sub>2</sub>O

Kulturmedium: Isoliermedium, ohne Amphotericin

Supplement Pack: rekombinanter humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (5 µg/ 500 µl), FCS (25 ml), Endothelzellen-Wachstumszusatz aus dem bovinem Hypothalamus (6 mg/2 ml), Gentamycin (25 mg/500 µl), Hydrocortison (500 µg/ 500 µl), Amphotericin (0,025 mg/500µl) für insgesamt 0,5 l Medium

Fibronectin: 10 µg/ml in H<sub>2</sub>O

#### **2.2.4. Stimulierung humaner Endothelzellen**

Zur Stimulierung wurden die HUVEC 24 h zuvor auf Mangelmedium gesetzt. Der entsprechende Stimulus wurde zum entsprechenden Zeitpunkt für die jeweils angegebene Dauer dem Medium beigefügt. Zur Stimulation wurde rekombinantes humanes IL-8 in einer finalen Konzentration von 5 ng/ml bzw. humanes rekombinantes VEGF in einer finalen Konzentration von 10 ng/ml oder der PMN-Überstand in einer Verdünnung von 1:5 verwendet. Unmittelbar nach der Stimulation wurden die HUVEC für die weitere Analyse durch Trypsinierung geerntet.

Mangelmedium: 1,3% Instamedium , 0,22% Bikarbonat , Gentamycin aus SupplementPack in H<sub>2</sub>O

### 2.2.5. Kultivierung und Differenzierung von HL-60-Zellen

Die humane promyeloische Zelllinie HL-60 (*Human Acute Myeloid Leukemia*, ACC 3, DSMZ, Braunschweig) wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in RPMI Medium 1640<sup>++</sup> in Gegenwart von 10% FCS, 50 E/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Differenzierung erfolgte nach Einstellung der Zelldichte auf 1 x 10<sup>6</sup>/ml durch Zusatz von 1,3% DMSO für 6 Tage.

### 2.2.6. mRNA-Isolation

Die mRNA-Isolierung wurde mit Hilfe eines RNA-Isolierungs-kits nach Angaben des Herstellers (Promega, Mannheim) unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt (für alle Puffer und Lösungen wurde DEPC Wasser 0,1% verwendet). Hierzu wurden 10<sup>6</sup> HUVEC bzw. 10<sup>7</sup> PMN in 600 µl Denaturierungslösung aus dem RNA-Isolierungs-Kit gelöst. Die Probe wurde mit 60 µl 2 M Natriumazetat (pH 4) versetzt und mit 600 µl der unteren organischen Phase des Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisches (99:24:1, pH 4,7) und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 4°C für 20 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die RNA-enthaltende wässrige Phase wurde gesammelt und der Rest verworfen. Zur Präzipitation der RNA wurde das gleiche Volumen an Isopropanol zugeben, für mindestens 5 min bei 20°C inkubiert und bei 4°C bei 10000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in jeweils 1 ml 70% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5-20 min bei Raumtemperatur getrocknet, um sämtliches Ethanol aus dem Pellet zu entfernen. Anschließend wurde das Pellet in 10–40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 1 µl Rnase Inhibitor, Promega, Mannheim versetzt. Zur Auflösung der tertiären Struktur wurde 10 min bei 55–60 °C inkubiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde am Photometer der Firma Pharmacia Biotech, Rochester, USA in einer Quarzküvette bei einer OD von 260 nm vorgenommen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

DEPC-H<sub>2</sub>O: 0,1% DEPC (Genaxxon, Biberach) in H<sub>2</sub>O

### 2.2.7. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des M-MLV-RT-Kits von Promega, Mannheim durchgeführt. Hierzu wurden 2-4 µg der jeweiligen mRNA 0,5 µg Oligo(dT)<sub>15</sub>-Primer beigefügt und 5 min bei 70°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt. Anschließend wurde die mRNA nach der Zugabe von 1x Reaktionspuffer, 10 mM dNTP-Mix, 20 U rRNasin, 200 U Reverse Transkriptase, Promega, Mannheim in DEPC-H<sub>2</sub>O für 1 h bei 37°C in cDNA transkribiert.

dNTP-Mix: 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in H<sub>2</sub>O (Promega, Mannheim)

1x Reaktionspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT

### 2.2.8. Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) Amplifikation wurde mit spezifischen Primer Sets von der Firma Metabion, München und 1x Reaktionspuffer, 0,25 U Taq DNA Polymerase, Promega, Mannheim in einem Thermocycler von Biometra, Göttingen bzw. Eppendorf, Hamburg durchgeführt (siehe Tabelle 2). Das Primerdesign erfolgte nach Vorlagen aus entsprechenden Publikationen oder mit Hilfe folgender Software ([bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/epimer3](http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/epimer3) bzw. [www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch](http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch)). Die spezifischen Primer wurden in einer Konzentration von 0,2 µM angewendet. Im Anschluß an die jeweilige PCR-Reaktion erfolgte eine Elongation der PCR-Produkte für 5 min bei 72 °C.

1x Reaktionspuffer: 10mM Tris-HCl pH 9, 50mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100

**Tabelle 2: Primersequenzen und PCR-Bedingungen.** Inkrement: Annealing erfolgte ansteigend in 0,5°C Schritten pro Zyklus; Us: Upstream Primer; Ds: Downstream Primer.

Gen	Primer	Produkt	Bedingungen (Zyklen)
β-Aktin	Us: TGTCCACCTTCCAGCAGATGTG Ds: AGTCCTCGGCCACATTGTGAAC	300 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 21 Zyklen
bFGF	Us: AAGAGCGACCCTCACATCAAGC Ds: ATAGCTTTCTGCCAGGTCCTG	275 bp	Je 1 min 94°C, 57°C, 72°C, 30 Zyklen
Ephrin A2	Us: GCGTGAAGAGCTGGAAC Ds:TACGCCGTCTACTGGAAC	294 bp	Je 1 min 94°C, 55°C, 72°C, 40 Zyklen

Ephrin B2	Us: GAAGGGACTCCGTGTGGAAG Ds: CTGGTTTGGCACAGTTGAGG	303 bp	11 Zyklen: 1 min 94°C, 2 min Inkrement: 59–64°C, 1 min 72°C; 31 Zyklen: Je 1 min 94°C, 60°C, 72°C
erb-B2	Us: GGAAGTACACGATGCGGAGA Ds: GCCATCACGTATGCTTCGTC	277 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 35 Zyklen
ets-1	Us: GAATGACTACCCCTCGCTCA Ds: TTGGTCCACTGCCTGTGTAG	398 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 25 Zyklen
HPSE	Us: GTGGGCACCAAGGTGTTAAT Ds: TTCCATTAAGGTGGCAAGG	300 bp	Je 1 min 94°C, 57°C, 72°C, 28 Zyklen
HIF-1 $\alpha$	Us: TCCTTCTCTTCTCCGCGTGT Ds: GTGGCAACTGATGAGCAAGC	231 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 26 Zyklen
IL-8	Us: GGACAAGAGCCAGGAAGAAACC Ds: CTTCAAAAATTCTCCACAACCC	335 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 27 Zyklen
MDK	Us: AATGCTCAGTGCCAGGAGAC Ds: AGCTTCCCAGAATCCCTTGT	299 bp	Je 1 min 94°C, 61°C, 72°C, 40 Zyklen
MMP-9	Us: CTCGAACTTTGACAGCAGCCACAG Ds: GCCATTCACGTCGTCCTTATG	187 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 26 Zyklen
Restin	Us: TCTTGGGGAGACCGACTTTG Ds: TGCTGCTGCTTCTCCTTACG	399 bp	Je 1 min 94°C, 60°C, 72°C, 32 Zyklen
TGF $\beta$ -R2	Us: CCTAACCTGCTGCCTGTGTG Ds: CGTTGTCCTTCATGCTTTTCG	302 bp	Je 1 min 94°C, 60°C, 72°C, 32 Zyklen
TGF $\beta$ -R3	Us: AGTGTGTGCCTCCTGACGAA Ds: ACTTGCTGCCTTCTGCTGT	298 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 28 Zyklen
TGF- $\beta$ 1	Us: GTACCTGAACCGTGTGCT Ds: GAACCCGTTGATGTCCACTT	291 bp	Je 1 min 94°C, 57°C, 72°C, 27 Zyklen
THBS-3	Us: GGCTGTGACCCAACTCCAT Ds: TTCTTGATCCCATCCCCATC	401 bp	11 Zyklen: 1 min 94°C, 2 min Inkrement; 55–60°C, 1 min 72°C; 28 Zyklen: Je 1 min 94°C, 58°C, 72°C
TIMP-2 <sup>138</sup>	Us: CTCGGCAGTGTGTGGGGT Ds: CGAGAAACTCCTGCTTGGGG	364 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 25 Zyklen
VE-Cadherin	Us: ATGCTCCTCGCCACATC Ds: ACAACCGATGCGTGAAC	450 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 35 Zyklen
VE-Cadherin	Us: ACGAAAAGCTTGGACCGAGA Ds: TCAATGGTGAAAGCGTCCTG	293 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 35 Zyklen
VE-Cadherin <sup>139</sup>	Us: ACCGGATGACCAAGTACAGC Ds: ACACACTTTGGGCTGGTAGG	596 bp	Je 1 min 94°C, 59°C, 72°C, 35 Zyklen
VEGFA	Us: AGAAGGAGGAGGGCAGAATC Ds: TTGGTGAGGTTTGTATCCGC	250 bp	Je 1 min 94°C, 57°C, 72°C, 31 Zyklen

### 2.2.9. DNA-Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV Licht analysiert. Als DNA-Größenmarker wurde eine 100 bp-Leiter von Fermentas, St. Leon-Rot verwendet.

Agarosegel: 1% Agarose in 1x TBE-Puffer, 0,002% Ethidiumbromid

10x TBE-Puffer: 10,8% Tris pH 8, 5,5% Borsäure, 0,93% EDTA in H<sub>2</sub>O

5x DNA-Ladepuffer: 50% Glycerin, 5x TBE-Puffer, Bromphenolblau und Xylenzanol

### 2.2.10. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die PMN-Suspension wurde unmittelbar nach der Stimulation bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet ( $2 \times 10^6$ /Probe) wurde in 40 µl 1x Lämmli-Puffer aufgenommen und für 5 min bei 100°C inkubiert. Nicht gelöstes Material wurde durch zentrifugieren abgetrennt. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Gels eingebracht. In einer Tasche wurde ein entsprechender Proteinstandard aufgetragen. Die Gelelektrophorese von Proteinen wurde in SDS-Polyacrylamid-Gelen unter denaturierenden Bedingungen in einer Elektrophorese-apparatur der Firma BioRad, München durchgeführt. Die Konzentration der Trenngele betrug 10% Acrylamid (für den Nachweis von HIF-1 $\alpha$ ), bzw. 14% Acrylamid (für den Nachweis von MDK). Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung bei 100 V für 4 h in 1x Elektrophoresepuffer. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mittels Westernblot analysiert.

Proteinstandard: 120 kDa Proteinmarker ( $\beta$ -Galaktosidase) von Sigma, Deisenhofen sowie der HMW (220 kDa Myosin, 170 kDa  $\alpha$ -2-Makroglobulin, 116 kDa  $\beta$ -Galaktosidase, 76 kDa Transferrin, 53 kDa Glutamatdehydrogenase) bzw. LMW-Marker (97 kDa Phosphorylase b, 66 kDa Albumin, 45 kDa Ovalbumin, 30 kDa Carboanhydrase, 20,1 kDa Trypsininhibitor, 14,4 kDa  $\alpha$ -Laktalbumin) von Amersham, New Jersey, USA verwendet

3x Lämmli-Puffer: 200 mM Tris/HCl (pH 7,5), 6% SDS, 30% Glycerol, 18%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,02% Bromphenolblau in H<sub>2</sub>O

10x Elektrophoresepuffer: 1,92 M Glycin, 0,1 % SDS, 250 mM Tris in H<sub>2</sub>O

SDS-Trenngel: 10% bzw. 14% Acrylamid, 0,375 M Tris/HCl (pH 8,9), 0,1% SDS, 0,05% Ammoniumpersulfat, 0,05% TEMED in H<sub>2</sub>O

SDS-Sammelgel: 3% Acrylamid, 125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,05% Ammoniumpersulfat, 0,05% TEMED in H<sub>2</sub>O

### 2.2.11. Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden die Proteine mit Hilfe der Westernblot-Technik auf eine Nitrocellulose-Filtermembran übertragen um einen immunologischen Nachweis von Proteinen durchführen zu können. Der Transfer erfolgte mit Hilfe einer „*Semidry*“ Westernblot-Apparatur von Biotec-Fisher, West Perth, Australien bei 200 mA für 1 h, oder in der „Mini Trans-Blot“ Elektrophoresekammer von Biorad, München für 1 h bei 400 mA bzw. über Nacht bei 90 mA. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung gefärbt.

### 2.2.12. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 1 h mit 5% Trockenmilchpulver für den HIF-1 $\alpha$  Nachweis bzw. mit 1% BSA für den MDK-Nachweis in TBS inkubiert. Anschließend wurde für mindestens 1 h mit dem ersten Antikörper in 5% Trockenmilchpulver bzw. 0,1% BSA in TBS inkubiert. Hierbei wurde der HIF-1 $\alpha$ -Antikörper in einer Konzentration von 1:250 und der MDK-Antikörper in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt. Es folgten 4 Waschschrte in TBS-T für jeweils 15 min um unspezifisch an die Membran gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde für 1 h mit dem Zweitantikörper inkubiert. Zur HIF-1 $\alpha$ -Detektion wurde hierbei der Peroxidasegekoppelte anti-Maus Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 in 5% Trockenmilch in TBS verwendet und zur MDK-Detektion der Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen Antikörper 1:4000 in 0,1% BSA in TBS eingesetzt. Zuletzt erfolgten nochmals 4 Waschschrte für jeweils 15 min in TBS-T. Als Nachweissystem wurde

ein Chemilumineszenz-Detektions-Reagenz von Applichem, Darmstadt verwendet. Zur Kontrolle wurde ein anti-Aktin Antikörper verwendet. Für die nochmalige Verwendung wurde die Membran mit einer Strippinglösung bei 50°C für 30 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend mit TBS-T gewaschen.

TBS: 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,3 %Tris Base in H<sub>2</sub>O

TBS-T: TBS mit 0,1% Tween 20

Strippinglösung: 62,5 mM Tris (pH 6,7), 2% SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol

### **2.2.13. Bestimmung der Konzentration von Zytokinen**

Die Konzentrationen für bFGF, IL-8, TGF-β1 und VEGF im Überstand von humanen PMN wurden in Doppelbestimmungen mit Hilfe von ELISA-Kits der Firma Biosource, Nivelles, Belgien nach Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Zum Einsatz kamen der bFGF, IL-8, TGF-β1 und VEGF-ELISA-Kit (KHG0022, KHC0082, KAC1688 und KHG0112). Die Absorption wurde bei 450 nm mit einem Spektrometer der Firma Tecan, Maennedorf, Schweiz gemessen und die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Microsoft Excel und Sigma Plot (Systat Software, Erkrath).

### **2.2.14. Genarray für Angiogenese-relevante Gene**

Zur Identifizierung von Angiogenese-relevanten Faktoren in humanen PMN wurde der GE-Array Kit (HS-009N-4) für humane Angiogenese-relevante Gene von Superarray, Bethesda, USA verwendet. Eine komplette Auflistung aller Gene ist im Internet unter [www.superarray.com](http://www.superarray.com) zu finden. Die mRNA wurde wie unter 2.2.6. beschrieben isoliert. Die Arrays wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Probensynthese erfolgte für 2 h bei 42°C unter Verwendung von mRNA (2-4 µg), 100 U Reverse Transkriptase, 8 U RNase Inhibitor (Promega, Mannheim), Biotin-16-dUTP (Roche, Mannheim), dNTP Mix (Promega, Mannheim) und einem Primer-Mix von Superarray, Bethesda, USA. Während dessen erfolgte für 1 h bei 60°C eine

Prähybridisierung mit GEAhyb-Hybridisierungslösung, die 100 µg/ml denaturierte Lachs-Sperma-DNA von Stratagen, La Jolla, USA enthielt. Die Membranen wurden über Nacht bei 60°C mit den denaturierten biotinylierten DNA-Proben hybridisiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Membranen für 10 Minuten mit Alkaline Phosphatase-konjugiertem Streptavidin inkubiert und die Genexpression mit Hilfe von Chemilumineszenz detektiert. Hierzu wurde das Alkaline Phosphatase Substrat CDP-Star, Superarray, Bethesda, USA verwendet. Die Daten wurden mit Hilfe der GEArray-Analysierungs-Programme ScanAlyze (Eisen-Software, USA) und GeArray-Analyzer Software (BioLogic, USA) analysiert. Die β-Aktin Expression wurde zur Normalisierung verwendet.

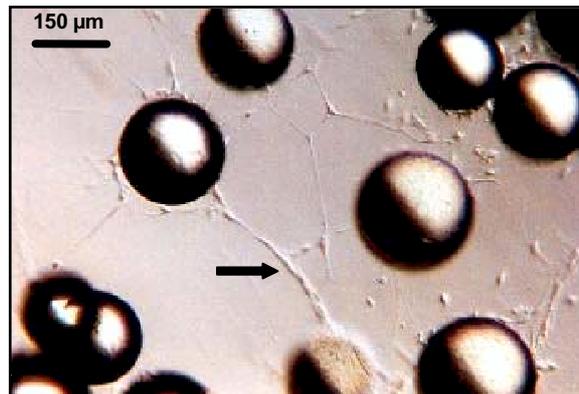
### 2.2.15. In vitro-Angiogenese-Modell

Frisch isolierte HUVEC wurden unmittelbar nach der Isolierung ohne weitere Kultivierung verwendet. HUVEC ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden mit 25 mg Fibronectin-beschichteten Biosilon *Microbeads* von Nunc, Roskilde, Dänemark für 4 h in 1 ml Medium 199 mit HEPES unter ständiger Rotation inkubiert. Anschließend wurden die HUVEC bis zum Erreichen der Konfluenz auf den *Microbeads* unter statischen Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in Kulturmedium kultiviert. Der Assay wurde in 24-Loch Platten von Nunc, Roskilde, Dänemark in Doppelansätzen durchgeführt. Hierzu wurden die HUVEC-beschichteten *Microbeads* in eine dreidimensionale Fibrinmatrix eingebettet. Die Angiogenese wurde durch Zugabe von Überständen von fMLP-aktivierten PMN (100 µl) siehe 2.2.2. oder des proangiogenetischen Faktors VEGF (finale Konzentration 100 ng/ml) induziert. Der neutralisierende IL-8-Antikörper und die Isotypkontrolle wurden in einer finalen Konzentration von 400 ng/ml beigefügt. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die kapillären Strukturen bei 10-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt. Eine Aussprossung wurde als kapilläre Struktur definiert, wenn ihre Länge dem doppelten Durchmesser eines *Microbeads* entsprach (300 µm). Aussprossungen, die zwei *Microbeads* verbanden, wurden zweimal gezählt.

Medium 199 EARLE (HEPES): mit Supplement Pack der Firma Promocell,  
Heidelberg

Fibronektin: 10 mg/ml in PBS

Fibrinmatrix pro Ansatz: 400 µl Medium 199 EARLE NaHCO<sub>3</sub><sup>++</sup> mit 2% FCS,  
1 mg/ml Fibrinogen und 54 U Thrombin



**Abbildung 4: Proangiogenetischer Effekt von PMN.** Lichtmikroskopische Aufnahme von kapillären Strukturen im in vitro-Angiogenese-Assay 3 Tage nach Induktion der Angiogenese durch PMN-Überstand. Der Länge des Größenmarkers entspricht 150 µm. Pfeil: Kapilläre Struktur.

### 2.2.16. In vivo-Angiogenese-Modell

Als in vivo-Angiogenese Modell wurde der *Chorioallantoic-Membrane* (CAM)-Assay gewählt. Hierzu wurden befruchtete Hühnereier von der Virologie des Instituts für Geflügelkrankheiten der LMU München, Sonnenstrasse 18, 85764 Oberschleißheim bezogen und 10 Tage bei 37°C in humider Atmosphäre bei leichter Rotation bebrütet. Am Tag 10 wurden diese zunächst auf Vitalität der Hühnerembryos überprüft. Anschließend wurde die Eischale mit 70% Ethanol desinfiziert. An einer blutgefäßfreien Stelle und einer Position über dem Luftsack wurde jeweils ein Loch durch die Eischale gebohrt ohne die CAM dabei zu verletzen. Durch Ansaugen am Loch über dem Luftsack mit Hilfe eines Pasteurpipettenhütchens wurde die CAM an der Stelle des zweiten Loches von der Schale gelöst und nach unten gezogen. Dort wurde ein Fenster in die Eischale eingefräst und ein steriles Filterplättchen mit einem Durchmesser von 6 mm (GB 002, Gelblotting Papier von der Firma Whatman, Dassel) mit 10 µl des angiogenetischen Agens an einer blutgefäßfreien Stelle der CAM platziert. Zuvor wurde das sterile Filterplättchen mit Cortisonazetat (3 mg in

100% Ethanol) durchtränkt und 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Fenster und das Loch verschlossen und das präparierte Ei bei 37°C in humider Atmosphäre bebrütet. Nach 3 Tagen wurde der Filter mit der CAM großzügig ausgeschnitten, zweimal mit PBS gewaschen und unter dem Mikroskop bei 8-facher Vergrößerung fotografiert. Die Auswertung wurde mit UTHESCA Image Tool, San Antonio, USA durchgeführt. Hierzu wurden die Abzweigungen pro Aufnahme gezählt.

### **2.2.17. Statistische Analyse**

Die Statistische Analyse wurde mit Hilfe des *Student's t-Test* (Sigma Plot) durchgeführt. Es wurde vermerkt wenn die Statistische Analyse mit Hilfe des *Student's Paired t-Test* (Sigma Plot) durchgeführt wurde. Falls  $p < 0,05$  wurde das Ergebnis als signifikant bewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Das proangiogenetische Potenzial von humanen neutrophilen Granulozyten

##### 3.1.1. *Microarray* für Angiogenese-relevante Gene in humanen neutrophilen Granulozyten

Die Untersuchung der molekularen Basis des proangiogenetischen Potenzials von humanen PMN wurde mit Hilfe eines *Microarrays* für Angiogenese-relevante Gene vorgenommen. Hierzu wurden humane PMN verwendet, die frisch aus dem Blut gesunder Spender isoliert wurden. Unter 96 Angiogenese-relevanten Genen wurden insgesamt 28 Gene identifiziert, die in humanen PMN exprimiert werden (Tabelle 3). Darunter waren die Zytokine IL-8, GRO- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TNF $\alpha$  und VEGF, deren Expression in humanen PMN bereits beschrieben worden ist<sup>15,107-109,140</sup>. Darüber hinaus konnte erstmals die Expression des proangiogenetisch wirksamen Zytokins MDK in humanen PMN nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich die Expression der drei Angiogenese-relevanten Transkriptionsfaktoren erb-B2, ets-1 und HIF-1 $\alpha$  in humanen PMN. HIF-1 $\alpha$  wurde in humanen PMN bereits beschrieben<sup>141</sup>, jedoch ist dies der erste Nachweis für die Expression von erb-B2 und ets-1 auf mRNA-Ebene in humanen PMN. Unter den Zelloberflächenrezeptoren erfolgte die Detektion des bereits bekannten Mitglieds der TGF Rezeptor Familie T $\beta$ RI<sup>142</sup>. Des Weiteren wurden T $\beta$ RII und T $\beta$ RIII in humanen PMN nachgewiesen werden. Außerdem konnte die Expression der bereits in PMN bekannten Adhäsionsmoleküle Integrin  $\alpha$ 5, Integrin  $\beta$ 3, PECAM-1 und THBS-1 gezeigt werden<sup>143-146</sup>. Auch die Expression des zuvor in PMN unbekanntem Gens THBS-3 wurde mittels *Microarray* nachgewiesen. Zudem wurde im *Microarray* die Expression der vier bereits in humanen PMN bekannten Enzyme COX-2, HPSE, MMP-9 und uPA detektiert<sup>58,112,113,147</sup>. Bereits in der Literatur beschriebene und hier nachgewiesenen Gene waren darüber hinaus TIMP-1 und Chromogranin A (CHGA)<sup>148,149</sup>. Zusätzlich konnte die Expression der vier weiteren neuen Genen TIMP-2, Ephrin A2, Ephrin B2 und Restin unter Verwendung des *Microarrays* gezeigt werden.

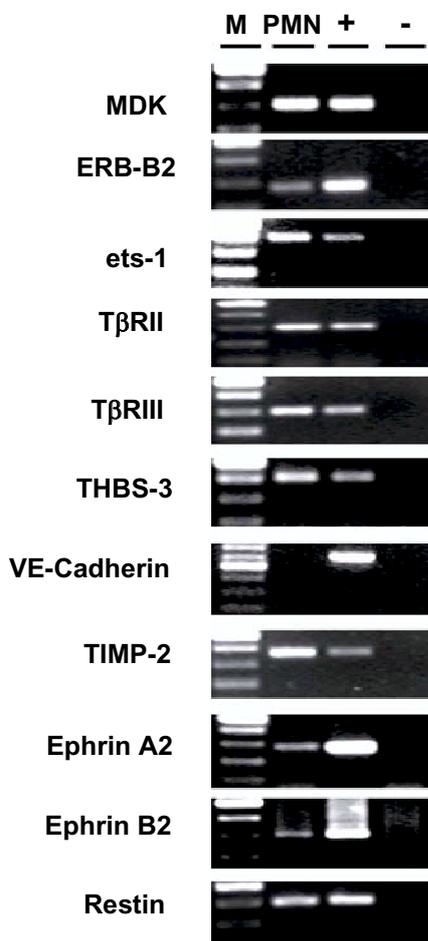
**Tabelle 3: Angiogenese-relevante Gene in humanen PMN.** Detektion Angiogenese-relevanter Gene im *Microarray*. Das Ergebnis ist repräsentativ für 4 unabhängige Experimente mit humanen PMN von 4 verschiedenen Spendern. Es wurden *Microarrays* mit 2 verschiedenen Chargennummer verwendet (1906 und 0507). Die Signale wurden als positiv definiert, wenn sie in mindestens 2 der 4 *Microarrays* nachgewiesen wurden und hierbei in jeder Chargennummer mindestens einmal detektiert werden konnten. \* Bisher in humanen PMN unbekannte Gene.

Gene	Abk.	Andere Bezeichnung	Ref.
<b>Zytokine</b>			
<i>Growth Related Oncogene <math>\alpha</math></i>	Gro- $\alpha$	CXCL1	140
Interleukin 8	IL-8	CXCL8	15
*Midkine	MDK	<i>Neurite Growth-Promoting Factor-2</i> (NEGF-2)	
<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>1</i>	TGF- $\beta$ 1		109
Tumornekrose Faktor $\alpha$	TNF $\alpha$		13
<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>	VEGF		107
<b>Transkriptionsfaktoren</b>			
*erb-B2 Onkogen	erb-B2	neu, her-2	
*ets-1 Onkogen	ets-1		
<i>Hypoxia-Inducible Factor 1, <math>\alpha</math> Untereinheit</i>	HIF-1 $\alpha$		141
<b>Zytokin-Rezeptoren</b>			
<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math> Receptor 1</i>	TGF $\beta$ R1		142
* <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math> Receptor 2</i>	TGF $\beta$ R2		
* <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math> Receptor 3</i>	TGF $\beta$ R3	$\beta$ -Glycan	
<b>Adhäsionsmoleküle</b>			
Integrin $\alpha$ 5 Untereinheit	ITGA5	CD49e	143
Integrin $\beta$ 3 Untereinheit	ITGB3	CD61	144
<i>Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>	PECAM-1	CD31	145
Thrombospondin 1	THBS-1		146
* Thrombospondin 3	THBS-3		
*VE-Cadherin		Cadherin 5	
<b>Enzyme</b>			
Cyclooxygenase 2	COX-2	Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase 2	147
Heparanase	HPSE		58
Matrix Metalloproteinase 9	MMP-9	Gelatinase Typ V, Kollagenase	112
Plasminogen Aktivator, <i>Urinary</i>	uPA	Urokinase, PLAU	113
<b>Andere</b>			
Chromogranin A	CHGA		149
*Ephrin A2	EFNA2		
*Ephrin B2	EFNB2		
*Restin	RSN	Cytoplasmic Linker Protein 170 (CLIP 170)	
<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1</i>	TIMP-1		148
* <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2</i>	TIMP-2		

Somit wurde mit Hilfe der *Microarray*-Technik die Expression von insgesamt 28 Genen nachgewiesen. Unter diesen Genen konnten 11 Angiogenese-relevante Gene erstmals in humanen PMN identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um MDK, erb-B2, ets-1, T $\beta$ R2, T $\beta$ R3, THBS-3, VE-Cadherin, TIMP-2, Ephrin A2, Ephrin B2 und Restin.

### 3.1.2. Nachweis der neu identifizierten Gene auf mRNA-Ebene mit Hilfe der RT-PCR

In weiterführenden Untersuchungen sollte die Expression der mit Hilfe der *Microarray*-Technik neu identifizierten Angiogenese-relevanten Gene (siehe Tabelle 3) mit einer unabhängigen Methode verifiziert werden. Hierzu wurde mit Hilfe der RT-PCR-Technik die mRNA-Expression der 11 neu identifizierten Gene mit Hilfe spezifischer Primer analysiert. Für die Experimente wurden humane PMN von insgesamt drei verschiedenen gesunden Spendern verwendet. Es zeigte sich, dass mit Ausnahme von VE-Cadherin die Expression aller Gene in humanen PMN bestätigt werden konnte (Abbildung 5).



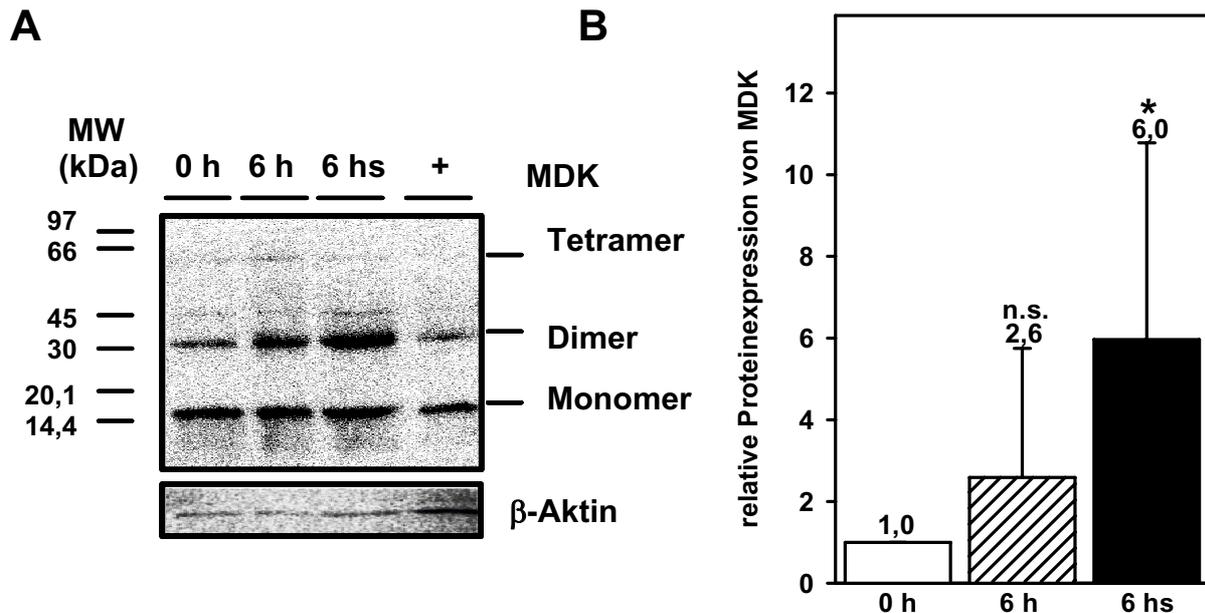
**Abbildung 5: RT-PCR von den in humanen PMN neu entdeckten Genen.** M, Marker; PMN, mRNA aus PMN; +, Positivkontrolle; -, Negativkontrolle. Als Negativkontrolle (-) wurde die PCR ohne *Template* durchgeführt. Als Positivkontrolle dienen HL-60 Zellen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit humanen PMN, die von drei verschiedenen Spendern gewonnen wurden. Die von VE-Cadherin dargestellte PCR wurde mit Primerpaar 3 (siehe Tabelle 2) durchgeführt, als Positivkontrolle wurden hierbei humane Endothelzellen verwendet. Die PCR mit Primerpaar 1 und 2 lieferte für VE-Cadherin ebenfalls ein negatives Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Im Falle von VE-Cadherin konnte die entsprechende mRNA in humanen PMN mit drei verschiedenen spezifischen Primerpaaren nicht nachgewiesen werden. Hierbei zeigte die Positivkontrolle, die an HUVEC durchgeführt wurde, dass die Primerpaare

funktionell waren. Dies deutet darauf hin, dass der *Microarray* für VE-Cadherin ein falsch positives Ergebnis lieferte. Zusammengefasst wurden 28 Angiogenese-relevante Gene in humanen PMN mit Hilfe der *Microarray*-Technik detektiert. Unter den neu identifizierten Gene waren insgesamt zehn Gene, deren Expression mit Hilfe der RT-PCR-Technik bestätigt werden konnte. Hierzu zählen MDK, erb-B2, ets-1, T $\beta$ RII, T $\beta$ RIII, THBS-3, Ephrin A2, Ephrin B2, Restin, und TIMP-2. Die Expression von VE-Cadherin konnte mit Hilfe der RT-PCR nicht bestätigt werden.

### 3.1.3. Expression von Midkine in humanen neutrophilen Granulozyten

Zytokine sind bei der Induktion der entzündlichen Angiogenese von besonderem Interesse. Daher sollte die Expression des in humanen PMN neu entdeckten Zytokins MDK in weiterführenden Untersuchungen auf Proteinebene mit Hilfe der Westernblot-Technik analysiert werden. Hierzu wurden humane PMN verwendet, die frisch aus dem Blut gesunder Spender isoliert wurden. Die Expression von MDK wurde in frisch isolierten PMN ohne weitere Inkubation sowie nach Inkubation für 6 h bei 37°C mit bzw. ohne Stimulation durch das bakterielle Tripeptid fMLP analysiert. Die Untersuchung ergab, dass MDK in frisch isolierten PMN in Form des Monomers und des Dimers sowie in geringem Umfang auch als Tetramer auf Proteinebene exprimiert wurde (Abbildung 6A). Es zeigte sich, dass die Proteinexpression von MDK nach fMLP-vermittelter Aktivierung von humanen PMN für 6 h im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zunahm. Hierbei konnte insbesondere die Expressionszunahme des mit Hilfe einer Transglutaminase kovalent verknüpften Dimers nachgewiesen werden, welches als biologisch funktionelle Variante gilt<sup>150</sup>. Zur Kontrolle wurde die  $\beta$ -Aktin-Expression auf Proteinebene analysiert. Die Darstellung der relativen optischen Dichte der erhaltenen Proteinbanden zeigt für die dimere Form von MDK im Vergleich zum 0 h-Wert eine signifikante Expressionszunahme nach fMLP-Stimulation für 6 h um den Faktor 6,0. Nach 6 h ohne Stimulation der PMN kam es zu einer nicht signifikanten Expressionszunahme um den Faktor 2,6. Somit konnte insgesamt nachgewiesen werden, dass das Zytokin MDK nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene in humanen PMN exprimiert wird. Die Ergebnisse legen darüber hinaus den Schluss nahe, dass die Rezeptor-vermittelte Aktivierung humaner PMN mit dem bakteriellen Tripeptid zu einer Expressionszunahme von MDK in diesen Zellen führt.



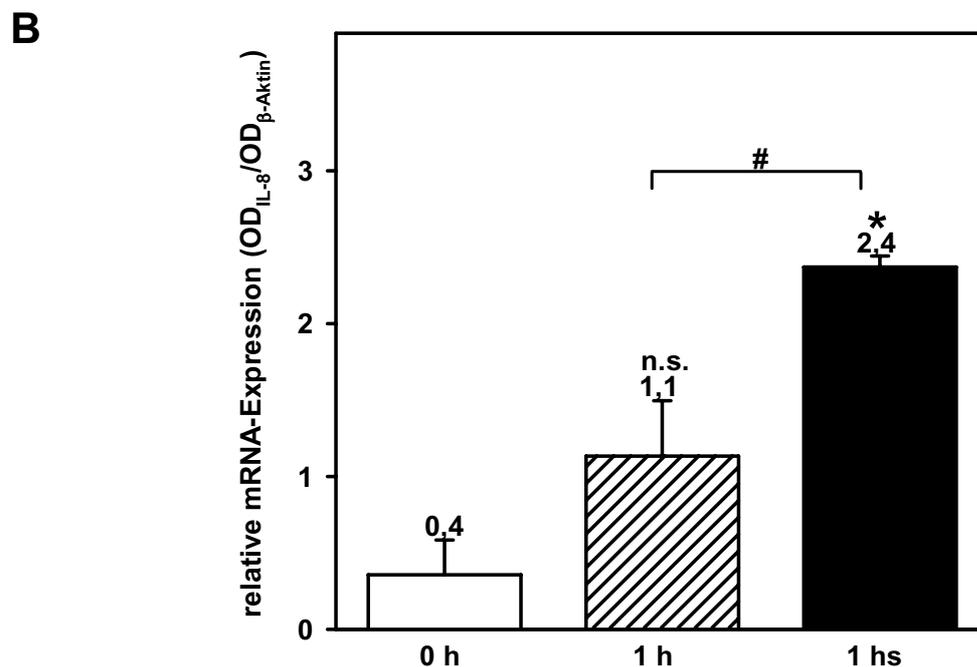
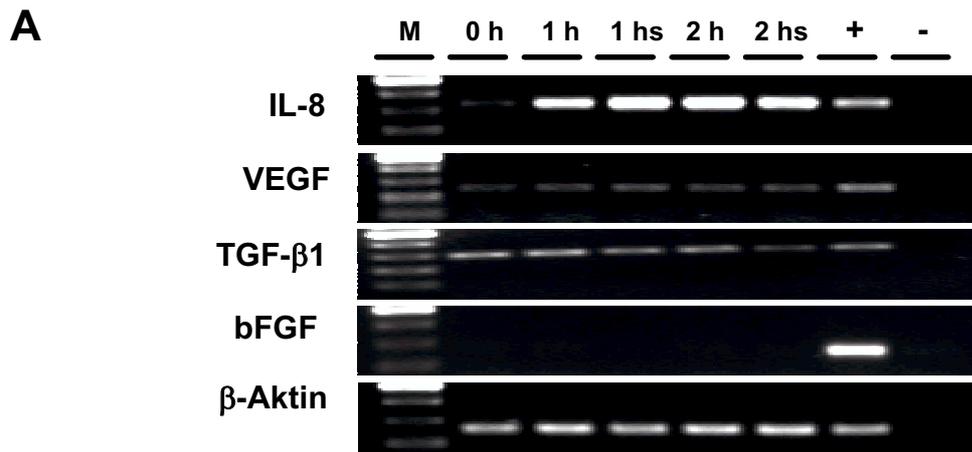
**Abbildung 6: Nachweis von Midkine auf Proteinebene.** Humane PMN ( $2 \times 10^6$  PMN/Probe) wurden ohne weitere Inkubation (0 h) sowie nach Inkubation für 6 h bei 37°C ohne Stimulation (6 h) bzw. nach Stimulation mit 100 nM fMLP verwendet (6 hs). Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines anti-MDK Antikörpers (H-65) und eines anti-Aktin Antikörpers (I-19) von der Firma Santa Cruz. A: Als Positivkontrolle (+) dienten HELA-Zellen. Die Expression erfolgte als Monomer (ca. 15 kDa), als Dimer (ca. 30 kDa) und als Tetramer (ca. 60 kDa); MW, Molekulargewicht. B: Dargestellt ist die relative Proteinexpression von MDK als OD der dimeren Form von MDK bezogen auf Expression von  $\beta$ -Aktin ( $OD_{MDK}/OD_{\beta Aktin}$ ).  $n = 4$ ; \*  $p < 0,05$  und n.s., nicht signifikant versus 0 h-Wert.

### 3.2. Die Induktion Angiogenese-relevanter Faktoren in humanen neutrophilen Granulozyten durch Stimulation mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Rezeptor-vermittelte Aktivierung humaner PMN mit bakteriellen Tripeptid fMLP die Proteinexpression des neu identifizierten Zytokins MDK induzierte, sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Expression weiterer proangiogenetisch wirksamer Zytokine in humanen PMN durch fMLP reguliert wird.

#### 3.2.1. Regulation von Angiogenese-relevanten Genen in humanen neutrophilen Granulozyten

Zunächst wurde die mRNA-Expression der hochwirksamen proangiogenetischen Faktoren IL-8, VEGF, TGF- $\beta$ 1 und bFGF in humanen PMN mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR untersucht.



**Abbildung 7: Analyse der mRNA-Expression von IL-8, VEGF, TGF-β1 und bFGF nach Stimulation humaner PMN mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP.** Semiquantitative RT-PCR für IL-8, VEGF, TGF-β1 und bFGF. Humane PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden ohne weitere Inkubation (0 h), nach Inkubation für 1 h bzw. 2 h ohne Stimulation (1 h, 2 h) bzw. nach Stimulation mit 100 nM fMLP verwendet (1 hs, 2 hs). Als Negativkontrolle (-) wurde die PCR mit mRNA durchgeführt. Als Positivkontrolle (+) dienten HUVEC bzw. differenzierte HL-60-Zellen. Als Kontrolle wurde β-Aktin verwendet. A: Agarosegel der PCR-Produkte;  $n = 3$ . B: Semiquantitative Analyse der IL-8 mRNA Expression mit Hilfe der Berechnung der relativen OD von IL-8 bezogen auf die OD der mRNA von β-Aktin ( $OD_{IL-8}/OD_{\beta-Aktin}$ ). Dargestellt ist das Ergebnis für frisch isolierte PMN (0 h), für PMN nach 1 h ohne Stimulation (1 h) bzw. nach fMLP-Stimulation für 1 h (1 hs).  $n = 4$ ; \*  $p < 0,05$  und n.s., nicht signifikant versus 0 h-Wert; #  $p < 0,05$ .

Für diese Untersuchungen wurden PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) verwendet, die frisch aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert wurden und bei 37°C für 1 h bzw. 2 h

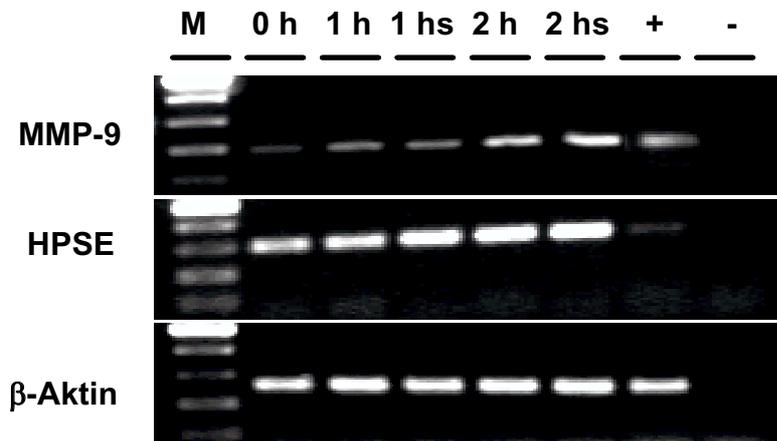
unstimuliert blieben oder mit 100 nM fMLP stimuliert wurden. Mit Hilfe von spezifischen Primerpaaren wurde anhand der semiquantitativen RT-PCR-Technik die Regulation der mRNA-Expression dieser proangiogenetischen Faktoren ermittelt. So konnte nachgewiesen werden, dass in unstimulierten humanen PMN eine basale Expression von IL-8 auf mRNA-Ebene vorlag. Die Expression der IL-8 mRNA stieg nach Aktivierung der PMN für 1 h mit fMLP an (Abbildung 7A und B). Hier ergab die semiquantitative Analyse eine sechsfache signifikante Steigerung der relativen IL-8 mRNA-Expression ( $OD_{IL-8}/OD_{\beta\text{-Aktin}}$ ) von  $0,4 \pm 0,2$  in unstimulierten, frisch isolierten PMN auf  $2,4 \pm 0,1$  nach fMLP-Stimulierung für 1 h. Auch bei der unstimulierten Kontrolle kam es zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der relativen IL-8 mRNA-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auf  $1,1 \pm 0,4$ . Darüber hinaus zeigte sich, dass frisch isolierte humane PMN auch eine basale mRNA-Expression von VEGF und TGF- $\beta$ 1 aufwiesen. Die Expression wurde jedoch nach fMLP-Stimulierung für 1 h bzw. 2 h nicht gesteigert (Abbildung 7A).

Darüber hinaus wurde die Expression des proangiogenetischen Faktors bFGF untersucht. Zwar hatte die Expressionsanalyse mit Hilfe der *Microarray*-Technik keinen Nachweis von bFGF in frisch isolierten PMN ergeben. Es sollte nun jedoch untersucht werden, ob die Stimulation der humanen PMN mit fMLP möglicherweise die Expression von bFGF induzierte. Die RT-PCR-Analyse ergab jedoch, dass auch nach Stimulation der humanen PMN keine Expression von bFGF auf mRNA-Ebene nachweisbar war. Dies zeigt, dass die Expression der proangiogenetischen Zytokine IL-8, VEGF, bFGF und TGF- $\beta$ 1 durchaus unterschiedlich reguliert wird. Während VEGF und TGF- $\beta$ 1 in unstimulierten PMN auf mRNA-Ebene exprimiert wurden, ließ sich keine Induktion der mRNA nach Stimulation mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP nachweisen. Demgegenüber konnte die basale Expression der IL-8 mRNA nach Stimulation gesteigert werden, während eine Expression von bFGF weder in frisch isolierten, noch in stimulierten PMN nachgewiesen werden konnte.

Da im Mittelpunkt dieser Arbeit die Frage stand, ob humane PMN ein proangiogenetisches Potenzial haben, das im Kontext einer entzündlichen Reaktion aktiviert wird, sollte nachfolgend untersucht werden, ob neben IL-8 weitere

Angiogenese-relevante Faktoren nach fMLP-Stimulation auf mRNA-Ebene induziert werden. Hierzu wurde die Expression der beiden Faktoren MMP-9 und HPSE untersucht, die eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielen und in humanen PMN exprimiert werden.

**A**



**B**

	0 h	1 h	1 hs	2 h	2 hs
$OD_{MMP-9}/OD_{\beta-Aktin}$	0,5	1,1	1,4	1,3	2,4
$OD_{HPSE}/OD_{\beta-Aktin}$	0,3	0,2	0,4	0,7	0,5

**Abbildung 8: Analyse der mRNA-Expression von MMP-9 und HPSE nach Stimulation humaner PMN mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP.** Semiquantitative RT-PCR für MMP-9 und HPSE. Humane PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden frisch isoliert (0 h) bzw. nach Inkubation bei 37°C für 1 h bzw. 2 h ohne Stimulation (1 h, 2 h) bzw. nach Stimulation mit 100 nM fMLP verwendet (1 hs, 2 hs). Als Negativkontrolle (-) wurde die PCR mit mRNA durchgeführt. Als Positivkontrolle (+) dienten differenzierte HL-60-Zellen. A: Agarosegel der PCR-Produkte B: Relative OD-Werte ( $OD_{MMP-9}/OD_{\beta-Aktin}$  und  $OD_{HPSE}/OD_{\beta-Aktin}$ ) der dargestellten semiquantitativen RT-PCR von HPSE und MMP-9. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Die Analyse der Regulation der mRNA-Expression mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR ergab, dass sowohl die Expression von MMP-9 als auch von HPSE auf mRNA-Ebene nach Stimulierung mit 100 nM fMLP induziert wurde (Abbildung 8A und 8B). Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte anhand Berechnung der

relativen OD von MMP-9 und HPSE im Vergleich zur jeweiligen mRNA Expression von  $\beta$ -Aktin. Hier zeigte sich im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ein Anstieg der relativen OD der MMP-9 mRNA-Expression von 0,5 auf 1,4 nach Stimulation der Zellen für 1 h mit fMLP. Auch nach Inkubation der humanen PMN für 1 h ohne weitere Stimulation kam es zu einem Anstieg der basalen Expression auf 1,1. Nach 2 h zeigte sich ein Anstieg der Expression von 1,3 in den unstimulierten Zellen auf 2,4 nach fMLP-Stimulation. Ein ähnliches Ergebnis lieferte die Analyse der mRNA-Expression von HPSE. Hierbei ergab die quantitative Analyse einen Anstieg der relativen OD von 0,3 in frisch isolierten humanen PMN auf 0,4 bzw. 0,5 nach 1 h bzw. 2 h fMLP-Stimulation. Die relativen OD der unstimulierten Kontrollen betragen dagegen 0,2 nach 1 h und 0,4 nach 2 h. Die jeweiligen Experimente stehen stellvertretend für 3 unabhängige Experimente.

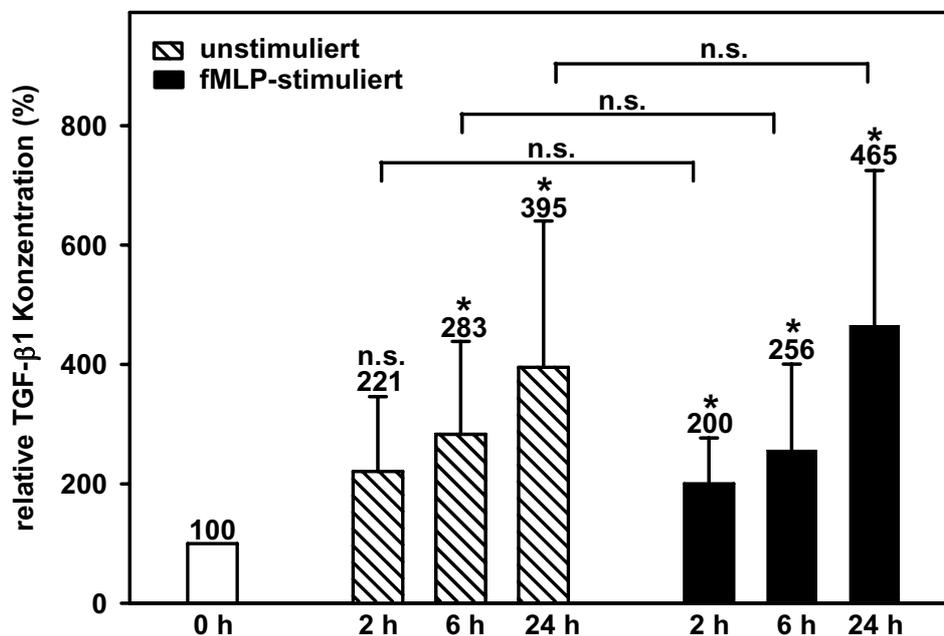
Insgesamt konnte somit belegt werden, dass die mRNA-Expression der beiden Faktoren HPSE und MMP-9 in humanen PMN durch fMLP-Stimulierung induziert wird. Somit beschränkt sich die Induktion der mRNA-Expression nach fMLP-Stimulation nicht nur auf IL-8, sondern umfasst auch die beiden proangiogenetisch wirksamen Faktoren MMP-9 und HPSE.

### **3.2.2. Freisetzung proangiogenetisch wirksamer Zytokine durch humane neutrophile Granulozyten**

In weiterführenden Experimenten sollte die Frage untersucht werden, ob die Stimulation humaner PMN mit 100 nM fMLP die Freisetzung der proangiogenetischen Zytokine IL-8, VEGF, TGF- $\beta$ 1 und bFGF induzierte. Die Freisetzung von IL-8 und VEGF im Überstand von humanen PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurde bereits von unserer Gruppe untersucht<sup>151</sup>. Nach 1 h fMLP-Stimulation wurde eine signifikant höhere Konzentration von  $154 \pm 16$  pg/ml IL-8 im Überstand humaner PMN gemessen als im Überstand unstimulierter humaner PMN nach 0 h ( $7 \pm 13$  pg/ml,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ). Nach Inkubation für 4 h, 8 h und 24 h bei 37°C nach fMLP-Stimulation stieg diese Konzentration signifikant auf  $360 \pm 44$  pg/ml,  $427 \pm 12$  pg/ml und  $723 \pm 92$  pg/ml. Die Analyse von VEGF ergab eine basale Konzentration von  $2 \pm 2$  pg/ml im Überstand unstimulierter PMN (0 h). Die VEGF Konzentration stieg signifikant auf  $15 \pm 3$  pg/ml nach 1 h,  $20 \pm 5$  pg/ml nach 4 h,  $23 \pm 5$  pg/ml nach 8 h,

und  $33 \pm 9$  pg/ml nach 24 h fMLP-Stimulation ( $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ). Zusammenfassend zeigt dieses Ergebnis, dass humane PMN bereits nach 1 h fMLP-Stimulation substanzielle Mengen von IL-8 und VEGF freisetzen.

In weiteren Untersuchungen sollte die Konzentration von TGF- $\beta$ 1 im Überstand humaner PMN ermittelt werden. Die Überstände von frisch Isolierten PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden nach Inkubation bei 37°C ohne Stimulation bzw. mit Stimulation des bakteriellen Tripeptids fMLP (100 nM) für 2 h, 6 h oder 24 h mit Hilfe der ELISA-Technik analysiert.



**Abbildung 9: TGF- $\beta$ 1-Konzentration im Überstand von humanen PMN.** Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration wurde im Überstand von humanen PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) mit Hilfe eines spezifischen ELISA-Kits gemessen. Hierzu wurden die Überstände der Zellen ohne weitere Inkubation (0 h) bzw. nach 2 h, 6 h oder 24 h bei 37°C ohne Stimulation (2 h, 6 h, 24 h) bzw. nach Stimulation mit 100 nM fMLP (2 hs, 6 hs, 24 hs) verwendet.  $n = 4$ . \*  $p < 0,05$  versus 0 h-Wert; n.s., nicht signifikant.

So konnte nachgewiesen werden, dass die ermittelte TGF- $\beta$ 1 Konzentration im Überstand humaner PMN nach 2 h im Vergleich zu frisch isolierten PMN nicht signifikant verändert war. Nach 6 h bzw. 24 h Inkubation ohne weitere Stimulation bei 37°C kam es jedoch zu einer signifikanten Zunahme der TGF- $\beta$ 1-Konzentration auf

283 ± 156% bzw. 395 ± 245% im Vergleich zum 0 h-Wert. Durch Stimulation mit fMLP konnte die TGF-β1-Konzentration im Überstand im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen zu keinem Zeitpunkt (2 h, 6 h, 24 h) signifikant gesteigert werden (200 ± 76%, 256 ± 144%, 465 ± 260%).

In weiteren Untersuchungen sollte die Freisetzung von bFGF im Überstand von humanen PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) ermittelt werden. In humanen PMN konnte zwar mit Hilfe der *Microarray*-Technik und mit Hilfe der RT-PCR-Technik keine mRNA von bFGF nachgewiesen werden. Es sollte nun jedoch untersucht werden, ob humane PMN in der Lage sind, eventuell gespeichertes bFGF freizusetzen (Tabelle 4).

**Tabelle 4: bFGF-Konzentration im Überstand von PMN.** Die bFGF-Konzentration wurde im Überstand von humanen PMN ( $5 \times 10^6$  PMN/ml) mit Hilfe eines spezifischen ELISA-Kits gemessen. Hierzu wurden die Überstände der Zellen ohne weitere Inkubation (0 h) bzw. nach Stimulation mit 100 nM fMLP für 5 min, 30 min, 1 h, 4 h, 6 h und 24 h bei 37°C verwendet (0 h, 5 min, 30 min, 1 h, 4 h, 6 h, 24 h); n=5.

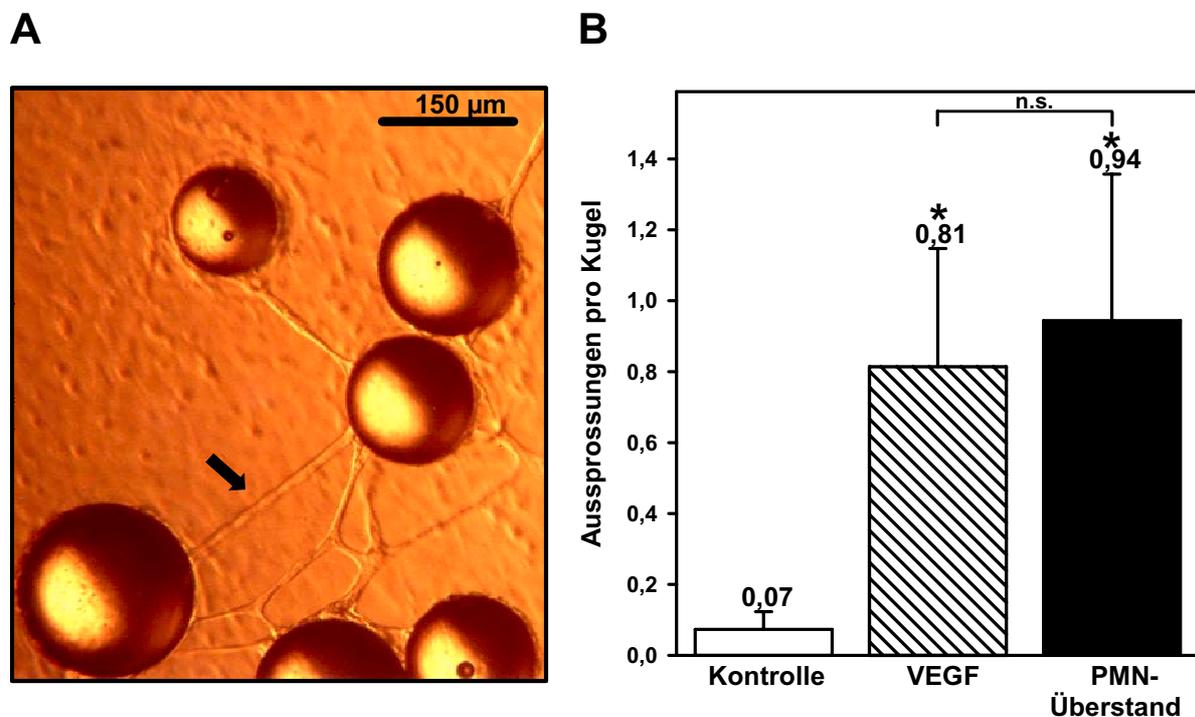
t	0 h	5 min	30 min	1 h	4 h	6 h	24 h
bFGF (pg/ml)	0	1,7 ± 3	1,2 ± 3	0	1,9 ± 4	4,6 ± 10	0

Hierbei zeigte sich, dass die Konzentration von bFGF im Überstand humaner PMN zu allen untersuchten Zeitpunkten im Bereich der vom Hersteller angegebenen Nachweisgrenze von 7 pg/ml lag. Dies zeigt, dass keine substanziellen Mengen von bFGF von humanen PMN freigesetzt wurden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass humane PMN nach fMLP-Stimulation keine substanziellen Mengen von bFGF freisetzen, während TGF-β1 offensichtlich konstitutiv freigesetzt wird. Demgegenüber führte die fMLP-vermittelte Aktivierung von PMN zu einer signifikanten Freisetzung der proangiogenetisch wirksamen Zytokine VEGF und IL-8.

### 3.2.3. Der proangiogenetische Effekt von humanen neutrophilen Granulozyten *in vitro*

In weiterführenden Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob die Freisetzung der proangiogenetisch wirksamen Zytokine durch humane PMN eine funktionelle Relevanz für die Induktion der Angiogenese hat. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe eines *In vitro*-Angiogenese-Modells durchgeführt. Hierzu wurden frisch aus humanen Nabelschnurvenen isolierte HUVEC auf Biosilon-Kugeln ausgesät, die anschließend in eine dreidimensionale Fibrinmatrix gebettet wurden. Die Induktion der Angiogenese wurde hierbei durch Auszählen kapillärer Strukturen am Tag 3 quantifiziert (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Induktion der Angiogenese von humanen PMN *in vitro*.** Quantitative Analyse des angiogenetischen Effektes im *In vitro*-Angiogenese-Assay am Tag 3 nach Induktion der Angiogenese. Biosilon-Kugeln wurden mit HUVEC beschichtet und in eine dreidimensionale Fibrinmatrix eingebracht. Als Positivkontrolle wurde 100 ng/ml VEGF und als Negativkontrolle PBS (Kontrolle) verwendet. Am Tag 3 nach der Stimulation wurden die Aussprossungen ausgezählt. Die Stimulation erfolgte mit dem Überstand von PMN, die für 1 h mit 100 nM fMLP aktiviert wurden. A: Lichtmikroskopische Aufnahme der kapillären Strukturen (Pfeil) im Angiogenese-Assay. Der Länge des Größenmarkers entspricht 150 µm. B: Quantitative Auswertung der Aussprossungen pro Kugel am Tag 3 nach der Induktion. n = 5; \* p < 0,05 versus Kontrolle; n.s., nicht signifikant.

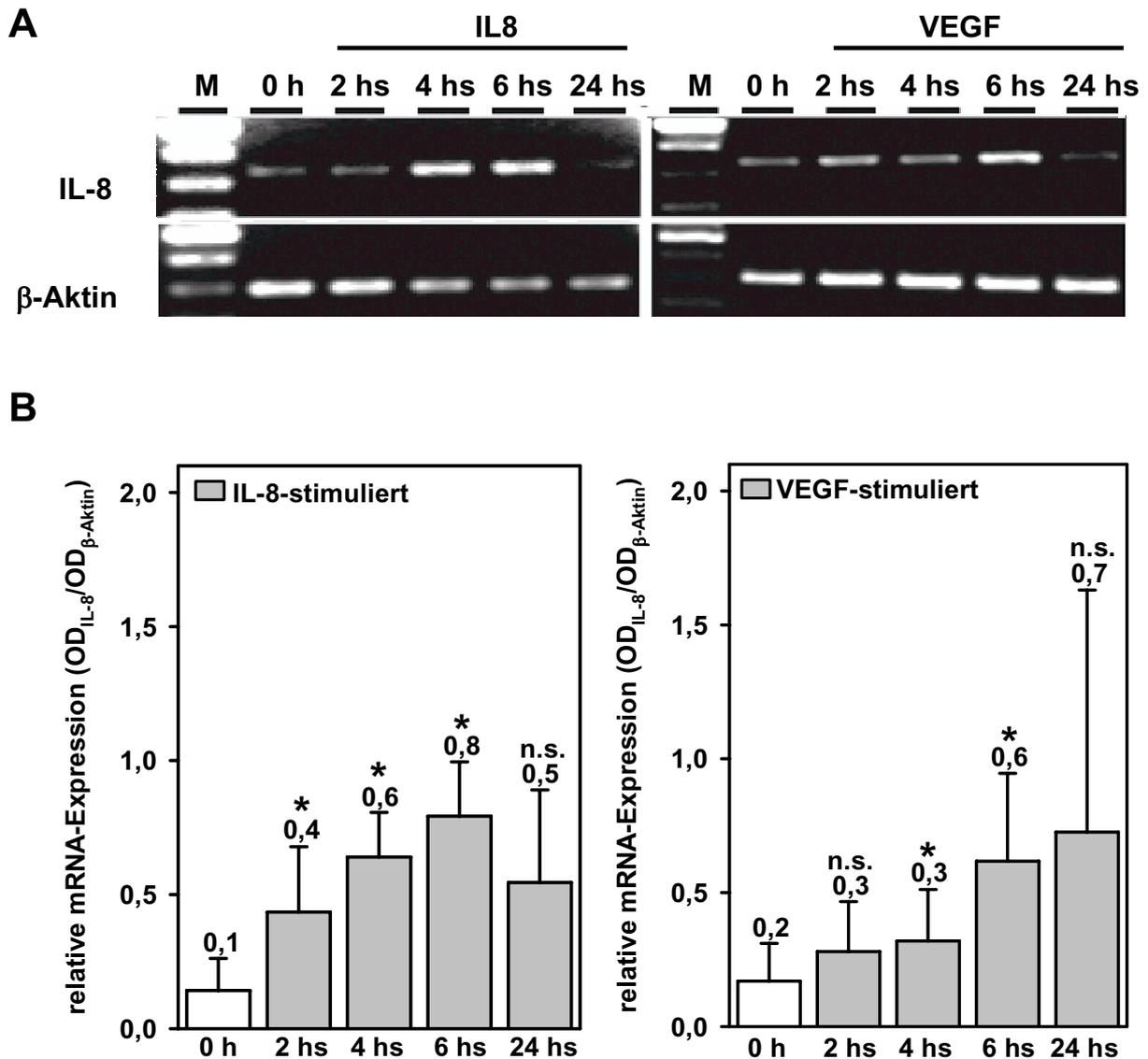
Die Überstände von PMN ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ), die für 1 h mit fMLP (100 nM) stimuliert wurden, induzierten eine etwa 13-fache signifikante Zunahme der Angiogenese von  $0,07 \pm 0,05$  Aussprossungen/Kügelchen bei der unstimulierten Kontrolle auf  $0,94 \pm 0,04$  Aussprossungen/Kügelchen. Somit konnte gezeigt werden, dass humane PMN die Fähigkeit besitzen, die Aussprossung von kapillären Strukturen zu induzieren. Der hierbei hervorgerufene Effekt war in seiner Größenordnung vergleichbar mit der proangiogenetischen Antwort, die durch 100 ng/ml VEGF induziert wurde ( $0,81 \pm 0,33$  Aussprossungen/Kügelchen). Demgegenüber hatte die Applikation von fMLP allein keinen Einfluss auf die Aussprossung kapillärer Strukturen (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt zeigt dieses Experiment, dass humane PMN proangiogenetische Faktoren freisetzen, die in der Lage sind, die Aussprossung von kapillären Strukturen direkt zu induzieren. Hierbei liegt das proangiogenetische Potenzial insgesamt in derselben Größenordnung wie die maximale effektive Stimulation mit dem potenten Angiogenese-Faktor VEGF. Um die funktionelle Bedeutung humaner PMN für die Auslösung der Angiogenese in vivo zu verifizieren, sollten die Überstände fMLP-stimulierter PMN zur Induktion der Angiogenese im CAM-Modell untersucht werden. Die Voruntersuchungen ergaben jedoch, dass bereits die Applikation von fMLP allein eine substantielle proangiogenetische Antwort in diesem Modell induzierte (Daten nicht gezeigt). Somit konnten die geplanten Untersuchungen in diesem Modell nicht sinnvoll durchgeführt werden.

#### **3.2.4. Einfluss humaner neutrophiler Granulozyten auf die endotheliale IL-8 mRNA-Expression**

In weiterführenden Untersuchungen sollten die zellulären Mechanismen analysiert werden, die für den proangiogenetischen Effekt verantwortlich sind. Aufgrund der Tatsache, dass humane PMN große Mengen von IL-8 und VEGF freisetzen und HUVEC für diese beiden proangiogenetischen Faktoren spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurde die mRNA-Expression von endotheliale IL-8 nach IL-8- und VEGF-Stimulation in HUVEC untersucht. Hierzu wurden frisch aus der humanen Nabelschnurvene isolierte HUVEC in Kultur genommen und für 0 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h mit IL-8 (5 ng/ml) bzw. VEGF (10 ng/ml) stimuliert. Die

Expression der endothelialen IL-8 mRNA wurde mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR-Technik unter Verwendung spezifischer Primerpaare analysiert. Als quantitative Kontrolle diente die Expression von  $\beta$ -Aktin (Abbildung 11).



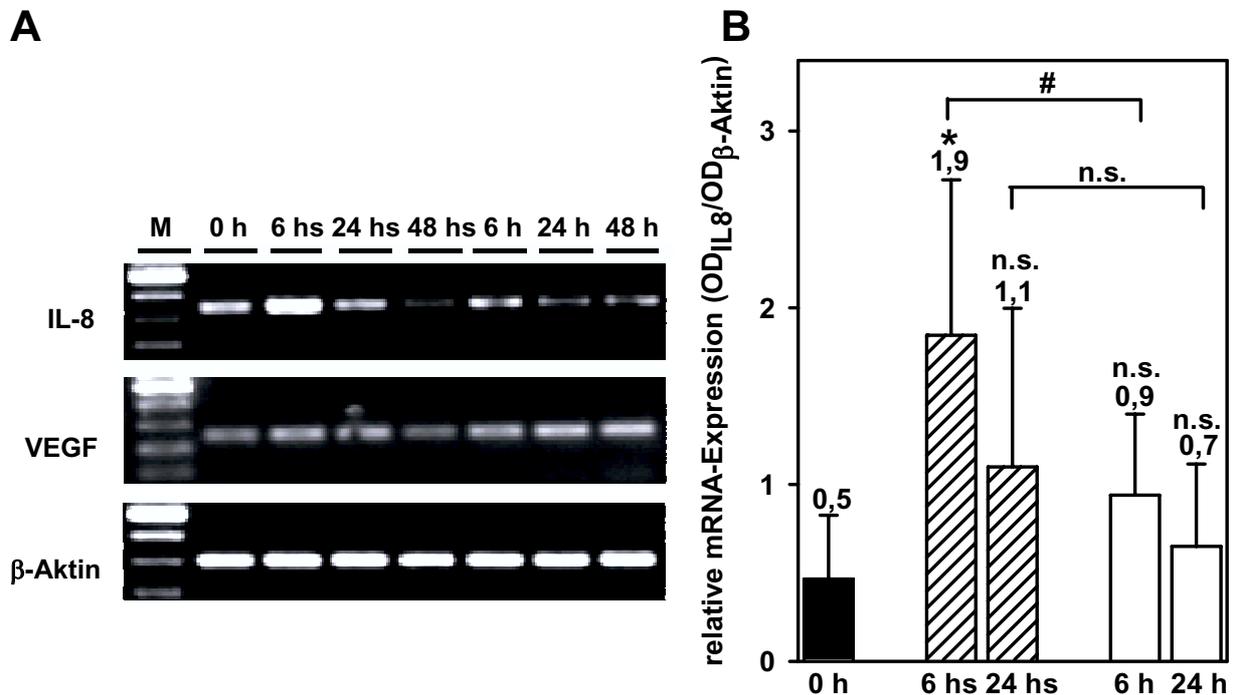
**Abbildung 11: Induktion endothelialer IL-8 mRNA Expression nach Stimulation von HUVEC mit IL-8 und VEGF.** Semiquantitative RT-PCR für endotheliales IL-8. Hierzu wurden HUVEC ohne Stimulation verwendet (0 h) bzw. mit IL-8 (5 ng/ml) bzw. VEGF (10 ng/ml) für 2 h, 4 h, 6 h und 24 h stimuliert (2 hs, 4 hs, 6 hs, 24 hs). Als Kontrolle diente die mRNA-Expression von  $\beta$ -Aktin. A: Agarosegel der PCR-Produkte. B: Darstellung der quantitativen Analyse der relativen OD der endothelialen IL-8 mRNA bezogen auf  $\beta$ -Aktin ( $OD_{IL-8}/OD_{\beta-Aktin}$ ).  $n = 4$ ; \*  $p < 0,05$  und n.s., nicht signifikant versus 0 h-Wert.

Die quantitative Analyse ergab einen signifikanten Anstieg der endothelialen IL-8 mRNA-Expression nach 2 h ( $0,4 \pm 0,2$ ), 4 h ( $0,6 \pm 0,2$ ) und 6 h ( $0,8 \pm 0,2$ ) Stimulation mit IL-8 im Vergleich zum 0 h-Wert ( $0,1 \pm 0,1$ ). Nach 24 h war keine signifikante Zunahme der relativen OD mehr zu verzeichnen ( $0,5 \pm 0,4$ ). Nach VEGF-Stimulation ergab die quantitative Analyse der endothelialen IL-8 mRNA einen spezifischen transienten Anstieg nach 4 h ( $0,3 \pm 0,2$ ) und 6 h ( $0,6 \pm 0,3$ ) im Vergleich zum 0 h-Wert ( $0,2 \pm 0,1$ ). Nach 2 h ( $0,3 \pm 0,2$ ) und 24 h ( $0,7 \pm 0,9$ ) war der Anstieg der relativen OD der endothelialen IL-8 mRNA nicht signifikant. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden Faktoren IL-8 und VEGF offensichtlich in der Lage sind, einen transienten Anstieg der endothelialer IL-8 mRNA-Expression zu induzieren.

In weiterführenden Untersuchungen sollte nun der proangiogenetische Effekt von humanen PMN auf der mRNA-Ebene in HUVEC untersucht werden. Hierzu wurden frisch aus der Nabelschnurvene isolierte HUVEC in Kultur genommen und für 0 h, 6 h, 24 h und 48 h mit Überstand von humanen PMN behandelt. Die humanen PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden zuvor für 1 h mit 100 nM fMLP stimuliert. Als Kontrolle wurde PBS verwendet. PBS sowie der PMN-Überstand wurde in einer Verdünnung von 1:5 dem Kulturmedium beigefügt. Nach Isolierung der endothelialen mRNA wurde die semiquantitative RT-PCR-Technik angewendet und unter Verwendung spezifischer Primerpaare die endotheliale mRNA-Expression von IL-8 und VEGF analysiert. Als Kontrolle diente die Expression der endothelialen  $\beta$ -Aktin mRNA (Abbildung 12).

Hierbei zeigte sich ein transienter Anstieg der endothelialen IL-8 mRNA-Expression nach 6 h Stimulation der HUVEC mit PMN-Überstand. Die quantitative Analyse ergab eine signifikante Zunahme der relativen IL-8 mRNA-Expression von  $0,5 \pm 0,4$  (0 h) auf  $1,9 \pm 0,9$  nach Stimulation mit PMN-Überstand für 6 h. Die relative endotheliale IL-8 mRNA-Expression der PBS-Kontrolle von  $0,9 \pm 0,5$  zum Zeitpunkt 6 h war im Vergleich zum 0 h-Wert nicht signifikant erhöht. Die Zunahme der relativen mRNA-Expression nach Stimulation mit PMN-Überstand für 24 h auf  $1,1 \pm 0,9$  war im Vergleich zum 0 h-Wert ebenfalls nicht signifikant. Im Gegensatz hierzu zeigte die Analyse der mRNA-Expression von VEGF, dass die Überstände aktivierter PMN nicht in der Lage waren, die basale Expression von VEGF zu steigern. Somit wurde

durch den Überstand aktivierter PMN nur die endotheliale IL-8 mRNA, nicht aber die VEGF mRNA induziert.

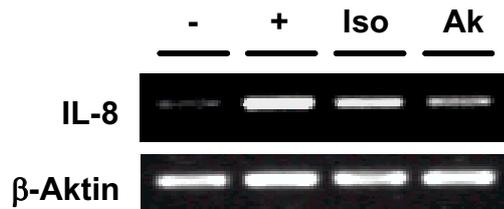


**Abbildung 12: Analyse der mRNA-Expression von endothelialen IL-8 bzw. VEGF nach PMN-vermittelter Stimulation von HUVEC.** Semiquantitative RT-PCR für IL-8 und VEGF mRNA in HUVEC, die nicht stimuliert (0 h) bzw. mit PMN-Überstand für 6 h, 24 h und 48 h stimuliert wurden (6 hs, 24 hs, 48 hs). Hierzu wurden frisch isolierte humane PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) bei 37°C für 1 h mit 100 nM fMLP stimuliert. Die PMN-Überstände wurden in einer Verdünnung von 1:5 dem Kulturmedium beigefügt. Als Kontrolle wurde PBS verwendet (6 h, 24 h, 48 h). Zur Berechnung der relativen Expression wurde die Expression der  $\beta$ -Aktin mRNA analysiert. A: Agarosegel der PCR-Produkte. B: Darstellung der quantitativen Analyse der relativen OD von endothelialer IL-8 mRNA bezogen auf  $\beta$ -Aktin. n = 4; \* p < 0,05 und n.s., nicht signifikant versus 0 h-Wert; # p < 0,05.

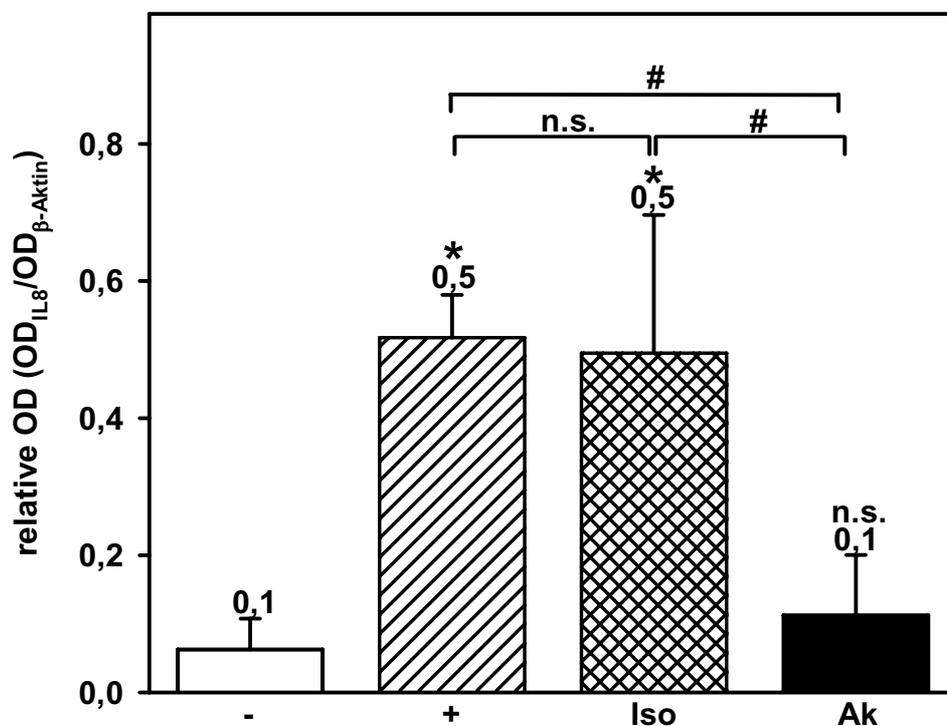
Da IL-8 als wichtiger Aktivator der Angiogenese diskutiert wird, sollte in weiterführenden Untersuchungen der Frage nachgegangen werden, ob durch Induktion des endothelialen IL-8 möglicherweise ein parakriner *Feedforward* Mechanismus aktiviert wird. Hierzu wurden frisch aus der Nabelschnurvene isolierte HUVEC in Kultur genommen und für 6 h mit 100 ng/ml VEGF stimuliert. Um die Frage zu klären, ob die VEGF-vermittelte Induktion der IL-8 mRNA abhängig ist von der Freisetzung von IL-8 wurde die VEGF-Stimulation zusätzlich in Gegenwart eines spezifischen neutralisierenden IL-8-Antikörper durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein

Antikörper desselben Isotyps verwendet. Als Negativkontrolle wurde für 6 h mit PBS inkubiert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR Technik und spezifischen Primerpaaren die Expression der endothelialen IL-8-Expression analysiert. Als Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin (Abbildung 13).

**A**



**B**

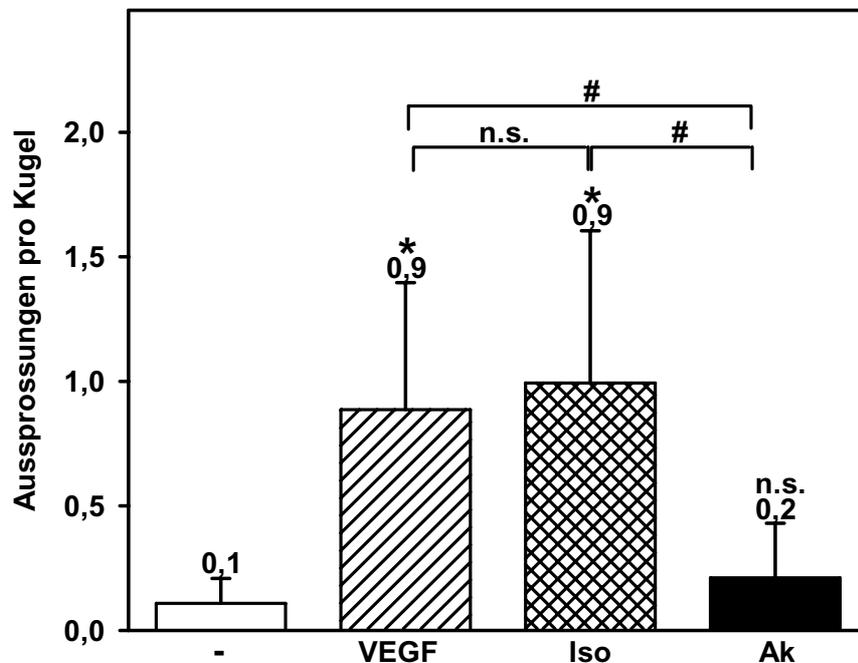


**Abbildung 13: Parakriner Feedforward Mechanismus.** Semiquantitative RT-PCR für endotheliales IL-8. Hierzu wurden HUVEC frisch aus der Nabelschnurvene isoliert und in Kultur genommen und für 6 h als Kontrolle mit PBS behandelt (-), für 6 h mit 100 ng/ml VEGF (+) bzw. 100 ng/ml VEGF in Gegenwart eines spezifischen neutralisierenden IL-8 Antikörper (Klon B-K8, IgG<sub>1</sub>) von der Firma Biosource (Ak) bzw. 100 ng/ml VEGF mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (Iso) stimuliert. Als quantitative Kontrolle diente die Expression von  $\beta$ -Aktin mRNA. A: Agarosegel der PCR-Produkte. B: Quantitative Darstellung der relativen mRNA-Expression von endothelialen IL-8 bezogen auf  $\beta$ -Aktin ( $OD_{IL-8}/OD_{\beta-Aktin}$ ). n = 4; \* p < 0,05 und n.s., nicht signifikant versus Kontrolle (-); # p < 0,05.

Hierbei zeigte sich, dass der VEGF-induzierte Anstieg der endothelialen IL-8 mRNA-Expression in Gegenwart des neutralisierenden anti-IL-8-Antikörpers fast komplett gehemmt wurde. Die Isotyp-Kontrolle des Antikörpers hatte keinen Effekt. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der VEGF-vermittelte Anstieg der IL-8 mRNA-Expression abhängig ist von der endothelialen IL-8 Freisetzung.

### 3.2.5. Der Mechanismus des proangiogenetischen Effektes von humanen neutrophilen Granulozyten in HUVEC

In weiterführenden Untersuchungen sollte die biologische Relevanz dieses Ergebnisses analysiert werden. Dies erfolgte mit Hilfe des In vitro-Angiogenese-Assays.



**Abbildung 14: Quantifizierung der VEGF-vermittelten Angiogenese nach Neutralisation von IL-8.** Quantitative Analyse des angiogenetischen Effektes im In vitro-Angiogenese-Assay am Tag 3 nach Induktion der Angiogenese. Biosilon-Kugeln wurden mit HUVEC beschichtet und in eine dreidimensionale Fibrinmatrix eingebracht. Die Angiogenese wurde mit 100 ng/ml VEGF induziert. Zum Nachweis der IL-8-Abhängigkeit des Effektes wurde die Stimulation in Gegenwart eines neutralisierenden anti-IL-8-Antikörpers (Klon B-K8, IgG<sub>1</sub>) von der Firma Biosource durchgeführt (Ak). Als Kontrolle wurde die Angiogenese in Gegenwart einer Isotyp-Kontrolle des Antikörpers (Iso) induziert und als Negativkontrolle wurde PBS (-) verwendet. Die Anzahl der Aussprossung der kapillären Strukturen wurden am Tag 3 nach Induktion bestimmt. n = 4; \* p < 0,05 und n.s., nicht signifikant versus Negativkontrolle (-); # p < 0,05.

Hierzu wurden frisch aus der Nabelschnurvene isolierte HUVEC auf Biosilon-Kugeln gesät, diese wurden in eine dreidimensionale Fibrinmatrix eingebettet. Anschließend wurde die Angiogenese 100 ng/ml VEGF induziert. Zum Nachweis der IL-8-Abhängigkeit des proangiogenetischen Effektes wurde die Stimulation in Gegenwart des spezifischen neutralisierenden anti-IL-8-Antikörpers durchgeführt. Um einen unspezifischen Effekt des Antikörpers auszuschließen wurde die Isotyp-Kontrolle des Antikörpers eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Die Angiogenese wurde als Aussprossungen pro Kugel am Tag 3 nach Zugabe des Stimulus quantifiziert (Abbildung 14). Hierbei zeigte sich, dass die Gegenwart des neutralisierenden IL-8 Antikörpers die durch VEGF hervorgerufene proangiogenetische Antwort fast vollständig hemmte. Kein hemmender Effekt konnte mit der Isotyp-Kontrolle verzeichnet werden. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der VEGF-vermittelte, proangiogenetische Effekt von einem parakrinen *Feedforward* Mechanismus abhängig ist, der die Freisetzung von endotheliale IL-8 beinhaltet.

### **3.3. Die Induktion von Angiogenese-relevanten Faktoren in humanen neutrophilen Granulozyten durch Hypoxie**

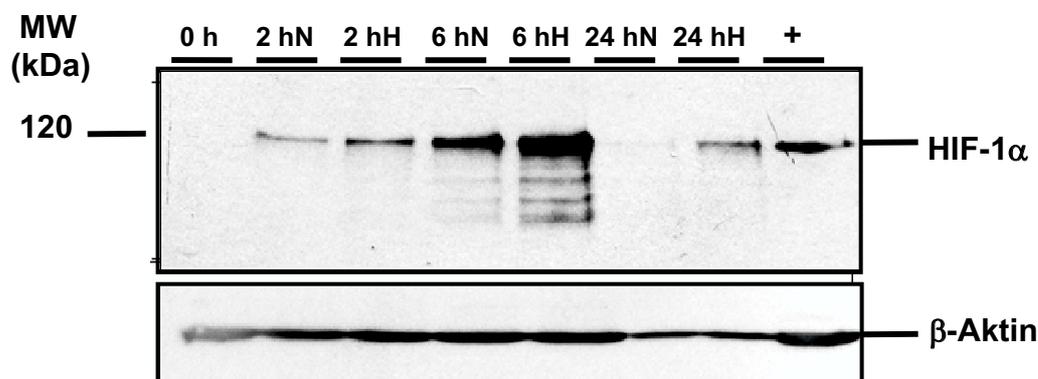
Im Rahmen entzündlicher Prozesse wandern PMN in der Regel in Gewebe ein, in denen Sauerstoffmangelbedingungen herrschen. Die Anpassung an diese Bedingungen erfolgt durch Umschalten des Stoffwechsels auf anaerobe Glykolyse. Dies erfolgt u.a. durch die Hypoxie-induzierte Regulierung der  $\alpha$ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors Hif-1<sup>34</sup>, der die Transkription von glykolytischen Enzymen vermittelt. Da in anderen Zellsystemen bereits gezeigt werden konnte, dass auch die Expression von VEGF durch HIF-1 $\alpha$  gesteigert wird<sup>34</sup> sollte nun untersucht werden, ob nicht nur die Stimulation humaner PMN durch fMLP, sondern auch die Hypoxie die Expression von VEGF, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 induziert.

#### **3.3.1. Die HIF-1 $\alpha$ - Expression in humanen neutrophilen Granulozyten**

Zunächst wurde untersucht, ob hypoxische Bedingungen die Expression von HIF-1 $\alpha$  in humanen PMN beeinflussen. Hierzu wurden frisch aus dem Blut gesunder Spender gewonnene PMN verwendet, die in einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ ml

bei 37°C für 2 h, 6 h bzw. 24 h unter hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) bzw. normoxischen Bedingungen (21% O<sub>2</sub>) inkubiert wurden. Als quantitative Ladekontrolle wurde die Expression von  $\beta$ -Aktin analysiert. Die Expression von HIF-1 $\alpha$  wurde mit Hilfe der Westernblot-Technik und unter Verwendung eines spezifischen HIF-1 $\alpha$ -Antikörpers detektiert (Abbildung 15)

Es zeigte sich, dass HIF-1 $\alpha$  in frisch isolierten PMN auf Proteinebene nicht nachweisbar war (0 h). Nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen für 2 h bzw. 6h wurde die Expression von HIF-1 $\alpha$  im Vergleich zu frisch isolierten PMN deutlich gesteigert. Nach 24 h unter Hypoxie nahm die HIF-1 $\alpha$ -Expression jedoch wieder ab. Darüber hinaus wurde eine schwache Proteininduktion von HIF-1 $\alpha$  in humanen PMN nachgewiesen, die für 2 h bzw. 6 h unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Somit konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  in humanen PMN zunimmt.



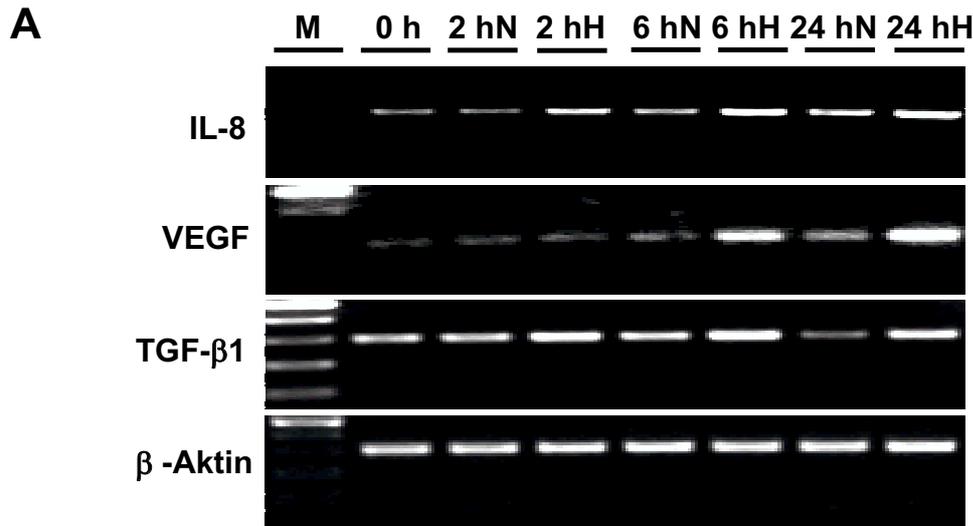
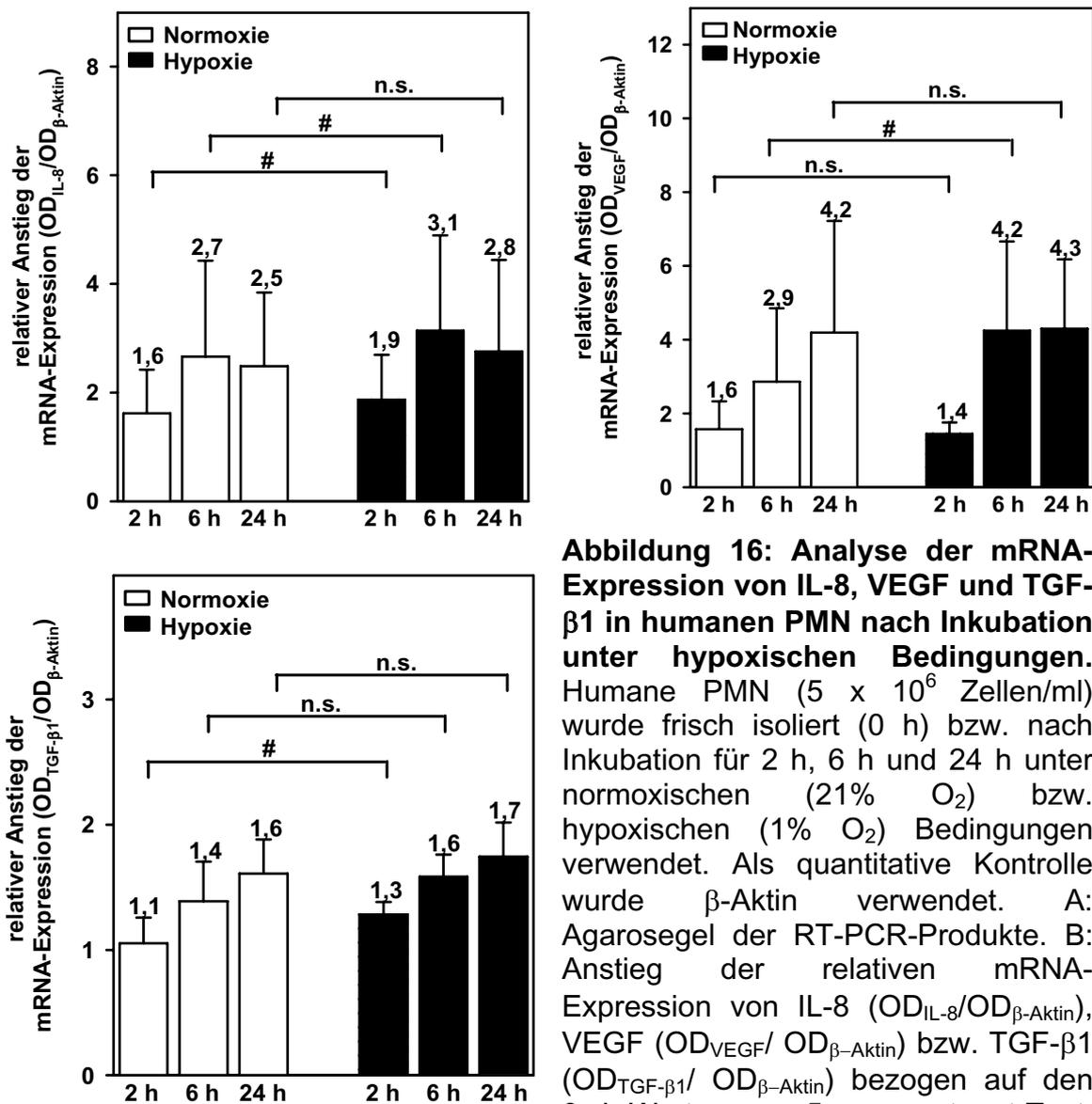
**Abbildung 15: Regulation der HIF-1 $\alpha$ -Expression in humanen PMN unter hypoxischen Bedingungen.** Die Westernblot-Analyse der Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  erfolgte in PMN ( $2 \times 10^6$  Zellen/Probe) ohne weitere Inkubation (0 h) bzw. nach Inkubation für 2 h, 6 h und 24 h unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) Bedingungen (2 hN, 6 hN, 24 hN) bzw. hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen (2 hH, 6 hH, 24 hH). Der Nachweis erfolgte mit dem anti-HIF-1 $\alpha$  Antikörper (Klon 54, IgG<sub>1</sub>) von der Firma BD Transduction Laboratories. Als Positivkontrolle wurden differenzierte HL-60-Zellen verwendet (+). Als Molekulargewichtsmarker (MW) diente  $\beta$ -Galaktosidase von der Firma Sigma. Die Ladekontrolle erfolgte mit Hilfe der Proteinexpression von  $\beta$ -Aktin. Diese Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

### 3.3.2. Expression proangiogenetischer Gene in humanen neutrophilen Granulozyten unter hypoxischen Bedingungen

Nachdem bewiesen werden konnte, dass die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie zunimmt, sollte in weiterführenden Experimenten die funktionelle Relevanz dieses Befundes geklärt werden. Hierzu wurde untersucht, ob die Expression von HIF-1 $\alpha$  unter Hypoxie einen Einfluss auf die mRNA-Expression des proangiogenetischen Faktors VEGF hat. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob möglicherweise weitere Faktoren wie IL-8 und TGF- $\beta$ 1 auf mRNA-Ebene induziert werden.

Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurden PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) verwendet, die frisch aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert wurden und bei 37°C für 2 h, 6 h bzw. 24 h unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden. Unter Verwendung von spezifischen Primerpaaren wurde die semiquantitative RT-PCR-Technik angewendet. Zur Kontrolle wurde die Expression der  $\beta$ -Aktin mRNA untersucht (Abbildung 16A). Die Darstellung der semiquantitativen Analyse erfolgt als Anstieg der relativen mRNA-Expression bezogen auf den 0 h-Wert (Abbildung 16B).

Die semiquantitative Analyse der IL-8 mRNA Expression nach 2 h Hypoxie ( $1,9 \pm 0,8$ ) zeigte einen schwachen, jedoch signifikanten Anstieg im Vergleich zum 2 h-Wert, der unter Normoxie ermittelt wurde ( $1,6 \pm 0,8$ ). Der Unterschied zwischen der IL-8 mRNA-Expression nach 6 h Inkubation unter normoxischen Bedingungen ( $2,7 \pm 1,8$ ) und unter hypoxischen Bedingungen ( $3,1 \pm 1,8$ ) war ebenso signifikant. Nach 24 h Normoxie ( $2,5 \pm 1,4$ ) und Hypoxie ( $2,8 \pm 1,7$ ) war die IL-8-mRNA-Expression allerdings nicht mehr signifikant unterschiedlich. Die semiquantitative Analyse der VEGF mRNA-Expression zeigte lediglich nach 6 h einen signifikanten Unterschied zwischen normoxischen ( $2,9 \pm 2,0$ ) und hypoxischen Bedingungen ( $3,7 \pm 2,4$ ). Die relative VEGF mRNA-Expression betrug nach Normoxie für 2 h ein  $1,6 \pm 0,8$ -faches bzw. nach 24 h ein  $4,2 \pm 3,0$ -faches des 0 h-Werts. Nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen wurde nach 2 h ein  $1,4 \pm 0,3$ -facher Anstieg bzw. nach 24 h ein  $4,3 \pm 1,9$ -facher Anstieg der VEGF mRNA-Expression im Vergleich zum 0 h-Wert ermittelt.

**B**

**Abbildung 16: Analyse der mRNA-Expression von IL-8, VEGF und TGF-β1 in humanen PMN nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen.** Humane PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurde frisch isoliert (0 h) bzw. nach Inkubation für 2 h, 6 h und 24 h unter normoxischen (21%  $O_2$ ) bzw. hypoxischen (1%  $O_2$ ) Bedingungen verwendet. Als quantitative Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. A: Agarosegel der RT-PCR-Produkte. B: Anstieg der relativen mRNA-Expression von IL-8 ( $OD_{IL-8}/OD_{\beta-Aktin}$ ), VEGF ( $OD_{VEGF}/OD_{\beta-Aktin}$ ) bzw. TGF-β1 ( $OD_{TGF-\beta1}/OD_{\beta-Aktin}$ ) bezogen auf den 0 h-Wert. n = 5; gepaarter t-Test; # p < 0,05; n = 3; n.s., nicht signifikant.

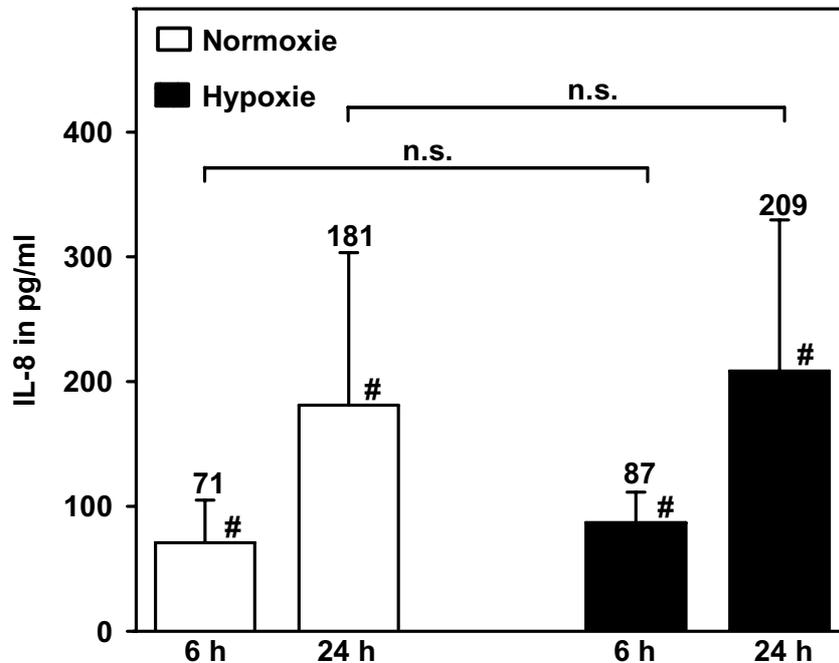
Die semiquantitative Analyse der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression war nach 2 h Normoxie ( $1,1 \pm 0,2$ ) und Hypoxie ( $1,3 \pm 0,1$ ) signifikant unterschiedlich. Nach Inkubation unter normoxischen Bedingungen wurde nach 6 h ein Anstieg von  $1,4 \pm 0,3$  bzw. nach 24 h  $1,6 \pm 0,3$  im Vergleich zum 0 h-Wert verzeichnet. Die relative OD der TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression war nach Hypoxie für 6 h ( $1,6 \pm 0,2$ ) bzw. 24 h ( $1,7 \pm 0,3$ ) nicht signifikant zur Normoxie.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen somit, dass es nach 6 h Hypoxie zu einem substantziellen Anstieg der VEGF mRNA-Expression im Vergleich zur Normoxie kommt. Demgegenüber induzierte die Hypoxie nur Vergleichsweise schwache Effekte auf die mRNA-Expression von IL-8 und TGF- $\beta$ 1. Hierbei war der unspezifische Effekt in Kultur relativ groß. So wurde unter normoxischen Bedingungen sowohl die HIF-1 $\alpha$ -Expression als auch die mRNA-Expression der drei untersuchten Faktoren gesteigert. So konnte insbesondere zu späteren Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression mehr verzeichnet werden.

### **3.3.3. Freisetzung proangiogenetischer Faktoren unter hypoxischen Bedingungen**

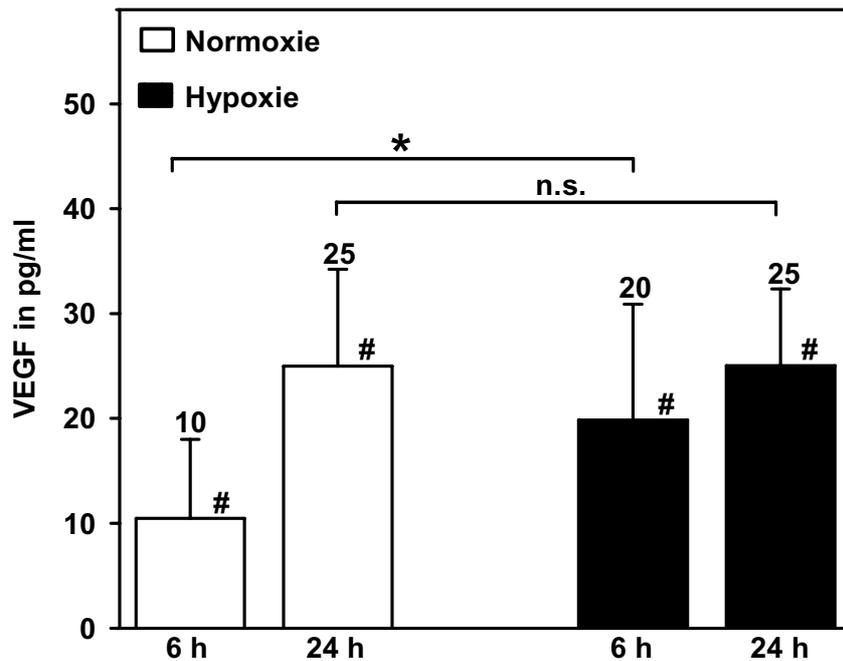
In weiterführenden Experimenten sollte nun die Frage untersucht werden, ob Hypoxie in humanen PMN die Freisetzung der proangiogenetischen Zytokine IL-8, VEGF und TGF- $\beta$ 1 induziert. Hierzu wurden humane PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) verwendet, die frisch aus dem Blut gesunder Spender isoliert wurden. Anschließend wurden die PMN für 6 h und 24 h bei 37°C unter normoxischen (21% O<sub>2</sub>) bzw. hypoxischen (1% O<sub>2</sub>) Bedingungen inkubiert. Der Nachweis der Zytokin-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe der ELISA-Technik im Überstand der Zellen. Die Darstellung erfolgte abzüglich der basalen Zytokinfreisetzung zum Zeitpunkt 0 h. Die IL-8 Konzentration im Überstand humaner PMN (Abbildung 17) betrug zum Zeitpunkt 6 h nach Inkubation unter normoxischen Bedingungen  $71 \pm 34$  pg/ml. Die ermittelte IL-8-Konzentration war nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen für 6 h nicht signifikant unterschiedlich ( $87 \pm 25$  pg/ml). Die IL-8-Freisetzung nach 24 h Normoxie stieg auf  $181 \pm 25$  pg/ml an. Nach 24 h Inkubation unter hypoxischen Bedingungen wurde im Vergleich zum 24 h-Wert unter Normoxie keine signifikante Zunahme der

IL-8 Konzentration gemessen ( $209 \pm 121$  pg/ml). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass humane PMN unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur Normoxie nicht signifikant mehr IL-8 freisetzen.



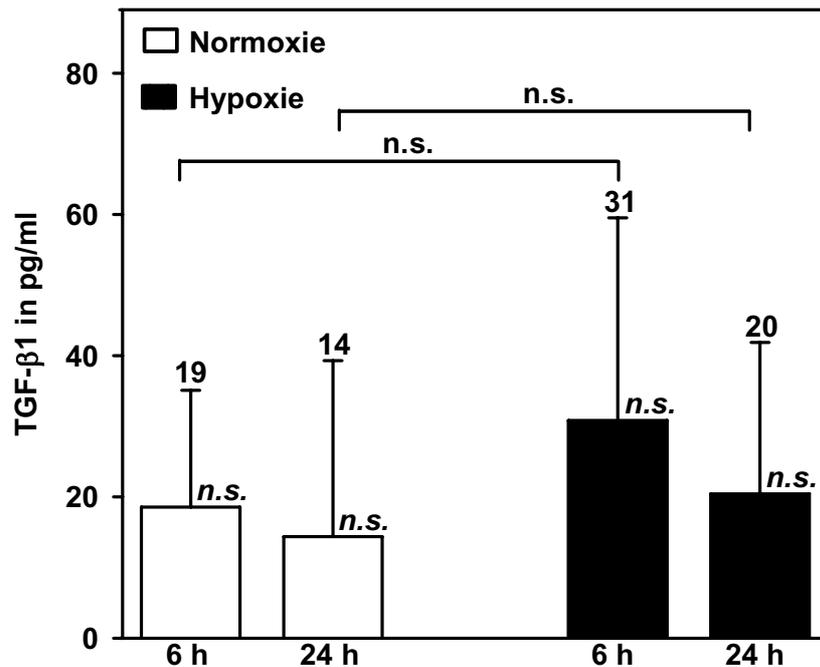
**Abbildung 17: IL-8 Konzentration im Überstand von PMN die unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden.** Die IL-8 Konzentrationen wurden im Überstand von frisch isolierten humanen PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml), nach Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  für 6 h und 24 h unter normoxischen (21%  $\text{O}_2$ ) Bedingungen (Normoxie für 6 h bzw. 24 h) bzw. hypoxischen (1%  $\text{O}_2$ ) Bedingungen (Hypoxie für 6 h bzw. 24 h) bestimmt. Die Darstellung erfolgte abzüglich der basalen IL-8-Freisetzung frisch isolierter humaner PMN.  $n = 4$ ; n.s., nicht signifikant; #  $p < 0,05$  versus 0 h-Wert.

Die ermittelte VEGF Konzentration (Abbildung 18) lag im Überstand humaner PMN, die für 6 h unter normoxischen Bedingungen inkubiert wurden, bei  $10 \pm 8$  pg/ml. Nach 24 h Normoxie nahm die VEGF-Konzentration im Überstand auf  $25 \pm 9$  pg/ml zu. Nach 6 h Inkubation unter hypoxischen Bedingungen betrug die Konzentration  $20 \pm 11$  pg/ml. Diese Konzentration war signifikant unterschiedlich zum 6 h-Wert unter Normoxie. Nach 24 h Hypoxie erfolgte ein weiterer Anstieg auf  $25 \pm 7$  pg/ml. Der Unterschied zum entsprechenden 24 h-Wert unter Normoxie war nicht mehr signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen das Ergebnis der mRNA-Expressions-Analyse. So setzen humane PMN nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen signifikant mehr VEGF frei.



**Abbildung 18: VEGF Konzentration im Überstand von PMN die unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden.** Die VEGF Konzentrationen wurden im Überstand von frisch isolierten humanen PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml), nach Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  für 6 h und 24 h unter normoxischen Bedingungen (Normoxie für 6 h bzw. 24 h) bzw. hypoxischen Bedingungen (Hypoxie für 6 h bzw. 24 h) bestimmt. Die Darstellung erfolgte abzüglich der basalen VEGF-Freisetzung frisch isolierter humaner PMN.  $n = 13$ ; \*  $p < 0,05$ ; n.s., nicht signifikant; #  $p < 0,05$  versus 0 h-Wert.

Die gemessene TGF- $\beta$ 1 Konzentration (Abbildung 19) betrug nach 6 h Inkubation unter normoxischen Bedingungen  $19 \pm 17$  pg/ml. Nach Inkubation für 24 h unter Normoxie wurde eine Konzentration von  $14 \pm 25$  pg/ml verzeichnet. Die ermittelte Konzentration nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen für 6 h betrug  $31 \pm 29$  pg/ml. Nach 24 h Inkubation unter hypoxischen Bedingungen wurde eine Konzentration von  $20 \pm 21$  pg/ml bestimmt. Die ermittelten TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen waren unter Normoxie zum jeweiligen Zeitpunkt unter Hypoxie nie signifikant unterschiedlich. Dies zeigt, dass TGF- $\beta$ 1 unter hypoxischen Bedingungen nicht vermehrt freigesetzt wird.



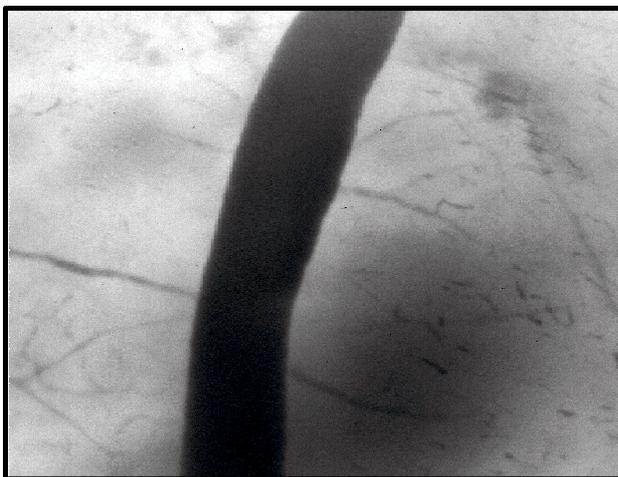
**Abbildung 19: TGF- $\beta$ 1 Konzentration im Überstand von PMN die unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden.** Die TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen wurden im Überstand von frisch isolierten humanen PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml), nach Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  für 6 h und 24 h unter normoxischen Bedingungen (Normoxie für 6 h bzw. 24 h) bzw. hypoxischen Bedingungen (Hypoxie für 6 h bzw. 24 h) bestimmt. Die Darstellung erfolgte abzüglich der basalen TGF- $\beta$ 1-Freisetzung frisch isolierter humaner PMN.  $n = 3$ ; n.s., nicht signifikant; n.s., nicht signifikant versus 0 h-Wert.

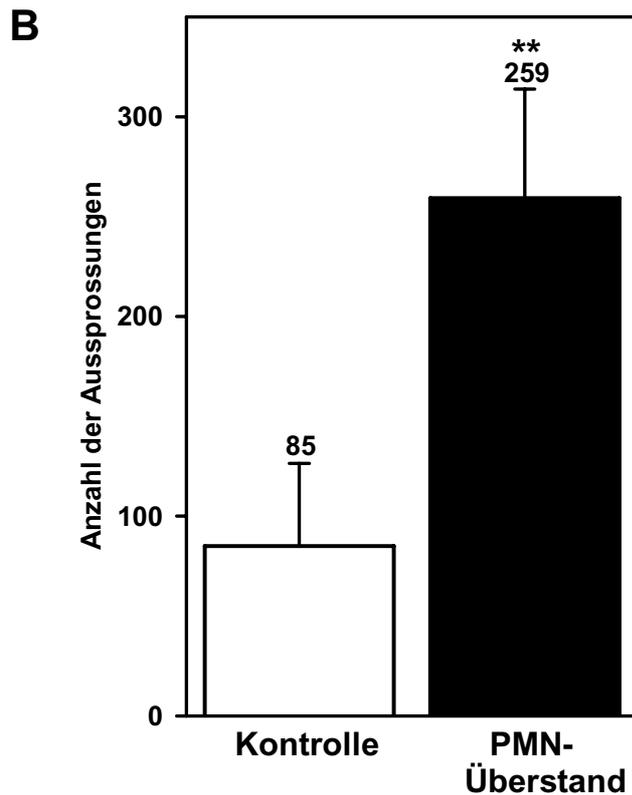
Somit konnte gezeigt werden, dass Hypoxie lediglich die Freisetzung von VEGF beeinflusst. Obwohl alle 3 untersuchten proangiogenetischen Faktoren HIF-1 $\alpha$ -abhängig vermehrt synthetisiert werden. Wurde zum Zeitpunkt 6 h ausschließlich VEGF signifikant vermehrt freigesetzt. Jedoch rührt die fehlende Signifikanz eventuell von den unspezifischen Effekten in Kultur her.

### 3.3.4. Der proangiogenetische Effekt von humanen neutrophilen Granulozyten nach Hypoxie in vivo

In weiterführenden Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob die Freisetzung der proangiogenetisch wirksamen Zytokinen durch humane PMN eine funktionelle Relevanz für die Induktion der Angiogenese in vivo hat. Hierzu wurde der CAM-Assay verwendet. Befruchtete Hühnereier wurden am Tag 10 nach der Methode von Peter C. Brooks<sup>152</sup> präpariert. Auf die bereits vaskularisierte CAM

wurde an einer möglichst gefäßfreien Stelle ein Filter mit 10 µl der zu testenden Substanz aufgetragen und das Ei in einem Brutapparat unter humiden Bedingungen bebrütet. Am Tag 3 nach dem Start des Experiments wurde die CAM weiträumig um das Filterplättchen ausgeschnitten. An der Filterunterseite wurde die Aussprossungen pro Gesichtsfeld bei 8-facher Vergrößerung gezählt. Zur Analyse wurde der Überstand von humanen PMN verwendet, die für 6 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden. Als Negativkontrolle diente das Inkubationsmedium der PMN. In Abbildung 20A ist ein repräsentatives Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Abbildung 20B zeigt die quantitative Auswertung dieser Testreihe. Hierbei wurde am Tag 3 nach Beginn des Experiments in der Kontrolle  $85 \pm 41$  Aussprossungen pro Gesichtsfeld ermittelt. In Gegenwart des Überstandes von hypoxischen PMN nahm die Anzahl der Aussprossungen signifikant auf  $295 \pm 55$  Aussprossungen pro Gesichtsfeld zu. Dies zeigt, dass humane PMN die Fähigkeit besitzen, nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen eine proangiogenetische Entität freizusetzen, die in vivo die Neovaskularisierung induziert.

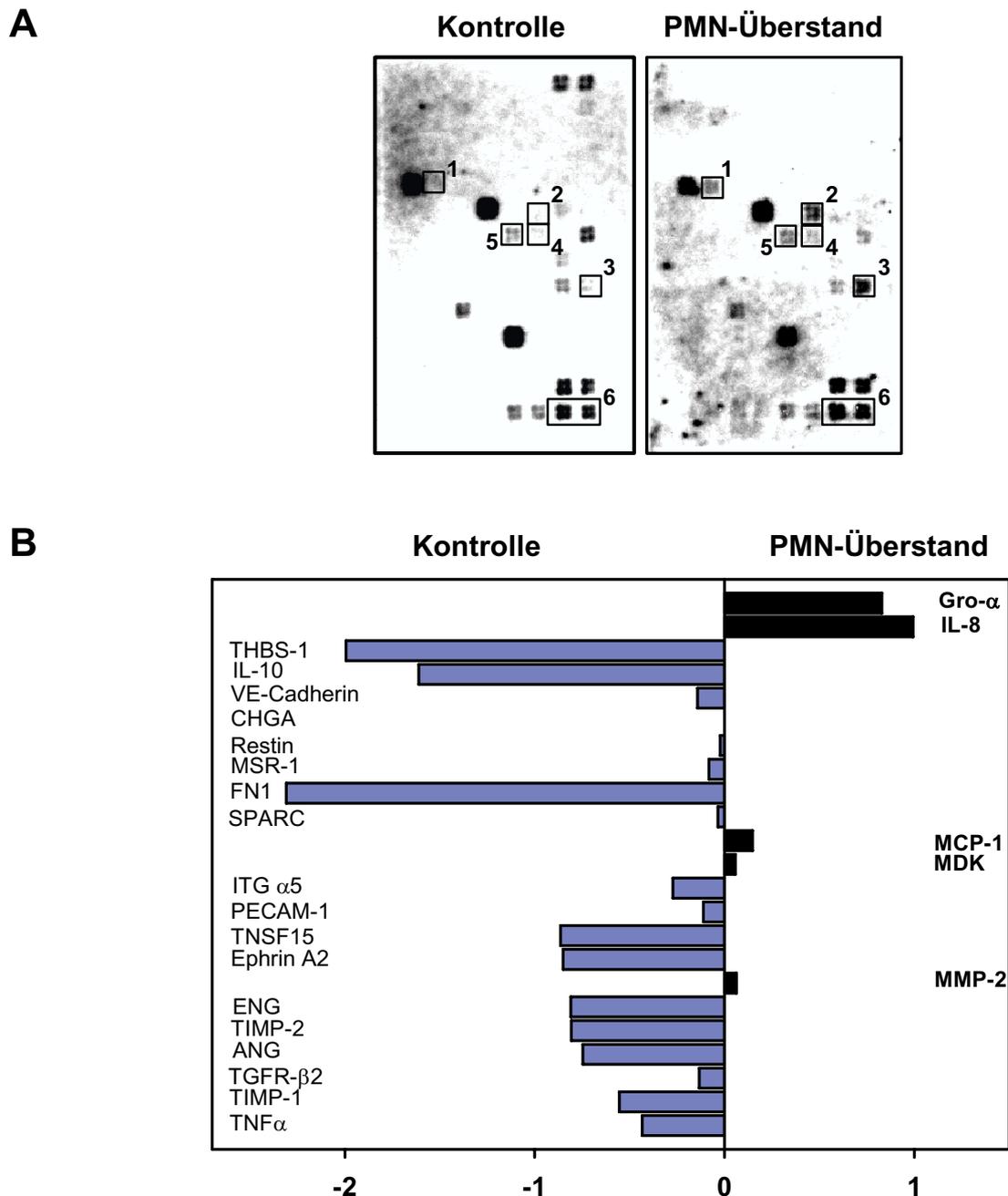
**A****Kontrolle****PMN-Überstand**



**Abbildung 20: Analyse des pro-angiogenetischen Effekts von humanen PMN nach Inkubation unter hypoxischen Bedingungen im CAM-Assay.** Zur Induktion der Angiogenese wurde der Überstand von humanen PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) verwendet, die für 6 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden (PMN-Überstand). Als Kontrolle wurde das Kulturmedium der PMN verwendet. Angiogenese wurde als Aussprossungen pro Sichtfeld quantifiziert. A: Lichtmikroskopische Darstellung der Aussprossungen im CAM-Assay nach 3 Tagen. B: Quantitative Analyse der Aussprossungen pro Gesichtsfeld nach 3 Tagen bei 8-facher Vergrößerung.  $n = 5$ ; \*\* $p < 0.005$  versus Kontrolle.

### 3.3.5. Humane neutrophile Granulozyten induzieren einen angiogenetischen *Switch* in HUVEC

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit sollten die zellulären Mechanismen des proangiogenetischen Effekts von humanen PMN, die für 6 h unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden, in Endothelzellen untersucht werden. Hierzu wurde der *Microarray* für Angiogenese-relevante Gene verwendet. Frisch aus der Nabelschnurvene isolierten HUVEC wurden auf Zellkulturschalen ausgesät und für 6 h mit dem Überstand von humanen PMN in einer Verdünnung von 1:5 zum Kulturmedium stimuliert. Zuvor wurden die humanen PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) für 6 h bei 37°C in PBS mit 0,25% BSA und 0,1% Glukose unter hypoxischen Bedingungen (ca. 1% O<sub>2</sub>) inkubiert. Als Kontrolle wurden HUVEC unter identischen Bedingungen in Gegenwart von PBS mit 0,25% BSA und 0,1% Glukose kultiviert. Anschließend wurde die mRNA isoliert und unter Verwendung des *Microarrays* analysiert. Die detektierten Signale wurden mit einer speziell vom Hersteller angebotenen Software vermessen und ausgewertet.



**Abbildung 21: Analyse der Expression Angiogenese-relevanter Gene in HUVEC, die für 6 h mit dem Überstand humaner PMN stimuliert wurden.** Frisch isolierte humane PMN ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden für 6 h bei 37°C unter hypoxischen Bedingungen inkubiert. Frisch aus der Nabelschnurvene gewonnene HUVEC wurden in Kultur genommen und für 6 h mit dem Überstand humaner PMN in einer Verdünnung von 1:5 stimuliert (PMN-Überstand). Als Kontrolle wurden HUVEC für 6 h mit PBS (1:5 zum Kulturmedium) inkubiert (Kontrolle). A: *Microarray* für Angiogenese-relevante Gene (Superarray); Kästen: Gro- $\alpha$  (1), IL-8 (2), MCP-1 (3), MMP-2 (4), MDK (5) und  $\beta$ -Aktin (6). B: Quantitative Analyse der Expression Angiogenese-relevanter Gene. Die relativen OD der positiven Signale wurden mit Hilfe von  $\beta$ -Aktin berechnet. Die relative OD der positiven Signale der Kontrolle wurden von denjenigen der stimulierten HUVEC subtrahiert.

Nach Berechnung der relativen OD in Bezugnahme auf die  $\beta$ -Aktin-Expression zeigte sich, dass die Stimulation der HUVEC mit PMN-Überstand eine eindeutige Induktion der CXC-Chemokine Gro- $\alpha$  und IL-8 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hervorrief. Darüber hinaus erfolgte eine PMN-vermittelte Induktion der Angiogenese-relevanten Faktoren MCP-1, MDK und MMP-2 (Abbildung 21).

Somit konnte ein entscheidender Hinweis erbracht werden, dass HUVEC bereits nach 6 h die Signale humaner PMN zur Induktion wichtiger Angiogenese-relevanter Gene nutzen.

## 4. Diskussion

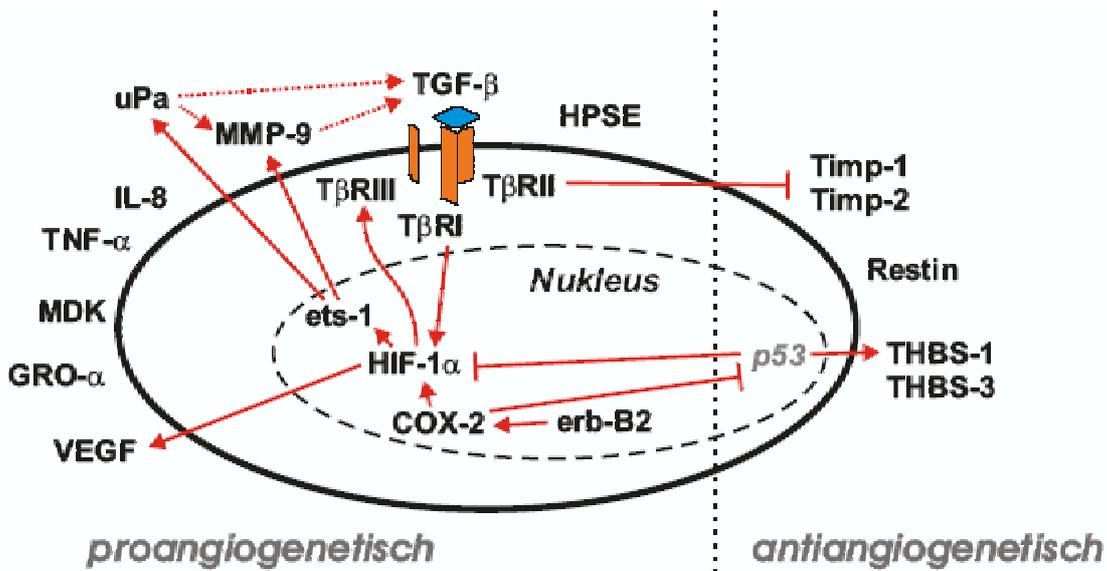
### 4.1. Die Rolle von neutrophilen Granulozyten bei der entzündlichen Angiogenese

#### 4.1.1. Das proangiogenetische Potenzial von neutrophilen Granulozyten

Bei einer akuten Entzündungsreaktion kommt es zur Einwanderung humaner PMN in das entzündliche Gewebe. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Frage, ob humane PMN nicht nur für die Abwehr von zentraler Bedeutung sind, sondern auch eine Rolle bei der Induktion der entzündlichen Angiogenese spielen. Hierzu sollte zunächst geklärt werden, welche Angiogenese-relevanten Gene in PMN exprimiert werden. Zur Untersuchung der molekularen Basis der proangiogenetischen Kapazität von humanen PMN wurde ein *Microarray* für Angiogenese-relevante Gene verwendet. Hierbei wurde die mRNA Expression von 28 Genen detektiert. Darunter waren die bereits in PMN bekannten Zytokine IL-8<sup>15</sup>, Gro- $\alpha$ <sup>140</sup>, TGF- $\beta$ 1<sup>109</sup>, TNF $\alpha$ <sup>13</sup> und VEGF<sup>107</sup>. Insbesondere VEGF und IL-8, aber auch Gro- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 und TNF- $\alpha$  wurden in verschiedenen Modellen als hochpotente proangiogenetische Mediatoren beschrieben<sup>80,131,133,135,151,153,154</sup>. Zusätzlich konnte MDK als ein weiteres proangiogenetisches Zytokin in humanen PMN identifiziert werden. Für MDK wurde bereits eine Funktion bei der Induktion der PMN-Chemotaxis beschrieben<sup>155,156</sup>. So wurde gezeigt, dass in MDK-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine verminderte Anzahl von PMN in das entzündete Gewebe migrieren<sup>157</sup>. Des Weiteren wurde MDK als proangiogenetischer Faktor im Cornea-Assay beschrieben<sup>158</sup>. Bei der Induktion der Tumorangiogenese bei Blasenkrebs wird MDK eine besondere Rolle zugeschrieben<sup>158</sup>. Hier wurde beschrieben, dass hohe Serumspiegel von MDK bei Patienten mit invasiven Krebsarten mit schlechten Heilungschancen einhergehen<sup>159,160</sup>. Das Zytokin MDK bildet mit Hilfe der Transglutaminase kovalent verknüpfte Dimere, die als biologisch aktive Form von MDK beschrieben wurden<sup>150</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Westernblot-Technik die monomere, dimere und tetramere Form in frisch isolierten humanen PMN nachgewiesen. Nach fMLP-Stimulation für 6 h wurde die Expression der dimeren Form von MDK signifikant gesteigert. Diese Tatsache deutet auf eine mögliche Rolle bei der PMN-vermittelten Induktion der Angiogenese hin. Bei der Induktion der Angiogenese sind Zytokine von herausragender Bedeutung, da sie parakrin auf Endothelzellen wirken.

Jedoch sind ebenso Angiogenese-relevante Transkriptionsfaktoren erforderlich um die Zytokinsynthese in humanen PMN zu gewährleisten. Neben der Expression von HIF-1 $\alpha$ <sup>141</sup> wurden die 2 neuen Angiogenese-relevante Transkriptionsfaktoren erb-B2 und ets-1 in humanen PMN nachgewiesen. Die Tyrosinkinase erb-B2 ist ein Transkriptionsaktivator des COX-2 Promotors<sup>161</sup>. Der Promotor induziert über den Prostaglandin-E<sub>2</sub>-vermittelten Signalweg die HIF-1 $\alpha$ -Expression und somit die VEGF Expression<sup>162</sup>. Demgegenüber ist der Transkriptionsfaktor ets-1 ein Zielgen von HIF-1 $\alpha$ <sup>141</sup> und induziert die Expression von verschiedenen MMPs wie MMP-9<sup>163</sup>, das in humanen PMN bereits beschrieben wurde<sup>112</sup>. Außerdem induziert ets-1 die Expression von uPA<sup>164</sup>. Diese Protease wird ebenso nachweislich von PMN exprimiert<sup>113</sup> und ist zur proteolytischen Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 und MMP-9 befähigt<sup>59,165</sup>. Unter den Angiogenese-relevanten Enzymen und Proteasen in humanen PMN wurden neben MMP-9 und uPA die Expression von COX-2 und HPSE im *Microarray* detektiert. Diese Faktoren sind bereits in humanen PMN beschrieben worden<sup>58,112,113,147</sup>. HPSE und MMP-9 spielen eine bedeutende Rolle bei der Degradierung der ECM<sup>58,59</sup>. Dort sind zahlreiche proangiogenetische Faktoren gebunden, die durch proteolytische Aktivität dieser Proteasen freigesetzt werden z.B. VEGF, bFGF und TGF  $\beta$ 1<sup>62,166,167</sup>. MMP-9 ist in der Lage, verschiedene von PMN freigesetzte Faktoren wie TGF-  $\beta$ 1 zu aktivieren<sup>165</sup>. Diese Metalloproteinase wird u.a. für den angiogenetischen *Switch* bestimmter Tumorarten verantwortlich gemacht<sup>63</sup>. Hierbei wurde eine entscheidende Beteiligung von COX-2 gezeigt. COX-2 ist ein bedeutender Faktor in der Tumorthherapie geworden, da mit dessen Hemmung die Tumorangiogenese und somit die Versorgung des Tumors blockiert werden kann. So wurden bereits eine Reihe von anti-inflammatorische Agenzien beschrieben, die selektiv auf COX-2 wirken und in Angiogenesemodellen die Angiogenese hemmen können<sup>168</sup>. Zusätzlich zur Expression von TGF- $\beta$ RI, der in PMN bereits beschrieben wurde<sup>109</sup>, wurden TGF- $\beta$ RII und TGF- $\beta$ RIII in humanen PMN identifiziert. Diese beiden Rezeptoren wurden als HIF-1-induzierbare Faktoren identifiziert<sup>162</sup>. TGF $\beta$ RI-, TGF $\beta$ RII- oder TGF $\beta$ RIII-defiziente Mäuse weisen verschiedene Defekte in Vaskulogenese und Angiogenese auf<sup>169</sup>. Der Ligand der TGF- $\beta$ -Rezeptoren ist das multifunktionelle Zytokin TGF- $\beta$ 1, das lediglich in geringen Konzentrationen proangiogenetisch wirksam sein soll<sup>170</sup>. Es induziert u.a. die Expression von VEGF, MMP-2 und MMP-9 in Fibroblasten, Endothelzellen<sup>171</sup> und einer humanen

Krebszelllinie<sup>172</sup>. Der Nachweis der Expression aller bekannten TGF- $\beta$ -Rezeptoren in humanen PMN lässt eine Funktion des TGF- $\beta$ -Signalwegs bei der Aktivierung des proangiogenetischen Potenzials dieser Zellen annehmen. Darüber hinaus konnte die Expression der Adhäsionsmoleküle Integrin  $\alpha 5$ , Integrin  $\beta 3$  und PECAM-1 in humanen PMN bestätigt werden<sup>143-145</sup>. Die Expression dieser Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen ist im Verlauf der Angiogenese von essenzieller Bedeutung. In PMN fungieren die exprimierten Integrine auch als Rezeptoren<sup>173</sup>. Bei Adhäsion werden bei Ligandenbindung Signalwege aktiviert<sup>174</sup>. Des Weiteren wurde im *Microarray* der in PMN bereits bekannte Faktor THBS-1 detektiert<sup>146</sup>. Die Expression von THBS-3 konnte in humanen PMN neu beschrieben werden. Thrombospondine sind als antiangiogenetisch wirksame Faktoren bekannt<sup>175</sup>. Darüber hinaus wurde die Expression von CHGA in humanen PMN bestätigt<sup>149</sup> und zudem die Expression von Ephrin B2 und Ephrin A2, Liganden der Ephrin Rezeptor Tyrosine Kinasen, in humanen PMN nachgewiesen. Obwohl die endotheliale Expression der Ephrine und ihrer Rezeptoren eine Rolle in der Angiogenese spielen<sup>176</sup>, bleibt deren Funktion in der PMN-vermittelten Angiogenese unklar. Des Weiteren wurde die Expression von Restin, einem 22 kDa Fragment von humanem Kollagen XV mit Homologie zum Angiogenese-Inhibitor Endostatin, demonstriert, der die Migration von Endothelzellen inhibiert<sup>248</sup>. Zuletzt wurde die Expression von Timp-1 und Timp-2 demonstriert, die ebenso als Inhibitoren der Angiogenese gelten<sup>99</sup>. Timp-1 war bereits in PMN beschrieben worden<sup>148</sup>. Insgesamt wurden also fünf antiangiogenetische Faktoren (THBS-1, THBS-3, Restin, Timp-1 und Timp-2) gefunden. Diese Tatsache könnte bedeuten, dass PMN nicht nur pro- sondern auch antiangiogenetisches Potenzial besitzen. Allerdings zeigen Untersuchungen, dass das TGF- $\beta 1$ -*Signaling* die Timp-Expression zu inhibieren vermag<sup>177</sup>. Die Aktivierung von COX-2 reguliert nachweislich die p53 Expression herunter<sup>177</sup>. p53 ist wiederum für die Eigenschaft bekannt, den Angiogeneseinhibitor THBS-1 zu induzieren<sup>178</sup> und die Expression von HIF-1 $\alpha$  zu hemmen<sup>59</sup>. Nach PMN-Aktivierung kommt es zu einer Induktion der COX-2 Aktivität, die auf diese Weise die Balance zwischen pro- und antiangiogenetischer Aktivität von humanen PMN in Richtung des proangiogenetischen Potenzials verschieben. In Abbildung 22 wurden diese Zusammenhänge graphisch dargestellt.



**Abbildung 22: Zusammenhänge** der Regulation der Angiogenese-relevanten Faktoren in humanen PMN (Abbildung nach 234).

Zuletzt sei noch anzumerken, dass außerdem die Expression von VE-Cadherin in PMN mittels *Microarrays* detektiert wurde. Jedoch konnte dieses Ergebnis mit drei verschiedenen Primerpaaren durch Verwendung der RT-PCR-Technik nicht bestätigt werden. Insofern wurde das Signal für VE-Cadherin im *Microarray* als "falsch-positiv" definiert.

Insgesamt wurden im *Microarray* Signale als positiv definiert, wenn sie in mindestens 2 der 4 *Microarrays* nachgewiesen wurden und hierbei in jeder Chargennummer mindestens einmal detektiert werden konnten. Allerdings wurden einige Faktoren nur in einem der *Microarrays* detektiert (siehe Anhang).

Die unterschiedlichen Genexpressionsmuster einzelner Mikroarrays könnten auf etwaige Sensitivitätsunterschiede oder Genexpressionsvarianzen der PMN zurückzuführen sein. So können in PMN je nach Art und Grad ihrer Aktivierung die Expression verschiedener Faktoren induziert sein. Allerdings konnte mit Ausnahme von VE-Cadherin die Expression aller Gene, die im *Microarray* ein positives Signal lieferten mit Hilfe der RT-PCR Technik bestätigt werden. Hierbei wurden die PMN von drei verschiedenen Spendern verwendet, die ein identisches Ergebnis lieferten.

Einige proangiogenetische Faktoren, die bereits in PMN bekannt sind, konnten im *Microarray* nicht nachgewiesen werden. So wird der lösliche proangiogenetische Faktor HGF von PMN nach fMLP-Stimulierung freigesetzt<sup>134</sup> und durch die Protease uPA aktiviert<sup>179</sup>. HGF reguliert Monozyten-/Makrophagen-Funktionen und induziert die Proliferation und Motilität von Epithel- und Endothelzellen<sup>180</sup>. Als weiterer löslicher proangiogenetischer Faktor sei TGF- $\alpha$  anzuführen. Dieses Zytokin wurde bereits in den zytoplasmatischen Granula der PMN lokalisiert<sup>108</sup> und ist sowohl für Wundheilung<sup>133</sup> als auch in der Tumorangiogenese essenziell<sup>181</sup>. Für die Induktion der Angiogenese hat PGF eine bedeutende Rolle<sup>182</sup>. Dieser proangiogenetische Stimulus wird ebenso als löslicher Faktor von PMN freigesetzt<sup>183</sup> und bindet an die VEGF-Rezeptoren FLT-1 und FLK-1 auf Endothelzellen<sup>184, 185</sup>. Hierbei induziert PGF eine intramolekulare Transphospholierung von Flk-1<sup>186</sup>. Dieser Rezeptor vermittelt den proangiogenetischen Effekt von VEGF in Endothelzellen<sup>187</sup>. PGF bindet dort als Homodimer und als Heterodimer mit VEGF<sup>186</sup>. Das Heterodimer wurde bereits als hochpotent proangiogenetisch im Mausmodell beschrieben<sup>186</sup>. Darüber hinaus wurde sowohl Flk-1 als auch Flt-1 in PMN nachgewiesen<sup>188,189</sup>. Die Aktivierung dieser beiden Rezeptoren induziert eine Reihe proangiogenetischer Faktoren in PMN. Außerdem haben Rezeptoren für chemotaktische Migration von PMN in Richtung PGF und VEGF eine Bedeutung<sup>188</sup>. Des Weiteren wurden VEGF-C und VEGF-D in PMN auf Proteinebene nachgewiesen<sup>190</sup>. Diese beiden Mitglieder der VEGF-Familie stellen bei Bindung an den VEGF-Rezeptor-3 wichtige Induktoren der Lymphangiogenese dar<sup>191</sup> und sind sowohl für Wundheilung als auch Tumorangiogenese essenziell. Beide Faktoren können auch Flk-1 aktivieren und sind auf diese Weise in der Lage die Angiogenese zu induzieren<sup>192</sup>. Zudem wurde bereits EGF in PMN nachgewiesen<sup>193</sup>. Dieser wichtige proangiogenetische Faktor agiert auto- und parakrin über seinen Rezeptor (EGF-R), der ebenfalls bereits in PMN beschrieben wurde<sup>194</sup>. Hierbei stimuliert EGF die TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung der PMN, deren Abwehrfunktionen und IL-8 Freisetzung<sup>194</sup>. Während der Wundheilung vermittelt EGF zusammen mit TGF- $\alpha$  die Differenzierung, Proliferation und Chemotaxis von Epithelzellen und die Proliferation von Fibroblasten<sup>195</sup>. Somit leistet EGF einen entscheidenden Beitrag zur Angiogenese. MCP-1 ist ein weiterer bedeutender löslicher proangiogenetischer Faktor in PMN dessen Expression unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert wird<sup>196,197</sup>. Dieser ist u.a. verantwortlich für

das Nachfolgen von Makrophagen ins entzündete Gewebe<sup>198</sup>, die eine zweite wichtige Quelle für proangiogenetischer Faktoren darstellen und für den weiteren Ablauf der Wundheilung essenziell sind<sup>218</sup>. Ferner wurde MCP-1 bereits in Angiogenese-Modellen als potenter proangiogenetischer Faktor beschrieben<sup>199</sup>. Auch der lösliche Faktor IGF-1 ist in PMN bereits bekannt<sup>200</sup>. IGF-1 kann erst in einer späteren Phase der Wundheilung in PMN detektiert werden und wirkt stimulierend auf die Differenzierung und Proliferation von Fibroblasten und induziert die VEGF-Expression<sup>200</sup>. Demgegenüber wird IFN $\gamma$  unmittelbar nach Aktivierung von PMN freigesetzt<sup>201</sup>. Im Verlauf der Wundheilung wird diesem löslichen Faktor eine Funktion im *Cross Talk* mit TGF- $\beta$ 1 beigemessen<sup>180</sup>. Nicht nur TGF- $\beta$ 1 sondern auch TGF- $\beta$ 2 werden nachweislich von PMN in bioaktiver Form freigesetzt<sup>202</sup>. Diese beiden Faktoren stellen hochpotente Chemotaxine für PMN dar<sup>203</sup>. Sie binden als Liganden der TGF- $\beta$ -Rezeptoren auf PMN, deren Aktivierung auf der Endothelzelloberfläche proangiogenetischen Effekt hat<sup>204</sup>. Die Bindung der TGF- $\beta$ -Isoformen auf PMN induziert nachweislich die Fibrinogen (FN)-Freisetzung<sup>92</sup>. In Abhängigkeit von FN wirken TGF- $\beta$ 1, -2 und -3 chemotaktisch auf PMN<sup>92</sup>. Der FN-Rezeptor der PMN ist hierbei das Integrin  $\alpha_5\beta_1$ <sup>170</sup>. Auch die Expression von Angiomotin ist bereits in PMN bekannt<sup>132</sup>. Dieser Faktor wird von den Endothelzellen in Tumorgefäßen exprimiert. Die Expression von Angiomotin führt zu einer Steigerung der Endothelzell-Migration und zur Bildung kapillärer Strukturen<sup>204</sup>. Demgegenüber ist die Funktion in PMN noch unklar. Eventuell besteht die proangiogenetische Wirkung von Angiomotin in der Fähigkeit den Angiogenese-Inhibitor Angiostatin durch Bindung zu inaktivieren<sup>132</sup>. Außerdem exprimieren PMN Adhäsionsmoleküle, die für die Angiogenese förderlich sind. So vermitteln z.B. das Integrin  $\alpha_v$ <sup>144</sup> und CD36<sup>205</sup> die Adhäsion von PMN an Endothelzellen<sup>205,206</sup>. Darüber hinaus wurde die Expression von Tie-2 in PMN bereits beschrieben<sup>207</sup>. Dieser Rezeptor wird im Zusammenhang mit seinen Liganden Ang-1 und -2 auf Endothelzellen, als einer der Hauptregulatoren der Angiogeneseinduktion verstanden<sup>208</sup>. Auf PMN exprimiert soll die Bindung von Ang-1 und -2 an Tie-2, eine Aktivierung der PMN und die Rekrutierung von PMN ins Entzündungsgebiet vermitteln<sup>207</sup>. Zuletzt wäre noch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) anzuführen, ein bedeutendes proangiogenetisches Enzym, das in humanen PMN bereits beschrieben wurde<sup>209</sup>.

Somit konnten verschiedene proangiogenetisch wirksame Faktoren, die in PMN exprimiert werden, mit Hilfe des *Microarrays* nicht nachgewiesen werden. Dies könnte eine Folge der stringenten Definition des „positiven Signals“ sein. Die stringente Definition führte zu einer hohen Spezifität, d.h. die Expression aller Gene mit Ausnahme von VE-Cadherin konnte mit Hilfe der RT-PCR Technik verifiziert werden. Die hohe Spezifität bedingt jedoch eine niedrige Sensitivität, die zu falsch-negativen Signalen führt. Dies wurde jedoch bewusst in Kauf genommen, um die Anzahl an falsch-positiven Signalen möglichst niedrig zu halten. Insgesamt konnten mit dieser Vorgehensweise in der vorliegenden Arbeit 10 Angiogenese-relevante Faktoren in humanen PMN neu identifiziert werden. Das Ergebnis schließt jedoch nicht aus, dass weitere angiogenetisch wirksame Gene in PMN exprimiert werden, die bisher jedoch nicht nachgewiesen werden konnten.

#### 4.1.2. Die Expression Angiogenese-relevanter Gene

PMN zirkulieren im Blutkreislauf, bis sie in infiziertes Gewebe rekrutiert werden. Zur Erfüllung ihrer Funktion ist Art der Grad der Aktivierung entscheidend. Die PMN reagieren auf eine Infektion zunächst mit der Freisetzung von ROS in ihre Granula zur Zerstörung des phagozytierten Materials. Bei nicht phagozytierbarem Material wird ROS in die Umgebung abgegeben. Die von PMN exprimierte NADPH Oxidase produziert sehr rasch ROS nach und ist für den sogenannten *Respiratory Burst* verantwortlich<sup>210</sup>. Die Aktivität der NADPH Oxidase wird u.a. über fMLP-Rezeptor Liganden induziert. In vivo wird der Rezeptor von formylierten Peptide von Bakterien aktiviert. Der fMLP-Rezeptor (FPR-1) ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der den MAP-Kinase-Weg induziert und die Phospholipase C aktiviert. So wird intrazellulär IP3 und Ca<sup>2+</sup> freigesetzt, das wiederum die Protein Kinase C und den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert, der für die Transkription von Zytokinen verantwortlich gemacht wird<sup>211</sup>. Die Aktivierung von PMN bei einer bakteriellen Infektion im Gewebe, entspricht in vitro der Stimulierung mit fMLP. Das Ergebnis ist die Hochregulierung von zahlreichen Genen u.a. Angiogenese-relevante Faktoren wie das CXC-Chemokin IL-8<sup>151</sup>, das zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer PMN führt<sup>16</sup>. Aber auch HPSE und MMP-9 werden auf mRNA-Ebene vermehrt synthetisiert. Wie bereits beschrieben sorgen diese Proteasen für die proteolytische Aktivierung der von PMN freigesetzten Faktoren sowie für die Degradierung der

ECM als essentielle Voraussetzung für die Angiogenese<sup>58,59</sup>. Hierbei werden auch zahlreiche in der ECM gebundene hochpotente proangiogenetische Faktoren freigesetzt wie TGF- $\beta$ 1, VEGF und bFGF<sup>62,166,167</sup>. bFGF konnte in humanen PMN nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchungen erfolgten sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene.

Die Freisetzung von IL-8 von humanen PMN ist abhängig von dessen Neusynthese<sup>151</sup>. Die IL-8 mRNA Expression wurde bereits nach fMLP-Stimulierung für 2 h hochreguliert. Die Synthese von IL-8 erfolgt sehr rasch, so dass bereits nach 6 h maximale Mengen von fMLP-stimulierten PMN ausgeschüttet wurden. Demgegenüber wurde die basale mRNA- oder Proteinsynthese von VEGF und TGF- $\beta$ 1 nach fMLP-Stimulation nicht gesteigert. Es erfolgte jedoch eine Freisetzung ausgehend von einem bereits bestehenden intrazellulären Pool. VEGF wird ebenso bis zu 24 h lang im zunehmenden Maße von fMLP-stimulierten humanen PMN freigesetzt. Demgegenüber scheint die Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 unabhängig von fMLP-Stimulation zu sein, da im Vergleich zum unstimulierten humanen PMN nie signifikant mehr freigesetzt wurde. Somit hat die Aktivierung humaner PMN eine vermehrte Freisetzung der zwei hochpotenten proangiogenetischen Faktoren IL-8 und VEGF zur Folge. Darüber hinaus setzen humane PMN offensichtlich konstitutiv TGF- $\beta$ 1 frei. Das könnte bedeuten, dass schon während der Abwehr die Induktion der Angiogenese in einer Wunde stattfindet.

In vivo existieren jedoch noch weitere Faktoren die stimulierend auf die Aktivität von PMN wirken. Bei der Wundheilung oder dem Wachstum maligner Tumoren, liegt ein Versorgungsdefizit im Gewebe vor. Dies verursacht eine Ischämie im betroffenen Gewebe, die in der Regel einhergeht mit hypoglykämischen und hypoxischen Bedingungen, Nährstoffmangel, einer Ansammlung metabolischer Abfallprodukte, einer erhöhten Laktatkonzentration und dadurch bedingt eine Reduktion des pH-Wertes<sup>212</sup>(Tabelle 5). Es gibt Hinweise, dass hypoxische Bedingungen ein essenzielles Erfordernis für die Synthese proangiogenetischer Faktoren wie VEGF von Immunzellen darstellen, zur Induktion der Angiogenese als Basis der Wundheilung<sup>162</sup>. Der Sauerstoffpartialdruck liegt im gesunden Gewebe bei mindestens 55 mm Hg. In den ersten beiden Tagen nach einer Verletzung nimmt

dieser auf bis zu 20-30 mm Hg stetig ab, zu einem Minimum von 5-7 mm Hg nach 5-7 Tagen<sup>213</sup>. Darüber hinaus könnte eine erhöhte Laktatkonzentration für eine vermehrte Freisetzung von VEGF verantwortlich sein. Dies wurde zumindest für Makrophagen gezeigt<sup>214</sup>.

**Tabelle 5: Physiologische Bedingungen in einer Wundgewebe.** Laktat- und pH-Wert im Wundgewebe, im Vergleich zu normalem Gewebe<sup>212</sup>.

Faktor	Normale Bedingungen	Wunde
Laktat	1,8 +/- 0,1 mM	10- 15 mM
Extrazellulärer pH	7,4	7

Die Auswirkung von Hypoxie auf die Expression und Freisetzung proangiogenetischer Faktoren wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Zunächst wurde gezeigt, dass unter hypoxischen Bedingungen die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  deutlich anstieg. Zusätzlich erfolgte eine unspezifische Induktion, die möglicherweise durch eine autokrine Stimulation von PMN hervorgerufen wurde. So wurde bereits gezeigt, dass ROS die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  induziert<sup>35</sup>. Ferner setzen humane PMN zahlreiche Faktoren frei (z.B. TGF- $\beta$ 1), die in der Lage sind, über einen p42/22- und NF $\kappa$ B-abhängigen Signalweg die Expression von HIF-1 $\alpha$  zu fördern<sup>215</sup>. Im Falle von TGF- $\beta$ 1 kommt es zu einer funktionellen Kooperation des zwischen den von TGF- $\beta$ 1 aktivierten Smads und HIF-1 $\alpha$ <sup>216</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte eine HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Induktion der IL-8, VEGF und TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression nachgewiesen werden. Jedoch wurde lediglich VEGF nach 6 h Inkubation unter hypoxischen Bedingungen im Vergleich zur Normoxie vermehrt freigesetzt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass hypoxische Bedingungen zwar die mRNA-Synthese von IL-8, VEGF und TGF- $\beta$ 1 fördern, jedoch nur zu einer vermehrten Freisetzung von VEGF führen. Hypoxische Bedingungen wirken darüber hinaus für PMN und HUVEC antiapoptotisch<sup>129,219-220</sup>.

## 4.2. Die Induktion der entzündlichen Angiogenese durch humane neutrophile Granulozyten

### 4.2.1. Einfluss der neutrophilen Granulozyten auf die mRNA- Expression in HUVEC

Das Gefäßendothel ist im Wundbereich einer Reihe von Stressfaktoren sowie einem Mangel von Nährstoffen und Sauerstoff ausgesetzt. Diese Einflüsse sorgen für eine Induktion proangiogenetischer Faktoren, die meist ein HRE besitzen, d.h. HIF-1 $\alpha$  abhängig reguliert werden<sup>34</sup>. Kennzeichnend für das hypoxische Gewebe ist eine Ansammlung von PMN, hervorgerufen durch eine vermehrte Migration der PMN in das hypoxische Gewebe<sup>221</sup>. Hierfür wird u.a. das für PMN potente Chemotaxin IL-8 verantwortlich gemacht, welches unter hypoxischen Bedingungen in HUVEC hochreguliert wird<sup>222</sup>. Darüber hinaus werden die Protease MMP-2 und das Zytokin MDK nachweislich unter hypoxischen Bedingungen induziert<sup>223,224</sup>. IL-8, MMP-2 und MDK gelten als hochwirksame proangiogenetische Faktoren<sup>225,226</sup>. Die Induktion der Synthese von HIF-1 $\alpha$ -abhängigen Faktoren in HUVEC kann überdies von Faktoren gewährleistet werden, die in den Signalweg von HIF-1 $\alpha$  eingreifen wie TGF- $\beta$ 1<sup>215</sup> oder auch ROS<sup>35</sup>. Diese Faktoren werden wiederum in großen Mengen von aktivierten PMN freigesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkung die von humanen PMN freigesetzte proangiogenetische Entität, hinsichtlich der Expression Angiogenese-relevanter Faktoren in HUVEC hat. Mit Hilfe eines *Microarrays* für Angiogenese-relevante Gene wurde gezeigt, dass die Inkubation von HUVEC mit PMN-Überstand für 6 h, die Expression der Zytokine IL-8, Gro- $\alpha$ , MCP-1 und MDK sowie der Proteinase MMP-2 in HUVEC induziert. Die Induktion dieser Faktoren in HUVEC wurden bei der Tumorangio-genese als Auslösung des angiogenetischen *Switch* bezeichnet<sup>227</sup>. Neben der Funktion als potente Chemotaxine für Leukozyten wurden diese Zytokine bereits als hochwirksame proangiogenetische Faktoren beschrieben<sup>78,228,229</sup>. Durch die Rekrutierung weiterer PMN wird die Freisetzung proangiogenetischer Zytokine im entzündlichen Gewebe erhöht. Allein die Adhäsion von humanen PMN an Endothelzellen hat eine Induktion proangiogenetischer Faktoren in HUVEC zur Folge. So wurde beschrieben, dass adhären-te PMN über Rezeptor-Ligandenbindung in HUVEC den Transkriptionsfaktor ets-1 induzieren<sup>114</sup>. Dieser

Transkriptionsfaktor sorgt für die Synthese von Metalloproteasen und uPA<sup>163</sup>, die im Rahmen der Induktion der entzündlichen Angiogenese zur Degradierung der Basalmembran und der ECM benötigt werden<sup>59</sup>.

Die essentielle Beteiligung von IL-8 und VEGF bei der Induktion der Angiogenese wurde bereits in der Maus gezeigt<sup>80</sup>. PMN sind während der ersten Stunden nach Beginn der Entzündung die Hauptquelle für VEGF<sup>230</sup> und MIP-2<sup>231</sup>, das Homolog zum humanen IL-8. In dieser Arbeit wurde der Effekt dieser beiden Faktoren auf mRNA-Ebene von HUVEC untersucht. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte gezeigt werden, dass sowohl VEGF als auch IL-8 die endotheliale IL-8 mRNA induziert<sup>232</sup>. Entsprechend induzierte der PMN-Überstand eine Induktion von endothelialer IL-8 mRNA-Expression in HUVEC. Zur Untersuchung der Identität der verantwortlichen Faktoren wurden Neutralisierungsexperimente durchgeführt. So konnte bereits in einem In vitro-Angiogenese-Assay von unserer Gruppe gezeigt werden, dass ein neutralisierender VEGF-Antikörper die PMN-vermittelte Angiogenese zu hemmen vermag<sup>151</sup>. Dies ist ein entscheidender Hinweis, dass von PMN freigesetztes VEGF eine wesentliche Rolle bei diesem Prozess spielt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein neutralisierender anti-IL-8-Antikörper die VEGF-vermittelte Induktion der Angiogenese in einem In-vitro-Angiogenese-Assay komplett hemmt. Ebenso zeigte die Neutralisierung von IL-8 mit spezifischen Antikörpern eine vollständige Hemmung der VEGF-vermittelten Induktion der endothelialen IL-8-mRNA-Expression. Dies deutet darauf hin, dass humane PMN einen parakrinen *Feedforward*-Mechanismus aktivieren, der zur Induktion der endothelialen IL-8 Expression führt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen den Schluss nahe, dass dieser *Feedforward*-Mechanismus zumindest für die VEGF-vermittelte Angiogenese in vitro essenziell ist.

#### **4.2.2. Die biologische Relevanz des proangiogenetischen Potenzials humaner neutrophiler Granulozyten**

Humane PMN setzen eine Vielzahl proangiogenetischer Faktoren frei. Das diese selbst ohne fMLP-Stimulation zu einem ausreichend proangiogenetischen Effekt in vivo führen konnte im CAM-Assay gezeigt werden. Diese Untersuchungen konnten nicht mit fMLP-enthaltenden Proben durchgeführt werden, da dadurch eine Entzündung hervorgerufen wurde, die das Ergebnis unbrauchbar machte. Die PMN-

vermittelte Induktion der Angiogenese übersteigt den Effekt von VEGF. Außerdem scheinen es sich im Falle der um ein organisierteres Netzwerk im Falle der PMN-induzierten Angiogenese, im Vergleich zur VEGF-induzierten zu handeln. Nach Isolierung der humanen PMN werden sie für bestimmte Zeit der Stimulation oder anderweitigen Behandlung bei 37°C in Kultur genommen. Hierbei kommt es zu einer unspezifischen Stimulierung durch die von PMN selbst ausgeschütteten Faktoren. Die unspezifische Stimulation durch diesen Cocktail an Wachstumsfaktoren, Proteasen und Zytokinen ergänzt selbstverständlich zusätzlich die fMLP-vermittelte Stimulation. Im Falle des *in vitro* Angiogeneseassays in welchen frisch-isolierte HUVEC auf Biosilikonkugel gesät wurden, konnten die fMLP-enthaltenden Überstände verwendet werden. Das fMLP-enthaltendes pures Medium keinen proangiogenetischen Effekt hat, wurde im voraus getestet. Allerdings stellten die von PMN in großen Mengen freigesetzten Proteasen (z.B. MMP-9, HPSE) ein Problem dar, sofern die dreidimensionale Fibrinmatrix spätestens am Tag 3 degradiert war. Auch in diesem Assay überstieg die proangiogenetische Wirkung der humanen PMN, die von VEGF-induzierte Angiogenese.

#### 4.3. Schlussfolgerung

Der Mechanismus, der die entzündliche Angiogenese induziert ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es scheint eher unwahrscheinlich, dass die Applikation eines einzelnen Faktors die Bildung von funktionellen Gefäßen und einer intakten Mikrozirkulation *in vivo* induzieren kann. Tumorgefäße sind in der Regel völlig desorganisiert und weisen eine abnormale Mikrozirkulation auf<sup>53</sup>. So ist es fraglich, ob die Identifikation von Faktoren, die die Tumorangio-genese induzieren, zur Aufklärung des Mechanismus der Bildung eines funktionellen mikrovaskulären Netzwerks beitragen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass humane PMN die Fähigkeit besitzen, direkt die Aussprossung kapillärer Strukturen *in vitro* und *in vivo* zu induzieren. Neovaskularisierung durch Aussprossung spielt eine entscheidende Rolle bei der Entzündung und der Wundheilung. Außerdem kann dieses proangiogenetische Potenzial unter hypoxischen Bedingungen und durch fMLP-Stimulation gesteigert werden. Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass humane PMN eine proangiogenetische Entität freisetzen, die in der Lage ist, die entzündungsvermittelte Angiogenese direkt induzieren. Im Gegensatz

zu Monozyten und Lymphozyten, benötigen PMN für deren Infiltration ins entzündliche Gewebe das Leukozyten-Adhäsionsmolekül der  $\beta_2$ -Integrin Familie (CD11/CD18). Nach Deletion von CD18 in der Maus wurde die PMN-Infiltration ins entzündete Gewebe erheblich eingeschränkt. In diesen Mäusen konnte eine starke Hemmung der entzündungsvermittelten Angiogenese demonstriert werden<sup>233</sup>. Andere Untersuchungen zeigten, dass das Fehlen des  $\beta_2$ -Integrins in diesem Modell mit einer verzögerten Wundheilung assoziiert war<sup>18</sup>.

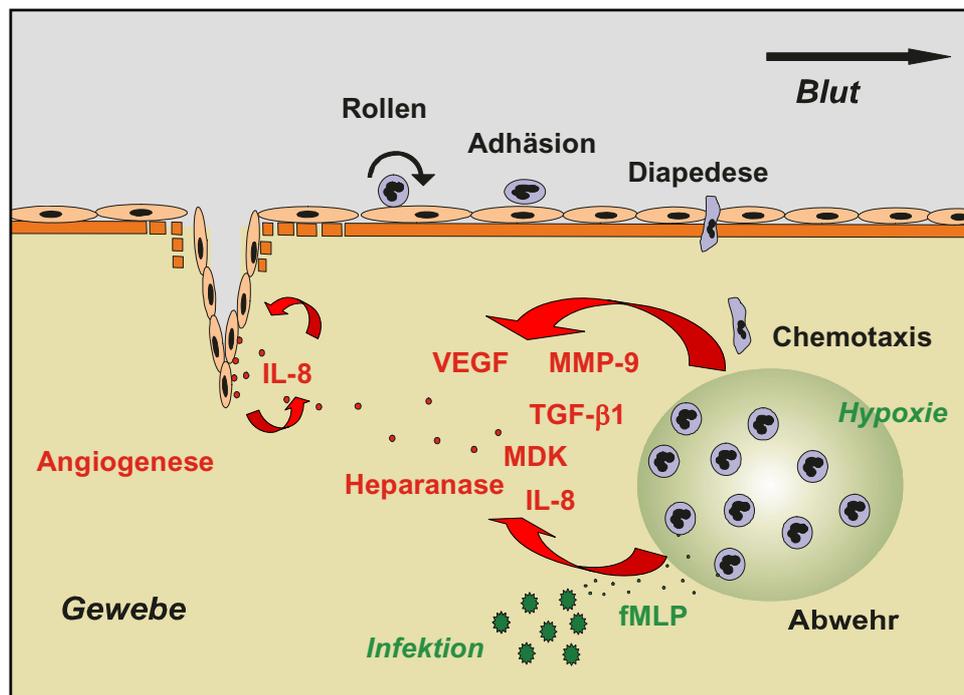
Im Rahmen dieser Arbeit wurde deutlich, dass bei der Ausbildung eines funktionellen Netzwerks ein komplexes Zusammenspiel verschiedener proangiogenetischer Faktoren erforderlich ist. Die Kenntnis der Identität dieser Faktoren ist bei der Behandlung von einer Reihe Angiogenese-abhängiger Krankheiten von enormer Bedeutung. Daher ist die Aufklärung des Mechanismus der Angiogenese in der Wundheilung nicht nur wichtig, um den physiologischen Prozess der Angiogenese zu verstehen. Die Identifizierung der Faktoren, die unter physiologischen Bedingungen die Angiogenese vermitteln, erlaubt möglicherweise auch die Entwicklung neuer Konzepte für die therapeutische Induktion der Angiogenese.

## 5. Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten (PMN) haben bei der unspezifischen Abwehr und der Entzündungsreaktion eine essenzielle Rolle und sind an der Induktion der entzündungsvermittelten Angiogenese beteiligt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden molekulare und zelluläre Mechanismen entschlüsselt, die für diesen Effekt verantwortlich sind. Zunächst wurde die molekulare Identität der verantwortlichen Faktoren untersucht. Mit Hilfe eines Mikroarrays für Angiogenese-relevante Gene wurde die Expression von 18 bereits bekannten Faktoren bestätigt und 10 neue Faktoren gezeigt: Midkine (MDK), erb-B2, ets-1, *Transforming Growth Factor- $\beta$*  Rezeptor-2 und -3, Thrombospondin, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2*, Ephrin A2, Ephrin B2, und Restin. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der RT-PCR-Technik bestätigt. Die Expression des löslichen proangiogenetischen Faktors MDK wurde in humanen PMN zusätzlich auf Proteinebene untersucht. Nach 6 h Stimulation mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP konnte eine Induktion der physiologisch relevanten dimeren Form von MDK nachgewiesen werden. Ferner wurde eine Zunahme der mRNA-Expression der beiden Proteasen Metalloproteinase-9 (MMP-9) und Heparanase (HPSE) in humanen PMN nach fMLP-Stimulation für 1 h bzw. 2 h festgestellt. Diese Proteasen sind für die Degradierung der ECM sowie für die Aktivierung zahlreicher proangiogenetischer Faktoren, die von humanen PMN freigesetzt werden, von entscheidender Bedeutung. Überdies wurden Mechanismen untersucht, die für die Induktion der Synthese von VEGF, IL-8 und TGF- $\beta$ 1 in humanen PMN verantwortlich sind. So konnte eine Induktion der mRNA-Expression der Angiogenese-relevanten Faktoren Interleukin-8 (IL-8), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und *Transforming Growth Factor- $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) durch Hypoxie gezeigt werden. Die Expression von *Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) erfolgt unter hypoxischen Bedingungen sowie durch autokrine Wirkung von Zytokinen, die von den humanen PMN in Kultur freigesetzt werden. Eine substantielle Freisetzung unter Hypoxie konnte lediglich für VEGF ermittelt werden. Zur Charakterisierung der biologischen Relevanz der erhobenen Befunde wurde der In vitro-Angiogenese-Assay durchgeführt. Hierzu wurden frisch isolierte humane Endothelzellen auf Biosilikonkugeln gebracht, die in eine dreidimensionale Fibrinmatrix eingebettet wurden. Unter Verwendung eines neutralisierenden IL-8 Antikörpers wurde hierbei gezeigt, dass endotheliales IL-8 bei der PMN-vermittelten Angiogenese eine entscheidende Bedeutung hat. Darüber hinaus konnte der

proangiogenetische Effekt von VEGF in Gegenwart eines neutralisierenden anti-IL-8-Antikörpers komplett gehemmt werden. Dies deutet darauf hin, dass ein parakriner *Feedforward*-Mechanismus, der endotheliales IL-8 beinhaltet die Angiogenese fördert. Des Weiteren wurde der proangiogenetische Effekt humaner PMN in vivo demonstriert. Im *Chorionallantoic-Membrane-Assay* wurde eine signifikante Angiogenese-Induktion durch humane PMN nachgewiesen, die zuvor unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden.

Abschließend wurde mit Hilfe eines *Microarrays* analysiert, wie humane Endothelzellen auf mRNA-Ebene die PMN-vermittelten Signale umsetzen. Die Stimulation humaner Endothelzellen mit PMN-Überständen zeigte eine Induktion der mRNA-Synthese der CXC-Chemokine IL-8, *Macrophage Chemotactic Protein* (MCP-1), *Growth Related Oncogene- $\alpha$*  (GRO- $\alpha$ ), MDK und MMP-2. Alle Faktoren konnten bereits eine Rolle bei der Induktion der Angiogenese. Insofern wurde dargelegt, dass PMN in humanen Endothelzellen einen angiogenetischen *Switch* auslösen.



**Abbildung 23: Die PMN-vermittelte Induktion der entzündlichen Angiogenese.** Die Freisetzung und Synthese proangiogenetischer Faktoren durch PMN erfolgt nach Stimulation mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP sowie durch hypoxische Bedingungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Faktoren VEGF, TGF- $\beta$ 1, IL-8, MMP-9, HPSE und MDK näher untersucht. Die proangiogenetische Entität von humanen PMN induziert die Angiogenese in vitro und in vivo. Endotheliales IL-8 ist bei diesem Prozess entscheidend beteiligt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass humane PMN über ein proangiogenetisches Potenzial verfügen, dass durch pathophysiologische Bedingungen im entzündlichen Gewebe enorm gesteigert wird. Dieses Potenzial hat biologische Relevanz, da aktivierte PMN nicht nur in vitro, sondern auch in vivo die entzündliche Angiogenese stimulieren. In Abbildung 23 sind die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zusammenfassend dargestellt.

## 6. Anhang

Bezeichnung	Literatur
Angiomotin	143
ANG	235
CD36	205
COX-2	147
EGF	193
EGF-R	194
ENA-78	236
Endoglin (ENG)	237
FLK-1/KDR	188
FLT1	189
FN	238
GM-CSF	239
GRO $\alpha$	140
HPSE	58
HGF	134
HIF1 $\alpha$	141
ID1	240
IFN $\alpha$ 1	241
IFN $\gamma$	201
IGF1	200
IGTAV/CD51	144
IL-1 $\beta$	125
IL-1	242
IL-1Ra	125
IL-3	243
IL-6	242
IL-8	15
IL-10	244
IL-12a	245
Integrin $\alpha$ 5	143
Integrin $\beta$ 3	144
MCP-1/SCYA2	195
MIP-1a	246
MMP-9	112
NOS3/eNOS	207
PECAM-1	145
PGF	183
SERPINB5/Maspin/PI5	243
SPP1/OPN	247
TGF- $\alpha$	108
TGF- $\beta$ 1	109
TGF- $\beta$ 2	202
TGF $\beta$ R1	142
TIE-2	205
TIMP1	148
TNF- $\alpha$	13
uPA	113
VEGF C	190
VEGF D	190
VEGF	107

Tab. 6: Übersicht über eine Auswahl bekannter Angiogenese-relevante Faktoren in humanen PMN.

**Tab. 7: Relative Expression Angiogenese-relevanter Gene in humanen PMN.** Das Ergebnis stellt die 4 unabhängigen Experimente mit humanen PMN von 4 verschiedenen Spendern dar. Es wurden *Microarrays* (HS-009N-4, Superarray, Bethesda, MD) mit 2 verschiedenen Chargennummern verwendet (1906 und 0507). Die Signale wurden als positiv definiert, wenn sie in mindestens 2 der 4 *Microarrays* nachgewiesen wurden und hierbei in jeder Chargennummer mindestens einmal detektiert werden konnten. Die relative Genexpression wurde mit Hilfe von  $\beta$ -Aktin berechnet. \* Bisher in humanen PMN unbekannte Gene; n.n., nicht nachgewiesen.

Gene	relative Genexpression			
	Microarray Charge # 1906		Microarray Charge # 9191	
	Array 1	Array 2	Array 3	Array 4
uPA	n.n.	0.02	0.32	0.23
*erb-B2	0.08	0.05	0.42	0.33
T $\beta$ RI	0.03	n.n.	0.36	0.31
TGF- $\beta$ 1	0.14	0.08	0.35	0.42
TIMP-1	0.10	n.n.	0.34	0.35
VEGF	n.n.	0.06	0.33	0.41
*ephrin A2	0.10	n.n.	0.45	0.33
*ephrin B2	0.08	n.n.	0.46	0.35
integrin $\beta$ 3	n.n.	0.31	n.n.	0.30
GRO $\alpha$	0.27	0.29	0.43	0.27
CHGA	0.20	0.42	0.42	0.31
*THBS3	n.n.	0.31	n.n.	0.39
TGF- $\alpha$	0.24	n.n.	0.44	0.42
*TIMP-2	0.31	0.14	0.70	0.35
*Restin	0.27	0.36	0.43	0.49
*VE-Cadherin	0.32	0.57	0.43	0.29
MMP-9	0.27	0.16	0.68	0.52
PECAM-1	0.52	0.18	0.50	0.53
*ets-1	n.n.	0.49	n.n.	0.39
HIF-1 $\alpha$	0.63	0.42	0.68	0.36
TNF $\alpha$	0.31	0.37	1.10	0.39
*T $\beta$ RII	0.37	n.n.	0.93	0.35
Cox-2	0.86	0.30	0.71	0.41
*MDK	0.48	0.34	1.03	0.44
integrin $\alpha$ 5	0.28	n.n.	0.97	n.n.
HPSE	0.39	0.25	1.44	0.43
IL-8	1.76	0.91	1.95	0.50
*T $\beta$ RIII	2.55	0.54	1.59	0.45

## 6. Literaturverzeichnis

1. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; 420: 846-852.
2. Maianski NA, Maianski AN, Kuijpers TW, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol* 2004; 111: 56-66.
3. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 7: 301-314.
4. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 255-266.
5. Walzog B, Gaetgens P. Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. *News Physiol Sci* 2000; 15: 107-113.
6. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, McEver RP, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993; 92: 559-570.
7. Dubravec DB, Spriggs DR, Mannick JA, Rodrick ML. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6758-6761.
8. Issekutz AC, Rowter D, Springer TA. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 117-126.
9. Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik AB. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol* 1993; 264: L406-L412.
10. Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 2004; 167: 377-388.
11. Nourshargh S, Marelli-Berg FM. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol* 2005; 26: 157-165.
12. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microb Inf* 2003; 5: 1317-1327.
13. Snyderman R, Pike MC. Transductional mechanism of chemoattractant receptors on leukocytes. *Contemp Top Immunobiol* 1984; 14: 1-28.
14. Mariano F, Bussolati B, Migliori M, Russo S, Triolo G, Camusi G. Platelet-activating factor synthesis by neutrophils, monocytes, and endothelial cells is modulated by nitric oxide production. *Shock* 2003; 19: 339-344.
15. Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi F, Ceska M, Dewald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J Exp Med* 1991; 173: 771-774.
16. Cassatella MA, Bazzoni F, Ceska M, Ferro I, Baggiolini M, Berto G. IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Immunol* 1992; 148: 3216-3220.
17. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leuk Biol* 1994; 56: 672-686.

18. Peters T, Sindrilaru A, Hinz B, Hinrichs R, Menke A, Al-Azzeh EA, Holzwarth K, Oreshkova T, Wang H, Kess D, Walzog B, Sulyok S, Sunderkotter C, Friedrich W, Wlaschek M, Krieg T; Scharffetter-Kochanek K. Wound-healing defect of CD18<sup>-/-</sup> mice due to a decrease in TGF- $\beta$ 1 and myofibroblast differentiation. *EMBO J* 2005; 24: 3400-3410.
19. Della-Bianca V, Grzeskowiak M, Rossi F. Studies on molecular regulation of phagocytosis and activation of the NADPH oxidase in neutrophils. IgG- and C3b-mediated ingestion and associated respiratory burst independent of phospholipid turnover and Ca<sup>2+</sup> transients. *J Immunol* 1990, 144: 1411-1417.
20. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1025-1042.
21. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol* 2002; 86: 41-59.
22. Brigham KL. Role of free radicals in lung injury. *Chest* 1986; 86: 859-863.
23. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 2005; 6: 1191-1197.
24. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation. *Am J Surgery* 2004; 187: 11S-16S.
25. Smith RE, Strieter RM, Zhang K, Phan SH, Standiford TJ, Lukas NM, Kunkel SL. A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 782-787.
26. Low QE, Drugea IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, Kovacs EJ, DiPietro LA. Wound healing in MIP-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> and MCP-1<sup>-/-</sup> mice. *Am J Pathol* 2001; 159: 457-463.
27. Yamahiro S, Kamohara H, Yoshimura T. Alternations in the responsiveness to tumour necrosis factor- $\alpha$  is crucial for maximal expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human neutrophils. *Immunology* 2000; 101: 97-103.
28. Ajuebor MN, Flower RJ, Hannon R, Christie M, Bowers K, Verity A, Perretti M. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 108-116.
29. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 91-104.
30. Barringhaus KG, Phillips JW, Thatte JS, Sanders JM, Czarnik AC, Bennett DK, Ley KF, Sarembock IJ.  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin (VLA-4) blockade attenuates both early and late leukocyte recruitment and neointimal growth following carotid injury in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *J Vasc Res* 2004; 41: 252-260.
31. Li XC, Miyasaka M, Issekutz TB. Blood monocyte migration to acute lung inflammation involves both CD11/CD18 and very late activation antigen-4-dependent and independent pathways. *J Immunol* 1998; 161: 6258-6264.
32. Weaver CT, Unanue ER. T cell induction of membrane IL-1 on macrophages. *J Immunol* 1986; 137: 3868-3873.

33. Cramer T, Johnson RS. A novel role for the hypoxia inducible factor HIF-1 $\alpha$ : critical regulation of inflammatory cell function. *Cell Cycle* 2003; 2: 192-193.
34. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9: 677-684.
35. Kietzmann T, Gorkach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 474-486.
36. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. HIF-1 $\alpha$  is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 2003; 113: 645-657.
37. Ferrara N, Davis-Smith T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
38. Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, Kim RY, Rohan RM, Colby KA, Yeo K-T, Adamis AP. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1996; 98: 1667-1675.
39. Burns PA, Wilson DJ. Angiogenesis mediated by metabolites is dependent on vascular endothelial growth factor. *Angiogenesis* 2003; 6: 73-77.
40. Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, Capogrossi MC, Napolitano M. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods* 2003; 273: 83-101.
41. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am* 1997; 77: 509-528.
42. O'Toole EA. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 525-530.
43. Risau W. Mechanism of Angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
44. Carmeliet P. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature* 2000; 6: 389-395.
45. Gargett CE, Rogers PAW. Human endometrial angiogenesis. *Reproduction* 1997; 121: 181-186.
46. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking through hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10: 858-864.
47. Gerber HP, Malik AK, Gregg PS, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters, Ferrara N. VEGF regulates hematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 2002; 417: 606-612.
48. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998; 125: 1591-1598.
49. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanism of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 634-646.

50. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 1999; 4: 915-924.
51. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309.
52. Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, Ferrara N. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptorspecific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* 2001; 276: 3222-3230.
53. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249- 257.
54. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, Glazer N, Holash J, McDonald DM, Yancopoulos GD. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000; 6: 460-463.
55. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewsky C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997, 277: 55-60.
56. Mandriota SJ, Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* 1998; 83: 852-859.
57. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases : VEGF, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999; 13: 1055-1066.
58. Matzner Y, Bar-Ner M, Yahalom J, Ishai-Michaeli R, Fuks Z, Vlodaysky I. Degradation of heparan sulfate in the subendothelial extracellular matrix by a readily released heparanase from human neutrophils. Possible role in invasion through basement membranes. *J Clin Invest* 1985; 76: 1306-1313.
59. Shapiro SD. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 602-608.
60. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisan LM. Matrix Metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1135-1149.
61. Nakajima M, Irimura T, Nicolson G. Heparanases and tumor metastasis. *J Cell Biochem* 1988; 36: 157-167.
62. Schonherr E, Hausser HJ. Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol* 2000; 7: 89-101.
63. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 737-744.
64. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, Berger JE, Helms JA, Hanahan D, Shapiro SD, Senior RM, Werb Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertonic chondrocytes. *Cell* 1998; 86: 952-659.

65. Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW, So JN, Koh KN, Ahn BC, Koh GY. Angiopoietin induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res* 2000; 86: 952-959.
66. George SJ, Johnson JL, Smith MA, Angelini GD, Jackson CL. Transforming growth factor- $\beta$  is activated by plasmin and inhibits smooth muscle cell death in human saphenous vein. *J Vasc Res* 2005; 42: 247-254.
67. Heymans S, Lutun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, Cleutjens JP, Shipley M, Angellilo A, Levi M, Nube O, Baker A, Keshet E, Lupu F, Herbert JM, Smits JF, Shapiro SD, Baes M, Borgers M, Collen D, Daemen MJ, Carmeliet P. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and cause cardiac failure. *Nat Med* 1999; 5: 1135-1142.
68. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60: 203-212.
69. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 2000; 55: 15-35.
70. Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF. Mice lacking the vascular endothelial factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000; 86: E29-E35.
71. Eriksson U, Alitalo K. Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 41-57.
72. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998; 282: 946-949.
73. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-198.
74. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa SI, Kubo H, Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumour cells via the lymphatics. *Nature Med* 2001; 7: 186-191.
75. Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J* 2001; 20: 1223-1231.
76. Carmeliet N. Fibroblast growth factor-1 stimulates branching and survival of myocardial arteries: a goal for therapeutic angiogenesis? *Circ Res* 2000; 87: 176-178.
77. Tanaka E, Ase K, Okuda T, Okumura M, Nogimori K. Mechanism of acceleration of wound healing by basic fibroblast growth factor in genetically diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 1141-1148.

78. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SJ, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan SY, Roczniak S, Shanafelt AB. The functional role of the ERL motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270: 27348-27357.
79. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 1-8.
80. Scapini P, Morini M, Tecchio C, Minghelli S, Carlo EC, Tanghetti E, Albin A, Lowell C, Berton G, Noonan DM, Cassatella MA. CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *J Immunol* 2004; 172: 5034-5040.
81. Ohki Y, Heissig B, Sato Y, Akiyama H, Zhu Z, Hicklin DJ, Shimada K, Ogawa H, Daida H, Hattori K, Ohsaka A. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB* 2005; 19: 2005-2007.
82. Guo DQ, Wu LW, Dunbar JD, Ozes ON, Mayo LD, Kessler KM, Gustin JA, Berwald MR, Jaffe EA, Warren RS, Donner DB. Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 2000; 275:11216-11221.
83. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of  $\alpha_v$  integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999; 103: 1227-1230.
84. Ilan N, Mahooti S, Rimm DL, Madri JA. PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated  $\beta$ -catenin. *J Cell Sci* 1999; 112: 3005-3014.
85. Huynh-Do U, Stein E, Lane AA, Liu H, Cerretti DP, Daniel TO. Surface densities of ephrin-B1 determines EphB1-coupled activation of cell attachment through  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrins. *EMBO J* 1999; 18: 2165-2173.
86. Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *Int Rev Cytol* 2000; 196: 177-244.
87. Varner JA, Brooks PC, Cheresh DA. REVIEW: the integrin  $\alpha_v\beta_3$ : angiogenesis and apoptosis. *Cell Adhes Commun* 1995; 3: 367-374.
88. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin  $\alpha_v\beta_3$  for angiogenesis. *Science* 1994; 264: 569- 571.
89. Heibling PM, Saulnier DM, Brandli AW. The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrin-B ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development* 2000; 127: 269-278.
90. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999; 13: 295-306.
91. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann

- R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-Cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999; 98: 147-157.
92. Parekh T, Saxena B, Reibman J, Cronstein BN, Gold LI. Neutrophil chemotaxis in response to TGF-beta isoforms (TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3) is mediated by fibronectin. *J Immunol* 1994; 152: 2456-2466.
93. Shovlin CL. Supermodels and disease: insights from the HHT mice. *J Clin Invest* 1999; 104: 1534-1537.
94. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9815-9820.
95. Knudsen KA, Frankowski C, Johnson KR, Wheelock MJ. A role for cadherins in cellular signaling and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 31: 168-176.
96. Lindahl P, Bostrom H, Karlsson L, Hellstrom M, Kalen M, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in angiogenesis and alveogenesis. *Curr Top Pathol* 1999; 93: 27-33.
97. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 1993; 122: 497-511.
98. Bein K, Simons M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* 2000; 275: 32167-32173.
99. Sang QX. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res* 1998; 8: 171-177.
100. Kupprion C, Motamed K, Sage EH. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 29635-29640.
101. Pece S, Chiariello M, Murga C, Gutkind JS. Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* 1999; 274: 19347-19351.
102. Gerber H, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 30336-30343.
103. Limaye V, Li X, Hahn C, Xia P, Berndt MC, Vadas MA, Gamble JR. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood* 2005; 105: 3169-3177.
104. Gao C, Sun W, Christofidou-Solomidou M, Sawada M, Newman DK, Bergom C, Albelda SM, Matsuyama S, Newman PJ. PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis; *Blood* 2003; 102: 169-179.

105. Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, Resnick N. VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9462–9467.
106. Wong ME, Hollinger JO, Pinero GJ. Integrated processes responsible for soft tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 1996; 82: 475-492.
107. Gaudry M, Br gerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997; 90: 4153-4161.
108. Calafat J, Janssen H, Stahle-Backdahl M, Zuurbier AE, Knol EF, Egesten A. Human monocytes and neutrophils store transforming growth factor- $\alpha$  in a subpopulation of cytoplasmic granules. *Blood* 1997; 90: 1255-1266.
109. Grotendorst GR, Smale G, Pancev D. Production of transforming growth factor  $\beta$  by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J Cell Physiol* 1989; 140: 396-402.
110. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Role of  $\beta_2$ -integrins for homing and neovascularisation capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med* 2005; 201: 63-72.
111. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18: 3964-3972.
112. Dewald B, Bretz U, Baggiolini M. Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils. *J Clin Invest* 1982; 70: 518-525.
113. Heiple JM, Ossowski L. Human neutrophil plasminogen activator is localized in specific granules and is translocated to the cell surface by exocytosis. *J Exp Med* 1986; 164: 826-840.
114. Yasuda M, Shimizu S, Ohhinata K, Naito S, Tokuyama S, Mori Y, Kiuchi Y, Yamamoto T. Differential roles of ICAM-1 and E-selectin in polymorphonuclear leukocyte-induced angiogenesis. *Am J Cell Physiol* 2002; 282: C917-C925.
115. DiPietro LA. Wound healing and the role of the macrophage in wound repair. *Shock* 1995; 4: 233-240.
116. Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukocyte Biol* 1994; 55: 410-22.
117. Danon D, Kowatch MA, Roth GS. Promotion of repair in old mice by local injection of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2018-2020.
118. Flood L, Constance A. Diabetes and exercise safety. *Am J Nurs* 2002; 102: 47-55.
119. Chbinou N, Frenette J. Insulin-dependent diabetes impairs the inflammatory response and delays angiogenesis following Achilles tendon injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286: R952–R957.
120. Furukawa S, Saito H, Matsuda T, Inoue T, Fukatsu K, Han I, Ikeda S, Hidemura A, Muto T. Relative effect of glucose and glutamin on reactive oxygen intermediate production by neutrophils. *Shock* 2000; 13: 274-278.

121. Alba-Loureiro TC, Hirabara SM, Mendonca JR, Curi R, Pithon-Curi TC. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. *J Endocrinol* 2006; 188: 295-303.
122. Nabi AH, Islam LN, Rahman MM, Biswas KB. Polymorphonuclear neutrophil dysfunctions in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J Biochem Mol Biol* 2005; 30; 38: 661-667.
123. da Costa Pinto FA, Malucelli BE. Inflammatory infiltrate, VEGF and FGF-2 contents during corneal angiogenesis in STZ-diabetic rats. *Angiogenesis* 2002; 5: 67-74.
124. Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 1999; 73: 369-509.
125. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2000; 177: 195-203.
126. Matusmoto T, Ikeda K, Mukaida N, Harada A, Matusmoda Y, Yamashida J, Matusushima K. Prevention of cerebral edema and infarct in cerebral reperfusion injury by an antibody to IL-8. *Lab Invest* 1997; 77: 119-125.
127. Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE. Macrophages phagocytosis of wound neutrophils. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 35-42.
128. Rappolee DA, Mark D, Banda MF, Werb Z. Wound macrophages express TGF- $\alpha$  and other factors in vivo: Analysis by mRNA phenotyping. *Science* 1988; 241: 708-712.
129. Li A. IL-8 directly enhanced EC-survival, proliferation, MMP-9 production and regulated AG. *J Immunol* 2003; 170: 3369-3376.
130. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, Buechi L, Walz A, Richmond A, Strieter RM. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, a putative receptor for ELR<sup>+</sup> CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 2000; 165: 5269-5277.
131. Devalaraja RM, Nanney LB, Qian Q, Du J, Yu Y, Devalaraja MN, Richmond A. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 234-244.
132. Benelli R, Morini M, Carrozzino F, Ferrari N, Minghelli S, Santi L, Cassatella M, Noonan DM, Albin A. Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J* 2002; 16: 267-269.
133. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248.
134. Grenier A, Chollet-Martin S, Crestani B, Delarche C, El Benna J, Boutten A, Andrieu V, Durand G, Gougerot-Pocidallo MA, Aubier M, Dehoux M. Presence of a mobilizable intracellular pool of hepatocyte growth factor in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 2002; 99: 2997-3004.
135. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4015-4023.

136. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential depositions into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317-1326.
137. Donald C, Anderson M D. Leukocyte adhesion deficiency: an inherent defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Ann Rev Med* 1987; 38: 175-194.
138. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Addadi-Rebbah S, Jallot E, Laurent-Maquin D, Frayssinet P, Guenounou M. MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in the presence of different forms of hydroxyapatite particles. *Biomaterials* 2004; 25: 2515-2524.
139. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2<sup>+</sup>AC133<sup>+</sup> endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; 88: 167-174.
140. Gasperini S, Calzetti F, Russo MP, De Gironcoli M, Cassatella MA. Regulation of GRO  $\alpha$  production in human granulocytes. *J Inflamm* 1995; 45: 143-151.
141. Mecklenburgh KI, Walmsley SR, Cowburn AS, Wiesener M, Reed BJ, Upton PD, Deighton J, Greening AP, Chilvers ER. Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis. *Blood* 2002; 100: 3008-3016.
142. Brandes ME, Mai UE, Ohura K, Wahl SM. Type I transforming growth factor- $\beta$  receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor- $\beta$ . *J Immunol* 1991; 47: 1600-1606.
143. Lishko VK, Novokhatny VV, Yakubenko VP, Skomorovska-Prokvolit HV, Ugarova TP. Characterization of plasminogen as an adhesive ligand for integrins  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1) and  $\alpha_5\beta_1$  (VLA-5). *Blood* 2004; 104: 719-726.
144. Janardhan KS, Appleyard GD, Singh B. Expression of integrin subunits  $\alpha_v$  and  $\beta_3$  in acute lung inflammation. *Histochem Cell Biol* 2004; 121: 383-390.
145. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993; 178: 449-460.
146. Kreis C, La Fleur M, Menard C, Paquin R, Beaulieu AD. Thrombospondin and fibronectin are synthesized by neutrophils in human inflammatory joint disease and in a rabbit model of in vivo neutrophil activation. *J Immunol* 1989; 143: 1961-1968.
147. Niiro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Niho Y. Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 1997; 89: 1621-1628.
148. Triebel S, Blaser J, Gote T, Pelz G, Schuren E, Schmitt M, Tschesche H. Evidence for the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Biochem* 1995; 231: 714-719.
149. Tasiemski A, Hammad H, Vandenbulcke F, Breton C, Bilfinger TJ, Pestel J, Salzet M. Presence of chromogranin-derived antimicrobial peptides in plasma during coronary artery bypass surgery and evidence of an immune origin of these peptides. *Blood* 2002; 100: 553-559.
150. Kojima S, Inui T, Muramatsu H, Suzuki Y, Kadomatsu K, Yoshizawa M, Hirose S, Kimura T, Sakakibara S, Muramatsu T. Dimerization of Midkine by tissue transglutaminase and its functional implication. *J Biol Chem* 1997; 272: 7410-7416.

151. Schrufer R, Lutze N, Schymeinsky J, Walzog B. Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1186-H1192.
152. Brooks PC, Montgomery AM, Cheresh DA. Use of the 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis. *Methods in Molecular Biology* 1999; 129: 257-270.
153. Loukinova E, Dong G, Enamorado-Ayalya I, Thomas GR, Chen Z, Schreiber H, Van Waes C. Growth regulated oncogene- $\alpha$  expression by murine squamous cell carcinoma promotes tumor growth, metastasis, leukocyte infiltration and angiogenesis by a host CXC receptor-2 dependent mechanism. *Oncogene* 2000; 19: 3477-3486.
154. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Ullrich A, Heine, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS. Transforming growth factor type  $\beta$ : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4167-4171.
155. Takada T, Kinkori T, Muramatsu H, Hayakawa A, Torii S, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine, is a novel regulator of intracellular calcium in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 756-761.
156. Takada T, Toriyama K, Muramatsu H, Song XJ, Torii S, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J Biochem* 1997; 122: 453-458.
157. Sato W, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Muramatsu H, Hotta N, Matsuo S, Muramatsu T. Midkine is involved in neutrophil infiltration into the tubulointerstitium in ischemic renal injury. *J Immunol* 2001; 167: 3463-3469.
158. Muramaki M, Miyake H, Hara I, Kamidono S. Introduction of midkine gene into human bladder cancer cells enhances their malignant phenotype but increases their sensitivity to antiangiogenic therapy. *Clin Canc Res* 2003; 9: 5152-5160.
159. Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Ziche M, Bicknell R. An angiogenic role for the neurokines midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Canc Res* 1997; 57: 1814-1819.
160. Ikematsu S, Yano A, Aridome K, Kikuchi M, Kumai H, Nagano H, Okamoto K, Oda M, Sakuma S, Aikou T, Muramatsu H, Kadomatsu K, Muramatsu T. Serum midkine levels are increased in patients with various types of carcinomas. *Br J Cancer* 2000; 83: 701-706.
161. Wang SC, Lien HC, Xia W, Chen IF, Lo HW, Wang Z, Ali-Sayed M, Lee DF, Bartholomeusz G, Ou-Yang F, Giri DK, Hung MC. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Canc Cell* 2004; 6: 251-261.
162. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732.
163. Oda N, Abe M, Sato Y. Ets-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin  $\beta$ 3. *J Cell Physiol* 1999; 178: 121-132.

164. Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1996; 169: 522-531.
165. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001; 29: 117-129.
166. Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *End Rel Canc*; 7: 165-197.
167. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential depositions into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317-1326.
168. Iniguez MA, Rodriguez A, Volpert OV, Fresno M, Redondo JM. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 2003; 9: 73-78.
169. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- $\beta$  receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 301-307.
170. Pepper MS. Transforming growth factor- $\beta$ : vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 21-43.
171. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- $\beta$  in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 6271-6274.
172. Sehgal I, Thompson TC. Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor- $\beta$ 1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 407-416.
173. Hynes O. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48: 549-554.
174. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T, Fässler R. Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 2002; 109: 999-1006.
175. Iruela-Arispe ML, Luque A, Lee N. Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1070-1078.
176. Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 475-486.
177. Liu XH, Kirschenbaum A, Yu K, Yao S, Levine AC. Cyclooxygenase-2 suppresses hypoxia-induced apoptosis via a combination of direct and indirect inhibition of p53 activity in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem* 2005; 280: 3817-3823.
178. Harada H, Nakagawa K, Saito M, Kohno S, Nagato S, Furukawa K, Kumon Y, Hamada K, Ohnishi T. Introduction of wild-type p53 enhances thrombospondin-1 expression in human glioma cells. *Cancer Lett* 2003; 191: 109-119.
179. Galimi F, Cottone E, Vigna E, Arena N, Boccaccio C, Giordano S, Naldini L, Comoglio PM. HGF is a regulator of monocyte-macrophage function. *J Immunol* 2001; 166: 1241-1247.

180. Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, Folkman J, Dvorak HF, Brown LF, Berse B, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol* 1994; 145: 574-584.
181. Derynck R. The physiology of transforming growth factor- $\alpha$ . *Adv Canc Res* 1992; 58: 27-52.
182. Cursiefen C, Rummelt C, Kuchle M. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor- $\alpha$ , and transforming growth factor- $\beta$ 1 in human corneas with neovascularization. *Cornea* 2000; 19: 526-533.
183. Kumazaki K, Nakayama M, Suehara N, Wada Y. Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions. *Hum Pathol* 2002; 33: 1069-1077.
184. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesion of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 15442-15451.
185. Lutun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PIGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt-1. *Nat Med* 2002; 8: 831-840.
186. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003; 9: 936-943.
187. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ulrich A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 1994; 367: 576-579.
188. Ancelin M, Chollet-Martin S, Herve MA, Legrand C, El Benna J, Perrot-Applanat M. Vascular endothelial growth factor VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism. *Lab Invest* 2004; 84: 502-512.
189. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87: 3336-3343.
190. Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, Jeltsch M, Petrova TV, Pytowski B, Stacker SA, Yla-Herttuala S, Jackson DG, Alitalo K, McDonald DM. Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest* 2005; 115: 247-257.
191. Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 2441-2449.

192. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 550-563.
193. Nassif PS, Simpson SQ, Izzo AA, Nicklaus PJ. Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha in middle ear effusion. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 119: 564-568.
194. Lewkowicz P, Tchorzewski H, Dytnerka K, Banasik M, Lewkowicz N. Epidermal growth factor enhances TNF- $\alpha$ -induced priming of human neutrophils. *Immunol Lett* 2005; 96: 203-210.
195. Schultz G, Rotatorio DS, Clark W. EGF and TGF- $\alpha$  in wound healing and repair. *J Cell Biochem* 1991; 45: 346-352.
196. Yamashiro S, Kamohara H, Yoshimura T. Alteration in the responsiveness to tumour necrosis factor-alpha is crucial for maximal expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human neutrophils. *Immunology* 2000; 101: 97-103.
197. Madjdpour C, Jewell UR, Kneller S, Ziegler U, Schwendener R, Booy C, Klausli L, Pasch T, Schimmer RC, Beck-Schimmer B. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284: L360-L367.
198. Goede V, Brogelli L, Ziche M, Augustin HG. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer* 1999; 82: 765-770.
199. Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1 induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* 2005; 105: 1405-1407.
200. Gartner MH, Benson JD, Caldwell MD. Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound. *J Surg Res* 1992; 52: 389-394.
201. Ethuin F, Gerard B, Benna JE, Boutten A, Gougereot-Pocidallo MA, Jacob L, Chollet-Martin S. Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Lab Invest* 2004; 84: 1363-71.
202. Szymkowiak CH, Csernok E, Reinhold D, Bank U, Gross WL, Kekow J. Neutrophils synthesize and activate TGF- $\beta$ 2. *Cytokine* 2000; 12: 397-400.
203. Buhling F, Tholert G, Kaiser D, Hoffmann B, Reinhold D, Ansorge S, Welte T. Increased release of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, and chemoattractant mediators in pneumonia. *J Interf Cytok Res* 1999; 19: 271-278.
204. Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, Matvijenko O, Holmgren L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol* 2001; 152: 1247-1254.
205. Kopprasch S, Pietzsch J, Westendorf T, Kruse HJ, Gräßler J. The pivotal role of scavenger receptor CD36 and phagocyte-derived oxidants in oxidized low density lipoprotein-induced adhesion to endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 460-471.
206. Schwartz BR, Karsan A, Bombeli T, Harlan JM. A novel  $\beta$ 1 integrin-dependent mechanism of leukocyte adherence to apoptotic cells. *J Immunol* 1999; 162: 4842-4848.

207. Lemieux C, Maliba R, Favier J, Theoret JF, Merhi Y, Sirois MG. Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* 2005; 105: 1523-1530.
208. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue. G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1989; 46: 467-473.
209. de Frutos MA, Sanchez de Miguel L, Farre J, Gomez J, Romero J, Marcos-Alberca P, Nunez A, Rico L, Lopez-Farre A. Expression of an endothelial-type nitric oxide synthase isoform in human neutrophils: modification by tumor necrosis factor- $\alpha$  and during acute myocardial infarction. *Am Coll Cardiol* 2001; 37: 800-807.
210. Thomas EL, Lehrer RI, Rest RF. Human neutrophil antimicrobial activity. *Rev Infect Dis* 1988; 10: S450-S456.
211. Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidal MA, El Benna J. The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol* 2000; 165: 5238-5244.
212. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 478-490.
213. Kivisaari J, Niinikoski. Oxygen tension in healing anastomosis of rabbit aorta. *Surgey* 1975; 78: 165-175.
214. Constant JS, Feng JJ, Zabel DD, Yuan H, Suh DY, Scheunstuhl H, Hunt TK, Hussain MZ. Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound Repair Regen* 2000; 8: 353-360.
215. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 6765-6771.
216. Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernbeu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between hypoxia and transforming growth factor pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 43799-43808.
217. Leuenroth S, Lee C, Grutkoski P, Keeping H, Simms H. Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-1 interaction. *Surgery* 1998; 124: 409-417.
218. Lagraoui M, Gagnon L. Enhancement of human neutrophil survival and activation by TGF- $\beta$ 1. *Cell Mol Biol* 1997; 43: 313-318.
219. Li W, Ahmad SA, Reinmuth N, Shaheen RM, Jung Y, Fan F, Ellis LM. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis* 2000; 5: 323-328.
220. Vinals F, Pouyssegur J. Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) promotes Endothelial Cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF- $\beta$  signaling. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 7218-7230.
221. Rainger GE, Fisher A, Shearman C, Nash GB. Adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells after hypoxia and reoxygenation in vitro. *Am J Physiol* 1995; 269: H1398-H1406.

222. Karakurum M, Shreeniwas R, Chen J, Pinsky D, Yan SD, Anderson M, Sunouchi K, Major J, Hamilton T, Kuwabara K, et al. Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 1564-1570.
223. Ottino P, Finley J, Rojo E, Otlecz A, Lambrou Gn, Bazan HE, Bazan NG. Hypoxia activates matrix metalloproteinases expression and the VEGF system in monkey choroid-retinal endothelial cells: Involvement of cytosolic phospholipase A2 activity. *Mol Vis* 2004; 10: 341-350.
224. Reynolds PR, Mucenski ML, Le Cres TD, Nichols WC, Whitsett JA. Midkine is regulated by hypoxia and causes pulmonary vascular remodeling. *J Biol Chem* 2004; 279: 37124-37132.
225. Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresch DA. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998; 92: 391-400.
226. Sumi Y, Muramatsu H, Takei Y, Hata K, Ueda M, Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding growth factor, promotes growth and glycosaminoglycan synthesis of endothelial cells through its action on smooth muscle cells in an artificial blood vessel model. *J Cell Sci* 2002; 115: 2659-2667.
227. Folkman J, Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princ Takamatsu Symp* 1991; 22: 339-347.
228. Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol* 2004; 25: 201-209.
229. Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9: 9-23.
230. Taichmann NS, Young S, Crunchley AT, Taylor P, Paleolog E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* 1997; 62: 397-400.
231. Armstrong DA, Major JA, Chudyk A, Hamilton TA. Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 641-648.
232. Lee TH, Avraham H, Lee SH, Avraham S. Vascular endothelial growth factor modulates neutrophil transendothelial migration via up-regulation of interleukin-8 in human brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 10445-10451.
233. Walzog B, Scharffetter-Kochanek K, Gaehtgens P. Impairment of neutrophil emigration in CD18 null mice. *Am J Physiol* 1999; 276: G1125-G1130.
234. Schrufer R, Sulyok S, Schymeinsky J, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Walzog B. The proangiogenic capacity of polymorphonuclear neutrophils delineated by microarray technique and by measurement of neovascularization in wounded skin of CD18-deficient mice. *J Vasc Res* 2006; 43: 1-11.
235. Rybak SM, Fett JW, Yao QZ, Vallee BL. Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 146:1240-1248.
236. Suzuki S, Kobayashi M, Chiba K, Horiuchi I, Wang J, Kondoh T, Hashino S, Tanaka J, Hosokawa M, Asaka M. Autocrine production of epithelial cell-derived

- neutrophil attractant-78 induced by granulocyte colony-stimulating factor in neutrophils. *Blood* 2002; 99: 1863-1865.
237. Wilkins BS, Jones DB. Vascular networks within the stroma of human long-term bone marrow cultures. *J Pathol* 1995; 177: 295-301.
238. Kreis C, La Fleur M, Menard C, Paquin R, Beaulieu AD. Thrombospondin and fibronectin are synthesized by neutrophils in human inflammatory joint disease and in a rabbit model of in vivo neutrophil activation. *J Immunol* 1989; 143: 1961-1968.
239. Metcalf D. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Science* 1985; 229: 16-22.
240. Buitenhuis M, van Deutekom HW, Verhagen LP, Castor A, Jacobsen SE, Lammers JW, Koenderman L, Coffier PJ. Differential regulation of granulopoiesis by the basic helix loop helix transcriptional inhibitors Id1 and Id2. *Blood* 2005; 105: 4272-4281.
241. Shirafuji N, Matsuda S, Ogura H, Tani K, Kodo H, Ozawa K, Nagata S, Asano S, Takaku F. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates human mature neutrophilic granulocytes to produce interferon- $\alpha$ . *Blood* 1990; 75: 17-19.
242. Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol Today* 1992; 13: 169-172.
243. Ballestrero A, Garuti A, Bertolotto M, Rocco I, Boy D, Nencioni A, Ottonello L, Patrone F. Effect of different cytokines on mammaglobin and maspin gene expression in normal leukocytes: possible relevance to the assays for the detection of micrometastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 1948-1952.
244. Piskin G, Bos JD, Teunissen MB. Neutrophils infiltrating ultraviolet B-irradiated normal human skin display high IL-10 expression. *Arch Dermatol Res* 2005; 296: 339-342.
245. Hoffman SJ, Polack FP, Hauer DA, Griffin DE. Measles virus infection of rhesus macaques affects neutrophil expression of IL-12 and IL-10. *Viral Immunol* 2003; 16: 369-379.
246. Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD, Kunkel SL. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ . *J Exp Med* 1993; 178: 63-72.
247. Shimazu Y, Nanci A, Aoba T. Immunodetection of osteopontin at sites of resorption in the pulp of rat molars. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 911-921.
248. Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Segal M, Lu H, Knebelmann B, Sukhatme VP. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 255: 735-739.

## Veröffentlichungen:

1. Schrufer R. Polarisiert Transport der Disintegrin Metalloprotease ADAM 10 in *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) Zellen und dessen Auswirkung auf die Prozessierung des  $\beta$ -Amyloid-Vorläuferproteins ( $\beta$ APP). Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie der LMU München, 2000, durchgeführt am Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie der Medizinischen Fakultät der LMU München bei Prof. Dr. Christian Haass.
2. Schrufer R, Lutze N, Schymeinsky J, Walzog B. Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin 8. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1186-H1192.
3. Schrufer R, Sulyok S, Schymeinsky J, Peter T, Scharffetter-Kochanek K, Walzog B. The proangiogenic capacity of human polymorphonuclear neutrophils delineated by microarray technique and by measurement of neovascularization in wounded skin of CD18 deficient mice. *J Vasc Res* 2006; 43: 1-11.

## Kongressbeiträge

1. Schrufer, R., Lutze, N., Schymeinsky, J., Walzog, B. (2003) Human neutrophils promote angiogenesis: A putative role for endothelial interleukin 8. *4th Symposium on the Biology of Endothelial Cells, vom 18.-20.7.2003, München*
2. Schrufer, R., Walzog, B. (2003) The pro-angiogenic capacity of human polymorphonuclear neutrophils delineated by microarray technique: The impact of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ). *Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., vom 16.-18.10.2003 in München, abstract-book p. 61*
3. Schrufer, R., Walzog, B. (2004) Human neutrophils promote angiogenesis: A role of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-1 $\alpha$ ). *Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Leipzig, 2004. Pflügers Arch. Suppl. 1, S40, 2004*
4. R. Schrufer, B. Walzog. (2004) Human neutrophils promote angiogenesis: A role for hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1 $\alpha$ ). *23<sup>rd</sup> European Conference on Microcirculation and Vascular Biology, vom 8.-11.9.2004, Lissabon, Portugal, J. Vasc. Res. 41, suppl. 2, p. 23, 2004.*
5. Walzog, B., Schrufer, R. (2004) Human polymorphonuclear neutrophils induce angiogenesis in vivo. *Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., vom 16.-18.10.2003, Berlin, J. Vasc. Res. 2004, 41: p. 452.*

6. Schrufer, R., Walzog, B. Human neutrophils promote angiogenesis by a mechanism involving TGF- $\beta$ 1, HIF-1 $\alpha$  and VEGF. *Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, 6.-9.3. 2005, Göttingen. Pflügers Arch. Suppl. 1, S69, 2005.*
7. Walzog, B., Schrufer, R., Lutze, N. Human neutrophils promote angiogenesis by a paracrine feedforward mechanism involving endothelial interleukin-8. *Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, 6.-9.3. 2005, Göttingen. Pflügers Arch. Suppl. 1, S39, 2005.*
8. Schrufer R., Groesser L., Walzog B. Midkine – a novel proangiogenic cytokine in human polymorphonuclear neutrophils. *Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft. 26.-29.3.2006.*