

Aus der Arbeitsgruppe
„Arteriogenesis and Collateral Targeting“
Leiter: Priv. Doz. Dr. Wulf Ito
Medizinische Klinik III, Angiologie und Kardiologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. Thomas Meinertz

**Entwicklung eines in vivo Modells zur Evaluation
der Funktion eines in Kollateralarterien
regulierten Antigens**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Sandra Traub, geb. Herzog
aus Pforzheim

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der
Universität Hamburg am: 26.06.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. W. Ito

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. R. Köster

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. F. Thais

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	5
1.1. Molekulare und zelluläre Mechanismen des Gefäßwachstums	5
1.2. Molekulare und zelluläre Mechanismen der Arteriogenese	8
1.3. Fragestellung	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. Tiermodell	13
2.1.1. Tierversuchsgenehmigungsnummer	13
2.1.2. Narkose	13
2.2. Pumpenimplantation	14
2.2.1. Pumpenfüllung	14
2.2.2 Operatives Vorgehen	15
2.3. Angiographien zur Gefäßdarstellung	17
2.3.1. Kontrastmittelzubereitung	17
2.3.2. Operatives Vorgehen	17
2.3.3. Angiographien als bildgebendes Verfahren	18
2.3.4. Stereoskopische Auswertung der Angiographien	19
2.3.5. Kollateralgrößenindexbestimmung sowie Kollaterallängenbestimmung unter Zuhilfenahme der NIH Image Software	19
2.4. Bestimmung des Proliferationsindex	20
2.4.1. Operatives Vorgehen	20
2.4.2. Entnahme histologischen Gewebes	20
2.4.3. Anfertigung histologischer Schnitte	21
2.4.4. Immunhistologische Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper	21
2.4.5. Auswertung der fluoreszenzmarkierten Schnittpräparate	22
2.5. Erstellung einer Wachstumskinetik	23
2.5.1. Operatives Vorgehen	23
2.5.2. Auswertung der erstellten Wachstumskinetik	23
2.6. Herstellung eines kollateralspezifischen Antikörpers	23
2.6.1. Vorarbeiten zur Immunisierung und Generierung eines kollateralspezifischen Antikörpers	24
2.6.2. Hybridomazellaufzucht	24
2.6.3. Isolation des kollateralspezifischen Antikörpers aus Hybridomazellüberstand	26

3. ERGEBNISSE	28
3.1. Entwicklung und Beschreibung des Rattenmodells	28
3.1.1. Post mortem Angiographien: Entstehung eines Kollateralgefäßes aus einer präexistierenden Anastomose.	28
3.1.2. Die Proliferation beschränkt sich auf die präexistierende arterielle Anastomose	36
3.1.3. Proliferationskinetik der Kollateralarterie	37
3.2. In vivo Auswirkung der Aktivierung eines Proteasom- und Fokal Adhesion assoziierten Antigens durch CTA 157-2 auf die Arteriogenese	42
3.2.1. Post mortem Angiographien nach 7-tägiger CTA 157-2 Injektion in die Femoralarterie der Ratte im Vergleich zur PBS Injektion	42
3.2.2. Proliferationsindexbestimmung nach 7-tägiger CTA 157-2 Injektion in die Femoralarterie im Vergleich zur 7-tägigen PBS Injektion	44
4. DISKUSSION	48
4.1. Entwicklung und Beschreibung des Rattenmodells	48
4.2. In vivo Auswirkung der Aktivierung des Proteasom- und Fokal Adhesion assoziierten Antigens	55
4.2.1. Ziel dieser Arbeit war es die funktionelle Relevanz des vom Antikörper gebundenen Antigens in dem zuvor entwickelten in vivo Modell zu untersuchen.	55
4.2.2. Parallel durchgeführte in vitro Untersuchungen zu der Wirkung des Antikörpers auf die Migration und Proliferation von Endothelzellen (in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt von N.Janson)	57
4.2.3. Identifikation eines Proteasom- und Fokal Adhesion assoziierten Antigens als Regulator des Kollateralwachstums	59
4.3. Ausblick	63
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATURVERZEICHNIS	67
DANKSAGUNG	72
LEBENS LAUF	73
ERKLÄRUNG	75

Abkürzungsverzeichnis

AMC	7-amino-4-methylcoumarin
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumine
ca	Circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CTA 157-2	Collateral Targeting Antibody 157-2
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
Gr	Größe
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
H ₂ O	Wasser
ICAM 1	Adhäsionsmolekül auf Zellen
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IE	Injektionseinheit
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
LLVY	Leucin-Leucin-Valin-Tyronin Peptid
M	Molar
MCP 1	Monocyte Chemotactic Protein 1
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NaHCO ₃	Natrium Hydrogen Carbonat
NIH	National Institute of Health
nm	Nanometer

PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PPD	1,2-Phenylenediamine
RHE A	Rat heart endothelial cells
rpm	Rounds per minute
Tie 2	Tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains 2
TNF- α	Tumor Necrose Factor- α
Tris	Tris (hydroxymethyl) Aminomethan
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit noch immer eine der Haupttodesursachen dar. Die zahlreichen invasiven kardiologischen Revaskularisationsverfahren, wie beispielsweise die Ballondilatation oder die Bypass Operation, haben entscheidend zur Senkung der Morbidität und der Mortalität der koronaren Herzerkrankung beigetragen. Da jedoch diese Therapieformen in ihrer Anwendung durch individuelle Faktoren, wie beispielsweise die linksventrikuläre Herzfunktion, die Anzahl der zur Verfügung stehenden anschlussfähigen Gefäße oder gar ihrer Erreichbarkeit, limitiert sind, ist es nicht verwunderlich, dass die Suche nach möglichen Alternativen große Aufmerksamkeit gefunden hat. Ziel ist das Erreichen einer „biologischen“ Revaskularisation durch die Verstärkung der Proliferation alternativer Gefäßverbindungen, und somit dem gezielten Nutzen körpereigener Bewältigungsstrategien.

Der menschliche Körper besitzt auch im Erwachsenenalter noch die bemerkenswerte Fähigkeit, bei Gefäßverschlüssen beziehungsweise drohenden Gefäßverschlüssen kompensatorisch eigene Umgehungskreisläufe zu bilden. Das bedeutet, es bleibt die Fähigkeit erhalten Gefäße neu zu bilden, was eine erhebliche klinische Relevanz in Bezug auf drohende Ischämie und Tumorgenese darstellt. Würde es gelingen, die daran beteiligten Prozesse in ihrer Kausalität vollständig zu verstehen, könnten Methoden entwickelt werden, die es ermöglichen würden die führenden Hauptursachen der menschlichen Mortalität zu verbessern oder gar zu beseitigen (Carmliet 2000).

Dabei ist es erforderlich zwischen den verschiedenen Arten des Gefäßwachstums zu unterscheiden.

1.1. Molekulare und zelluläre Mechanismen des Gefäßwachstums

Die *Vaskulogenese* stellt den initialen Schritt bei der Entstehung des Blutgefäßsystems dar. Sie findet schon in den frühen Phasen der

Embryonalentwicklung ihren Ursprung und ist somit der früheste morphogenetische Prozeß der Gefäßentstehung (Buschmann und Schapper 1999). Zuerst kommt es zur Differenzierung mesodermalen Vorläuferzellen in Hämangioblasten, die sich zu Blut-Insel ähnlichen Strukturen formieren und aus denen im nächsten Schritt ein primärer Kapillarplexus entsteht (Risau und Flamme 1995; Bussolino et al. 1997). Durch kapilläre Sprossung, der sogenannten Angiogenese, wächst dieser primäre Plexus und breitet sich im Zielgewebe aus. Zum Zeitpunkt der einsetzenden Zirkulation differenzieren sich die Gefäße dieses Plexus in Arterien, Venen oder verbleiben im bereits erreichten Kapillarzustand (Risau 1997). Der drastische Druckanstieg im arteriellen Schenkel scheint wesentlich für die Arterialisierung, also der Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen, verantwortlich zu sein.

Die *Angiogenese* stellt eine wesentliche Komponente bei zahlreichen physiologischen, wie auch pathologischen Vorgängen dar. Dabei ist beispielsweise an die Wundheilung, die Frakturheilung, die allmonatliche, menstruelle Follikelreifung und Ovulation der Frau oder an die Schwangerschaft zu denken (Buschmann und Schaper 1999). Jedoch den zahlreichen physiologischen Vorgängen ist die Beteiligung der Angiogenese an den unerwünschten pathologischen Mechanismen gegenüber zu stellen. Es kann durch die Gefäßneubildung zu einer langfristigen Verschlimmerung von Krankheiten, wie zum Beispiel der proliferativen Retinopathie oder der weitverbreiteten Arteriosklerose kommen. Schlimmstenfalls kann abhängig von der Angiogenese eine Aktivierung eines noch schlummernden Tumorleidens hervorgerufen werden.

Die Angiogenese beinhaltet ausgehend von bereits vorbestehenden Gefäßen, Endothelzellmigration und -proliferation, extrazelluläre Proteolyse, Endothelzellendifferenzierung sowie Gefäßwandveränderungen (Buschmann und Schaper 1999). Die durch Ischämie oder Gewebeverletzung verursachte Hypoxie führt dazu, dass lokal Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren freigesetzt werden, die ihrerseits wiederum eine Gefäßdilatation mit erhöhter Gefäßpermeabilität hervorrufen. Monozyten und Makrophagen wandern in das Entzündungsgebiet und sezernieren weitere

Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren (Arras und Ito et al. 1998). Daraus ergibt sich einerseits die Auflösung der umgebenden Matrix durch freigesetzte Metalloproteinasen und andererseits resultiert eine Hochregulation der entsprechenden Endothelzellrezeptoren. Dies führt dazu, dass sich die glatten Muskelzellen von den Gefäßen ablösen, diese werden dadurch destabilisiert, und somit können neue Endothelzellen migrieren (Carmeliet 2000).

An den oben erwähnten Mechanismen der Gefäßentstehung sind zahlreiche Wachstumsfaktoren und Rezeptoren beteiligt, wobei denjenigen aus der Familie der „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und der „Fibroblast Growth Factor“ (FGF) eine besondere Stellung zusteht.

Sowohl für die Mobilisierung von Vorläuferzellen, als auch für die Kapillarsprossung, scheint der in hypoxischen Myozyten oder auch in Endothelzellen selbst gebildete „Vascular Endothelial Growth Factor“ verantwortlich zu sein (Schaper, Piek et al. 1999). Des Weiteren scheint der für die Endothelzellmigration notwendige Anstieg der Gefäßpermeabilität ebenfalls durch VEGF verursacht zu sein.

Das in glatten Muskelzellen gebildete Angiopoetin 1 und sein auf Endothelzellen vorkommender Rezeptor Tie 2 sind für die Stabilisierung der Gefäße verantwortlich, indem sie die Durchlässigkeit der Gefäße verhindern. Für die Endothelzellmigration jedoch ist es notwendig, den interendothelialen Zellkontakt zu lösen, um die reifen Gefäße durchdringen zu können. Angiopoetin 2 scheint daran beteiligt zu sein die glatte Muskelzellverbindung sowie die umgebende extrazelluläre Matrix für diesen Vorgang zu lösen (Carmeliet 2000).

Die Gruppe der Ephrine wurde ursprünglich vor allem im Zusammenhang des Nervensystems erforscht, bis Wang et al zeigen konnten, dass diese ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Ausdifferenzierung der Gefäße zu spielen scheinen (Yancopoulos, Klagsbrun und Folkman 1998). Die Beobachtungen ergaben, dass Ephrin B2 auf zukünftigen arteriellen Gefäßen zu finden ist, während einer seiner Rezeptoren Ephrin B4 lediglich auf venösen Gefäßen vorkommt. So lässt sich vermuten, dass sich trotz anfänglich wenig

morphologischem Unterschied das arterielle System frühzeitig vom venösen System trennt.

Die oben genannten Wachstumsfaktoren werden bei systemischer Anwendung relativ schnell inaktiviert und gleichzeitig müssen sie über einen längeren Zeitraum in ausreichender Konzentration vorhanden sein, um lokal zu wirken. Da es sich bei diesen Substanzen meist um sehr potente Vasodilatoren handelt, wären bei der systemischen Applikationsform gravierende hämodynamische Nebenwirkungen, wie beispielsweise die Ödembildung zu erwarten oder Gefäße würden sich auch dort bilden, wo sie nicht erwünscht sind. Somit wird zur Realisierung einer therapeutischen Stimulierung eine Applikationsform benötigt, die sowohl lokal, als auch über einen längeren Zeitraum hinweg, die Freisetzung des Wachstumsfaktors erlaubt.

1.2. Molekulare und zelluläre Mechanismen der Arteriogenese

Sowenig auch bekannt ist über den endgültigen Schritt, der zur Bildung eines reifen Gefäßes führt, ist es doch schwer sich vorzustellen, dass ein Kollateralgefäß zu seiner Entstehung sämtliche Stufen der Gefäßentwicklung, wie sie in der Embryonalphase beschrieben sind, durchläuft. Dies ist einer der Gründe weshalb mehrere Arbeitsgruppen davon ausgehen, dass es sich beim Kollateralwachstum um einen eigenständigen, von der Angiogenese abzugrenzenden Mechanismus handelt.

Eine weitere Beobachtung, die zu dieser Annahme führte ist, dass die Kollateralgefäße im Gegensatz zum beschriebenen Gefäßwachstum der Angiogenese meist außerhalb des ischämischen Gebietes wachsen, wodurch Hypoxie als Hauptstimulus für das Kollateralwachstum auszuschließen ist (Ito et al. 1997). Mehrere Mechanismen sind beschrieben worden, die von der Gewebshypoxie ausgehend zur Hochregulation des endothelspezifischen Wachstumsfaktors VEGF und damit zur Angiogenese führen. Diese Mechanismen spielen aber sehr wahrscheinlich bei der Arteriogenese keine entscheidende Rolle, da Kollateralarterien, wie oben bereits erwähnt, außerhalb des eigentlichen ischämischen Territoriums wachsen.

Hinzu kommt die Schnelligkeit in der die Kollateralgefäße wachsen, die wiederum ebenfalls nicht mittels Angiogenese zu erklären wäre. Bereits Rentrop konnte 1981 zeigen, dass sich beim Menschen nach Myokardinfarkt innerhalb weniger Wochen eine Kollateralzirkulation entwickelt (Rentrop et al. 1989). Auch Tierexperimente am Hundeherzen und an den Kaninchenhinterläufen führten zu der Erkenntnis, dass es sich hierbei um einen äußerst schnellen Wachstumsprozeß handelt (Schaper 1971; Ito et al. 1997). Da es kaum vorstellbar ist, dass arterielle Gefäße mit einigen Zentimetern Länge und mehrere Muskelreihen beinhaltend innerhalb von 2 Wochen lediglich durch Sprossung entstanden sein sollen, liegt die Hypothese nahe, dass es sich hierbei möglicherweise um bereits präexistierende Anastomosen handelt. Fulton und Baroldi konnten in den sechziger Jahren zeigen, dass jedes normale menschliche Herz präformierte, arterioläre Anastomosen mit einem Durchmesser von 50 bis 200 Mikrometern besitzt, aus denen sich, ähnlich wie im Hundeherzen, relativ schnell Kollateralarterien entwickeln können (Fulton 1965, Baroldi und Scomazzoni 1967). Anastomosen diesen kleinen Durchmessers reichen selbstverständlich nicht aus, den Verschuß eines großen Gefäßes zu kompensieren, jedoch wecken sie die Möglichkeit die Verstärkung des Kollateralwachstums als therapeutischen Angriffspunkt zu sehen.

Geht man davon aus, dass durch den Verschuß des hauptversorgenden Gefäßes, der Blutfluß über die bereits präexistierenden Shunts geleitet wird, führt dies dazu, dass sich die Flussgeschwindigkeit um ein Vielfaches erhöht, da diese einen wesentlich kleineren Durchmesser besitzen als das Ursprungsgefäß, auch wenn aufgrund des kleineren Durchmessers der Widerstand zu und der Gesamtfluß abnimmt. Mit der Flussgeschwindigkeitserhöhung steigt auch die Schubspannung, die somit den Hauptstimulus für das Kollateralwachstum darstellen könnte.

Im Gegensatz zum diffusen Erscheinungsbild der Angiogenese scheint es sich beim Kollateralwachstum um ein begrenztes lokales Phänomen zu handeln, beschränkt auf die präexistierenden arteriolären Verbindungen ohne Beteiligung der direkt benachbarten Gefäße.

Vermutlich führt die erhöhte Schubspannung zu einer Aktivierung der Endothelzellen, so dass diese vermehrt endotheliale Chemokine, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren bilden (Topper und Gimbrone 1999; Schaper und Helisch 2000). Dabei sind einige Vertreter dieser Gruppen zu nennen: MCP-1 als Vertreter der Chemokine, ICAM-1 exemplarisch zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle zu zählen und GM-CSF stellvertretend als Granulozyten und Makrophagen stimulierender Faktor (Ito und Arras et al. 1997; Chappell et al. 1998; Kosaki et al. 1998).

Wie die erhöhte Schubspannung von der Endothelzellmembran in den Zellkern übermittelt wird, ist momentan noch nicht genau bekannt. Die lokale Makrophagenakkumulation führt dazu, dass TNF- α produziert wird, welches weitere Monozyten anlockt. Die Monozyten ihrerseits produzieren ebenfalls große Mengen an Wachstumsfaktoren. Eine weitere Folge der Makrophagenakkumulation ist die Entstehung einer lokalen Entzündungsreaktion, diese bewirkt die Auflösung der umgebenden Matrix, und somit die Voraussetzung für die Ausbreitung der Gefäße (Arras und Ito et al. 1998). Begleitend zur Makrophagenakkumulation wandern auch Leukozyten in das entzündliche Gebiet und geben das von ihnen gebildete Interleukin-4 ab, welches wiederum die Expression weiterer Adhäsionsmoleküle zur Folge hat (Buschmann und Schaper 2000). Schon bald darauf resultieren die ersten Teilungsprozesse, sowohl des Endothels, als auch der glatten Muskelzellen.

Bei der oben beschriebenen Aktivierung der Endothelzellen kann stets eine morphologische Veränderung beobachtet werden. Die glatten Muskelzellen wandeln sich aus dem ursprünglich „kontraktilen Phenotyp“, der reichlich Aktinfilamente besitzt, in einen „synthetisierenden Phenotyp“ um. Dabei kommt es zu einer Vergrößerung des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgiapparates, begleitet von einer erhöhten Anzahl an Mitochondrien. Die glatten Muskelzellen produzieren neues Elastin und Kollagen und ersetzen dadurch, die für die Zellinvasion degradierte Lamina elastica interna des Gefäßes (Buschmann und Schaper 1999; van Royen et al. 2001).

Die alleinige Teilung der Endothelzellen würde das immense Wachstum dieser präexistierenden Gefäße nicht ausreichend beschreiben, viel mehr existiert

neben diesem proliferativen Aspekt auch noch ein unterstützender Umbauprozess. Unter normalen Bedingungen könnten diese, zu Beginn noch äußerst dünnwandigen Gefäße, weder die ausreichende Blutversorgung gewährleisten, noch den veränderten hämodynamischen Anforderungen standhalten (Longland 1953). Doch die Fähigkeit das Gefäßlumen durch aktive Proliferation und begleitende Umbauprozesse in kurzer Zeit so stark zu vergrößern, lässt das anfangs bestehende Defizit schnell schwinden. Somit entstehen Gefäße, die von gewöhnlichen Arterien, abgesehen von ihrem leicht erhöhten Anteil an Kollagen zwischen den glatten Muskelzellreihen, nicht mehr zu unterscheiden sind.

Andererseits entwickeln die Kollateralgefäße bei den oben beschriebenen Umbauprozessen stets eine morphologisch charakteristische Korkenzieherform, welche hämodynamisch im Vergleich deutlich ungünstiger ist, denn es können nur maximal 60 Prozent des ursprünglichen Blutflusses kompensiert werden.

Vermutlich ist schon das genetisch festgelegte Muster jedes einzelnen Individuums für die große Variabilität in Bezug auf die Anzahl der präexistierenden Kollateralgefäße und die Wachstumskapazität dieser Gefäße verantwortlich (Buschmann und Schaper 2000).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass beide Mechanismen, sowohl die Angiogenese, als auch die Arteriogenese, ähnliche Vorgänge beinhalten, die von den Endothelzellen reguliert werden. Es ist anzunehmen, dass diese Zellen in der Lage sind voneinander abweichende Mechanismen zu entwickeln, die wiederum für die jeweilige Form der Gefäßentstehung verantwortlich sind (Cameliet 2000 ; Buschmann und Schaper 2000 ; Lindner und Maciag 2001).

Möglicherweise kann die Angiogenese indirekt den natürlichen Prozess der Arteriogenese verstärken, da durch die verstärkte Kapillarsprossung der periphere Widerstand herabgesetzt wird. Dies führt wiederum dazu, dass sich der Blutfluß über die präexistierenden arteriolären Anastomosen erhöht, was zu einem Anstieg der Schubspannung in diesen Gefäßen führt, und somit deren Umbau zu Kollateralarterien fördert.

Da für die Kompensation von gravierenden Stenosen, beziehungsweise Verschlüssen eines Hauptversorgungsgefäßes, funktionelle

Umgehungskreisläufe mit ausreichend großen Lumina benötigt werden, und dies in einem adäquaten Zeitraum vermutlich nur über den Mechanismus der Arteriogenese gelingt, ist es Ziel genau diesen Abschnitt therapeutisch beeinflussen zu lernen. Da dieser Prozeß sich ohnehin schon sehr schnell adaptiv entwickelt, besteht die Aufgabe darin, diesen zu verstärken. Damit dies gelingt, ist es erforderlich, die daran beteiligten Mechanismen weiter aufzuklären.

1.3. Fragestellung

Während die Mechanismen der Angiogenese bereits erforscht sind, müssen die zuvor genannten zellulären und molekularen Mechanismen der Arteriogenese weitgehend als Hypothese formuliert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mehrere zentrale Fragen bezüglich des Mechanismus der Arteriogenese zu beantworten:

1. Kann anhand eines einzelnen Gefäßes nachgewiesen werden, dass Kollateralarterien aus präexistierenden arteriolären Verbindungen entstehen?
2. Wie sieht die Proliferationskinetik einzelner Kollateralgefäße aus?
3. Wann setzt im Vergleich dazu, die korkenzieherartige Deformierung der Kollateralgefäße ein?
4. Gibt es membran- und zytoskelettassoziierte Moleküle, die einen spezifischen Einfluß auf das Kollateralwachstum haben und als Mechanotransduktoren in Frage kommen?

2. Material und Methoden

2.1. Tiermodell

Für die Versuche wurden männliche, 400-500g schwere Sprague Dawley Ratten von der Firma Charles River (Lieferant Wiga) verwendet.

2.1.1. Tierversuchsgenehmigungsnummer

Alle hier geschilderten Versuche wurden gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Tierversuchsgenehmigungsnummer: 36/99 vom 23.11.1999

2.1.2. Narkose

Die Narkose wurde mit einer Etherinhalation (Diethylether stabilisiert mit Butylhydroxytoluol, Chiosolfabrik, Allied Signal Riedel-de-Haen AG, Deutschland) eingeleitet. Die weitere Narkose erfolgte durch eine Intraperitonealinjektion, bestehend aus Ketamin (Ketaminhydrochlorid, Atarost GmbH & Co, Deutschland) in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht und Rompun (Xylazinhydrochlorid 2%, Bayer Vital GmbH, Deutschland) in einer Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht. Zusätzlich wurden 1000 IE/kg Körpergewicht Heparin (Liquemin N 25000, Roche, Deutschland) hinzugeführt, um eine Gerinnung in dem implantierten Schlauchsystem direkt nach der Gefäßokklusion zu vermeiden. Durch Schmerzreizung erfolgte die Kontrolle der Narkosetiefe. Falls nötig wurde intraoperativ nochmals 20 mg/kg Körpergewicht Ketamin nachinjiziert.

2.2. Pumpenimplantation

2.2.1. Pumpenfüllung

Unter der sterilen Werkbank (Lamin Air Typ HVR 2448, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland) wurden die osmotischen Minipumpen (Alzet Model 2ml1: 10 ml per hour, 7 days, Durect Corporation, USA) steril mit den jeweiligen Substanzen bestückt.

Zur Pumpenimplantation mit gleichzeitiger Katheterisierung der Arteria femoralis wurden die Schutzkappen der Minipumpen entfernt und über den Pumpenstecker ein Katheterschlauchsystem fixiert. Dieser Katheterschlauch, bestehend aus einem kurzen, 0,5 cm langen Polyethylenverbindungsstück (Außendurchmesser: 1.22 mm, Innendurchmesser: 0,75 mm, Föhr Medical Instruments GmbH, Deutschland), das mit einer Ligatur (Resolon 5/0, Resorba, Deutschland) am Pumpenstecker befestigt wurde, und einem 10 cm langen Polyethylenendstück (Außendurchmesser: 0,8 mm, Innendurchmesser: 0,4 mm, Föhr Medical Instruments GmbH), welches nach dem Einführen in das größere Verbindungsstück ebenfalls mit einer Ligatur daran fixiert wurde. Am Endstück des Schlauchsystems wurde eine Einmalinjektionskanüle (Sterican Gr.20, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) vorgeschoben, um später die luftfreie Füllung des Kathetersystems zu gewährleisten. Der Pumpenstecker, samt dem daran fixiertem Katheterschlauchsystem, wurde vor der jeweiligen Pumpenfüllung eingeschweißt und im Gassterilisator sterilisiert.

Nach der Pumpenfüllung wurden die Minipumpen 4-6 Stunden in einer mit 0,9% Isotonen Kochsalzlösung (B.Braun Melsungen AG, Deutschland) gefüllten Zellkulturflasche (250 ml Falkon, Becton Dickinson, USA) im 37°C warmen Wasserbad (GFL-Schüttel-Wasserbad 1083, Rudolf Franke Labortechnik, Deutschland) belassen. Dies diente, dem für die Pumpenimplantation notwendigen Druckaufbau.

2.2.2 Operatives Vorgehen

Der Eingriff wurde unter möglichst keimfreien Bedingungen durchgeführt. Nach einem Hautschnitt in der Leistenregion des Rattenhinterbeins wurde die Arteria femoralis und der von ihr abgehende Hautast freipräpariert. Im Anschluß daran wurde der Hautast zweifach im Abstand von 1 cm ligiert (Resolon 5/0, Resorba, Deutschland) und durchtrennt. Dadurch erhielt man einen freien Blick auf den distal vom Leistenband gelegenen Abschnitt der Femoralarterie. In diesem Bereich wurde nun die Arterie von Nerv und Vene stumpf abgelöst und zweimal angeschlungen.



Abbildung 1: Nach Präparation doppelt angeschlungene Femoralarterie des rechten Rattenbeins.

Zur Platzierung der Pumpe wurde vor der anschließenden Katheterisierung stumpf eine Tasche ins Bauchfell präpariert. Die Pumpe wurde mit einer sich um den Pumpenstecker schlingenden Hauthaht (Ethicon Vicryl 3/0 RB-1, Johnson & Johnson, Belgien) fixiert.

Zur Katheterisierung wurde die Arterie nach distal verschlossen, es erfolgte ein kleiner Gefäßschnitt proximal dieser Ligatur, über den, der sich an der Pumpe befindliche Katheterschlauch, ca. 1 cm in das Gefäß vorgeschoben wurde.

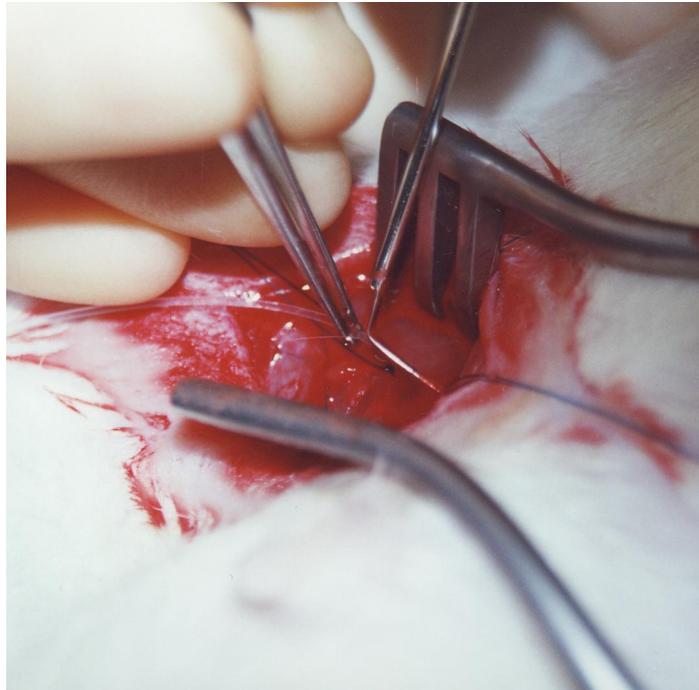


Abbildung 2: Femoralarterienkatheterisierung nach vorheriger Inzision.

Die zweite Ligatur erfolgte nun über dem sich im Gefäß befindenden Katheterschlauch, um diesen gleichzeitig zu fixieren. Zusätzlich wurde der Katheterschlauch nochmals mit dem Faden der distal gelegenen Ligatur am Gefäß befestigt. Nach Spülung der Wunde mit 0,9% isotoner Kochsalzlösung erfolgte der Verschluss durch eine fortlaufende Hautnaht.

Zur Schmerzlinderung wurden den Tieren am Operationstag 16 Tropfen Novaminsulfon (Wirkstoff: Metamizol-Natrium, Ratiopharm GmbH, Deutschland) pro 500 ml H₂O ins Trinkwasser gegeben.

2.3. Angiographien zur Gefäßdarstellung

2.3.1. Kontrastmittelzubereitung

Es wurden 100 ml Aqua ad iniectabilia (Baxter GmbH, Deutschland) auf einem Heizer (TMA 2071, Karl Hecht Assistent GmbH, Schweiz) erwärmt. Unter ständigem Rühren erfolgte nach und nach die Zugabe von 12 g Gelatine (Type A: From Porcine Skin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und 60 g Bariumsulfat (Merck KGaA, Deutschland).

2.3.2. Operatives Vorgehen

Zur Gefäßdarstellung erfolgte 7 Tage nach der Pumpenimplantation, bei gleichzeitiger Ligatur der Femoralarterie, die Aortenkanülierung mit anschließender Kontrastmittelgabe.

Nach einem Hautschnitt an der lateralen Bauchdecke des Tieres ist man mit Durchtrennung der Muskelschicht in den Retroperitonealraum gelangt, in dem die großen Gefäße durch Verdrängung der Bauchorgane gut einzusehen waren. Die Bauchaorta wurde stumpf von der sich in unmittelbarer Nähe befindenden Vena cava inferior abgelöst und für die anschließende Kanülierung zweifach umschlungen. Die Aorta wurde nach proximal hin ligiert. Anschließend wurde das Gefäß angeschnitten, um einen Polyethylenkatheterschlauch (Außendurchmesser: 1,22 mm, Innendurchmesser: 0,75 mm, Föhr Medical Instruments GmbH, Deutschland) darin vorschieben und fixieren zu können. Über die sich am Katheterende befindende 1 ml-Spritze (Omnifix-F, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) wurden 0,5 ml 0,9% isotone Kochsalzlösung zuzüglich 2500 IE Heparin ins Gefäß injiziert.

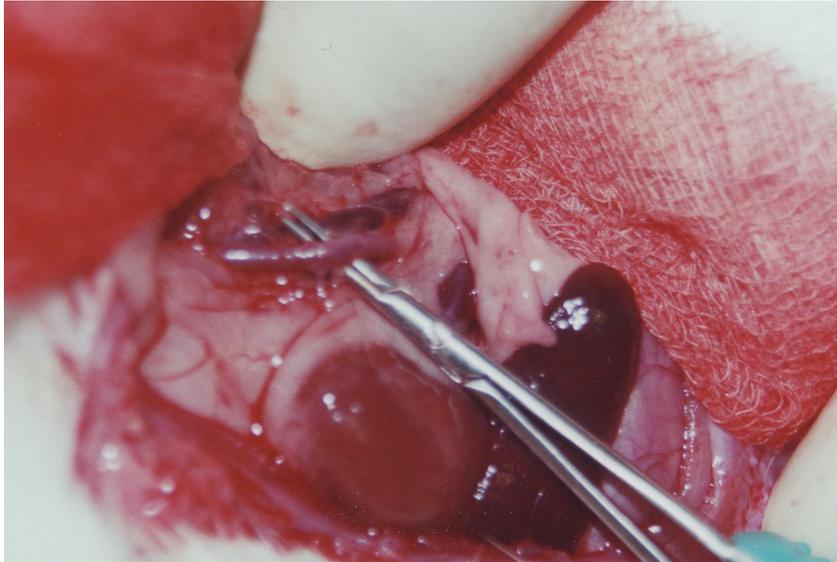


Abbildung 3: Präparation der abdominalen Aorta zur anschließenden Katheterisierung mit Kontrastmittelgabe.

Die Tiere wurden durch Entbluten aus der Vena cava inferior getötet.

Nach dem Tod der Tiere wurden mit Hilfe eines Druckperfussionssystems beide unteren Extremitäten zuerst mit 0,9% isotoner Kochsalzlösung gespült. Im Anschluß daran erfolgte die Kontrastmittelgabe bei 220 mmHg.

Die Ratte wurde zum Wärmeerhalt in ein Wasserbad umgelagert, um somit die komplette Gefäßfüllung mit Kontrastmittel zu erzielen. Während der Kontrastmittelgabe ließ sich peripher am Kontrollbein, sowie etwas verzögert auch am ligierten Bein, die Füllung überprüfen.

Nach 5 minutiger Perfussion wurde das Tier unter Aufrechterhaltung des Druckes auf Eis umgelagert, um somit die Aushärtung des Kontrastmittels im Gefäßsystem zu erreichen.

2.3.3. Angiographien als bildgebendes Verfahren

Sowohl die Schrägaufnahmen für die stereoskopische Beurteilung, als auch die Erzielung einer gleichmäßigen Bestrahlung machten es erforderlich die Tiere in Gelatine (Type A: From Porcine Skin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) einzubetten. Somit ist es gelungen, die Aufnahmen unter

Verwendung eines Röntgenfilms (X-OMAT MA 13x18 cm, Kodak, Frankreich) bei einer Röntgenspannung von 30 kV und einer Belichtungszeit von 6 Minuten in fixierter Stellung durchzuführen (Faxitron x-ray corporation, Model 43855D, USA). Das Gefäß wurde mitsamt dem am äußeren unteren Boden fixierten Film zur Rechts- bzw. Linksschrägaufnahme in einem Winkel von 15 ° gekippt.

2.3.4. Stereoskopische Auswertung der Angiographien

Für die Auswertung der Angiographien befand sich das Stereoskop (Topcon, Tokyo Kogaku Kikai Co. LTD, Japan) auf einem Durchleuchtungstisch (Leuwico, Deutschland), somit war es möglich die beiden angefertigten Schrägaufnahmen, unter gleichzeitiger Durchleuchtung, vor dem eigenen Auge zur Deckung zu bringen. Durch diese Methode gelang es, die nicht endenden Gefäßstümpfe, von den Kollateralgefäßen mit Ursprung und tatsächlicher Wiedereinmündung in das schon bestehende Gefäßsystem abzugrenzen. Zur Auswertung wurden die Kollateralgefäße durch visuelles Auszählen ermittelt. Es wurden die Angiographien der Substanzgruppe mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Zusätzlich wurden Angiographien nach dreiwöchiger Femoralarterienligatur durchgeführt und vergleichend zu der siebentägigen Kontrollgruppe beurteilt.

2.3.5. Kollateralgrößenindexbestimmung sowie Kollaterallängenbestimmung unter Zuhilfenahme der NIH Image Software

Von den angiographisch dargestellten Kollateralgefäßen konnte unter Zuhilfenahme der NIH Image Software der Durchmesser sowie die Länge des Kollateralgefäßes ermittelt werden. Die Bestimmung erfolgte lediglich am Hauptkollateralgefäß, welches auch im Tiermodell eindeutig als solches identifiziert werden konnte. Um den Füllungszustand zu berücksichtigen wurde der Mittelzonendurchmesser der Kollateralarterie in Relation zum Durchmesser der Femoralarterie direkt distal der Verschlussstelle bestimmt.

2.4. Bestimmung des Proliferationsindex

2.4.1. Operatives Vorgehen

Für die Bestimmung des Proliferationsindex sind zusätzliche Minipumpen ins Nackenfell implantiert worden. Diese wurden mit 62 mg des Thymidinanalogs 5'-Bromo-2'-Desoxyuridin (B-9285, Sigma, Deutschland) gelöst in 3 ml einer 0,5 molaren NaHCO₃-Pufferlösung pH 9,8 ebenfalls unter sterilen Bedingungen beladen. Die hierfür erforderliche Tasche wurde nach einem Hautschnitt in das sich zwischen den Schulterblättern befindende Nackenfell, ebenfalls stumpf freipräpariert. Der Wundverschluß erfolgte durch Einzelknopfnähte mit einem 5/0 Faden (Seralon, Serag Wiessner, Deutschland).

2.4.2. Entnahme histologischen Gewebes

Die Entnahme erfolgte nach dem siebentägigen Verbleiben der beiden Pumpen (Substanz-Pumpe mit Katheter in der Arteria femoralis und zusätzlicher BrdU-Pumpe im Nackenfell) im Anschluß an die Kontrastmittelgabe.

Hierfür wurde die Haut des Rattenbeines entfernt und das Kollateralgefäß nach erfolgter Identifizierung durch die zuvor stattgefundene Kontrastierung gemeinsam mit dem umgebenden Muskel herauspräpariert. Es wurden jeweils, sowohl die Gefäße des ligierten Beines, als auch die des Kontrollbeines entnommen.

Das auf Korkplättchen, in Tissue Tek (O.C.T.TM Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande) eingebettete Gewebestück wurde in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten N-Hexan-Röhrchen (ICN Biomedicals, USA) schockgefroren. Die Lagerung der Gewebestücke erfolgte im -80°C Gefrierschrank (Kryotec, Hans-S.Schröder GmbH, Deutschland).

2.4.3. Anfertigung histologischer Schnitte

Es wurden 7 µm dicke histologische Schnittpräparate der einzelnen Gewebeblöcke am Kryostaten (Frigocut Modell 2800, Reichert-Jung, Cambridge Instruments GmbH, Deutschland) angefertigt. Die Schnitte wurden auf beschichtete Glasobjektträger (SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) gebracht. Nach dem Trocknen erfolgte die Fixierung mit -20°C kaltem Ethanolfixans über 20 Minuten in einer vorgekühlter Glasküvette.

Das Ethanolfixans wurde unter Verwendung von 30 ml eines 50 mM Glycin-Puffer (G-8898 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) und 70 ml absolutem Ethanol (Merck KgaA, Deutschland) hergestellt. Im Anschluß an die Herstellung erfolgte mit Hilfe des pH-Meter (pH-Elektrode SenTix 61, Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten GmbH, Deutschland) die Einstellung des pH-Wertes auf 2,0. Nach der Fixierung wurden die Präparate bis zur Immunhistologischen Färbung im -80°C Gefrierschrank aufbewahrt.

2.4.4. Immunhistologische Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper

Zu Beginn erfolgte, durch dreimal 5 minutiges Waschen in 1x PBS, die Rehydrierung, der im -80°C Gefrierschrank gelagerten histologischen Präparate.

Die Ränder der Objektträger wurden vor dem Aufpipettieren des 1% BSA-Blocks (Albumin from bovine serum, Fluka Chemie GmbH, Schweiz) mit einem Zellstofftuch abgetrocknet. Pro Schnitt wurden 100 µl 1% BSA-Block verwendet. Es folgte eine 30 minutige Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C im Labor-Trockenschrank (Typ T12, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland). Nach der Inkubation wurde der BSA-Block von den Schnitten abgekippt und diese mit je 100 µl des Anti-BrdU-Antikörpers bestückt.

Die nukleasehaltige Anti-BrdU-Arbeitslösung (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit 2, Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) wurde vor dem Gebrauch mit einem Inkubationspuffer, der 66 mM Tris-Puffer, 0,6 mM MgCl₂ und 1 mM 2-Mercaptoethanol enthält (5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling

and Detection Kit 2, Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) ,1:10 verdünnt. Die jeweilige Negativkontrolle wurde nur mit Inkubationspuffer versehen.

Vor jeder Antikörperauftragung wurden die Schnitte durch entsprechendes Trockenwischen in der Umgebung von Flüssigkeit befreit.

Im Anschluß an eine erneute 30 minutige Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C erfolgte das Abkippen des Erstantikörpers mit zusätzlichem dreimaligen 5 minutigen Waschen in 1x PBS. Nach dem Waschvorgang wurden die Schnitte mit 100 µl Cy 2-conjugated Goat-Anti-Mouse IgG (Lot Nr.41110, Jackson Immuno Research Laboratories, Dianova, Deutschland), welches zuvor 1:200 mit 1% BSA-Lösung verdünnt wurde, überschichtet. Der Zweitantikörper war während der gesamten Zeit dunkel zu halten.

Es folgte eine weitere 60 minutige Inkubation in einer feuchten, dunklen Kammer bei 37°C, nach der die Antigen-Antikörperreaktion durch Abklopfen und dreimal 5 minutiges Waschen in 1x PBS gestoppt wurde.

Zur Kerngegenfärbung wurde 0,1% Propidium Iodide Stocklösung (P-4170, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) 1:100 mit 1x PBS verdünnt und in 100 µl Portionen auf die Schnittpräparate pipettiert. Die Inkubation erfolgte über 15 Minuten in der feuchten, dunklen Kammer bei 37°C. Die Farbreaktion wurde durch dreimaliges 5 minutiges Waschen in 1x PBS gestoppt.

Ein Gemisch bestehend aus Mowiol (Calbiochem, U.S.) und PPD (1,2-Phenylenediamine, Merck KGaA, Deutschland) diente zum Eindeckeln der gefärbten Schnitte, hierfür wurden 15 µl pro Schnitt und kleines Deckglas (18x18 mm, Superior Marienfeld, Deutschland) verwendet.

Um die Deckgläser frei von Luftblasen zu halten, wurden diese einzeln mit Nagellack umrandet.

2.4.5. Auswertung der fluoreszenzmarkierten Schnittpräparate

Die gefärbten Schnittpräparate wurden am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Deutschland) mit einem Rodaminfilter unter Zuhilfenahme einer Fotokamera (Pentax Z-20, Pentax Handelsgesellschaft mbH, Deutschland) per Diafilm (Kodak Ektachrome 64 T Professional, Kodak Limited, England) abgelichtet.

Die so entstandenen Dias konnten durch manuelle Auszählung der darauf dargestellten Zellkerne der einzelnen Gefäße an einem Diaentwicklungsgerät (Focomat V35 Autofocus, Leitz, Deutschland) ausgewertet werden.

Es erfolgte die Auszählung aller durch Kerngegenfärbung dargestellter Zellkerne sowie derer, die sich während des siebentägigen Verbleibens unter BrdU-Zufuhr neu gebildet hatten.

Zur Bestimmung des Proliferationsindex wurde die Zahl der proliferierten Kerne durch die Gesamtkernzahl dividiert.

2.5. Erstellung einer Wachstumskinetik

2.5.1. Operatives Vorgehen

Für die Erstellung der Wachstumskinetik erfolgte bei den Tieren die Femoralarterienligatur eines Beines mit gleichzeitiger BrdU-Pumpenimplantation ins Nackenfell. Es wurden keine zusätzlichen Substanzpumpen implantiert. Die Gefäßentnahme wurde mit Hilfe der unter 2.3.2. beschriebenen Kontrastmittelamplikation in den Zeiträumen: 24 Stunden, 3 Tage, 7 Tage und 3 Wochen nach der jeweiligen Gefäßokklusion durchgeführt.

2.5.2. Auswertung der erstellten Wachstumskinetik

Die Auswertung erfolgte durch die unter 2.4. bereits beschriebene Bestimmung des Proliferationsindex im Anschluß an die immunhistologische Färbung mit einem fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper.

2.6. Herstellung eines kollateralspezifischen Antikörpers

Der in der Arbeit verwendete kollateralspezifische Antikörper wurde in Vorarbeiten generiert.

2.6.1. Vorarbeiten zur Immunisierung und Generierung eines kollateralspezifischen Antikörpers

Dazu wurden C57/B16 Mäuse mit Membranpräparationen aus Kollateralarterien, durch drei intraperitoneale Injektionen in zweiwöchigem Abstand immunisiert (Sigma; St.Louis, USA). Zwei Tage nach einer vierten Stoßinjektion wurde die Milz der Mäuse entnommen. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die daraus gewonnenen Lymphozyten mit SP2/O Myelomzellen fusioniert (Dean CJ 1998).

Unter Verwendung von Kryoschritten aktivierter Kollateralarterien sowie entsprechender Kontrollgefäße wurden die Klone detektiert und selektiert.

Für in vivo und in vitro Untersuchungen musste der Antikörper mittels der Affinity Pak Immobilized Protein- L Säule (Pierce, Rockford, IL) isoliert werden.

2.6.2. Hybridomazellaufzucht

Zur Vorbereitung wurde eine 500 ml Flasche Zellkulturmedium (Dulbeccos MEM with Glutamax, Gibco BRL, Deutschland) mit 10-15% fetalem Kälberserum (Gibco BRL, Deutschland) und einer Ampulle Penicillin/Streptomycin (Roche, Deutschland) unter der sterilen Werkbank (Lamin Air HVR 2448, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland) angesetzt. Davon wurden 10 ml entnommen und in ein 15 ml Röhrchen (Falcon, Becton Dickinson, USA) pipettiert.

Die in einem Kryotube (Nunc GmbH, Dänemark) schockgefrorenen Hybridomazellen wurden zur Kultivierung aus dem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter (Air Liquide GT 40, Frankreich) entnommen und im 37°C warmen Wasserbad schnell, fast vollständig aufgetaut.

Anschließend wurden die Hybridomazellen in das vorbereitete 15 ml Röhrchen überführt. Um die Zellen nun wieder von dem Einfriermedium zu trennen, erfolgte eine 3 minutige Zentrifugation bei 1000 rpm (Labofuge 400 R, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland). Der so entstandene Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe (Absaugsystem, Biochem Vacuu Center Merck, Deutschland) abgesaugt. Durch mehrmaliges Klopfen des Röhrchens wurden

die Zellen vom Boden gelöst und in 10 ml frisches Zellkulturmedium suspendiert.

Zur Kultivierung der Hybridomazellen überführte man das Gemisch in eine Zellkulturflasche (250 ml Falcon, 0,2 µm vented Blue Plug Seal Cap, Becton Dickinson, USA). Diese wurde 2-4 Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, Heraeus Instruments GmbH, Deutschland) inkubiert.

Sobald ein subkonfluenten Zustand erreicht war, wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 auf größere Zellkulturflaschen (750 ml Falcon, 0.2 µm vented Blue Plug Seal Cap, Becton Dickinson, USA) verteilt. Dabei wurde die doppelte Menge an Zellkulturmedium zugegeben. Unter ständiger mikroskopischer Kontrolle der Zellmorphologie erfolgte, falls nötig, die erneute Zugabe von 10 ml frischen Medium, solange bis die erwünschte Wachstumsdichte erreicht war.

Anschließend wurde die gesamte Suspension einer Flasche auf eine Dreibodenflasche (Nunclon Triple Flask, Nunc GmbH & CoKG, Deutschland) zuzüglich der doppelten Menge an frischem Zellkulturmedium überführt. Alle 2-3 Tage wurde frisches Medium, bis zu einem maximalen Flaschenvolumen von 200 ml hinzugegeben.

Vor Erreichen der maximalen Zelldichte wurden die Hybridomazellen mit samt ihres produzierten Überstandes zur weiteren Verarbeitung in ein steriles Becherglas gegeben. Zuvor hatten die Zellen, um eine maximale Antikörperausschüttung zu erreichen, einen Tag kein frisches Medium erhalten. Die Suspension wurde mit einem Eßlöffel Hyflo Super Gel (Fluka Chemie GmbH, Schweiz) gemischt, um die Zellen, Zelltrümmer und eventuell vorhandene Präzipitate zu binden und sie somit vom Überstand abzutrennen. Das eingesetzte Gel dient dabei als Vorfilter, der es ermöglicht im Anschluß die gesamte Suspension mit einem 0,2 µm Membranfilter (Stericap 500 ml, Millipore Corporation, USA) unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe zu filtrieren, ohne dass dieser verstopft.

2.6.3. Isolation des kollateralspezifischen Antikörpers aus Hybridomazellüberstand

Zu Beginn wurden die für die Isolation verwendeten Proteinsäulen (AffinityPak Immobilized Protein L Column, Pierce, USA) auf Raumtemperatur gebracht. Die Säulen waren mit an Protein L gekoppelter Sepharose gefüllt. Der Antikörper enthaltende Hybridomazellüberstand wurde 1:2 mit einem bindenden Puffer pH 7,2 (BupH Phosphate Buffered Saline Packs, Pierce, USA) verdünnt.

Um die Entstehung von Luftblasen zu vermeiden, erfolgte zuerst die Öffnung des TopCaps und erst im Anschluß daran, die Öffnung des unteren Verschlusses der Säule. Vor Verwendung der Säulen wurden diese mit 10 ml des zuvor hergestellten Puffers gewaschen, hierfür wurden jeweils 5 ml auf die entsprechende Säule pipettiert.

Nach dem Waschvorgang erfolgte Schritt für Schritt die Zugabe von 50 ml des verdünnten Hybridomazellüberstands auf die einzelnen Säulen.

An die vollständige Bestückung der Säulen wurde ein erneuter Waschvorgang mit 25 ml des vorhandenen pH-Puffers angeschlossen.

Unter Verwendung eines Elutionspuffers (ImmunoPure L Elution Buffer, Pierce, USA), der Glycin enthalten hat und dadurch einen pH-Wert von 4,0 besaß, wurden die zuvor gebundenen Antikörper wieder von der Säule abgelöst. Hierfür wurden je Säule 7 Reagenzröhrchen mit 100 µl 1M Tris (Tris, Life Technologies/Gibco BRL, USA) pH 7,5 bestückt, um wieder eine Neutralisierung herbeizuführen. Der Durchlauf von 1 ml Elutionspuffer wurde unter gleichzeitigem Sammeln des Eluats abgewartet, um anschließend die Säule vor erneuter Bestückung auf das nächste Reagenzröhrchen umzusetzen. Für die spätere Extinktionsmessung mittels Photometer (Spectrophotometer DU 640, Beckman, USA) wurden die Proben zur Vermischung kurz gevortext (VF2, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Deutschland). Die Extinktionsmessung erfolgte unter Verwendung einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge $\lambda = 280\text{nm}$. Die Proben wurden hierfür in eine Quarzglasküvette (Präzisionsküvette Suprasil, Hellma, Deutschland) überführt.

Die Fraktionen mit Absorptionwerten größer 0,1 wurden gepoolt und zur Volumeneinengung in einen Konzentrator (Miniplus Concentrator, Amicon Bioseparations, Millipore Corporation, USA) pipettiert.

Nach der Einengung auf das gewünschte Volumen erfolgte das Entsalzen des Konzentrats. Die dafür verwendeten Säulen (Desalting Column PD-10 Sephadex G-25M, Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden) wurden nach Erreichen der Raumtemperatur geöffnet und ebenfalls mit 25 ml des 7,2 pH-wertigen Puffers gewaschen, bevor das Konzentrat aufpipettiert wurde. Pro Säule erfolgte die Vorbereitung von 7 Reagenzröhrchen. Danach wurde die Säule mit je 1 ml Puffer bestückt, die Fraktion wurde gesammelt und die Säule wurde auf das nächste Röhrchen umgesetzt.

Im Anschluß daran erfolgte die Extinktionsbestimmung der erhaltenen Fraktionen mittels Photometer. Die Fraktionen mit Absorptionwerten größer 0,1 wurden in ein gemeinsames Reagenzröhrchen gegeben, aus dem nach erfolgtem Schwenken nochmals 1 ml zur erneuten Extinktionsmessung abgenommen wurde.

Die so erhaltene Endextinktion wurde durch den Faktor 1,18 dividiert, um die Konzentration der Probe in mg/ml zu bestimmen.

Nach erfolgter steriler Filtration (Millex-HV 0,45 µm FilterUnit, Millipore, Frankreich) konnte die Probe zur Füllung der Osmotischen Minipumpen verwendet werden.

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung und Beschreibung des Rattenmodells

3.1.1. Post mortem Angiographien: Entstehung eines Kollateralgefäßes aus einer präexistierenden Anastomose.

Zur Beurteilung der Entwicklung eines Kollateralgefäßes fertigten wir 7 Tage sowie 3 Wochen nach Verschuß der Rattenfemoralarterie stereoskopische postmortem Angiographien an. Die Auswertung erfolgte mittels Imaging Computersystem sowie mittels stereoskopischer Auszählung.

Die präexistierende Anastomose konnte in allen Tieren identifiziert werden, und somit gelang es nach erfolgter Ligatur deren Entwicklung zur Hauptkollateralarterie zu beobachten.

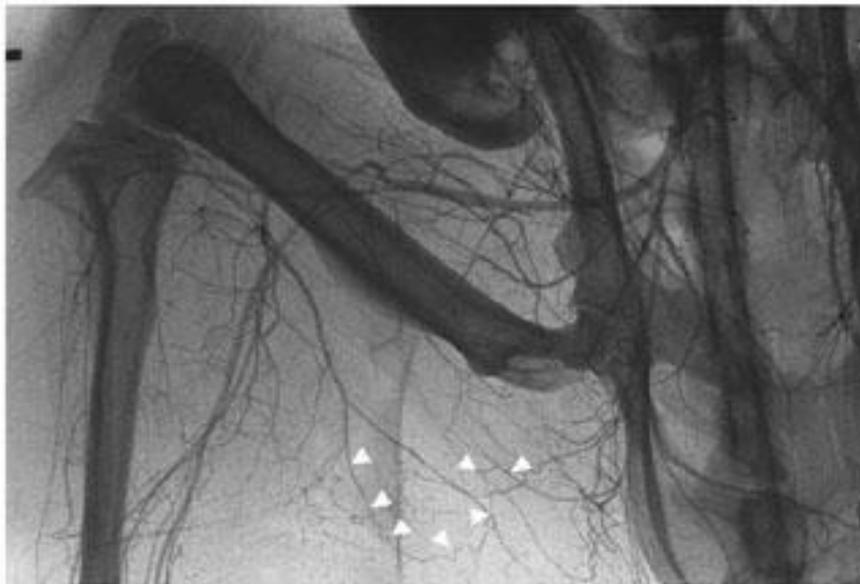


Abbildung 4 : Postmortemangiographie ohne Femoralarterienligatur. Die weißen Pfeile markieren die präexistierende Anastomose. Auch im nicht ligierten Bein kann eine präexistierende arterielle Verbindung zwischen der A.iliaca interna und der A.poplitea identifiziert werden.

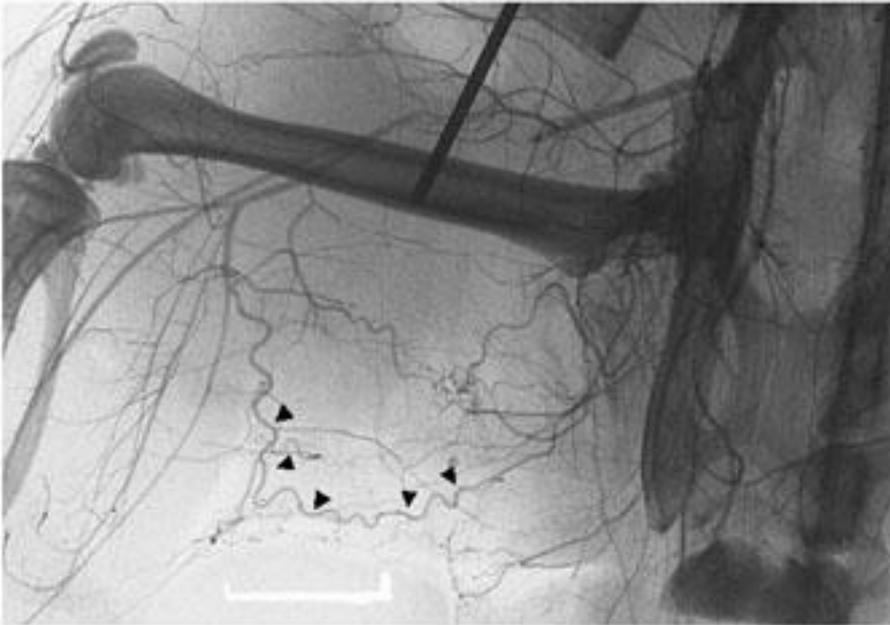


Abbildung 5: Postmortemangiographie des Rattenhinterbeins nach erfolgter 7-tägiger Femoralarterienligatur. Die schwarzen Pfeile markieren die deutlich verlängerte, kornenzieherförmige Kollateralarterie.

Fall	Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralgefäße	
	ohne Ligatur	7 Tage nach Ligatur
R 29	3	5
R 31	2	5
R 33	2	6
R 35	2	5
R 107	3	5
R 109	2	6
Mittelwert	2,333333333	5,333333333

Tabelle 1: Darstellung der Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralgefäße 7 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur im Vergleich zum Kontrollbein ohne Ligatur.

Fall	Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralgefäße	
	ohne Ligatur	21 Tage nach Ligatur
R 235	1	7
R 236	2	7
R 237	2	8
Mittelwert	1,666666667	7,333333333

Tabelle 2: Darstellung der Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralgefäße 21 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur im Vergleich zum Kontrollbein ohne Ligatur.

Die Gesamtanzahl der angiographisch darstellbaren Kollateralarterien ist signifikant von $2,3 + 0,5$ vor Gefäßverschluss auf $5,3 + 0,5$ nach 7-tägigem Femoralarterienverschluss und auf $7,3 + 0,5$ nach 3-wöchiger Femoralarterieligatur angestiegen (Kontrolle / 7 Tage: $P < 0,00001$; 7 Tage / 21 Tage: $P < 0,01$).

Die größte Zunahme an sichtbaren Kollateralgefäßen ließ sich innerhalb der ersten 7 Tage nach Femoralarterienligatur beobachten.

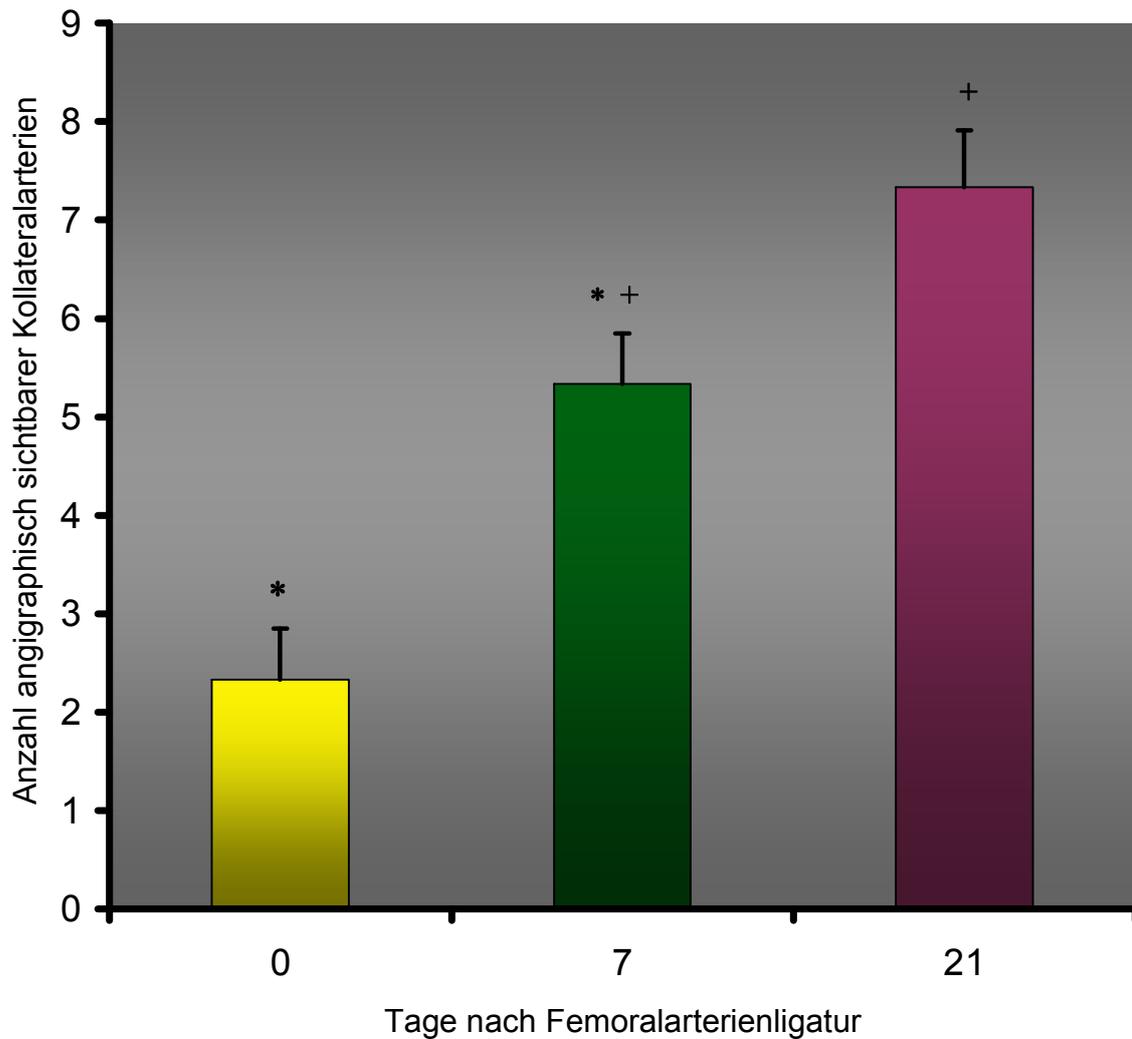


Abbildung 6: Säulendiagramm zur Darstellung der Anzahl angiographisch sichtbaren Kollateralarterien in einem definierten Beobachtungszeitraum nach erfolgter Femoralarterienligatur (*P < 0,00001; +P < 0,01).

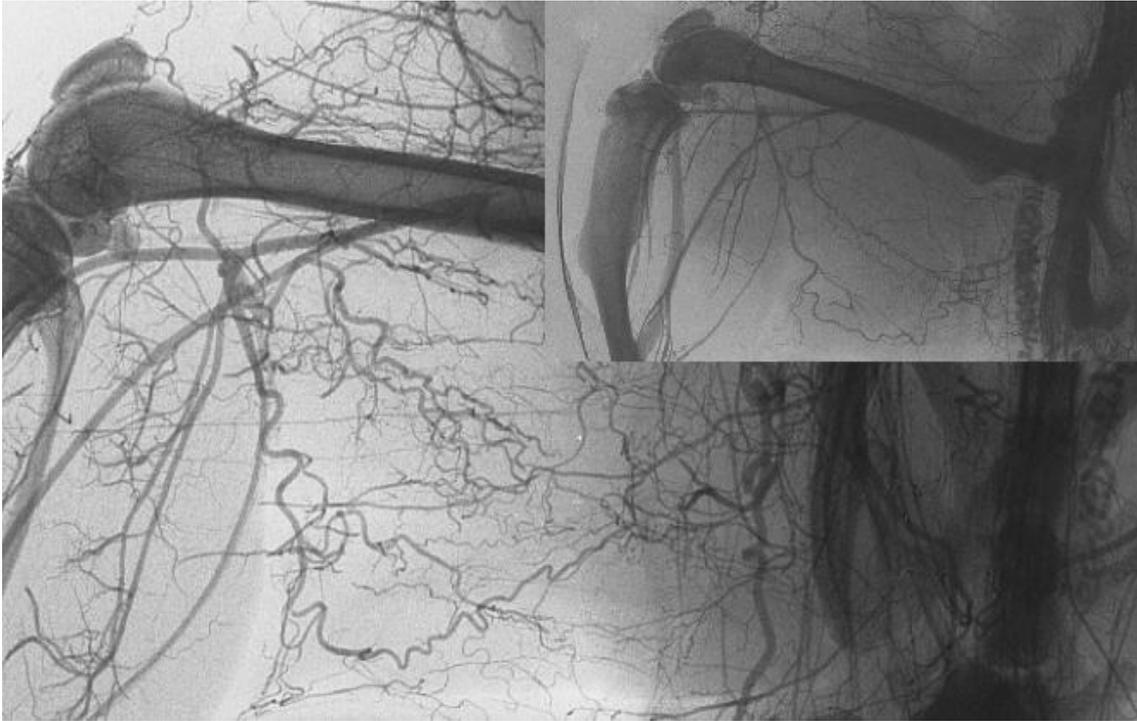


Abbildung 7: Die hinterlegte Angiographie zeigt das ausgebildete Kollateralgefäßsystem 21 Tage nach Femoralarterienligatur, im kleinen Bild rechts oben vergleichend dazu dargestellt die Angiographie 7 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur.

Der *Mittelzonenindex* der Kollateralarterie ergibt sich aus dem Mittelzonendurchmesser des Kollateralgefäßes im Verhältnis zum Durchmesser der distalen Femoralarterie.

Fall	Kollateralgrößenindex	
	ohne Ligatur	7 Tage nach Ligatur
R 29	0,25806452	0,46875
R 31	0,23333333	0,4375
R 33	0,10526316	0,4
R 34	0,14634146	0,41176471
R 35	0,11363636	0,59259259
R 37	0,21428571	
R 48	0,18518519	
Mittelwert	0,179444247	0,46212146

Tabelle 3: Darstellung des Kollateralgrößenindex 7 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur im Vergleich zum Kontrollbein ohne Ligatur.

Wir konnten eine Zunahme dieses Index der Hauptkollateralarterie von $0,17 + 0,05$ vor Gefäßverschluß auf $0,46 + 0,07$ nach 7-tägiger Femoralarterienligatur feststellen.

Es wurden nur diejenigen angiographischen Bilder ausgewertet, die eindeutig mit Stamm, Mittelzone, sowie sicherem Wiederanschluß an das Gefäßsystem zu identifizieren waren.

	Kollateralgrößenindex
Fall	21 Tage nach Ligatur
R 235	0,375
R 236	0,28125
R 237	0,3
Mittelwert	0,31875

Tabelle 4: Darstellung des Kollateralgrößenindex 21 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur.

Interessanterweise ließ sich eine Abnahme des Mittelzonenindex auf $0,31 + 0,04$ nach 3-wöchigem Femoralarterienverschluß beobachten, welcher auf eine Regression des Kollateralgefäßwachstums hinweist.

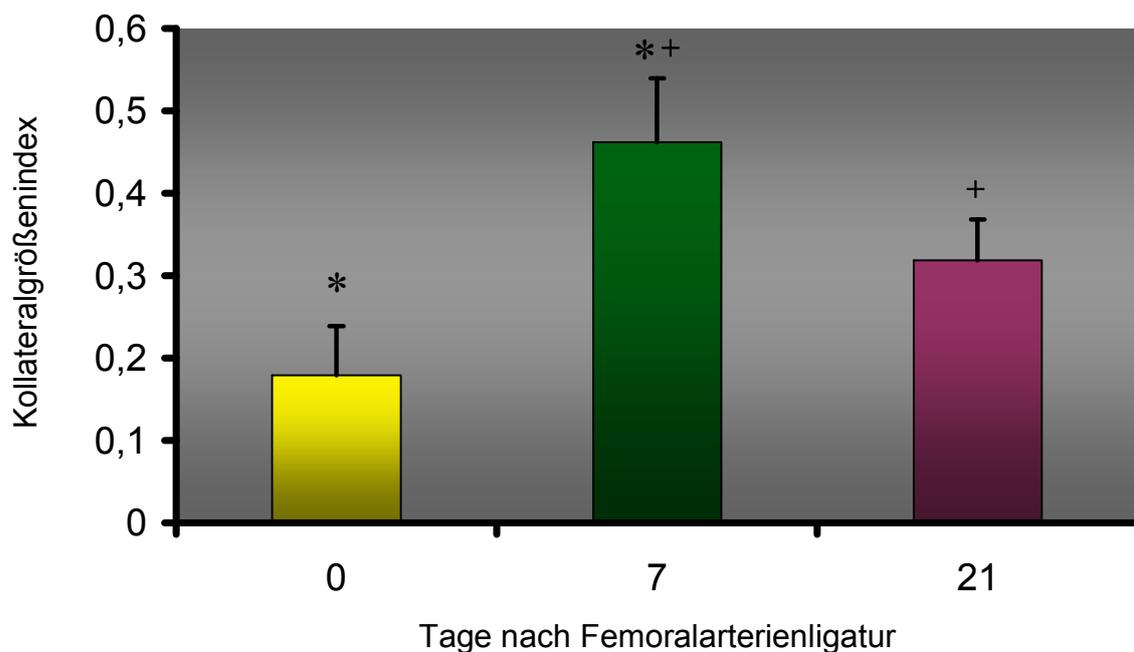


Abbildung 8: Säulendiagramm zur Darstellung des Kollateralgrößenindex in einem definierten Beobachtungszeitraum nach erfolgter Femoralarterienligatur (* $P < 0,001$; + $P < 0,02$).

Wir konnten nicht nur eine Größenzunahme des Gefäßdurchmessers der Kollateralarterie sondern auch eine *Längenzunahme*, die sich in einer verstärkten Gewundenheit des Gefäßes darstellte, beobachten. Die Gesamtlänge der Kollateralarterie hat von 21% während der ersten Woche nach Femoralarterienligatur auf signifikante 39% innerhalb von 3 Wochen nach Verschuß des Gefäßes zugenommen ($P < 0,02$).

	Kollateralarterienlänge	
Fall	Ohne Ligatur	7 Tage nach Ligatur
R 29		4,128
R 31	3,132	4,528
R 33		4,994
R 34		4,804
R 35		3,628
R 37	3,714	
R 48	4,068	
Mittelwert	3,638	4,4164
Zunahme in %		21,3963716

Tabelle 5: Darstellung der Kollateralarterienlänge 7 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur im Vergleich zum Kontrollbein ohne Ligatur.

	Kollateralarterienlänge
Fall	21 Tage nach Ligatur
R 235	5,382
R 236	4,57
R 237	5,23
Mittelwert	5,060666667
	0,43167272
Zunahme in %	39,1057358

Tabelle 6: Darstellung der Kollateralarterienlänge 21 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur.

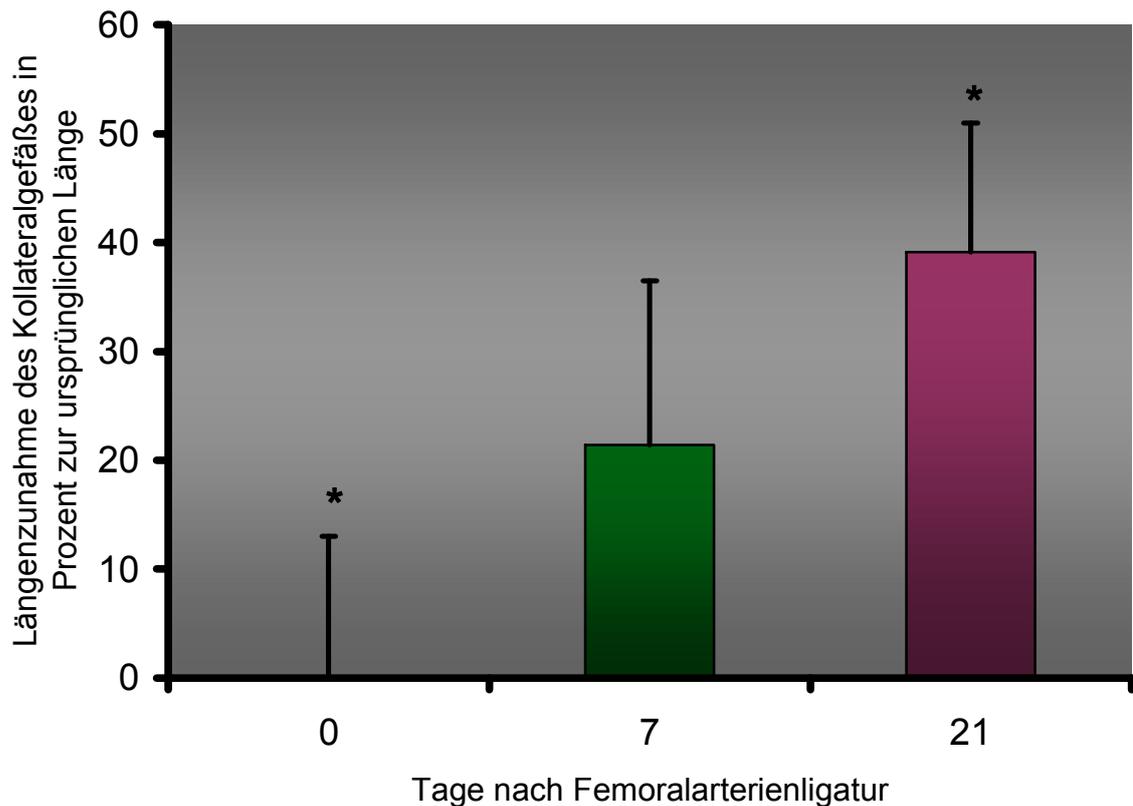


Abbildung 9: Säulendiagramm zur Darstellung der kontinuierlichen Längenzunahme des Kollateralgefäßes in Prozent zur ursprünglichen Länge der präexistierenden Verbindung in einem definierten Beobachtungszeitraum nach erfolgter Femoralarterienligatur (*P < 0,02).

3.1.2. Die Proliferation beschränkt sich auf die präexistierende arterielle Anastomose

Die nach 7-tägiger Femoralarterienligatur und kontinuierlicher subcutaner Infusion des Thymidinanalogon BrdU angefertigten und immunhistologisch gefärbten Schnitte verdeutlichen, dass sich die Proliferation lediglich auf die präexistierende arterielle Anastomose beschränkt

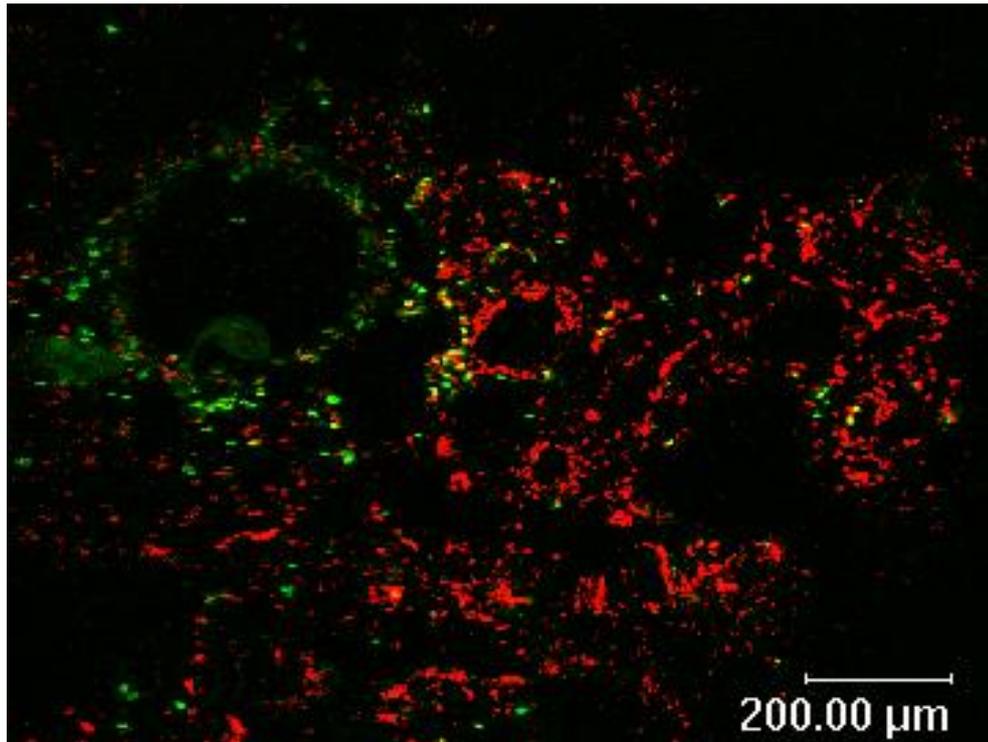


Abbildung 10: Grün fluoreszierend dargestellt, die proliferierten Zellkerne des Kollateralgefäßes, durch BrdU Färbung detektiert. In direkt benachbarten Gefäßen mit vergleichbarer Größe und Gefäßstruktur, die jedoch keine Verbindung zwischen dem ischämischen und nicht ischämischen Gebiet herstellen, lässt sich mittels der entsprechenden Färbung keinerlei Proliferation nachweisen. Dementsprechend rot fluoreszierend dargestellt, die bereits vorbestehenden Zellkerne, der während des Beobachtungszeitraums nicht proliferierenden Gefäße.

3.1.3. Proliferationskinetik der Kollateralarterie

Um eine Proliferationskinetik zu erhalten, führten wir immunhistologische Untersuchungen nach kontinuierlicher BrdU-Infusion über 24 Stunden, 3 Tage, 7 Tage sowie 3 Wochen durch. Hierbei wurden die positiv gefärbten Zellkerne der Endothel- und glatten Muskelzellen, die ihrerseits die während des Beobachtungszeitraums neu gebildeten Zellen darstellen, im Verhältnis zur gesamten Kernanzahl des vaskulären Gewebes ermittelt, somit gelang es einen Proliferationsindex zu bestimmen.

Drei Tage nach Femoralarterienligatur konnten erstmals BrdU positive Kerne gesehen werden, zuvor 24 Stunden nach Femoralarterienligatur ließen sich keinerlei BrdU positive Kerne nachweisen (R 266, R 267, R 268, R 269). Somit gehen wir davon aus, dass die Proliferation zwischen 24 Stunden und 3 Tagen nach Femoralarterienligatur begonnen hat.

Proliferationskinetik 3 Tage nach Ligatur			
	Anzahl rot	Anzahl grün	Proliferationsindex
R 245	98	36	0,367346939
R 246	268	108	0,402985075
R 248	130	39	0,3
Mittelwert			0,356777338

Tabelle 7: Darstellung der Anzahl immunhistologisch identifizierter Zellkerne mit sich daraus ergebendem Proliferationsindex 3 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur.

Proliferationskinetik 7 Tage nach Ligatur				
Fall	Anzahl rot	Anzahl grün	Proliferationsindex	Mittelwert
R 115	174	115	0,6609195	0,6267156
	159	103	0,6477987	
	413	236	0,5714286	
R 124	77	34	0,4415584	0,4938279
	197	111	0,5634518	
	120	62	0,5166667	
	25	11	0,44	
	67	34	0,5074627	
R 133	273	170	0,6227106	0,6207639
	493	296	0,6004057	
	388	248	0,6391753	
R 134	229	168	0,7336245	0,5122518
	319	171	0,5360502	
	322	86	0,2670807	
	159	103	0,6477987	
	413	236	0,5714286	
R 136	247	172	0,6963563	0,7352749
	465	360	0,7741935	
Mittelwert ges.				0,5977668

Tabelle 8: Darstellung der Anzahl immunhistologisch identifizierter Zellkerne mit sich daraus ergebendem Proliferationsindex 7 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur.

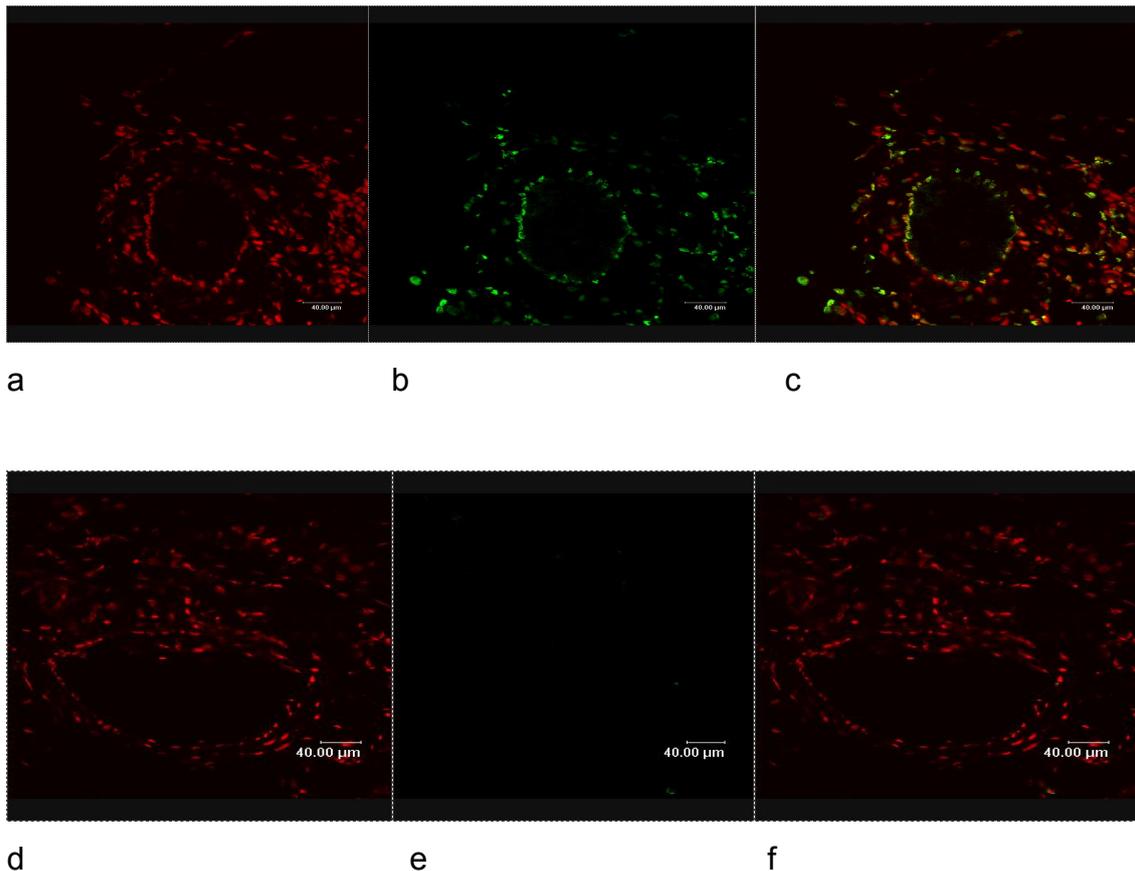


Abbildung 11: (a) Die rotfluoreszierenden Zellkerne stellen die Gesamtzahl an histologisch sichtbaren Zellkernen dar. (b) Die grüne Fluoreszenz markiert die nach erfolgter 7-tägiger Femoralarterienligatur und gleichzeitiger kontinuierlicher BrdU- Infusion neu gebildeten Zellkerne des Kollateralgefäßes. (c) Zeigt eine Kombinationsdarstellung aus beiden. (d) Gesamtzellzahl des Kontrollbeingefäßes ohne Ligatur. (e) Es lassen sich mittels immunhistologischer Färbung keine neugebildeten Zellkerne im Kontrollgefäß darstellen. (f) Kombinierte Darstellung des Kontrollgefäßes ohne Ligatur und somit ohne sichtbare Proliferation.

Proliferationskinetik 21 Tage nach Ligatur			
Fall	Anzahl rot	Anzahl grün	Proliferationsindex
R 215	222	101	0,454954955
R 217	19	11	0,578947368
R 218	44	24	0,545454545
Mittelwert			0,52645229

Tabelle 9: Darstellung der Anzahl immunhistologisch identifizierter Zellkerne mit sich daraus ergebendem Proliferationsindex 21 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur.

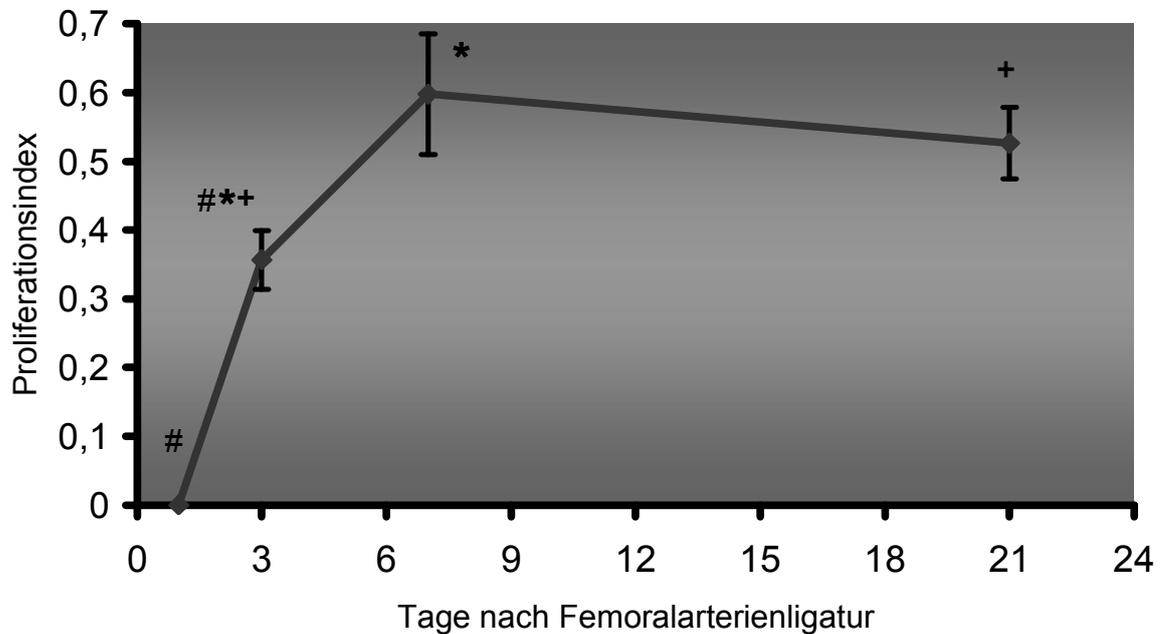


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Proliferationsindex in einem definierten Beobachtungszeitraum nach erfolgter Femoralarterienligatur (#P < 0,01; *P < 0,01; +P < 0,05)

Die maximale Zunahme des Proliferationsindex konnten wir innerhalb des ersten und dritten Tages nach Femoralarterienligatur feststellen, an Tag 3 erreicht dieser 35 %. 7 Tage nach durchgeführtem Verschluss ergab sich eine

Proliferationsrate von 59 %. Nach dem siebten Tag kam es zu keinem weiteren messbaren Anstieg des Proliferationsindex. Im Einklang mit unseren Angiographieergebnissen ergab sich am Tag 21 nach Femoralarterienligatur ein geringerer Proliferationsindex als an Tag 7 nach Verschluss der Femoralarterie (24 Stunden / 3Tage: $P < 0,01$; 3Tage / 7Tage: $P < 0,01$).

3.2. In vivo Auswirkung der Aktivierung eines Proteasom- und Focal Adhesion assoziierten Antigens durch CTA 157-2 auf die Arteriogenese

3.2.1. Post mortem Angiographien nach 7-tägiger CTA 157-2 Injektion in die Femoralarterie der Ratte im Vergleich zur PBS Injektion

Vergleicht man die Gesamtzahl der angiographisch darstellbaren Kollateralarterien nach 7-tägiger Femoralarterienligatur mit gleichzeitiger kontinuierlicher Infusion von CTA 157-2 mit der Kontrollgruppe, bei der eine kontinuierliche Infusion von PBS durchgeführt wurde, so lässt sich eine geringere Anzahl an ausgebildeten Kollateralgefäßen in der CTA-Gruppe beobachten (5,3 \pm 0,5 PBS / 4,3 \pm 0,5 CTA ; $P < 0,05$).

Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralgefäße 7 Tage nach Ligatur im Vergleich			
Fall	PBS	Fall	CTA 157-2
R 29	5	R 73	5
R 31	5	R 98	4
R 33	6	R 101	4
R 35	5	R 112	5
R 107	5	R 114	3
R 109	6	R 122	5
Mittelwert	5,333333333	Mittelwert	4,333333333

Tabelle 10: Darstellung der Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralgefäße 7 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur mit kontinuierlicher Infusion von PBS im Vergleich zur kontinuierlichen CTA 157-2 -Infusion.

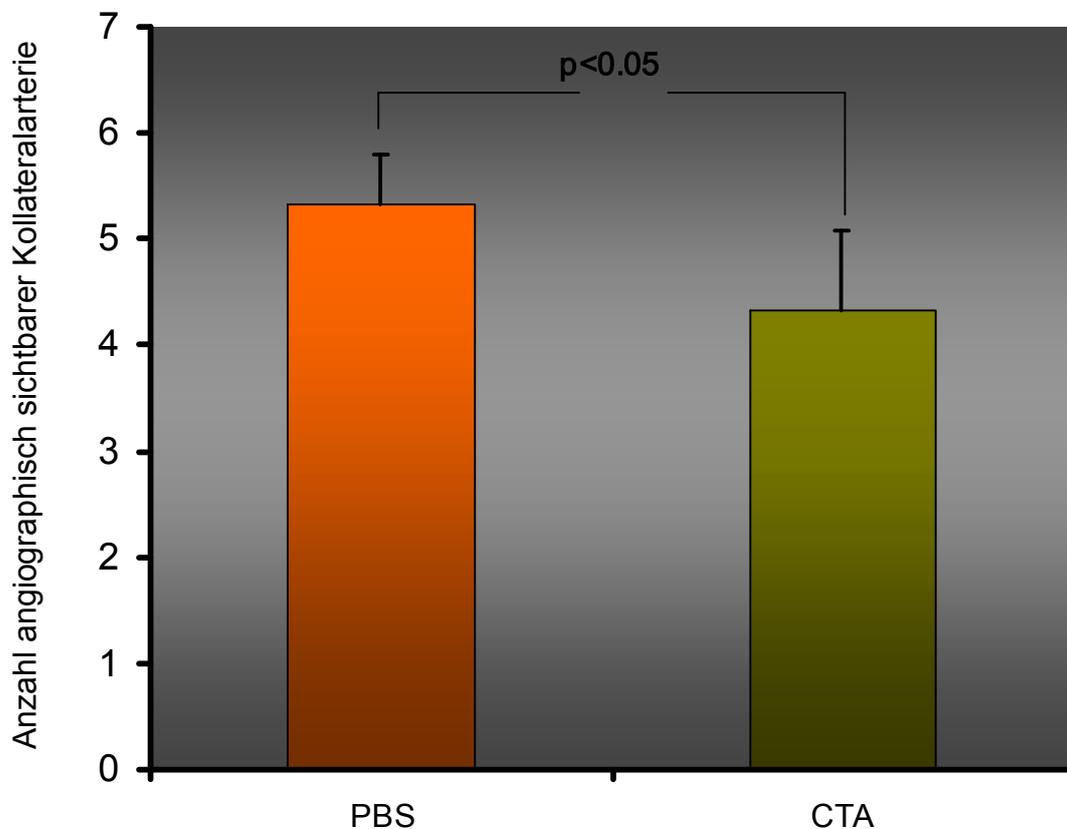


Abbildung 13: Säulendiagramm zur Darstellung der Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralarterien 7 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur samt kontinuierlicher PBS im Vergleich zur kontinuierlichen CTA 157-2 Infusion .

3.2.2. Proliferationsindexbestimmung nach 7-tägiger CTA 157-2 Injektion in die Femoralarterie im Vergleich zur 7-tägigen PBS Injektion

Um die Auswirkung der Aktivierung des membranständigen Proteasoms CTA 157-2 *in vivo* verifizieren zu können, erfolgte die Implantation zweier Minipumpen. Eine Pumpe zur direkten dauerhaften Injektion in die Femoralarterie gefüllt mit CTA 157-2 oder in der Kontrollgruppe lediglich mit PBS, sowie eine weitere Minipumpe zur kontinuierlichen subcutanen Abgabe des Thymidinanalogs BrdU. Nach 7-tägiger Injektion wurden Gewebeproben entnommen, die dann wiederum mittels immunhistologischer Färbung zur Bestimmung des Proliferationsindex führten.

Vergleicht man den Proliferationsindex der beiden Gruppen miteinander so ergibt sich eine signifikant geringere Proliferationsrate in der CTA-Gruppe ($0,60 \pm 0,5$ PBS / $0,44 \pm 0,5$ CTA; $P < 0,05$).

Proliferationsindex nach 7-tägiger PBS Injektion				
Fall	Anzahl rot	Anzahl grün	Proliferationsindex	Mittelwert
R 115	174	115	0,66091954	0,626715618
	159	103	0,647798742	
	413	236	0,571428571	
R 124	77	34	0,441558442	0,493827914
	197	111	0,563451777	
	120	62	0,516666667	
	67	34	0,507462687	
	25	11	0,44	
R 133	273	170	0,622710623	0,620763853
	493	296	0,60040568	
	388	248	0,639175258	
R 134	229	168	0,733624454	0,512251785
	319	171	0,536050157	
	322	86	0,267080745	
R 136	247	172	0,696356275	0,735274912
	465	360	0,774193548	
Mittelwert gesamt				0,597766817

Tabelle 11: Darstellung der Anzahl immunhistologisch identifizierter Zellkerne mit sich daraus ergebendem Proliferationsindex 7 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur samt kontinuierlicher PBS-Infusion.

Proliferationsindex nach 7-tägiger CTA 157-2 Injektion				
Fall	Anzahl rot	Anzahl grün	Proliferationsindex	Mittelwert
R 128	75	22	0,293333333	0,238652203
	31	6	0,193548387	
	227	52	0,22907489	
R 129	66	20	0,303030303	0,384232525
	87	35	0,402298851	
	38	17	0,447368421	
R 137	121	76	0,628099174	0,505599958
	473	310	0,655391121	
	63	20	0,317460317	
	40	22	0,55	
	61	23	0,37704918	
R 139	225	111	0,493333333	0,595565764
	224	143	0,638392857	
	127	78	0,614173228	
	44	28	0,636363636	
R 207	69	19	0,333333333	0,387134503
	95	47	0,494736842	
	42	14	0,333333333	
R 210	157	79	0,503184713	0,530515042
	327	186	0,568807339	
	716	372	0,519553073	
Mittelwert gesamt				0,440283333

Tabelle 12: Darstellung der Anzahl immunhistologisch identifizierter Zellkerne mit sich daraus ergebendem Proliferationsindex 7 Tage nach erfolgter Femoralarterienligatur samt kontinuierlicher CTA 157-2 Infusion.

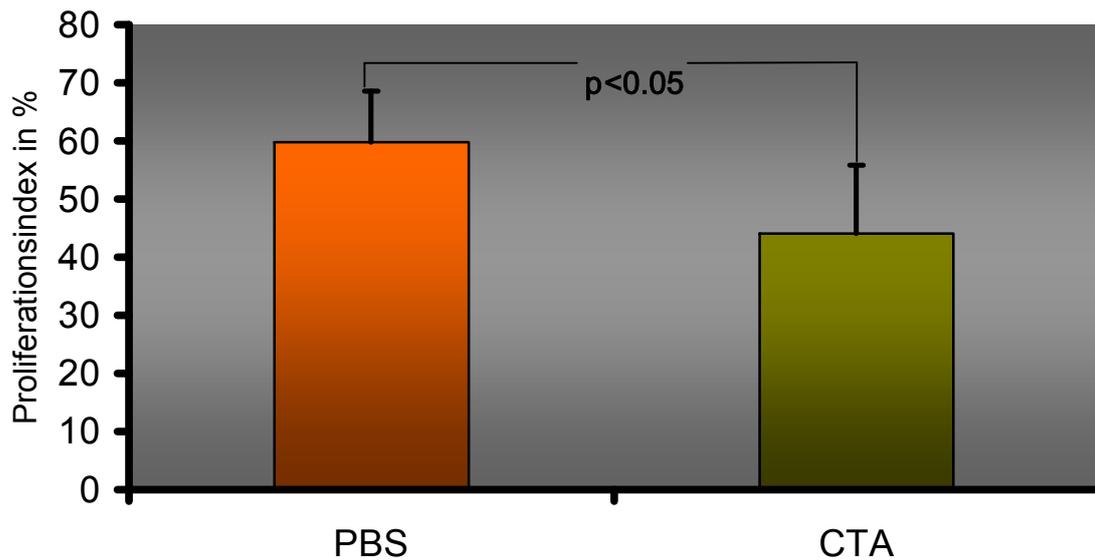


Abbildung 14: Säulendiagramm zur Darstellung des Proliferationsindex in Prozent nach kontinuierlicher 7-tägiger PBS Injektion verglichen mit kontinuierlicher CTA 157-2 Injektion ins Kollateralsystem nach erfolgter Femoralarterienligatur.

Somit konnte sowohl durch die reduzierte Anzahl an Kollateralgefäße als auch durch die verminderte Anzahl an proliferierenden Zellen ein hemmender Einfluß des CTA 157-2 auf das Kollateralwachstum nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1. Entwicklung und Beschreibung des Rattenmodells

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass Kollateralarterien aus präexistierenden Anastomosen entstehen. Es gelang die Hypothese zu beweisen, dass ein von der Angiogenese und der Vaskulogenese zu unterscheidender Mechanismus existiert und für das Kollateralwachstum verantwortlich ist. Lange wurde davon ausgegangen, daß sowohl die Angiogenese, als auch die Arteriogenese dem selben Mechanismus unterliegen. Es herrschte die Vorstellung, dass es bedingt durch die auftretende Ischämie zur Expression von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise VEGF A kommt. Diese stimulieren ihrerseits die proximal sowie distal des Gefäßverschlusses liegende Gefäße zur Kapillarsprossung. Die so entstandenen Kapillarsprossungen anastomosieren und werden durch Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen stabilisiert. Betrachtet man jedoch die Länge und Größe der arteriellen Kollateralgefäße, so erscheint der oben beschriebene Entstehungsmechanismus angesichts der kurzen Entwicklungszeitspanne eher unwahrscheinlich. Die Kollateralgefäße wachsen in einer enormen Schnelligkeit, die sich nicht ausschließlich durch kapillare Sprossung erklären lässt. Bezieht man die sonst niedrige Proliferationsrate der Gefäßzellen in vivo in die Überlegungen mit ein, so lässt sich die rasche proliferative Antwort ebenfalls nicht mit dem Entstehungsmechanismus der Angiogenese vereinbaren.

Versuche am Kaninchenhinterlauf zeigten bereits, dass das Wachstum der Kollateralarterien sehr viel schneller, als das Sprossen von Kapillaren verlief. Das Maximum an Proliferation konnte bereits innerhalb der ersten 3 Tage nach Okklusion beobachtet werden, während die Proliferation von Kapillaren sich erst 7 Tage nach Femoralarterienverschluß darstellen ließ (Ito, Arras, Scholz, Winkler, Htun und Schaper 1997). Ein weiterer Aspekt, der für die unterschiedlichen Entstehungsmechanismen spricht, ist die Beobachtung, dass Kollateralarterien hauptsächlich außerhalb des ischämischen Gebietes zu finden sind.

Die Arbeitsgruppe um Terjung konnte zeigen, dass die Angiogenese und das

Kollateralwachstum unterschiedlich auf Stickstofferschöpfung reagieren. Diese Ergebnisse bestätigen somit ebenfalls, dass es sich hierbei um zwei zu unterscheidende Mechanismen der Gefäßproliferation handelt (Lloyd, Hsiao und Terjung 2001).

Basierend auf den oben erwähnten Beobachtungen ergab sich für uns die Hypothese der "Arteriogenese" .

Entsprechend dieser Hypothese wird durch den Verschluss eines hauptversorgenden Gefäßes der gesamte Blutfluß über kleine präexistierende Verbindungen in das ischämische Gebiet geleitet. Diese Umleitung hat einen drastischen Anstieg der Flussgeschwindigkeit, und somit auch der Schubspannung zur Folge. Die Steigerung der Schubspannung bedingt eine Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen und anderen Faktoren, die zur Anlockung und Migration von Monozyten führen. Monozyten/Makrophagen sezernieren sowohl Metalloproteinasen, die für den benötigten Raum sorgen, wie auch Wachstumsfaktoren, die zur Stimulation der Proliferation von Gefäßzellen führen. Adaptativ entsteht als Resultat die Proliferation und der Umbauprozess der präexistierenden Verbindungen zur Kollateralarterie. Die Auswirkung der Schubspannung auf den Umbau von Gefäßen wurde erstmals von Glagov und Zarins beschrieben (Glagov, Zarins, Giddens und Ku 1988).

Bei unseren Untersuchungen der Kollateralzirkulation am Rattenbein fiel auf, dass sich an der selben Stelle stets eine besonders prominente Kollateralarterie ausbildete. Durch nähere angiographische und histologische Beobachtungen ließ sich dieses Kollateralgefäß bereits vor der Femoralarterienligatur als präexistierende Anastomose nachweisen. Hieraus ergab sich die Möglichkeit, das Gefäß über einen definierten Behandlungszeitraum in seiner Veränderung zu beobachten.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit beschriebenen Modells konnten wir erstmalig anhand einer identifizierten präexistierenden Kollaterale, eine genaue Proliferationskinetik erstellen. Bereits vor dessen Proliferation gelang es uns, das Kollateralgefäß eindeutig zu identifizieren, und somit die frühen Stadien des Kollateralwachstums zu untersuchen.

Das bisherige Fehlen eines solchen Modells, ließ unser Konzept der Arteriogenese für zahlreiche Interpretationen offen.

In einem Bericht von Lindner und Maciag wurde dagegen beschrieben, dass im Erwachsenenorgan die Angiogenese samt Kapillarsprossung der Arteriogenese stets vorausgeht (Lindner und Maciag 2001). Die nun gewonnenen Ergebnisse am Rattenhinterbein widersprechen dieser Art der Interpretation.

Wir können nicht ausschließen, dass unter gewissen Umständen auch im Erwachsenenorganismus ein Gefäßnetz neu entstehen kann. Unsere Arbeit jedoch zeigt, dass sich Kollateralgefäße auch unabhängig von vorangegangener Angiogenese entwickeln können. Dass es sich hierbei um einen äußerst schnellen adaptativen Prozeß handelt, konnte mehrfach bewiesen werden.

Anatomische Studien von Fulton und Baroldi konnten im Einklang mit klinischen Studien von Rentrop verdeutlichen, dass die Arteriogenese auch in menschlichen Organen den Hauptmechanismus für die Entstehung der Kollateralgefäße darstellt. Fulton und Baroldi gelang es bereits in den sechziger Jahren, in jedem menschlichen Herzen die Existenz präformierter arteriolärer Anastomosen nachzuweisen, aus denen sich relativ schnell Kollateralarterien entwickeln können (Fulton 1965; Baroldi und Scomazzoni 1967). Rentrop konnte zeigen, dass es sich beim Kollateralwachstum um einen äußerst schnellen Mechanismus handelt. Kollateralarterien ließen sich bereits zwei Wochen nach einem akuten Koronarverschluß darstellen (Rentrop, Feit, Sherman und Thornton 1989).

Interessanterweise beschränkte sich die Proliferation in unseren Versuchen lediglich auf die präexistierenden Gefäße, die tatsächlich eine Verbindung zwischen ischämischem und nicht ischämischen Gebiet herstellten. Vergleichbar große, direkt benachbarte Gefäße ohne nachweisbaren Anschluß an das Ursprungsgefäß, proliferierten nicht. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Stimulation für das Kollateralwachstum vom Inneren des Gefäßes und nicht vom umgebenden Gewebe auszugehen scheint.

Die Beobachtung, dass es sich beim Kollateralwachstum um einen sehr schnellen proliferativen Prozeß handelt, der weitgehend außerhalb des eigentlich ischämischen Gebietes und lediglich an einigen ausgewählten Gefäßen abläuft, ließe uns die Hypothese entwickeln, dass hämodynamische Kräfte als Stimulus in Frage kommen.

Eine dieser hämodynamischen Kräfte stellt die Schubspannung dar, diese ändert sich, wie bereits oben beschrieben, nach Verschluß des hauptversorgenden

Gefäßes deutlich. Die durch Glagov und Zarins festgestellte Umgestaltung der Gefäße, scheint auf das Kollateralwachstum ebenfalls zu zutreffen.

Versuche der Arbeitsgruppe um Tuttle konnten zeigen, dass sich der Umstrukturierungsgrad der Kollateralgefäße im Darm proportional zur Fluggeschwindigkeit, und somit zur Schubspannung ändert (Tuttle, Nachreiner, Bhuller, Condict, Connors, Herring, Dalsing, Unthank 2001).

Unsere Annahme, dass es sich bei der Schubspannung um den Hauptstimulus des Kollateralwachstums handelt, wurde mehrfach angezweifelt. Eine der Begründungen basiert auf den Ergebnissen, die ergaben, dass die Proliferation in der Rattenniere sich zentripetal vom ischämischen Grenzgebiet her ausbreitet (Yancopoulos, Klagsbrun und Folkman 1998). Unter der Vorstellung, dass der Blutfluß und somit auch die Schubspannung über den gesamten Verlauf der Kollateralarterie gleich sind, wäre zu erwarten, dass auch die Proliferation gleichmäßig entlang des Gefäßes auftritt und nicht wie in der Rattenniere beobachtet zentripetal.

Dieses Gegenargument beruht jedoch auf dem Irrtum, dass die Schubspannungsveränderung mit dem Blutfluß einhergeht. Die Schubspannung ist umgekehrt proportional zur dritten Potenz des Radius und proportional zur Fluggeschwindigkeit. Die zentripetale Ausbreitung der Proliferation kann somit ebenfalls ursächlich durch die Schubspannungsänderung erklärt werden, da der Durchmesser präexistierender Gefäße an den Organgrenzen am geringsten und die Schubspannung dort am höchsten ist. Eine derartige vom ischämischen Gebiet ausgehende Proliferation der Kollateralarterien spricht somit nicht gegen den Einfluß hämodynamischer Faktoren.

Dies zeigt jedoch, wie schwierig es ist, Schubspannungsberechnungen innerhalb eines Gefäßes durchzuführen, da hierbei sowohl die jeweilige Flussform, als auch die Gefäßarchitektur mitberücksichtigt werden müssen.

Wie bereits durch unsere Angiographien beschrieben, handelt es sich bei den präexistierenden Anastomosen, um stark gewundene Gefäße mit einer Vielzahl an Kurven und daraus entstandenen Durchmesservariationen. Geht man einmal mehr davon aus, dass die Schubspannung den Hauptstimulus des Kollateralwachstums darstellt, lässt sich somit auch die Mannigfaltigkeit an Proliferationsmustern innerhalb ein und desselben Gefäßes erklären.

In unseren Versuchen spiegelte sich die zunehmende Gewundenheit in der Längenzunahme des präexistenten Kollateralgefäßes wieder. Die Proliferation sowie die Zunahme des Gefäßdurchmessers erreichen eine Woche nach Gefäßverschluß ihr Maximum und sistieren dann. Im Gegensatz dazu, nimmt das Längenwachstum über den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen hinweg fortlaufend zu.

Zunächst ist innerhalb der ersten 3 Tage und ebenfalls während der ersten 7 Tage ein steiler Anstieg der Proliferation des spezifisch identifizierten Kollateralgefäßes zu beobachten, der im weiteren Beobachtungszeitraum zwischen 7 Tagen und 3 Wochen sistiert. Dahingegen nimmt die Anzahl der sichtbaren Kollateralgefäße zwischen 7 Tagen und 21 Tagen nochmals signifikant zu. Wenn man sich nun im Vergleich dazu den Gefäßdurchmesser, des auf den Angiographien dargestellten, stark ausgebildeten Kollateralgefäßes näher ansieht, ist zu beobachten, dass dieser zunächst zunimmt, doch zwischen 7 Tagen und 21 Tagen sogar abnimmt.

In der Annahme, dass die erfolgte Proliferation durch die erhöhte Flussgeschwindigkeit in den bereits präexistierenden Anastomosen nach der Femoralarterienokklusion induziert wurde, lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Der erhebliche Flussgeschwindigkeitsanstieg nach Verschluß der Arteria femoralis führt zu der signifikanten Zunahme des Proliferationsindex in dem spezifisch identifizierten Kollateralgefäß während der ersten beiden Beobachtungszeiträume. Gleichermaßen verhält sich die Größenzunahme des Gefäßdurchmessers. Die steigende Anzahl an sichtbaren Kollateralgefäßen führt jedoch dazu, dass der Blutfluß über diese Gefäße verteilt wird. Dadurch sinkt die Flussgeschwindigkeit in der zur Bestimmung des Proliferationsindex entnommenen Kollateralarterie deutlich ab. Mit dem Rückgang der Flussgeschwindigkeit fehlt nun auch der für die Proliferation notwendige Stimulus, wodurch sich der fehlende Anstieg der Proliferation von Tag 7 auf Tag 21 erklären lässt.

Geht man davon aus, dass sich der zu Beginn schnell einsetzenden Proliferationsphase eine Umbauphase anschließt, bei der sich eine Neointima im Gefäßlumen bildet, würde dies wiederum die Abnahme des Gefäßdurchmessers vergleichend zu dem Zeitraum zwischen Tag 7 und Tag 21 erklären. Ein weiterer

Hinweis auf die stattgefundenen Umbauprozesse ist die Längenzunahme des beobachteten Kollateralgefäßes. Es konnte eine vermehrte korkenzieherförmige Schlängelung beobachtet werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es sich beim Kollateralwachstum um einen biphasischen Prozeß handelt, beginnend mit einer sehr schnellen Proliferationsphase, an die sich eine Phase der Umstrukturierung anschließt.

Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten Methode gelang es uns erstmals anhand einer Proliferationskinetik nachzuweisen, dass die maximale Proliferation innerhalb der ersten drei Tage nach Femoralarterienokklusion stattfand. Histologische Studien am Kaninchenhinterbein konnten bereits zeigen, dass die maximale Proliferation innerhalb der ersten drei Tage nach Gefäßverschuß vorkam (Arras, Ito, Scholz, Winkler, Schaper und Schaper 1998). Diese Beobachtungen beruhen allerdings auf qualitativen und nicht auf quantitativen Ergebnissen. In den vorbeschriebenen Versuchen konnten Kollateralgefäße erst ab dem dritten Tag nach Femoralarterienligatur angiographisch dargestellt werden. Im Gegensatz dazu gelang es im vorliegenden Rattenmodell bereits vor erfolgter Ligatur, eine präexistierende arterielle Verbindung zu identifizieren.

Durch diese eindeutige Identifizierung ergab sich die Möglichkeit, die Arteriogenese in ihrer frühen Entstehung innerhalb eines Gefäßes zu untersuchen. Analog zum Kaninchenmodell konnten funktionelle Studien im Bezug auf die Proliferation durchgeführt werden, auf die im späteren Verlauf näher eingegangen wird.

Im Einklang mit vorangegangenen Studien konnten wir beginnend mit dem siebten Tag nach Femoralarterienverschuß, einen verstärkten Umbauprozess der Kollateralgefäße beobachten. Dieses sogenannte „Remodeling“ führt sowohl zu einer immensen Zunahme des Gefäßwanddurchmessers, als auch zu einer asymmetrischen Neointimabildung. Der Durchmesser des Gefäßlumens ändert sich dabei nicht. Die Länge des Kollateralgefäßes nimmt ebenfalls deutlich zu, was zu einer erheblichen Verstärkung der hämodynamisch ungünstigen Korkenzieherformation führt. Das endgültige anatomische und histologische Bild der beobachteten Gefäßverbindung ähnelt der typischen Erscheinungsform der Kollateralgefäße, wie sie in unterschiedlichen Organen und Arten bereits beschrieben wurde.

Unsere Ergebnisse der Proliferationskinetik sowie der angiographisch ermittelten Kollateralgefäßanzahl stimmen überein. Der Proliferationsindex erreicht nahezu sechzig Prozent und geht mit der Verdopplung des Gefäßdurchmessers einher. Die geringe, jedoch signifikante Abnahme des Kollateralgefäßdurchmessers zwischen dem siebten und einundzwanzigsten Tag nach Verschuß des Gefäßes, spiegelt sich in der ebenfalls geringen Abnahme der sich teilenden Endothelzellanzahl wieder. Dieses weist daraufhin, dass eine zusätzliche Migration sich nicht teilender Zellen in die Gefäßwand stattfindet.

Zusammenfassend handelt es sich beim Kollateralwachstum um einen biphasischen Prozeß, beginnend mit einer sehr schnellen, massiven Proliferationszunahme. Diese Steigerung der Proliferation führt innerhalb der ersten Woche nach Gefäßverschuß zu einem äußerlichen Umbauprozess. Diese Proliferationsphase verlangsamt sich im weiteren Verlauf deutlich und kommt nach einer Woche gar zu einem Stillstand. Zu diesem Zeitpunkt setzt die Remodelingphase ein, hierbei kommt es zu Veränderungen, die das Gefäßinnere betreffen. Die Umbauprozesse im Inneren des Gefäßes verursachen sowohl eine Zunahme des Gefäßwanddurchmessers, als auch eine Neointimaneubildung.

Auch wenn aufgrund dieser Ergebnisse gezeigt werden konnte, dass lokale hämodynamische Kräfte, und nicht ein einzelner chemischer Faktor, wie beispielsweise die Ischämie, für das Kollateralwachstum verantwortlich sind, ist es nicht gelungen, den direkten Beweis für die Annahme, dass die Schubspannung den Hauptstimulus der Arteriogenese darstellt, zu liefern. Die Fähigkeit, ein und dasselbe Kollateralgefäß nach der Induktion identifizieren zu können, ist jedoch die Voraussetzung, Flussmusteränderungen entlang einer präexistierenden arteriellen Verbindung und der daran beteiligten Entwicklung während des Kollateralwachstums genauer analysieren zu können.

Die molekularen Vorgänge, welche die mechanischen Kräfte letztendlich in Proliferation und Remodeling der Kollateralarterie umsetzen, bleiben ebenfalls noch unentdeckt, auch wenn bereits zahlreiche gut dokumentierte Studien versucht haben, den Einfluß der mechanischen Kräfte auf die Zellform und Zellfunktion zu ergründen (Khan und Sheetz 1997; Resnick und Gimbrone 1995). Das in dieser Arbeit beschriebene Rattenmodell ermöglicht, den Prozeß des Gefäßumbaus und der Arteriogenese genauer analysieren und beschreiben,

sowie Schlüsselmoleküle identifizieren zu können. Das Konzept der Arteriogenese öffnet ein neues Feld der Gefäßforschung vor allem unter dem Aspekt, dass bisher alle klinisch kontrollierten Studien, die versucht haben mittels Induktion der Angiogenese eine erneute Vaskularisierung eines ischämischen Gebiets zu erlangen, fehl geschlagen sind (Freedman und Isner 2001; Simons, Annex, Laham, Kleinman, Henry, Dauerman, Udelson, Gervino, Pike, Moon und Chronos 2002).

4.2. In vivo Auswirkung der Aktivierung des Proteasom- und Fokal Adhesion assoziierten Antigens

Im zweiten Teil der Arbeit machten wir uns das oben beschriebene Modell zu nutzen, um Schlüsselmoleküle zu identifizieren. Zur Identifizierung kollateralspezifischer Oberflächenmoleküle wurden in Vorversuchen zu dieser Arbeit, monoklonale Antikörper gegen Membranpräparationen von Kollateralarterien, hergestellt. Dies geschah unter der Vorstellung eine Erklärung dafür zu finden, weshalb sich das Wachstum von Kollateralarterien auf bestimmte Gefäße beschränkt. Die monoklonalen Antikörper wurden nach ihrer Kollateralspezifität aus histologischen Schnitten von Kollateralarterien und ihren Kontrollgefäßen selektioniert. Auf diese Weise wurde ein kollateralspezifischer Antikörper CTA 157-2 generiert. Dieser Antikörper wurde insbesondere auf dem Endothel proliferierender Kollateralarterien und in geringen Maße auch auf Nervengewebe exprimiert.

4.2.1. Ziel dieser Arbeit war es die funktionelle Relevanz des vom Antikörper gebunden Antigens in dem zuvor entwickelten in vivo Modell zu untersuchen.

Durch das in der Arbeit entwickelte Rattenmodell ergab sich nicht nur die Möglichkeit kollateralspezifische Moleküle zu identifizieren, sondern auch die funktionelle Rolle des generierten kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 auf das Kollateralwachstum zu analysieren.

Für die Applikation war es notwendig die zu testende Substanz lokal über einen

längeren Zeitraum in ausreichender Konzentration in das Gefäßsystem zu injizieren. Der gezielte, lokale Einsatz direkt in die Kollateralzirkulation reduziert die Gefahr der systemischen Auswirkung der Substanz, und somit entsprechender Gefäßproliferation an unerwünschter Stelle.

Zu diesem Zweck wurde eine Katheterisierung der Femoralarterie vorgenommen, um ein eigens dafür vorgesehenes Kathetersystem in das Gefäß zu installieren. An das Kathetersystem wurde eine osmotischer Minipumpe angeschlossen, die kontinuierlich über einen Zeitraum von 7 Tagen, CTA 157-2 direkt in die Kollateralzirkulation abgab. Gleichzeitig erfolgte die Ligatur der Femoralarterie distal der Katheterplatzierung.

Zur Quantifizierung wurde die Kollateraldichte mittels stereoskopischer Auswertung der Angiographien, sowie durch Färbungen histologischen Materials ermittelt.

Da durch den Eingriff selbst ein Entzündungsreiz gesetzt wurde und dieser gegebenenfalls einen angiogenetischen Stimulus darstellt, wurde zu jeder Gruppe eine Kontrollgruppe zugeordnet, die derselben Prozedur unterzogen wurde. Der Effekt der transmyokardialen Laserrevaskulisierung wurde beispielweise lediglich auf den dadurch entstandenen Entzündungsreiz zurückgeführt.

Dass die alleinige Ligatur des Hauptstammgefäßes ohne Injektion einer zu testenden Substanz bereits das Kollateralwachstum beeinflusst, konnte in den vorherigen Versuche beobachtet werden.

Vergleicht man die Gesamtzahl der angiographisch darstellbaren Gefäße nach 7-tägiger Femoralarterienligatur mit gleichzeitig kontinuierlicher Infusion von CTA 157-2 mit der Kontrollgruppe, bei der lediglich eine kontinuierliche Infusion mit PBS erfolgte, so ließ sich eine signifikant geringere Anzahl an ausgebildeten Kollateralgefäßen in der CTA-Gruppe beobachten. Das bedeutet, dass die kontinuierliche Gabe des Antikörpers in die Kollateralzirkulation in vivo zu einer Hemmung des Kollateralwachstums führte.

Identisches ergab sich durch die Bestimmung des Proliferationindexes. Hierfür erfolgte die zusätzliche Implantation einer BrdU-Pumpe ins Nackenfell der Tiere, wie bereits im Methodenteil unter 2.4 beschrieben.

Die Ergebnisse zeigten eine signifikant verminderte Anzahl an proliferierenden Zellen. Somit konnte, sowohl durch die reduzierte Anzahl an sichtbaren Kollateralgefäßen, als auch durch die verminderte Proliferationsrate ein hemmender Einfluß des CTA 157-2 auf das Kollateralwachstum nachgewiesen werden. Wie genau es zur Entfaltung dieser Wirkung kommt, und welche molekularen Bestandteile an der Übertragung beteiligt sind, wurde im Folgenden weiter ergründet.

4.2.2. Parallel durchgeführte in vitro Untersuchungen zu der Wirkung des Antikörpers auf die Migration und Proliferation von Endothelzellen (in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt von N.Janson)

Der IgM Antikörper wurde in vitro an einer Rattenendothelzelllinie RHE A erprobt. Mittels Immunhistochemie und Flußcytometrie gelang es die Bindung des Antikörpers an die Zellmembran der Rattenendothelzellen zu beweisen.

In Zellkulturversuchen wurden die RHE A Zellen, sowohl mit Medium, als auch vergleichend mit verschiedenen Konzentrationen der kollateralspezifischen Antikörpers CTA-2 inkubiert. Mittels Zugabe des Thymidinanalogs BrdU konnte die Anzahl der proliferierenden Zellen im Fax ermittelt werden.

Nach Bindung des Antikörper an die Endothelzellen ergab sich eine signifikante geringere Proliferationsrate im Vergleich zur Inkubation der Zellen im Medium.

Von weiterem Interesse war es herauszufinden, ob die Abnahme der Proliferation proportional zur steigenden Antikörperkonzentration erfolgt. In einer darauf abgestimmten zweiten Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass der Antikörper nur in einem engen Konzentrationsbereich, die oben beschriebene Wirkung zeigte.

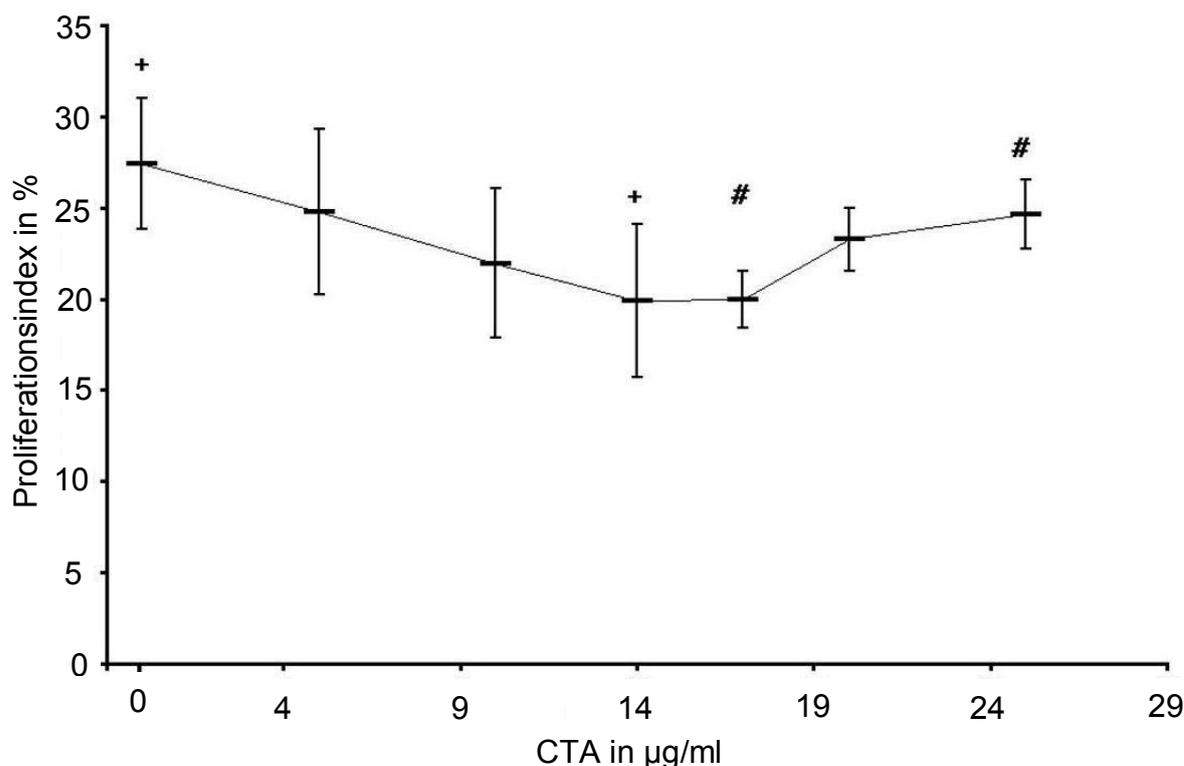


Abbildung 15: Darstellung des Proliferationsindex in Abhängigkeit von der CTA 157-2 Konzentration. CTA 157-2 führt konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation von Endothelzellen in vitro (# $P < 0,01$; + $P < 0,0001$).

Zur Bestimmung der Migration wurden Endothelzellen auf Thermanox-Plättchen ausplattiert. Unter dem Einfluß des Antikörpers sollten die Endothelzellen auf den Boden von Multiplatten migrieren. Nach Entfernen der Plättchen wurden die Zellen vom Boden der Multiplatte gelöst und die Anzahl im Faxgerät gemessen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Proliferation schien der Antikörper keine Rolle bei der Migration der Endothelzellen zu spielen. Allerdings sollte dabei bedacht werden, dass die Ursache der negativen Ergebnisse, vielleicht nicht nur in der fehlenden Wirkung des Antikörpers begründet ist, sondern sich auch aus der dafür gegebenenfalls ungünstigen Methode ergeben könnte.

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Akkumulation von Monozyten bzw Makrophagen mit dem Gefäßwachstum assoziiert ist (Arras et al. 1998). Aus diesem Grund wurde die Wirkung des kollateralspezifischen Antikörpers auf die Adhäsion von Makrophagen an Endothelzellen ebenfalls in vitro untersucht. Die gewonnen Ergebnisse wiesen darauf hin, dass der

kollateralspezifische Antikörper keinen direkt Effekt auf die Adhärenz zu haben scheint.

Zusammenfassend kann somit davon ausgegangen werden, dass der kollateralspezifische Antikörper sowohl in vivo, als auch in vitro eine signifikante Reduktion der Proliferation beim Kollateralwachstum verursacht.

4.2.3. Identifikation eines Proteasom- und Fokal Adhesion assoziierten Antigens als Regulator des Kollateralwachstums

Parallel zu den oben geschilderten Untersuchungen wurde in unserer Arbeitsgruppe Versuche durchgeführt, um die molekulare Identität des von CTA 157-2 gebundenen, kollateralspezifischen Antigens weiter zu ergründen.

Hierfür erfolgten Membranpräparationen der Rattenendothelzellen, die mittels Chromatographie und Gelfiltration näher aufgeschlüsselt wurden.

Die Untersuchungen zeigten, dass es sich um ein Antigen handelt, welches eine Größe von ca. 700 kDa besitzt, und aus mehreren Untereinheiten besteht. Nach chromatographischer Reinigung konnte eine 26 kDa α 7 und 21 kDa β 3 Untereinheit des 20S Proteasoms, als Teil des von CTA 157-2 gebundenen Proteinkomplexes, mit Hilfe der Elektrospraytechnik identifiziert werden. Die Annahme, dass das von CTA 157-2 gebundene Antigen mit dem Proteasom assoziiert, konnte durch den folgenden Versuch untermauert werden. Nach Hinzufügen des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 kam es konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der Aktivität eines rekombinant hergestellten 20S Proteasoms, im Gegensatz zur Kontrolle, bei der ein unspezifischer IgM Antikörper eingesetzt wurde, für den sich keine Aktivitätssteigerung ergab, und Lactacystin, das erwartungsgemäß die Aktivität konzentrationsabhängig unterdrückte. Die Aktivität wurde im Rahmen eines etablierten Assays über die AMC Abspaltung von LLVY durch gereinigtes 20S Proteasom und seine fluorometrische Bestimmung ermittelt. Somit konnte nicht nur die Bindung, sondern auch die direkte Stimulation des Proteasoms durch den kollateralspezifischen Antikörper gezeigt werden.

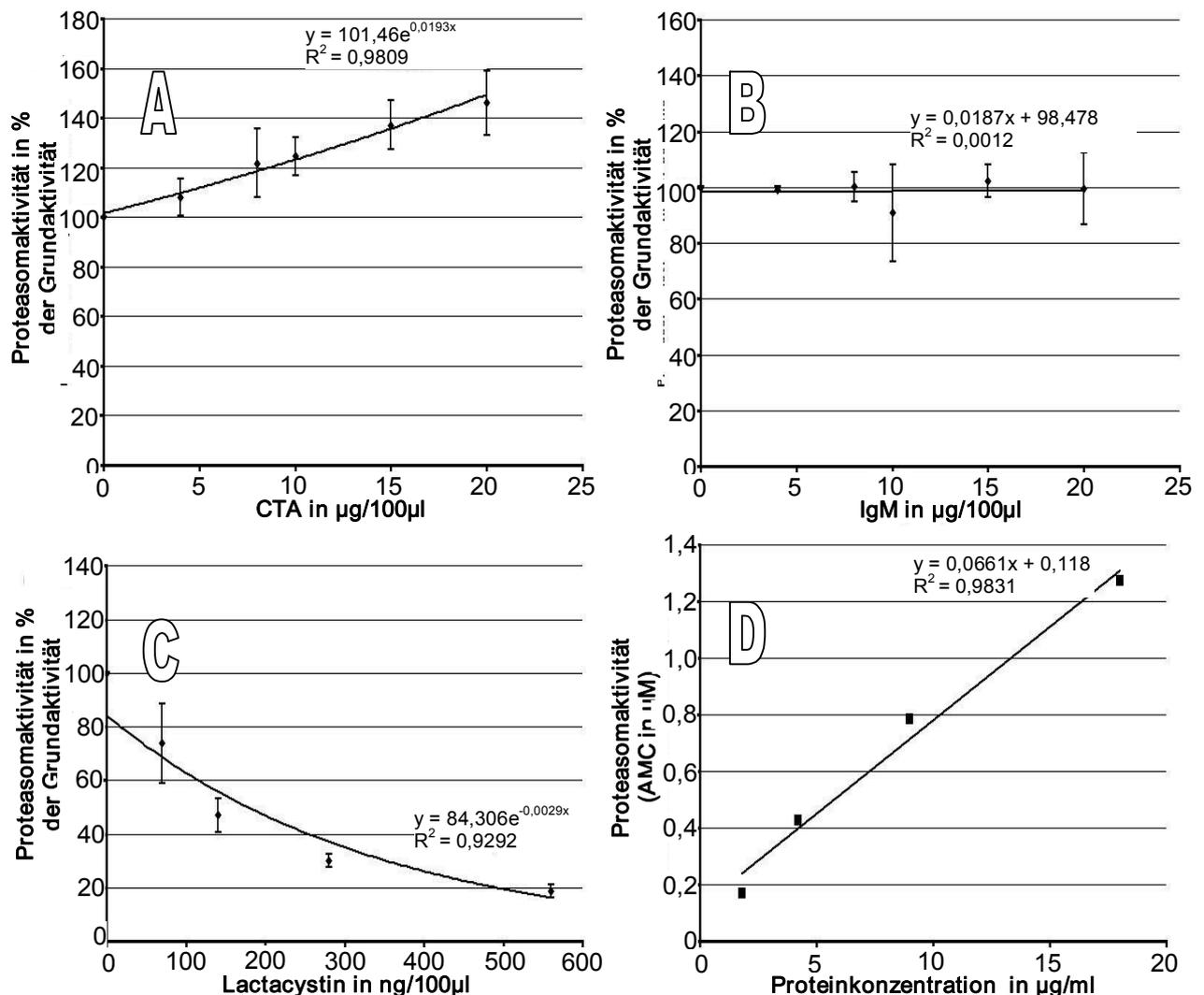


Abbildung 16: (a) Der kollateralspezifische Antikörper 157-2 führt zur Aktivierung der 20S Proteasoms, dagegen konnte (b) bei einem kommerziell erhältlichen IgM Kontrollantikörper keinerlei Effekt festgestellt werden. (c) Lactacystin unterdrückt konzentrationsabhängig die Aktivität des Proteasom. (d) Proteasomaktivierung in gereinigten Membranpräparationen nach Zugabe der kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 (Übernommen von Ito et al. 2006).

Die Stimulation der gereinigten Membranfraktionen mit CTA 157-2 führte ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung des Proteasoms.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich, bei dem von CTA 157-2 gebundenen Antigen, um ein membranständiges Molekül handelt. Dies wurde durch Fluoreszenzdoppelfärbungen und konfokale Analysen bestätigt. In diesen

konnte gezeigt werden, dass das von CTA 157-2 gebundene Antigen und Proteine der Fokalen Adhäsionspunkte wie Paxillin, Plectin, Vinculin und $\beta 3$ Integrin koexprimiert waren.

Das Proteasom ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus zwei 7α und zwei 7β Untereinheiten, wobei die 7 Proteine jeweils einen Ring bilden. Die beiden katalytischen, für die Proteindegradation zuständigen 7β Ringe liegen innen und werden durch die beiden α Ringe umgeben. Erst durch Öffnen der α Ringe, was spezifisch durch einen weiteren Proteinkomplex bewerkstelligt wird, gelangt das zu degradierende Protein zu den β -Untereinheiten. In der Regel ist die vorherige Verbindung des zu degradierenden Proteins mit Ubiquitin notwendig (Hochstrasser 1996; Hershko und Ciechanover 1998). Durch diesen Mechanismus des gesteuerten und spezifischen Abbaus von Proteinen ist es der Zelle möglich, sehr schnell auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Wichtige Proteine werden ständig synthetisiert und wieder proteasomal abgebaut. Durch Steuerung des proteasomalen Abbaus kann die Zelle die Expression dieser Proteine sehr schnell und sehr fein regulieren. Dementsprechend könnte die Bindung des Antikörpers CTA 157-2 an das Proteasom eine Degradation von Proteinen in der Zelle hervorrufen, die für die Feinregulierung des Kollateralwachstums notwendig sind.

Entsprechend würde die Aktivierung des Proteasoms in vivo zur reduzierten Proliferationsrate und verminderten Anzahl an sichtbaren Kollateralarterien führen. Auf der Suche nach Erklärungen dieser Beobachtungen auf zellulärer Ebene wurde in bereits beschriebenen, parallel zu dieser Arbeit durchgeführten in vitro Versuchen gezeigt, dass die Behandlung mit CTA 157-2 zu einer Reduktion der Proliferation führt, jedoch keinen Einfluss auf die Migration hat. Hervorzuheben ist dabei, dass diese Beobachtung nur für einen bestimmten Konzentrationsbereich gilt, wird dieser überschritten, kommt es wiederum zur Abnahme der Proliferationsrate.

Anhand der geschilderten Befunde stellten wir folgende Hypothese zur Wirkung des kollateralspezifischen Antikörpers 157-2 auf:

Zu Beginn des Kollateralwachstums kommt es zu einem Anstieg der Expression des von CTA 157-2 erkannten Proteasom assoziierten Antigens. Dadurch wird ein schneller und gesteuerter, posttranskriptioneller Umbau der fokalen

(a) Nach Verschluss des Hauptversorgungsgefäßes sind die Endothelzellen der präexistierenden arteriellen Anastomosen einem dramatischen Anstieg der Schubspannung ausgesetzt (b) Aktivierung des Proteasoms in der Zellwand der Endothelzellen führt zu (c) Degradation und Neubildung der fokalen Adhäsionsproteine und die daraus resultierende zytoskelettale Anpassung an die veränderte Schubspannung (d) Mit zunehmender Aktivierung des Proteasoms verändert sich das Zytoskelett, sowie die Kräfteverteilung, angepaßt an die Schubspannungsänderungen (e) Die zellulären Kräfteverteilungen konzentriert sich unter anderem auf die fokalen Adhäsionsmoleküle und ist für die Integration zahlreicher Zellvorgänge, wie beispielsweise die Migration und die Proliferation, verantwortlich. Veränderungen der Schubspannung führen zur entsprechenden Anpassung der Proliferation (Übernommen und ergänzt von Ingber 2003).

4.3. Ausblick

Für den therapeutischen Einsatz des Kollateralwachstums zur Behandlung von arteriellen Verschlusskrankheiten samt koronarer Herzkrankheit, sollte das Augenmerk zuerst auf die frühe Proliferationsphase gelenkt werden. In der sich anschließenden Umbauphase kommt es zu ungünstigen Veränderungen in Bezug auf die Hämodynamik der Gefäße. Die zunehmende korkenzieherartige Deformierung, sowie die Ausbildung einer Neointima mit daraus resultierender Verkleinerung des Gefäßdurchmessers limitieren den Nutzen des Kollateralgefäßes. Durch die Kollateralzirkulation lässt sich lediglich ein Fluß erreichen, der um circa 40 Prozent unter dem Maximalfluß durch das verschlossene Hauptstammgefäß bleibt (Ito 2003). Kritisch äußert sich dies bei Patienten, deren Versorgung von mehreren dieser kollateralen Umgehungskreisläufe abhängig ist, die ihrerseits wiederum von stenosierten Hauptgefäßen gespeist werden. Diese Patienten kommen für die herkömmlichen, konventionellen Revaskulationsverfahren leider nicht in Frage, sie würden jedoch von einer, die frühe Proliferationsphase steigernde, therapeutischen „Arteriogenese“ profitieren.

Andererseits könnte die Umbauphase durch Inhibitoren dahingehend beeinflusst werden, dass es nicht zur hämodynamisch ungünstigen Modellierung der Gefäße kommt.

Da wir davon ausgehen, dass die Schubspannung und deren Umwandlung in

molekulare Antworten einen entscheidenden Stimulus für das Kollateralwachstum darstellen, sollten in folgenden Studien, die daran beteiligten Mechanismen weiter erforscht werden.

Wie es letztendlich zur Mechanotransduktion, also zur Umwandlung von Schubspannung in molekulare Antworten kommt, bleibt ungeklärt.

Durch die Identifizierung des Proteasom- und Focal Adhesion assoziierten Antigens, welches insbesondere auf dem Endothel von Kollateralarterien hochreguliert wurde, ergibt sich ein Angriffspunkt der möglichen Steuerung.

Gelingt es die daran beteiligten Mechanismen näher zu identifizieren, könnte über extrazelluläre Liganden steuernd und modifizierend in die proteosomale Degradation eingegriffen werden. Anhand des kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 konnte gezeigt werden, dass eine Steuerung dieser Prozesse von außen möglich ist.

Sollte sich die am Ende dieser Arbeit aufgestellte Hypothese bestätigen, wäre es mit Hilfe spezifischer Proteasominhibitoren oder Proteasomaktivatoren möglich, die zytoskelettäre Adaptation der Zelle auf die Änderungen der Schubspannung zu beeinflussen, und damit eine Reihe von pathologischen bzw. physiologischen Adaptationsvorgängen, wie beispielsweise das Kollateralwachstum, zu steuern.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass Kollateralarterien aus präexistierenden Anastomosen entstehen.

Wir entwickelten ein Modell, welches es ermöglicht eine präexistierende arterielle Gefäßverbindung bereits vor der Proliferation zu identifizieren und über einen festgelegten Beobachtungszeitraum in ihrer Veränderung zu beobachten. Durch diese eindeutige Identifizierung gelang es, die „Arteriogenese“, das Wachstum von Kollateralgefäßen aus präexistierenden Anastomosen, in ihrer frühen Entstehung an einem Gefäß zu untersuchen.

Mit Hilfe dieses Modells konnten wir sowohl eine Proliferationskinetik des Kollateralgefäßwachstums erstellen, sowie die Anzahl an angiographisch sichtbaren Kollateralarterien bestimmen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass es sich beim Kollateralwachstum um einen biphasischen Prozeß handelt, beginnend mit einer sehr schnellen Proliferationsphase, an die sich eine Phase der Umstrukturierung anschließt. Dieses so genannte „Remodeling“ führt sowohl zu einer immensen Zunahme des Gefäßwanddurchmessers, als auch zu einer asymmetrischen Neointimabildung. Der Durchmesser des Gefäßlumens ändert sich dabei nicht. Die Länge des Kollateralgefäßes nimmt deutlich zu, was zu einer erheblichen Verstärkung der hämodynamisch ungünstigen Korkenzieherformation führt.

Das in dieser Arbeit beschriebene Rattenmodell erlaubte, den Prozeß des Gefäßumbaus und der Arteriogenese genauer zu analysieren und zu beschreiben, sowie Schlüsselmoleküle identifizieren zu können. So wurde an Hand des in der Arbeit entwickelten Rattenmodells ein kollateralspezifisches Molekül identifiziert, dessen funktionelle Rolle im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurde. Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten den Hinweis erbracht, dass es sich bei dem von dem kollateralspezifischen Antikörpers CTA 157-2 gebundenen Antigen um ein Proteasom- und Focal Adhesion assoziiertes Molekül handelt. Der Antikörper selbst vermochte das Proteasom zu aktivieren.

Die Quantifizierung der Kollateraldichte mittels stereoskopischer Auswertung von Angiographien und Ermittlung des proliferativen Indexes an Hand des Einbaus von Bromodesoxyuridin zeigten, dass die Aktivierung des Antigens durch CTA

157-2 zu einer Reduktion des Kollateralwachstums führte. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen somit die Möglichkeit nahe, durch die Steuerung des proteasomalen Abbaus gezielt das Kollateralwachstums beeinflussen zu können.

6. Literaturverzeichnis

Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W (1998) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 101: 40-50

Baroldi G and Scomazzoni G (1967) Coronary circulation in the normal and pathologic heart. Washington: Office of the Surgeon General, Department of the Army

Buschmann I, Schaper W (1999) Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth. *News in Physiological Science* Vol 14, No. 3: 121-125

Buschmann I, Schaper W (2000) The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol* 190: 338-342

Bussolino F, Mantovani A, Persico G (1997) Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 22: 251-256

Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6: 389-395

Carmeliet P, Jain R (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257

Chapell DC, Varner SE, Nerem RM, Medford RM, Alexander RM (1998) Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circulation Research* 82: 532-539

Dean CJ (1998) Preparation and testing of monoclonal antibodies to recombinant protein in immunchemical protocols. J.D. Pound editor, Humana press, Totowa New Jersey 23-37

Deindl E, Buschmann I, Hoefler I, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W (2001) Role of ischemia and hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circulation Research* 89: 779-786

Freedman S, Isner J (2001) Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33: 379-393

Fulton WFM (1965) *The coronary arteries*. Springfield, Illinois: Charles C Thomas

Glagov S, Zarins C, Giddens D, Ku D (1988) Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 112(10): 1018-31

Hershko A and Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Ann. Rev. Biochem.* 67: 425-479

Herzog S, Sager H, Khmelevski E, Deylig A and Ito WD (2002) Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J. Physiol.* 283: H 2012-2020

Hochstrasser M (1996) Ubiquitin- depend protein degradation, *Ann.Rev. Genet.* 30: 405-439

Ingber D (2003) Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J. Cell Science* 116, 1397-1408

Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W (1997) Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol* 273: H 1255-1265

Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W (1997) Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 80: 829-837

Ito WD (2003) Why we need arteriogenesis research. *Endothelium* 10:193-195

Ito WD, Lellek H, Bergmann J, Herzog S, Janson N, Obermeyer N, Tiede P, Deylig A, Buck F, Schaper W, Meinertz T (2006) Identification of transmembraneous proteasome as novel regulator of collateral growth. Submitted for publication

Khan S, Sheetz M (1997) Force effects on biochemical kinetics. *Annual Review of Biochemistry* 66: 785- 805

Kosaki K, Ando J, Korenaga R, Kurokawa T, Kamiya A (1998) Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization. *Circulation Research* 82: 794-802

Lindner V, Maciag T (2001) The putative convergent and divergent natures of angiogenesis and arteriogenesis. *Circulation Research* 89: 747

Lloyd P, Hsiao T, Terjung R (2001) Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 281: H2528-H2538

Longland CJ (1953) The collateral circulation of the limb. *New Ann R Coll Surg Engl* 13:161-164

Rentrop KP, Feit F, Sherman W, Thornton JC (1989) Serial angiographic assessment of coronary artery obstruction and collateral flow in acute myocardial infarction- report from the second mount Sinai- new york university reperfusion trial. *Circulation* 80: 1166-1175

Resnick N, Gimbrone MA (1995) Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 9: 874-882

Risau W, Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 73-91

Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674

Schaper W, Schaper J (1993) Collateral Circulation-Heart, Brain, Kidney, Limbs. Boston, Dordrecht, London, Kluwer Academic Publishers

Schaper W, Ito WD (1996) Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation Research* 79: 911-919

Schaper W, Helisch A (2000) Angiogenesis and arteriogenesis-not yet for prescription. *Z Kardiol* 89: 239-244

Simons M, Annex B, Laham R, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse M, Moon T, Chronos NA (2002) Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2 ; double- blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 105: 788-793

Topper JN, Gimbrone MA (1999) Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* 5: 40-46

Tuttle J, Nachreiner R, Bhuller A, Condict K, Connors B, Herring B, Dalsing M, Unthank J (2001) Shear level influences resistance artery remodelling: wall dimensions, cell density and eNOS expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281(3): H1380-H1389

Van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefler I, Voskuil M, Schaper W (2001) Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Card Res* 49:543-553

Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J (1998) Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 93: 661-664

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Thomas Meinertz als Leiter des Instituts der experimentellen Kardiologie der Universität Hamburg. Besonderen Dank möchte ich Herrn PD Dr. Wulf Ito aussprechen, der mich während der gesamten experimentellen Arbeit betreut hat und selbst das Ende des schriftlichen Parts über 660 km hinweg möglich gemacht hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Medizinisch Technischen Assistentinnen Frau Juliane Bergmann und Frau Andrea Deylig für die labortechnische Anleitung und Unterstützung bei zahlreichen Fragen und Nervereien über ein ganzes Jahr hinweg.

Danke meiner Freundin Nina Janson für das gemeinsame Medizinstudium und den Abschluß unserer Dissertationen. Gemeinsam mit ihr habe ich mich durch all die Vorlesungen und Klausuren des Studiums gekämpft und nur mit ihr waren die wahnartigen Lernphasen möglich, denn keine andere hätte dafür Lust und vor allem Mut aufgebracht.

Mein Dank gilt auch Stefan Groth und Sebastian Thöm für den gemeinsamen Beginn an den experimentellen Arbeiten, die anfangs mit viel Frust und Verzagen verbunden waren.

Mein ganz herzlicher Dank gilt auch Sven Mörk, für die mehrfache Durchsicht des Manuskriptes, sowie für die viele Hilfe bei der Formatierung der Arbeit mit dem PC.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, meinen Eltern und meinen Großeltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben und mich zu dem gemacht haben, was ich heute bin. Insbesondere danke ich meinem damaligen Freund und heutigen Ehemann Marc für unser gemeinsames Leben und seine bedingungslose Liebe zu mir.

Lebenslauf

Name: **Sandra Traub, geb. Herzog**

Wohnort: **Baldung-Grien-Strasse 26
75173 Pforzheim
Tel.: 07231 / 418685**

Geburtstag: **25.05.1976**
Geburtsort: **Pforzheim**
Familienstand: **verheiratet**
Nationalität: **deutsch**

Schulbildung

1987-1996 Schiller-Gymnasium in Pforzheim

06/1996 Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr

11/1996- 03/1997 Städtisches Klinikum Pforzheim
-Krankenpflegehelferin -

Studium

04/1997- 09/2002 Studium der Humanmedizin an der
Universität Hamburg

04/1999 Ärztliche Vorprüfung
04/2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
09/2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen
Prüfung

10/2002-11/2003 Medizinstudentin im Praktischen Jahr
am Städtischen Klinikum Pforzheim,
Akad. Lehrkrankenhaus der Universität
Heidelberg

11/2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

01/2004-09/2004

Ärztin im Praktikum in der Frauenklinik
des Klinikum Pforzheims

10/2004- dato

Assistenzärztin in der Frauenklinik des
Klinikum Pforzheim

Promotion

05/2000

Beginn der experimentellen Arbeit
unter der Anleitung von Priv. Doz. Dr.
Wulf Ito, Arbeitsgruppe „Arteriogenesis
and Collateral Targeting“
Medizinische Klinik III, Kardiologie und
Angiologie, Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Veröffentlichung

07/2002

**Herzog S, Sager H, Khmelevski E,
Deylig A and Ito WD (2002) Collateral
arteries grow from preexisting
anastomoses in the rat hindlimb. Am J.
Physiol. 283: H 2012-2020**

Erklärung

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 oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens) Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

Sandra Traub