

„Der Einfluss des Applikationszeitpunktes auf die
Effektivität der lokalisierten
Neoangiogenese - Stimulation mittels
Zell - basierter VEGF - Gentherapie“

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Juliane Müller

geboren am 04.04.1988 in Salzwedel

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau, Jena
2. Prof. Dr. Gunther O. Hofmann, Jena
3. PD Dr. Dr. Michael Throwarth, München

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.11.2013

Für Opi

Abkürzungsverzeichnis

AD	Adenovirus
ADME	Absorption Distribution Metabolism Excretion
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninic Acid
BCL	B-Cell Lymphoma
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CMV	Cytomegalovirus
Cy	Carbocyanin
d	Day
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelial Cell
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EPC	Endothelial Progenitor Cell
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
flk	Fms Like Tyrosinkinase
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HE	Hämalaun-Eosin
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
HRE	Hypoxia-Responsive Element
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	Hematopoietic Stem Cell
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin

II

IPTG	I sopropyl-beta-d-thiogalactopyranoside
IU	I nternational U nit
KDR	K inase-insert D omain R eceptor
KG	K örpergewicht
KGF	K eratinocyte G rowth F actor
LB	L ysogeny B roth
LDS	L ithium D odecyl S ulfate
MES	2-(N -morpholino)ethanesulfonic Acid
MSC	M ultiple C loning S ite
NO	Stickstoffmonoxid
OD	O ptische D ichte
Op	O peration
p.op.	post operationem
PBS	P hosphate B uffered S aline
PCR	P olymerase C hain R eaction
PD-ECGF	P latelet D erived E ndothelial C ell G rowth F actor
PDGF	P latelet- D erived G rowth F actor
PEI	P olyethylenimin
PFA	P araformaldehyd
PLC	P hospholipase C
PLGA	P olylactid-co- G lycolid A cid
PMSF	P henylmethylsulfonylfluoride
RFU	R elative F luorescence U nit
ROS	R eactive O xygen S pecies
rpm	R ounds P er M inute
RT	R aumtemperatur
Rt	R everse T ranscriptase
S.O.C.	S uper O ptimal Broth with C atabolite repression
SDF-1	S tromal C ell-derived F actor 1
SDS	S odium D odecyl S ulfate
Shb	S rc homology domain containing adaptor protein B
SSC	S tandard S aline C itrate
TAE	T ris- A cetate- E DTA
TB	T errific B roth
TBS-(T)	T ris- B uffered S aline-(T ween-20)
TE	T ris- E DTA
TEA	T riethanolamin
TGFα/β	T ransforming G rowth F actor alpha/beta
TNFα	T umor N ecrosis F actor alpha
Tx	T ransplantation

III

VE

VEGF

VEGFR

vHL

X-Gal

XIAP

Vollentsalzt

Vascular Endothelial Growth Factor

Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

von Hippel-Lindau

5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galaktos

X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG.....	3
2.1	WUNDHEILUNG.....	3
2.1.1	Hämostase	3
2.1.2	Inflammation	4
2.1.3	Proliferation	5
2.1.4	Remodelling.....	6
2.2	ANGIOGENESE UND VASKULOGENESE	6
2.2.1	Vaskulogenese	6
2.2.2	Angiogenese.....	8
2.3	VEGF – VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR.....	9
2.3.1	VEGF	9
2.3.2	VEGF - Rezeptoren	10
2.3.3	Funktion des VEGF	10
2.3.4	Induktion von VEGF	11
2.4	THERAPEUTISCHE ANGIOGENESE	12
2.4.1	Beschriebene Therapieansätze	13
2.5	KLINISCHE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN BEI WUNDHEILUNGSSTÖRUNGEN.....	14
3	ZIELE DER ARBEIT	15
4	METHODIK	17
4.1	TIERVERSUCH	17
4.1.1	Versuchstiere.....	19
4.1.2	Anästhesie.....	20
4.1.3	Zungenbiopsie	20
4.1.4	Isolation und Kultivierung der Fibroblasten.....	21
4.1.5	Gentechnologische Arbeiten.....	22
4.1.6	Transfektion.....	23
4.1.7	Injektion und Tx - Hebung	24
4.2	REAL - TIME POLYMERASEKETTENREAKTION	25
4.2.1	RNA - Isolierung	26
4.2.2	Quantifizierung der mRNA.....	27

4.3	IN - SITU HYBRIDISIERUNG	31
4.3.1	Anfertigung der Präparate	34
4.3.2	DNA - Isolierung und Amplifizierung	35
4.3.3	Klonierung	38
4.3.4	In vitro - Transkription	39
4.3.5	In - situ Hybridisierung der Präparate	41
4.4	IMMUNOBLOT	42
4.4.1	Proteinaufbereitung	45
4.4.2	SDS - Page - Gelelektrophorese	47
4.4.3	Blotting	48
4.4.4	Detektion	49
4.5	HISTOLOGIE	50
4.5.1	Anfertigung der Präparate	52
4.5.2	H&E - Färbung	52
4.5.3	Indirekte Immunfluoreszenz	53
4.5.4	Mikroskopische Auswertung	53
4.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	54
5	ERGEBNISSE	55
5.1	TRANSFEKTION	55
5.2	REAL - TIME PCR	56
5.2.1	Vergleich der Therapiestrategien	56
5.2.2	Untersuchung auf regionale Unterschiede	57
5.2.3	Therapeutischer Effekt der Fibroblasten	59
5.3	IN - SITU HYBRIDISIERUNG	62
5.3.1	Herstellung der Sonden	63
5.3.2	Qualitative Auswertung	63
5.4	WESTERN BLOT	65
5.4.1	Vergleich der Therapiestrategien	65
5.4.2	Untersuchung auf regionale Unterschiede	67
5.4.3	Therapeutischer Effekt der Fibroblasten	68
5.5	HISTOLOGIE	70
5.5.1	H&E - Übersichtsaufnahmen	70
5.5.2	Qualitative Auswertung	70

VI

6	DISKUSSION	75
6.1	BESCHRIEBENE APPLIKATIONSSYSTEME FÜR THERAPEUTISCHE ANGIOGENESE	75
6.2	ANGEWANDTES MODELL DER THERAPEUTISCHEN ANGIOGENESE	77
6.2.1	Effektivität der Therapiestrategien	78
6.2.2	Ortsbeständigkeit der transfizierten Fibroblasten	80
6.3	STED – PARAMETER.....	81
6.3.1	Erreichen der Zielzellen – Parameter S	82
6.3.2	Transfektionseffizienz – Parameter T	82
6.3.3	Expressionsstärke der transduzierten Zellen – Parameter E.....	83
6.3.4	Tansfektionspersistenz – Parameter D.....	83
7	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	84
8	LITERATURVERZEICHNIS	I
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
10	ANHANG	XIII
10.1	DANKSAGUNG	XIII
10.2	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	XIV

1 Zusammenfassung

Die Induktion der lokalen Angiogenese ist von besonderem Interesse auf dem Gebiet der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie. Dabei übernimmt VEGF eine Schlüsselrolle im Prozess der Angiogenese. Eine Methode der therapeutischen Angiogenese stellt die auf autologe Fibroblasten - basierende VEGF - Gentherapie dar. Durch die Behandlung des Zielgewebes mit VEGF - transgenen Fibroblasten konnte bereits in einer vorhergegangenen Studie eine erhöhte VEGF - Expression sowie eine verstärkte Neovaskularisation erzielt werden.

Ziel dieser Arbeit war es weiterführend den optimalen Applikationszeitpunkt der pro - angiogenetischen Therapie am Tiermodell zu bestimmen. Dazu wurden 60 Wistar - Ratten, ipsilateral in die Leistenregion zwischen Subcutis und M. graciles, 1×10^7 VEGF - transgene autologe Fibroblasten injiziert. Als Kontrollgruppe dienten weitere 60 Wistar - Ratten, der ipsilateral PBS und kontralateral native Fibroblasten injiziert wurden. Simultan, 7 Tage und 14 Tage vor Einleitung der Ischämie wurden die Zellen bzw. PBS injiziert. Gewebeproben wurden am 3., 5., 7. und am 14. Tag post operationem aus der kaudalen, der kranialen und der oberflächlichen Region des M. graciles entnommen. Die Explantate wurden mittels Real - time Polymerasekettenreaktion und In - situ Hybridisierung quantitativ sowie qualitativ auf RNA - Ebene untersucht. Durch Western Blot und Immunhistochemie erfolgte die quantitative und qualitative Untersuchung auf Protein - Ebene. Die Ergebnisse wurden mit dem ungepaarten Student's t - Test unabhängiger Variablen und dem Tukey - HSD Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht.

Nach Einleitung der Ischämie und simultaner Injektion der VEGF - transgenen Fibroblasten konnten im Vergleich zu der Behandlung 7 Tage bzw. 14 Tage prä operationem quantitativ die besten Ergebnisse konstatiert werden. Über annähernd den gesamten Untersuchungszeitraum wurde eine signifikante Erhöhung der relativen VEGF - Expression ($p < 0,05$ an Tag 3, Tag 7 und Tag 14 p. op.), sowie ein verstärkter Zytokin - Gehalt im Gewebe ($p < 0,05$ an Tag 7 p. op.) beobachtet. Die transiente Transgen - Expression bestand über den Untersuchungszeitraum von 14 Tagen, mit einem Expressionshöhepunkt am 7. Tag post operationem. An Tag 14

glichen sich Expression und VEGF - Proteingehalt langsam dem Basislevel an. Die größte relative VEGF - Transkriptionsrate konnte in dem oberflächlichen Anteil des M. graciles nachgewiesen werden. Zwischen dem oberflächlichen und dem kaudalen bzw. kranialen Anteil des M. graciles zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$ an Tag 5 und Tag 7 p. op.). Die alleinige Applikation von Fibroblasten hatte dabei keinen therapeutischen Effekt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen, dass die auf Fibroblasten - basierende VEGF - Plasmid - Applikation ein potentes System zur Induktion der therapeutischen Angiogenese darstellt. In Hinblick auf VEGF - Expressionsrate und Proteingehalt hat die simultane Therapiestrategie den größten prä - klinischen Erfolg zu verzeichnen. Die injizierten transgenen Fibroblasten verbleiben am Ort der Injektion und erhöhen die lokale VEGF - Expression.

Um weiterführend auch klinisch langfristige Erfolge zu erzielen, muss eine Optimierung der Gefäßreifung und Stabilität der entstandenen Gefäßkomplexe sichergestellt sein. Ein stabiles Gefäßnetz stellt eine *Conditio sine qua non* für eine erhöhte Take - Rate und Tx - Überlebensrate dar.

2 Einleitung

2.1 Wundheilung

Die Wundheilung ist ein lebenswichtiger physiologischer Prozess des Organismus, der die Wiederherstellung von beschädigtem Gewebe anstrebt. Der Prozess der Wundheilung vereinigt die initiale Entzündungsreaktion mit der Wiederherstellung des lädierten Gewebes (Ko et al. 2011; Robbins et al. 1998; Schäffer et al. 1999). Man unterscheidet vier fließend ineinander übergehende Phasen der Wundheilung: 1. Hämostase, 2. Inflammation, 3. Proliferation und 4. Remodelling (Hoffman 2008; McDonald et al. 2007).

2.1.1 Hämostase

Nach sofortiger Vasokonstriktion der Gefäße ermöglicht die zelluläre (primäre) Hämostase den schnellen Wundverschluss durch Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten (Asmussen et al. 1993). Diese lagern sich an die freiliegenden subendothelialen Bestandteile über den von - Willebrand - Faktor an Kollagen Typ I und Typ III (Ferrara et al. 1991a; Peyvandi et al. 2011) oder an Fibronectin (Piotrowicz et al. 1988) sowie Laminin (Sonnenberg et al. 1988) an. Aus dem elektronendichten Granula werden ADP, Serotonin und Thromboxan A_2 ausgeschüttet, welche eine zusätzliche Aktivierung der Thrombozyten bewirken (Akkumulation). Die Aggregation erfolgt unter dem Einfluss von ADP über Fibrinogen (Gachet 2000). Es bildet sich ein weißer Bluthrombus aus. Durch Degranulation von α - Granula der aktivierten Thrombozyten werden Zytokine und Wachstumsfaktoren wie der Epidermal Growth Factor (EGF), der Platelet - derived Growth Factor (PDGF), der Transforming Growth Factor - beta (TGF - β) (Barrientos, Stojadinovic et al., 2008) sowie der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Möhle et al. 1997; Salgado et al. 2001) ins Wundgebiet entlassen.

Die plasmatische (sekundäre) Hämostase sorgt für die Stabilisierung des Wundverschlusses durch Ausbildung eines Fibringeflechts. Nach Aktivierung des

Blutgerinnungssystem spaltet Thrombin als Serinprotease Fibrinogen zu stabilem Fibrin, welches polymerisiert und in Gegenwart von Faktor XIIIa gegen mechanische Belastung stabilisiert wird (Asmussen & Söllner 1993; Fries et al. 2010; Sedlarik 1993). Die Struktur des Clots ist abhängig von der Thrombinkonzentration (Blombäck et al. 1994; Fogelson et al. 2010; Wolberg 2007). Durch das Zurückhalten von Erythrozyten entsteht ein roter Blutthrombus.

Nachdem die primäre Blutung durch Thrombozytenaggregation und Fibrinagglutination gestoppt wurde, erweitern sich die Blutgefäße und werden permeabel (Piatek 2006).

2.1.2 Inflammation

Die Entzündungsphase beginnt mit dem Einwandern von Leukozyten u.a. neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, gefolgt vom Übergang der Monozyten aus dem Blut ins Gewebe, wo sie zu Makrophagen reifen. Die Rekrutierung der Entzündungszellen erfolgt chemotaktisch (Hatz et al. 1993). Dabei dient der Clot als Matrix für die einwandernden Zellen und zugleich als Speicherort für Degranulate und Mediatoren (Ko et al. 2011).

Neutrophile Granulozyten sind durch ihre amöboide Beweglichkeit bereits nach einer Stunde vorhanden (Clark 1985). Sie dienen dem Wunddébridement und der lokalen Abwehr durch Opsonierung und Phagozytose, vorwiegend gegen eine drohende bakterielle Invasion (Hoffman 2008).

Makrophagen stellen eine *Conditio sine qua non* im Wundheilungsgeschehen dar (Hatz et al. 1993). Sie dienen dem Wunddébridement (Clark 1985) und koordinieren die Immunantwort durch das Ausschütten von Zytokinen (DiPietro 1995). Durch die Sekretion von IL - 1 werden weitere neutrophile Granulozyten angelockt. Die Komplementfaktoren C1 - C5 und die Wachstumsfaktoren FGF, EGF, PDGF, TNF - α und TGF - α/β sowie VEGF tragen zur Stimulierung von Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten bei (Asmussen & Söllner 1993; Hatz et al. 1993; Nissen et al. 1998).

2.1.3 Proliferation

Die Proliferationsphase beginnt mit Abnahme der Anzahl an Entzündungszellen und Zunahme der Endothelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten (Piatek et al. 2001). Es setzen proliferierende Prozesse im Rahmen der Gefäßneubildung und des Auffüllens von Gewebedefekten ein (Probst et al. 2010).

Während der anabolen Phase ist eine verstärkte Sauerstoffversorgung zur Normalisierung des pH-Werts des neugebildeten Gewebes notwendig. Endothelzellen wandern ins Wundgebiet ein, welche zur Ausbildung neuer kapillärer Strukturen stimuliert werden (Sedlarik 1993).

Fibroblasten bilden Kollagen und eine Grundsubstanz aus Fibrin und Fibronectin. Das durch die Hämostase gebildete Fibrinnetzwerk dient dabei als Leitschiene (Asmussen & Söllner 1993). Mit der Produktion von Kollagen verliert Fibrin jedoch seine Funktion und wird im Rahmen der Fibrinolyse über Plasmin abgebaut (Sedlarik 1993). Mit dem Einstellen der mitotischen Aktivität wandeln sich die Fibroblasten teils zu Myofibroblasten um. Die Wundkontraktion beginnt (1 - 2 mm/d) (Asmussen & Söllner 1993; Hatz et al. 1993).

Die Wunde füllt sich mit Granulationsgewebe, welches sich aus vielen kleinen Blutgefäßen und wenig stabilisierendem Bindegewebe zusammensetzt (Hoffman 2008). Die glatte und feuchte Fläche bildet den Grundstein für die anschließende Epithelialisierung (Sedlarik 1993).

Keratinozyten bilden den Ausgangspunkt für die Epithelialisierung. Sie vermehren sich und migrieren ins Wundgebiet. Das Granulationsgewebe wirkt dabei chemotaktisch auf die Randepithelien (Sedlarik 1993). Die primitive Gewebeeinheit der Granulation bildet sich unter der neugebildeten Epidermis zurück und wird als Narbengewebe in den Gewebeverband integriert. Das Granulationsgewebe wird wasser- und gefäßärmer (Probst & Vasal - Biergans 2010).

2.1.4 Remodelling

Die Kollagenbildung und -umstrukturierung hält bis zu zwölf Monate an, bis die Wunde ihre endgültige Zugfestigkeit erreicht hat (Sedlarik 1993). Die Zellanzahl nimmt ab und das Kollagengeflecht wird umorganisiert, teils durch Abbauprozesse, teils durch neue Vernetzung untereinander (Asmussen & Söllner 1993).

2.2 Angiogenese und Vaskulogenese

Die vaskuläre Unterstützung ist für die Wundheilung als auch für die Entwicklung und Differenzierung in der Embryogenese sowie für reproduktive Funktionen im adulten Organismus von fundamentaler Bedeutung (Folkman 1995).

Ein erhöhter Sauerstoffbedarf wurde nachweislich für eine Neovaskularisation aufgedeckt (Prior et al. 2004), die im postnatalem Organismus im Rahmen der Angiogenese und Vaskulogenese stattfindet (Carmeliet 2000; Fam et al. 2003; Velazquez 2007). Die Vaskulogenese beschreibt die de - novo Entstehung von kapillarähnlichen Strukturen aus endothelialen Progenitorzellen (EPCs) (Sepúlveda et al. 2007; Stewart et al. 2011). Bei der Entstehung neuer Kapillaren aus bereits existenten Gefäßen spricht man von Angiogenese (Carmeliet 2000).

Die Balance zwischen inhibierenden und stimulierenden Faktoren der Angiogenese ist dabei von entscheidender Bedeutung (Carmeliet 2003). Bei exzessiver Stimulation kippt das Gleichgewicht. Pathologische Angiogenese findet man bei der Neovaskularisation von Tumoren (Ferrara 2002), Erkrankungen des Auges (Patz 1980) und chronischen Entzündungsreaktionen (Carmeliet 2003; Folkman 1995).

2.2.1 Vaskulogenese

Unter Vaskulogenese versteht man die de - novo Entstehung von primitiven Blutgefäßen während der Embryonalentwicklung (Stewart & Kleinerman 2011). Zellen mesodermalen Ursprungs differenzieren sich zu Hämangioblasten und formieren sich zu kleinen Blutinseln. Die Randzellen der Insel differenzieren sich

weiter zu EPCs, den Angioblasten und die zentral gelegenen Zellen zu den Hämoytoblasten (HSC), den Progenitorzellen der Blutzellen (Murasawa et al. 2005). EPCs und HSCs besitzen somit eine gemeinsame Vorläuferzelle (Flamme et al. 1992). Die EPCs verlängern sich, gehen eine Verknüpfung miteinander ein und bilden ein erstes primitives vaskuläres Netzwerk kleiner Kapillaren aus (Risau 1997; van Oostrom et al. 2008).

Die Vaskulogenese ist nicht nur auf die Embryogenese beschränkt, sondern wurde kürzlich auch im adulten Organismus nachgewiesen. Die endothelialen Progenitorzellen des Knochenmarks vermehren sich in Gegenwart spezieller Zytokine wie VEGF (Adams et al. 2007; Gerber et al. 2002) oder SDF - 1 (Ceradini et al. 2004), ebenso auch unter hypoxischen Bedingungen (Asahara et al. 1999). Für die Rekrutierung von EPCs aus dem Blutstrom bedarf es chemotaktischer Reize. Durch ischämiebedingte Alterationen und Modulation bestehender interzellulärer Kontakte der Endothelzellen wird die Adhäsion der EPCs an das Endothel sowie die transendotheliale Migration gefördert. Die EPCs können auf der einen Seite durch den direkten Einbau in die Gefäßwand zu einem zirkumferentiellen Wachstum beitragen. Andererseits können sie aus der Kapillarwand aussprossen und neue Kapillarstrukturen formieren (Abbildung 1) (Adams & Alitalo 2007).

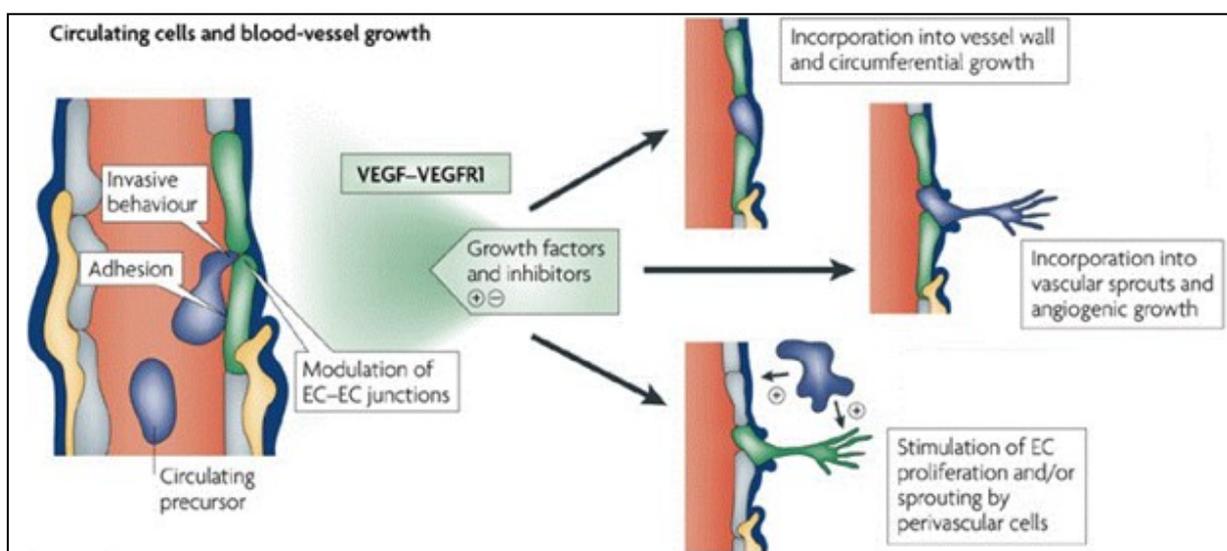


Abbildung 1: Vaskulogenese und der Verbleib der rekrutierten EPCs (Adams & Alitalo 2007)

2.2.2 Angiogenese

Die Angiogenese beinhaltet das Wachstum von Gefäßgeflechten durch Aussprossen von Kapillaren sowie Ausreifen und Remodellieren bereits existenter Gefäßstrukturen zu höher organisierten Strukturen (Carmeliet 2000; van Oostrom et al. 2008). Pro-angiogene Signale, wie VEGF, induzieren ein Aussprossen von Kapillaren. Endothelzellen mit einem hohen VEGF-Rezeptorbesatz (tip-cells) werden aktiviert und verlieren ihre Polarität. Gleichzeitig kommt es zu einer Modulation der Zell-Zell-Kontakte und einer Degradation der extrazellulären Matrix (Abbildung 2a und b) (Adams & Alitalo 2007). Durch Migration der tip-cells und Migration und Proliferation von stalk-cells aus bereits existierenden Gefäßstrukturen erfolgt die Formierung neuer Gefäßstrukturen (Abbildung 2c) (Folkman et al. 1987; Stewart & Kleinerman 2011; Zhang et al. 2004). Das Gefäßlumen wird durch Ausbildung von Vakuolen und anschließender Fusion geformt (Kamei et al. 2006). Die Filopodien der tip-cells reagieren auf die navigierenden, abstoßenden und anziehenden Signale aus dem umgebenden Gewebe für eine geordnete vaskuläre Strukturierung. Durch Sekretion von PDGF-B durch tip-cells wird die Rekrutierung von vaskulären glatten Muskelzellen und Perizyten (mural cells) gefördert und die Gefäße erreichen eine ausreichende Stabilität (Abbildung 2d) (Adams & Alitalo 2007).

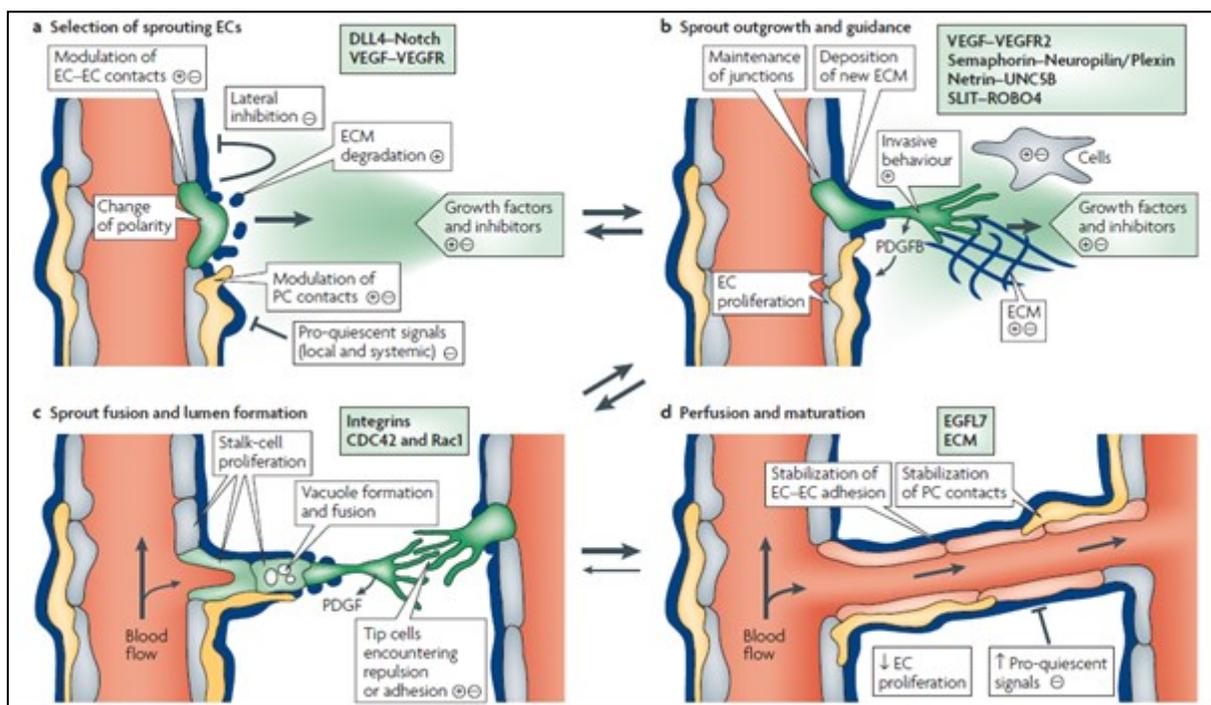


Abbildung 2: Angiogenese und Gefäßausprossung (Adams & Alitalo 2007)

VEGFR - 2 wird von den Endothelzellen exprimiert, unabhängig von deren Entstehung über die Vaskulogenese oder Angiogenese (Palis et al. 1995). Die Endothelzellen behalten so lebenslang die Fähigkeit sich auf ischämische Reize hin zu teilen. Die Angiogenese kann reaktiviert werden (Carmeliet 2003).

2.3 VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

Unter allen Wachstumsfaktoren ist VEGF der Wichtigste hinsichtlich Angiogenese und Vaskulogenese (Ferrara et al. 1996), da er in löslicher Form existiert und als klassisches Signalpeptid fungiert (Leung et al. 1989). FGF und PD - ECGF verfügen dagegen über keine Signalsequenz, die sie für den extrazellulären Transport befähigt (Abraham et al. 1986). VEGF ist beim Anregen des vaskulären Endothelzellenwachstums zehnfach wirksamer als PD - ECGF (Ferrara et al. 1989).

2.3.1 VEGF

VEGF - A ist ein sezerniertes Heparin - bindendes homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45.000 Kilodalton (Asahara et al. 1999; Ferrara & Henzel 1989). Das Protein, welches auf dem Chromosom 6p21.3 codiert ist (Vincenti et al. 1996), übt nachweislich einen direkten und spezifisch mitogenen Effekt auf vaskuläre Endothelzellen aus (Ferrara 1993). VEGF wird von Zellen exprimiert, die sich in enger Nachbarschaft zu Gefäßen befinden u.a. Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Thrombozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten (Ko et al. 2011, Breier et al. 1995). Das Transkript des nativen Gens setzt sich aus acht Extrons und sieben Introns zusammen. Durch alternatives Splicen der mRNA existieren mindestens vier verschiedene Isoformen des Gens. Abhängig von der Anzahl der Aminosäuren unterscheidet man VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ (Ferrara et al. 1991a; Stalla 2007; Tischer et al. 1991). Alle Isoformen besitzen die gleiche biologische Funktion. Sie unterscheiden sich lediglich im Sekretionsverhalten (Ferrara et al. 1991b) und ihrer Löslichkeit (Houck et al. 1992), dementsprechend in ihrer Bioverfügbarkeit.

2.3.2 VEGF - Rezeptoren

Die Signaltransduktion des VEGF erfolgt über einen der drei Tyrosin - Kinase - Rezeptoren für VEGF. Jedoch sind nur VEGFR - 1 bzw. fms - like - tyrosine kinase (de Vries et al. 1992) und VEGFR - 2 bzw. KDR (Terman et al. 1992) in der Lage VEGF-A zu binden (Kowanetz et al. 2006). VEGFR - 1 sowie VEGFR - 2 werden in vaskulären Endothelzellen exprimiert (Jakeman et al. 1992). Zusätzlich findet man VEGFR - 1 noch in der Zellmembran von Monozyten, Makrophagen und HSCs (Cross et al. 2003; Shen et al. 1993). Beide Rezeptoren setzen sich aus sieben Immunglobulin - ähnlichen Domänen extrazellulär, einer Transmembranregion für die Verankerung in der Phospholipidmembran und einer Tyrosinkinase - Sequenz mit eingeschobener Kinaseaktivität im Intrazellularraum zusammen (Terman et al. 1991). Die zweite Immunglobulin - ähnliche Struktur ist für die Bindung des Gens entscheidend (Davis-Smyth et al. 1996). VEGFR - 2 bindet VEGF mit einer geringeren Affinität als VEGFR - 1 (Terman et al. 1992), wobei er für die Angiogenese und Hämatopoese die Schlüsselrolle einnimmt (Shalaby et al. 1995) und durch VEGF zehnfach stärker aktiviert wird als VEGFR - 1 (Ferrara et al. 1997).

Die Aktivierung durch VEGF führt zur Rezeptor - Dimerisierung. Es kommt zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten der intrazellulären Domäne (Barleon et al. 1997). Die Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade durch jeweilige Effektoren wie PLC - γ (Takahashi et al. 2001) oder Shb (Holmqvist et al. 2004) wird induziert.

2.3.3 Funktion des VEGF

VEGF stimuliert auf parakrinem Weg die physiologische als auch die pathologische Angiogenese, einerseits durch die Mobilisierung von EPCs über VEGFR - 1 (Asahara et al. 1999), andererseits durch die Aktivierung von Endothelzellen über VEGFR - 2 (Carmeliet 2000; Ferrara 2004). VEGF ist durch das Vorbeugen der Apoptose ein Überlebensfaktor für Endothelzellen (Gerber et al. 1998b). Er induziert die Expression der anti - apoptotischen Faktoren BCL - 1, A1 (Gerber et al. 1998a) und XIAP (Tran et al. 1999). Schon allein das Fehlen eines einzigen VEGF - Allels führt

zur Letalität des Embryos und zeigt die Unabdingbarkeit des Gens (Ferrara et al. 1996). Auf der anderen Seite führt eine unkontrollierte VEGF - Expression zur Entstehung abnormaler Blutgefäße. Es kann zur Ausbildung von Hämangiomen kommen (Ozawa et al. 2004).

VEGF ist auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor bekannt, was auf seine Fähigkeit zur Permeabilitätserhöhung durch Stimulation der NO - Synthese zurückzuführen ist (Cross et al. 2003; Ferrara 2004). Eine dosisabhängige Vasodilatation der Arteriolen ist eine weitere Erscheinung der aktiven NO - Synthese (Yang et al. 1996).

Die Funktion des VEGF ist nicht ausschließlich auf Endothelzellen beschränkt. VEGF kann zusätzlich durch das Rekrutieren von Makrophagen, die eine Auswahl an angiogenen Faktoren produzieren, die Gefäßentwicklung kontrollieren (Barleon et al. 1996; Clauss et al. 1990).

2.3.4 Induktion von VEGF

Die Verfügbarkeit von Sauerstoff stellt den stärksten Regulator der VEGF - Expression dar. Mit sinkendem Sauerstoffpartialdruck steigt die mRNA - Expression des Gens (Minchenko et al. 1994). Der Transkriptionsfaktor HIF - 1 fungiert als Induktor, der unter hypoxischen Bedingungen sowie in Gegenwart von bestimmten Wachstumsfaktoren wie EGF (Zhong et al. 2000) und PDGF (Richard et al. 2000) als auch Thrombin (Görlach et al. 2001) und ROS (Shatrov et al. 2003) exprimiert wird. Durch die Bindung des HIF - 1 an das HRE in der Promotorregion von VEGF wird die Expression von VEGF hochreguliert (Liu et al. 1995). Zudem hat HIF einen stabilisierenden Effekt auf die VEGF₁₆₄ - mRNA (Dor et al. 1997).

Die Induktion der VEGF - Expression erfolgt direkt über eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie PDGF, IGF1, TGF - α , KGF (Frank et al. 1995) und EGF (Goldman et al. 1993), ebenso über reaktive Sauerstoffprodukte, erhöhte Lactat - Werte (Kumar et al. 2007), IL - 1 α (Ben-Av et al. 1995), IL - 1 β (Li et al. 1995) und IL - 6 (Cohen et al. 1996). Es gibt Indizien für eine Steigerung der Expression durch Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen wie p53 (Kieser et al. 1994) oder

vHL (Siemeister et al. 1996), sowie durch Aktivierung von Onkogenen wie RAS (Mazure et al. 1996).

2.4 Therapeutische Angiogenese

Unter therapeutischer Angiogenese ist der Gebrauch von biologischen Agenzien zur gezielten Stimulation des Wachstums neuer Gefäße, zur Wiederherstellung oder Verbesserung der Gewebepfusion, zur Beseitigung von ischämischen Situationen sowie zur Unterstützung von Wundheilungsvorgängen zu verstehen (Tímár et al. 2001).

Schultze - Mosgau et al. konnten eine Reduktion der Anzahl und des Durchmessers der Kapillarstrukturen im vorbestrahlten Transplantatlager als Hauptursache für Einheilungsstörungen nach vaskularisierter Weichgewebs - Tx finden (Schultze - Mosgau et al. 2002). Bestrahlung führt zu einer gebremsten endogenen VEGF – Expression. Durch die tägliche topische Applikation eines rekombinanten endothelialen Wachstumsfaktors (rVEGF) konnte am Tiermodell eine verstärkte Neovaskularisation nach Weichgewebs - Tx im ersatzschwachen Lagergewebe nach Radiatio gezeigt werden (Schultze - Mosgau et al. 2003).

Durch die kurze Halbwertszeit von 30 – 45 min von VEGF (Zhang et al. 2004) und der Tendenz in die Blutbahn zu diffundieren, ergeben sich für die klinische Umsetzung Einschränkungen. Das exogen zugeführte VEGF kann in räumlich entfernten Körperregionen zur Induktion der Angiogenese führen und so unter Umständen die Neovaskularisation von okkulten Tumoren bedingen (Carmeliet 2005; Simons et al. 2000). Weitere Auswirkungen durch die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren, wie das Auftreten von neointimaler Hyperplasie (Nabel et al. 1993) sowie niedrigem Blutdruck und Vasodilatation (Unger et al. 2000), wurden beschrieben.

2.4.1 Beschriebene Therapieansätze

Für die klinische Anwendung von pro - angiogenetischen Therapieformen wird ein effizientes und sicheres Delivery - System zur kontrollierten Induktion der Angiogenese gefordert.

Im Rahmen des protein - therapeutischen Ansatzes werden Proteine unter Verwendung von natürlichen sowie synthetischen Polymermatrix - Systemen in das Zielgebiet appliziert. In PLGA - eingekapseltes VEGF wurde in einen im Tissue - engineering hergestellten Darm appliziert, welcher anschließend in das Omentum der Ratte implantiert wurde. Es konnte ein erhöhter Gehalt an VEGF im Gewebe sowie eine verstärkte Proliferation der Epithelzellen und eine erhöhte Kapillardichte festgestellt werden (Rocha et al. 2008).

Das Ziel der gentherapeutischen Therapieform ist die Integration der genetischen Information des pro - angiogenetischen Faktors. Bei der in vivo Gentherapie macht man sich die Eigenschaft von Viren zu Nutze, in Wirtszellen einzudringen und die genetische Information in das Genom einzubauen. Der Einsatz unterschiedlicher Viren u.a. Retroviren, Adenoviren und Lentiviren wurde beschrieben (Gaffney et al. 2007). Lubiowski et al. konnten nach Applikation von Ad - VEGF eine erhöhte Überlebensfläche am epigastrischen Lappenmodell der Ratte beobachten (Lubiowski et al. 2002). Aluigi et al. entwickelten eine nicht - virale, auf Elektroporation basierende Gen - Transfer - Methode, die das genetische Material ex vivo direkt in den Nukleus schleust – die Nukleofektion (Aluigi et al. 2006). Müller et al. etablierten ein auf autologe Fibroblasten basierendes VEGF - Slow - Release - System. Die Fibroblasten wurden ex vivo durch Nukleofektion unter Verwendung eines VEGF - codierenden Plasmid mit einer Effizienz von 63% transfiziert. Die Zellen produzierten über einen Zeitraum von 14 Tagen aktives Transgen. Nach Injektion zwischen Subcutis und transplantierte allogener Membran konnte eine beschleunigte Neovaskularisation der Membran beobachtet werden. Für die Applikation ist kein Co - Reagenz notwendig (Mueller et al. 2010b). Es konnten keine lokalen und systemischen Nebenwirkungen nachgewiesen werden (Mueller et al. 2010a).

Ein weiterer beschriebener therapeutischer Ansatz in der plastisch - chirurgischen Forschung ist die Verwendung von Stammzellen mit angiogenetischem Potential. Durch das Rekrutieren von EPCs konnte eine gesteigerte Neovaskularisation im ischämischen Gewebe am Tiermodell nachgewiesen werden (Park et al. 2004).

2.5 Klinische Anwendungsmöglichkeiten bei Wundheilungsstörungen

Von den 150 Millionen an Diabetes erkrankten Patienten weltweit, leiden 15% unter Fußulzerationen, welche sich zu chronischen Wunden entwickeln (Boulton et al. 2005) und für die Hospitation dieser Patienten verantwortlich sind (Ko et al. 2011). Ein hoher Blutzuckerspiegel beeinträchtigt die Funktion und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und daraus resultierend ist das Risiko einer Infektion und Wundheilungsstörung erhöht. Die Entzündungsphase ist verlängert, die Angiogenese eingeschränkt und die Kollagensynthese sinkt (Bennett et al. 2003). Die Angiogenese ist für die Bildung des Granulationsgewebes ebenso unentbehrlich wie für die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr in das Wundgebiet (Li et al. 2003). Reduzierte Angiogenese trägt so zu nicht heilenden Wunden bei (Falanga 2005).

Vorherige Studien an Mäusen haben bereits bewiesen, dass die Anwendung einer Gen - Therapie mit dem Einsatz von Wachstumsfaktoren den Wundheilungsprozess in diabetischen Wunden begünstigt (Jazwa et al. 2010; Yoon et al. 2009). Darüber hinaus ist ein Rekombinant des humanen PDGF, Beclapermin, bereits zur Behandlung von diabetischen Wunden im Einsatz (Harding et al. 2002). Der Nachteil dieses Medikaments besteht allerdings in der täglichen Applikation bedingt durch die kurze Halbwertszeit im Körper.

Weiterhin fördern mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks die Heilung von diabetischen Wunden. Die Stammzellen fördern die Reepithelialisierung, Zellinfiltration und Angiogenese (Wu et al. 2007).

3 Ziele der Arbeit

In der plastisch - rekonstruktiven Chirurgie besteht die Hauptaufgabe darin, verlorengangenes Gewebe bzw. Organe möglichst durch gleichwertiges Gewebe zu ersetzen und so dessen Funktion, sofern möglich, wieder herzustellen. Dabei unterliegen diese Eingriffe einem besonderen ästhetischen Anspruch. Durch Tumorerkrankungen im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich kommt es häufig zu Defekten, die weitestgehend nur mit der Verpflanzung von Transplantaten gedeckt werden können. Eine optimale Wundheilung trägt entscheidend zum Erfolg der freien Transplantation bei. Diese kann jedoch durch intrinsische als auch extrinsische Faktoren beeinträchtigt werden. Zu den extrinsischen Ursachen zählt man unter anderem eine vorhergehende Radiatio als auch endokrine Störungen wie dem Diabetes mellitus. Ein Sauerstoffmangel (Ischämie) wie auch die Wundinfektion werden dem intrinsischen Ursachenkomplex zugeordnet. Um auch Patienten mit gestörter Wundheilung ein optimales Transplantationsergebnis zu ermöglichen, wurde ein auf Fibroblasten - basierender VEGF - Gentransfer zur experimentellen Präfabrikation myocutaner Weichgewebstransplantate entwickelt.

Vorherige Studien zeigten folgende Ergebnisse:

- VEGF - transfizierte Fibroblasten setzen 14 Tage aktives Transgen frei.
- Nach Injektion in Bereich von Kollagenmembranen konnte eine beschleunigte Neovaskularisation der Membran am Rattenmodell sowie eine Induktion der endogenen VEGF - Expression beobachtet werden.
- Es besteht keine Gefahr des Trafficking in andere Organe (keine systemischen Nebenwirkungen).

Das Ziel dieser Arbeit ist es nun den optimalen Applikationszeitpunkt der auf Fibroblasten - basierenden Gentherapie zur Verbesserung der Weichgewebeheilung im Muskelgewebe zu ermitteln und so den Einfluss des Applikationszeitpunktes auf die Effektivität dieser Gentherapie in vivo zu bestimmen. Die Zellapplikation wurde entweder 14, 7 oder 0 Tage vor Tx - Hebung vorgenommen. Im Anschluss wurde bei jeder Ratte je eine Probe des oberflächlichen M. graciles, eine des kaudalen Anteils

und eine des kranialen Anteils des Muskels entnommen und auf VEGF - Konzentration bzw. VEGF - Expression hin untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Ratten mit injizierten untransfizierten Fibroblasten bzw. PBS.

Folgende Hypothesen werden im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

- Die simultane Therapievariante ist am effektivsten hinsichtlich VEGF - Expression und - Konzentration.
- Nach der Injektion der VEGF - transfizierten Fibroblasten ist zu erwarten, dass eine erhöhte Konzentration an VEGF sowie eine erhöhte Expression von VEGF in den oberflächlichen Anteilen des M. graciles der Versuchsgruppe festzustellen sein wird.
- Die Konzentration und Expression von VEGF in Proben des kaudalen und kranialen Anteils des M. graciles werden sich nicht von denen der Kontrollgruppe unterscheiden.

4 Methodik

4.1 Tierversuch

Chemikalien	
Ampicillin	Invitrogen®, U.K.
Antibiotikum	Sigma - Aldrich®, U.S.A.
Basic Nucleofector Kit (Primary Fibroblasts)	AMAXA, Köln, Dt.
Diethylether	Fischar, Saarbrücken, Dt.
Dispase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Dt.
Dulbecco's modified Eagle's medium	Gibco®, Paisley, U.K.
Endo Free - Plasmid Maxi Präparation	Qiagen, Hilden, Dt Qiagen
Escherichia coli Bakterien (StammDH5α)	Invitrogen®, Carlsbad, U.S.A.
Fetal calf serum	Gibco®, Paisley, U.K.
Isofluran-Actavis	DeltaSelect GmbH, Dreieich, Dt.
Ketavet (Ketaminhydrochlorid)	Pfizer GmbH, Berlin, Dt.
Kollagenase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Dt.
LB - Agar (Lennox; pH 7,0)	BD Difco™, Maryland, U.S.A.
Methylbutan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
PBS	Invitrogen®, Carlsbad, U.S.A.
pcDNA3.1/n V5 DEST™	Invitrogen®, Carlsbad, U.S.A.
Rompun® TS 50 mg/ml	Bayer AG, Leverkusen, Dt.
S.O.C. Medium	Invitrogen®, Carlsbad, U.S.A.
Softasept	Braun AG; Melsungen, Dt.
X - Gal	PROMEGA GmbH, Mannheim, Dt.
Materialien	
5 ml Pipetten, 10 ml Pipetten, 25 ml Pipetten	Greiner, Bio - one, Frickenhausen, Dt.
Anatomische Pinzette	KLSmartin, Tuttlingen, Dt.

Augenstäbchen	Lohmann&Rauscher GmbH, Neuwied, Dt.
Chirurgische Pinzette	KLSmartin, Tuttlingen, Dt.
Handschuhe (Micro - Touch®Sensi - Clean™)	Ansell GmbH, München, Dt.
Knüpfpinzette	KLSmartin, Tuttlingen, Dt.
Makrolon Typ III Käfige	Techniplast, Varese, Italien
Mulltupfer	Fuhrmann GmbH, Köln, Dt.
Nadelhalter	KLSmartin, Tuttlingen, Dt.
Nierenschale	KLSmartin, Tuttlingen, Dt.
Petrischale	Greiner, Bio - one, Frickenhausen, Dt.
PP Röhrchen 50 ml, PP Röhrchen 15 ml	Greiner, Bio - one, Frickenhausen, Dt.
Präparierschere	KLSmartin, Tuttlingen, Dt.
T25 Kulturflasche	Greiner, Bio - one, Frickenhausen, Dt.
Tamponade	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, Dt-
Standardpelletnagerfutter N° 1320,	Altromin, Lage, Dt.
2/0 Seidenfaden	Ethicon, Nordstedt, Dt.
4.0 Vicryl-Faden	Ethicon, Nordstedt, Dt.
Kanüle Terumo® SurGuard®2 ; 0,7 mm x 25 mm	MSG, Wuppertal, Dt.

Geräte

Axioplan Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Dt.
Inkubator	Heraeus, Hanau, Dt.
Nukleofektor I	AMAXA, Köln, Dt.
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg, Dt.
Tierwaage	Satorius, Göttingen , Dt.
Z2 cell and particle Counter	Beckman Coulter, Krefeld, Dt.
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Dt.

Programme

AxioVision Rel. 4.7

4.1.1 Versuchstiere

In dieser Arbeit wurden 120 männliche, drei Monate alte Albino - Ratten des Auszuchtstammes Wistar (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Germany) mit einem Gewicht von 200 bis 250 Gramm verwendet. Zur Identifikation wurden die Tiere mit einer Ohrmarkierung versehen. Die Ratten wurden zu jeweils 5 Tieren in Makrolon Typ III Käfigen bei einer Temperatur von $22 \pm 0,5$ °C, 55% Luftfeuchtigkeit und einen 12 h Tag-/ Nachtrhythmus gehalten. Sie erhielten ein Standardpelletnagerfutter und frisches Wasser nach Bedarf.

Der Tierversuch wurde durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittel und Verbraucherschutz genehmigt (N 02-002/09).

Die Versuchstiere wurden randomisiert in sechs Gruppen eingeteilt.

Versuchsgruppe:

Gruppe	Probennummer	Tx - Hebung	Entnahmezeitpunkt
I 1	n = 41 - 45	simultan mit Injektion	3. Tag p. op.
I 2	n = 46 - 50	simultan mit Injektion	5. Tag p. op.
I 3	n = 51 - 55	simultan mit Injektion	7. Tag p. op.
I 4	n = 6 - 10	simultan mit Injektion	14. Tag p. op.
II 1	n = 21 - 25	7 d nach Injektion	3. Tag p. op.
II 2	n = 26 - 30	7 d nach Injektion	5. Tag p. op.
II 3	n = 31 - 35	7 d nach Injektion	7. Tag p. op.
II 4	n = 36 - 40	7 d nach Injektion	14. Tag p. op.
III 1	n = 1 - 5	14 d nach Injektion	3. Tag p. op.
III 2	n = 56 - 60	14 d nach Injektion	5. Tag p. op.
III 3	n = 11 - 15	14 d nach Injektion	7. Tag p. op.
III 4	n = 16 - 20	14 d nach Injektion	14. Tag p. op.

Kontrollgruppe PBS /native Fibroblasten:

Gruppe	Probennummer	Tx - Hebung	Entnahmezeitpunkt
IV 1	n = 41 - 45	simultan mit Injektion	3. Tag p. op.

IV 2	n = 46 - 50	simultan mit Injektion	5. Tag p. op.
IV 3	n = 51 - 55	simultan mit Injektion	7. Tag p. op.
IV 4	n = 56 - 60	simultan mit Injektion	14. Tag p. op.
V 1	n = 21 - 25	7 d nach Injektion	3. Tag p. op.
V 2	n = 26 - 30	7 d nach Injektion	5. Tag p. op.
V 3	n = 31 - 35	7 d nach Injektion	7. Tag p. op.
V 4	n = 36 - 40	7 d nach Injektion	14. Tag p. op.
VI 1	n = 1 - 5	14 d nach Injektion	3. Tag p. op.
VI 2	n = 6 - 10	14 d nach Injektion	5. Tag p. op.
VI 3	n = 11 - 15	14 d nach Injektion	7. Tag p. op.
VI 4	n = 16 - 20	14 d nach Injektion	14. Tag p. op.

4.1.2 Anästhesie

Die Tiere wurden einzeln in ein Glasgefäß überführt und durch das Inhalationsnarkotikum Isofluran - Actavis sediert. Anschließend erfolgte die intramuskuläre Injektion der Narkotika [Mischinjektion Ketamine (Ketavet)/ Xylazine (Rompun®TS) im Verhältnis 2:1] in den Oberschenkelmuskel des in Rückenlage befindlichen Tieres (2,5 ml/kg KG). Nach ca. 15 min konnte mit der Operation begonnen werden.

4.1.3 Zungenbiopsie

Die Ratte wurde in Seitenlage auf einem Plexiglas - OP - Tisch, abgedeckt mit sterilen Tüchern, positioniert. Die Augen wurden durch einen in Kochsalzlösung getränkten Gaze - Tupfer geschützt. Mit einem 4.0 Vicryl - Faden wurde die Zunge nach außen verlagert. Zur Prävention vor Aspiration wurde eine Rachentamponade gelegt. Pro Ratte wurden von der lateralen Zungenregion zwei schmale Schleimhautstreifen in der Größe 2 x 5 mm unter dem Mikroskop präpariert (Abbildung 3). Nach Blutstillung mit einem Mulltupfer wurde die Wunde der freien

Granulation überlassen. Die Ratten wurden in stabiler Seitenlage in Einzelkäfigen zurückgelassen, um Kannibalismusschäden vorzubeugen.

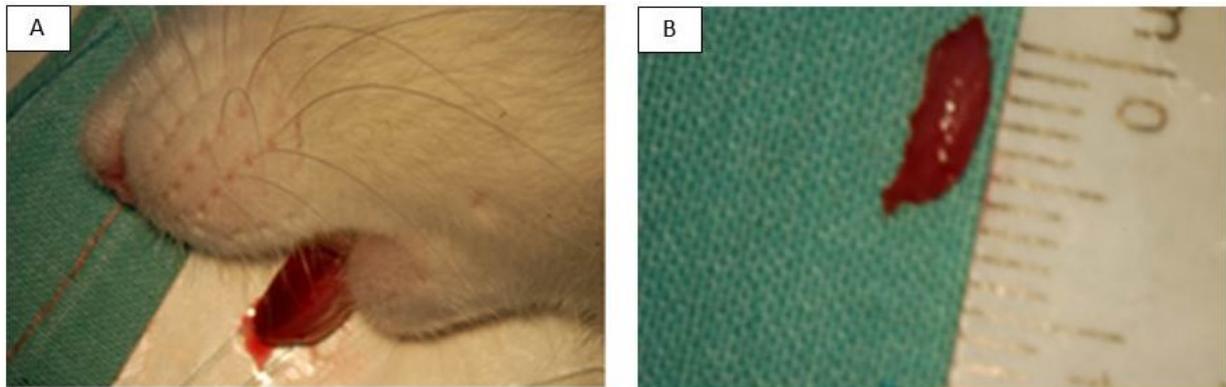


Abbildung 3: Intraoperative Aufnahmen (A) Zungenbiopsie (B) Schleimhautpräparat der Zunge.

4.1.4 Isolation und Kultivierung der Fibroblasten

Für die Isolierung der autologen Fibroblasten wurden zunächst die Proben zweifach in steriler PBS mit Zusatz von 100 IU/ml Penicillin G, 0,25 µg/ml Amphotericin B und 100 µg/ml Streptomycin gewaschen. Die Proben wurden mittels Einmalskalpell mechanisch zerkleinert und durch einen Enzymcocktail aus 0,03%iger Kollagenase / 0,01%iger Dispase II in PBS für 2 - 3 h bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde durch das Hinzufügen von 1% FCS in PBS gestoppt. Nach Zentrifugation (5 min, 2.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und die verbleibenden Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Das Kulturmedium entsprach DMEM mit einem Zusatz von 10% FCS und 1% Penicillin / Streptomycin, um einer Kontamination vorzubeugen. Die Zellen wurden anschließend in T25 Kulturflaschen überführt. Es folgte die Inkubation für mehrere Tage bei einer Atmosphäre von 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator, wobei alle drei Tage ein Mediumwechsel unter sterilen Bedingungen vorgenommen wurde. Zunächst wurde dafür das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, welches anschließend wieder abgesaugt wurde. Durch Zugabe von 2,5 mg/ml Trypsin / 0,2 mg/ml EDTA und dreiminütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen von dem Flaschenboden gelöst. Nach Verwerfen von EDTA / Trypsin wurde frisches Kulturmedium hinzugegeben.

Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurde die Zellzahl gemessen. Die Charakterisierung der Zellen erfolgte anhand morphologischer Merkmale (langgestreckte Zellkörper, lineare oder bündel - ähnliche Ausrichtung der Zellen) mittels Phasenkontrastmikroskopie. Die Zellen wurden wie beim regelmäßigen Mediumwechsel von dem Flaschenboden gelöst und anschließend zentrifugiert (5 min, 1.500 rpm). Das entstandene Zellpellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert. Die Zellzahl konnte nun im Z2 Cell and Particle Counter bestimmt werden.

4.1.5 Gentechnologische Arbeiten

Der pVEGF₁₆₄3.1/nV5 wurde vom Institut für Pathologie, Friedrich - Alexander - Universität Erlangen - Nürnberg zur Verfügung gestellt. Die cDNA des VEGF₁₆₄ (pVEGF₁₆₄3.1/nV5) wurde durch das Gateway® - Klonierungsverfahren der Firma Invitrogen in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1/nV5-DEST™ (7136 bp) subkloniert (Abbildung 4). Per LR - Reaktion wurde die VEGF₁₆₄ - Sequenz zwischen der Rekombinationskassete attR1 und attR2 transferiert. Unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV - Promotors wurde VEGF₁₆₄ als C-terminales V5 - Fusionsprotein exprimiert.

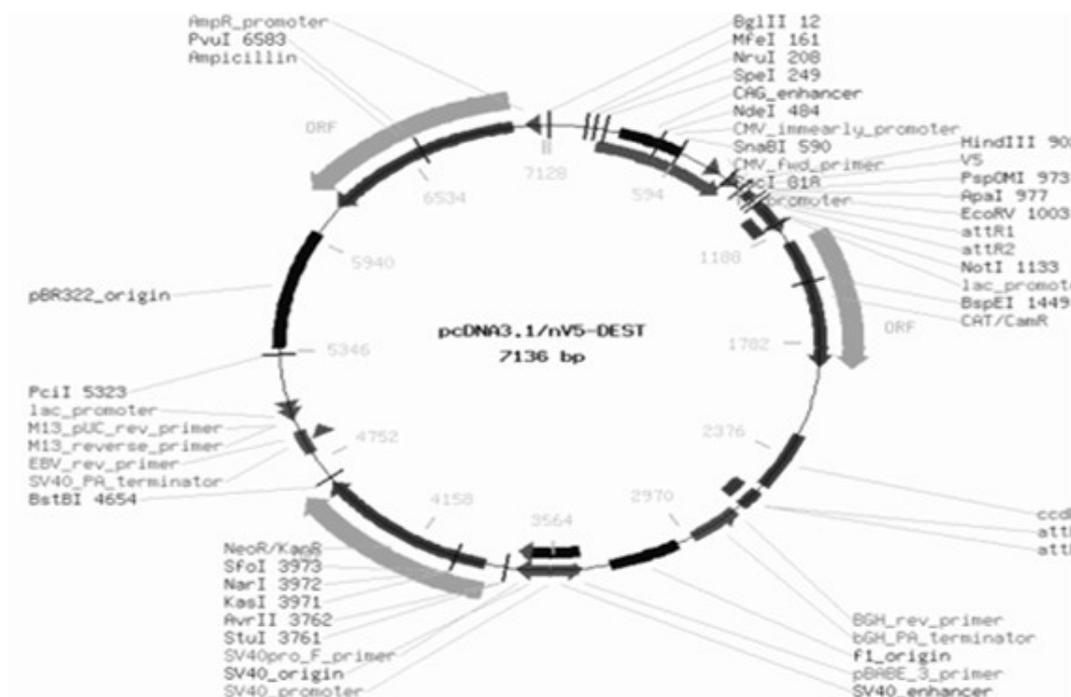


Abbildung 4: Karte des Plasmids pVEGF₁₆₄ 3.1/n V5 (Invitrogen®)

Durch Hitzeschock wurde das erhaltene Plasmid in *Escherichia coli* Bakterien des Stammes DH5 α transformiert (Inkubation im Thermoblock bei 42 °C für 45 sec). Die Bakterien wurden auf LB / Ampicillin - enthaltenen Selektionsplatten ausgestrichen. Über Nacht gewachsene Kolonien (Inkubation bei 37 °C) wurden mittels EndoFree - Plasmid Maxi Präparation Kit aufgereinigt und nachfolgend sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden auf den richtigen Leserahmen hin überprüft und mit Hilfe von BLAST mit der Datenbank verglichen.

4.1.6 Transfektion

Entsprechend des weiteren Versuchsablaufs wurden die isolierten autologen Fibroblasten der Versuchsgruppe (n = 60) mit pVEGF₁₆₄3.1/nV5 transfiziert, während die der Kontrollgruppe (n = 60) nativ belassen wurden. Die Fibroblasten wurden anschließend über einen Zeitraum von 24 h weiter kultiviert.

Die Transfektion der primären Fibroblasten der Versuchsgruppe wurde durch Nukleofektion, einem non - viralen Gentransfer, mittels des AMAXA Basic Nucleofector Kit „Primary Fibroblasten“ nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt (Programm A-024). 1×10^7 Fibroblasten und 3 μ g pVEGF₁₆₄3.1/nV5 wurden dazu mit 100 μ l Nukleofektions - Lösung versetzt. Durch kurzzeitige Depolarisation der Zellmembran konnte das Plasmid bis in den Zellkern gelangen.

Für die weitere Kultivierung der transfizierten Fibroblasten wurden 4 ml DMEM mit einem Zusatz von 10% FCS und 1% Penicillin / Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert.

Die Transfektionseffizienz konnte nach Transfektion der Fibroblasten mit einem pmaxGFP durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt werden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop mit GFP - Filter (Anregung: BP 485/20, Strahlenteiler: FT 510, Emission: LP 515) wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm der Anteil grün fluoreszierender Zellen bestimmt. Die optische Beurteilung erfolgte nach 12 bzw. 48 h.

4.1.7 Injektion und Tx - Hebung

Den Tieren der Versuchsgruppe wurden 1×10^7 autologe VEGF - transgene Fibroblasten in die Region zwischen M. graciles und der Subkutis injiziert. Den Tieren der Kontrollgruppe wurden ipsilateral 1×10^7 nativ - belassene autologe Fibroblasten und kontralateral PBS in selbige Region injiziert. Die Injektion erfolgte 14 Tage vor Tx - Hebung (n = 20), 7 Tage vor Tx - Hebung (n = 20) oder simultan mit Tx - Hebung (n = 20).

Unter sterilen Bedingungen mit mikrochirurgischen Techniken und Instrumenten wurde die Tx - Hebung durchgeführt. Zunächst wurden die Ratten wie in 4.1.2 beschrieben anästhesiert. Nach einer Inzision in die Region des M. graciles wurde die A. femoralis von der Vene separiert. Die rechte und linke oberflächliche A. femoralis wurde durch Einzelknopfnähte von der Blutzufuhr abgetrennt (Abbildung 5). Anschließend wurde die Wunde mit 2/0 Seidennähten geschlossen. Nach 3, 5, 7 oder 14 Tagen p. op. wurden die Tiere durch Hyperinsufflation mit Ätherdampf getötet. Gewebeproben des oberflächlichen, des kaudalen und des kranialen Anteils des M. graciles wurden entnommen.

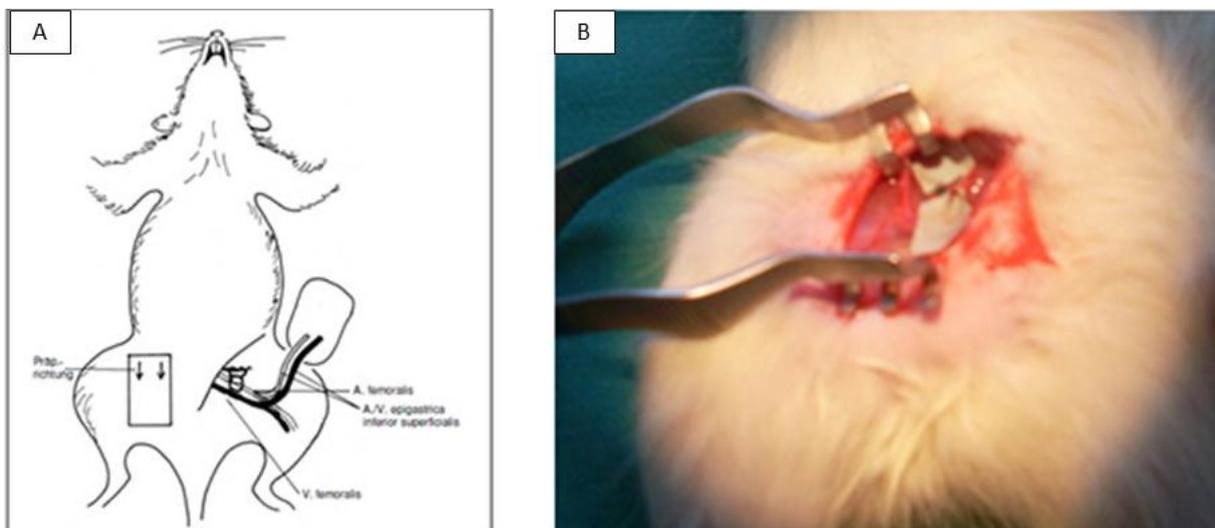


Abbildung 5: Legierung der A. femoralis (A) Op-Skizze (B) intraoperative Fotoaufnahme

4.2 Real - time Polymerasekettenreaktion

Um kleine Mengen an DNA molekularbiologischen Analysen zugänglich zu machen, wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion entwickelt (Mullis et al. 1987). Quantitative Aussagen waren jedoch nicht möglich. Durch die Einführung der Real - time PCR, eine Erweiterung basierend auf einen kinetischen Ansatz, wurde die quantitative Analyse ermöglicht (Higuchi et al. 1992). Die Real - time Polymerasekettenreaktion stellt eine sehr zuverlässige und genaue Methode zur relativen Quantifizierung von spezifischer RNA in der Molekularbiologie dar.

Chemikalien

Chloroform (Roti ® - phenol/C/I)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
DEPC - Wasser 0,1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
PureZol TM RNA Isolation Reagent	BioRAD, München, Dt
QuantiTect® Primer Assay	
- rVEGF-Primer (Rn_RGD:619991_1_SG)	Qiagen, Hilden, Dt.
- β-Actin Primer (Rn_Actb_1_SG)	Qiagen, Hilden, Dt.
QuantiTect TM RT Mix	Qiagen, Hilden, Dt.
RNAse free water	Qiagen, Hilden, Dt.
Rotor - Gene SYBR Green RT - PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, Dt.
Stickstoff (flüssig)	Linde AG, Pullach, Dt.
TE Buffer pH 8.0	ambion®, U.S.A.

Materialien

72 - rt PCR Well Platte	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.
Eppendorf Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.
Eppendorf-Pipette 100 µl -1000 µl ; 10 µl-100 µl; 1 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.
filtertips hydrophob Pipettenspitzen 1000 µl; 0,5 - 10 µl; 1-100 µl	neoLab, Heidelberg, Dt.
Mörser	Sigma - Aldrich®, U.S.A.
PCR - Tubes	Qiagen, Hilden , Dt.
Pinzette	KLSmartin, Tuttlingen, Dt.

Schale	Sigma - Aldrich®, U.S.A.
Skalpell	Dahlhausen, Köln, Dt.
Spachtel	KLSmartin, Tuttlingen, Dt.
<hr/>	
Geräte	
Nano - drop Spektrophotometer	Thermo Scientific, München, Dt.
Rotor - Gene Q	Qiagen, Hilden, Dt.
Vortex Genie 2	Scientific industries Si, U.S.A.
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Dt.
<hr/>	
Programme	
Nano - drop 7.0	
Rotor - Gene Q Series Software 2.0.2.	
<hr/>	

4.2.1 RNA - Isolierung

Die bei -20°C gelagerten Gewebeproben (Gewicht < 20 mg) wurden mit einem sterilen Skalpell in ca. 3 mm^2 große Stücke zerkleinert. Zur weiteren Gewebezerkleinerung wurde das Gewebe mit flüssigem Stickstoff versetzt und anschließend mit einem Pistill in einem Mörser zu einem feinen Pulver zermürbt. Das Gewebepulver wurde in ein RNase - freies Eppendorf - Gefäß überführt.

Die RNA - Isolierung erfolgte nach der „single step“ Methode von Chomczynski unter Verwendung von PureZol - Reagent (Chomczynski et al. 1987). Dabei wurde das Gewebepulver mit 1 ml PureZol - Reagent versetzt und auf dem Vortex für 10 sec homogenisiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis folgte ein Zentrifugationsschritt (10 min, 0°C , 12.000 rpm). Das PureZol - Reagent enthält u.a. Guanidiniumisothiocyanat, welches die Enzymaktivität der RNase hemmt, während es zeitgleich die Zellen lysiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit jeweils 200 μl Chloroform vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde der Reaktionsansatz für 15 min zentrifugiert (4°C , 12.000 rpm). Drei Phasen haben sich formiert: eine obere farblose wässrige Phase, die die RNA enthält, eine dünne weiße

Interphase, die die DNA enthält und eine untere rote organische Phase, die hauptsächlich Proteine enthält. Für die Präzipitation der RNA wurde die obere wässrige Phase mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach fünfmaligem Invertieren und zehnmütiger Inkubation bei RT folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min (4°C, 12.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol (verdünnt mit DEPC - Wasser) resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet für ca. 10 min an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde mit 20 µl RNase freiem Wasser resuspendiert.

Die RNA - Ausbeute wurde mit Nano - drop über die spektralphotometrische Messung der Absorption im Eluat bei 260 nm (A₂₆₀) bestimmt. Die Absorptionwerte bei 260 nm sollten zwischen 0,15 und 1,0 liegen, um eine möglichst genaue Messung zu erhalten. Falls nötig wurde die gewonnene Konzentration an RNA mit DEPC - Wasser verdünnt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA/ml. Um eine mögliche Proteinkontamination oder Verunreinigung durch DNA ausschließen zu können, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Dabei sollte der Quotient der optischen Dichte OD₂₆₀ / OD₂₈₀ zw. 1,7 und 2,0 liegen (Sambrook et al. 1989).

Für jeden Reaktionsansatz wurden 10 ng/µl total RNA benötigt. Die RNA - Proben wurden dazu mit DEPC - Wasser verdünnt. Je nachdem wie hoch der total RNA - Gehalt lag, wurde eine geeignete Verdünnung (1:1000; 1:100; 1:10) gewählt.

4.2.2 Quantifizierung der mRNA

Die relative Quantifizierung der mRNA erfolgte unter dem Einsatz des Rotor - Gene SYBR Green RT - PCR Kit und des Rotor Gene Q Cycler System. Die Reaktion verlief im Fast One - Step Rt - PCR Programm. Pro Durchlauf konnten 72 Reaktionsgefäße, darunter immer zwei Negativkontrollen (9,75 µl RNase freies Wasser), mitgeführt werden (72 - well - rotor). Jede Probe lief als Triplett.

Das Reaktionsvolumen für jedes einzelne Reaktionsgefäß betrug 25 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

Chemikalie	Reaktionsansatz (Total = 25µl)
10 x QuantiTect Primer Assay	2,5 µl
2 x Rotor - Gene SYBR Green Rt - PCR Master Mix	12,5 µl
RNase - freies Wasser	variabel (max. 9,75 µl)
Rotor - Gene RT Mix 10	0,25 µl
Template RNA	≤ 10 ng/Reaktion

Für jede Probe wurde das Volumen an total RNA berechnet, welches pro Reaktionsansatz benötigt wurde.

Berechnungsbeispiel: total RNA - Gehalt = 3,463 ng/µl



10 ng / 3,463 ng/µl ≈ 2,89 µl total RNA

9,75 µl - 2,89 µl = 6,86 µl RNase - freies - Wasser

Durch eine reverse Transkriptase, eine RNA - abhängige DNA - Polymerase, erfolgte die Umschreibung der mRNA in komplementäre DNA. Die Synthese der cDNA erfolgte bei 55°C über einen Zeitraum von 10 min und wurde über eine Inaktivierung der reverse Transkriptase durch einen Temperaturanstieg auf 95°C über 5 min beendet. Durch den Temperaturanstieg wurde darüber hinaus die HotStarTaq Plus DNA - Polymerase aktiviert (Abbildung 6).

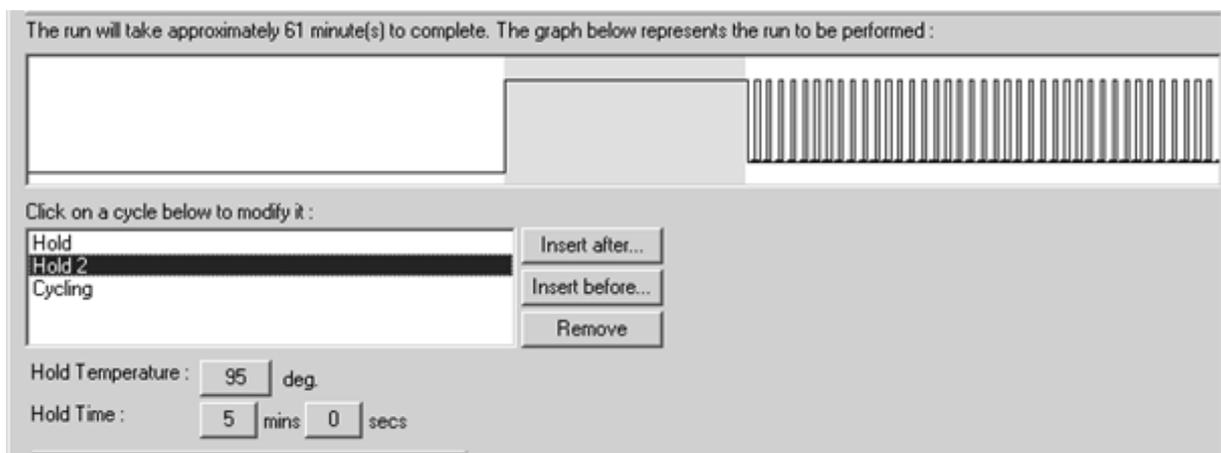


Abbildung 6: Fast One - Step Rt - PCR Programm. Inaktivierung der reverse Transkriptase bei 95° über 5 min. Nachfolgend Amplifizierung der cDNA über 40 Zyklen.

Die cDNA wurden innerhalb von 40 aufeinanderfolgenden Zyklen exponentiell amplifiziert. Ein Zyklus setzte sich aus drei Phasen zusammen: Denaturierung, Annealing und Extension. Während der Denaturierung bei 95°C lösten sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren der DNA - Stränge. Die DNA - Einzelstränge waren so für die Primer zugänglich, die sich durch eine komplementäre Basen - Sequenz an die zu amplifizierenden DNA - Stränge anlagerten. Ausgehend von dem Primer konnten nun die DNA - Einzelstränge in 5' – 3' - Richtung durch die hitzestabile Polymerase komplementiert werden. Annealing und Extension erfolgten kombiniert bei 60°C (Abbildung 7).

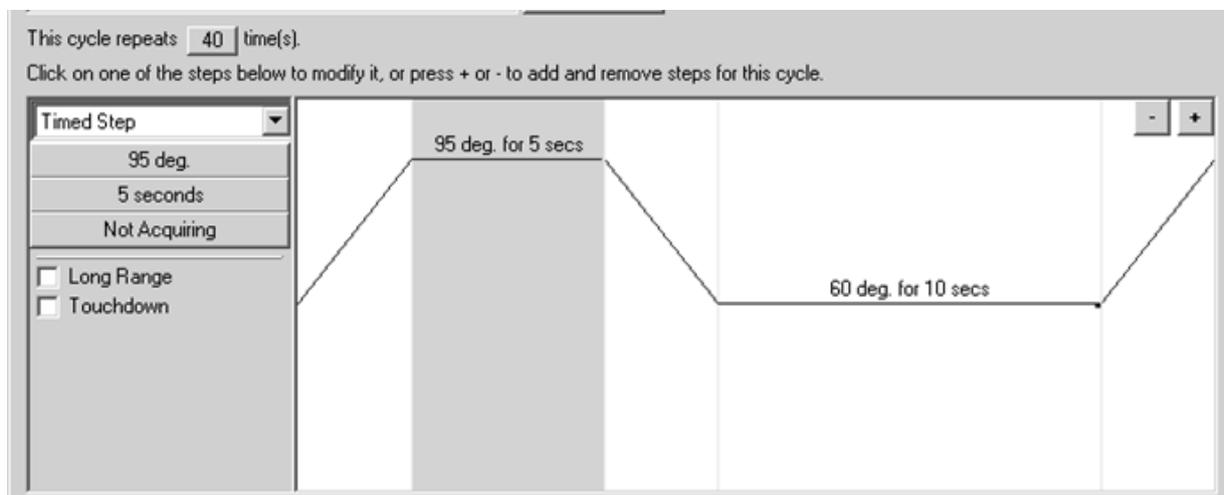


Abbildung 7: Ablauf eines PCR - Zyklus. Ein Zyklus setzt sich aus drei Phasen zusammen: Denaturierung (95°, 5 sec), Annealing und Extension (60°, 10 sec).

Die DNA - Amplifikation verläuft exponentiell. In der exponentiellen Phase (entspricht der linearen Phase in der logarithmischen Darstellung) ist in jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA - Menge zu verzeichnen. Hier erfolgt die Untersuchung der DNA - Amplifikation. Als Marker wurde das SYBR Green verwendet, welches in den Zwischenräumen der DNA - Helix interkaliert und fluoresziert. Bei Abwesenheit von doppelsträngiger DNA fluoresziert SYBR Green gering. Je mehr doppelsträngige DNA gebildet wird, desto mehr SYBR Green bindet und das Fluoreszenzsignal wird stärker. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zur amplifizierten DNA - Menge, und verläuft somit ebenfalls exponentiell. Wenn das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert (Treshold) erreicht, wird die Zykluszahl vermerkt. Der Schwellenwert wurde bei 10^{-1} RFU definiert (Abbildung 8).

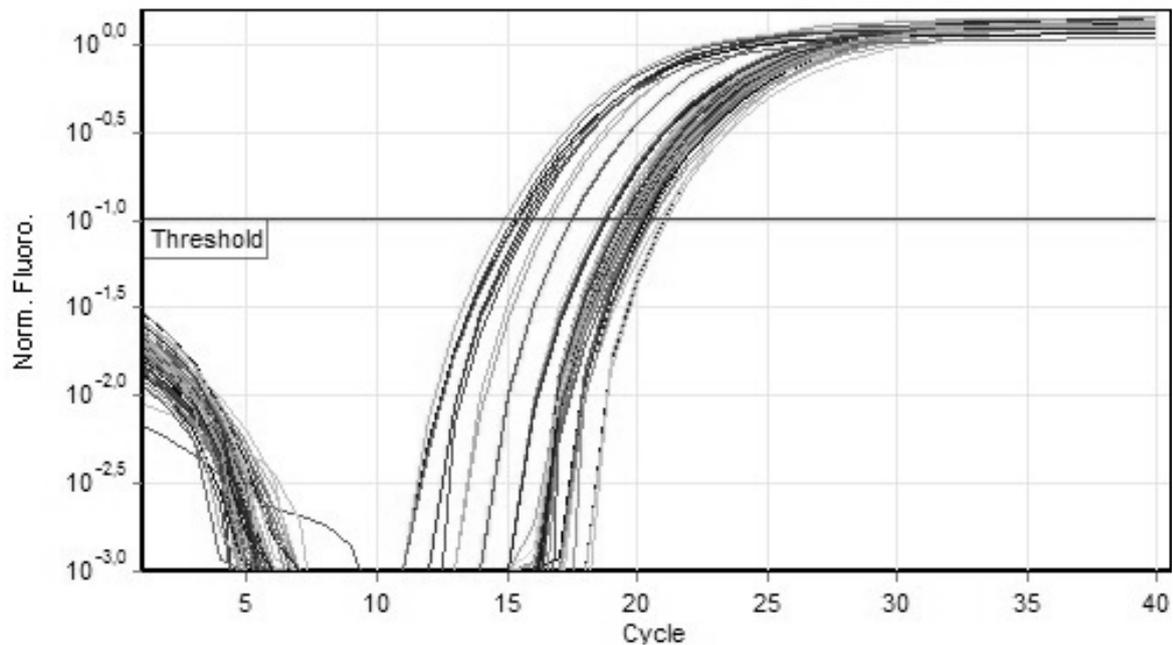


Abbildung 8: Logarithmische Darstellung der PCR - Daten. Der Treshold wurde bei 10^{-1} RFU festgelegt. Wenn das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert erreicht, wird die Zykluszahl vermerkt.

Die ermittelten C_t - Werte des zu untersuchenden Gens VEGF und des Referenzgens β - Actin, einem konstitutiv exprimiertem House - Keeping Gen, wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ - Methode ausgewertet. Dazu wurde zunächst der C_t - Wert des House - Keeping Gens vom C_t - Wert des Zielgens abgezogen. So konnte gewährleistet werden, dass sich global methodische Fehler (Effizienz der reversen Transkriptase, Effizienz der RNA - Isolierung), die alle Gene in gleichem Maße betreffen, weitestgehend aufheben (Normalisierung der Daten). Anschließend wurde der $\Delta\Delta C_t$ - Wert zwischen beiden Gruppen ermittelt.

$$\Delta C_t = C_t(\text{VEGF}) - C_t(\beta - \text{Actin})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Versuchsgruppe}) - \Delta C_t(\text{Kontrollgruppe})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

4.3 In - Situ Hybridisierung

Die In - Situ Hybridisierung stellt eine Nachweismethode zum direkten Nachweis von Nukleinsäure wie RNA dar. Es ist so möglich qualitative Aussagen über die Expression eines bestimmten Gens zu treffen. Die Markierung erfolgt über den Einbau modifizierter Gene. Man spricht von in - situ, da man die Nukleinsäure direkt in dem jeweiligem Gewebe nachweist.

Chemikalien

1,4 - Dithiothreitol (DTT)	PROMEGA GmbH, Mannheim, Dt.
10 x Puffer R	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
10 x Tango Puffer	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
10 x DIG RNA Labeling Mix	Roche, Mannheim, Dt.
10 x Taq Puffer	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
50 x TAE-Laufpuffer	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
5 x Transkriptionspuffer	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
6 x Loadingbuffer	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
Agarosepulver	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
Ampicillin	Invitrogen®, U.K.
Blocking - Reagent	Roche, Mannheim, Dt.
BSA Fraction V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
Dextransulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
dNTPs	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
Endo Free Plasmid - Purification Maxi - Kit	Qiagen, Hilden, Dt.
Ethidiumbromid	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
Eukitt	KindlerGmbH&Co, Freiburg, Dt.
Ficol 400	Sigma - Aldrich®, U.S.A.
Formamid	Sigma - Aldrich®, U.S.A.
HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
IPTG	PROMEGA GmbH, Mannheim, Dt.

KCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
LB - Agar (Lennox; pH 7,0)	BD Difco™, Maryland, U.S.A.
Marker-Gene Ruler qkb Plus DNA	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
MgCl ₂	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
Mineralöl	Sigma - Aldrich®, U.S.A.
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
NaCl	J.T. Baker, Niederlande
NaOH (Tablette)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
One Shot® E.Coli	Invitrogen, Paisley, U.K.
Paraformaldehyd	Merck, Hohenbrunn, Dt.
PBS	Invitrogen®, Carlsbad, U.S.A.
Poly - A - RNA	Biocompare, U.S.A
Polymerase (T3/T7/Sp6)	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
Polyvenylpyrolidon	Sigma - Aldrich®, U.S.A.
Primer	Invitrogen, Paisley, U.K.
QIAquick Gel Extractions Kit QG Puffer PE Puffer	Qiagen, Hilden, Dt.
Restriktionsenzyme (Xbal, HindIII)	Gibco®, Paisley, U.K.
RNasin Ribonuclease Inhibitor	PROMEGA GmbH, Mannheim, Dt.
S.O.C. Medium	Invitrogen, Paisley, U.K.
Taq Polymerase	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Dt.
TB - Medium	Invitrogen, Paisley, U.K.
TEA	BioWORLD, U.S.A.
TOPO TA Cloning Dual Promotor Kit	Invitrogen, Paisley, U.K.
Tri – Na - Citrat x 2H ₂ O	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
TRIS - Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Merck KGaA, Darmstadt, Dt.
TRIS - HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
Tween 20	Dako Cytomation, Eching, Dt.
X - Gal	PROMEGA GmbH, Mannheim, Dt.
Yeast tRNA	Roche, Mannheim, Dt.

Lösungsansätze	
10 x PBS	80 g NaCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2 g KCl 2 g KH ₂ PO ₄ in 1 l Aqua dest.; pH 7,2
20 x SSC	175,3 g 3 M NaCl 88,2 g 0,3 M Tri - Na - Citrat x 2H ₂ O in 1000 ml Aqua dest. pH 7,4
3% PFA in PBS	30 g Paraformaldehyd in 800 ml DEPC - Wasser 1 Tablette NaOH 100 ml PBS pH 7,0 einstellen auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen
50 x Denhardt's Lösung	2,5 g Ficol 400 2,5 g Polyvenylpyrolidon 2,5 g BSA Fraktion V in 250 ml Aqua dest.
BI	120 ml 1 M TRIS 36 ml 5 M NaCl in 1200 ml VE - Wasser pH 7,5
BIII	100 ml 1 M TRIS 20 ml 5 M NaCl 50 ml 1 M MgCl ₂ in 1000 ml Aqua dest. pH 9,5
Blockierungslösung	1 g 0,5% Blocking - Reagent in 200 ml BI - Puffer
Färbe - Lösung	6 ml BIII 21 µl BCIP 27 µl NBT / 70%iges DMF
Grundmix 10 x	2,0 ml 1 M TRIS - HCl 2,0 ml 50 x Denhardt's Lösung 2,0 ml Yeast tRNA (25 mg/ml) 2,0 ml poly - A - RNA (5 mg/ml) 0,2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 1,8 ml DEPC - Wasser
Mastermix	1333,2 µl 5 M NaCl 2000 µl Grundmix 1000 µl 2 M 1,4 Dithioereitol (DTT) 200 µl 0,1 M EDTA 4 ml Dextransulfat
TEA (0,1 M)	14,7 g TEA in 1000 ml Aqua dest. pH 8,0
TE - Puffer	5 ml 1 M TRIS 1 ml 0,5 M EDTA in 500 ml VE-Wasser pH 8,0
TRIS	2,5 l Aqua dest. 21,9 g NaCl 17,1 g TRIS - HCl 2,25 g TRIS - Base (Tris(hydroxymethyl) aminomethane) 2,5 ml Tween 20 pH 7,6
TRIS (1 M)	121,14 g TRIS in 1000 ml Aqua dest. pH 7,6 mit 37%igem HCl einstellen

Materialien

Elektrophoresekammer	C.B.S. Scientific, U.S.A.
Mikrotom - Klängen	Feather, Japan
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Dt.
PCR - Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.
pH - Papier	Merck KGaA, Darmstadt, Dt.
Pipettenspitzen	neoLab, Heidelberg, Dt.
QIAquick spin columnes	Qiagen, Hilden, Dt.
Skalpell	Dahlhausen, Köln, Dt.
Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.

Geräte

Axioplan Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Dt.
Consort	Sigma - Aldrich®, U.S.A.
Heizplatte	stuart, U.K.
Inkubator	Heraeus, Hanau, Dt.
Kryostat	Leica GmbH, Wetzlar, Dt.
Labor - Waage LE323S	Sartorius AG, Göttingen, Dt.
SYNOGBOX-EF	Synoptics, U.K.
Thermocycler Rotor Gene Q	Qiagen, Hilden, Dt.
Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Dt.
Vortex Genie 2	Scientific industries Si, U.S.A.
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Dt.

4.3.1 Anfertigung der Präparate

Die bei -80°C in Stickstoff gelagerten Gewebeproben wurden im Kryostat (-25°C) aufgetaut. Die Explantate wurden in Tissue - Tek eingebettet, wobei die Schnittführung parallel zum Muskelquerschnitt gewährleistet wurde. Die $10\ \mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden auf saubere, fettfreie Objektträger aufgeschmolzen und bei

37°C auf einer Heizplatte getrocknet. Von jeder Probe wurden zwei Objektträger mit je zwei Schnitten angefertigt. Ein Objektträger diente der Sense- und der andere Objektträger der Anti - Sense - Färbung. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Präparate wurden in PBS - Küvetten für 10 - 15 min bei 4°C aufgetaut. Nach fünfminütiger Fixierung in 3% PFA / PBS folgte ein Waschvorgang in 1 x PBS (10 min) und ein weiterer Waschvorgang in Aqua dest. (2 x 5min). Die Präparate wurden in 0,1 M TEA über 20 min bei RT acetyliert. Nach fünfminütigem Waschvorgang in PBS wurden die Präparate in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 80%, 100%) für je 2 min dehydriert und schließlich bei RT getrocknet.

4.3.2 DNA - Isolierung und Amplifizierung

Unter Gebrauch des All - tissue DNA - Extraktions - Kits wurde die genomische DNA aus den Fibroblasten der Wistar - Ratten isoliert. Die Zellen wurden mit Lyse - Mix versetzt. Eine Inkubation von 30 min bei 65°C folgte.

Chemikalie	Volumen (Total = 560µl)
Lyse 1	500 µl
Lyse 2	50 µl
Enzym	10 µl

Nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 13.000 rpm) wurden 500 µl des entstandenen klaren Überstandes mit 375 µl Lyse 3 versetzt. Der Reaktionsansatz inkubierte bei -20°C für 5 min. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4°C, 13.000 rpm) wurden 800 µl des entstandenen Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Durch Zugabe von Isopropanol wurde die DNA gefällt und nach Zentrifugation (15 min, 4°C, 13.000 rpm) schließlich pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskaltem Ethanol resuspendiert.

Die Standard - PCR nach Kary Mullis dient der in vitro Amplifizierung der rVEGF Sequenz für die anschließende TOPO Klonierung. Um den zu amplifizierenden DNA - Bereich von beiden Seiten einzugrenzen, wurden zwei Primer verwendet.

Forward - GAGAGGCCGAAGTCTGTTTG	rVEGF-A	(266 bp)
Reverse - CAGGCTCCTGATTCTTCCAG	NM_0318363	(266 bp)

Pro Reaktionsansatz wurden 500 ng genomische DNA benötigt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Chemikalie	Volumen (Total = 50 µl)
DNA Template	1 µl
10 x PCR Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	5 µl
Primer Forward (10 µM)	1 µl
Primer Reverse (10 µM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl
dNTPs (25 nM)	0,4 µl
TaqPolymerase	0,25 µl
ddH ₂ O	35,35 µl

Die Reaktion lief im Thermocycler über ein fest definiertes Programm ab. Nach dreiminütiger initialer Denaturierung bei 94°C folgte die Amplifizierung der DNA in 35 aufeinanderfolgende Zyklen.

Dabei setzte sich ein Zyklus wie folgt zusammen:

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94°C	3 min
Primer Annealing	60°C	30 sec
Primer Extension	72°C	1 min

Der letzte Syntheseschritt erfolgte bei 72°C über 10 min. Um einen Verdunsten des Tubeninhalts vorzubeugen, wurde der Reaktionsansatz mit Mineralöl überschichtet.

Die Analyse der Amplifikationsprodukte erfolgte mit Hilfe der Agarose - Gelelektrophorese. Für die Herstellung eines nativen 1%igen Agarose - Gels wurde 1 g Agarosepulver unter Aufkochen in 100 ml

gebrauchsfertigem TAE - Laufpuffer gelöst bis eine klare Lösung entstand. Die Lösung wurde auf 50°C abgekühlt und mit 20 µl Ethidiumbromid versetzt, bevor es in eine Gelkassette gegossen wurde.

Die gegossenen Gelkassetten wurden in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE - Laufpuffer geflutet. Die DNA - Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und anschließend in die Geltaschen pipettiert (15 µl). Beim Anlegen einer elektrischen Spannung von 150 V wanderten die negativ geladenen Desoxyribonukleinsäuren, entsprechend ihrem Molekulargewicht mit einer Geschwindigkeit umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare, durch die Gelmatrix zur Anode. In jedem Gel lief ein Größenstandard mit (10 µl), der eine definierte Menge an DNA - Fragmente bekannter Basenpaarlänge beinhaltet.

Die Analyse erfolgte am SYNOGBOX - EF unter UV - Bestrahlung. Die Ethidiumbromidmoleküle interkalieren zwischen den Basen der DNA und verändern so ihr Anregungsspektrum. Das Fluoreszenzsignal nach UV - Bestrahlung des interkalierten Ethidiums ist im Vergleich zu dem der freien Ethidiumbromidmoleküle im Gel stark erhöht (Wahl et al. 1970). Die DNA - Banden konnte klar vom dunklen Hintergrund unterschieden werden. Die Expositionsdauer wurde auf ein Minimum begrenzt, um DNA - Schäden zu vermeiden. Die Banden wurden fotodokumentarisch festgehalten.

Die Isolierung der DNA - Fragmente vom Agarose - Gel geschah mit Hilfe des QIAquick Gel Extractions - Kit. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der selektiven Bindung der DNA an einzigartig gestalteten Silika - Gelmembranen und die Solubilisierung der Agarose mit Hilfe des Bindungspuffer QG, der die dafür verantwortlichen chaotropen Salze enthält. Für die DNA - Bindung ist ein hoher Salzgehalt und ein pH < 7,5 erforderlich. Für die Elution ist dagegen ein höherer pH - Wert und eine niedrigere Salzkonzentration notwendig.

Die Banden wurden mit einem Skalpell unter UV - Illumination aus dem Agarose - Gel geschnitten. Die DNA - Fragmente inklusive Agarose - Gel wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, abgewogen und in einem Verhältnis von 1:3 mit Puffer QG versetzt. Der Reaktionsansatz inkubierte über 10 min im Thermomixer bei 50°C mit mehrfachen zwischenzeitlichen vortexen, bis zur vollständigen Lösung des

Gels. Der Puffer solubilisierter die Agarose - Gelstücke. Der Inhalt wurde in das QIAquick Säulchen überführt, welches sich in einem Sammelgefäß befand (2 ml Tube). Nach Zentrifugation (1 min, 4°C, 13.000 rpm) wurde das Eluat verworfen und das QIAquick Säulchen in ein neues Sammelgefäß überführt. Nach zweifachen Waschen in 0,5 ml PE - Puffer, wurde das Eluat verworfen und anschließend zentrifugiert (1 min, 4°C, 13.000 rpm). Die Elution der DNA erfolgte in einem neuen Sammelgefäß durch Zusatz von 50µl Aqua dest. während einminütiger Zentrifugation (4°C, 13.000 rpm).

4.3.3 Klonierung

Für die Klonierung der erhaltenen Sequenz in den TOPO[®]TA Vektor wurde das TOPO[®]TA Cloning - Kit verwendet. Der Vektor liegt linearisiert vor und ist kovalent an die Topoisomerase I gebunden. Es wird keine Ligase benötigt. Die Taq - Polymerase, mit terminaler Transferase - Aktivität, hängt an die 3' - Enden von den PCR - Produkten einzelne Desoxyadenosine an. Analog dazu besitzt der linearisierte TOPO[®] - Vektor am 3' - Ende überhängende Desoxythymidin - Reste. Eine effiziente Ligation zwischen dem PCR - Insert und Vektor ist ermöglicht. Die freiwerdende Energie bei der Lösung des Enzyms von dem Vektor wird für die neue Verknüpfung des PCR - Produkts mit dem Vektor genutzt.

Für die Klonierung wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

Chemikalie	Volumen (Total = 5 µl)
PCR - Produkt	1 µl
Salzlösung	1 µl
Wasser	3 µl
TOPO [®] Vektor	1 µl

Nach Zentrifugation (1 min, 4°C, 13.000 rpm) und Inkubation über 5 min bei RT wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt.

Die Transformation erfolgte durch Zusammenführen von One Shot® chemisch kompetenter E.coli Zellen mit 2 µl des TOPO - Reaktionsansatzes. Das Gemisch inkubierte über 20 – 30 min auf Eis. Nach einem Hitzeschock über 30 sec bei 42°C wurden die Reaktionsgefäße erneut auf Eis überführt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit S.O.C. Medium bei 37°C im Schüttelinkubator. Die Plasmid - haltigen E.coli Zellen wurden auf LB - Amp - Platten, auf der X - Gal und IPTG ausgestrichen wurden, ausgebracht. Der Ansatz inkubierte über Nacht.

Die Multiple Cloning Site (MSC) liegt inmitten der kodierenden Sequenz der β - Galaktosidase. Wenn die Sequenz durch ein Insert unterbrochen wird, kann das Enzym nicht mehr exprimiert werden. X - Gal kann nicht mehr gespalten werden und es entsteht kein blauer Farbstoff. Nach einer effizienten Klonierung erscheinen die Kolonien weiß. Mit dem Plasmid - Maxi - Kit von QIAGEN wurde nach Vorgaben des Herstellers die Plasmid - DNA aus den erfolgreich klonierten Bakterienkulturen isoliert.

4.3.4 In vitro - Transkription

Die DNA von VEGF - A wurde in den pCR II - TOPO Vektor einkloniert, der an beiden Enden der MSC einen Promotor für eine RNA - Polymerase (Sp6 und T7) besitzt. Diese Regionen müssen zunächst linearisiert werden, um einen gezielten Abbruch der in vitro - Transkription zu ermöglichen. Man erhält eine mRNA - Sonde in gewünschter Länge und Basensequenz.

Folgende Restriktionsenzyme und Polymerasen kamen zur Anwendung:

	Sense (5' - 3')	Antisense (3' - 5')
Restriktionsenzym	Xbal	HindIII
Puffer	10 x Tango-Puffer	10 x Puffer R
Polymerase	Sp6	T7

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt vorbereitet:

Chemikalie	Volumen (Total = 20 µl)
DANN (0,5-1 µg/µl)	1 µl
10 x Tango Puffer bzw. 10 x Puffer R	2 µl
XbaI bzw. HindIII	1 µl
H ₂ O	16 µl

Der Reaktionsansatz inkubierte über Nacht bei 37°C und wurde anschließend bei 65°C über 5 min hitzeinaktiviert. Zur Kontrolle der Klonierungseffizienz wurde der Vektor mit dem Enzym HindIII und XbaI zeitgleich verdaut. Die Proben wurde anschließend auf ein 1%iges Agarose - Gel aufgetragen.

Für die in vitro - Transkription wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

Chemikalie	Volumen (Total = 20 µl)
linearisiertes Plasmid (0,5-1 µg)	2 µl
10 x DIG RNA Labeling Mix	2 µl
5 x Transkriptionspuffer	4 µl
100 mM DTT	1 µl
RNasin Ribonuclease Inhibitor	1 µl
T7/Sp6 Polymerase (20 U/µl)	1,5 µl
DEPC - Wasser	8,5 µl

Der Ansatz inkubierte über 2 h bei 37°C im Wasserbad. Die künstlich hergestellte Sonde konnte über Digoxigenin durch einen Enzym - gekoppelten Antikörper nachgewiesen werden. Durch Zugabe von RNasin Ribonuclease Inhibitor wurde das Transkript gegen einen RNA - Abbau geschützt. Die RNA wurde durch Zugabe von 1,25 µl 8 M Lithiumchlorid und 75 µl 100%ige Ethanol und Inkubation über Nacht bei -20°C ausgefällt. Nach Zentrifugation über 30 min (4°C, 13.000 rpm) wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und schließlich mit 20 µl DEPC - Wasser resuspendiert.

4.3.5 In - Situ Hybridisierung der Präparate

Die Sonden wurden in autoklaviertem DEPC - Wasser verdünnt. Pro Präparat wurden 100 µl Hybridisierungsmix pipettiert. Der Mix wurde im Thermocycler auf Hybridisierungstemperatur vorgewärmt.

Der Hybridisierungsmix setzte sich wie folgt zusammen:

Chemikalie	Volumen (Total = 100 µl)
Formamid	50 µl
Mastermix	42,7 µl
Sonde (2.000 ng/µl) + Aqua dest.	7,3 µl

Die Präparate, angeordnet in Recks, inkubierten mit dem Hybridisierungsmix über Nacht bei 50°C im Brutschrank. Den Racks wurden 100 ml 2 x SSC / 50% Formamid zugegeben, um einem Austrocknen vorzubeugen.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte mehrfach gewaschen:

1. Waschvorgang	1 x SSC	5 – 10sec	50°C
2. Waschvorgang	1 x SSC	30 min	50°C
3. Waschvorgang	2 x SSC / 50%Formamid	2 x 45 min	50°C
4. Waschvorgang	2 x SSC	2 x 5 min	37°C

Vor Inkubation mit der Antikörperlösung über Nacht bei 4°C wurde die unbesetzten Bindungsstellen durch Inkubation mit 0,5%iger Blockierungslösung über 1 h bei RT blockiert.

1. Antikörper	Verdünnung	Firma
Anti - Dig - AK	1:300 in 0,5%iger BI	Roche

Es folgten mehrere Waschvorgänge:

1. Waschvorgang	BI	5 – 10sec	RT
2. Waschvorgang	BI	2 x 5 min	RT
3. Waschvorgang	BIII	5 – 10 sec	RT
4. Waschvorgang	BIII	10 min	RT

Nach Auftragen der Färbelösung wurde die Farbentwicklung regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Farbentwicklung wurde durch Zusatz von TE - Puffer gestoppt. Die Präparate wurden bei RT getrocknet und mit Eukitt eingedeckelt.

4.4 Immunoblot

Der Western Blot dient der Quantifizierung von Proteinen. Dabei werden zunächst die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht über einem Polyacrylamid - Gel unter Anlegen von elektrischem Strom, aufgetrennt. Die entstandenen Proteinbanden werden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und über eine Antikörperreaktion identifiziert und quantifiziert.

Chemikalien

Albumin Standard	Thermo Scientific, U.S.A.
BCA ^{1M} Protein Assay Reagent A	Thermo Scientific, U.S.A.
BCA ^{1M} Protein Assay Reagent B	Thermo Scientific, U.S.A.
EGTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt
Isopropanol	Merck, Hohenbrunn, Dt.
LDS Sample Buffer	Invitrogen, U.S.A.
MES SDS Running Buffer (20 x)	Invitrogen, U.S.A.
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
NaCl	J.T. Baker, Niederlande
Na - Desoxycholat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.

NaF	Sigma - Aldrich, U.S.A.
NaOH	Dr.K.Hollborn&Söhne, Leipzig, Dt.
Na - Orthovanadat	Sigma - Aldrich, U.S.A.
Nonodet/ IGEPAL	Fhuka, ChemieGmbH, Schweiz
PMSF	AppliChemBioChemica, Darmstadt, Dt.
Precision Plus Protein TM WesternCTM Standards	BIO - RAD, U.S.A.
Protease Inhibitor	RocheComplete, Mannheim, Dt.
Reducing Agent (10 x)	Invitrogen, U.S.A.
StrepTactin - HRP Conjugate	BIO - RAD, U.S.A.
Streptavidin - HRP	BioFX Laboratories Inc., U.S.A.
Stripping Buffer	Thermo Scientific , U.S.A.
Transfer - Buffer	Invitrogen, U.S.A.
Tris Ultra	Merck, Darmstadt, Dt.
Tween 20	Dako Cytomation, Eching, Dt.

Lösungsansätze

Blotto - Puffer	50 ml TBS 2,5 g Magermilchpulver 50 µl Tween 20
Lyse Puffer	72 ml Aqua dest. 20 ml Lyse – Puffer - Stock 4 ml Protease (1 Tablette in 2 ml Aqua dest.) 1 ml PMSF (0,017 g in 1 ml Isopropanol) 0,5 ml Na-Orhovanadat (36,8 g in 1 ml Aqua dest.) 0,25 ml NaF (0,84 g in 10 ml Aqua dest.)
Lyse - Puffer Stock (5 x)	100 ml Aqua dest. 0,606 g Tris Ultra 0,876 g NaCl 0,038 g EGTA 1 ml Nonodet /P - 40 (IGEPAL) 0,25 ml Na-Desoxycholat
MES - Puffer	950 ml Aqua dest. 50 ml MES SDS Running - Buffer (20 x)
TBS (10 x)	60,5 g Tris in 1000 ml Aqua dest. lösen 2 M HCl auf pH 7,6 90 g NaCl
TBS - Puffer	900 ml Aqua dest. 100 ml TBS (10 x) pH 8,0
Transfer - Puffer	750 ml Aqua dest. 200 ml Methanol 50 ml Transfer - Buffer (20 x)

Materialien

Eppendorf-Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.
Eppendorf - Pipette 100µl - 1000µl ; 10µl - 100µl; 1µl	Eppendorf AG, Hamburg, Dt.
Filterpapier	Whatman GmbH, Dassel, Dt.
Hybond™ - C Extra Membrane	Amersham Bioscience, U.K.
Nu Page 4 - 12% Bis - Tris Gel	Invitrogen, U.S.A.
Pinzette	KLSmartin, Tuttlingen, Dt.
Pipettenspitzen 1000 µl; 0,5-10 µl ;1-100 µl	neoLab, Heidelberg, Dt.
Blotschwämme	Invitrogen, U.S.A.
Tissue Culture Plate, 96W	greiner bio - one, Frickenhausen, Dt.
X Cell IITM Blot Module	Invitrogen, U.S.A.
XCell SureLock™ Mini Cell	Invitrogen, U.S.A.

Geräte

Consort E143	Sigma - Aldrich, U.S.A.
Inkubator	Heraeus, Hanau, Dt.
Labor - Waage LE323S	Sartorius AG, Göttingen, Dt.
Fujifilm LAS 3000	R&D Systems, U.S.A.
Stuart®Scientific Roller mixer SRT1	Sigma - Aldrich, U.S.A.
Thermo max Miroplate - Reader	MWG - BIO Tech, Ebersberg, Dt.
Thermomixer Compact	eppendorf, Hamburg, Dt.
Vortex Genie 2	Scientific industries Si, U.S.A.
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Dt.

Programme

Digital Science 1D 3.02
Fujifilm LAS 3000 2.2
Softmax Pro 3.0

4.4.1 Proteinaufbereitung

Die Proteine wurden aus dem zermürbten Gewebepulver, welches schon zur Isolierung der RNA vorbereitet wurde, aufbereitet. Durch Zusatz von 200 μl Lyse - Puffer wurden die Proteine aus dem Zellverband gelöst und 5 x 20 - 30 sec gevortext. Der Reaktionsansatz wurde zentrifugiert und für 20 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (2 min, 4°C, 12.000 rpm) und Inkubation über 30 min auf Eis wurde der Überstand abpipettiert und die Gewebereste verworfen.

Die Messung der Proteinkonzentration erfolgt mit Hilfe des Pierce® BCA Protein Assay Reagent - Kit und dem Microplate - Reader. Das Prinzip beruht auf einer Komplexbildungsreaktion von Kupfer mit dem BCA - Reagenz, welche zu einem violetten Farbumschlag führt. Das einwertige Kupfer stammt aus der voraus gegangenen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch die Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) (Abbildung 9).

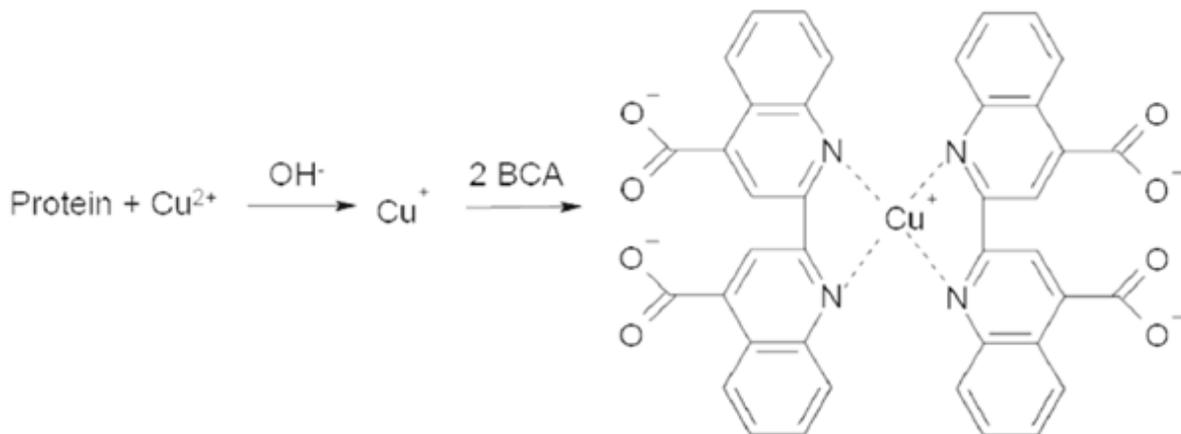


Abbildung 9: Biuret - Reaktion (<http://www.waetjen.de/downloads/Proteinbestimmung.ppt.pdf> ; Stand: 21. September 2012)

Die lysierten Proben wurden 1:4 vorverdünnt (4 μl Probe : 36 μl Aqua dest.). Von jeder Probe wurden Triplets angefertigt.

Das Pipettierschema pro Well setzte sich wie folgt zusammen:

Chemikalie	Volumen (Total = 560 μ l)
BCA Working Reagent (Reagenz A : Reagenz B; 50 : 1)	200 μ l
Aqua dest.	40 μ l
Proteinprobe	10 μ l

Nach Inkubation über 30 min bei 37°C und anschließender Abkühlung über 10 min konnte photometrisch die Proteinkonzentration anhand der gemessenen Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt werden. Als Referenz diente dabei eine Reihe aufsteigender Konzentration des Albumin - Standards. Aus diesen Werten konnte eine Eichgerade aufgestellt werden und so die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe abgeleitet werden (Abbildung 10).

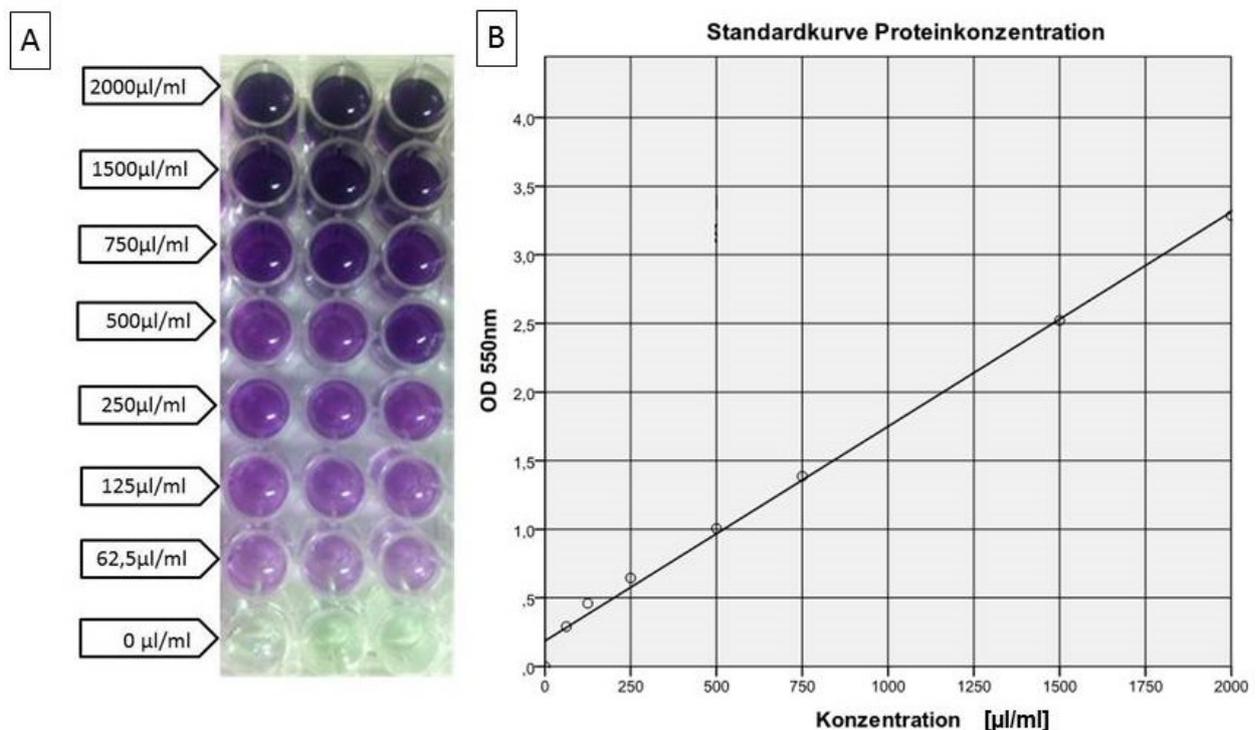


Abbildung 10: Bestimmung der Proteinkonzentration (A) Violetter Farbumschlag durch Komplexbildungsreaktion von reduziertem Kupfer mit dem BCA - Reagenz. Kupfer wurde durch Albumin unterschiedlicher Konzentration reduziert. **(B)** Experimentell ermittelte Standardkurve der Proteinkonzentration.

4.4.2 SDS - Page - Gelelektrophorese

Die Proteine wurden elektrophoretisch dem Molekulargewicht entsprechend nach dem Prinzip der SDS - PAGE - Gelelektrophorese (Laemmli 1970) aufgetrennt.

Die gebrauchsfertigen Gelkassetten wurden mit deionisiertem Wasser gespült und in die Gelelektrophoresekammer positioniert, welche anschließend mit MES - SDS Running Buffer geflutet wurde. Das Volumen für eine Geltasche betrug 25 μl .

Dieses setzte sich wie folgt zusammen:

Chemikalien	Volumen
LDS Sample Buffer (4 x)	6,25 μl
Reducing Agent (10 x)	2,5 μl
Probe 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ + Aqua dest.	16,25 μl

Das im Ladepuffer enthaltene stark anionische Lithiumdodecylsulfat überführt die Proteine in ihre primäre native Form und lagert sich an der AS - Sequenz an, wodurch sie eine negative Ladung erhält. Dabei ist die negative Ladung proportional dem Molekulargewicht des Proteins (Shapiro et al. 1967).

Nach Zusammenführen der Chemikalien wurden die Proben zentrifugiert (1 min, 4°C, 13.000 rpm), über 10 min auf 70°C erwärmt, 5 min auf Eis gestellt und für weitere 10 min zentrifugiert (4°C, 13.000 rpm). Die Proben wurden in die Gelkammern pipettiert. Als Größenstandard lief in einer Gelkammer ein Marker (15 μl) mit. Es wurde eine Spannung von 200 V angelegt. Nach einer halben Stunde hatte die blaue Bromphenolblau - Front das untere Gelende erreicht und die Elektrophorese konnte beendet werden (Abbildung 11).

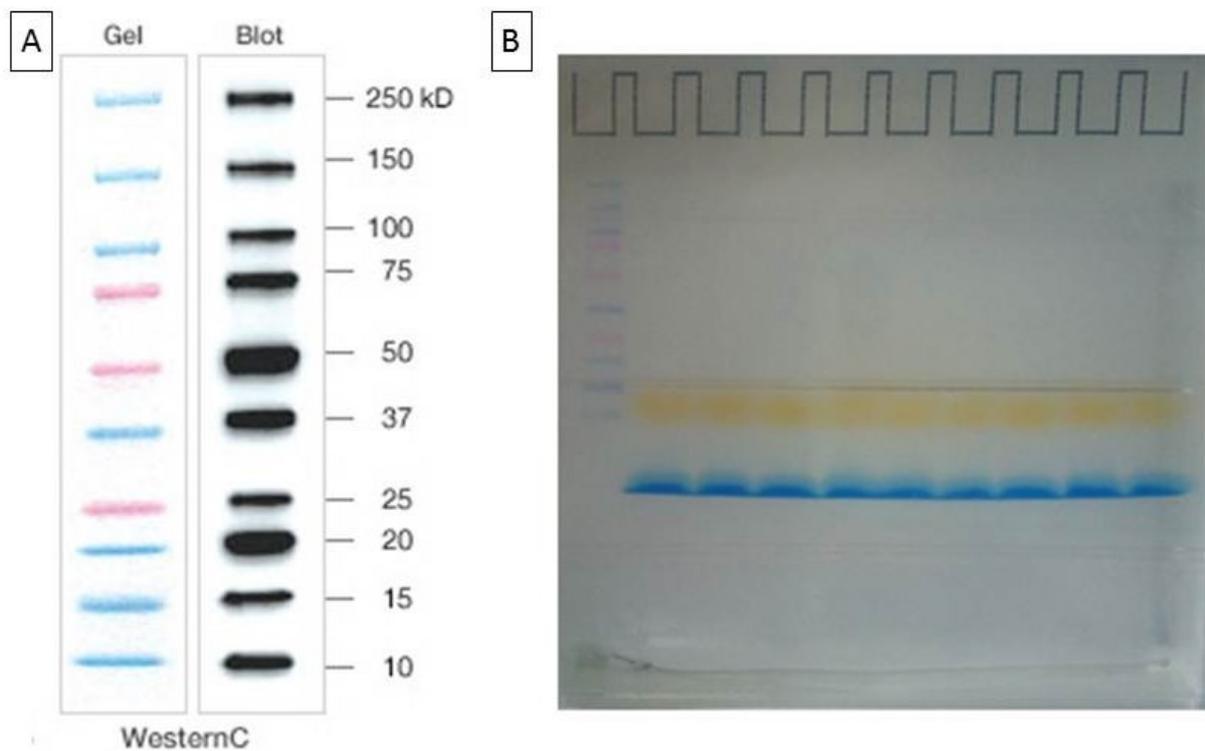


Abbildung 11: Gelelektrophorese (A) Western C Standard auf Tris - HCL Gel und die nach Blotten durch Chemilumineszenz detektierten korrespondierenden Banden mit entsprechendem Molekulargewicht (Instruction Manual Bio - Rad). **(B)** Vorgang der Gelelektrophorese. In der ersten Kammer läuft der WesternC™ Standard.

4.4.3 Blotting

Das Gel wurde aus der Kassette gelöst und die Proteinbanden des Gels wurden mittels Semidry Blotting auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Towbin et al. 1979). Die Bindung erfolgt über hydrophobe Wechselwirkung und Wasserstoffbrückenbindung. Dabei wurde das Gel einschließlich der Membran mit Filterpapier und Blotschwämme luftblasenfrei in die dafür vorgesehene Kathoden - Kammer in Reihenfolge zusammengelegt und mit dem Anoden - Deckel verschlossen (Abbildung 12). Der elektrophoretische Proteintransfer erfolgt bei einer Spannung von 30 V über 1 h in der mit Transferpuffer gefluteten Blot - Kammer.

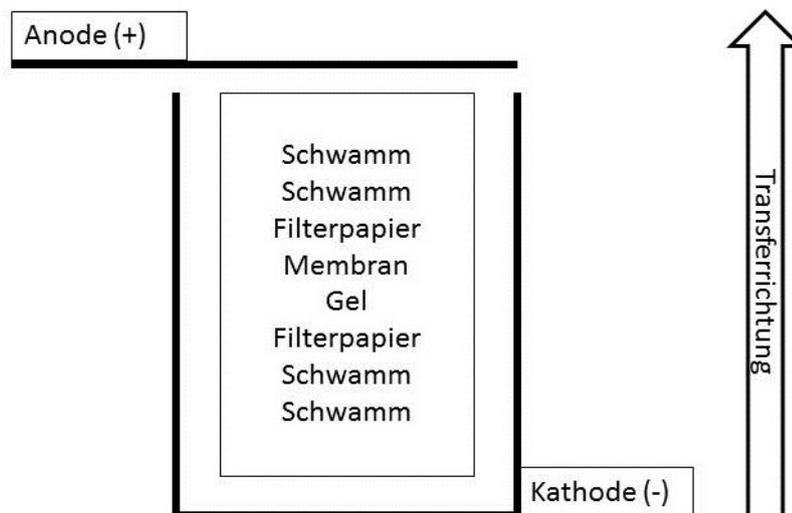


Abbildung 12: Anordnung für das Semidry Blotting.

4.4.4 Detektion

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch ein immunhistochemisches Verfahren auf indirektem Weg mit einem 1. AK und einem Peroxidase - markierten 2. AK (Towbin et al. 1979). Um die restlichen Proteinbindungsstellen auf der Membran zu blockieren, erfolgte eine Inkubation in 5%igem Magermilchpulver/ TBST über 1 h bei RT. Der 1. AK inkubierte über Nacht bei 4°C. Es folgte ein Waschvorgang 3 x 5 min in TBST und anschließend die Inkubation des 2. AK über 1 h bei RT. Bei der Detektion von VEGF wurde zusätzlich Streptavidin - HRP in einer Verdünnung von 1:10.000 hinzugegeben, da der 2. AK nicht Peroxidase - gekoppelt ist.

1. Antikörper	Verdünnung	Firma
Polyclonal Goat VEGF Ig	1:300 in TBST	Santa Crus Biotechnology
β - Actin A5441	1:1.000 in TBST	Sigma - Aldrich

2. Antikörper	Verdünnung	Firma
Polyclonal Rabbit Anti - Goat Ig	1:5.000 in TBST	Dako Cytomation
AntiMouse IgG (H+L)	1:1.000 in TBST	Vector Laboratories
Polyclonal Rabbit Anti - Mouse Ig	1:5.000 in TBST	Dako Cytomation

Die Membran wurde 3 x 5 min in TBST gewaschen und inkubiert über 30 min in einem StrepTactin - HRP Konjugat (1:10.000 in TBST), um den Standard mit einer Peroxidase - Aktivität zu versehen. Danach folgte ein Waschvorgang 1 x 5 min. Die Membran wurde nun mit Luminol Reagenz geflutet. Luminol (3-Amino-Phthalsäurehydrazid) wird durch die Meerrettich - Peroxidase oxidiert, wodurch eine Lichtemission ausgelöst wird (Durrant et al. 1994). Nach Inkubation über 1 min bei RT mit dem Luminolreagenz konnten die Chemilumineszenz - Reaktion der Proteinbanden in einer Dunkelkammer detektiert werden. Die Expositionszeit lag zwischen 1 - 10 sec.

Da der Nachweis des Proteins über einen Peroxidase - markierten 2. AK stattfand, war es möglich 1. AK und 2. AK mit Hilfe eines Stripping Buffers auszuwaschen und eine erneute Antikörperfärbung durchzuführen. Die Membran musste dazu 15 min in Stripping Buffer bei 37°C inkubieren. Es folgte ein Waschvorgang 1 x 5 min in TBS. Die unbesetzten Stellen der Membran wurden mit 5%igem Magermilchpulver/ TBST (30 min bei RT) blockiert. Es konnte ein weiteres Protein durch einen erneuten Antikörpertest nachgewiesen werden.

Die densitometrische Auswertung der sichtbaren Proteinbanden erfolgte durch die Software Digital Science 1D 3.02 von Kodak. Dabei wurde die Farbdichte der Proteinbanden gemessen. Je größer die optische Dichte, desto weniger Licht wurde reflektiert. Durch den Abgleich zum Hintergrund konnten alle erhobenen Daten als nachgewiesene Antikörperbindungen gedeutet werden und standen somit indirekt für die zu detektierenden Proteine.

4.5 Histologie

Mit Hilfe der Immunhistologie ist es möglich Proteine über einen fluoreszenzmarkierten Antikörper qualitativ zu detektieren und zu lokalisieren.

Chemikalien

10 x PBS - Puffer

80 g NaCl
2 g KCL
14,4 g Na₂HPO₄
2,4g KH₂PO₄ auf 1 l Aqua dest.
pH 7,4

Aceton (CH ₃) ₂ CO	J.T.Baker, Niederlande
AntibodyDiluent	Dako Cytomation, Eching, Dt.
Bisbenzimid:10 mg in 1 ml Aqua dest.	Sigma - Aldrich®, U.S.A.
Cy2 - conjugated affine Pure Donkey Anti-Goat IgG	Jackson ImmunoResearch, U.K.
DABCO: 2,5 g DABCO in 90 ml Glycerol 10 ml PBS, pH 8,6	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
Donkey Serum	Jackson ImmunoResearch, U.K.
Eosin – G - Lösung 0,5% 1:4 in Aqua dest., 3 Tropfen 2%ige Essigsäure	Merck, Darmstadt, Dt.
Eukitt	KindlerGmbH&Co, Freiburg, Dt.
Hämalaun	Merck, Darmstadt, Dt.
HCL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
NaOH	Dr.K.Hollborn&Söhne,Leipzig; Dt.
Polyklonal Goat VEGF IgG	Santa Crus Biotechnology, U.S.A.
Tissue - Tek	Sakura, Niederlande

Materialien

24 x 60 mm Deckgläser	Menzel, Braunschweig, Dt.
Fettstift	Dako Cytomation, Eching, Dt.
Küvetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dt.
M.I.S.T. Magnetic Immuno Staining Tray	Cell Path, U.K.
Messzylinder	VitLab, U.S.A.
Mikrotom - Klingen	Feather, Japan
Objektträger Polysine Slides	Menzel, Braunschweig, Dt.
Pasteurpipetten	greiner bio-one, Frickenhausen, Dt.
Pipetten	neoLab, Heidelberg, Dt.

Geräte

Axioplan Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Dt.
Heizplatte	stuart, U.K.
Kryostat	Leica, Nussloch, Dt.

Laborwaage LE323S	Sartorius AG, Göttingen, Dt.
Magnetrührer	IKA® - Werke GmbH & Co., Staufen, Dt.
pH - Messgerät Argus X	Sentron, Niederlande

Programme

Axio Vision Rel. 4.7

4.5.1 Anfertigung der Präparate

Die bei -80°C in Stickstoff gelagerten Gewebeproben wurden im Kryostat (-25°C) aufgetaut. Zur Präparatanfertigung wurden die Gewebeproben in Tissue - Tek eingebettet. Die $10\ \mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden auf saubere, fettfreie Objektträger aufgeschmolzen und bei über 1 h bei 37°C getrocknet. Von jedem Explantat wurden zwei Objektträger mit je drei Schnitten angefertigt. Ein Objektträger diente der Immunfluoreszenzfärbung und der andere Objektträger wurde mit Hämalaun und Eosin angefärbt. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20°C . Vor Durchführung der jeweiligen Färbung wurden die Präparate bei RT getrocknet und anschließend in Aceton über 10 min bei -20°C fixiert. Frische Kryoschnitte wurden in Aceton über 10 min bei RT fixiert.

4.5.2 H&E - Färbung

Die Objektträger wurden für 5 min in Hämalaun überführt. Nach Spülung mit Aqua dest. wurden die Präparate für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit Eosin über 5 min mäßig überfärbt. Nach einminütigem Wasserbad folgte die Differenzierung in 80%igem und 100%igem Ethanol. Die Präparate wurden mit Eukitt eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

4.5.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Nach einem zehnmütigen Waschvorgang in PBS wurde jedes Präparat mit einem Fettstift umrandet. Vor der eigentlichen Färbung erfolgte eine Inkubation über 20 min bei RT in 5% Serum / PBS, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Jedes Präparat wurde mit 100 µl dieser Blockierungslösung versetzt. Nach mechanischem Abklopfen inkubierten die Präparate mit 50 µl Primärantikörper/ PBS über Nacht bei 4°C. Der polyklonale Ziege - VEGF IgG Antikörper gegen VEGF (Verdünnung 1:50 in PBS) wurde appliziert. Zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen des sekundären Antikörpers wurde bei jeweils einem Präparat der primäre Antikörper durch PBS ersetzt und diente als Negativkontrolle. Die ungebundenen Antikörper wurden durch 3 x 5 min Waschen in PBS gelöst. Die Präparate inkubierten über 60 min bei RT mit 50 µl des fluorchromkonjugiertem Zweitantikörpers (Verdünnung 1:100 in PBS). Die Objektträger befanden sich im Dunkeln. Um ungebundenen Antikörper zu lösen, folgte ein Waschvorgang 3 x 5 min in PBS. Die Kernfärbung erfolgte durch Inkubation über 15 min bei RT mit Bisbenzimidin (15 µl/ 30 ml PBS). Nach einem letzten Waschvorgang 3 x 5 min in PBS wurden die Schnitte direkt mit DABCO, einem Fluoreszenzerhaltungspuffer, eingedeckelt.

4.5.4 Mikroskopische Auswertung

Die morphologische Untersuchung des Muskelgewebes erfolgte lichtmikroskopisch. Die Aufnahmen dienten einer Übersicht vor der qualitativen Auswertung der immunhistochemischen Färbung.

Die Beurteilung der VEGF - Markierung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dabei wird durch Bestrahlung des Objektträgers mit einer speziellen Wellenlänge Licht mit einer definierten Wellenlänge abgestrahlt. Cy2 wird bei 492 nm maximal angeregt und fluoresziert im grünen Bereich des sichtbaren Spektrums. So war eine qualitative Beurteilung des VEGF mikroskopisch möglich. DAPI wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm angeregt. Die blaue Emission wurde über einen 420 nm Filter aufgezeichnet.

Augenmerk beim qualitativen Vergleich der Gruppen waren die Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz des Cy2. Für eine relative Objektivierung der Ergebnisse wurde immer die gleiche Belichtungszeit gewählt. Weiterhin wurde auf die Verteilung und Anhäufung des VEGF an anatomischen Strukturen geachtet.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware SPSS V.19.0 (SPSS Inc., USA) für Windows. Die Ergebnisse wurden mit dem ungepaarten Student's t - Test unabhängiger Variablen und dem Tukey - HSD Test analysiert. Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurden als signifikant für die Alternativhypothese bewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SA) dargestellt. Die graphische Darstellung erfolgte durch Bar - Plots.

5 Ergebnisse

Für die Versuchsreihe wurden 120 männliche ca. 250 g schwere Wistar - Ratten den Operationen unterzogen. 60 Beliebige gehörten der Versuchsgruppe an und 60 der Kontrollgruppe. Eine Ratte starb während des Experiments. Die anderen überstanden die Arterienlegierung gut. Nach Tötung konnten genug Explantate aus der Leistenregion von dem M. graciles gewonnen werden.

5.1 Transfektion

Es gelang auf Basis des Isolierungsprotokolls Fibroblasten aus der Zunge von Wistar - Ratten zu isolieren und zu kultivieren. Die Fibroblasten wurden auf ihre Morphologie hin untersucht. Die Auswertung erfolgte über Phasenkontrastmikroskop - Aufnahmen. Die Abbildung zeigt eine konfluent wachsende Zellkultur. In einem Zeitfenster von 10 Tagen nimmt die Zellzahl zu und die Zellkörper flachen ab (Abbildung 13 a-c).

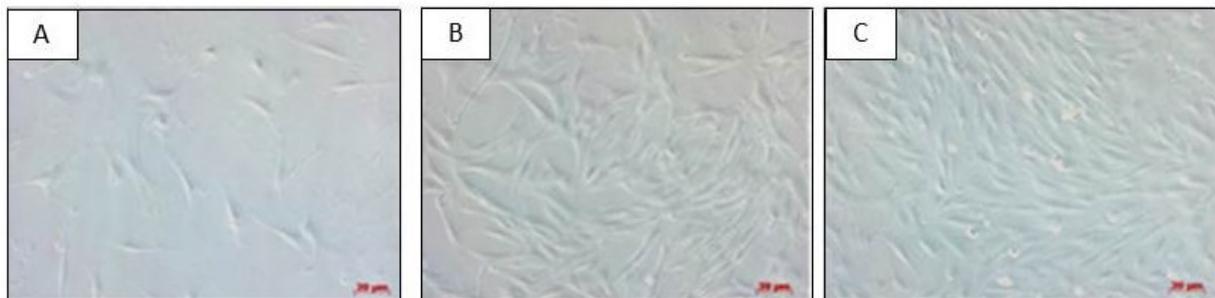


Abbildung 13: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von einer Fibroblastenzellkultur während einer Kulturdauer von 10 Tagen. **(A)** Tag 2 **(B)** Tag 5 **(C)** Tag 10; Vergrößerung: 20 x.

Die optische Beurteilung der Transfektionseffizienz erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit GFP - Filter bei einer Wellenlänge von 488 nm nach 12 bzw. 48 h. Die anschließende Auswertung der fotografierten Gesichtsfelder ergibt, dass der Anteil grün - fluoreszierender Zellen nach 12 h 30% beträgt, und nach 48 h auf 50% ansteigt (Abbildung 14).

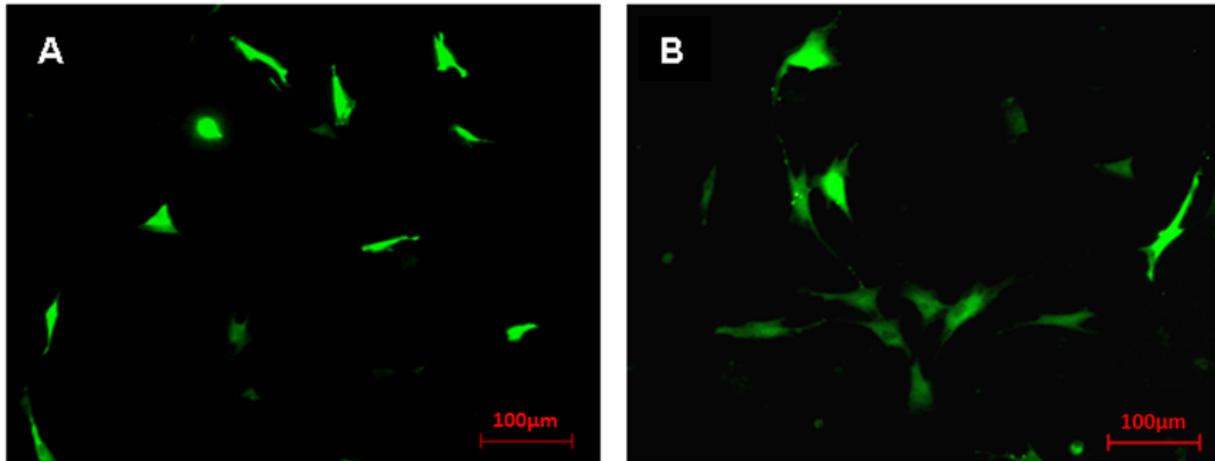


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transfizierten Fibroblasten. Die Zellen wurden mit pmaxGFP transfiziert. (A) 12 h nach Transfektion (B) 48 h nach Transfektion; Vergrößerung: 10 x.

5.2 Real - time PCR

Die Explantation der Gewebeproben des M. graciles aus den Versuchsgruppen (Gruppe I - III) und den Kontrollgruppen (Gruppe IV – VI) fanden am 3., 5., 7. und 14. Tag nach Einleitung der Ischämie statt. Dabei wurden pro Tier jeweils Proben aus dem oberflächlichen, aus dem kaudalen und aus dem kranialen Anteil entnommen. Es wurden jeweils Proben von 3 Tieren ausgewertet. Die VEGF - mRNA wurde mit der qRT - PCR quantifiziert. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, denen lediglich PBS injiziert wurde, sowohl für die Versuchsgruppe als auch für Proben der Kontrollgruppe, die mit nativen Fibroblasten behandelt wurden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte über die DeltaDeltaCt - Methode.

5.2.1 Vergleich der Therapiestrategien

Auf RNA - Ebene zeigt sich die Applikation der VEGF - transfizierten Fibroblasten mit simultaner Einleitung der Ischämie am effektivsten. Bereits am 3. Tag p. op. ist der mRNA - Gehalt von Gruppe I gegenüber dem der Gruppe II ($p = 0,007$) und III ($p = 0,03$) signifikant erhöht. Die VEGF₁₆₄ - mRNA - Ratio erreicht an Tag 7 p. op. einen Wert von 16,8 (SA: 0,58) in Gruppe I und unterscheidet sich so hochsignifikant von Gruppe II ($p < 0,001$) und Gruppe III ($p < 0,001$). Abbildung 15 zeigt eine

deutliche Zunahme der relativen mRNA - Transkription von Tag 3 p. op. (1,9; SA: 0,56) über Tag 5 p. op. (3,42; SA: 0,82) hin zu Tag 7 p. op. (16,9; SA: 0,58) in Gruppe I. In Gruppe III geht der mRNA - Gehalt kaum über das Basislevel hinaus. Zwischen dem 7. und 14. Tag p. op. ist ein deutlicher Abfall der VEGF₁₆₄ - mRNA - Ratio in Gruppe I zu erkennen (Abbildung 15).

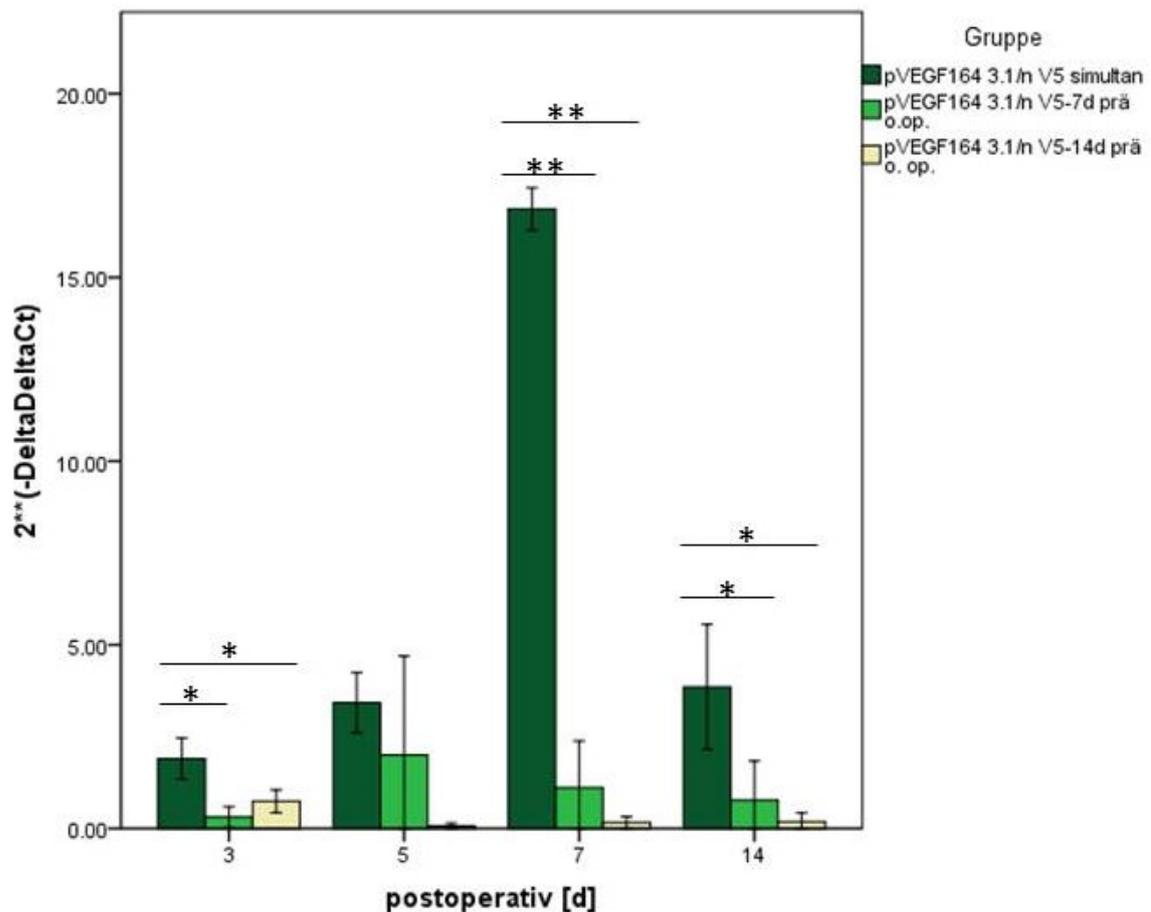


Abbildung 15: Graphische Darstellung des relativen VEGF₁₆₄ - mRNA - Gehalts des oberflächlichen Anteils des M. graciles der Gruppen I – III. Pro Entnahmezeitpunkt wurden Proben von 3 Tieren aus jeder Gruppe ausgewertet. Von jedem Explantat wurde ein Triplet analysiert. Gruppe I überragt Gruppe II sowie Gruppe III mit hochsignifikanten Unterschieden an Tag 7 p. op. deutlich. *p < 0,05; **p < 0,001.

5.2.2 Untersuchung auf regionale Unterschiede

Die größte relative VEGF₁₆₄ - Transkriptionsrate ist in dem oberflächlichen Anteil des M. graciles in Gruppe I nachzuweisen. Zwischen dem oberflächlichen und dem kaudalen bzw. kranialen Anteilen des Muskels zeigen sich an Tag 5 p. op. (kaudal: p = 0,028; kranial: p = 0,025) und Tag 7 p. op. (kaudal: p = 0,017; kranial:

$p = 0,032$) signifikante Unterschiede. Während Abbildung 16 bei Proben des oberflächlichen Anteils des *M. gracilis* bereits an Tag 5 p. op. einen relativen $VEGF_{164}$ – mRNA - Gehalt von 3,43 (SA: 0,82) zeigt, kann bei Proben des kaudalen Anteils nur ein geringer relativer mRNA - Gehalt von 1,8 (SA: 0,49) und bei Proben des kranialen Anteils von ebenfalls nur 1,8 (SA: 0,1) ermittelt werden. An Tag 7 p. op. ist der höchste relative $VEGF_{164}$ - mRNA - Gehalt von 16,86 (SA: 0,58) im oberflächlichen Anteil zu konstatieren. In der graphischen Darstellung sind die deutlichen Unterschiede in der Expression zu sehen. In allen Regionen ist ein deutlicher Zuwachs der relativen Transkriptionsrate von $VEGF_{164}$ bis hin zum Expressionshöhepunkt am 7. Tag p. op. zu verzeichnen und folgend ein deutlicher Abfall hin zu Tag 14 (Abbildung 16).

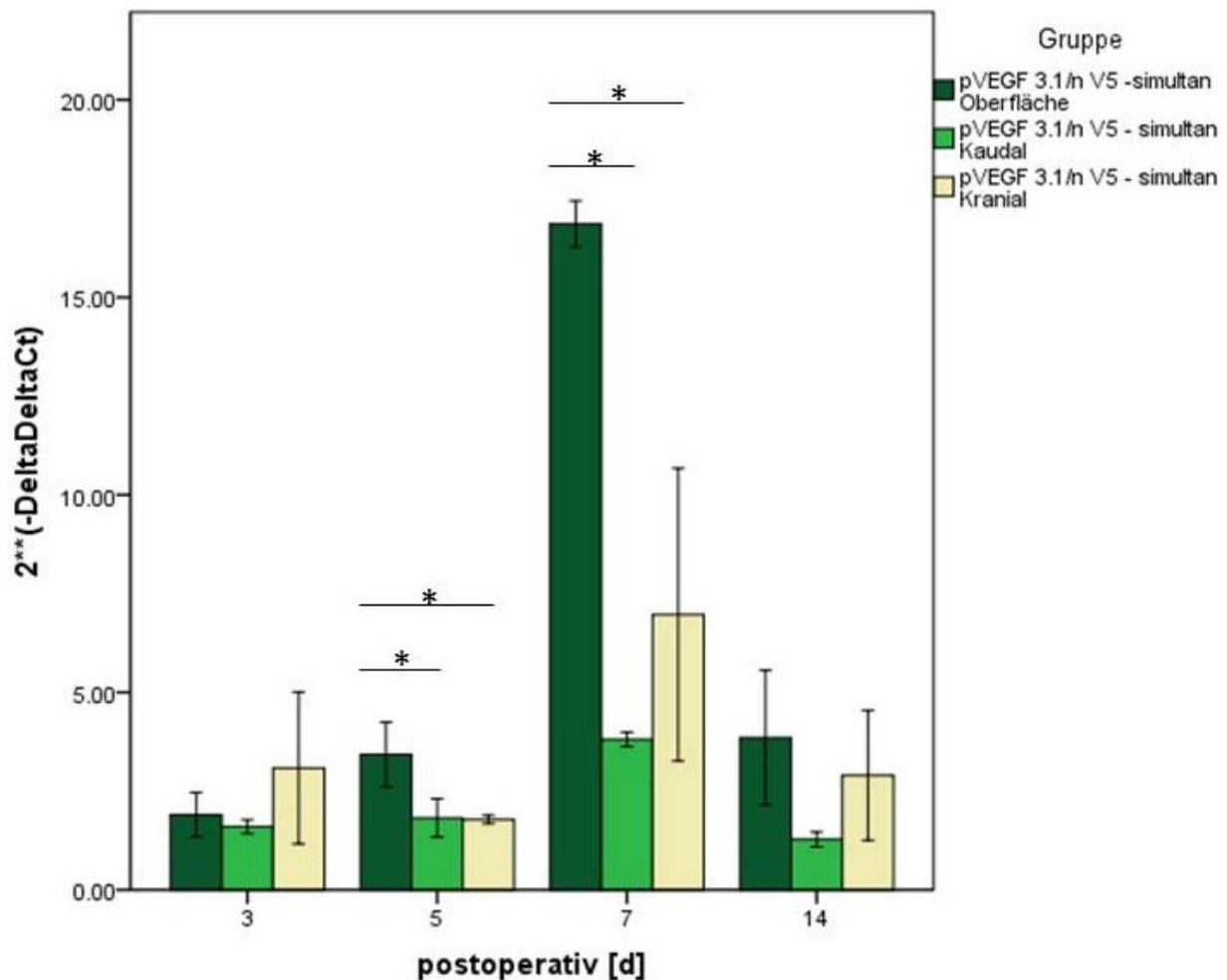


Abbildung 16: Graphische Darstellung des relativen $VEGF_{164}$ – mRNA - Gehalts der verschiedenen Regionen in Gruppe I. Je Entnahmezeitpunkt wurden Proben von 3 Tieren pro Entnahmeregion ausgewertet. Von jedem Explantat wurde ein Triplet analysiert. In dem oberflächlichen Anteil des *M. gracilis* ist die höchste Expressionsrate mit signifikantem Unterschied zu dem kaudalen und kranialen Anteil zu detektieren. * $p < 0,05$.

5.2.3 Therapeutischer Effekt der Fibroblasten

Am 3. Tag nach Einleitung der Ischämie ist kein signifikanter Unterschied zwischen der relativen Transkriptionsrate der Gruppe I und Gruppe IV zu verzeichnen. Explantate, behandelt mit nativen Fibroblasten, zeigen an Tag 3 p. op. eine erhöhte relative VEGF₁₆₄ - Genpression, die deutlich über das Basislevel hinausgeht. Der relative mRNA - Gehalt erreicht einen Wert von 2,5 (SA: 1,1) im oberflächlichen Anteil des M. graciles. Die graphische Darstellung zeigt in Gruppe IV ab dem 5. Tag nur eine sehr niedrige mRNA - Ratio, während der relative VEGF₁₆₄ - mRNA - Gehalt der Gruppe I kontinuierlich bis hin zum 7. Tag p. op. ansteigt. Es sind signifikante bis hochsignifikante Unterschiede zwischen Gruppe I und Gruppe IV im oberflächlichen Anteil des M. graciles am 5. Tag p. op. ($p = 0,002$) und am 7. Tag p. op. ($p = 0,001$) festzustellen (Abbildung 17A). Die Signifikanzwerte liegen ebenfalls unter dem 0,05 - Niveau, sowohl im kaudalen als auch im kranialen Anteil des M. graciles (Abbildung 17B und C).

In Gruppe IV geht die mRNA - Ratio ab dem 5. Tag p. op. kaum über das Basislevel hinaus. Es ist kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, der PBS injiziert wurde, und der Kontrollgruppe, die mit nativen Fibroblasten behandelt wurde, festzustellen. An Tag 7 p. op. ist nur noch ein relativer VEGF₁₆₄ - mRNA - Gehalt von 0,9 (SA: 0,45) nachzuweisen (Abbildung 17A). Ähnliche Ergebnisse zeigen Abbildung 17B und 17C sowohl für Explantate des kaudalen als auch des kranialen Muskelanteils.

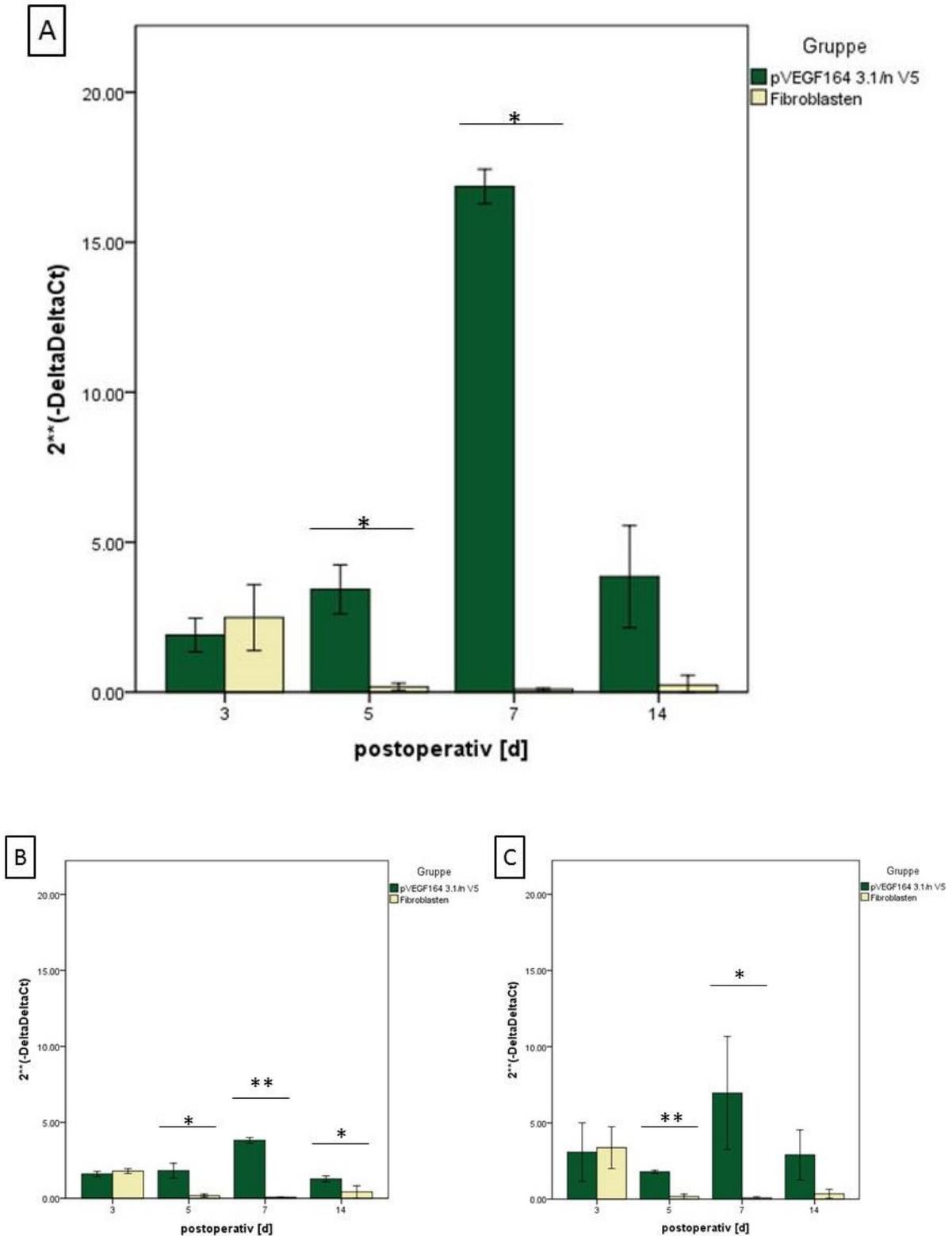


Abbildung 17: Graphische Darstellung des relativen VEGF₁₆₄ - mRNA - Gehalts der Gruppe I und der Gruppe IV. Es wurden pro Gruppe je Entnahmezeitpunkt Proben von 3 Tieren ausgewertet. Von jedem Explantat wurde ein Triplet analysiert. Den Fibroblasten kann mit signifikanten bis hochsignifikanten Unterschieden zu Gruppe I kein Effekt zugeschrieben werden **(A)** Oberfläche **(B)** kaudal **(C)** kranial. *p < 0,05, **p < 0,001.

Zwischen Gruppe III und VI kann gezeigt werden, dass Gewebeproben, behandelt mit nativen Fibroblasten, einen höheren relativen VEGF₁₆₄ - mRNA - Gehalt aufweisen als Explantate, denen die transfizierten Fibroblasten injiziert wurden. Es zeigen sich signifikante Unterschiede an Tag 5 p. op. ($p = 0,014$) und an Tag 14 p. op. ($p = 0,038$). Gewebeproben, die mit nativen Fibroblasten behandelt wurden, erreichen einen relativen VEGF₁₆₄ - mRNA - Gehalt von 1,11 an Tag 7 p. op. (SA: 1,2) sowie an Tag 14 p. op. (SA: 0,41), wohingegen der höchste Wert der Gruppe III an Tag 3 p. op. mit einer Ratio von 0,75 (SA: 0,31) zu ermitteln ist.

An Tag 5 p. op., Tag 7 p. op. und Tag 14 p. op. geht die VEGF₁₆₄ - mRNA - Ratio der Gruppe III nicht über 0,18 (Tag 14, SA: 0,25) hinaus. Es ist somit auch kein deutlicher Unterschied in dem relativen VEGF₁₆₄ - mRNA - Gehalt zwischen der Versuchsgruppe, die mit transfizierten Fibroblasten behandelt wurde, und der Kontrollgruppe, die mit PBS behandelt wurde, festzustellen. An Tag 5 liegt der relativer mRNA - Gehalt bei nur 0,068 (SA: 0,084). Die graphische Darstellung zeigt den relativen mRNA - Gehalt der Gruppe III, der nur gering über das Null - Level hinausgeht (Abbildung 18).

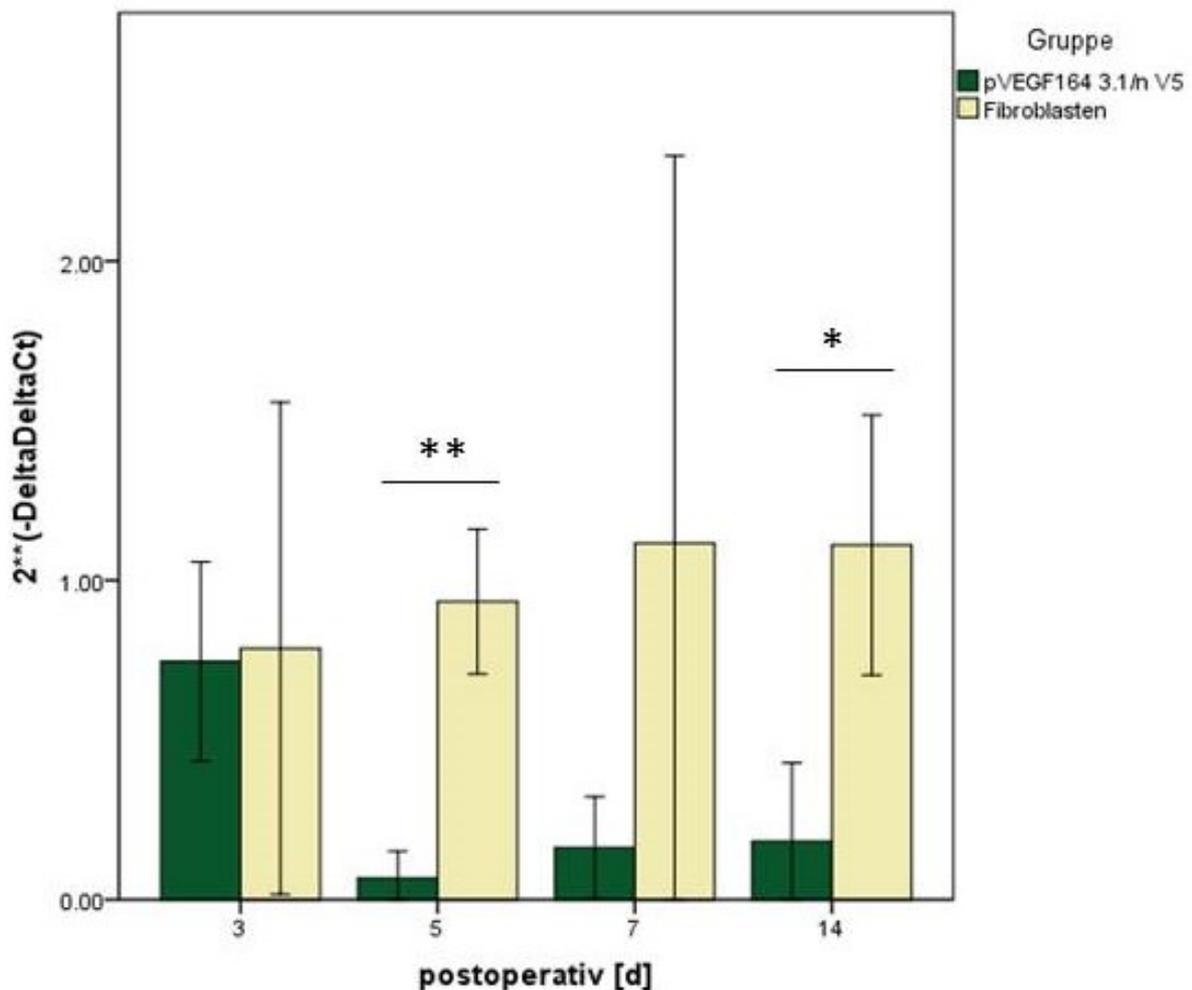


Abbildung 18: Graphische Darstellung des relativen VEGF₁₆₄ - mRNA - Gehalts der Gruppe III und VI des oberflächlichen Anteils des *M. gracilis*. Aus jeder Gruppe wurden pro Entnahmezeitpunkt Proben von 3 Tieren ausgewertet. Von jedem Explantat wurde ein Triplet analysiert. Gruppe VI überragt Gruppe I auf RNA - Ebene mit signifikanten bis hochsignifikanten Unterschieden. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

5.3 In-situ Hybridisierung

Die qualitative Auswertung auf RNA - Ebene erfolgte mittels der In - situ Hybridisierung, in dem die mRNA_{VEGF} im Gewebe mit speziell hergestellten Sonden markiert wurde. Dabei wurde aus jeder Versuchsgruppe je Region je Entnahmezeitpunkt ein Objektträger ausgewertet.

5.3.1 Herstellung der Sonden

Um die Qualität der PCR - Produkt kontrollieren zu können, wurden die Produkte durch Agarose - Gelelektrophorese aufgetrennt. In Abbildung 19A sind deutliche Banden zu erkennen, wobei die 262bp - Bande der Isoform VEGF₁₆₄ entspricht. Nach Klonierung der VEGF₁₆₄ - Sequenz in den TOPO[®]TA - Vektor und anschließendem Restriktionsverdau wurde die Effizienz des Klonierens durch erneute Agarose - Gelelektrophorese überprüft. Ein Restriktionsverdau des Vektors ergibt ein Insert der erwarteten Größe von > 266 bp (Abbildung 19B).

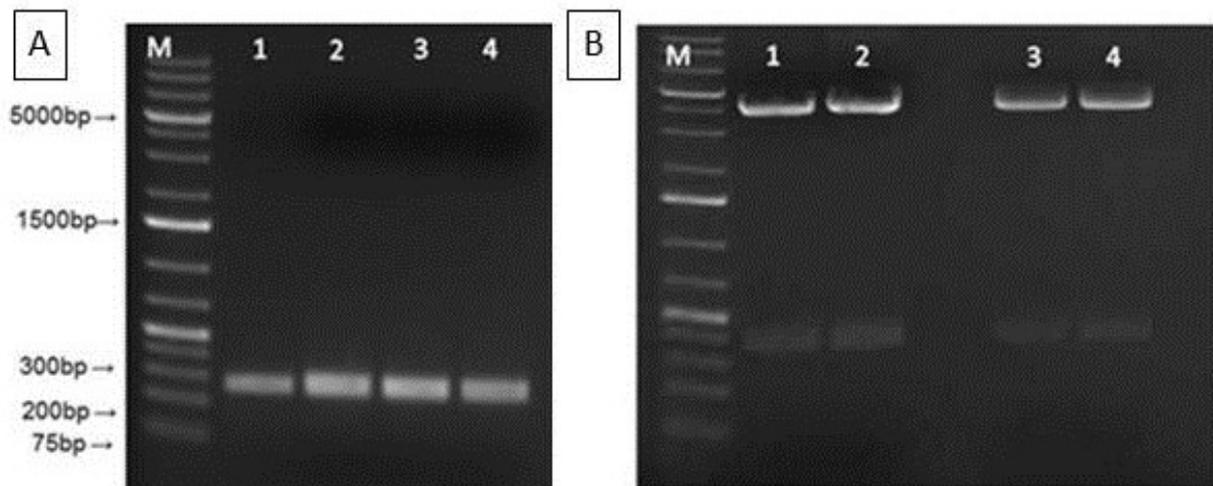


Abbildung 19: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR - Produkte. (A) Die detektierten Banden entsprechen VEGF₁₆₄. **(B)** Restriktionsverdau des Inserts aus dem TOPO[®]TA - Vektor und anschließender gelelektrophoretische Auftrennung. Detektierte Banden entsprechen dem Insert mit erwarteter Größe > 266 bp; M = Marker - Gene Ruler qkb Plus DNA.

5.3.2 Qualitative Auswertung

Die visuelle Darstellung der mRNA_{VEGF} bekräftigt die schon quantitativ erhobenen Ergebnisse. Abbildung 20 zeigt, dass an Tag 7 p. op. in Gruppe I eindeutig mehr positiv angefärbte Nucleinsäuren auszumachen sind als in den Gruppen II und III. In Gruppe I ist visuell der höchste mRNA_{VEGF} - Gehalt und somit auch die stärkste Transkriptionsrate zu erfassen. In Gruppe III sind nur in geringem Maße angefärbte Nucleinsäuren zu erkennen (Abbildung 20C).

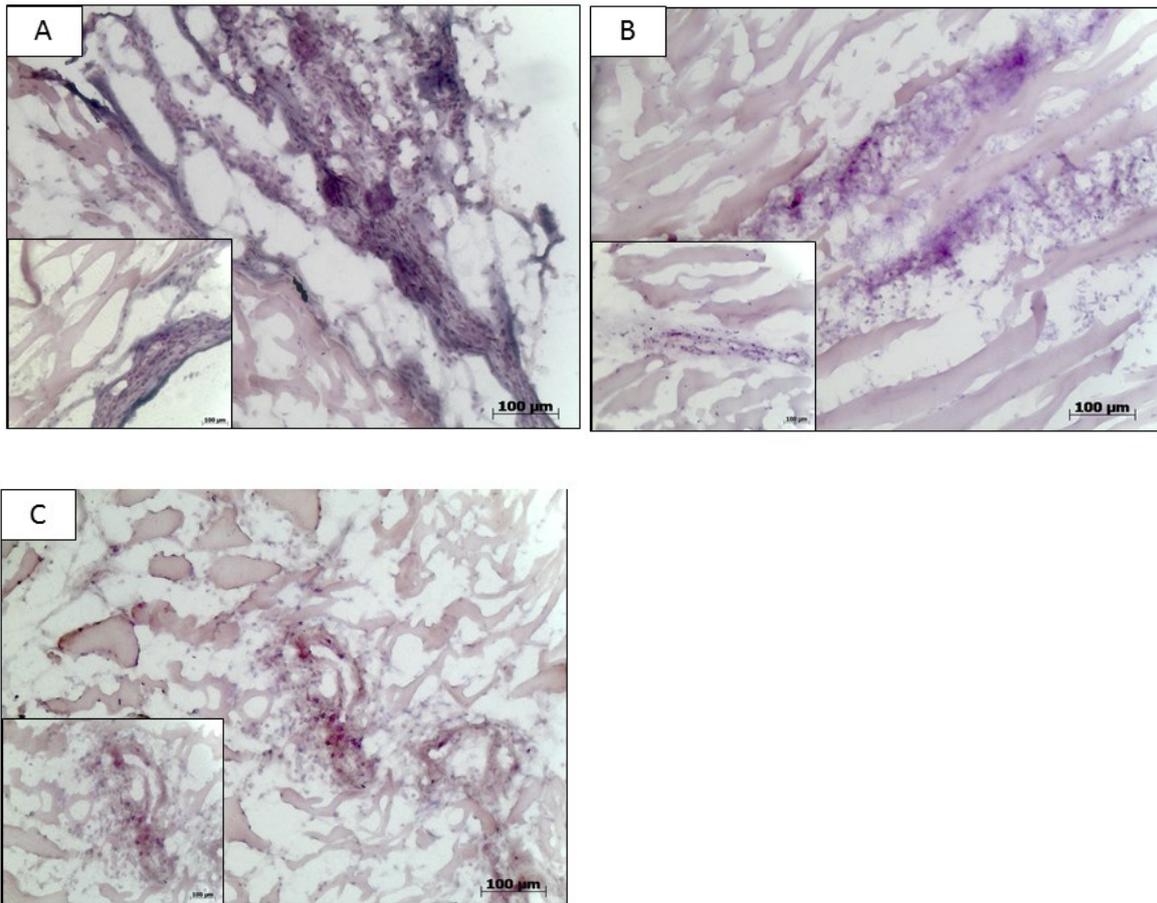
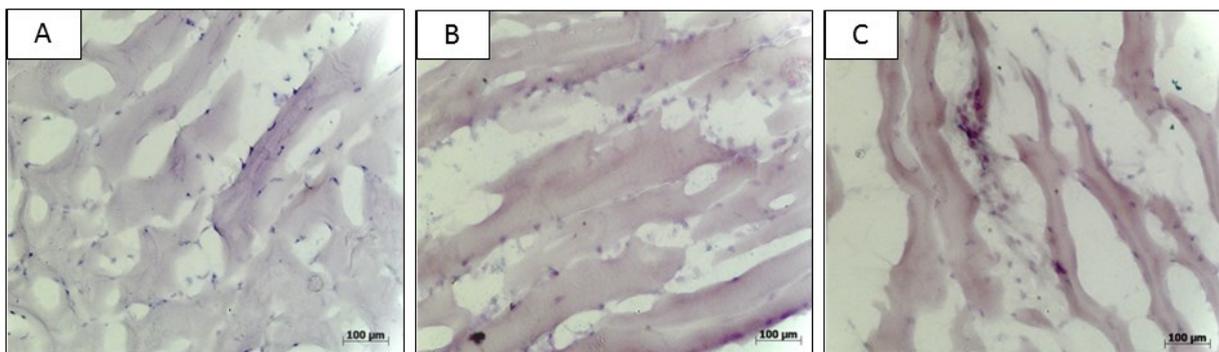


Abbildung 20: In - situ Hybridisierung der Versuchsgruppe. Anfärben der VEGF₁₆₄ – mRNA durch speziell hergestellte Sonden. **(A)** Gruppe I Tag 7 p. op. **(B)** Gruppe II Tag 7 p. op. **(C)** Gruppe III Tag 7 p. op.; Vergrößerung: 10 x; Negativkontrolle: unten links.

In den Kontrollgruppen kann ebenfalls kaum VEGF₁₆₄ - RNA nachgewiesen werden. Es kann visuell kein Unterschied zwischen Präparaten der Kontrollgruppe I, der native Fibroblasten injiziert wurden, und Präparaten der Kontrollgruppe II, der PBS injiziert wurde, erfasst werden (Abbildung 21A-F).



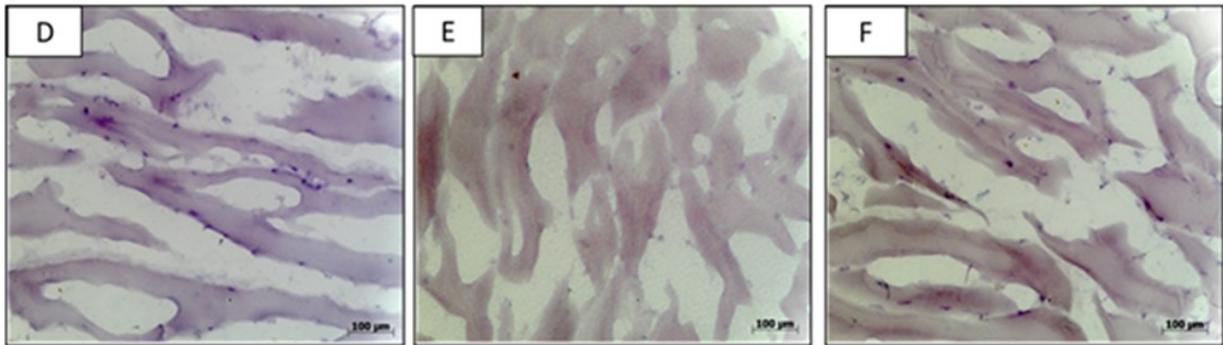


Abbildung 21: In - situ Hybridisierung der Kontrollgruppe. Anfärben der VEGF₁₆₄ - mRNA durch speziell hergestellte Sonden. **(A)-(C)** Kontrollgruppe Fibroblasten **(A)** Gruppe IV 7d p. op. **(B)** Gruppe V 7d p. op. **(C)** Gruppe VI 7d p. op. ;**(D)-(F)** Kontrollgruppe PBS **(D)** Gruppe IV 7d p. op. **(E)** Gruppe V 7d p. op. **(F)** Gruppe VI 7d p. op. ; Vergrößerung: 10 x.

5.4 Western Blot

Für die quantitative Untersuchung auf Protein - Ebene wurden aus jeder Gruppe pro Entnahmezeitpunkt Proben von 3 Tieren ausgewertet. Die Proteine VEGF und β - Actin wurden anhand der optischen Dichte der Banden quantifiziert. Für die Auswertung wurde der β - Actin Gehalt vom VEGF - Gehalt subtrahiert.

5.4.1 Vergleich der Therapiestrategien

Auf Proteinebene ist in Gruppe I am 5. und 7. Tag p. op. mehr VEGF₁₆₄ im Vergleich zu Gruppe II und III zu konstatieren. Der höchste relative Gehalt an VEGF₁₆₄ kann an Tag 7 p. op. nachgewiesen werden. Die VEGF₁₆₄ - Konzentration liegt bei 9,57 (SA: 0,35). Dieser Gehalt an VEGF₁₆₄ unterscheidet sich signifikant von dem der Gruppe II mit 8,1 (SA: 0,65) und hochsignifikant von dem der Gruppe III mit 2,24 (SA: 0,6). An Tag 7 p. op. befindet sich weiterhin der Signifikanzwert zwischen Gruppe II und Gruppe III bei $p < 0,001$. Somit besteht ebenfalls ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Gruppe II und Gruppe III am 7. Tag p. op. (Abbildung 22 und 23).

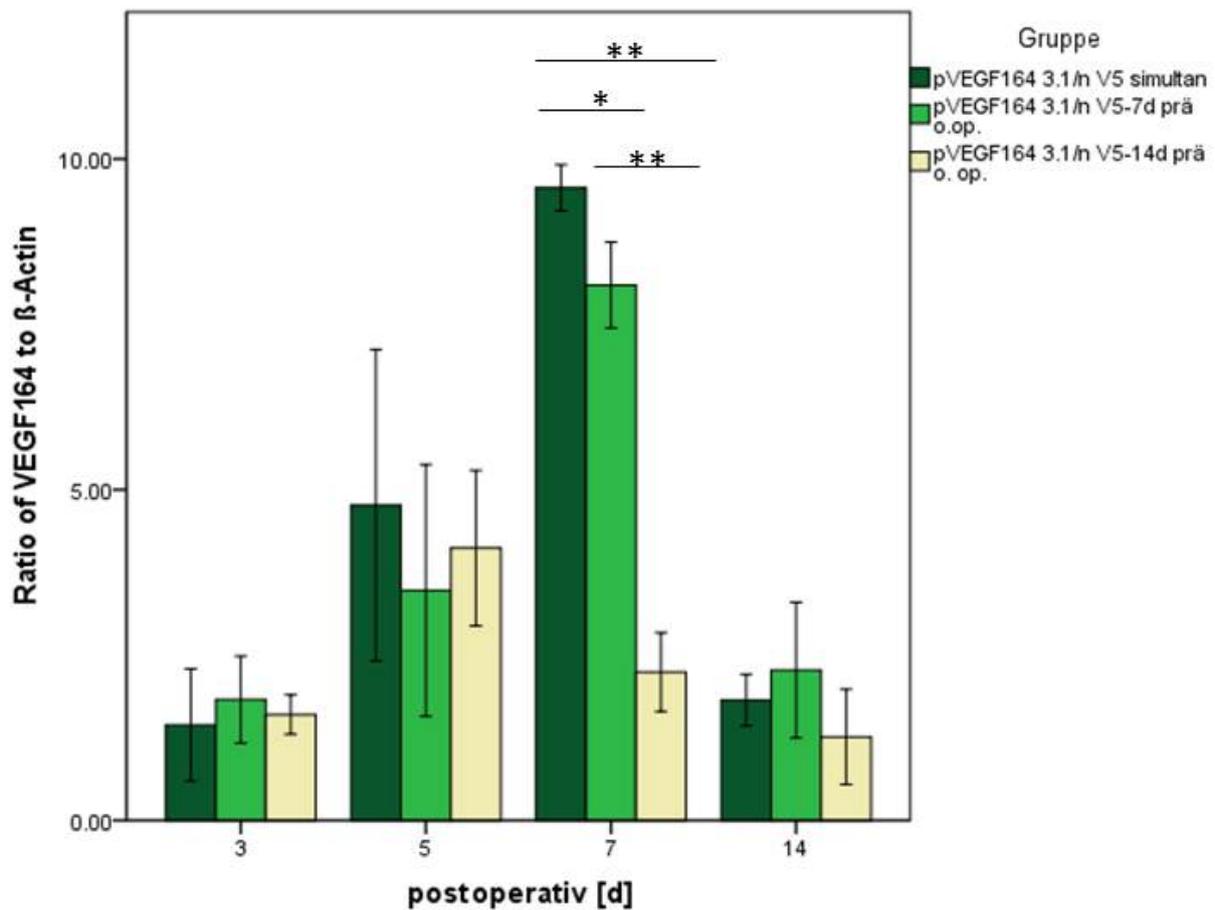


Abbildung 22: Graphische Darstellung des relativen VEGF₁₆₄ - Gehalts der Gruppen I, II und III des oberflächlichen Anteils des *M. gracilis*. Es wurden in jeder Gruppe pro Entnahmezeitpunkt 3 Tiere ausgewertet. Signifikante Unterschiede konnten zwischen Gruppe I und Gruppe II sowie Gruppe III an Tag 7 p. op. erfasst werden. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

An Tag 14 ist ein deutlicher Rückgang der Proteinkonzentration zu verzeichnen. Der relative VEGF₁₆₄ - Gehalt in Gruppe I liegt bei nur noch 1,8 (SA: 0,39). Es besteht kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Versuchsgruppen.

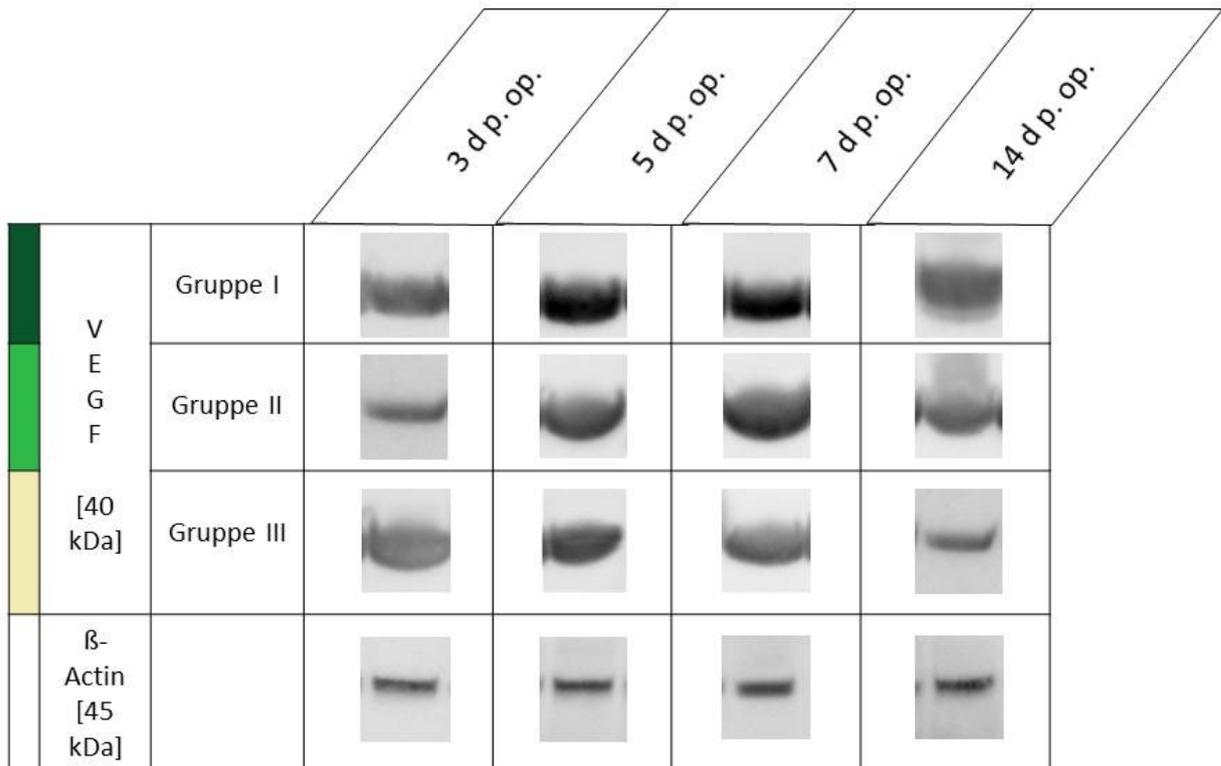


Abbildung 23: Detektierte Proteinbanden nach Blotting. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte auf indirektem Weg mit einem 1. AK und einem Peroxidase - markierten 2. AK. Die Unterschiede im VEGF₁₆₄ - Gehalt zwischen Gruppe I, II und III sind zu erkennen. Der β - Actin-Gehalt ist über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu konstant.

5.4.2 Untersuchung auf regionale Unterschiede

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der qRt - PCR ist unter den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Entnahmeregionen auszumachen. In Gruppe I sind in dem oberflächlichen Anteil als auch in dem kaudalen bzw. kranialen Anteil des M. graciles ähnliche Mengen an VEGF nachzuweisen. Abbildung 24 zeigt die geringen Unterschiede der Proteinkonzentrationen an den jeweiligen Entnahmezeitpunkten. An Tag 7 p. op. ist im oberflächlichen Anteil ein VEGF₁₆₄ - Gehalt von 9,57 (SA: 0,35), im kaudalen Anteil von 9,78 (SA: 3,25) und im kranialen Anteil von 7,82 (SA: 0,44) zu konstatieren.

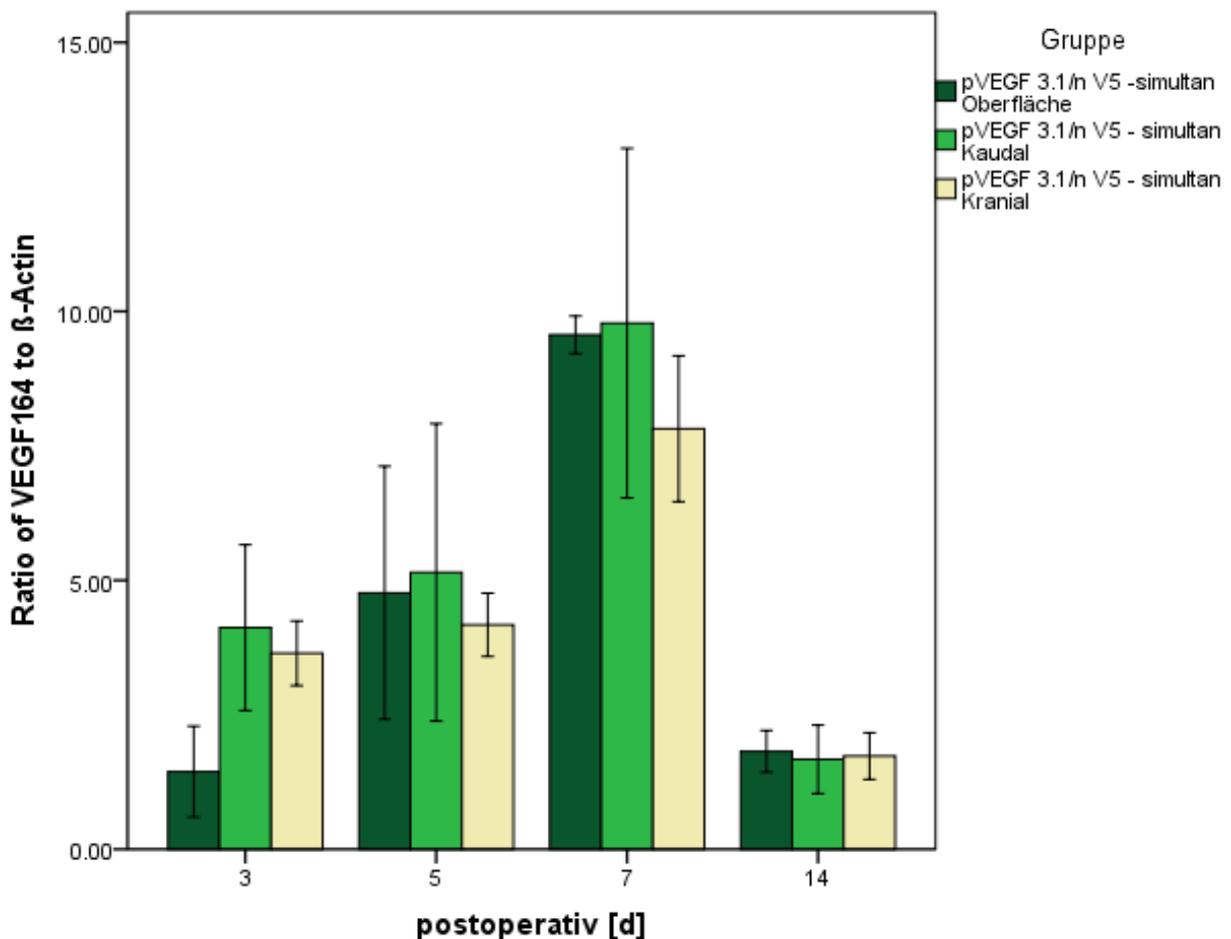


Abbildung 24: Graphische Darstellung des relativen VEGF₁₆₄ - Proteingehalts der unterschiedlichen Entnahmeregionen in Gruppe I. Aus jeder Region wurden pro Entnahmezeitpunkt Proben von 3 Tieren ausgewertet. Es sind keine signifikanten Unterschiede zu konstatieren.

5.4.3 Therapeutischer Effekt der Fibroblasten

Der VEGF₁₆₄ - Gehalt ist in jeder Versuchsgruppe dem Gehalt der Kontrollgruppen, seien sie mit Fibroblasten oder PBS behandelt wurden, quantitativ überlegen. Die Therapie erzielt in allen Variationen auf Proteinebene Erfolge, lediglich die Erfolgsgrade unterscheiden sich.

An Tag 7 p. op. sind hochsignifikante Unterschiede zwischen Gruppe I und der Kontrollgruppe, die mit Fibroblasten behandelt wurde, sowie der Kontrollgruppe, der PBS injiziert wurde, nachzuweisen ($p < 0,001$). Der höchste VEGF₁₆₄ - Proteingehalt ist in Gruppe I an Tag 7 p. op. mit 9,57 (SA: 0,35) festzustellen. Bei der Applikation von unbehandelten Fibroblasten befindet sich der relative Protein-Gehalt bei 3,73

(SA: 0,86). Es ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe, der PBS injiziert wurde (2,3; SA: 0,11), zu ermitteln. Über den gesamten Untersuchungszeitraum konnten keine Signifikanzen zwischen der Behandlung mit PBS und der Behandlung mit nativen Fibroblasten konstatiert werden. In Gruppe II und Gruppe III ist ebenfalls kein Effekt der Fibroblasten festzustellen (hier nicht dargestellt).

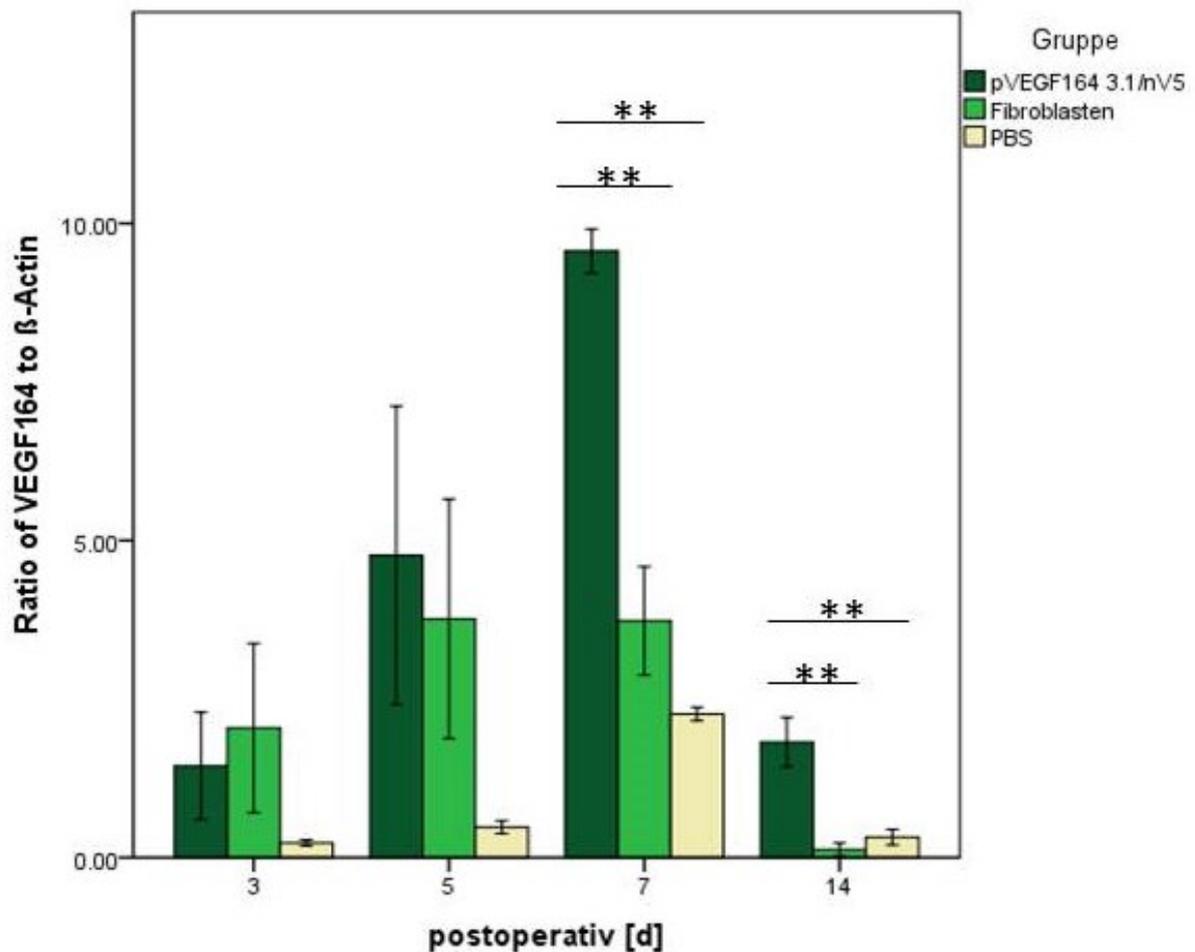


Abbildung 25: Graphische Darstellung des relativen VEGF₁₆₄ - Gehalts des oberflächlichen Muskelanteils der Gruppe I und der Kontrollgruppen (Fibroblasten bzw. PBS). Der relative VEGF₁₆₄ - Gehalt erreicht die höchsten Werte am 7. Tag p. in Gruppe I und unterscheidet sich hochsignifikant von dem der Kontrollgruppen. Zwischen den Kontrollgruppen sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. **p < 0,001.

5.5 Histologie

5.5.1 HE-Übersichtsaufnahmen

Um einen Überblick über die Gewebeproben zu schaffen, wurden HE - Färbungen angefertigt, die eine histologische Darstellung des Muskelgewebes und der integrierten Gefäßstrukturen ermöglichen. Das Hämatoxylin färbt basophile Strukturen wie den Zellkern blau. Der saure Farbstoff Eosin färbt die eosinophilen Strukturen. Dazu gehören die Zytoplasmaproteine. Man kann in Abbildung 26 den typischen Aufbau quergestreifter Muskulatur erkennen - Muskelzellen mit enthaltenen Myofibrillen und den randständigen Zellkernen.

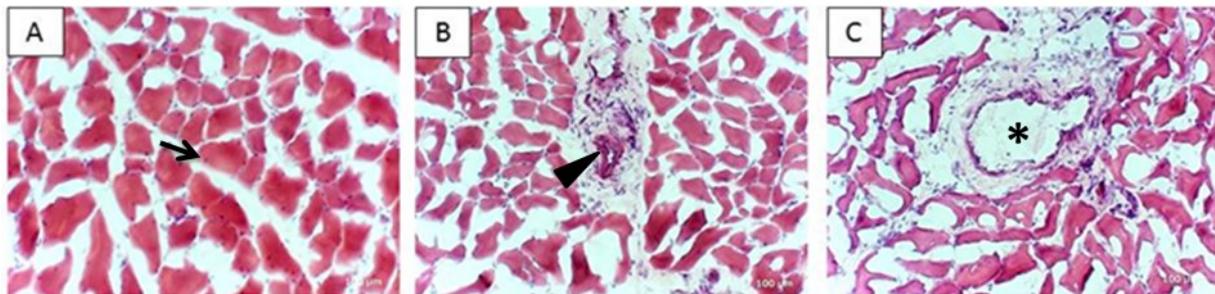


Abbildung 26: M. graciles im Querschnitt. Muskelzellen mit randständigen Zellkernen (→) und die im Perimysium externum liegenden Gefäße (▶ Arteriole, * Venole) (A) Gruppe II 7 d p. op. (B) Gruppe I 7 d p. op (C) Gruppe II 7 d p. op.; Färbung: H&E; Vergrößerung: 10 x.

5.5.2 Qualitative Auswertung

Abbildung 27 und 28 zeigen eine deutliche Lokalisationsprävalenz von VEGF₁₆₄ an dem Gefäßendothel erkennen, wo es letztlich auch über die VEGF - Rezeptoren seine Wirkung entfaltet. Im Gefäßlumen selber sind keine Fluoreszenzsignale zu erkennen und somit auch keine Proteinstrukturen nachzuweisen. Ein schwaches Fluoreszenzsignal ist weiterhin in dem perivaskulärem Bindegewebe zu sehen.

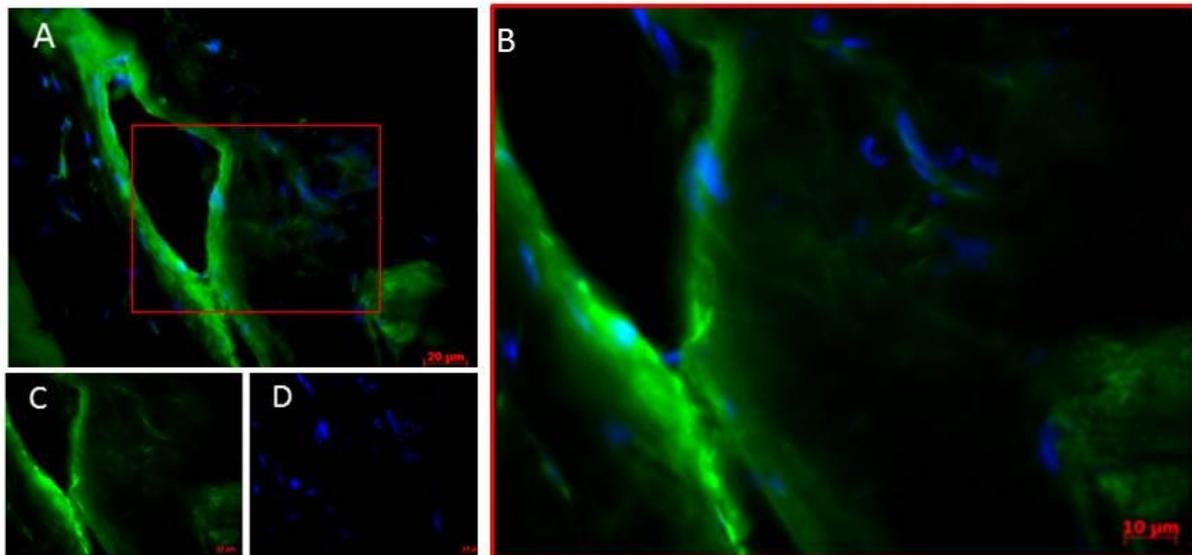


Abbildung 27: Immunfluoreszenzaufnahme einer Gefäßstruktur im Muskelgewebe des *M. graciles*. Ein VEGF₁₆₄ - Primär-Antikörper (Polyklonaler Ziege - IgG Antikörper), gebunden an VEGF₁₆₄, wurde mithilfe eines fluorchromkonjugierten Zweitantikörpers (Cy2) markiert. VEGF₁₆₄ lässt sich an dem grünen Fluoreszenzsignal erkennen. Man sieht an den Gefäßstrukturen zahlreiche Proteinstrukturen **(A)** Gruppe I 7 d p. op. **(B)** Gruppe I 7 d p. op. **(C)** Cy2 Färbung **(D)** Kernfärbung DAPI (blau); (A) Vergrößerung: 20 x, (B)(C)(D) Vergrößerung: 40 x.

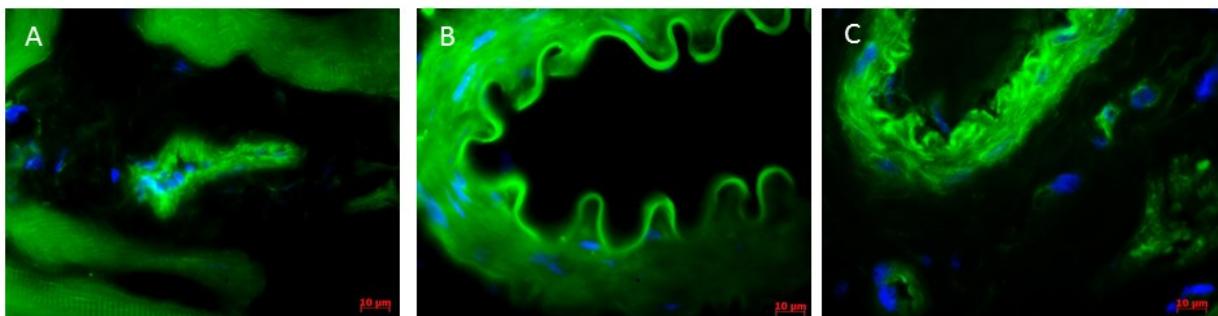


Abbildung 28: Immunfluoreszenzaufnahme von Arteriolen des *M. graciles*. Der Farbstoff Cy2 markiert VEGF. Stark grün fluoreszierende Bereiche fand man besonders im Bereich der Endothelzellen der Gefäße. **(A)** Gruppe I 14 d p. op. Oberfläche **(B)** Gruppe III 3 d p. op. Oberfläche **(C)** Gruppe III 5 d p. op. Oberfläche; Vergrößerung: 40 x.

In den Muskelzellen sind weitere VEGF - Proteinstrukturen nachzuweisen. Dabei ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal tendenziell hin zu Tag 7 p. op. ansteigt. Im weiteren Verlauf wird das Signal wieder schwächer. In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass die Proteine hauptsächlich im Randbereich der Muskelzelle und zwischen den einzelnen Myofibrillen im Zytoplasma lokalisiert sind.

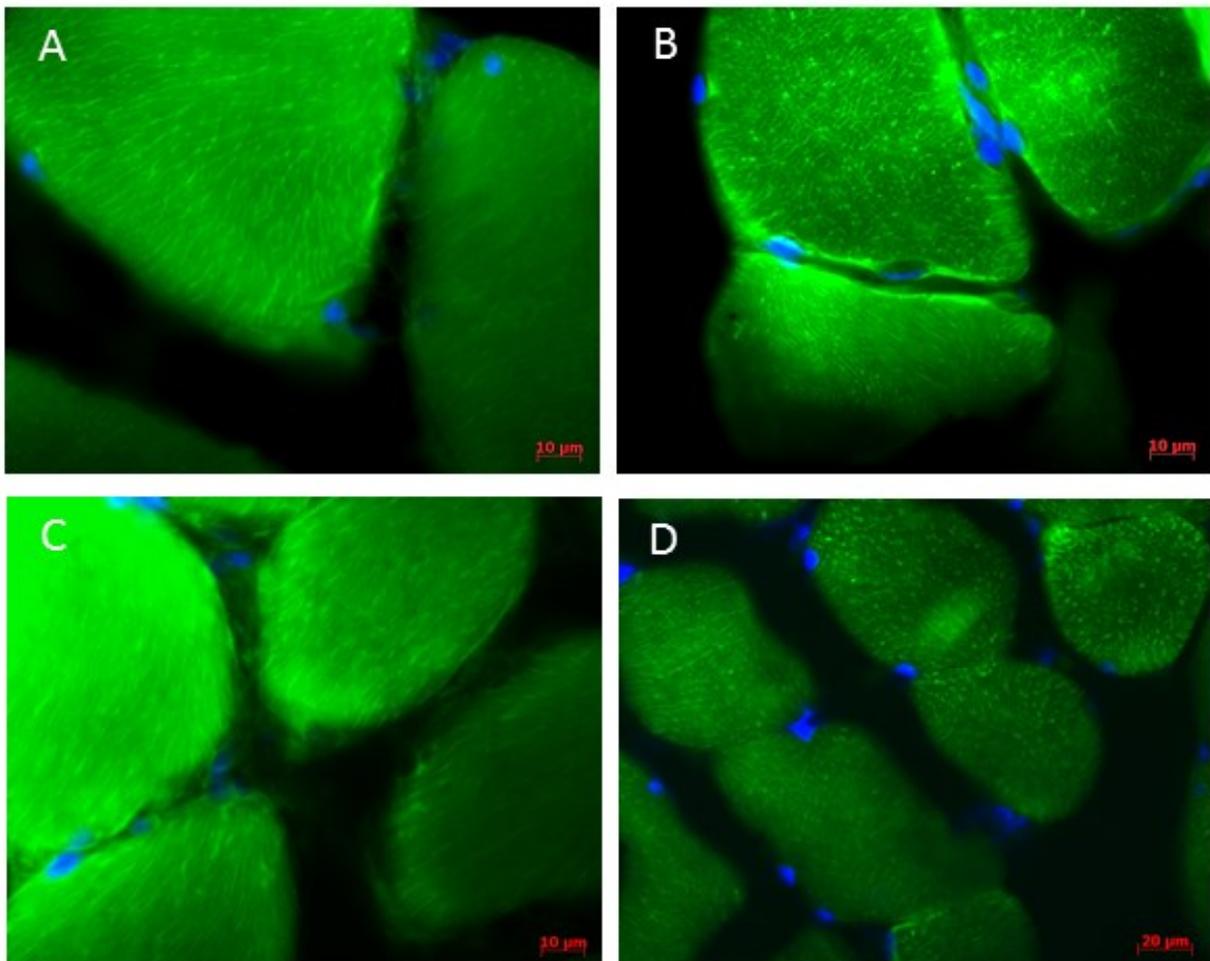


Abbildung 29: Immunfluoreszenzaufnahme des *M. graciles* der Gruppe I. VEGF wird durch einen fluorchromkonjugierten Zweitantikörper markiert. Cy2 wird bei einer Wellenlänge von 492 nm angeregt und mit dem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen. **(A)** 3 d p. op. kaudaler Anteil **(B)** 5 d p. op. kaudaler Anteil **(C)** 7 d p. op. kranialer Anteil **(D)** 14 d p.op. oberflächlicher Anteil; (A)(B)(C) Vergrößerung: 40 x, (D) Vergrößerung: 20 x.

An Tag 3 p. op. sind in allen Versuchsgruppen keine neuen Gefäßstrukturen zu identifizieren. Zwischen den Muskelzellen sind lediglich einige wenige ältere Gefäße im umliegenden Bindegewebe zu sehen. Je länger der zeitliche Abstand zum Ligationszeitpunkt gewählt wird, desto mehr neue kleinere Gefäßstrukturen sind visuell zu erfassen. Der Gefäßdurchmesser vergrößert sich ebenfalls je mehr Zeit nach Einleitung der Ischämie verstreicht (Abbildung 30).

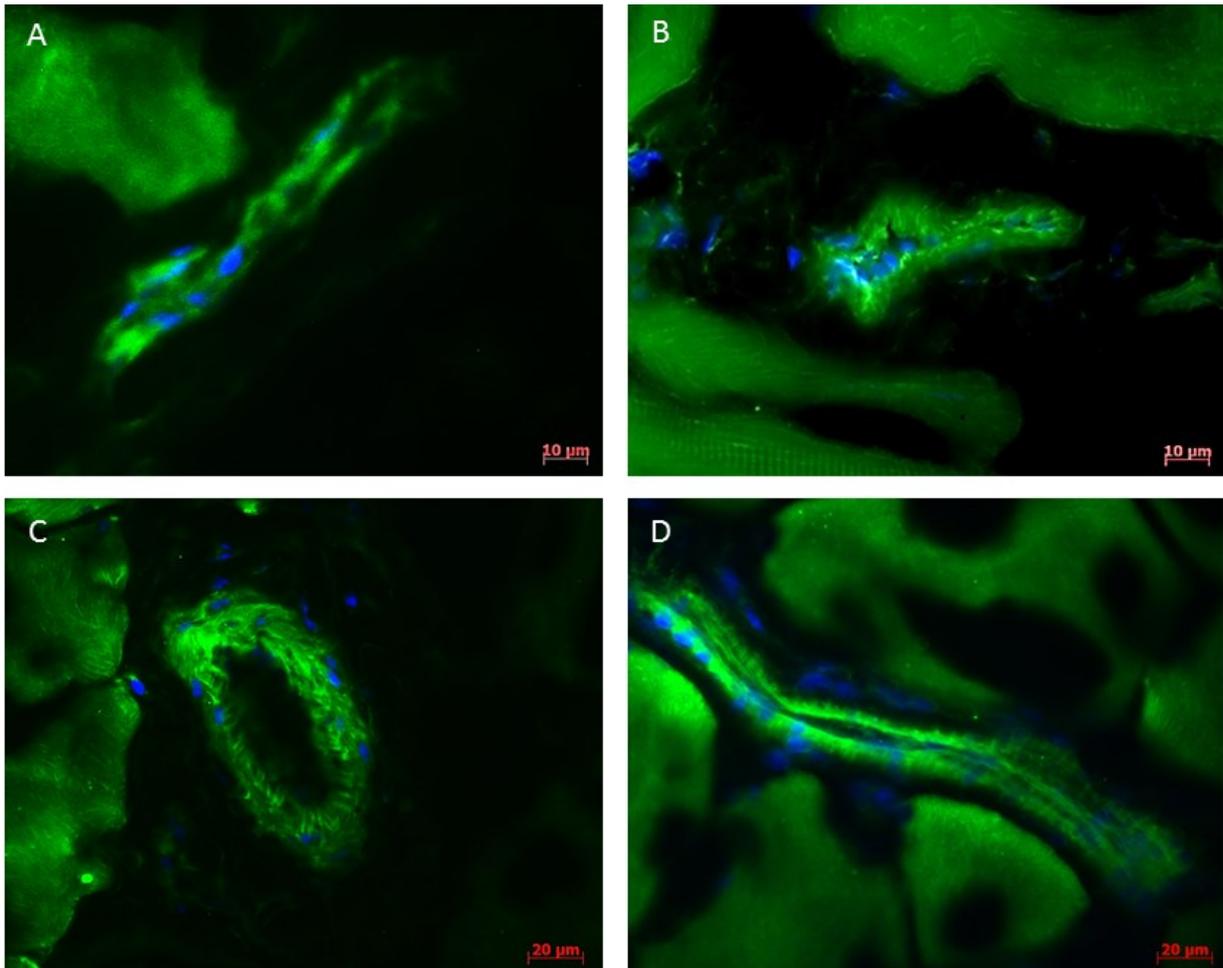


Abbildung 30: Immunfluoreszenzaufnahme von neu entstandenen Gefäßstrukturen. Kurz nach Ligationszeitpunkt konnten keine neuen Gefäßstrukturen aufgefunden werden. Je mehr Tage p. op. vergehen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit auf neue Gefäße zu stoßen. Am 14 d p. op. sind die besten Ergebnisse hinsichtlich Menge und Größe der Gefäße zu sehen. Gruppe I **(A)** 5 d p. op. **(B)** 7 d p. op. **(C)/(D)** 14 d p. op.; (A)(B) Vergrößerung: 40 x, (C)(D) Vergrößerung: 20 x.

In der Kontrollgruppe sind kaum neue Gefäßstrukturen visuell zu erfassen. Das Fluoreszenzsignal von Cy2 ist im Vergleich zu Gruppe I, II sowie III an allen Tagen nur sehr schwach. Die niedrigere Proteinkonzentration im Vergleich zur Versuchsgruppe bestätigt sich so auch qualitativ (Abbildung 31).

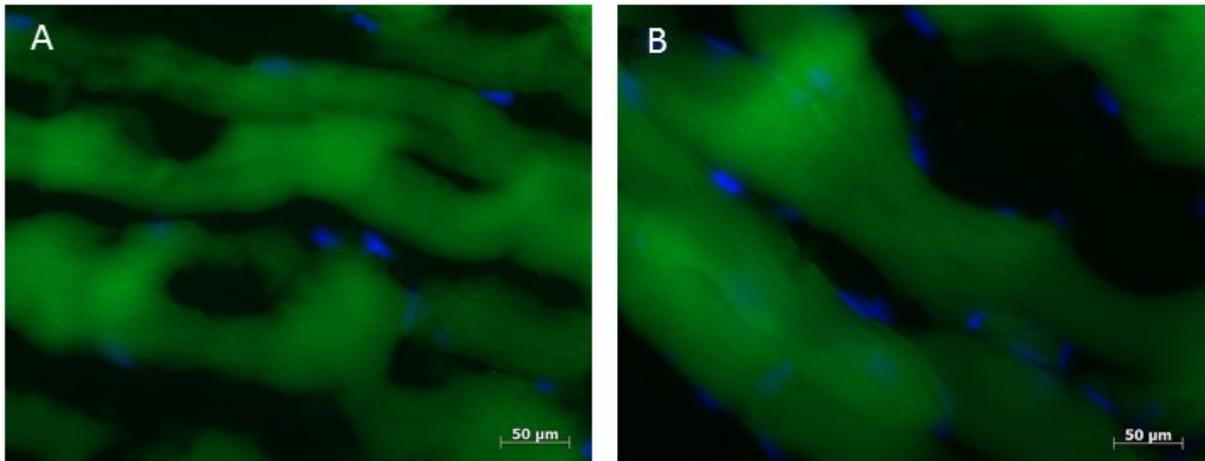


Abbildung 31: Immunfluoreszenzaufnahme des *M. graciles* der Kontrollgruppe im Längsschnitt. Das Fluoreszenzsignal ist sehr schwach und es können keine neuen Gefäßstrukturen visuell nachgewiesen werden. **(A)** Gruppe IV 7d p. op. **(B)** Gruppe IV 14d p. op.; Vergrößerung: 20 x.

6 Diskussion

Die therapeutische Angiogenese weckt neue Hoffnung in der Behandlung von ischämischen Gewebe und Wundheilungsstörungen (Ylä - Herttuala 2006). VEGF ist durch seine mitogene Wirkung auf Endothelzellen (Carmeliet 2000) sowie durch die Mobilisation von EPCs (Asahara, Takahashi et al., 1999) schon lange als potenter Angiogeneseinduktor bekannt. Eine ausreichende Vaskularisation des Transplantats sowie des Transplantationslagers stellt die Voraussetzung für eine hohe Take - Rate dar (Schultze - Mosgau et al. 2002). Dementsprechend hat sich die therapeutische Induktion der Angiogenese in den letzten Jahren zu einem der am intensivsten untersuchten Forschungsgebiet im Bereich der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie entwickelt.

6.1 Beschriebene Applikationssysteme für die therapeutische Angiogenese

Es konnte bereits in mehreren präklinischen Untersuchungen eine Perfusionssteigerung durch den Einsatz von VEGF nachgewiesen werden. Padubidri et al. fanden nach VEGF - Injektion am epigastrischen Lappenmodell der Ratte eine erhöhte Überlebensrate. Durch histologische Untersuchungen konnte der Erfolg auf die erhöhte Kapillardichte zurückgeführt werden (Padubidri et al. 1996). Ähnliche Ergebnisse beschrieben Kryger et al. in ihrer präklinischen Studie am muskulo - kutanen McFarlane - Lappen mit einer durchschnittlichen Überlebensrate des Lappens von 78 - 96% (Kryger et al. 2000). Durch die topische Applikation von rVEGF konnte darüber hinaus im vorbestrahlten Transplantatlager die endogene VEGF und CD105 - Produktion hochreguliert werden (Schultze - Mosgau et al. 2003). Trotz präklinischer Erfolge hat die isolierte Applikation von Wachstumsfaktoren auch seine Schattenseiten. Durch den unkontrollierten Übertritt ins Blut und der daraus folgenden systemischen Wirkung kann es unter anderem zu einer Neovaskularisation von okkulten Tumoren kommen (Carmeliet 2005). Die kurze Halbwertszeit stellt darüber hinaus die Effektivität dieser Therapiemöglichkeit in Frage (Zhang et al. 2004).

Das Ziel ist es, ein effizientes und sicheres System zur kontrollierten Induktion der therapeutischen Angiogenese zu entwickeln. Es wurde eine Vielfalt von Applikationssystemen beschrieben.

- (I) Protein - Delivery - Systeme
- (II) Gentherapie
 - In vivo Gentherapie
 - Nicht - viraler oder Viraler Gentransfer
 - Ex vivo Gentherapie
- (III) Transplantation von Zellen mit angiogenetischem Potential

Versuche für eine kontrollierte und lokale Proteinfreisetzung stellte die Entwicklung eines zellfreien Protein - Slow - Release Systems unter Verwendung von natürlichen sowie synthetischen Polymermatrix - Systemen dar. Die Freisetzungskinetik ist charakterisiert durch einen initialen Burst innerhalb der ersten 24 h, gefolgt von einer kontinuierlichen Freisetzung über einige Wochen (Rui et al. 2012). Elcin et al. konnten ab der ersten Woche histomorphometrisch die Formation neuer Kapillaren nach Implantation eines VEGF - funktionalisierten PLGA - Schwammes unter die Leistenfaszie der Ratte beobachten (Elcin et al. 2006). Durch die Degradation der Biomaterialien fällt jedoch ein Massenanteil saurer Abbauprodukte an, der eine Funktionsminderung des VEGF um 25% zur Folge hat (Kim et al. 2002). Andere Studien wiederum fanden keine Aktivitätsbeeinträchtigung (King et al. 2000) bzw. berichten über eine Aktivitätsminderung von nur 10% (Sheridan et al. 2000).

Ein anderes Applikationssystem stellt die Gentherapie dar. Das Ziel besteht in der Integration der genetischen Information des therapeutischen Gens in die Zielzelle oder das Zielgewebe. Die alleinige Applikation von Plasmiden ohne jegliche Adjuvantien zeigt sich als weniger effektiv. Kang et al. beschreiben ein signifikant höheres VEGF - Expressionslevel durch den Einsatz von PLGA (Kang et al. 2008). Mittels Immunfluoreszenz konnten Esponda et al. zeigen, dass die GFP - Genexpression nach Transfektion ausschließlich im Zytoplasma stattfindet (Esponda et al. 2009). Chemische Adjuvantien wie PLGA oder PEI wirken jedoch im

Rahmen ihrer Degradation zytotoxisch, was sie für die klinische Anwendung indiskutabel machen.

Die viral - basierten Techniken weisen bisher die größten Transfektionserfolge auf. Dabei macht man sich die Eigenschaft von Viren zu Nutze in Wirtszellen einzudringen und die genetische Information in das Genom einzubauen. Es werden verschiedene virale Vektorsysteme beschrieben, die durch unterschiedliche Gentransfereigenschaften charakterisiert sind (Gaffney et al. 2007; Lubiowski et al. 2002). Durch die starke, adenoviral ausgelöste Immunantwort (Hinkel et al. 2011; Lee et al. 2005) sowie das hohe pathologische und toxische Potential (Cristiano 1998) bestehen jedoch zahlreiche Sicherheitsbedenken gegen den Einsatz von viralen Vektoren.

Aluigi et. al entwickelten eine nicht - viral, auf Elektroporation basierende Gentransfermethode, die das genetische Material ex vivo direkt in den Nukleus schleust – die Nukleofektion (Aluigi et al. 2006). Es konnte eine Transfektionseffizienz mesenchymaler Stammzellen von bis zu 73% mit einer Überlebensrate der Zellen von 92% ermittelt werden. Somit stellt die Nukleofektion als Gentransfersystem eine effektive Alternative zum viralen Gentransfer dar.

Die Transplantation von Zellen mit angiogenetischem Potential stellt durch die Entdeckung von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen im adulten Organismus eine weitere Methode der therapeutischen Angiogenese dar (Asahara et al. 1997). Es konnte am ischämischen Rückenhaulappen der Nacktmaus beobachtet werden, dass injizierte humane EPCs sich bevorzugt im Wundgebiet ansammeln. Sie tragen zu einer signifikant erhöhten Kapillardichte und einer erhöhten Überlebensrate des Gewebes bei (Park et al. 2004).

6.2 Angewandtes Modell der therapeutischen Angiogenese

In vorhergehenden Studien wurde ein Modell des zellbasierten Gentransfers beschrieben - ein auf autologe Fibroblasten basierende VEGF - Delivery - System (Mueller et al. 2010b). Die Fibroblasten werden aus Gewebeproben der oralen Mukosa der Wistar - Ratten isoliert und kultiviert. Wunden der Mundschleimhaut sind

durch eine schnelle Reepithelialisierung und ein schnelles Remodelling gekennzeichnet. Darüber hinaus proliferieren die Zellen aufgrund ihres embryonalen Phänotyps unter Standardkulturbedingungen (Stephens et al. 2001). Durch Nukleofektion werden die Zellen ex vivo mit einem VEGF - codierenden Plasmid, dem pVEGF164 3.1/nV5 DEST™ transfiziert. Eine definierte Anzahl transfizierter autologer Fibroblasten werden den Tieren der Versuchsgruppe in die Region zwischen M. graciles und der Subkutis injiziert. Die Ischämie wird experimentell durch die Unterbindung der vaskulären Versorgung durch die A. femoralis eingeleitet.

Nach Applikation von transgenen Fibroblasten konnte bereits in einer vorherigen Studie eine verstärkte Expression von VEGF und eine Neovaskularisation einer Kollagenmembran am Tiermodell belegt werden. Müller et al. implantierten dazu eine allogene Kollagenmembran mit 1 cm Durchmesser in die Leistenregion von Wistar - Ratten und behandelten selbige mit VEGF - transfizierten Fibroblasten. Es konnten keine systemischen und lokalen Nebenwirkungen festgestellt werden. Die auf Fibroblasten - basierende VEGF - Plasmid - Applikation stellt ein potentes System zur Verbesserung der Wundheilung durch Steigerung der Perfusion dar (Mueller et al. 2010a).

In dieser Arbeit konnte weiterführend festgestellt werden, dass die Behandlung des Zielgewebes mit transfizierten Fibroblasten bei simultaner Einleitung der Ischämie sich als effizientesten behauptet, auf RNA - als auch auf Protein - Ebene.

6.2.1 Effektivität der Therapiestrategien

Der Therapieerfolg wird an einer erhöhten VEGF - Transkriptions- und Expressionsrate ausgemacht. Eine signifikant erhöhte mRNA - Konzentration kann in Gruppe I, die simultan mit der Legierung der Arterie behandelt wurde, im Vergleich zu Gruppe II und III, die 7 Tage bzw. 14 Tage vor Einleitung der Ischämie behandelt wurden, zu nahezu jedem Untersuchungszeitpunkt (3 d, 7 d und 14 d p. op.) festgestellt werden. Durch In - situ Hybridisierung kann der Unterschied optisch bestätigt werden. Die pVEGF164 3.1/nV5 - transfizierten Fibroblasten exprimieren VEGF konstitutiv als C-terminales V5 Fusionsprotein. Die VEGF - Transgenexpression unterliegt keinem übergeordneten

Regulationsmechanismus. Der relative Expressionshöhepunkt am 7. Tag p. op. und die folgende Abnahme des relativen VEGF₁₆₄mRNA - Gehalts sowie des Proteingehalts in Gruppe I deckt sich mit vorherigen Untersuchungen. Das genetische Material des therapeutischen Gens wird in einen Plasmid eingelesen. Der Plasmid wird nicht in das Genom der Fibroblasten eingebaut und so auch nicht an die nächste Generation vererbt. Die Transkription findet über ein zeitlich definiertes Fenster statt (transient). An Tag 14 p. op. kann man davon ausgehen, dass es sich ausschließlich um endogen produzierte mRNA handelt (Mueller et al. 2010b). Somit endet die VEGF - Genexpression der transgenen Fibroblasten mit ihrem Absterben oder ihrer Teilung. Ähnliche Ergebnisse liefert die Untersuchung auf Proteinebene. Am 7. Tag p. op. unterscheidet sich die Proteinkonzentration der Gruppe I von Gruppe II und III signifikant bis hochsignifikant.

In Gruppe II kann auf RNA - Ebene noch ein kleiner therapeutischer Erfolg beobachten werden, der sich jedoch nicht signifikant von den Ergebnissen der Kontrollgruppe unterscheidet. Die VEGF₁₆₄ - Transkription ist im Vergleich zur Versuchsgruppe mit simultaner Einleitung der Ischämie stark reduziert, was durch In - situ Hybridisierung ebenfalls bestätigt wird. An Tag 7 p. op. besteht ein hochsignifikanter Unterschied zu Gruppe I, wobei man den über das Basislevel hinausgehenden relativen mRNA - Gehalt mit einer Restaktivität der transfizierten Fibroblasten sowie der induzierten endogenen VEGF - Transkription erklären kann. Auf Proteinebene sind ähnliche Ergebnisse zu beobachten, wobei der Unterschied zu Gruppe I sich nicht so deutlich darstellt. Es können darüber hinaus an Tag 7 p. op. hochsignifikante Unterschiede zu der PBS - Kontrollgruppe ermittelt werden. Durch vorhergehende Behandlung des Gewebes mit den transfizierten Fibroblasten kommt es schon vor Einleitung der Ischämie zu einer gesteigerten VEGF - Expression. Ein Anteil von VEGF₁₆₄ bindet über Heparansulfat - Proteoglykane an die extrazelluläre Matrix und stellt so ein Reservoir biologisch aktiven VEGFs dar. Die Freisetzung durch proteolytische Spaltung durch Plasmin erfolgt im Rahmen der physiologischen Angiogenese unter hypoxischen Bedingungen (Houck et al. 1992), in diesem Falle durch die Imitation einer ischämischen Situation durch Legierung der A. femoralis.

In Gruppe III kann auf mRNA - Ebene kein therapeutischer Effekt der transfizierten Fibroblasten mehr beobachtet werden. Der mRNA - Gehalt geht kaum über das Basislevel hinaus. Man kann davon ausgehen, dass die inzwischen neu entstandene

Generation die Eigenschaft der Transgenexpression verloren hat bzw. die transfizierten Fibroblasten abgestorben sind. Die Transgenexpression ist so auf ein zeitliches Fenster von weniger als 14 Tagen beschränkt. Die Ergebnisse der In - situ Hybridisierung bestätigen diese Beobachtung. Auf Proteinebene kann jedoch ein kleiner Erfolg verzeichnet werden. Die relative VEGF - Konzentration des oberflächlichen Muskelanteils der Versuchsgruppe übersteigt die der beiden Kontrollgruppen am 3. und 7. Tag p. op.. An Tag 7 p. op. kann ein hochsignifikanter Unterschied festgestellt werden. Eine mögliche Begründung liegt wie in Gruppe II schon erläutert in der Bindung von VEGF₁₆₄ an die extrazelluläre Matrix und die durch die Ischämie eingeleitete proteolytische Freisetzung.

In einer anderen Studie konnte kein therapeutischer Effekt bei Applikation von transfizierten Zellen mit gleichzeitiger Unterbindung der Blutzufuhr erkannt werden. Spanholtz et al. erzielten nur bei der Behandlung des Zielgebiets eine Woche vor Ischämiebeginn und nur unter Einbeziehung des umgebenden Gewebes eine signifikant höhere Überlebensrate des Ischämiegebiets. Trotz höchster Expressionsrate direkt nach Ischämiebeginn in der Gruppe mit simultaner Einleitung der Ischämie, konnte nur in der Gruppe, die ein Woche vor Ischämiebeginn behandelt wurde, ein therapeutischer Effekt gesehen werden (Spanholtz et al. 2009). Als Lappenmodell für die Arbeit von Spanholtz et al. diente der muskulokutane McFarlane - Lappen in einer Größe von 2 x 8 cm mit randomisierter Blutversorgung von der Lappenbasis ausgehend. Mikroangiographische und immunhistologische Untersuchungen ließen Rückschlüsse auf den Erfolg der jeweiligen Therapie ziehen. Man kann jedoch nicht ohne weiteres beide Ergebnisse miteinander vergleichen, da unterschiedliche Auswertungsmethoden verwendet wurden. Für Spanholtz et al. stellte die Gefäßdichte das entscheidende Kriterium für den Erfolg der Therapie dar.

6.2.2 Ortsbeständigkeit der transfizierten Fibroblasten

Es kann anhand der stärksten Expression an VEGF₁₆₄ - mRNA in den oberflächlichen Anteilen des M. graciles der Gruppe I gezeigt werden, dass die Fibroblasten Ortsbeständig sind. Am 7. Tag p. op. kann ein hochsignifikanter Unterschied zwischen dem oberflächlichen Anteil und dem kaudalen bzw. kranialen

Anteil des *M. graciles* ermittelt werden. Somit ist eine kontrollierte Angiogenese am Ort der Injektion möglich, was mit den Ergebnissen vorheriger Studien korreliert (Mueller et al. 2010a). Nebenwirkungen wie Vasodilatation, Hypotonie (Unger et al. 2000) oder die Neovaskularisation von Tumoren (Ferrara 2002; Stewart & Kleinerman 2011) in entfernten Gebieten sind auszuschließen.

Auf Proteinebene kann kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Regionen festgestellt werden. VEGF ist ein sezerniertes angiogenes Protein (Leung et al. 1989). Es wurde die Verteilung von VEGF bereits im Tumorgewebe durch Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten beschrieben, wobei die Diffusionsgeschwindigkeit von der VEGF - Isoform abhängig ist (Newton 2006). Ein signifikanter Anteil an VEGF₁₆₄ bindet über Heparansulfat - Proteoglykane an die extrazelluläre Matrix (Ferrara 1993). Nach Einleitung der Ischämie kommt es, wie bereits in 6.2.1 erläutert, zur Freilassung des Wachstumsfaktor, was eine freie Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten ermöglicht. Diese Tatsache lassen Vermutungen über den nicht zu beobachteten Unterschied auf Proteinebene zu.

6.3 STED – Parameter

Das Problem besteht in der Umsetzung der präklinischen Ergebnisse aus Tierversuchen in klinisch verwertbare Therapieansätze. Ylä - Herttuala fordert für die klinische Anwendung pro - angiogenetischer Gentherapien ergänzend zu den ADME - Parametern die Prüfung der STED - Parameter, vor allem hinsichtlich einer Optimierung der Vektorsysteme, der therapeutischen Dosen und der Behandlungsziele (Ylä - Herttuala 2006). Die STED - Parameter beinhalten:

S – Spreading throughout and reaching appropriate cells in the target tissue

T – Transduction efficiency

E – Expression strength in the transduced cells

D – Duration of expression

Das in dieser Arbeit angewandte Modell der therapeutischen Angiogenese wird folgend hinsichtlich dieser Parameter untersucht.

6.3.1 Erreichen der Zielzellen – Parameter S

Dieses Modell einer therapeutischen Angiogenese basiert auf einer ex vivo Gentherapie. Dabei werden autologe Fibroblasten der Zungenmukosa von Wistar - Ratten isoliert und kultiviert. Die VEGF₁₆₄ - cDNA wird durch das Gateway - Verfahren in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1/n V5-DEST™ subkloniert. Die Transfektion der Fibroblasten erfolgt ex vivo durch Nukleofektion. Im Anschluss werden den Tieren der Versuchsgruppe autologe VEGF - transgene Fibroblasten in die Region zwischen M. graciles und Subkutis injiziert. Durch eine ex vivo Transfektion der kultivierten, autologen Fibroblasten ist es möglich nur die Zielzellen genetisch zu verändern. Eine kontrollierte Transfektion ist ermöglicht.

6.3.2 Transfektionseffizienz – Parameter T

Zaragosi et al. testeten eine Reihe von Transfektionsmethoden an Adipozyten auf ihre Effektivität. Die Nukleofektion zeigte dabei mit Werten bis zu 73% 48 h nach Transfektion die besten Erfolge und stellt so eine effiziente Transfektionsmethode für eine transiente Transgenproduktion dar (Zaragosi et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden an humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) beschrieben (Aluigi et al. 2006).

Die in dieser Arbeit erreichte Transfektionseffizienz von über 50% 48 h nach Transfektion ist in Übereinstimmung mit vorherigen Studien. Dabei wurden autologe Fibroblasten, kultiviert über eine Passage, mit einer Effizienz von 63,331% nach 24 h durch den „Basic Nucleofector Kit“ mit dem P-22 Programm transfiziert. Dabei zeigt sich die Anwendung des „Basic Nucleofector Kit“ dem „Dermal Fibroblast Kit“ als überlegen (Mueller et al. 2010b). In einer weiteren Studie konnte die Transfektionseffizienz mit 62,92% bei Gebrauch des „Basic Nucleofector Kit“ bestätigt werden (Mueller et al. 2010a). Kleine Differenzen lassen sich durch die unterschiedlichen Reaktionsansätze erklären. 3 µg pVEGF₁₆₄3.1/n V5 DEST™ wurden in dieser Arbeit mit 1 x 10⁷ Fibroblasten versetzt, wogegen Mueller et al. nur 5 x 10⁵ Fibroblasten verwendeten (Mueller et al. 2010b).

6.3.3 Expressionsstärke der transduzierten Zellen – Parameter E

VEGF wirkt nur in einem engen Konzentrationsbereich durch Ausbildung von stabilen und funktionellen Gefäßstrukturen physiologisch. Dabei stellt weniger die Gesamtdosis als vielmehr die lokale VEGF - Konzentration die kritische Determinante dar (Ozawa et al. 2004; von Degenfeld et al. 2006). Eine ex vivo stattfindende genetische Veränderung der Zellen ermöglicht eine Bestimmung der Expressionsstärke der transgenen Zellen bereits vor deren therapeutischen Einsatz. In einer früheren Arbeit konnte an Tag 3 p. op. ein VEGF - Gehalt von 559.221 pg/ml detektiert werden. Die Expressionsstärke nahm über Tag 7 p. op. und Tag 9 p. op. hin zu Tag 11 p. op. mit einem VEGF - Gehalt von 50.363 pg/ml signifikant ab (Mueller et al. 2010b).

Es liegt eine konstitutive, transiente Genexpression vor. Solange die lokale Dosischwelle an VEGF nicht überstritten wird, spielt die Anzahl der injizierten genetisch veränderten Zellen keine Rolle (von Degenfeld et al. 2006). Das Risiko auf Nebenwirkung bei Überdosierung wie die Bildung von Hämangiomen und abnormalen Blutgefäßen wird reduziert (Ozawa et al. 2004).

6.3.4 Transfektionspersistenz – Parameter D

In vitro Versuche mit VEGF - transfizierten Fibroblasten ergaben bereits eine Transkriptionspersistenz von ungefähr 9 Tagen (Mueller et al. 2010b). In dieser in vivo Studie kann in allen Versuchsgruppen ein Expressionsmaximum am 7. Tag p. op. gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine vorherige Tierstudie von Mueller et al., mit der höchsten VEGF - Rate an Tag 7 p. op. nach Applikation VEGF - transfizierter Fibroblasten. An Tag 14 p. op. ging der Gehalt an transgenen VEGF gegen Null (Mueller et al. 2010a; Mueller et al. 2010b). Im Rahmen einer transienten Proteinexpression wird die genetische Information des Wachstumsfaktors in einem Plasmid festgeschrieben, der außerhalb des Genoms liegt. Der Plasmid wird nicht an die folgende Generation weiter vererbt. Die Produktion von transgenen VEGF vererbt binnen zwei Wochen und ist somit auf ein therapeutisches Zeitintervall begrenzt.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die auf Fibroblasten basierende VEGF - Gentherapie stellt ein potentes System zur Verbesserung der Wundheilung dar. VEGF gilt als ein Schlüsselprotein der Angiogenese. Eine präoperative Stimulation der Angiogenese durch zellbasierten Gentransfer steigert die Perfusion durch Induktion der Neovaskularisation über eine verstärkte VEGF - Expression. Eine ausreichende Vaskularisation bildet die Basis für den Gewebetransfer.

Im Rahmen der vorliegenden in vivo Studie konnte nach einer Behandlung mit VEGF - transgenen Fibroblasten über nahezu den gesamten Untersuchungszeitraum eine z.T. hochsignifikante Erhöhung der VEGF - Expression sowie ein verstärkter Zytokin - Gehalt im Gewebe nachgewiesen werden. Die alleinige Applikation von Fibroblasten hatte dabei keinen therapeutischen Effekt. Bei Injektion der transfizierten Fibroblasten mit simultaner Einleitung der Ischämie konnten quantitativ die besten Ergebnisse konstatiert werden. Die Behandlung zwei Wochen vor Tx - Hebung zeigte keine quantitative Veränderung des Zytokin - Haushalts. Die qualitative Beurteilung der entstandenen Gefäßstrukturen und der daraus resultierenden Tx - Überlebensrate könnte das Ziel weiterführender Studien sein.

Rinsch et al. konnten bereits in einer früheren Studie bei singulärer VEGF - Therapie, trotz signifikanter Erhöhung der Gefäßdichte, keinen Erfolg hinsichtlich der Tx - Überlebensrate feststellen (Rinsch et al. 2001). VEGF ist ein wichtiges Zytokin, welches EPCs mobilisiert und Endothelzellen aktiviert. Die Formation eines neuen Kapillarnetzwerkes beginnt. Eine Stabilisierung durch glatte Muskelzellen und Perizyten fehlt jedoch. Dem neugebildeten Gefäßnetz fehlt es an ausreichend Stabilität um Belastungen standzuhalten. Es bilden sich unreife Gefäßstrukturen mit Hyperpermeabilität. Man spricht von „leaky vessels“ (Spanholtz et al. 2011). Cao et al. berichteten bereits über die Ausbildung eines stabilen Gefäßnetzes durch eine Kombinationstherapie von VEGF und PDGF - BB (Cao et al. 2003). Ausgereifte Gefäßstrukturen durch die gleichzeitige Induktion von glatten Muskelzellen über bFGF konnten auch Spanholtz et al. beobachten (Spanholtz et al. 2011). Eine Kombinationsbehandlung aus zwei oder mehreren Wachstumsfaktoren wie VEGF mit PDGF, bFGF oder TGF - β könnte einen größeren Therapieerfolg versprechen.

Über die Induktion der Arteriogenese kann das Kapillarnetzwerk ausreifen, der Gefäßdurchmesser gesteigert werden und die Gefäße können an Stabilität gewinnen.

Eine weitere Möglichkeit könnte der therapeutische Einsatz von EPC - mobilisierenden Faktoren darstellen. Dazu zählen u.a. Angiopoietin 1, GM - CSF oder G - CSF. So kommt es zu einer verstärkten Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark und in deren Folge zu einer gesteigerten Vaskulogenese. Angiopoetin 1 ist an Reifung und Wachstum von Gefäßen beteiligt und darüber hinaus für die Erhaltung der Gefäßstabilität unverzichtbar (Thurston et al. 1999).

Für die klinische Anwendung ist es weiterhin wichtig zu prüfen, ob durch Vorbehandlung des Transplantatbetts eine Verbesserung der Take - Rate erzielt werden kann. Es konnte schon am McFarlane - Lappen in einer anderen Studie gezeigt werden, dass eine Behandlung des umliegenden Gewebes zu einer verbesserten Take - Rate beiträgt (Spanholtz et al. 2009).

Um auch klinisch langfristige Erfolge zu erzielen, muss eine Optimierung der Gefäßreifung und der Stabilität der entstandenen Gefäßkomplexe angestrebt werden. Ein stabiles Gefäßnetz stellt eine *Conditio sine qua non* für eine erhöhte Take - Rate und Tx - Überlebensrate dar.

8 Literaturverzeichnis

- Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, Mergia A, Friedman J, Gospodarowicz D, Fiddes JC. 1986. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J*, 5 (10):2523-2528.
- Adams RH, Alitalo K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (6):464-478.
- Alfranca A. 2009. VEGF therapy: a timely retreat. *Cardiovasc Res*, 83 (4):611-612.
- Aluigi M, Fogli M, Curti A, Isidori A, Gruppioni E, Chiodoni C, Colombo MP, Versura P, D'Errico-Grigioni A, Ferri E, Baccarani M, Lemoli RM. 2006. Nucleofection is an efficient nonviral transfection technique for human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24 (2):454-461.
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 18 (14):3964-3972.
- Asmussen PD, Söllner B. 1993. Wundversorgung Band 1: Prinzipien der Wundheilung. Stuttgart: Hippokrates Verlag, 24-51.
- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, 87 (8): 3336-43.
- Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marmé D, Martiny-Baron G. 1997. Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J Biol Chem*, 272 (16):10382-10388.
- Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, 16 (5):585-601.
- Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. 1995. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, 372 (1):83-87.
- Bennett SP, Griffiths GD, Schor AM, Leese GP, Schor SL. 2003. Growth factors in the treatment of diabetic foot ulcers. *Br J Surg*, 90 (2):133-146.
- Blombäck B, Carlsson K, Fatah K, Hessel B, Procyk R. 1994. Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation. *Thromb Res*, 75 (5):521-538.
- Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. 2005. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*, 366 (9498):1719-1724.
- Breier G, Clauss M, Risau W. 1995. Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Dev Dyn*, 204 (3):228-239.
- Cao R, Bråkenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y. 2003. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med*, 9 (5):604-613.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6 (4):389-395.

- Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9 (6):653-660.
- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438 (7070):932-936.
- Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*, 7 (5):575-583.
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 10 (8):858-864.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162 (1):156-159.
- Clark RA. 1985. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol*, 13 (5 Pt 1):701-725.
- Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. 1990. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*, 172 (6):1535-1545.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. 1996. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 271 (2):736-741.
- Cristiano RJ. 1998. Viral and non-viral vectors for cancer gene therapy. *Anticancer Res*, 18 (5A):3241-3245.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. 2003. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*, 28 (9):488-494.
- Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N. 1996. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *EMBO J*, 15 (18):4919-4927.
- de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. 1992. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 255 (5047):989-991.
- Denham JW, Hauer-Jensen M. 2002. The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol*, 63 (2):129-145.
- DiPietro LA. 1995. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock*, 4 (4):233-240.
- Dor Y, Keshet E. 1997. Ischemia-driven angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 7 (8):289-294.
- Durrant I, Fowler S. 1994. Nonradioactive oligonucleotide probe labeling. *Methods Mol Biol*, 31:163-175.
- Dvorak HF. 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 20 (21):4368-4380.
- Elcin AE, Elcin YM. 2006. Localized angiogenesis induced by human vascular endothelial growth factor-activated PLGA sponge. *Tissue Eng*, 12 (4):959-968.

- Elçin YM, Dixit V, Gitnick G. 2001. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. *Artif Organs*, 25 (7):558-565.
- Erdmann D, Sweis R, Wong MS, Niklason LE, du Laney TV, Levin LS, Klitzman B, Olbrich KC. 2003. Vascular endothelial growth factor expression in pig latissimus dorsi myocutaneous flaps after ischemia reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*, 111 (2):775-780.
- Esponda P, Carballada R. 2009. In-vivo gene transfer induces transgene expression in cells and secretions of the mouse cauda epididymis. *Mol Hum Reprod*, 15 (6):355-361.
- Falanga V. 2005. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*, 366 (9498):1736-1743.
- Fam NP, Verma S, Kutryk M, Stewart DJ. 2003. Clinician guide to angiogenesis. *Circulation*, 108 (21):2613-2618.
- Ferrara N. 1993. Vascular endothelial growth factor. *Trends Cardiovasc Med*, 3 (6):244-250.
- Ferrara. 1999. Vascular Endothelial Growth Factor: Molecular and Biological Aspects. In: Lena Claesson-Welsh, Hrsg. *Vascular Growth Factors and Angiogenesis*. Heidelberg: Springer Verlag GmbH. 1-30.
- Ferrara N. 2002. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 2 (10):795-803.
- Ferrara N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25 (4):581-611.
- Ferrara N, Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161 (2):851-858.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18 (1):4-25.
- Ferrara N, Winer J, Burton T. 1991a. Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth Factors*, 5 (2):141-148.
- Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. 1991b. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem*, 47 (3):211-218.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380 (6573):439-442.
- Flamme I, Risau W. 1992. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*, 116 (2):435-439.
- Fogelson AL, Keener JP. 2010. Toward an understanding of fibrin branching structure. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 81 (5 Pt 1):051922.
- Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1 (1):27-31.
- Folkman J, Klagsbrun M. 1987. Angiogenic factors. *Science*, 235 (4787):442-447.
- Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. 1995. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 270 (21):12607-12613.
- Fries D, Martini WZ. 2010. Role of fibrinogen in trauma-induced coagulopathy. *Br J Anaesth*, 105 (2):116-121.

- Gachet C. 2000. Platelet activation by ADP: the role of ADP antagonists. *Ann Med*, 32 Suppl 1:15-20.
- Gaffney MM, Hynes SO, Barry F, O'Brien T. 2007. Cardiovascular gene therapy: current status and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*, 152 (2):175-188.
- Gellert K. 2003. Techniken zum Wundverschluss. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 7-12.
- Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. 1997. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 272 (38):23659-23667.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 273 (46):30336-30343.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 273 (46):30336-30343.
- Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. 2002. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*, 417 (6892):954-958.
- Goldman CK, Kim J, Wong WL, King V, Brock T, Gillespie GY. 1993. Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell*, 4 (1):121-133.
- Görlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. 2001. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res*, 89 (1):47-54.
- Harding KG, Morris HL, Patel GK. 2002. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ*, 324 (7330):160-163.
- Hatz RA, Niedner R, Vanscheidt W, Westerhof W. 1993. Wundheilung und Wundmanagement. Heidelberg: Springer Verlag. 1-16.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10 (4):413-417.
- Hinkel R, Trenkwalder T, Kupatt C. 2011. Gene therapy for ischemic heart disease. *Expert Opin Biol Ther*, 11 (6):723-737.
- Hoffman M. 2008. Animal models of bleeding and tissue repair. *Haemophilia*, 14 Suppl 3:62-67.
- Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hägerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, Claesson-Welsh L, Welsh M. 2004. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem*, 279 (21):22267-22275.
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, 267 (36):26031-26037.
- Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. 1992. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest*, 89 (1):244-253.

- Jazwa A, Kucharzewska P, Leja J, Zagorska A, Sierpniowska A, Stepniowski J, Kozakowska M, Taha H, Ochiya T, Derlacz R, Vahakangas E, Yla-Herttuala S, Jozkowicz A, Dulak J. 2010. Combined vascular endothelial growth factor-A and fibroblast growth factor 4 gene transfer improves wound healing in diabetic mice. *Genet Vaccines Ther*, 8:6.
- Kamei M, Saunders WB, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM. 2006. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature*, 442 (7101):453-456.
- Kang SW, Lim HW, Seo SW, Jeon O, Lee M, Kim BS. 2008. Nanosphere-mediated delivery of vascular endothelial growth factor gene for therapeutic angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Biomaterials*, 29 (8):1109-1117.
- Kendall RL, Thomas KA. 1993. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (22):10705-10709.
- Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmé D, Kolch W. 1994. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*, 9 (3):963-969.
- Kim TK, Burgess DJ. 2002. Pharmacokinetic characterization of ¹⁴C-vascular endothelial growth factor controlled release microspheres using a rat model. *J Pharm Pharmacol*, 54 (7):897-905.
- King TW, Patrick CW. 2000. Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique. *J Biomed Mater Res*, 51 (3):383-390.
- Ko J, Jun H, Chung H, Yoon C, Kim T, Kwon M, Lee S, Jung S, Kim M, Park JH. 2011. Comparison of EGF with VEGF non-viral gene therapy for cutaneous wound healing of streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Metab J*, 35 (3):226-235.
- Kowanetz M, Ferrara N. 2006. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res*, 12 (17):5018-5022.
- Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. 2000. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. *Br J Plast Surg*, 53 (3):234-239.
- Kumar VB, Viji RI, Kiran MS, Sudhakaran PR. 2007. Endothelial cell response to lactate: implication of PAR modification of VEGF. *J Cell Physiol*, 211 (2):477-485.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.
- Ledley FD. 1995. Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther*, 6 (9):1129-1144.
- Lee TW, Matthews DA, Blair GE. 2005. Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J*, 387 (Pt 1):1-15.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246 (4935):1306-1309.
- Li J, Zhang YP, Kirsner RS. 2003. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microsc Res Tech*, 60 (1):107-114.

- Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME. 1995. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 270 (1):308-312.
- Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. 1995. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 77 (3):638-643.
- Lubiatowski P, Goldman CK, Gurunluoglu R, Carnevale K, Siemionow M. 2002. Enhancement of epigastric skin flap survival by adenovirus-mediated VEGF gene therapy. *Plast Reconstr Surg*, 109 (6):1986-1993.
- Mazure NM, Chen EY, Yeh P, Laderoute KR, Giaccia AJ. 1996. Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res*, 56 (15):3436-3440.
- McDonald A, Hoffman M, Hedner U, Roberts HR, Monroe DM. 2007. Restoring hemostatic thrombin generation at the time of cutaneous wounding does not normalize healing in hemophilia B. *J Thromb Haemost*, 5 (8):1577-1583.
- Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. 1994. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest*, 71 (3):374-379.
- Miyazono K, Okabe T, Urabe A, Takaku F, Heldin CH. 1987. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *J Biol Chem*, 262 (9):4098-4103.
- Möhle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. 1997. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (2):663-668.
- Mueller CK, Thorwarth M, Schultze-Mosgau S. 2010a. Transgenic overexpression of VEGF164 enhances topical neoangiogenesis without detectable local or systemic side effects. *Ann Plast Surg*, 65 (1):85-90.
- Mueller CK, Thorwarth MW, Schultze-Mosgau S. 2010b. Angiogenic gene-modified fibroblasts for induction of localized angiogenesis. *J Surg Res*, 160 (2):340-348.
- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155:335-350.
- Murasawa S, Asahara T. 2005. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)*, 20:36-42.
- Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC, Maciag T, Nabel GJ. 1993. Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature*, 362 (6423):844-846.
- Nakagawa A, Makino H, Aoki M, Miyake T, Shiraya S, Nakamura T, Ogihara T, Kimata Y, Morishita R. 2007. Improvement of survival of skin flaps by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase. *J Gene Med*, 9 (12):1087-1094.
- Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. 1998. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol*, 152 (6):1445-1452.
- Nyberg P, Xie L, Kalluri R. 2005. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*, 65 (10):3967-3979.

- Ozawa CR, Banfi A, Glazer NL, Thurston G, Springer ML, Kraft PE, McDonald DM, Blau HM. 2004. Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *J Clin Invest*, 113 (4):516-527.
- Padubidri A, Browne E. 1996. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Ann Plast Surg*, 37 (6):604-611.
- Palis J, McGrath KE, Kingsley PD. 1995. Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. *Blood*, 86 (1):156-163.
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. 1994. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*, 269 (41):25646-25654.
- Park S, Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Baharestani S, Kleinman ME, Pelo CR, Levine JP, Gurtner GC. 2004. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plast Reconstr Surg*, 113 (1):284-293.
- Patz A. 1980. Studies on retinal neovascularization. Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 19 (10):1133-1138.
- Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. 2011. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus*, 9 Suppl 2: 3-8.
- Piatek S, Tautenhahn J. 2006. Physiologie der Wundheilung. In: Lippert, H, Hrsg. *Wundatlas Kompendium der komplexen Wundbehandlung 2. Auflage*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 28-33.
- Piotrowicz RS, Orzechowski RP, Nugent DJ, Yamada KY, Kunicki TJ. 1988. Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets. *J Cell Biol*, 106 (4):1359-1364.
- Prior BM, Yang HT, Terjung RL. 2004. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol*, 97 (3):1119-1128.
- Probst, Vasal-Biergans. 2010. *Wundmanagement*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 23-29.
- Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. 2000. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 α in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 275 (35):26765-26771.
- Rinsch C, Quinodoz P, Pittet B, Alizadeh N, Baetens D, Montandon D, Aebischer P, Pepper MS. 2001. Delivery of FGF-2 but not VEGF by encapsulated genetically engineered myoblasts improves survival and vascularization in a model of acute skin flap ischemia. *Gene Ther*, 8 (7):523-533.
- Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386 (6626):671-674.
- Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC. 1998. Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol*, 16 (1):35-40.
- Rocha FG, Sundback CA, Krebs NJ, Leach JK, Mooney DJ, Ashley SW, Vacanti JP, Whang EE. 2008. The effect of sustained delivery of vascular endothelial growth factor on angiogenesis in tissue-engineered intestine. *Biomaterials*, 29 (19):2884-2890.
- Rui J, Dadsetan M, Runge MB, Spinner RJ, Yaszemski MJ, Windebank AJ, Wang H. 2012. Controlled release of vascular endothelial growth factor using poly-lactic-co-glycolic acid microspheres: in vitro characterization and application in polycaprolactone fumarate nerve conduits. *Acta Biomater*, 8 (2):511-518.

- Salgado R, Benoy I, Bogers J, Weytjens R, Vermeulen P, Dirix L, Van Marck E. 2001. Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): a morphological and functional study. *Angiogenesis*, 4 (1):37-43.
- Sambrook J, Gething MJ. 1989. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*, 342 (6247):224-225.
- Schäffer M, Becker HD. 1999. [Immune regulation of wound healing]. *Chirurg*, 70 (8):897-908.
- Schultze-Mosgau S, Rödel F, Radespiel-Tröger M, Wörl J, Grabenbauer GG, Neukam FW. 2002. Vascularization of the area between free grafts and irradiated graft beds in the neck in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 40 (1):37-44.
- Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rödel F, Amann K, Radespiel-Tröger M, Grabenbauer GG. 2003. Improved free vascular graft survival in an irradiated surgical site following topical application of rVEGF. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 57 (3):803-812.
- Sedlarik KM. 1993. *Wundheilung*. Jena: Gustav Fischer Verlag, 61-187.
- Sepúlveda P, Martínez-León J, García-Verdugo JM. 2007. Neoangiogenesis with endothelial precursors for the treatment of ischemia. *Transplant Proc*, 39 (7):2089-2094.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376 (6535):62-66.
- Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 28 (5):815-820.
- Shatrov VA, Sumbayev VV, Zhou J, Brüne B. 2003. Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) triggers hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) accumulation via redox-dependent mechanisms. *Blood*, 101 (12):4847-4849.
- Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, Borden L, Connolly D, Stern D, Kao J. 1993. Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes. *Blood*, 81 (10):2767-2773.
- Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ. 2000. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release*, 64 (1-3):91-102.
- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. 1990. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 5 (4):519-524.
- Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J, D'Amore PA. 1995. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med*, 1 (2):182-193.
- Siemeister G, Weindel K, Mohrs K, Barleon B, Martiny-Baron G, Marmé D. 1996. Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res*, 56 (10):2299-2301.
- Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE, Rosengart TK. 2000. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*, 102 (11):E73-86.

- Sonnenberg A, Modderman PW, Hogervorst F. 1988. Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature*, 336 (6198):487-489.
- Spanholtz TA, Theodorou P, Holzbach T, Wutzler S, Giunta RE, Machens HG. 2011. Vascular endothelial growth factor (VEGF165) plus basic fibroblast growth factor (bFGF) producing cells induce a mature and stable vascular network--a future therapy for ischemically challenged tissue. *J Surg Res*, 171 (1):329-338.
- Spanholtz T, Maichle A, Niedworok C, Stoeckelhuber BM, Krüger S, Wedel T, Aach T, Middeler G, Hellwig-Bürgel T, Bader A, Krengel S, Müller OJ, Franz WM, Lindenmaier W, Machens HG. 2009. Timing and targeting of cell-based VEGF165 gene expression in ischemic tissue. *J Surg Res*, 151 (1):153-162.
- Stalla GK. 2007. *Therapielexikon Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten*. Heidelberg: Springer Verlag, 1172-1173.
- Stephens P, Davies KJ, Occleston N, Pleass RD, Kon C, Daniels J, Khaw PT, Thomas DW. 2001. Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. *Br J Dermatol*, 144 (2):229-237.
- Stewart KS, Kleinerman ES. 2011. Tumor Vessel Development and Expansion in Ewing's Sarcoma: A Review of the Vasculogenesis Process and Clinical Trials with Vascular-Targeting Agents. *Sarcoma*, 2011:165837.
- Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. 2001. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*, 20 (11):2768-2778.
- Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. 1991. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 6 (9):1677-1683.
- Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Böhlen P. 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 187 (3):1579-1586.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 286 (5449):2511-2514.
- Tímár J, Döme B, Fazekas K, Janovics A, Paku S. 2001. Angiogenesis-dependent diseases and angiogenesis therapy. *Pathol Oncol Res*, 7 (2):85-94.
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. 1991. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 266 (18):11947-11954.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (9):4350-4354.
- Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. 1999. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 264 (3):781-788.
- Unger EF, Goncalves L, Epstein SE, Chew EY, Trapnell CB, Cannon RO, Quyyumi AA. 2000. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 85 (12):1414-1419.

- van Oostrom MC, van Oostrom O, Quax PH, Verhaar MC, Hoefer IE. 2008. Insights into mechanisms behind arteriogenesis: what does the future hold? *J Leukoc Biol*, 84 (6):1379-1391.
- Velazquez OC. 2007. Angiogenesis and vasculogenesis: inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing. *J Vasc Surg*, 45 Suppl A:A39-47.
- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. 1996. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 93 (8):1493-1495.
- von Degenfeld G, Banfi A, Springer ML, Wagner RA, Jacobi J, Ozawa CR, Merchant MJ, Cooke JP, Blau HM. 2006. Microenvironmental VEGF distribution is critical for stable and functional vessel growth in ischemia. *FASEB J*, 20 (14):2657-2659.
- Wahl P, Paoletti J, Le Pecq JB. 1970. Decay of fluorescence emission anisotropy of the ethidium bromide-DNA complex. Evidence for an internal motion in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 65 (2):417-421.
- Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 269 (43):26988-26995.
- Wilting J, Birkenhäger R, Eichmann A, Kurz H, Martiny-Baron G, Marmé D, McCarthy JE, Christ B, Weich HA. 1996. VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of chorioallantoic membrane. *Dev Biol*, 176 (1):76-85.
- Witte MB, Barbul A. 1997. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*, 77 (3):509-528.
- Wolberg AS. 2007. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev*, 21 (3):131-142.
- Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. 2007. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*, 25 (10):2648-2659.
- Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. 1996. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol*, 27 (6):838-844.
- Ylä - Herttuala S. 2006. An update on angiogenic gene therapy: vascular endothelial growth factor and other directions. *Curr Opin Mol Ther*, 8 (4):295-300.
- Yoon CS, Jung HS, Kwon MJ, Lee SH, Kim CW, Kim MK, Lee M, Park JH. 2009. Sonoporation of the minicircle-VEGF(165) for wound healing of diabetic mice. *Pharm Res*, 26 (4):794-801.
- Zaragosi LE, Billon N, Ailhaud G, Dani C. 2007. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*, 25 (3):790-797.
- Zhang F, Waller W, Lineaweaver WC. 2004. Growth factors and flap survival. *Microsurgery*, 24 (3):162-167.
- Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. 2000. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res*, 60 (6):1541-1545.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vaskulogenese und der Verbleib der rekrutierten EPCs.....	7
Abbildung 2: Angiogenese und Gefäßaussprossung.....	8
Abbildung 3: Intraoperative Aufnahmen	21
Abbildung 4: Karte des Plasmids pVEGF ₁₆₄ 3.1/n V5.....	22
Abbildung 5: Legierung der A. femoralis	24
Abbildung 6: Fast One - Step Rt - PCR Programm	28
Abbildung 7: Ablauf eines PCR - Zyklus.....	29
Abbildung 8: Logarithmische Darstellung der PCR - Daten.....	30
Abbildung 9: Biuret - Reaktion.....	45
Abbildung 10: Bestimmung der Proteinkonzentration.....	46
Abbildung 11: Gelelektrophorese.	48
Abbildung 12: Anordnung beim Semidry Blotting.	49
Abbildung 13: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen einer Fibroblastenzellkultur	55
Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transfizierten Fibroblasten	56
Abbildung 15: Graphische Darstellung des relativen VEGF ₁₆₄ - mRNA - Gehalts des oberflächlichen Anteils des M. graciles der Gruppen I – III	57
Abbildung 16: Graphische Darstellung des relativen VEGF ₁₆₄ - mRNA - Gehalts der verschiedenen Regionen in Gruppe I	58
Abbildung 17: Graphische Darstellung des relativen VEGF ₁₆₄ - m - RNA Gehalts der Gruppe I und der Gruppe I	60
Abbildung 18: Graphische Darstellung des relativen VEGF ₁₆₄ - mRNA - Gehalts der Gruppe III und VI des oberflächlichen Anteils des M. graciles.	62
Abbildung 19: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR - Produkte.	63
Abbildung 20: In - situ Hybridisierung der Versuchsgruppe.....	64
Abbildung 21: In - situ Hybridisierung der Kontrollgruppe.....	65
Abbildung 22: Graphische Darstellung des relativen VEGF ₁₆₄ - Gehalts der Gruppen I, II und III des oberflächlichen Anteils des M. graciles ...	66
Abbildung 23: Detektierte Proteinbanden nach Blotting.	67

Abbildung 24: Graphische Darstellung des relativen VEGF ₁₆₄ - Proteingehalts der unterschiedlichen Entnahmeregionen in Gruppe I	68
Abbildung 25: Graphische Darstellung des relativen VEGF ₁₆₄ - Gehalts des oberflächlichen Muskelanteils der Gruppe I und der Kontrollgruppen (Fibroblasten bzw. PBS)	69
Abbildung 26: M. graciles im Querschnitt	70
Abbildung 27: Immunfluoreszenzaufnahme einer Gefäßstruktur	71
Abbildung 28: Immunfluoreszenzaufnahme von Arteriolen des M. graciles	71
Abbildung 29: Immunfluoreszenzaufnahme des M. graciles der Gruppe I	72
Abbildung 30: Immunfluoreszenzaufnahme von neu entstandenen Gefäßstrukturen	73
Abbildung 31: Immunfluoreszenzaufnahme des M. graciles der Kontrollgruppe im Längsschnitt	74

10 Anhang

10.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern einen ganz besonderen Dank aussprechen. Sie haben stets ein offenes Ohr für mich. Sie haben immer an mich geglaubt und standen mir in allen Lebensphasen mit liebevollem Rat zur Seite. Ohne meine Eltern wäre ich jetzt nicht da, wo ich heute bin.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem leider bereits verstorbenen Opi bedanken. Ohne ihn hätte ich wohlmöglich nicht so einen großen Ehrgeiz und Wissensdrang entwickelt.

Auch meinen Großeltern gilt auch ein großer Dank. Wenn es drauf ankommt, sind Sie immer für mich da.

Ich möchte mich weiterhin bei allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben: Prof. Dr. Dr. Schultze - Mosgau danke ich für die Möglichkeit und Unterstützung innerhalb seiner Abteilung diese Arbeit anfertigen zu dürfen. Ganz besonders möchte ich mich auch bei Maia Mtsariashvili bedanken. Durch Ihre großen Bemühungen war ich in kürzester Zeit mit der Laborarbeit vertraut. Ein weiterer Dank geht an Frau Ute Günther für die außerordentlich gute Unterstützung in allen organisatorischen Belangen.

10.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Dr. Stefan Schultze-Mosgau, Maia Mtsariashvili und Cornelia K. Müller,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 18.11.2013

Juliane Müller