Aus dem Institut für Anatomie I

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Ehem. Direktor: Professor Dr. med. A. F. Holstein

Direktorin: Professor Dr. med. G. M. Rune

Nerve Growth Factor aktiviert Angiogenese im braunen Fettgewebe über Regulation der Expression von VEGF und seinen Rezeptoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Gülşen Atlihan

aus Bietigheim/Stuttgart

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 23.02.2007

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. S. Ergün

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. W. Fiedler

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Meinen Eltern und meinem Sohn Oğulcan Ozan

in Liebe

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG 5

2. EINLEITUNG 7

2.1 Allgemeine Einführung 7
2.2 Angiogenese-Faktoren 9
2.2.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und VEGF-Rezeptoren 9
2.2.2 Angiopoietine, Tie-1 und Tie-2 16
2.2.3 Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule-1 (CEACAM1) 18
2.2.4 Angiogenese-Inhibitor Endostatin 18
2.3 Nerve Growth Factor (NGF) 19
2.4 Weißes und braunes Fettgewebe 22
2.5 Arbeitshypothese und Fragestellung 28

3. MATERIAL UND METHODEN 29

3.1 Das Transgene Mausmodell 29
3.2 Gewebeentnahme und –aufbereitung 30
3.3 Proteinextraktion für Western Blot-Analysen 31
3.4 Western Blot 31
3.5 Gewebefixierung und Paraffineinbettung 32
3.6 Immunhistochemie 34
3.7 Quantitative Evaluierung immunhistochemischer Daten 37

4. ERGEBNISSE 38

4.1 Gefäßversorgung und Innervation des braunen (BAT) und weißen (WAT) Fettgewebes 38
4.2 Immunhistochemische Darstellung von VEGF und seiner Rezeptoren im BAT und WAT 39
4.3 NGF beeinflusst die Expression von VEGF und seiner Rezeptoren im BAT und WAT auf Proteinebene 42

5. DISKUSSION 45

6. LITERATURVERZEICHNIS 52

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 67

8. PUBLIKATION 69

9. DANKSAGUNG 70

10. LEBENSLAUF 71

11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG 72

1. Zusammenfassung

Mechanismen der Angiogenese sind entscheidend für die Anpassung der Gewebedurchblutung an metabolische Anforderungen. Neben der Steuerung des Stoffwechsels im Fettgewebe durch vegetative Innervation spielt die Vaskularisierung des Fettgewebes eine zentrale Rolle. Anzunehmen ist weiterhin, dass die Anpassung der Vaskularisierung an die Stoffwechselbedürfnisse durch angiogenetische Faktoren reguliert wird. Bisher ist jedoch der Zusammenhang zwischen den Faktoren der Angiogenese und den Faktoren, die das Nervenwachstum steuern, wie Nerve Growth Factor (NGF), nicht ausreichend untersucht. Hierzu wurden Gewebeproben von zwei NGF-transgenen Mauslinien mit vierfacher (aP2/NGF-1) und zehnfacher (aP2/NGF-2) NGF-Überexpression im BAT (Brown Adipose Tissue) und WAT (White Adipose Tissue) als Grundlage für proteinbiochemische Analysen mittels Western Blot und morphologische Analysen mittels Immunhistochemie genommen. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Gefäßdichte im BAT NGF-transgener Mäuse. Im WAT NGF-transgener Mäuse konnte ebenfalls eine erhöhte Gefäßdichte beobachtet werden, die jedoch nicht so signifikant war wie im BAT. Auf der Proteinebene war die Expression des potentesten Angiogenesefaktors Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) und seiner beiden Rezeptoren VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (Flk-1) im BAT NGF-transgener Mäuse im Vergleich zum BAT von Wildtyp-Mäusen signifikant gesteigert. Im WAT NGF-transgener Mäuse konnte eine signifikant erhöhte Expression auf der Proteinebene für VEGF und VEGFR-2 (Flk-1), nicht jedoch für VEGFR-1 (Flt-1) nachgewiesen werden. Passend zu den Western Blot-Ergebnissen zeigte sich immunhistochemisch eine verstärkte Immunfärbung für VEGF und VEGFR-1 sowie VEGFR-2 im BAT beider NGF-transgener Mauslinien. Lichtmikroskopisch zeigte sich eine um 30% höhere Nervendichte in Assoziation zu den Blutgefäßen im BAT NGF-transgener Mäuse verglichen mit Wildtyp-Mäusen. Allerdings war

immunhistochemisch mittels Neurofilament 200 kein Unterschied zwischen NGF-transgener und Wildtyp Mäuse bezüglich der Immunfärbungsintensität darstellbar.

In dieser Arbeit wird somit demonstriert, dass die Überexpression von NGF im BAT und WAT die Angiogenese und somit vermutlich die Perfusion des Fettgewebes reguliert. Die erhöhte Nervendichte in Assoziation mit den Gefäßen untermauert diese Hypothese und zeigt, dass die Interaktion zwischen dem NGF- und VEGF-System ein wesentlicher Initiator für die Aktivierung der Angiogenese im Fettgewebe ist. Die vorgelegten Ergebnisse hinsichtlich der Interaktion zwischen NGF- und VEGF-System ermöglichen neue Einblicke in die nervale Kontrolle der Vaskularisierung und somit der Durchblutung von Geweben und Organen.

2. Einleitung

2.1 Allgemeine Einführung

Angiogenese wird als ein Prozess der Neubildung von Blutgefäßen durch Aussprossung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen bezeichnet (Hanahan und Folkman, 1996). Physiologisch findet die Angiogenese während der Embryogenese und beim Erwachsenen in den weiblichen Reproduktionsorganen wie Uterus und Ovarien (Menstruationszyklus), in der Plazenta (Schwangerschaft) und bei der Wundheilung statt. Pathologisch kommt sie bei der Entstehung und Metastasierung von Tumoren (Berkman et al., 1993; Senger et al., 1993), der diabetischen Retinopathie (Aiello et al., 1994), der rheumatoiden Arthritis und anderen pathologischen Vorgängen vor, die einer Neovaskularisierung bedürfen. Die Blutgefäße sind außer bei den pathologischen Veränderungen und bei der physiologischen Angiogenese weitgehend ruhend (quiescent) (Hobsen et al., 1984; Bischoff, 1995; Hanahan et al., 1996).

Im Gegensatz dazu bezeichnet man als Vaskulogenese die *de novo* Entstehung eines primären Gefäßnetzwerkes aus multipotenten, mesenchymalen Vorläuferzellen, auch Angioblasten genannt (Wagner et al., 1994). Die Vaskulogenese umfasst die Bildung der Endothel- und Blutzellen in den Blutinseln. Sie ist eng mit der Mesoderminduktion verbunden und bis vor kurzem nahm man an, dass sie mit der Bildung des primären Gefäßplexus abgeschlossen sei. Inzwischen gilt es gesichert, dass es eine postnatale Vaskulogenese beim Adulten gibt, bei der aus zirkulierenden (Gehling et al., 2000; Rafii et al., 2002; Asahara und Kawamoto, 2004) oder Gefäßwand-gebundenen endothelialen Vorläuferzellen (Zengin et al., 2006) neue Blutgefäße entstehen.

Es ist bekannt, dass Tumorzellen Angiogenesefaktoren sezernieren. Zu den am besten untersuchten angiogenetischen tumorassoziierten Wachstumsfaktoren gehören das

Vascular Endothelial Growth Factor-System (Klagsbrun und D'Amore, 1996; Achen und Stacker, 1998; Veikkola und Alitalo, 1999; Ferrara et al., 2003; Tammela et al., 2005), Placenta-like Growth Factor (PIGF), Fibroblast Growth Factor (FGF-1, -2), die Angiopoietine (Ang1 bis Ang4), Transforming Growth Factor-ß (TGF-ß), Transforming Growth Factor-α (TGF-α), Insulin-like Growth Factor (IGF-1 und IGF-2), Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor (SF/HGF). Darüber hinaus spielen Zelladhäsionsmoleküle wie CEACAM1 (CEA-related Cell Adhesion Molecule-1) (Ergun et al., 2000), Intercellular Adhesion Molecule (ICAM), Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM), Integrine und VE-Cadherin eine besondere Rolle in der Angiogenese – wie bei der Modulierung der Kapillarbildung und bei der Regulierung der Gefäßpermeabilität (Carmeliet et al., 1999).

Die Angiogenese wird getriggert durch verschiedene Parameter, insbesondere durch Herabsetzung des Sauerstoff-Partialdruckes und des pH-Wertes, sowie durch entzündliche Prozesse und genetische Mutationen, die entweder zu einer Aktivierung von Onkogenen und/oder zu einer Deletion von Tumor-Suppressorgenen (z.B. von Hippel Lindau) führen (Ferrara et al., 1996; Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Fukumura et al., 1998).

Die Regulation der Angiogenese erfolgt durch ein Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Molekülen (Hanahan und Folkman, 1996; Carmeliet, 2000a). Bei der Tumorneoangiogenese ist die Balance zwischen angiogenetischen Aktivatoren und Inhibitoren zugunsten der angiogenetischen Aktivatoren verschoben, was als „angiogenic switch" bezeichnet wird (Hanahan und Weinberg, 2000). Somit wird die Vaskularisierung von Tumoren in Gang gesetzt. Dies kann durch zwei Mechanismen erfolgen: einerseits durch eine erhöhte Expression von Angiogenese-aktivierenden Faktoren wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder anderseits durch Herabsetzung Angiogenese-inhibierender Faktoren wie Endostatin.

Auf einzelne für diese Arbeit relevante Angiogenese-Aktivatoren und –Inhibitoren soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

2.2 Angiogenese-Faktoren

2.2.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und VEGF-Rezeptoren

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) spielt eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese und ist ein essentieller Faktor bei der Modulation der Gefäßpermeabilität. VEGF wird als ein homodimeres N-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 46-48 kDa sezerniert. VEGF wurde 1989 als endotheliales Mitogen beziehungsweise als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) beschrieben (Ferrara und Henzel, 1989; Gospodarowicz et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass dieses von Tumorzellen sezerniertes Protein einen erheblichen Einfluss auf die Gefäßpermeabilität und Extravasation von Proteinen ausübt (Senger et al., 1993; Dvorak et al., 1995). Zudem steigert dieser Faktor spezifisch die Proliferation von Endothelzellen (Leung et al., 1989) sowie die Motilität, Migration und die Tubeformierung der Endothelzellen *in vitro* (Ferrara et al, 2003). VEGF ist strukturell verwandt mit dem Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und zum Placenta-like Growth Factor (PIGF) (Conn et al., 1990; Keck et al., 1989). Die VEGF-Familie besteht aus verschiedenen Subtypen (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D/VEGF-related Protein (VPR), VEGF-E, auch orf virus derived VEGF genannt, die sich funktionell und strukturell unterscheiden. Diese sind zusammen mit ihren Rezeptoren in Übersichtsarbeiten näher beschrieben (Lee et al., 1996; Orlandini et al., 1996; Olofsson et al., 1996; Joukov et al., 1996, Klagsbrun und D'Amore, 1996; Neufeld et al., 1999; Veikkola und Alitalo, 1999; Ferrara, 2000).

VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A, VEGF)

Durch genetische Rekombination (Exon-Splicing der m-RNA) von einem einzelnen VEGF-Gen, bestehend aus acht Exons, entstehen fünf verschiedene Isoformen von VEGF-A: $VEGF_{121}$, $VEGF_{145}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ und $VEGF_{206}$. (Tischer et al., 1991) (Im Weiteren wird VEGF synonym für VEGF-A verwendet). Diese Isoformen besitzen alle eine Heparinbindungsdomäne und unterscheiden sich in ihrer Bindungsfähigkeit an Heparin und Heparansulfat (Park et al., 1993; Cohen et al., 1995; Klagsbrun und D`Amore, 1996). Die Haupt-VEGF-mRNA-Isoformen sind 121, 165, 189 und werden von den meisten Zelltypen sezerniert. $VEGF_{121}$ und $VEGF_{165}$ kommen vorwiegend im menschlichen Gewebe vor. $VEGF_{189}$ kommt jedoch in den meisten VEGF-exprimierenden Zellen vor (Bacic et al., 1995). Die kleinste Isoform, $VEGF_{121}$, wird in löslicher Form sezerniert, wohingegen $VEGF_{189}$ und $VEGF_{206}$ an die extrazelluläre Matrix oder an die Zelloberfläche gebunden exprimiert werden. $VEGF_{165}$ kann sowohl in löslicher als auch in zellgebundener Form vorgefunden werden. Das menschliche VEGF-A-Gen ist in der chromosomalen Region 6p21.3 lokalisiert und kodiert. $VEGF_{145}$ kommt selten vor und ist assoziiert mit Tumoren des weiblichen Genitaltraktes (Poltorak et al., 1997).

Die Arbeitsgruppe von Brown und Breier konnte 1992 zeigen, dass im adulten Gewebe VEGF vorerst die Permeabilität reifer Endothelzellen in Blutgefäßen moduliert ohne eine Proliferation der Endothelzellen zu induzieren (Brown et al., 1992; Breier et al., 1992). VEGF besitzt eine 50000-fach stärkere Permeabilitäts-steigernde Wirkung als Histamin (Senger et al., 1990 und 1986). Die intradermale Injektion und auch die lokale VEGF-Applikation nach dem Milestest (Miles und Miles, 1952) führte rasch zu einer Erhöhung der Permeabilität der postkapillaren Venen, der Venulen und Kapillaren (Roberts und Palade, 1995). Diese Permeabilitätserhöhung von VEGF wurde sowohl durch sich öffnende interendotheliale Kontakte (Tight junctions) als auch durch

Induktion einer Fenestrierung des Venen- und Kapillarendothels vermittelt (Dvorak et al., 1995; Roberts und Palade, 1995; Ergun et al., 1997). Die Arbeitsgruppe von Dvorak et al. konnte 1996 zeigen, dass VEGF die Bildung so genannter vesiculo-vakuolärer Organellen induziert und dass in diesen Gefäßabschnitten auch die Endothelpermeabilität für Plasmaproteine erhöht ist.

VEGF wird hauptsächlich von Tumorzellen sezerniert und wirkt dann parakrin an den Endothelzellen Tumor-assoziierter Blutgefäße und führt so zu einer Proliferation und Migration der Endothelzellen (Connolly et al., 1989; Yoshida et al., 1996). Zudem wird die Apoptose der Endothelzellen gehemmt (Watanabe und Dvorak, 1997; Gerber et al., 1998; Gupta et al., 1999). Durch eskaliertes Tumorwachstum kommt es insbesondere im Tumorzentrum zu einer Hypoxie, welche wiederum durch Aktivierung der Faktoren HIF-1α/-2α/-3α (Hypoxia Inducible Factor) zur Hochregulierung von VEGF und somit zur Tumorneoangiogenese führt (Semenza, 2003; Pugh und Ratcliffe, 2003). Auch das kleine Molekül Stickstoffoxid (NO) kann die Expression von VEGF steigern und fördert dadurch die Vasodilatation und die Gefäßpermeabilität (Tuder et al., 1995; Chin et al., 1997; Murohara, 1998). Umgekehrt steigert VEGF als positives Feedback die Produktion von NO (Dembinskakiec et al., 1997).

Bei Knockout-Mäusen mit homozygotem VEGF kommt es zu Störungen der Blutgefäß-Formation (Vaskularisierung) und die Mäuse versterben am 8. bis zum 9. Embryonaltag. Bereits ein fehlendes VEGF-Allel führt bei den Mäusen zu Defekten der frühen Gefäßentwicklung und folglich zum Versterben zwischen dem 11. und 12. Embryonaltag (Ferrara et al., 2004). Diese Mäuse weisen schwere Herz- und Gefäßentwicklungsdefekte sowie zentrales Nervensystem (ZNS)- und Plazentaentwicklungsdefekte auf. Mäuse mit selektiver $VEGF_{164}$-Expression sind im Vergleich zu Mäusen mit jeweils nur $VEGF_{120}$- oder $VEGF_{188}$-Expression gesund (Stalmans et al., 2002).

VEGF ist bekannt dafür, dass es im braunen Fettgewebe reichlich exprimiert wird und seine Expression scheint im braunen Fettgewebe von Kälte-exponierten Ratten erhöht zu sein (Asano et al., 1997). In gezüchteten Adipozyten ist die VEGF Expression auch durch sympathische Stimuli hochreguliert, wie zum Beispiel durch Noradrenalin und β3-Adrenozeptor-Agonisten (Asano et al., 1997).

VEGF-B, -C, -D und -E

Zu den weiteren VEGF-Subtypen gehören VEGF-B, -C, -D und -E.

VEGF-B wird auch als VEGF-related Factor/VRF bezeichnet. VEGF-B bindet selektiv an VEGFR-1 und Neuropilin-1 (Nrp-1) und kann Heterodimere mit VEGF selbst bilden. VEGF-B bewirkt die Proliferation von Endothelzellen (Olofsson et al., 1996 und 1998).

Zwei Isoformen von VEGF-B sind bekannt: VEGF-B_{167} und VEGF-B_{186}. Überwiegend kommt VEGF-B_{167}-Form in der gestreiften Muskulatur, im Myokard und im braunen Fettgewebe vor (Salven et al., 1998). Dies weist auf eine Rolle dieses Faktors in der Vaskularisierung der Muskulatur oder des braunen Fettgewebes hin. Die Bedeutung von VEGF-B ist bisher nicht genau bekannt. VEGF-B Knockout-Mäuse überleben im Gegensatz zu VEGF Knockout-Mäusen und zeigen ein kleineres Herz, eine abnormale koronare Vaskularisierung und eine erniedrigte Toleranz für kardiale Ischämien (Bellomo et al., 2000).

VEGF-C und VEGF-D spielen eine wichtige Rolle in der Lymphangiogenese (Veikkola et al., 2001) und besitzen mitogene Wirkung auf Endothelzellen. VEGF-C ist ein Ligand für VEGFR-2 (KDR) und VEGFR-3 (Flt-4). Die Lymphendothelzellen exprimieren im adulten Gewebe vorwiegend VEGFR-3, durch deren Aktivierung VEGF-C die Lymphangiogenese beeinflusst (Pajusola et al., 1992; Kaipainen et al., 1995; Klagsburn und D'Amore, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* VEGF-C

über den Rezeptor KDR die Migration und Mitogenese von Endothelzellen stimuliert und *in vivo* die Gefäßpermeabilität steigern kann (Lee et al., 1996; Joukov et al., 1996 und 1998; Cao et al., 1998). VEGF-C-deletierte Mäuse bilden keine Lymphgefäßformationen und können daher nicht überleben (Karkkainen et al., 2004). VEGF-D wird im humanen Gewebe am meisten in der Lunge und der Haut während der Embryogenese vorgefunden (Farnebo et al., 1999). Die Bedeutung von VEGF-D während der Embryogenese ist jedoch bisher noch nicht bekannt. Die Arbeitsgruppe von Achen konnte 2001 anhand von Melanomzellen zeigen, dass VEGF-D an der Tumorangiogenese und der Lymphangiogenese mitwirkt (Achen et al., 2001). VEGF-D erhöht in experimentellen Tumoren das lymphatische Gefäßwachstum und die lymphatische Metastasierung von Tumoren (Stacker et al., 2001).

Bei einer Expression von VEGF-C oder VEGF-D in der Haut transgener Mäuse kommt es zu einer lymphatischen Hyperplasie, ohne einen Effekt auf die Blutgefäße auszuüben (Veikkola et al., 2001).

Das VEGF-E-Gen ist ein aus dem Orf Parapoxyvirus isoliertes Gen. VEGF-E ist ein Ligand nur für VEGFR-2 (KDR) und bindet nicht an VEGFR-1 (Flt-1) (Meyer et al., 1999; Wise et al., 1999). Die Arbeitsgruppe von Ogawa konnte 1998 zeigen, dass VEGF-E *in vivo* die Gefäßpermeabilität erhöht und mitogene Wirkung auf Endothelzellen besitzt (Ogawa et al., 1998).

VEGF-Rezeptoren: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3 (Flt-4), Neuropilin (Nrp) -1 und -2

Die spezifische Wirkung von VEGF wird durch die Interaktion von VEGF mit Oberflächenrezeptoren vermittelt, die zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören: VEGFR-1 (Fms-like Tyrosine-Kinase; Flt-1), VEGFR-2 [Fetal-Liver-Kinase der Maus (Flk-1), beim Menschen als Kinase insert Domain-containing Receptor

(KDR) bezeichnet] und VEGFR-3 (Flt-4) (De Vries et al., 1992; Quinn et al., 1993; Detmar et al., 1998; Errikson et al., 1999; Shay-Salit et al., 2002). Diese Tyrosin-Kinase-Rezeptoren besitzen sieben Immunglobulin-ähnliche Domänen in ihrem extrazellulären Anteil (De Vries et al., 1992; Veikkola und Alitalo, 1999).

VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR/Flk-1) werden vorwiegend von Blutgefäßendothelzellen exprimiert (Millauer et al., 1993; Quinn et al., 1993) und sind für die Differenzierung der Endothelzellen aus Hämangioblasten (Fong et al., 1995; Asahara und Kavamoto, 2004), für die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Barleon et al., 1996; Yoshida et al., 1996) und die anschließende Formierung endothelialer Gefäßrohre unverzichtbar. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass VEGF-Rezeptoren nicht nur auf Endothelzellen exprimiert werden, sondern auch in Monozyten (Barleon et al., 1996), in glatten Muskelzellen des Uterus (Brown et al., 1997), in Stromazellen von Hämangiomen (Hatva et al., 1996), in hämatopoetischen Zellen (Katoh et al., 1995), in Haarwurzelzellen (Lachgar et al., 1996), in Leydig- und Sertolizellen und in perivaskulären Zellen (Ergün et al., 1997) sowie in einigen Tumorzellen (Barleon et al., 1996; Herold-Mende et al., 1999a, 1999b) gefunden werden können.

Nach Bindung von VEGF an die VEGF-Rezeptoren kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und Autophosphorylierung, woraufhin zahlreiche Signaltransduktionsmoleküle aktiviert werden können (z.B. Phosopholipase C, Phosphatidylinositol-3-Kinase).

Die jeweiligen VEGF-Rezeptoren haben unterschiedliche Affinitäten zu VEGF. So besitzt VEGFR-1 die höchste Affinität zu VEGF-A, welcher aber zusätzlich auch an VEGFR-2 (KDR/Flk-1) binden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die KDR-vermittelte Endothelzellproliferation über VEGFR-1 antagonisiert wird und somit folglich die Blutgefäßbildung vermindert wird (Zeng et al., 2001; Kearney et al., 2002).

Bei der Angiogenese spielt VEGFR-2 als Hauptrezeptor beim Gefäßwachstum (Endothelzellproliferation) und der Gefäßpermeabilität mittels Zelloberflächen-Interaktion mit VEGF eine wesentliche Rolle. Diese Interaktion über VEGFR-2 steuert maßgeblich die angiogenen und mitogenen Effekte an Endothelzellen und unterliegt einer Autoregulation: An VEGFR-2 binden zusätzlich zu VEGF-A auch VEGF-C und VEGF-D, wodurch die Expression dieses Rezeptors hochreguliert wird (Shima et al., 1995; Stacker et al., 2001).

VEGFR-1- und VEGFR-2-Knockout-Mäuse sind nicht lebensfähig. Die VEGFR-1-Knockout-Mäuse weisen eine ungeordnete Endothelzellproliferation auf (Fong et al., 1995 und 1999). Die VEGFR-2-Knockout-Mäuse entwickeln defekte endotheliale Vorläuferzellen und somit keinen funktionierenden primären Gefäßplexus und eine defekte Hämatopoese (Shalaby et al., 1995). Mäuse, bei denen lediglich die Tyrosinkinasedomäne von VEGFR-1 fehlt, entwickeln hingegen normale Blutgefäße und sind daher lebensfähig (Hiratsuka et al., 1998).

Ferner interagiert auch VEGF mit Neuropilin-1 und -2, die als Ko-Rezeptoren für VEGFR-2 dienen und in der Regulation der Angiogenese mitwirken. Neuropilin-1 wurde erstmalig als Semaphorinrezeptor identifiziert und ist vorwiegend auf Endothelzelloberflächen lokalisiert. Für VEGFR-2 kann Neuropilin-1 (Nrp-1) als Ko-Rezeptor fungieren, indem es die Affinität von VEGF-A_{165} zu VEGFR-2 verstärkt und die Chemotaxis durch VEGF-A_{165} erhöht (Soker et al., 1998). Neuropilin-1 bindet an VEGF-A_{165}, auch an VEGF-B und PIGF-2, zeigt aber keine selbständige Signalfunktion und die Wirkung wird erst durch die zusätzliche Bindung an den Rezeptor VEGFR-2 verstärkt (Soker et al., 1998). Im Vergleich zu Neuropilin-1 bindet Neuropilin-2 an VEGF, VEGF-C und PIGF (Ferrara et al., 2003) und ist auch auf Lymphendothelzellen lokalisiert.

Über die Eigenschaften und Funktion des VEGFR-3 (auch Flt-4 genannt) gibt es erst seit Kurzem einige Erkenntnisse: Er hat ein Molekulargewicht von 180 kDa und wird vorwiegend von lymphatischen Endothelzellen exprimiert (Dvorak, 2002). Der VEGFR-3 scheint eine Rolle während der Entwicklung von Blut- und Lymphgefäßen sowie bei der Lymphangiogenese zu spielen und wird nicht in Arterien und Venen des adulten Organismus exprimiert (Pajusola et al., 1992; Dvorak et al., 1995; Kaipainen et al., 1995; Klagsbrun und D'Amore, 1996; Ferrara und Davis-Smyth, 1997). VEGFR-3 ähnelt sehr dem VEGFR-1 (Flt-1) und hat jedoch nicht den VEGF als Ligand sondern hauptsächlich den VEGF-C und VEGF-D (Galland et al. 1993; Pajusola et al., 1994).

2.2.2 Angiopoietine, Tie-1 und Tie-2

Angiopoietine gehören mit zu den wichtigen Angiogenesefaktoren. Angiopoietin-1 und -2 (Ang1 und Ang2) sind ca. 75 kDa große Proteine, die mit einer gewissen Sequenzhomologie sekretiert werden.

Angiopoietin-1 ist ein gefäßstabilisierender Faktor und fördert den Einbau von Perizyten und glatten Muskelzellen in die Gefäßwand. Im Gegensatz dazu wirkt Angiopoietin-2 als gefäßdestabilisierend, der mit VEGF zusammen die Angiogenese verstärkt (Thurston, 2003). Beide Angiopoietine haben keine Wirkung auf die Proliferation von Endothelzellen. In Tumoren wurde eine höhere Expression von Angiopoietin-2 im Gegensatz zu Angiopoietin-1 nachgewiesen (Tait und Jones, 2004).

Angiopoietin-1-Knockout-Mäuse versterben am Embryonaltag 12,5 mit vergleichbaren vaskulären Defekten wie Tie-2-Knockout-Mäuse (s.u.) (Suri et al., 1996, Hanahan, 1997). Bei Angiopoietin-2-defizienten-Mäusen zeigen sich nach der Geburt Ödeme, defekte Blut- und Lymphgefäße und defektes vaskuläres Remodeling, so dass diese Mäuse meist am 14. Tag postnatal versterben (Gale et al., 2002). Transgene Mäuse, die Ang-2 in Endothelzellen überexprimieren, starben auch während der Embryogenese mit

vergleichbaren vaskulären Defekten (Maisonpierre et al., 1997). Folglich scheint Ang2 eine besondere Rolle beim Gefäßremodeling und somit in der Angiogenese zu spielen.

Beide Angiopoietine binden mit vergleichbarer Affinität spezifisch an die extrazelluläre Domäne des Tie-2-Rezeptors, welche ein endothelspezifischer Tyrosinkinase-Rezeptor ist, und induzieren so die Signalkaskade durch Rezeptorphosphorylierung. Dabei interagiert Ang2 als Gegenspieler beziehungsweise als Antagonist mit dem Tie-2-Rezeptor und hemmt die Aktivierung der Signalkaskade durch Ang1 (Davis et al., 1996). Neben Tie-2 (auch Tek bei Mäusen genannt) gibt es den Tie-1-Rezeptor (auch Tie genannt). Beide Rezeptoren sind ausführlich in mehreren Übersichtsarbeiten beschrieben worden (Maisonpierre et al., 1993; Schnurch et al., 1993; Sato et al., 1995). Ferner wurden sie auch auf hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen (Yano et al., 1997).

Die Bedeutung des Tie-2-Rezeptors liegt in der Fähigkeit, die Endothelzellen zu kontrollieren, die Stromazellen (Perizyten und glatte Muskelzellen) zu rekrutieren, Endotheltubes und so die Gefäßstruktur zu stabilisieren und die Funktion der Blutgefäße zu modulieren (Hanahan, 1997). Die Arbeitsgruppen von Dumont und Sato konnten anhand von Knockout-Mäusen zeigen, dass Tie-2 für die Differenzierung von Endothelzellen und für die Integration von perivaskulären Zellen (Perizyten bei Kapillaren und glatte Muskelzellen bei größeren Muskelzellen) in die Gefäßwand unentbehrlich ist. Tie-2-Knockout-Mäuse starben bereits in der Embryogenese am Embryonaltag 9,5 - 10,5 mit vaskulären Defekten hinsichtlich der strukturellen Stabilisierung und des Remodeling von Blutgefäßen in große und kleine Blutgefäße (Dumont et al., 1994; Sato et al., 1995).

Tie-1-Knockout-Mäuse starben nach einer variablen Periode – vom Embryonaltag 14,5 bis zur Geburt - an Hämorrhagien und Ödemen und zeigten Atemschwierigkeiten.

2.2.3 Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule-1 (CEACAM1)

Zur Überführung der angiogenen Gefäßform in ein reifes, ruhendes und somit stabiles Gefäß ist eine Integration des primitiven Gefäßrohres in die umgebende Extrazellulärmatrix notwendig. Außer den Angiopoietinen, die zur Rekruitierung von peri-endothelialen Zellen notwendig sind, spielen insbesondere Zelladhäsionsmoleküle eine wesentliche Rolle. Hierbei spielt CEACAM1 - auch bekannt als BGP (Biliary Glycoprotein), CD66a und C-CAM (Cell-Cell Adhesion Molecule) – als ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie und der CEA-Antigen Familie eine sehr wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass CEACAM1 pro-angiogenetische Aktivitäten hat und durch VEGF hochreguliert wird (Ergun et al., 2000; Wagner und Ergun, 2000). Andererseits führt eine Hochregulation von CEACAM1 in Endothelzellen zu einer Überexpression von VEGF auf RNA- und Proteinebene (Kilic et al., 2005). Er wird in Endothelzellen neu formierter unreifer Blutgefäße und in neu gebildeten Gefäßen im Rahmen der pathologischen und physiologischen Angiogenese exprimiert (Ergun et al., 2000; Wagner und Ergun, 2000).

2.2.4 Angiogenese-Inhibitor Endostatin

Die Angiogenese wird durch ein Zusammenspiel der Aktivatoren und Inhibitoren balanciert. Die Liste der Angiogeneseinhibitoren nimmt ständig zu und es werden neue endogene Inhibitoren nachgewiesen. Zu den therapeutisch bisher hoffnungsvollsten endogenen Angiogeneseinhibitoren zählt auch das Endostatin. Es ist ein 20 kDa großes C-terminales Fragment des Kollagen-XVIII und wird durch proteolytische Spaltung freigesetzt, so dass dadurch erst die antiangiogenetische Wirkung ausgelöst wird. Endostatin hemmt die endotheliale Proliferation und Migration und folglich die Angiogenese. In Maus-Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass Endostatin das

Wachstum und die Metastasierung von Tumoren hemmt (O`Reilly et al., 1997). Knockout-Mäuse für Kollagen-XVIII mit Kollagen-XVIII/Endostatin-Defizienz zeigten eine deutliche Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Yu et al., 2004). Der genaue Wirkungsmechanismus ist bislang nicht ausreichend geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Endostatin über Stabilisierung der Gefäßwände neuformierter Blutgefäße zur Gefäßreifung führt und so zur Herabsetzung der Permeabilität der Blutgefäße und der angiogenetischen Aktvität beiträgt (Ergun et al., 2001). Andere Arbeitsgruppen konnten eine Interaktion von Endostatin mit VEGFR-2 (Kim et al., 2002), mit E-Selektin (Yu et al., 2004), ß-Catenin (Dixelius et al., 2003) und mit Zink (Boehm et al., 1998) nachweisen. Die Endostatintherapie am Menschen befindet sich zurzeit in den USA in klinischen Studien. Ergebnisse hierzu stehen noch aus.

2.3 Nerve Growth Factor (NGF)

Der Nerve Growth Factor (NGF) wurde von Levi-Montalcini et al. als ein neurotrophes Molekül beschrieben, welches die Entwicklung und das Überleben von neuronalen Zellen und die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen fördert (Levi-Montalcini und Angeletti, 1968; Thoenen und Barde, 1980; Levi-Montalcini, 1987). Das NGF-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert.

Bisher wurden zusätzlich zum NGF weitere NGF-ähnliche Faktoren identifiziert, die als Neurotrophine mit ihren spezifischen biologischen Wirkungen bei der Entstehung, Entwicklung und beim Überleben der Nervenfasern mitzuwirken scheinen: BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Leibrock et al., 1989), NT-3 (Neurotrophin-3), NT-4/5 (Neurotrophin-4/5) (Ebendal, 1992) und Neurotrophin-6 (Götz et al., 1994).

Der Faktor NGF ist einer der am besten charakterisiertesten trophischen Proteine, welches aus den verschiedenen Untereinheiten α, β und γ besteht. Die β-Untereinheit ist ein nicht-kovalentes Dimer mit zwei identischen 118 Aminosäuren langen Polypeptid-

Ketten und ist für die neurotrophe Signalfunktion verantwortlich (Thoenen und Barde, 1980; Chao, 1990). NGF kommt als Monomer und auch als Dimer vor. Das NGF-Dimer ist die wirksame Form. Die biologisch aktive Form von NGF wird durch stabile, nicht-kovalente Homo- oder Heterodimere gebildet, die in ihrer Funktionalität äquipotent sind (Schmelzer et al., 1992). Bei Reduktion der Disulfidbrücken ist keine Dimerisierung mehr möglich (Timm et al., 1992).

Ferner spielt NGF eine Rolle als multifaktorieller Mediator von neuroimmun-endokrinen Faktoren. Das Protein wird aus dem Gewebe sezerniert und trägt zur Innervation dieser Gewebe durch postganglionäre sympathische Nervenendigungen bei (Korsching, 1993). Die Wirkung von NGF scheint hauptsächlich über Stimulierung der Differenzierung neuer postganglionärer Zellen, durch Verhinderung der Apoptose und als chemotaktischer Faktor für wachsende Axone zu beruhen.

Zudem besitzt NGF die Fähigkeit, neurotrophe Funktionen auszuüben und vor Neurodegeneration, altersabhängiger Atrophie und vor metabolischen Schäden zu schützen (Semkowa et al., 1996). Es wurde beschrieben, dass NGF die sich in Entwicklung befindenden Neurone beeinflusst und somit auf diese Weise das Wachstum und die Differenzierung von Nervenzellen sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem ermöglicht. In der Embryogenese wachsen Axone aus den vielen angelegten Neuronen in die Zielgebiete, wo die Zellen zu 40-60% degenerieren. Um diese Vorgänge regulieren zu können, sind neurotrophe Faktoren wie NGF entscheidend. Er beeinflusst unter anderem auch die neuronale Plastizität, in dem er nach Erkrankung oder Trauma neuronale Schäden überwinden kann (Moccheti, 1991). Weiterhin sind die Neuronen auch im adulten Stadium von den Neurotrophinen abhängig. Eine Verringerung der neurotrophischen Wirkung auf die Neurone kann im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen zum neuronalen Zelltod führen.

Darüber hinaus besitzt NGF Auswirkungen auf nicht-neuronale Zellen (Scully und Otten 1995; Levi-Montalcini et al., 1996). So werden Zellen des Immunsystems durch NGF beeinflusst, wie zum Beispiel Monozyten, Mastzellen und Lymphozyten, z.B. verlängert der NGF die Lebensdauer von neutrophilen Granulozyten (Kitama et al., 1991).

Tierexperimentielle Untersuchungen zeigten, dass NGF eine bedeutende Rolle bei der Behandlung diabetischer Neuropathie, peripheren neuronalen Erkrankungen und bei neurodegenerativen Prozessen des Gehirns spielt (Hellweg et al., 1994; Rask, 1999).

Zudem konnte gezeigt werden, dass NGF kombiniert mit 6-Hydroxy-Dopamin Wachstum und Vaskularisierung von sympathischen Ganglien beeinflusst (Calza et al., 2001). Neben dieser Wachstum fördernden Fähigkeit (Ip und Yancopoulos, 1996) und indirekten pro- angiogenetischen Effekte in der Entwicklung des zentralen Nervensystems, wurde eine mitogene Aktivität an Endothelzellen beschrieben (Cantarella et al., 2002; Moser et al., 2004; Salis et al., 2004). Eine Erhöhung der sympathischen Aktivität (Output) durch exzessive NGF-Produktion induziert die Rekruitment-Prozesse des braunen Fettgewebes (BAT, Brown Adipose Tissue) (Geloen et al., 1992; Morrison et al., 2000). Dies ist ein Prozess, welches die Erhöhung der Gewebeperfusion erfordert (Tonello et al., 1999; Kikuchi-Utsumi et al., 2002). Spezifische Rezeptoren für NGF sind zum einen die hochaffine membranständige Tropomyosin-Rezeptorkinase-A (TrkA) und der niedrig-affine p75 Neutrotrophinrezeptor (Martin-Zanca et al., 1986).

Die Menge vom NGF-Protein, das durch neurogene Ziele (neural targets) gebildet wird, könnte eine Rolle in der Determinierung der Anzahl der innervierenden Fasern und der Rekruitierung von braunem Fettgewebe (BAT) spielen (Morrison et al., 2000; Festuccia et al., 2003). Die selektive Anpassung der Perfusion von braunem Fettgewebe für die thermogenetische Kontrolle deutet auf eine direkte Verbindung zwischen dem

sympathischen Nervensystem und der Angiogenese (Asano et al., 1997; Tonello et al., 1999), möglicherweise einer neurogen gesteuerten Angiogenese, hin (a neural driven angiogenesis).

2.4 Weißes und braunes Fettgewebe

Das Fettgewebe besteht aus Adipozyten mit einem Durchmesser bis zu ca. 100 µm und ist eine Sonderform des retikulären Bindegewebes. Die Fettzelle enthält wenige Mitochondrien und wird von einer Basalmembran umschlossen. Durch Verstärkung der Basalmembran mit Retikulinfasern wird auch die Form der Fettzelle bei der Entleerung unterstützt. Mehrere Fettzellen bilden Fettläppchen, die von einer Bindegewebskapsel umhüllt sind. In Form von Vakuolen speichern die Adipozyten intrazellulär Fett, wodurch die Zellkerne an den Zellrand verschoben werden und die Adipozyten eine Siegelringform einnehmen.

Je nach Alter beträgt der Fettanteil eines normalgewichtigen Mannes ca. 15-25%, einer normalgewichtigen Frau 20-35% (vom Gesamtgewicht). Das Fettgewebe hat verschiedene Funktionen: Es dient als Energiespeicher, zum Wärmeschutz und als mechanischer Schutz vor Stößen, welches bei Neugeborenen eine besondere Rolle spielt. Es dient dem Wasserhaushalt als Wasserspeicher im Fettgewebe. Nach Rückbildung des Thymus wird dieser durch Fettgewebe ersetzt. Dies findet auch in der weiblichen Brust nach Abschluss einer Stillphase statt. Nicht zuletzt ist das Fettgewebe bei der geschlechtsabhängigen Formierung des Körpers beteiligt. Man unterscheidet hinsichtlich Morphologie und Funktion zwei verschiedene Speicherformen des Fettgewebes, die univakuolären und multivakuolären Fettzellen. Die univakuolären Fettzellen bilden das weiße Fettgewebe, WAT (White Adipose Tissue), und kommen im ganzen Körper, ausgenommen von Penis, Skrotum, Augenlidern, und Ohrläppchen vor. Die weißen Fettzellen stammen vom Mesenchym ab und entstehen aus spindelförmigen

Vorläufern, den Lipoblasten. Die Lipoblasten enthalten viele kleine Fettvakuolen, die sich während der Reifung zu einer einzelnen zentral im Zytoplasma liegenden Fettvakuole vereinigen. Diese univakuoläre Fettzelle speichert Fett meist in Form von Neutralfetten (Triacylglyzeride = Ester des Glyzerins und der Fettsäuren).

Durch Speicherung energiereicher Ernährung in Form von Triglyzeriden kommt es zu einer Größenzunahme der Adipozyten und damit von weißem Fettgewebe (WAT). Fett liegt bei Körpertemperatur in flüssiger Form vor, so dass die Fettzellen verformbar sind. Das weiße Fettgewebe dient einerseits als Speicherfett, welches vor allem in den Mammae, im Omentum majus und im Unterhautbindegewebe vorkommt. Es ist leicht mobilisierbar und kann bei Energiemangel freigesetzt werden, ohne dass die Fettzellen dabei zerstört werden. Andererseits kommt es als Baufett im Bereich des Gesäßes, der Hohlhand, der Fußsohle, als Corpus adiposum orbitae in der Orbita, als Fettkörper in den Gelenken, als Corpus adiposum bucae als Wangenfettpfropf vor und dient nach der Rückbildung des Thymus und des Blut bildenden Knochenmarks in den Röhrenknochen als Gewebeersatz. Dieses Baufett ist schwer mobilisierbar. Zwischen der 27. Embryonalwoche und dem 2. Lebensjahr und auch vor der Pubertät entstehen erst neue Fettzellen, deren Neubildung durch Nahrungsüberangebot begünstigt wird. Somit kann eine Prädisposition für spätere Fettleibigkeit entstehen. Außerdem spielen bei der Neubildung Wachstumshormone, Insulin, Glukokortikoide und Trijodthyronin eine wichtige Rolle. Folglich wird sowohl die Speicherung als auch die Mobilisierung von Fett durch Hormone bestimmt. Insbesondere sind Insulin und Östrogene an der Speicherung und Noradrenalin, Adrenalin, Hypophysenvorderlappenhormone wie ACTH und TSH sowie das Schilddrüsenhormon Thyroxin an der Lipolyse beteiligt. Das weiße Fettgewebe wird durch das sympathische Nervensystem innerviert.

Das braune Fettgewebe (BAT) ist ein hoch spezialisiertes Gewebe, welches in Säugetier- Winterschläfern (mammalian hibernators) und auch in Neugeborenen vorhanden ist. Es produziert Wärme als Antwort auf Kälteexposition (non-shivering thermogenesis) oder nach dem Nahrungskonsum (Diät-induzierte Thermogenese). Daher ist das BAT ein wichtiger Ort für Energieverbrauch (Morrison et al., 2000). Thermogenese im braunen Fettgewebe (BAT) wird durch Norepinephrine aktiviert. Jede einzelne Zelle wird durch sympathische Nervenendigungen mit Norepinephrinen versorgt (Carneheim et al., 1984; Morrison et al., 2000; Kikuchi-Utsumi et al., 2002).

Das BAT wird durch multivakuoläre Fettzellen gebildet, welches nur vor der Geburt entsteht. Beim Neugeborenen dient es zur Wärmebildung und beim Erwachsenen ist es nur im Nackenbereich, im Schilddrüsen- und Nierenhilus-Bereich zu finden. Im Gegensatz zum weißen Fettgewebe ist das braune Fettgewebe vor allem bei Nagetieren leicht nachweisbar. Bei Mäusen und Ratten befindet sich der größte Anteil des braunen Fettgewebes interskapulär und hebt sich als rotbraunes Fettgewebe vom umgebenden weißen Fettgewebe mikroskopisch hervor (Hamann und Matthaei, 1995). Im Vergleich zum weißen Fettgewebe enthalten die etwa 30 µm großen braunen Adipozyten viele kleine Fettvakuolen und bilden Fettläppchen. Außerdem zeigen sich im braunen Fettgewebe eine starke Vaskularisation und eine stärkere nervale Versorgung. Diese stärkere noradrenerge Innervation ist entscheidend für die Funktion des Gewebes. Die Adipozyten stehen über Synapsen mit sympathischen Nervenfasern in Verbindung. Diese innervieren die Adipozyten und die Blutgefäße. Die braunen Adipozyten können in verschiedenen Phasen und in verschiedenen Spezies unterschiedliche Funktionen wie thermogenetische Aktivität und Morphologie ausüben. Dieses ist vor allem von der Innervation und Stimulation des Gewebes durch das sympathische Nervensystem abhängig. Die sympathische Innervation des Fettgewebes enthält sowohl Nervenfasern mit dem Neurotransmitter Noradrenalin als auch mit dem Neurotransmitter Neuropeptid

Y (Himms-Hagen, 1991). Nervenfasern mit dem Neurotransmitter Neuropeptid Y versorgen ausschließlich die Blutgefäße. Nervenfasern mit dem Neurotransmitter Noradrenalin jedoch versorgen die Adipozyten, die Blutgefäße und die arterio-venösen Anastomosen. Die sensorische Innervation des Fettgewebes beinhaltet Nervenfasern mit dem Transmitter „Calcitonin-Gene-related-Peptide“ (CGRP), die zu den Adipozyten und zu den Blutgefäßen führen, und auch Nervenfasern mit dem Transmitter Substanz P, die nur zu den Blutgefäßen führen.

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die Fettzellen nicht nur speichern, sondern eine Reihe von Hormonen und Proteinen bilden können: wie z.B. Leptin, Tissue Factor, TNFα (Tumor Necrosis Factor alpha), TGFß (Transforming Growth Factor-ß), PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1), Angiotensinogen, Lipoproteinlipase, Apolipoprotein E, Choleserintransferprotein, Komplementfaktor-D (Adipsin)/-C3/-B, Östrogene und Adiponectin (Ouchi et al., 1999).

Eine wesentliche Aufgabe des braunen Fettgewebes ist die Thermogenese, die durch den Reichtum an Mitochondrien ermöglicht wird. Die Thermogenese ist ein wichtiger Regulationsfaktor des Körpergewichtes und wird unter anderem von so genannten „uncoupling proteins“ reguliert. Für die Mitochondrien des braunen Fettgewebes ist das Transportprotein „Uncoupling Protein-1“ (UCP1) charakteristisch, welches sich mit einem Molekulargewicht von 32 kDa in der inneren Mitochondrienmembran befindet und in keinem anderen Gewebe außer dem braunen Fettgewebe vorkommt (Klaus et al., 1991).

Die Aktivierung der Thermogenese erfolgt durch das sympathische Nervensystem über $ß_3$-adrenerge Rezeptoren, die im braunen Fettgewebe die dominierenden Rezeptoren darstellen. Das Transportprotein „Uncoupling Protein-1“ (UCP1) koppelt ATP von der

mitochondrialen Atmungskette ab, so dass Energie in Wärme umgewandelt und vom Körper abgestrahlt werden kann. Für die charakteristische Farbe des braunen Fettgewebes sind die Zyotochrome der Mitochondrien verantwortlich.

Zu der Familie der „Uncoupling-Proteine“ (UCP) gehören neben UCP1 im Weiteren UCP2 (Fleury et al., 1997), UCP3 (Vidal-Puig et al., 1997), UCP4 und BMCP-1 (Brain Mitochondrial Carrier Protein-1) (Mikulova et al., 2001; Argiles et al., 2002). UCP2 wird in vielen Geweben/Organen exprimiert. UCP3 wird überwiegend im braunen Fettgewebe und im Skelettmuskel exprimiert. UCP4 und BMCP-1 wurden ausschließlich im Gehirn gefunden. UCP ist anerkannt als ein Schlüsselmolekül in der metabolischen Thermogenese wie Kälte- und Diät-induzierte Wärmeproduktion, welches eine signifikante Komponente des Energieverbrauches ist. Ihre Dysfunktion trägt zur Fettleibigkeit bei (Saito et al., 2001). Sie sind aufgrund ihrer Möglichkeit in der Therapie der Fettleibigkeit intensiv untersucht worden. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Regulation dieser Proteine gibt (Rodriguez und Palon, 2004).

Lowell konnte 1993 die Wichtigkeit des braunen Fettgewebes für den Energiestoffwechsel durch den Phänotyp transgener Mäuse (UCP/DTA-Mäuse) nachweisen (Lowell et al., 1993). Durch die gewebsspezifische Expression der A-Kette des Diphterie-Toxins (DTA) konnte unter Kontrolle regulatorischer Elemente des „Uncoupling Protein-1“ Gens das braune Fettgewebe soweit ausgeschaltet werden, dass es folglich zu einer verminderten Thermogenese und zu einer erhöhten metabolischen Effizienz führte. Bei den Tieren zeigte sich eine deutliche Adipositas mit Diabetes mellitus Typ-2 und Hyperlipoproteinämie (Hamann et al., 1995). Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass das braune Fettgewebe eine wesentliche Schutzfunktion gegenüber Adipositas bietet (Hamann et al., 1996). Daher sind besondere Merkmale dieser transgenen Mäuse die erhöhte Prädisposition für nahrungsinduzierte Adipositas, sowie

die Hyperleptinämie und die vollständige Resistenz gegenüber exogener Leptin-Zufuhr (Hamann et al., 1997). Die UCP/DTA-Maus stellt somit ein geeignetes Tiermodell für Untersuchungen im Rahmen der Adipositas dar.

Um eine Überexpression von NGF im braunen Fettgewebe zu erreichen, wurde NGF-cDNA unter der Kontrolle des Promoters für das Fettsäure-bindende Protein aP2 in das Genom transgener Mäuse in zwei verschiedenen Linien eingeschleust. Die transgenen Mäuse zeigten eine deutliche Überexpression von NGF, für Linie 1 (aP2/NGF-1) eine vierfache und für Linie 2 (aP2/NGF-2) eine zehnfache (Hamann et al., 1998) sowohl im weißen als auch im braunen Fettgewebe. Diese phänotypisch unauffälligen transgenen aP2/NGF Mäuse weisen morphologisch eine deutliche Zunahme der sympathischen Innervation und eine erhöhte Vaskularisierung des braunen und weißen Fettgewebes auf.

2.5 Arbeitshypothese und Fragestellung

Neben der Steuerung des Stoffwechsels im Fettgewebe durch vegetative Innervation spielt die Vaskularisierung des Fettgewebes eine zentrale Rolle. Die Vaskularisierung des Fettgewebes während der Embryogenese als auch ihre Anpassung an die Stoffwechselbedürfnisse im adulten Fettgewebe wird reguliert durch angiogenetische Faktoren, die oben ausführlich vorgestellt wurden. Insbesondere ist die Regulation der Gefäßpermeabilität in dieser Hinsicht von großer Bedeutung. Bisher ist jedoch der Zusammenhang zwischen den Faktoren der Angiogenese und den Nervenwachstum-steuernden Faktoren, wie NGF, nicht ausreichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit war daher, zu untersuchen, inwieweit eine Interaktion zwischen NGF und dem VEGF-System hinsichtlich der Vaskularisierung und der Durchblutungsregulation im weißen (WAT) und braunen (BAT) Fettgewebe vorliegt und wenn ja, über welche Mechanismen diese Interaktion stattfindet. Zu diesem Ziel wurden morphologische Analysen, immunhistochemische und proteinbiochemische Untersuchungen hinsichtlich der Expression von VEGF und seiner Rezeptoren (VEGFR-1 und VEGFR-2) an weißem und braunem Fettgewebe zweier transgener Mauslinien vorgenommen, die NGF vierfach (aP2/NGF-1) und zehnfach (aP2/NGF-2) überexprimieren. Der Grad der Vaskularisierung von Fettgewebe transgener und Wildtyp-Mäuse wurde anhand der Immunfärbung für CD31 und von-Willebrand Faktor untersucht. Außerdem wurde durch immunhistochemische Färbungen für das Neurofilament 200 das Ausmaß der Innervation im Fettgewebe der transgenen Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bestimmt.

3. Material und Methoden

3.1 Das Transgene Mausmodell

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei NGF-transgene Mauslinien verwendet, die von der Arbeitsgruppe Hamann et al. hergestellt worden waren (Hamann et al., 1998). Zur Herstellung der murinen NGF-cDNA für NGF-Überexpression wurde eine 5,4 kb DNA-Sequenz aus dem regulierenden Genabschnitt für das Fettsäure-bindende Protein aP2 als Promoter benutzt.

Hierzu wurde ein EcoRI-ApaI-Fragment mit einem ApaI-PstI-Fragment, die vorher präpariert waren, zusammengefügt und dieses Konstrukt enthielt die gesamte codierende Sequenz der murinen NGF-cDNA. An diese Sequenz wurde ein PstI-BamHI Fragment mit einer Spleißstelle und dem poly-A Teil aus dem „SV40 small antigen“ ligiert. Nach Aufreinigung des Transgens wurde das Transgen nach den Standardmethoden der *in vitro*-Fertilisation in die Pronuclei befruchteter Eizellen injiziert, die dann in den Uterus der pseudoschwangeren Mäuse implantiert wurden. Die transgenen und nicht-transgenen Mäuse wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an genomischer DNA identifiziert, die aus Schwanzbiopsaten von drei Wochen alten Tieren isoliert wurden.

Der Grad der NGF-Überexpression im braunen Fettgewebe (BAT) betrug für die Mauslinie 1 (aP2/NGF-1) vierfach und für die Mauslinie 2 (aP2/NGF-2) zehnfach. Als Kontrollgewebe dienten BAT von nicht-transgenen Mäusen. Phänotypisch zeigten die transgenen Mäuse im Vergleich zu nicht-transgenen Kontroll-Mäusen keine wesentlichen Unterschiede. Für die Quantifizierung der NGF-mRNA wurde die Densitometrie benutzt.

Die Mäuse wurden mit Standard-Nagetierfutter ernährt und Wasser ad libitum gegeben. Die Haltung der Mäuse fand im Tierstall des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bei 22 °C Temperatur statt. Die Haltung und die durchgeführten Untersuchungen an den Mäusen erfolgten gemäß den Bestimmungen der deutschen Tierschutzkommission.

3.2 Gewebeentnahme und –aufbereitung

Nach Einschläferung der Mäuse mittels Stickstoff erfolgte eine Inzision der Haut mit einem Skalpell. Die Entnahme des weißen Fettgewebes (WAT) erfolgte aus dem Leistenbereich und die des braunen Fettgewebes (BAT) aus dem interskapulären Bereich. Ein Teil des herauspräparierten Gewebes wurde unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und für weitere Untersuchungen (Proteinextraktion) bei -80° C gelagert. Der andere Teil wurde in Bouin`scher Lösung (siehe unten) fixiert und für spätere Verwendung für immunhistochemische Analysen in Paraffin eingebettet

Das entnommene weiße und braune Fettgewebe besaß unterschiedliche Volumina. Die Größe des braunen Fettgewebes war im Vergleich zum weißen Fettgewebe kleiner.

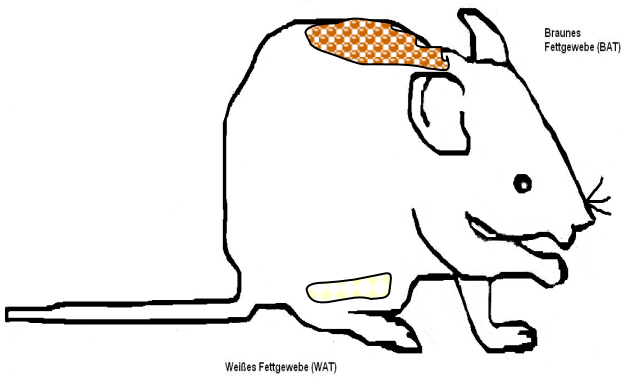

Abb. 1: Die Entnahme des braunen Fettgewebes (BAT) erfolgte aus dem interskapulären Bereich (braune Markierung) von aP2/NGF-transgenen und Wildtyp-Mäusen. Die Entnahme des weißen Fettgewebes (WAT) erfolgte aus dem Leistenbereich (helle Markierung).

3.3 Proteinextraktion für Western Blot-Analysen

Aus eingefrorenem Fettgewebe von NGF-transgenen und Wildtyp-Mäusen wurden Proteine wie folgt extrahiert: Das Gewebe wurde zunächst zerkleinert, mittels eines Polytron-Homogenisators bei maximaler Geschwindigkeit für 30 Sekunden in eiskaltem Lyse-Puffer [1% Triton, 10% Glycerol, 50 mM Hepes, pH 7,4, 2 mM Phenylmethlsulfonylfluorid, 150 nM Natrium-Pyrophosphat, 100 nm Natriumfluorid, 10 mM EDTA, 5 mM Natriumvanadat, Aprotinin (10 µg/ml) und Leupeptin (5 µg/ml)] homogenisiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mittels Bio-Rad-Lowry-Protein-Assay-Kit (Hercules, CA, USA) nach Lowry gemessen (Lowry et al., 1951).

Von allen Proben wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein (50 µg totale Proteinmenge) in Laemmli-Puffer aufgelöst und zur schnellen Denaturierung der Proteine für 5 Minuten gesiedet (Laemmli 1970). Die denaturierten Proteine wurden anschließend für Western Blot-Analysen verwendet.

3.4 Western Blot

Die weitere Auftrennung dieser denaturierten Proteine erfolgte im SDS-PAGE Gel bei 120 Volt (V). Für den Nachweis von VEGF wurde ein 12%-iges Gel und von den beiden Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 wurden 7,5%-ige Gele verwendet. Der anschließende Transfer erfolgte auf eine Polyvinylidiene-Fluorid (PVDF)-Membran (Immunobilon Millipore, Bedford, MA, USA) mittels eines BioRad-Transfersystems für 1,5 Stunden mit 350 mA.

Eine Ponceau-Färbung der Membran wurde durchgeführt, um den Protein-Transfer vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran zu kontrollieren. Die Membran wurde dann über Nacht in 5%-igem Blockingpuffer bei 4° C inkubiert. Danach wurde die Membran mit TBS/Tween für 3 x 15 Minuten gewaschen.

Anschließend wurde die Membran entweder mit einem polyklonalen VEGF-Antikörper oder mit den polyklonalen Antikörpern gegen VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 (alle von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) jeweils in einer Endverdünnung von 5 µg/ml für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an das erneute Waschen mit TBS/Tween für 3 x 15 Minuten wurde die PVDF-Membran für 1 Stunde mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper gegen Kaninchen IgG inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit 2 x 15 Minuten in TBS/Tween und 1 x 10 Minuten in TBS erfolgte die Entwicklung des Antigen-Antiköper-Komplexes mittels Chemolumineszenz-Verfahren mit dem ECL-Reagenz von Amersham (Amersham-Parmacia, Freiburg Deutschland) auf einem Fuji-RX Film (Fuji Photo Film, Tokio, Japan). Zur Quantifizierung des Proteinsignals wurde die Dichte der spezifischen Bänder mittels des Morphometric Programm Optimas™ (Optimas Seattle, WA, USA) gemessen.

3.5 Gewebefixierung und Paraffineinbettung

Fixierung der Gewebeproben in Bouin’scher Lösung

Nach Entnahme der Fettgewebeproben erfolgte die Fixierung in frisch angesetzter Bouin’scher Lösung bei Raumtemperatur für 24 Stunden.

Eine 100 ml Bouin’sche Lösung setzt sich zusammen aus:

-75 ml Pikrinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)

-15 ml Formaldehyd (37%-ig, Merck)

- 5 ml Eisessig (100%-ig, Riedel de Haen, Seelze, Deutschland)

Paraffineinbettung:

Nach Fixierung von Gewebeproben in Bouin'scher Lösung erfolgte ein dreitägiges Dehydratationsverfahren der Gewebestücke mittels aufsteigender Alkoholreihe. Zunächst wurden die Gewebestücke für 48 Stunden in 70%-igem Alkohol gelagert. Anschließend wurde eine automatische Entwässerung im Paraffinautomaten durchgeführt: Für zwei Stunden in 80%-igem Äthanol, für eine Stunde in 95%-igem und für 5 x 1 Stunde in 100%-igem Äthanol. Nach der Behandlung der Gewebeproben für 3 x 2 Stunden mit Methylbenzoat (Merck) wurden die Gewebestücke in flüssigem Paraffin/Histowax (Reichert und Jung, Wien, Österreich) für zunächst zwei, dann acht Stunden eingelegt, bevor sie in Paraffinblöcke gegossen wurden.

Objektträgerbeschichtung für die immunhistochemischen Analysen:

Zur besseren Haftung der Schnitte am Objektträger wurden diese mit einer Gelatine-Chromalaun-Mischung beschichtet. Zum Herstellen dieser Lösung wurden folgende Materialien verwendet:

- 500 mg Gelatinepulver (Merck)
- 50 mg Chromalaun (Kaliumchromsulfat, Merck)
- ad 100 ml Aqua dest.

Diese Mischung wurde zum Quellen gebracht und unter Rühren auf 50° C erwärmt. Staubfreie Objektträger wurden nach zweimaliger Filtration der Lösung in diese getaucht und dann für 24 Stunden in Trockenkästen bei Raumtemperatur aufgestellt.

Herstellung von Paraffinschnitten:

Die Herstellung der Dünnschnitte aus den Paraffinblöcken erfolgte an einem Schlittenmikrotom der Firma Zeiss (Jena, Deutschland). Für die Hämalaun-Eosin-Färbung wurden 5 µm dicke Schnitte auf unbeschichtete Objektträger und für die immunhistochemischen Untersuchungen 7 µm dicke Schnitte auf Gelatin-Chromalaun-beschichtete Objektträger angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte bei 40° C über Nacht getrocknet.

3.6 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde an jeweils 20 Schnitten vom braunen (BAT) und weißen Fettgewebe (WAT) von Wildtyp-Mäusen (n=5) und an jeweils 32 Schnitten von BAT und WAT von aP2/NGF-2-transgenen Mäusen (n=8) durchgeführt.

Von jedem Gewebeblock wurden jeweils die ersten 1-2 Schnitte mit Hämatoxylin/Eosin (HE) gefärbt, um die Gewebestruktur histologisch zu beurteilen und eine allgemeine Übersicht über die Gewebeareale zu erhalten.

Die weiteren Schnitte wurden der Immunhistochemie zugeführt. Die hier durchgeführte immunhistochemische Methode ist die von Davidoff und Schulze (Davidoff und Schulze, 1990) nach Zaborszky und Leranth (Zaborszky und Leranth, 1985) modifizierte Technik, die von Kilic und Ergün 2001 ausführlich beschrieben wurde (Kilic und Ergun, 2001). Diese modifizierte Methode besteht aus der Kombination Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) und Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) und anschließender Visualisierung der Peroxidasefärbung mittels Nickel-verstärkter Glukoseoxidase-Technik.

Vor Beginn der immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Paraffinschnitte in Xylolersatz (3 x 5 Minuten) und in absteigender Alkoholreihe (je 5 Minuten in 100%, 95%, 80%, 70% Äthanol und Aqua dest.) entparaffiniert beziehungsweise rehydriert.

Anschließend wurden die Schnitte in PBS für 15 Minuten gewaschen. Nach der Behandlung der Schnitte mit einem 2%-igem normalen Kaninchenserum für die monoklonalen Antikörper und Schweineserum (beide Seren von Sigma, Dako, USA) für die polyklonalen Antikörper für 30 Minuten wurden die Schnitte, ausgenommen die Negativkontrollen, mit dem zu untersuchenden primären Antikörper bei +4° C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Die Antikörper waren in PBS, BSA- und NaN_3 gelöst. Daher wurden die Kontrollschnitte (Negativkontrollen) nur mit dieser Lösung ohne primären Antikörper behandelt.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit dem passenden Biotin-gekoppelten sekundären Antikörper (anti-Maus Immunglobulin G (IgG) für die monoklonalen und anti-Kaninchen IgG für die polyklonalen primären Antikörper) für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach erneutem Waschen der Schnitte mit PBS für 3 x 10 Minuten wurden sie mit dem passenden PAP-Komplex (Maus-PAP für die monoklonalen und Kaninchen-PAP für die polyklonalen Antikörper) für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt und erneut mit PBS für 2 x 10 Minuten gewaschen.

Anschließend wurden die Schnitte mit dem ABC-Komplex, der etwa 30 Minuten vor der Benutzung angesetzt werden musste, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 2 x 10 Minuten mit PBS und für 10 Minuten mit PB gewaschen. Danach erfolgte die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität durch die Nickel-verstärkte Glukoseoxidase-Technik. Bei dieser sehr sensitiven Technik wurde die Entwicklung der spezifischen Immunfärbung unter dem Lichtmikroskop bis maximal 30 Minuten beobachtet und bei ausreichender Intensität gestoppt. Um die Residuen der Peroxidase-Aktivität zu entfernen, wurden die Schnitte für 3 x 5 Minuten mit PBS gespült und schließlich mit Kernechtrot gegengefärbt. Die Gegenfärbung mit Kernechtrot dient zur

Darstellung der Zellkerne, um das Gewebe besser im Hintergrund identifizieren zu können (Kernechtrot-Herstellung: 1000 ml Aqua dest. + 50 g Aluminium-Sulfat + 1 g. Kernechtrot heiß auflösen, nach Erkalten filtrieren).

Vor dem Eindeckeln der Schnitte auf dem Objektträger erfolgte das Dehydrieren der Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe (je 5 Minuten mit Aqua dest., 70%-, 80%-, 96%- und 2 x 100%-igem Äthanol) an die sich die Inkubation mit 3 x 5 Minuten in Xylol-Ersatz anschloss. Zum Schluss wurden die Schnitte unter Verwendung von Eukitt (Riedel de Haen, Seelze-Hannover, Deutschland) mit geeigneten Deckgläsern eingedeckelt.

Folgende primäre Antikörper wurden eingesetzt:

Zur Visualisierung der Blutgefäße im Fettgewebe wurde die Immunfärbung für den Nachweis des von Willebrand-Faktors mittels eines polyklonalen Antikörpers (DAKO, Hamburg, Deutschland) in einer Endverdünnung von 1:400 und eines monoklonalen Antikörpers gegen CD31 (DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland) in einer Endverdünnung von 1:100 durchgeführt.

Zur Lokalisation von VEGF und seiner Rezeptoren erfolgte die Immunfärbung mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern. Dabei wurde für die VEGF- und VEGFR-1-Antikörper (Flt-1) eine Endverdünnung von 1:200 und für den VEGFR-2-Antikörper (Flk-1) eine Endverdünnung von 1:100 eingesetzt. Alle drei Antiköper wurden käuflich erworben (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA).

Die Nervendichte wurde immunhistochemisch mittels eines Antikörpers gegen das Neurofilament 200 F (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer Endverdünnung von 1:200 untersucht.

Als immunhistochemische Kontrollen wurden folgende Verfahren durchgeführt:

1. Ersetzen des Primär- oder Sekundärantikörpers durch PBS,

2. Entwicklung der Peroxidase ohne vorherige Behandlung mit Antikörpern,

3. Inkubation der Gewebeschnitte mit normalem Kaninchen-Serum in Konzentrationen von 0,1% und 0,01% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) anstelle des Primärantikörpers.

3.7 Quantitative Evaluierung immunhistochemischer Daten

Die Blutgefäßdichte wurde unter dem Lichtmikroskop evaluiert. Die Anzahl der markierten Blutgefäße wurde per Blickfeld durch einen Leica Lichtmikroskop (Leica DMRB, Bensheim, Deutschland) gezählt.

Die Ermittlung der Nervendichte wurde auf zwei Wegen durchgeführt: Zum einen wurden die immunhistochemisch markierten Nervenfasern lichtmikroskopisch per Blickfeld gezählt, zum anderen wurden Nervenfaserbündel gezählt, die eng mit großen und mittelgroßen Blutgefäßen assoziiert waren. Die Anzahl der Nervenfaserbündel wurde in einem Bereich von insgesamt 50 Blutgefäßen gezählt. Dies wurde an braunem Fettgewebe NGF-transgener und Wildtyp-Mäuse durchgeführt, zueinander in Relation gesetzt und ihre Signifikanz berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Gefäßversorgung und Innervation des braunen (BAT) und weißen (WAT) Fettgewebes

Die Immunfärbung für den von Willebrand-Faktor ergab, dass die Blutgefäßdichte im BAT beider aP2/NGF-transgener Mauslinien (TG, n=8) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT, n=5) (Abb. 2 A, B) signifikant erhöht war. Gleiche Ergebnisse konnten durch die Immunfärbung für CD31 bestätigt werden (nicht gezeigt).

Im WAT NGF-transgener Mäuse konnte ebenfalls eine erhöhte Gefäßdichte beobachtet werden, die jedoch nicht so signifikant war wie im BAT (nicht gezeigt).

Die Immunfärbung für Neurofilament 200 an BAT zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Nervendichte der transgenen Mäuse (n=8) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (n=5) (Abb. 3 A, B). Im Gegensatz zu der absoluten Nervendichte war die Anzahl der Nervenbündel, die in Assoziation zu den Gefäßen standen, bei der lichtmikroskopischen quantitativen Evaluation im BAT der aP2/NGF-2 Mäuse im Vergleich zum BAT der Wildtyp-Mäuse um etwa 30% erhöht (Abb. 3 C, D).

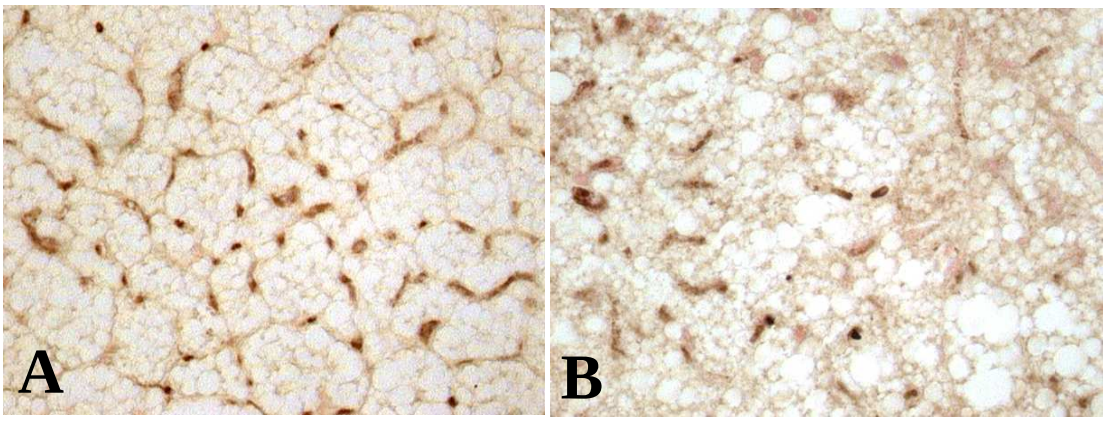

Abb. 2: **NGF-Effekt auf die Vaskularisierung des braunen Fettgewebes (BAT)**
Die Immunfärbung gegen den von Willebrand-Faktor zeigt eine signifikant höhere Gefäßdichte im BAT von aP2/NGF-2 (n=8) (Abb. 2 A) im Vergleich zum BAT von Wildtyp-Mäusen (WT) (n=5) (Abb. 2 B).
Die Schnitte sind mit Kernechtrot gegengefärbt (Vergrößerung: 200x).

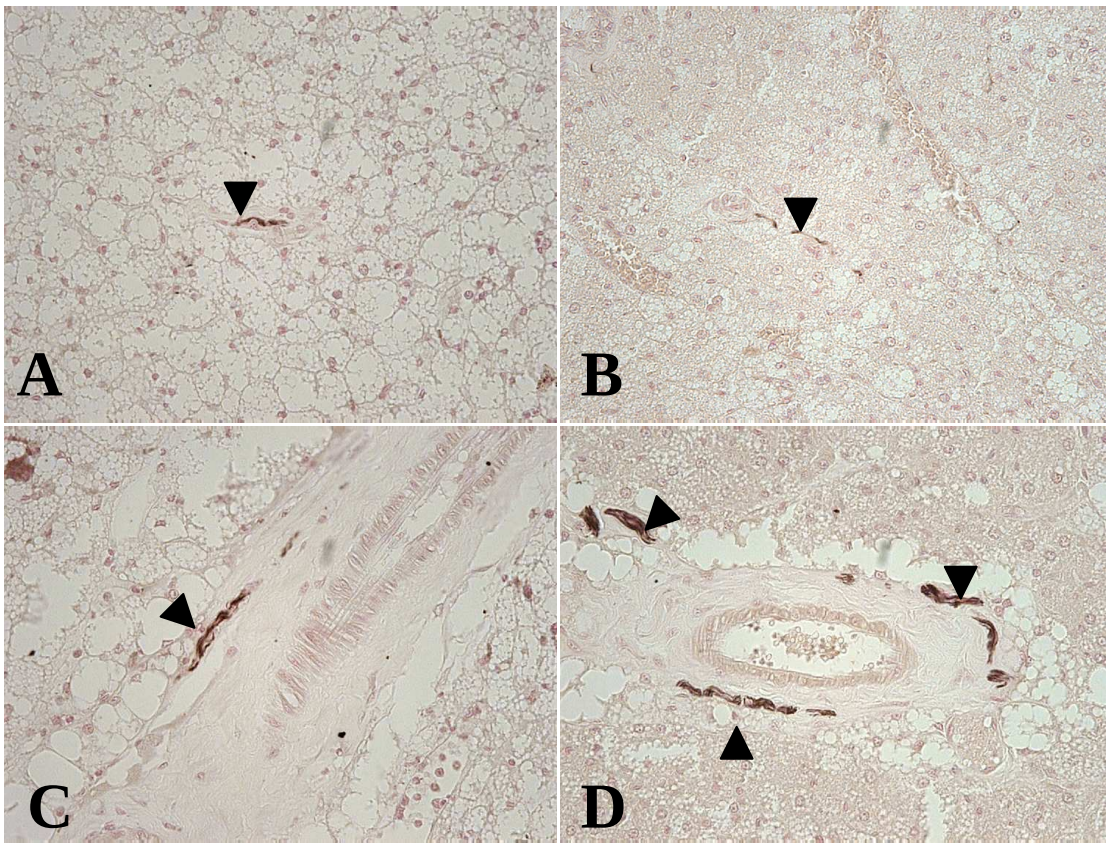

Abb. 3: **NGF-Effekt auf die Nervendichte im BAT**
Die Immunfärbung für Neurofilament (NF) 200 zeigt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Nervendichte zwischen Wildtyp (WT) (Abb. 3 A) und aP2/NGF-2 Mäusen (Abb. 3 B). Die dunkle Immunfärbung markiert die Neurofilamente in Nervenbündeln (Pfeilkopf). Im Gegensatz hierzu ist die Dichte der Nervenbündel, die mit den Blutgefäßen assoziiert sind, um ca. 30% bei aP2/NGF-2 Mäusen (n=8) (Abb. 3 D) im Vergleich zu WT-Mäusen erhöht (n=5) (Abb. 3 C). Alle Schnitte sind mit Kernechtrot gegengefärbt (Vergrößerung: 150x).

4.2 Immunhistochemische Darstellung von VEGF und seiner Rezeptoren im BAT und WAT

Immunhistochemische Analysen mittels des polyklonalen Antikörpers gegen den von Willebrand-Faktor (vWF) zeigten eine signifikant höhere Gefäßdichte im BAT und etwas weniger signifikant im WAT von NGF-transgenen Mäusen im Vergleich zum BAT (Abb. 2 A, B) und WAT von Wildtyp-Mäusen. Passend dazu ergaben die Immunfärbungen für VEGF und seinem Rezeptor VEGFR-2 (Flk-1) im BAT (Abb. 4 A, C) wie auch im WAT (nicht gezeigt) NGF-transgener Mäuse ebenfalls eine verstärkte Immunreaktion im Vergleich zu BAT (Abb. 4 B, D) und WAT der Wildtyp-Mäuse. Die Immunfärbung für den VEGFR-1 (Flt-1) ergab jedoch eine nur leicht stärkere Immunfärbung im BAT aP2/NGF-2 Mäuse (Abb. 4 E) im Vergleich zu

Wildtyp-Mäusen (Abb. 4 F). Im WAT der aP2/NGF-2-Mäuse war die Immunfärbung für den VEGFR-1 (Flt-1) nicht signifikant erhöht verglichen mit WAT der Wildtyp-Mäuse (nicht gezeigt).

Immunhistochemisch konnte VEGF vorwiegend in Fettzellen aber auch in glatten Muskelzellen und Endothelzellen großer Blutgefäße nachgewiesen werden (Abb. 4 A, B). Auch die Immunfärbung für VEGFR-2 war insbesondere in einigen glatten Muskelzellen großer Blutgefäße sowie in kleinen Blutgefäßen im Fettgewebe verstärkt darstellbar (Abb. 4 C). Zudem waren auch einige Fettzellen positiv für den VEGFR-2 (Abb. 4 C). Die Immunfärbung im BAT der Wildtyp-Mäuse war insgesamt schwächer (Abb. 4 D). Im Gegensatz zu der Immunfärbung für VEGFR-2 war die Immunfärbung für VEGFR-1 im BAT NGF-transgener Mäuse nicht signifikant erhöht (Abb. 4 E), aber dennoch leicht positiv im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 4 F). Die entsprechenden Kontrollen zeigten keine spezifische Immunfärbung (Abb. 4 G, H). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Fettzellen die wichtigste Quelle für die VEGF-Produktion sein könnten.

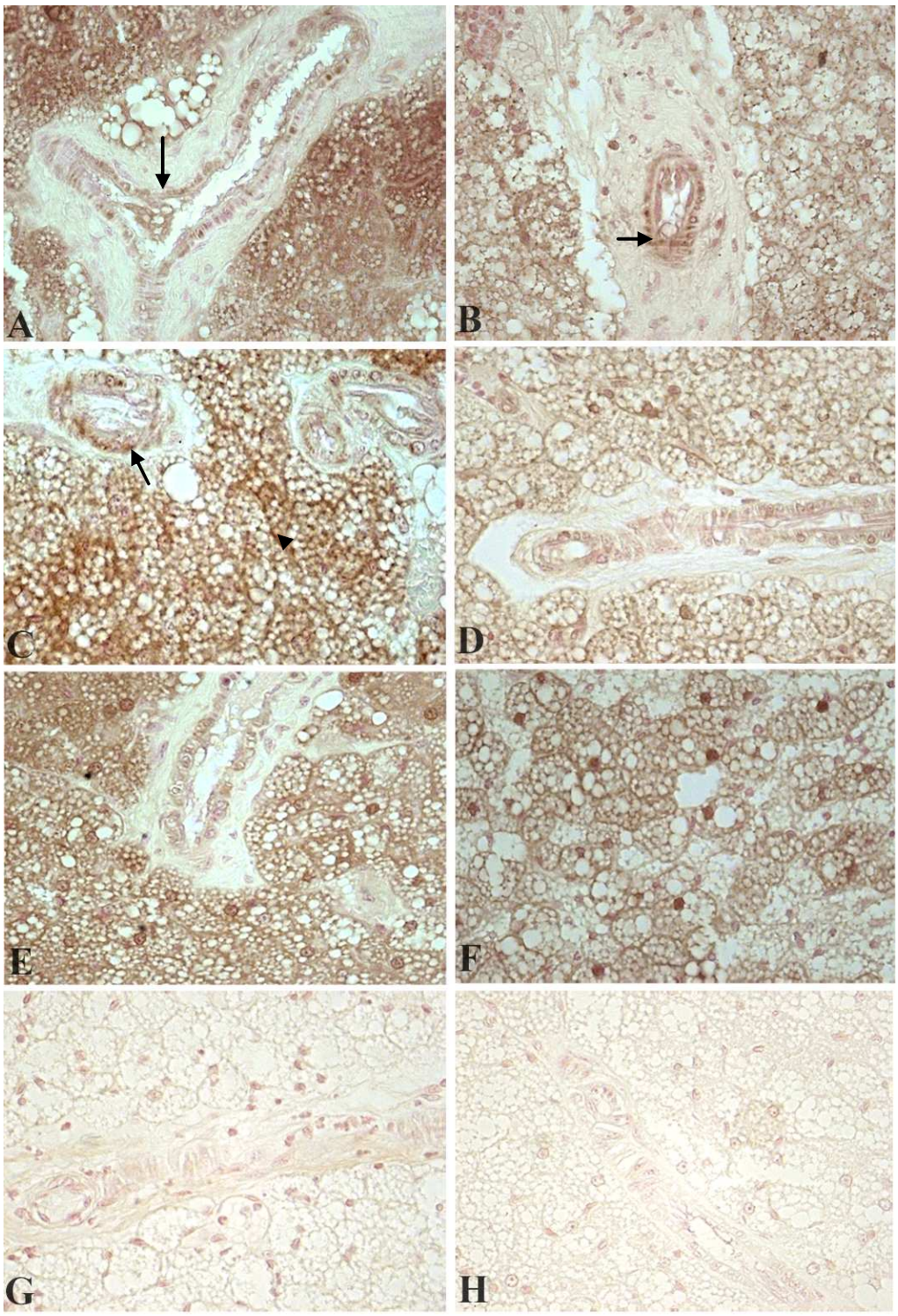

Abb. 4: **NGF-Effekt auf VEGF und seine Rezeptoren im BAT mittels Immunhistochemie**
Immunhistochemie an Paraffinschnitten vom BAT NGF-transgener Mäuse (Abb. 4 A) zeigt eine signifikant stärkere Immunreaktion für VEGF im Vergleich zum BAT von Wildtyp-Mäusen (Abb. 4 B). Auch im Gefäßendothel und in glatten Muskelzellen großer Blutgefäße ist eine positive VEGF-Immunreaktion zu finden (Pfeile, Abb. 4 A, B). Ebenso ist für den VEGFR-2 (Flk-1) eine verstärkte Immunfärbung in BAT NGF-transgener Mäuse (Abb. 4 C) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 4 D) zu finden. Dabei ist die spezifische Immunfärbung hauptsächlich in kleinen Gefäßen (Pfeilkopf) lokalisiert, jedoch exprimieren auch die glatten Muskelzellen und die Endothelzellen großer Blutgefäße den VEGFR-2 (Pfeil, Abb. 4 C). Ähnliches Immunreaktionsmuster ergibt sich für VEGFR-1 im BAT, das jedoch nicht so prägnant ist wie das für VEGF und VEGFR-2 (Abb. 4 E, F). Die entsprechenden Kontrollen zeigen keine spezifischen Immunfärbungen (Abb. 4 G, H). Die Immunhistochemie wurde nach der Nickel-verstärkten Glukose-Oxidase-Technik durchgeführt. Alle Schnitte sind mit Kernechtrot gegengefärbt (Vergrößerung: 150x).

4.3 NGF beeinflusst die Expression von VEGF und seiner Rezeptoren im BAT und WAT auf Proteinebene

Entsprechend den immunhistochemischen Ergebnissen zeigten sich in den Western Blot-Analysen erhöhte Proteinmengen für den VEGF sowohl in Dimer- (46 kDa) als auch Monomerform (22 kDa) im BAT von aP2/NGF-transgenen Mäusen im Vergleich zum BAT der Wildtyp-Mäuse (Abb. 5 A). Die dimere VEGF-Form kam trotz der Verwendung reduzierter Bedingungen im Western Blot zustande.

Auch der Proteinlevel für den VEGFR-2 war signifikant erhöht im BAT der aP2/NGF-Mäuse im Vergleich zum BAT der Wildtyp-Mäuse (Abb. 5 B). Ebenso war die Proteinmenge für den VEGFR-1 im BAT der aP2/NGF-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen erhöht (Abb. 5 C). Insbesondere war die Proteinmenge des VEGFR-1 bei 160 kDa deutlich erhöht, wohingegen die lösliche Form des VEGFR-1, erkennbar bei 110 kDa, signifikant reduziert war (Abb. 5 C).

Im weißen Fettgewebe (WAT) von aP2/NGF-transgenen Mäusen zeigten sich wie im BAT im Vergleich zum WAT der Wildtyp-Mäuse (Abb. 6 A) in den Western Blot-Analysen eine signifikant erhöhte Proteinexpression für die dimere Form von VEGF bei 46 kDa. Passend zu den Ergebnissen für VEGF war auch die Proteinmenge für den VEGFR-2 signifikant erhöht im WAT der aP2/NGF-Mäuse im Vergleich zum WAT der Wildtyp-Mäuse (Abb. 6 C). Im Gegensatz zur Proteinmenge für VEGF und seinen VEGFR-2 war die Proteinmenge für den VEGFR-1 im WAT der aP2/NGF-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nicht signifikant erhöht (Abb. 6 B).

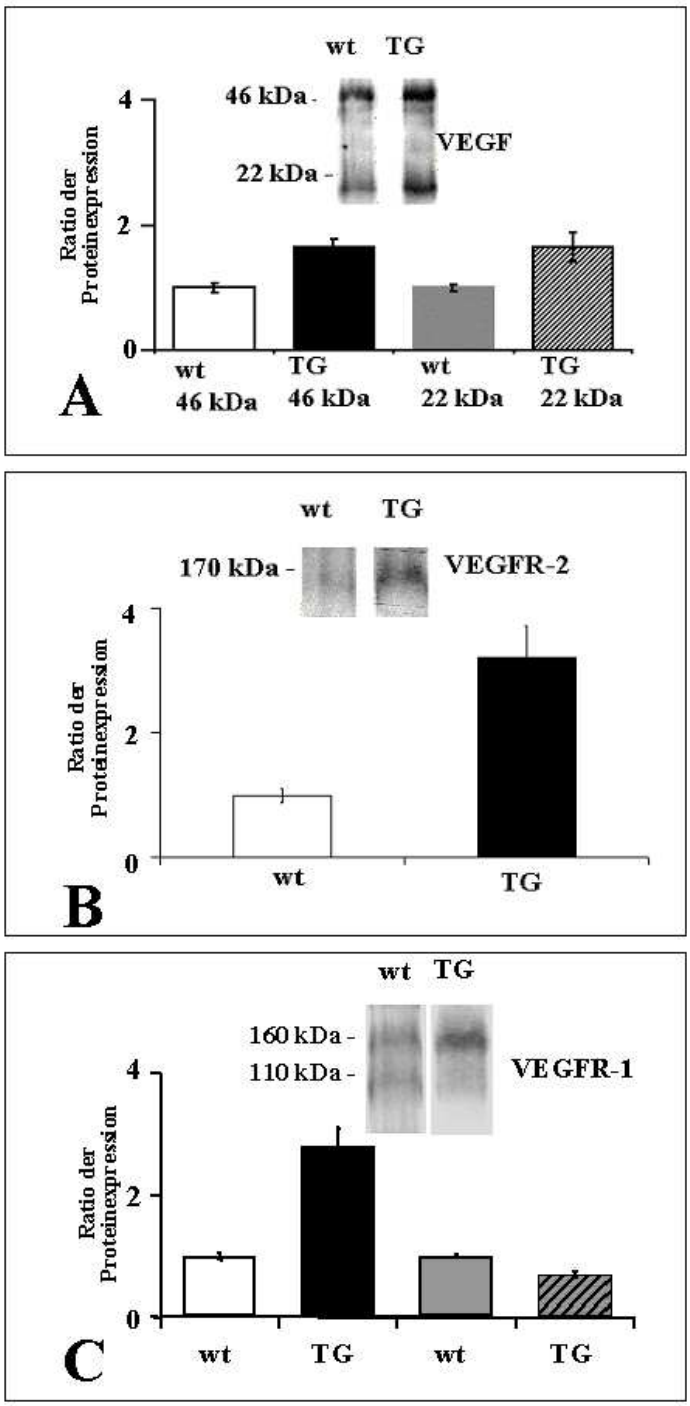

Abb. 5: **NGF-Effekt auf die Expression von VEGF und VEGF-Rezeptoren im BAT auf Proteinebene**
Western Blot-Untersuchungen zeigen eine signifikant erhöhte Expression für VEGF (Abb. 5 A), VEGFR-2 (Abb. 5 B) und VEGFR-1 (Abb. 5 C) im BAT transgener (aP2/NGF-2) Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.
Bemerkenswert ist, dass der VEGF-Proteinspiegel für beide Formen, also der dimeren Form bei 46 kDa und der monomeren Form bei 22 kDa signifikant erhöht ist, trotz reduzierter Bedingungen im Western Blot (Abb. 5 A).
Die Proteinmenge für den VEGFR-2 ist bei NGF-transgenen Mäusen deutlich höher als bei Wildtyp-Mäusen, was sich durch quantitative densitometrische Bestimmung klar bestätigen lässt (Abb. 5 B).
Hinsichtlich der Proteinexpression von VEGFR-1 findet sich eine signifikante Erhöhung für die dimere Form bei 160 kDa, jedoch eine signifikant niedrigere Proteinexpression für die lösliche Form von VEGFR-1 bei 110 kDa, die VEGF bindet und somit die Wirkung von VEGF neutralisiert (Abb. 5 C).
Die quantitative Evaluierung der Western Blot-Ergebnisse erfolgte durch densitometrische Bestimmung der Intensität spezifischer Banden mittels des morphometrischen Computerprogramms OptimasTM. Die mittleren Standardabweichungen sind in den Säulen als ±SEM gekennzeichnet und zum Vergleich wurden die Werte der transgenen Mäuse zu denen der Wildtyp-Mäuse in Relation gesetzt.

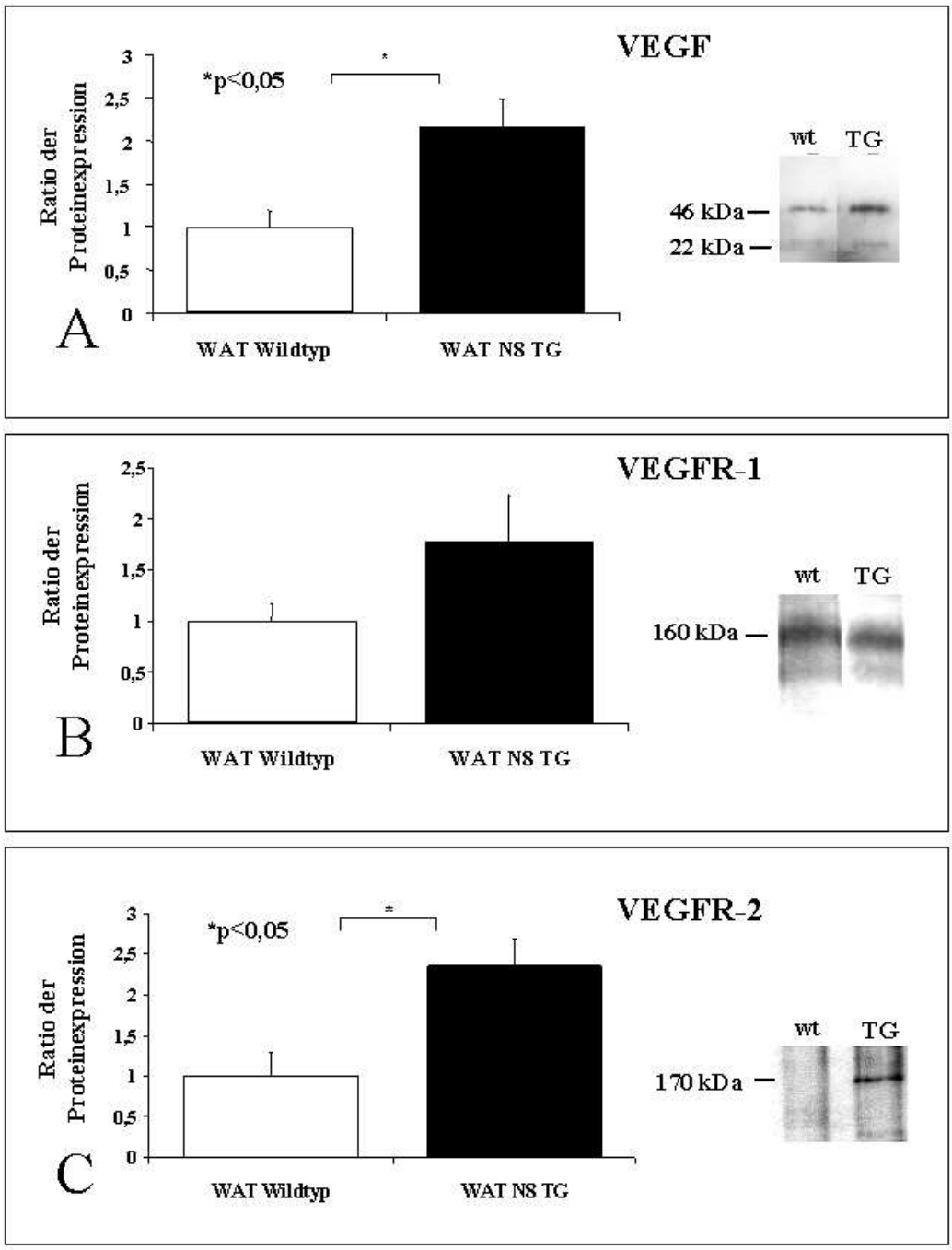

Abb. 6: **NGF-Effekt auf die Expression von VEGF und VEGF-Rezeptoren im WAT auf der Proteinebene**
Im WAT aP2/NGF-2-transgener Mäuse zeigt sich in den Western Blot-Analysen eine signifikant erhöhte Expression für VEGF für die 46 kDa-Form im Vergleich zu WAT von Wildtyp-Mäusen (Abb. 6 A). Die Proteinmenge von VEGFR-1 ist im WAT aP2/NGF-transgener Mäuse im Vergleich zu der im WAT von Wildtyp-Mäusen kaum verändert (Abb. 6 B).
Die Proteinmenge für den VEGFR-2 ist im WAT aP2/NGF-transgener Mäuse deutlich höher als in Wildtyp Mäusen (Abb. 6 C).

5. Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse ermöglichen neue Einblicke in die Mechanismen der neuronalen Kontrolle zur Organvaskularisierung und Organperfusion. Es zeigte sich, dass die Überexpression von NGF im BAT mittels NGF-transgener Mäuse die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 auf der mRNA- und Proteinebene konzentrationsabhängig steigert. Dies korreliert mit einer gesteigerten Vaskularisierung des braunen Fettgewebes, wie die immunhistochemischen Analysen hier belegen. Die auf der Basis dieser Analysen durchgeführten funktionellen Untersuchungen ergaben, dass erwartungsgemäß das durch NGF-Überexpression verstärkte VEGF-System seinerseits die Angiogenese aktiviert und somit die Gefäßparameter, wie Gefäßpermeabilität, Leukozyten-Endothel-Interaktionen und Gewebeperfusionsrate beeinflusst (Hansen-Algenstaedt et al., 2005).

Weitere Analysen unter Verwendung der braunen Fettgewebszellen der Zelllinie wie HIB 1B und der weißen Fettgewebszellen der Zelllinie 3T3L1, sowie der primären menschlichen Endothelzellen HDMECs *in vitro* zeigen, dass NGF die Adipozyten und Endothelzellen direkt stimuliert und sogar zu einer Proliferation beider Zellsorten führt. Ausgehend von der erhöhten VEGF-mRNA-Expression in HIB 1B Zellen nach Stimulierung mit NGF lässt sich vermuten, dass NGF dadurch die Gewebeperfusion zumindest teilweise über Aktivierung des VEGF-Systems im Fettgewebe reguliert.

Da bekanntermaßen NGF die Expression von VEGF im Nervengewebe erhöht (Calza et al., 2001) und angiogenetische Aktivatoren wiederum die Neurogenese beeinflussen (Santos et al., 1991), wurde ein Zusammenhang zwischen dem NGF- und dem VEGF-System angenommen. Diese Hypothese wurde ferner durch die Arbeiten von Cantarella (Cantarella et al., 2002) unterstützt, die eine erhöhte angiogenetische Aktivität in

humanen Endothelzellen der Vena umbilicalis (HUVEC) und in dem Chorionallantois-Membran-Assay (CAM) nach Zugabe von NGF demonstrieren konnten. Jedoch waren die durch NGF induzierten genauen molekularen und morphologischen Mechanismen an der Mikrovaskulatur des Fettgewebes und der Angiogenese bis zum Beginn der hier vorgelegten Dissertationsarbeit weitgehend unklar.

Mittels des hier benutzen transgenen Mausmodelle konnte ein wesentlicher Beitrag zur Erkenntnis der Interaktionen zwischen dem NGF- und VEGF-System hinsichtlich der Regulation der Angiogenese und der Mikrozirkulation geleistet werden. Hierbei konnten die Effekte von NGF an der Expression potenter angiogenetischer Wachstumsfaktoren quantitativ ermittelt werden. Quantitative Real-time-RT-PCR-Analysen ergaben deutlich höhere mRNA-Expressionswerte für VEGF, VEGFR-1 und -2 in aP2/NGF-2 Mäusen im Vergleich zu den aP2/NGF-1 Mäusen, deren NGF-Expression um das ca. 10-fache geringer ist. Da passend zu den erhöhten mRNA-Werten auch eine erhöhte Proteinmenge für VEGF, VEGFR-2 und für die membrangebundene Form von VEGFR-1 bei 160 kDa gefunden werden konnte, deuten diese Ergebnisse auf eine Erhöhung der Expression von VEGF und seinen Rezeptoren in Abhängigkeit von der Höhe der NGF-Expression hin. Da aber gleichzeitig die lösliche Form von VEGFR-1 bei 110 kDa, die durch das Binden des VEGF die freie Kapazität an VEGF und somit auch das pro-angiogenetische Signaling reduziert (Kendall und Thomas; 1993), unter NGF-Überexpression erheblich herabgesetzt war, ist zu vermuten, dass auch dadurch die pro-angiogenetische Aktivität von NGF verstärkt wird. Weiterhin belegen die vorgelegten Befunde, dass die angiogenetische Aktivität in aP2/NGF Mäusen hauptsächlich über den Rezeptor VEGFR-2 vermittelt wird. Ausgehend von diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die

Überexpression von NGF die Angiogenese im BAT zumindest teilweise über das VEGF- System steuert.

Um ferner herauszufinden, ob NGF das VEGF-System direkt aktiviert oder ob die erhöhte Expression von VEGF und den VEGF-Rezeptoren ein Resultat der erhöhten metabolischen Anforderungen im Fettgewebe ist, welche durch das sympathische Output (Asano et al., 1997; Festuccia et al., 2003; Tonello et al., 1999) in aP2/NGF Mäusen induziert wurde, wurden an Fettzellen des braunen Fettgewebes der Zelllinie von HIB 1B und vaskulären Endothelzellen (HDMEC) Stimulationsversuche mit NGF unter Kulturbedingungen durchgeführt. Wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Moser et al., 2004; Raychaudhuri et al., 2001; Salis et al., 2004) zeigte sich auch hier, dass die Stimulation mit NGF zu einer signifikanten Erhöhung der Proliferationsrate beider Zellsorten, HIB 1B und HDMEC, führte. Die erhöhte VEGF-mRNA Expression nach 3 und 12 Stunden konnte durch Präinkubationsversuche mit NGF-neutralisierenden Antikörpern aufgehoben werden. Diese Ergebnisse unterstützten die Annahme, dass NGF über eine direkte Aktion an den Adipozyten und den Endothelzellen agiert. Folglich ist zu vermuten, dass der NGF über zwei unterschiedliche Wege zu einer Steigerung der VEGF-Expression führt: direkte Wirkung an Adipozyten und Endothelzellen sowie indirekt über erhöhte sympathische Stimulation von braunem Fettgewebe (BAT).

Die im endothelialen Proliferations-Assay erhobenen Ergebnisse zeigen, dass die Proliferationsrate der Endothelzellen nach Stimulierung mit NGF signifikant erhöht ist. Dies deutet auf einen mitogenen Effekt von NGF an Endothelzellen hin. Die erhöhte Expression der VEGF-mRNA in Endothelzellen nach NGF-Stimulierung lässt vermuten, dass diese mitogenen Effekte von NGF an Endothelzellen indirekt über die gesteigerte Expression von VEGF erfolgen könnten, welches über einen autokrinen

Mechanismus an Endothelzellen wirksam werden kann. Übereinstimmend damit konnte Emanueli et al. (Emanueli et al., 2002) zeigen, dass *in vivo* die angiogenetische Aktivität von NGF durch Applikation von monoklonalem VEGF-Antikörper aufgehoben werden konnte. Diese Arbeiten weisen darauf hin, dass im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen (Cantarella et al., 2002; Kikuchi-Utsumi et al., 2002), die angiogenetische Fähigkeit *in vivo* zumindest partiell über Stimulierung des VEGF-Systems vermittelt wird. Ob NGF über diese indirekten Effekte hinaus tatsächlich direkt die mikrovaskulären Funktionen, wie Gefäßdichte und Permeabilität beeinflusst, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die im Zusammenhang mit den hier vorgelegten Befunden durchgeführten *in vivo* Analysen unter Anwendung der Intravital-Floureszenzmikroskopie anhand eines interskapulären und eines inguinalen Fensters (Algenstaedt et al., 2003; Hansen-Algenstaedt et al., 2000; Shay-Salit et al., 2002) belegen eindeutig, dass NGF-Überexpression mit der Beeinflussung der funktionellen Gefäßparameter, wie die Gerfäßpermeabilität, Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Gewebeperfusion einhergeht (Hansen-Algenstaedt et al., 2005). Dabei zeigte sich, dass die erhöhte Gefäßdichte bei gleichzeitig normalem Blutfluss in den einzelnen Gefäßen zur erhöhten Gewebeperfusionsrate im BAT der aP2/NGF-transgenen Mäusen führte, welche in den aP2/NGF-2 Mäusen besonders verstärkt war. Die Steigerung der Gewebeperfusion ist Voraussetzung für den bedarfsgerechten Aufbau des Gewebes und für die Anpassung an die erhöhten metabolischen Anforderungen. Ebenso erfordert eine erhöhte thermogenetische Aktivität vom braunen Fettgewebe (BAT) eine verstärkte Gewebeperfusion. Von einer erhöhten Gefäßdichte in Muskulatur nach chronischer Verabreichung von NGF wurde bereits früher berichtet (Emanueli et al., 2002). Zudem wurde mittels eines Laser-Doppler-Flussgeschwindigkeitsmessers in Beinen von

diabetischen Mäusen eine erhöhte postischämische Perfusion gemessen. Die Perfusion war sofort nach NGF-Applikation und sieben Tagen post-interventionell erhöht. Es blieb jedoch unklar, ob die erhöhte Perfusion aus einer Gefäßdilatation oder aus der hier gezeigten Steigerung der Gefäßdichte resultierte. Die hier vorgelegte Arbeit und die in diesem Zusammenhang in der Arbeitsgruppe von Dr. Hansen-Algenstaedt (Orthopädie, UKE) durchgeführten *in vivo* Analysen zeigen, dass die erhöhte Gewebeperfusion bei chronischer NGF-Überexpression durch die erhöhte Gefäßdichte bei unveränderter Gefäßperfusionsgeschwindigkeit der einzelnen Gefäße bedingt ist.

Hinsichtlich der Nervendichte im BAT von Wildtyp- und aP2/NGF-Mäusen konnte bezüglich des Gesamtgewebes kein Unterschied gefunden werden. Dieser Befund stimmt damit überein, dass auch der Expressionsspiegel von $trkA^{NGFR}$ in aP2/NGF Mäusen sich nicht veränderte, da bekanntermaßen die trkA-Rezeptoren hauptsächlich die Nervenaussprossung vermitteln, während $p75^{NTR}$ die Formierung von sympathischen `Bouton-like`-Strukturen moduliert (Lad et al., 2003). Daher könnte eine erhöhte NGF- und $p75^{NTR}$-Expression zu einer gesteigerten Sekretion von Norepinephrinen aus den sympathischen Nervenendigungen führen (Heumann et al., 1984; Roux und Barker, 2002). Es gibt jedoch auch Arbeiten, die eine Aktivierung der Angiogenese über Erhöhung der NGF- und trkA-Expression in Tumoren (Davidson et al., 2003), in NGF-stimulierten arteriellen Zellen (Manni et al., 2005) und während des Wundheilungsprozesses (Graiani et al., 2004) zeigen. Die erhöhte Nervendichte, die mit Gefäßen assoziiert ist, unterstützt die in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese, dass die NGF-vermittelte Regulation der Gewebeperfusion zum einen durch neuronale Kontrolle von Gefäßen zustande kommt und zum anderen durch die Interaktion zwischen den NGF- und VEGF-Systemen über Aktivierung der Angiogenese herbeigeführt wird.

Die mikrovaskuläre Permeabilität war im BAT NGF-transgener Mäuse signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtyp Mäusen, wobei zwischen den beiden transgenen Mauslinien kein weiterer signifikanter Unterschied gefunden werden konnte. Verglichen mit den übrigen mikrovaskulären Parametern weist dieser vernachlässigbar geringe Unterschied zwischen den Mauslinien aP2/NGF-1 und aP2/NGF-2 darauf hin, dass die effektive, mikrovaskuläre Permeabilität der am sensitivsten und als einer der initial beeinflussten Parameter ist bei erhöhtem VEGF-Level (Algenstaedt et al. 2003b).

Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass NGF das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und damit zusammenhängend die Leukozyten-Adhäsion an HDMECs *in vitro* erhöht (Raychaudhuri et al. 2001). Anhand der im Zusammenhang mit dieser Dissertationsarbeit durchgeführten *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von NGF die Leukozyten-Endothel-Interaktion abhängig von der Expressionshöhe von NGF erhöht, ohne lokale hämodynamische Veränderungen zu bewirken. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass NGF-Überexpression in BAT die Perfusionsgeschwindigkeitsrate in den einzelnen Blutgefäßen nicht wesentlich beeinflusst. Die gesteigerte Leukozyten-Endothel-Interaktion im Gefäßbett des BAT NGF-transgener Mäuse weist darauf hin, dass NGF-Überexpression mit einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen in mikrovaskulären Endothelzellen einhergehen könnte.

Zusammenfassend weisen die in dieser Arbeit vorgelegten Befunde daraufhin, dass Erhöhung des sympathischen Outputs durch exzessive NGF-Produktion in einer Aktivierung angiogenetischer Prozesse resultiert, die sowohl zu einer erhöhten Gefäßdichte im BAT führen als auch morphologische und funktionelle Gefäßparameter über das VEGF und VEGF-Rezeptorsystem, insbesondere über den VEGFR-2,

beeinflussen. Diese erstmaligen Befunde werden unser Verständnis nicht nur bezüglich der neuronalen Regulierung der Energielieferung aus dem Fettgewebe, sondern auch bezüglich der neuronalen Kontrolle der Angiogenese im Allgemeinen verbessern. Diese Beobachtungen könnten weiterhin helfen, die Mechanismen der Organperfusion und der damit verbundenen Stoffwechselaktivität, sowie der Organentwicklung besser zu verstehen.

6. Literaturverzeichnis

Achen MG and Stacker SA (1998) The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. Int J Exp Pathol 79:255-265

Achen MG, Williams RA, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PA, Lederman F, Roufail S and Stacker SA (2001) Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. J Pathol 193:147-154

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, Nguyen HV, Aiello LM, Ferrara N, King GL (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. N Engl J Med 331:1480-1487

Algenstaedt P, Schaefer C, Biermann T, Hamann A, Schwarzloh B, Greten H, Ruther W, Hansen-Algenstaedt N (2003) Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia. Diabetes 52:542-549

Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ (2002) The role of uncoupling proteins in pathophysiological states. Biochem and Biophys Res Comunications 293:1145-1152

Asahara T and Kavamoto A (2004) Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 287:C572-579

Asano A, Morimatsu M, Nikami H, Yoshida T, Saito M (1997) Adrenergic activation of vascular endothelial growth factor mRNA expression in rat brown adipose tissue: implication in cold-induced angiogenesis. Biochem J 328:179-183

Bacic M, Edwards NA, Merill MJ (1995) Differential expression of vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) forms in rat tissues – Short Communication. Growth Factors 12,11-15

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor Flt-1. Blood 87:3336-3343

Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK and Kay GF (2000) Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. Circ Res 86:E29-E35

Berkman RA, Merrill MJ, Reinhold WC, Monacci WT, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Ali IU, Oldfield EH (1993) Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. J Clin Invest 91:153-159

Bischoff J (1995) Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis, Trends in Cell Biol 5:69-73

Boehm T, O'Reilly MS, Keough K, Shiloach J shabpiro R, Folkman J (1998) Zinc-binding of endostatin is essential for its antiangiogenic activity. Biochem Biophys Res Commun 252:190-94

Breier G, Albrecht U, Sterrer S, and Rissau W (1992) Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. Developmenet 114:521-532

Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van De Water L, Senger D, Dvorak HF, Rosen S (1992) Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. Kidney Int 42:1457-1461

Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, Van De Water L (1992) Expression of vascular permeability factor (/vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. J Exp Med 176:1375-1379

Brown LF, Detmar M Tognazzi K, Abu-Jawdeh G, Iruela-Arispe ML (1997) Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. Lab Invest 76:245-255

Calza L, Giardino L, Giuliani A, Aloe L, Levi-Montalcini R (2001) Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactiv factors. Proc Natl Acad Sci USA 98:4160-4165

Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappala G, Pafumi C, Bernardini R (2002) Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. Faseb J 16:1307-1309

Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Erikkson A, Kumar V, Qi J-H, Claesson-Welsh L, Alitalo K (1998) Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis *in vivo.* Proc Natl Acad Sci USA 95:14389-1494

Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernolle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de GA, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, and Dejana E (1999) Targeted deficiency or cystosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. Cell 98:147-157

Carmeliet P (2000a) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med 6:389-395

Carneheim C, Nedergaard J, Cannon B (1984) Beta-adrenergic stimulation of lipoprotein lipase in rat brown adipose tissue during acclimation to cold. Am J Physiol 246:E327-E333

Chao MV (1990) Nerve growth factor. In Sporn MB, Roberts AB (Hrsg.). Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Springer Berlin, Heidelberg 95 (II):135-165

Chin K, Krashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H (1997) Induction of vascular endothelial growth by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. Oncogene 15:437-442

Cohen T, Gitay-Goren H, Sharon R, Shibuya M, Halaban R, Levi BZ, Neufeld G (1995) VEGFR121, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. J Biol Chem 270:11322-11326

Conn G, Sodermann DD, Schaeffer MT, Wile M, Hatscher HB, Thomas K (1990) Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line. Proc Natl Acad Sci USA 87:1323-1327

Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. J Clin Invest 84:1470-1478

Davidoff M, Schulze W (1990) Combination of the peroxidase anti-peroxidase (PAP)- and avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)-techniques: an amplification alternative in immunocytochemical staining. Histochemistry 93:531-36

Davidson B, Reich R, Lazarovici P, Nesland JM, Skrede M, Risberg B, Trope CG, Florenes VA (2003) Expression and activation of the nerve growth factor receptor TrkA in serous ovarian carcinoma. Clin Cancer Res 9:2248-2259

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD (1996) Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. Cell 87:1161-1169

Dembinskakiec A, Dulak J, Partyka L, Huk I, Mailnski T (1997) VEGF – nitric oxide reciprocal regulation. Nature Med 3:1177

Detmar M, Brown LF, Schon MP, Elicker BM, Velasco P, Richard L, Fukumura D, Monsky W, Claffey KP, Jain RK (1998) Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. J Invest Dermatol 111:1-6

Dixelius J, Cross MJ, Matsumoto T, Claesson-Welsh L (2003) Endostatin action and intracellular signalling: beta-catenin as a potential target? Cancer Lett 196:1-12

Dumont DJ, Gradwohl G, Fong G-H, Puri MC, Gerstenstein M, Auerbach A, Breitman ML (1994) Dominant negative and targeted null mutation in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. Genes Dev 8:1897-1909

Dvorak HF, Lawrence FB, Detmar M, Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor /vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. Am J Pathol 146:1029-1039

Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF (1996) The vesico-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extavasation. J Leukoc Biol 59(1):100-115

Dvorek 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 20:4368-4380

De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT (1992) The fms-tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. Science 255:989-991

Ebendal T (1992) Function and evolution in the NGF family and its receptors. J Neurosci Res 32:461-470

Emanueli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P (2002) Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. Circulation 106:2257-2262

Ergun S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK (1997) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in the normal human testicular tissue. Mol Cell Endocrinol 131:9-20

Ergun S, Kilic N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Gotze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagner C (2000) CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major growth effector of vascular endothelial growth factor. Mol. Cell 5:311-320

Ergun S, Kilic N, Wurmbach JH, Ebrahimnejad A, Fernando M, Sevinc S, Kilic E, Chalajour F, Fiedler W, Lauke H, Lamszus K, Hammerer P, Weil J, Herbst H, Folkman J (2001) Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes. Angiogenesis 4:193-206

Eriksson U, Alitalo K (1999) Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. Curr Top Microbiol Immunol 237:41-57

Farnebo F, Piehl F and Lagercrantz J (1999) Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung. Biochem Biophys Res Commun 257:891-894

Ferrara N, Henzel WJ (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor special for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 161:851-858

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 380:439-442

Ferrara N, Davis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. Endocrine Rev 18:4-25

Ferrara N (2000) Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. Recent Prog Horm Res 55:15-35; discussion 35-6. Review

Ferrara N, Gerber HP and LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 9:669-676

Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov 3:391-400

Festuccia WTL, Guerra-Sa R, Kawashita NH, Garofalo MAR, Evangelista EA, Rodrigues V, Kettelhut IC, Migliorini RH (2003) Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284:R1536-R1541

Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. Nat Genet 15:269-272

Fong GH, Rossant J, Gertenstein M, Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature 376:66-70

Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J (1999) Increased hemangioblast commitment , not vascular disorganization, is the primary defect in Flt-1 knock-out mice. Development 126(13):3015-3025

Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielson G, Taksir T, Jain RK, Seed B (1998) Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. Cell 94:715-725

Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, Mc Clain J, Marin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ and Yancopoulos GD (2002) Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. Dev Cell 3:411-423

Galland F, Karamysheva A, Pebusque M-J, et al., (1993) The Flt-4 gene encodes a transmembrane tyrosine kinase related to the vascular endothelial growth factor receptor. Oncogene 8:1233-1240

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, HOsfeld DK, Fiedler W (2000) In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. Blood 95:3106-12

Geloen A, Collet A, Bukowiecki L (1992) Role of sympathetic innervation in brown adipocyte proliferation. Am J Physiol 263:1176-1181

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N (1998) vascular endothelial growth factor induces expression oft the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem 273:13313-13316

Gospodarowicz D, Lau K (1989) Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. Biochem Biophys Res Commun 165(1):292-298

Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Schartl M, Thoenen H (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. Nature 372:266-269

Graiani G, Emanueli C, Desortes E, Van Linthout S, Pinna A, Figueroa CD, Manni L, Madeddu P (2004) Nerve growth factor promotes reparative angiogenesis and inhibits endothelial apoptosis in cutaneous wounds of Type 1 diabetic mice. Diabetologia 47:1047-1054

Gupta K, Kshirsagar S, Li W. Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, Law PY, Hebbel RP (1999) VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. Exp Cell Res 247:495-504

Hamann A, Matthaei S (1995) Braunes Fettgewebe und Adipositas. Diab Stoffw 4:321-326

Hamann A, Flier JS, Lowell BB (1996) Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity., diabetes, and hyperlipidemia. Endocrinology 137:21-29

Hamann A, Büsing B, Kausch C, Ertl J, Preibisch G, Greten H, Matthaei S (1997) Chronic leptin treatment does not prevent the development of obesity in transgenic mice with brown fat deficiency. Diabetologia 40:810-815

Hamann A, Cinti S, Giordano A, Morroni M, Flier J, Lowell B (1998) Overexpression of nerve growth factor (NGF) in adipose tissue of transgenic mice causes sympathetic hyperinnervation. Int J Obes 22 (Suppl. 3):33

Hamann A (1998) Genetik der Adipositas. Klinikarzt 27:214-220

Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 86:353-364

Hanahan D (1997) Signaling vascular morphogenesis and maintenance [comment]. Science 277:48-50

Hanahan D and Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. Cell 100:57-70

Hansen-Algenstaedt N, Stoll BR, Padera TP, Dolmans DE, Hicklin DJ, Fukumura D, Jain RK (2000) Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. Cancer Res 60:4556-4560

Hansen-Algenstaedt N, Joschek C, Schaefer C, Lamszus K, Wolfram L, Fiedler W, Ruther W (2005a) Long-term observation reveals time-course-dependent characteristics of tumour vascularisation. Eur J Cancer 41:1073-1085

Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C, Wolfram L, Joscheck C, Schroeder M, Algenstaedt P, Ruther W (2005b) Femur window-a new approach to microcirculation of living bone in situ. J Orthop Res 23:1073-1082

Hatva E, Jaaskelainen J, Hirvonen H, Alitalo K, Haltia M (1996) Tie endothelial cell-specific receptor tyrosine kinase is upregulated in the vasculature of arteriovenous malformations. J Neuropathol Exp Neurol 55:1124-1133

Hellweg R, Raivich G (1994) Nerve growth factor: pathophysiological and therapeutic implications. Pharmacopsychatry 27 Suppl 1:15-17

Herold-Mende C, Steiner HH, Andl T, Riede D, Buttler A, Reisser C, Fusenig NE, Mueller MM (1999 a) Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells. Lab Invest 79:1573-1582

Herold-Mende C, Andl T, Laemmler F, Reisser C, Mueller MM (1999 b) Functional expression of vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 on squamous cell carcinoma of the head and neck. HNO 47:706-711

Heumann R, Korsching S, Scott J, Thoenen H (1984) Relationship between levels of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. Embo J 3:3183-3189

Himms-Hagen J, Desautels M (1978) A mitochondrial defect in brown adipose tissue of the obese (ob/ob) mouse: reduced binding of purine nucleotides and a failure to respond to cold byan increase in binding. Biochem Biophys Res Commun 83:628-634

Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal developement and angiogenesis in mice. Proc Natl Acad Sci USA 95:9349-9354

Hobson B, Denekamp J (1984) Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continouous labelling studies. Br J Cancer 49:405-313

Ip NY, Yancopoulos GD (1996) The Neurotrophins and CNTF: Two Families of Collaborative Neurotrophic Factors. Annu Rev Neurosci 19:491-515

Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov DA, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C is a ligand for the Flt-4 (VEGFR-3) and KDR4 (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. EMBO J 15:290-298

Joukov V, Kumar V, Sorsa T, Arighi E, Weich H, Saksela O, Alitalo K (1998) A recombinant mutant vascular endothelial growth factor-C that has lost vascular endothelial growth factor receptor-2 binding, activation, and vascular permeability activities. J Biol Chem 273:6599-6692

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VWM, Fang G-H, Dumont D, Breitman M, Alitalo K (1995) Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during developement. Proc Natl Acad Sci USA 92:3566-3570

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. Nat Immunol 5:74-80

Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoitic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res 55:5687-5692

Kearney JB, Ambler CA, Monac K-A, Johnson N, Rapoport RG, Bautch VL, (2002) Vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 negatively regulates developmental blood vessel formation by modulating endothelial cell division. Blood 99(7):2397-2407

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science 246:1309-1312

Kendall RL, Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. Proc Natl Acad Sci USA 90:10705-10709

Kikuchi-Utsumi K, Gao B, Ohinata H, Hashimoto M, Yamamoto N, Kuroshima A (2002) Enhanced gene expression of endothelial nitric oxide synthase in brown adipose tissue during cold exposure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 282:R623-R626

Kilic N and Ergun S (2001) Methods to Evaluate the Formation and Stabilzation of Blood Vessels and Their Role in Tumor Growth and Metastasis. In Methods in Molecular Medicine: Metastasis Research Protocols, Cell Behavior In Vitro and In Vivo, S.A. Brooks and U. Schumacher, ed. (Totowa, NJ: Humana Press Inc), pp. 125-148

Kilic N, Oliveira-Ferrer L, Wurmbach JH, Loges S, Chalajour F, Vahid SN, Weil J, Fernando M, Ergun S (2005) Pro-angiogenic signaling by the endothelial presence of CEACAM1. J Biol Chem 280:2361-2369

Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS, Kwon YG (2002) Endostatin blocks VEGF-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1. J Biol Chem

Kitama H, Yoshida A, Ishioka C, Kusunoki T, Hosoi S, Mikawa H (1991) Nerve growth factor specifically induced human IgG4 production. Eur J Immunol 21 (1):137-141

Klagsbrun M, D`Amore PA (1996) Vascular endothelial growth factor and its receptors. Cytokine Growth Factor Rev 7:259-270

Klaus S, Casteilla L, Bouillaud F, Ricquier D (1991) The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier expcluively expressed in brown adipose tissue. Int J Biochem 23:791-801

Korsching S (1993) The neurotrophic factor concept: a reexamination. J Neurosci 13:2739-2748

Lachgar S, Charveron M, Gall Y, Plouet J, Bonafe JL (1996) Vascular endothelial cells: targets for studying the activity of hair follicle cell-produced VEGF. Cell Biol Toxicol 12:331-334

Lad SP, Peterson DA, Bradshaw RA, Neet KE (2003) Individual and combined effects of TrkA and p75NTR nerve growth factor (NGF) receptors: a role for the high affinity receptor site. J Biol Chem:M212270200

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680

Lee J, Gray A, Yuan J, Louth S-M, Avraham H, Wood W (1996) Vascular endothelial growth factor related protein: A ligand and spezific activator of the tyrosine kinase receptor Flt-4. Proc Natl Acad Sci USA 93:1988-1992

Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H und Barde YA (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. Nature 341:149-152

Levi-Montalcini R, Angeletti PU (1968) Nerve growth factor. Physiol Rev 48:534-569

Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor 35 years later. Science 237, 1154-1162

Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Petrelli L, Leon A (1996) Nerve growth factor: From neurotrophin to neurokine. Trends Neurosci 19:514-520

Leung DW, Carchianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246:1306-1309

Lowell BB, Susulic VS, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS (1993) Development of obesity in transgenic mice following the genetic ablation of brown adipose tissue. Nature 366:740-742

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-275

Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD, Gao G(1993) Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. Oncogene 8:1631-1637

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadapoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997) Angiopoeietin-2: a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. Science 2:55-60

Manni L, Antonelli A, Costa N, Aloe L (2005) Stress alters vascular-endothelial growth factor expression in rat arteries: Role of nerve growth factor. Basic Res Cardiol 100:121-130

Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. Nature 319:743-748

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C (1999) A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. EMBO J 18(2):363-374

Mikulova R, Hainer V (2001) Uncoupling proteins. Cas Lek Cesk 140(13):387-391

Miles AA, Miles EM (1952) Vascular reactions to histamine, histamin liberators, or leukotoxins in the skin of guinea pigs. J Physiol 118:228-257

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W and Ullrich A (1993) High affinity VEGF binding an development expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. Cell 72:835-846

Moccheti I (1991) Theoretical basis for a pharmacology of nerve growth factor biosynthesis. Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:303-328

Morrison SF, Ramamurthy S, Young JB (2000) Reduced rearing temperature augments responses in sympathetic outflow to brown adipose tissue. J Neurosci 20:9264-9271

Moser KV, Reindl M, Blasig I, Humpel C (2004) Brain capillary endothelial cells proliferate in response to NGF, express NGF receptors and secrete NGF after inflammation. Brain Res 1017:53-60

Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen DF, Sullivan A, Isner JM (1998) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. Circulation 97:99-107

Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M (1998) A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. J Biol Chem 273:31273-31282

Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, Von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, and Eriksson U (1996) Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 93:2576-2581

Olofsson B, Korpelainen E, Mandriota S, Pepper MS, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jetsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U (1998) Vascular endothelial growth factor (VEGF) B binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 95:11709-11714

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell 88:277-285

Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S (1996) Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. Proc Natl Acad Sci USA 93:11675-11680

Ouchi N, Kihara S, Arita Y et al. (1999) Novel modulator for endothelial adhaesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. Circulation 100:2473

Pajusola K, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K (1992) Flt-4 recptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. Cancer Res 52:5738-5743

Pajusola K, Aprelikova O, Pelicci G, Weich H, Claesson-Welch L, Alitalo K (1994) Signalling properties of Flt-4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors. Oncogene 9:3545-3555

Park JE, Keller GA, Ferrara N (1993) Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms – differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extra-cellular matrix-bound VEGF. Mol Biol Cell 4:1317-1326

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G (1997) VEGF145, a secreted vascular endothelial cell isoform, that binds to extracellular matrix. J Biol Chem 272:7151-7158

Pugh CW and Ratcliffe PJ (2003). Regulation of angiogensis by hypoxia: role of the HIF system. Nat. Med. 9:677-684

Qiunn TP, Peters KG, De VC, Ferrara N, Williams LT (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. Proc Natl Acad Sci USA 90:7533-7537

Rafii S, Lyden D, Beneztra R, Hattori K, Heissig B (2002) Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? Nat Rev Cancer 2:826-35

Rask CA (1999) Biological actions of nerve growth factor in the peripheral nervous system. Eur Neurol 41 (Suppl 1):14-19

Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP, Weltman H, Farber EM (2001) Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. Arch Dermatol Res 293:291-295

Roberts WG and Palade GE (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J Cell Sci 108 (Pt6):2369-2379

Rodríguez AM, Palon A (2004) Uncoupling proteins: gender dependence and their relation to body weight control. International Journal of Obesity 28:500-502

Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. Prog Neurobiol 67:203-233

Saito M, Ohashi A (2001) Mitochondrial uncoupling protein as a target of pharmacoterapy for obesity. Folia Pharmacologica Japonica 118:327-333

Salis MB, Graiani G, Desortes E, Caldwell RB, Madeddu P, Emanueli C (2004) Nerve growth factor supplementation reverses the impairment, induced by Type 1 diabetes, of hindlimb post-ischaemic recovery in mice. Diabetologia 47:1055-1063

Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, Von EG, Eriksson U, Alitalo K, and Joensuu H (1998) Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. Am J Pathol 153:103-108

Santos PM, Winterowd JG, Allen GG, Bothwell MA, Rubel EW (1991) Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration. Otolaryngol Head Neck Surg 105:12-25

Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. Nature 376:70-74

Schmelzer CH, Burton LE, Chan WP, Martin E, Gorman C, Canova-Davis E, Ling VT, Sliwkowski MB, McCray G, Briggs JA, **et al.,** (1992) Biochemical characterization of recombinant human nerve growth factor. J Neurochem 59(5):1675-1683

Schnurch H, Risau W (1993) Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. Development 119:957-968

Scully JL, Otten U (1995). NGF: Not just for neurons. Cell Biol Int 19:459-469

Semenza GL (2003) Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. Annu Rev Med 54:17-28

Semkowa I, Schilling M, Henrik-Noak P, Rami A, Krieglstein J (1996) Clenbuterol protects mouse cerebral cortex and rat hippocampus from ischemic damage and attenuates glutamate neurotoxicity in cultured hippocampal neurons by induction of NGF. Brain Res 717:44-54

Senger DR, Perruzzi CA, Feder J and Dvorak HF (1986) A highly conseved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. Cancer Res 46:5629-32

Senger DR, Connolly DT, Van de WL, Feder J and Dvorak HF (1990) Purification and NH2-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. Cancer Res 50:1774-1778

Senger DR, Van De Water L, Brown L, Nagy J, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman RW, Dvorak AM, Dvorak HF (1993) Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. Cancer Metastasis Rev 12:303-324

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. Nature 376:62-66

Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, Resnick N (2002) VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. PNAS 99:9462-9467

Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA (1995) Hyposic induction of vascular endohtelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. FEBS Lett 370:203-208

Soker S, Takshima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell 92:735-745

Stacker SA, Caesar C. Bladwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med 7:186-191

Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, Fujisawa H, Hermans B, Shani M, Jansen S, Hicklin D, Anderson DJ, Gardiner T, Hammes HP, Moons L, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P, DÀmore PA (2002) Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. J Clin Invest 109:327-336

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. Cell 87:1171-1180

Tait CR, Jones PF (2004) Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. J Pathol 204:1-10

Tammela T, Enholm B Alitalo K, Paavonen K (2005) The biology of vascular endohtelial growth factors. Cardiovasc Res 65:550-563

Thoenen H, Barde YA (1980) Physiology of nerve growth factor. Physiol Rev 60:1284-1335

Thurston G (2003) Role of angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. Cell Tissue Res 314:61-68

Timm DE, Neet KE (1992) Equilibrium denaturation studies of mouse beta-nerve growth factor. Protein Sci 1(2):236-244

Tischer E, Mitchel B, 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 266:11947-11954

Tonello C, Giordano A, Cozzi V, Cinti S, Stock MJ, Carruba MO, Nisoli E (1999) Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. FEBS Lett 442:167-172

Tuder R, Flook B, Voelkel NF (1995) Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia – modulation of gene expression by nitric oxide. J Clin Invest 95:1798-1807

Veikkola T, and Alitalo K (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. Semin Cancer Biol 9:211-220

Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K (2001) Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. EMBO J 20(6)1223-1231

Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB (1997) UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun 235:79-82

Wagner EF, Risau W (1994) Oncogenes in the study of endothelial cell growth and differentiation. Semin Cancer Biol 5:137-145

Wagener C, Ergun S (2000) Angiogenic Properties of the Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1. Exp Cell Res 261:19-24

Watanabe Y, Dvorak HF (1997) Vascular permeability facotr/vascular endothelial growth factor inhibitsanchorage-disruption-induced apoptosis in microvessel endothelial cells by inducing scaffold formation. Exp Cell Res 233:340-349

Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, Stacker SA (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. Proc Natl Acad Sci USA 96(6):3071-3076

Yano M, Iwama A, Nishio H, Suda J, Takada G, Suda T. (1997) Expression and function of murine receptor tyrosine kinases, TIE and TEK, in hematopoietic stem cells. Blood 89:4317-26

Yoshida A, Anand-Apte B, Zetter BR (1996) Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. Growth Factors 13:57-64

Yu Y, Moulton KS Khan MK, Vineberg S, Boye E, Davis VM, O'Donnell PE Bischoff J, Milstone DS (2004) E-selectin is required for the antiangiogenic activity of endostatin. Proc Natl Acad Sci USA 101:8005-8010

Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D (2001) Vascular Permeability Factor (VPF)/Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-1 Down-modulates VPF/VEGF Receptor-2-mediated Endothelial Cell Proliferation, but not Migration,

through Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Pathways. J Biol Chem 276(29):26969-26979

Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergün S (2006) Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. Development 133:1543-1551

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACTH	Adreno-Corticotropes Hormon
Ang1 und 2	Angiopoietin-1/-2
aP2	Fettsäure-bindendes Protein
BAT	Brown Adipose Tissue
BCG	Bacillus-Calmette-Guerin
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
BGP	Biliary Glycoprotein
BMCP-1	Brain Mitochondrial Carrier Protein-1
BSA	Bovine Serum Albumine
cAMP	cyclisches 3`,5`-Adenosinmonophosphat
C-CAM	Cell-Cell Adhesion Molecule
CD31	Cluster of Differentiation 31
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CEACAM1	Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule-1
CGRP	Calcitonin-Gene-related-Peptide
DTA	Diphterie-Toxin
ECL-Reagenz	Enhanced Chemilumineszenz-Reagenz
EZ	Endothelzellen
EZM	Extrazellulärmatrix
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
Flk-1 (KDR)	Fetal Liver Kinase-1 (Kinase-insert Domain Receptor)
Flt-1, -4	Fms-like Tyrosine kinase-1, -4
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
HE	Hämatoxylin/Eosin
HIF-1α, -2 α, -3 α	Hypoxia Inducible Factor-1α, -2 α, -3 α
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilo Dalton
KDR (Flk-1)	Kinase-insert Domain Receptor
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

KHK	Koronare Herzkrankheit
LEI	Leukozyten-Endothel Interaktion
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NaN3	Nickelsulfat
NF 200	Neurofilament 200
NGF	Nerve Growth Factor
Nrp-1/-2	Neuropilin-1/-2
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAP	Peroxidase Anti-Peroxidase
PB	Phosphate Buffer
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PIGF	Placenta-like Growth Factor
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PVDF	Polyvinylidiene-Fluorid
RNA	Ribonucleic Acid
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SMC	Smooth Muscle Cell
TBS	Tris Buffered Saline
Tie-1/-2	Tyrosine Kinase with Immunoglobulin and Epidermal Growth Factor Homology Domains-1/-2
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TNF-α	Tumor Nekrose Factor-alpha
Trk	Tropomyosin-related Kinase
TSH	Tyreoideastimulierendes Hormon, Thyreotropin
UCP-1	Uncoupling-Protein-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1, -2, -3	VEGF-Rezeptor-1 (Flt-1), -2 (KDR, Flk-1), -3 (Flt-4)
VPF	Vascular Permeability Factor
VRF	Vascular Endothelial Growth Factor-related Protein
WAT	White Adipose Tissue

8. Publikation

Hansen-Algenstaedt N, Algenstaedt P, Schaefer C, Hamann A, Wolfram L, Cingöz (Atlihan) G, Kilic N, Schwarzloh B, Schroeder M, Joscheck C, Wiesner L, Rüther W, Ergun S (2005) Neural driven angiogenesis by overexpression of nerve growth factor. Histochem Cell Biol 29:1-13

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Süleyman Ergün danke ich ganz besonders für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas, seine individuelle und hervorragende Betreuung, seine kritischen Anregungen und seinen Einsatz am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. A. F. Holstein und Frau Prof. Dr. med. G.M. Rune danke ich insbesondere dafür, dass ich die wissenschaftlichen Experimente im Rahmen dieser Dissertation in den Laboratorien des Anatomischen Institutes im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchführen durfte.

Frau Dr. med. P. Algenstaedt und Herrn Dr. med. N. Hansen-Algenstaedt danke ich sehr für die Bereitstellung des Fettgewebes, die mir diese Dissertation erst ermöglicht hat, und für ihre Unterstützungen und Anregungen bei den wissenschaftlichen Experimenten.

Ganz herzlich danke ich Frau Dr. med. N. Kilic für die kritischen Diskussionen, sowie bei allen medizinisch-technischen Assistentinnen des Anatomischen Institutes und der Medizinischen Klinik für ihre hervorragenden technischen Hilfestellungen.

Insbesondere möchte ich bei meiner Familie ganz herzlich für ihre motivierende und zeitliche Unterstützung bedanken. Ebenfalls bei meinem lieben Sohn, ohne dessen Verzicht auf gemeinsame Stunden, diese Arbeit nicht hätte intensiver angegangen werden können.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner lieben Freundin und Kollegin Sema Sevinc für die große Hilfe beim Layout bedanken.

Die Arbeit wurde unterstützt von dem Graduiertenkolleg 336 „molekulare Endokrinologie –molekularer Stoffwechsel“.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Atlıhan
Vorname:	Gülşen
Anschrift:	Conventstr. 11, 22089 Hamburg
Geburtsdatum/-ort:	30. Juli 1974, Bietigheim/Stuttgart
Familienstand:	ein Sohn, geb. 11.06.2001

Schulbildung

1981 - 1987	Grund- und Beobachtungsstufe Hinschenfelde, Hamburg
1987 - 1994	Emil-Krause Gymnasium, Hamburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/1994	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
02/1998	Ärztliche Vorprüfung
08/1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

10/2001 - 02/2002	Allgemeinchirurgie, Prof. Dr. J. R. Izbicki Herz- und Gefäßchirurgie, Prof. Dr. Dr. H. Reichenspurner
02/2002 - 06/2002	Innere Medizin, Prof. Dr. H. Greten Kardiologie, Prof. Dr. T. Meinertz
06/2002 - 09/2002	Gynäkologie, Prof. Dr. F. Jänicke

Studienbegleitende Tätigkeiten

1995 - 2000	Studentische Hilfskraft in den Abteilungen für Innere Medizin und Chirurgie im Marienkrankenhaus, Hamburg
05/2000 - 12/2000	Studentische Hilfskraft in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. R. Paus in der Hautklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Ärztliche Tätigkeit

05/2003 - 7/2003	Beginn Ärztin im Praktikum im Zentrum für operative Gynäkologie in der Tagesklinik Altonaer Straße, Hamburg
7/2003 - bis dato	Assistenzärztin in Weiterbildung in der I. Medizinischen Abteilung, Abteilung für Kardiologie, Allgemeines Krankenhaus Harburg, Hamburg

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den

Unterschrift: ……..