

Identifizierung von Schlüsselgenen der Arteriogenese  
und Induktion des Kollateralwachstums in einem  
klinisch relevanten Ischämiemodell im peripheren  
Kreislauf des Schweines

---

**ANNA-SOPHIA SCHILP**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Wiederkäuer und Schweine,  
Professur für Schweinekrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

**und**

der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim und dem  
Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung  
(W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für experimentelle Kardiologie), Bad Nauheim

Betreuer: Prof. Dr. A. Elsässer

**Identifizierung von Schlüsselgenen der Arteriogenese und  
Induktion des Kollateralwachstums in einem klinisch  
relevanten Ischämiemodell im peripheren Kreislauf des  
Schweines**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Anna-Sophia Schilp**

Tierärztin aus Mannheim

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

---

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner  
Prof. Dr. A. Elsässer

Tag der Disputation: 18.06.2012

- Meinen Eltern -

# Inhalt

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
1.1	HINTERGRUND	1
1.2	ZIELSETZUNG	3
<b>2</b>	<b><u>LITERATUR</u></b>	<b>4</b>
2.1	GEFÄßWACHSTUM	4
2.1.1	VASKULOGENESE	5
2.1.2	ANGIOGENESE	5
2.1.3	ARTERIOGENESE	7
2.1.3.1	Historischer Überblick Kollateralarterien	8
2.1.3.2	Morphologie	10
2.1.3.3	Schubspannung	11
2.1.3.4	Zeitverlauf der Arteriogenese	12
2.1.3.5	Unvollständigkeit der Arteriogenese	14
2.2	TRP-KANÄLE UND REGULATION DES VASKULÄREN TONUS	15
2.2.1	DIE VERSCHIEDENEN TRP-FAMILIEN	16
2.2.2	EIGENSCHAFTEN DER TRP-KANÄLE	16
2.2.3	ALLGEMEINE STRUKTUR DER TRP-KANÄLE	16
2.2.4	TRPV-FAMILIE	17
2.2.5	TRPV4	18
2.3	KALZIUMABHÄNGIGE FAKTOREN	23
2.3.1	DREAM	23
2.3.2	NFATc1	23
2.3.3	CREB1	24
2.3.4	AP-1	25
2.4	TIERMODELLE IN DER ARTERIOGENESE	26
2.4.1	WAHL DER METHODE	26
2.4.2	WAHL DER TIERART	28
<b>3</b>	<b><u>METHODEN</u></b>	<b>29</b>
3.1	VERSUCHSPLAN	29
3.2	TIERVERSUCHE	30
3.2.1	VERSUCHSTIERE	30

3.2.2	AUFBAU UND BESCHICKUNG DER OSMOTISCHEN MINIPUMPEN	31
3.2.3	PRÄMEDIKATION UND OPERATIONSVORBEREITUNG	32
3.2.4	NARKOSE	32
3.2.5	VORGEHEN BEI DER ERSTEN OP	33
3.2.6	POSTOPERATIVE VERSORGUNG	35
3.2.7	VORGEHEN BEI DER ZWEITEN OP NACH 7 TAGEN	35
3.2.8	COLLATERAL FLOW INDEX (CFI)	37
<b>3.3</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMIE</b>	<b>38</b>
3.3.1	HERSTELLUNG DER SILANE BESCHICHTETEN OBJEKTTRÄGER	38
3.3.2	HERSTELLUNG DER GEFRIERSCHNITTE	38
3.3.3	HÄMALAUN-EOSIN-FÄRBUNG (HE-FÄRBUNG)	39
3.3.4	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	39
3.3.4.1	Färbeprotokolle	40
3.3.5	MIKROSKOPIE	43
3.3.6	ZÄHLUNG DER ARTERIENDICHTE	44
3.3.7	KI67-ZÄHLUNG	44
<b>3.4</b>	<b>QUANTITATIVE ANALYSE VON RNA</b>	<b>45</b>
3.4.1	RNA-ISOLATION	45
3.4.2	CDNA-SYNTHESE	46
3.4.3	PRIMER-AUSWAHL	46
3.4.4	QUALITATIVE REAL-TIME PCR	47
<b>3.5</b>	<b>WESTERN BLOT</b>	<b>48</b>
3.5.1	PROTEINEXTRAKTION AUS DEM PROBENGeweBE	48
3.5.2	PROTEINBESTIMMUNG NACH LOWRY	48
3.5.3	SDS-GELELEKTROPHORESE	49
3.5.4	TRANSFER DER PROTEINE AUF NITROZELLULOSEMEmBRAN	49
3.5.5	IMMUNFÄRBUNG	49
<b>3.6</b>	<b>STATISTIK</b>	<b>50</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>DRUCKMESSUNGEN UND CFI</b>	<b>52</b>
<b>4.2</b>	<b>ANGIOGRAPHIEN</b>	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>ZELLPROLIFERATION</b>	<b>55</b>
<b>4.4</b>	<b>ARTERIEN-/ARTERIOLENDICHTE IN DER ADDUKTOREN MUSKULATUR</b>	<b>58</b>
<b>4.5</b>	<b>UNTERSUCHUNG MOLEKULARER MECHANISMEN DER ARTERIOGENESE</b>	<b>60</b>
4.5.1	TRPV4	61
4.5.2	DOWNSTREAM REGULATORY ELEMENT ANTAGONIST MODULATOR (DREAM)	64

4.5.3	NFATc1 (NUCLEAR FACTOR OF ACTIVATED T-CELLS)	66
4.5.4	CREB1 (cAMP RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN 1)	71
4.5.5	AP-1	73
4.5.5.1	C-JUN (V-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog)	73
4.5.5.2	c-fos (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog)	75
4.5.6	DEN UNTERSUCHTEN TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NACHGESCHALTETE GENE	76
<b>5</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>80</b>
<b>5.1</b>	<b>TIERMODELL</b>	<b>80</b>
5.1.1	DAS SCHWEIN ALS VERSUCHSTIER	80
5.1.2	EINFACHE LIGATUR DER A. FEMORALIS VS. SHUNT-OPERATION	81
<b>5.2</b>	<b>HÄMODYNAMISCHE PARAMETER</b>	<b>83</b>
<b>5.3</b>	<b>MORPHOLOGISCHE PARAMETER</b>	<b>85</b>
5.3.1	ANGIOGRAPHIE	85
5.3.2	ARTERIENZÄHLUNG UND PROLIFERATION VASKULÄRER ZELLEN	86
<b>5.4</b>	<b>TRPV4</b>	<b>88</b>
<b>5.5</b>	<b>KALZIUMABHÄNGIGE WACHSTUMSFAKTOREN</b>	<b>90</b>
<b>5.6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b><u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b>120</b>
<b>10</b>	<b><u>TABELLENVERZEICHNIS</u></b>	<b>122</b>
<b>11</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b>123</b>
<b>11.1</b>	<b>OPERATIONSZUBEHÖR</b>	<b>123</b>
11.1.1	MEDIKAMENTE UND CHEMIKALIEN	123
11.1.2	GERÄTE	124
11.1.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	124
<b>11.2</b>	<b>LABORZUBEHÖR</b>	<b>125</b>
11.2.1	GERÄTE	125

11.2.2	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	126
11.2.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	128
<b>11.3</b>	<b>ANTIKÖRPER</b>	<b>128</b>
11.3.1	PRIMÄRANTIKÖRPER FÜR IMMUNHISTOCHEMIE	128
11.3.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER FÜR IMMUNHISTOCHEMIE	129
11.3.3	DETEKTIONSSYSTEM FÜR BIOTINYLIERTE SEKUNDÄRANTIKÖRPER (IMMUNHISTOCHEMIE)	129
11.3.4	PRIMÄRANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT	129
11.3.5	SEKUNDÄRANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT	130
<b>11.4</b>	<b>VERWENDETE PRIMER-OLIGONUKLEOTIDE</b>	<b>130</b>
<b>11.5</b>	<b>HERSTELLUNG VON PUFFERN</b>	<b>131</b>
11.5.1	HERSTELLUNG DES GELATINE-KONTRASTMITTELS	131
11.5.2	PHOSPHATGEPUFFERTE KOCHSALZLÖSUNG (PBS)	131
11.5.3	MOWIOL 4-88	131
11.5.4	4%IGE FORMALDEHYDLÖSUNG	131
11.5.5	ZITRATPUFFER	132
11.5.6	TBST-PUFFER	132
11.5.7	TRANSFERPUFFER	132
<b>12</b>	<b><u>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</u></b>	<b>133</b>
<b>13</b>	<b><u>ERKLÄRUNG</u></b>	<b>134</b>
<b>14</b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b>135</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
$\eta$	Blutviskosität
$\mu\text{m}$	Mikrometer
4 $\alpha$ PDD	4 $\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate
A.	Arterie
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ABRA	Actin binding rho activating protein
Ang-1	Angiopoietin-1
bFGF	basic fibroblast growth factor
BIPAP-ASB-Modus	biphasic intermittent positive airway pressure mit assisted spontaneous breathing
BK <sub>Ca</sub>	Ca <sup>2+</sup> -aktivierter K <sup>+</sup> -Kanal
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CFI	Collateral flow index
c-fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CICR	Ca <sup>2+</sup> -induzierte Ca <sup>2+</sup> -Freisetzung
C-JUN	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1
C <sub>t</sub> -Wert	threshold cycle = Schwellenwert
CVP	zentraler Venendruck
CYP	Cytochrom P450 Epoxygenase
DAPI	4,6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dd H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dr	Radiusänderung
Draq5	1,5-Bis[[2-(dimethylamino)ethyl]amino]-4,8-dihydroxyanthracene-9,10-dion
Dream	downstream regulatory element antagonist modulator
dv	Geschwindigkeitsveränderung

dyn/cm <sup>2</sup>	Einheit der Schubspannung
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EET	Eicosatriensäure
eNOS	endotheliale Stickstoff-Synthetase
GMCSF	granulocyte-monocyte-colony-stimulating factor
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HIF-1	hypoxia-inducible factor-1
HRE	hypoxia-response element
HRP	horseradish peroxidase
ICAM-1	intracellular adhesion molecule
I <sub>CRAC</sub>	calcium-release-activated-current
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IGF-1	insulin-like growth factor-1
K <sup>+</sup>	Kalium
KHK	Koronare Herzkrankheit
M.	Muskel
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEF2c	myocyte enhancer factor 2c
min	Minute
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MW±SEM	Mittelwert ± Standardfehler
NaCl	isotonische Kochsalzlösung
NFATc1	nuclear factor of activated T-cells c1
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffsynthase
P <sub>Ao</sub>	Blutdruck in der Aorta
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheiten
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	platelet derived growth factors
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule

PEEP	positiv endexpiratorischer Druck
PFA	Paraformaldehyd
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
P <sub>O<sub>cc</sub></sub>	Blutdruck im poststenotischen Gebiet
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
Q	Blutfluss
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RR	Ruthenium Rot
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s <sup>-1</sup>	Einheit der Scherrate
SDS	sodium dodecyl sulfate = Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SEM	Standard error of mean
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSRE	shear-stress-responsive-element
Tab.	Tabelle
TBST	tris buffered saline tween
Tie2	endothelium-specific receptor tyrosine kinase 2
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TRPV4	transient receptor potential channel, Unterfamilie V, Mitglied 4
V.	Vene
VCAM-1	vascular adhesion molecule
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
VEGF $\alpha$	vascular endothelial growth factor $\alpha$
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor-Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind laut Jahresbericht der Weltgesundheitsorganisation (WHO) weltweit die häufigste Todesursache (WHO 2004). Vor allem in Zentral- und Osteuropa, sowie in Asien zeigte sich in den vergangenen Jahren eine Zunahme der Inzidenz koronarer Herzerkrankungen. Auch in Afrika kommt es infolge verstärkten Tabakgenusses in Kombination mit einer hohen Prävalenz von Bluthochdruck trotz der vergleichsweise geringen Lebenserwartung zu einem Anstieg von Todesfällen durch kardiovaskuläre Erkrankungen (Helisch und Schaper 2003). Diese sind in der Regel durch Arterienverschlüsse als Komplikation der Atherosklerose bedingt und führen zu den Krankheitsbildern der *koronaren Herzkrankheit* (KHK), der ischämischen cerebralen Krankheit und der *peripheren arteriellen Verschlusskrankheit* (pAVK). Als wichtigste Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen sind arterielle Hypertonie, Rauchen, Diabetes Mellitus, Fettstoffwechselstörung, mangelnde Bewegung und Übergewicht zu nennen (WHO 2005).

Auch wenn periphere arterielle Verschlüsse selten zum Tode führen, so kommt es jedoch zunächst zu belastungsabhängigen ischämischen Schmerzen distal der Stenose, welche als *Claudicatio intermittens* (intermittierendes Hinken, auch *Schlaufensterkrankheit*) bezeichnet werden. Bei fortschreitender Erkrankung treten häufig Nekrosen und/oder Gangrän auf, welche nicht selten zur Amputation der betroffenen Gliedmaße führen.

Mögliche Folgen atherosklerotischer Verengungen der Koronargefäße hingegen haben eine Ischämie des Myokards zur Folge, welche sich klinisch als Angina pectoris manifestiert. Zusätzlich kann es zu plötzlichen Rupturen der artherosklerotischen Plaques mit darauf folgendem thrombotischen Verschluss des Gefäßes und Tod des Patienten durch Myokardinfarkt kommen (Roskamm 1996).

In den vergangenen Jahrzehnten wurden einige effektive Methoden etabliert, um stenosierte Gefäße zu revaskularisieren. Techniken wie die *perkutane transluminale Koronarangioplastie* (PTCA), welche kathetergestützt minimalinvasiv durchgeführt wird, oder operative Bypassverfahren wurden optimiert. Allerdings können diese die Ursachen vaskulärer Veränderungen langfristig nicht beseitigen und sind äußerst

kostenintensiv, womit sie für viele Patienten außerhalb der westlichen Industrieländer unzugänglich sind. Zusätzlich besteht bei Revaskularisierung das relativ hohe Risiko einer Restenose (bei etwa 50% der Patienten nach PTCA ohne Stentimplantation) oder Thrombosierung (Hamawy et al. 1999).

Nicht immer jedoch muss auf den Verschluss einer Koronararterie zwangsläufig der Tod des Patienten folgen. Seit Etablierung der Koronarangiographie ist bekannt, dass auch Patienten mit hochgradigsten Gefäßstenosen manchmal nur über minimale Beschwerden klagen und auch einen kompletten Gefäßverschluss ohne Infarkt überleben können. Bei diesen Patienten können Umgehungskreisläufe dargestellt werden, welche die verschlossenen Gefäße in der Versorgung des Myokardareals ersetzen. Solche Ersatzgefäße werden als Kollateralgefäße und aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu einem chirurgischen Bypass auch als *natürliche Bypässe* bezeichnet. Wie bei chirurgischen Bypässen verbinden sie offene Gefäße mit dem postokklusiven Verlauf der verschlossenen Arterie und sichern somit die Versorgung der betroffenen Gewebsareale.

Kollateralarterien gehen aus präexistierenden arterio-arteriellen Anastomosen hervor, welche infolge Schubspannungszunahme nach Gefäßverschluss in kurzer Zeit zu funktionellen Arterien umgebaut werden. Für diesen Prozess wurde der Terminus „Arteriogenese“ etabliert. Eine Einschränkung dieses natürlichen Mechanismus liegt in der häufigen Komplikation atherosklerotischer Gefäßveränderungen durch das Auftreten von Thrombosen. Diese verschließen das Gefäß akut, wodurch der arteriogenetische Wachstumsprozess nicht mit dem Krankheitsverlauf mithalten kann. Ein weiteres Problem liegt in der nicht ausreichenden Kapazität der Kollateralgefäße, da diese nur 40% des verschlossenen Gefäßes erreicht und damit lediglich für einen Ruhemetabolismus ausreichend ist. Aus diesem Grunde befasst sich die Arteriogeneseforschung mit der Aufklärung molekularer Mechanismen dieses Prozesses mit dem Ziel der pharmakologischen Stimulation des Wachstums von Kollateralkreisläufen.

Ein Durchbruch gelang durch Etablierung eines neuen Tiermodells an Kaninchen und Schwein mit Operation eines arteriovenösen Shunts in Kombination mit Ligatur der A. femoralis, wodurch die Schubspannung in den Kollateralen chronisch erhöht werden konnte. Die daraufhin signifikant gesteigerte Kollateralenbildung macht deutlich, dass die Schubspannung als physikalische Kraft den Haupttrigger der Arteriogenese darstellt (Pipp et al. 2004; Eitenmuller et al. 2006). Bei Untersuchung

der Mechanismen der Kollateralenbildung fand man bei Untersuchung der so entstandenen Kollateralen auf molekularbiologischer Ebene unter den hochregulierten Genen einen schubspannungsabhängigen Kalziumkanal namens *transient receptor potential channel, Unterfamilie V, Mitglied 4* (TRPV4) (Troidl et al. 2008). Von diesem war bereits bekannt, dass er eine Rolle in der Regulation des vaskulären Tonus spielt und dass seine Aktivierung zu einer Vasodilatation durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom führt (Nilius et al. 2003). Troidl et al. (2008) konnten im Kleintier zeigen, dass TRPV4 den Stimulus der Schubspannung zu Beginn der Arteriogenese in ein intrazelluläres Signal umwandelt. Bei weiteren Versuchen führte die pharmakologische Aktivierung des Kanals zu einer aktiven Proliferation vaskulärer Zellen in der Zellkultur und in vivo.

## 1.2 Zielsetzung

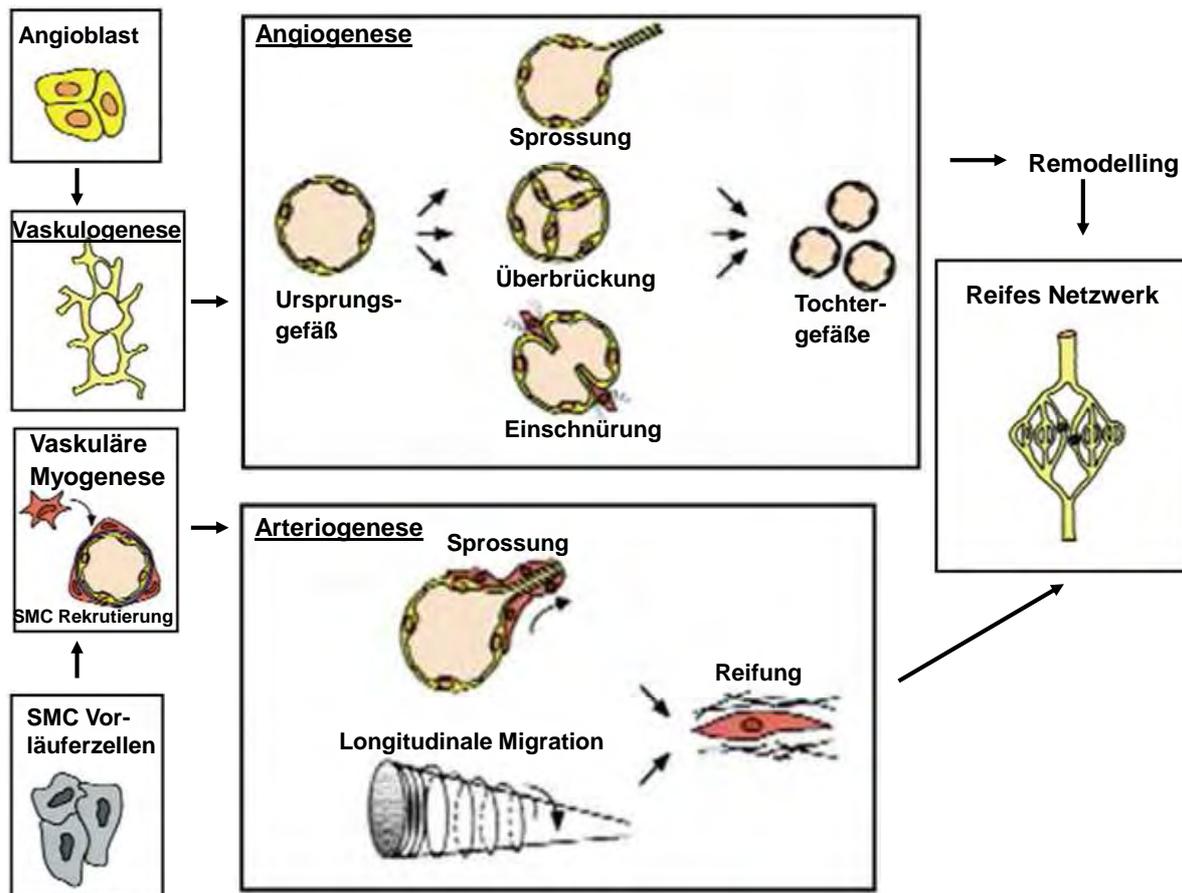
Die wichtigsten Ziele der vorliegenden Arbeit waren die

- (1) Untersuchung der Arteriogenese in einem klinisch relevanten Modell im ischämischen Hinterlauf des Schweines.
- (2) Validierung des TRPV4-Kanals als Stimulus für die Arteriogenese durch pharmakologische (4 $\alpha$ PDD) und physikalische (erhöhte Schubspannung) Aktivierung.
- (3) Identifizierung kalziumabhängiger Wachstumsfaktoren, welche dem TRPV4-Kanal nachgeschaltet und während der Arteriogenese aktiviert sind.

## 2 Literatur

### 2.1 Gefäßwachstum

Es werden grundsätzlich drei verschiedene Arten des Gefäßwachstums unterschieden. Dabei handelt es sich um Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese (Abb. 1).



**Abbildung 1: Mechanismen des Gefäßwachstums nach Carmeliet (2000).** Vaskulogenese bezeichnet die de novo Gefäßentwicklung während der Embryogenese, bei der Angiogenese kommt es zur Aussprossung neuer Kapillaren aus bestehenden Gefäßen. Arteriogenese wird definiert als die Weiterentwicklung schon präexistent im Gewebe liegender arterio-arteriellen Anastomosen zu funktionellen Kollateralarterien.

### 2.1.1 Vaskulogenese

Als Vaskulogenese bezeichnet man die Entwicklung des primitiven embryonalen Blutgefäßsystems, welche mit der Differenzierung von bipotenten Vorläuferzellen aus dem Mesoderm des Dottersacks beginnt (Risau 1997). Diese Hämangioblasten formieren sich zu sogenannten Blutinseln. Das Zentrum der zellulären Aggregate differenziert sich weiter zu hämatopoetischen Vorläuferzellen, während sich die äußere Schicht zu primitiven Endothelzellen entwickelt (Conway et al. 2001). Die Differenzierung der Hämangioblasten wird im Wesentlichen vom *vascular endothelial growth factor  $\alpha$*  (VEGF $\alpha$ ), seinem Rezeptor (VEGFR-2), sowie vom *basic fibroblast growth factor* (bFGF) beeinflusst (Carmeliet 2000).

Im weiteren Verlauf fusionieren die Endothelzellen und bilden ein primitives vaskuläres Netzwerk, welches sich letztlich durch den Vorgang der Angiogenese zu einem komplexen System weiterentwickelt.

Während früher angenommen wurde, dass die Vaskulogenese nur während der Embryonalentwicklung stattfindet, wurden in den letzten Jahren auch in adulten Organismen endotheliale Vorläuferzellen in Knochenmark und Blut gefunden. Ihre Differenzierung und Mobilisation wird durch VEGF $\alpha$ , *granulocyte-monocyte-colony-stimulating factor* (GM-CSF), bFGF und *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) stimuliert (Carmeliet 2000). Dieser Prozess wird auch als Neo-Vaskulogenese bezeichnet und ist ein wichtiger Ansatzpunkt für zukünftige Therapiemöglichkeiten (z.B. bei ischämischen Erkrankungen, Tumorerkrankungen) (Ribatti et al. 2001; Murasawa und Asahara 2005).

### 2.1.2 Angiogenese

Angiogenese wird als das Wachstum neuer Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen und die daraus resultierende Bildung eines neuen kapillaren Netzwerkes definiert (Heil et al. 2006). Man unterscheidet hierbei zwischen einer sprossenden und einer nicht-sprossenden Form. Die sprossende Angiogenese beginnt mit der proteolytischen Degradation der extrazellulären Matrix, gefolgt von chemotaktischer Migration und Proliferation von Endothelzellen. Durch anschließende Bildung eines Lumens und funktionelle Ausreifung des Endothels entstehen schließlich neue kapilläre Gefäße in das umliegende Gewebe hinein. Bei der nicht-sprossenden

Angiogenese, die auch als Intussuszeption bezeichnet wird, teilen sich vorhandene Gefäße durch Einwanderung periendothelialer Zellen (Conway et al. 2001). Welche Art der Angiogenese stattfindet, könnte von der Anzahl der schon vorhandenen Gefäße im Gewebe abhängen. Sprossung dominiert zum Beispiel in der Lunge, in der sich endotheliale Vorläuferzellen befinden und sich die primären Gefäße durch Vaskulogenese bilden. Im Gehirn, in welchem keine Angioblasten vorhanden sind, findet hingegen vor allem Intussuszeption statt (Risau 1997).

Initialer Auslöser der Angiogenese ist die Gewebshypoxie, durch welche der *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) aktiviert wird. Dieser transloziert in den Zellkern und bindet im Promoter seiner Zielgene an das *hypoxia-response element* (HRE). Die dadurch bedingte Aktivierung der Transkription führt zu einer erhöhten Bildung des *vascular endothelial growth factor  $\alpha$*  (VEGF $\alpha$ ) (Kimura et al. 2000). Gleichzeitig aktiviert HIF-1 die *Stickstoffsynthase* (NOS), wodurch *Stickstoffmonoxid* (NO) produziert wird, welches wiederum eine Vasodilatation bewirkt. Zusätzlich kommt es durch VEGF $\alpha$  zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität. Diese wird durch eine Umverteilung intrazellulärer Adhäsionsmoleküle wie des *platelet endothelial cell adhesions molecule* (PECAM-1) und des *vascular endothelial cadherin* (VE-Cadherin) sowie durch Veränderungen der Zellmembranstruktur durch eine Reihe von Kinasen (z.B. MAP-Kinase und Tyrosin-Kinase) verursacht. Dadurch kommt es zu einer Extravasation von Plasmaproteinen, welche als provisorisches Gerüst für einwandernde Endothelzellen fungieren. Als Regulator für die Permeabilität gilt *Angiopoietin-1* (Ang-1), ein Ligand des endothelialen Rezeptors *tyrosine-protein kinase receptor* (Tie2), welches die Zelle vor überschüssendem Plasmaverlust schützt und gleichzeitig als chemotaktischer Faktor für Endothelzellen fungiert (Witzenbichler et al. 1998; Kim et al. 2000).

Zusätzlich finden Degradationsprozesse der extrazellulären Matrix durch Proteinasen statt, wobei vor allem die *Matrixmetalloproteinasen* (MMPs) MMP-1, MMP-3 und MMP-9 eine bedeutende Rolle spielen. Durch diesen Abbau wird zum einen Raum für die sich entwickelnde Kapillare geschaffen, zum anderen werden hierdurch Wachstumsfaktoren wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF), VEGF $\alpha$  und *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) freigesetzt. Nach Abbau dieser physiologischen Barriere können, durch Zusammenspiel verschiedener Formen von VEGF $\alpha$ , Angiopoietinen, FGFs und ihrer Rezeptoren, proliferierende Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix migrieren. Sie lagern sich zunächst zu soliden Strängen zusammen und

erhalten erst nachträglich ein Lumen. Dies wird durch Anlagerung und Ausdünnung der endothelialen Zellen entlang des schon vorhandenen Gefäßes und durch Fusion mit demselben erreicht, um längere und mit einem größeren Durchmesser versehene Gefäße zu erhalten (Conway et al. 2001).

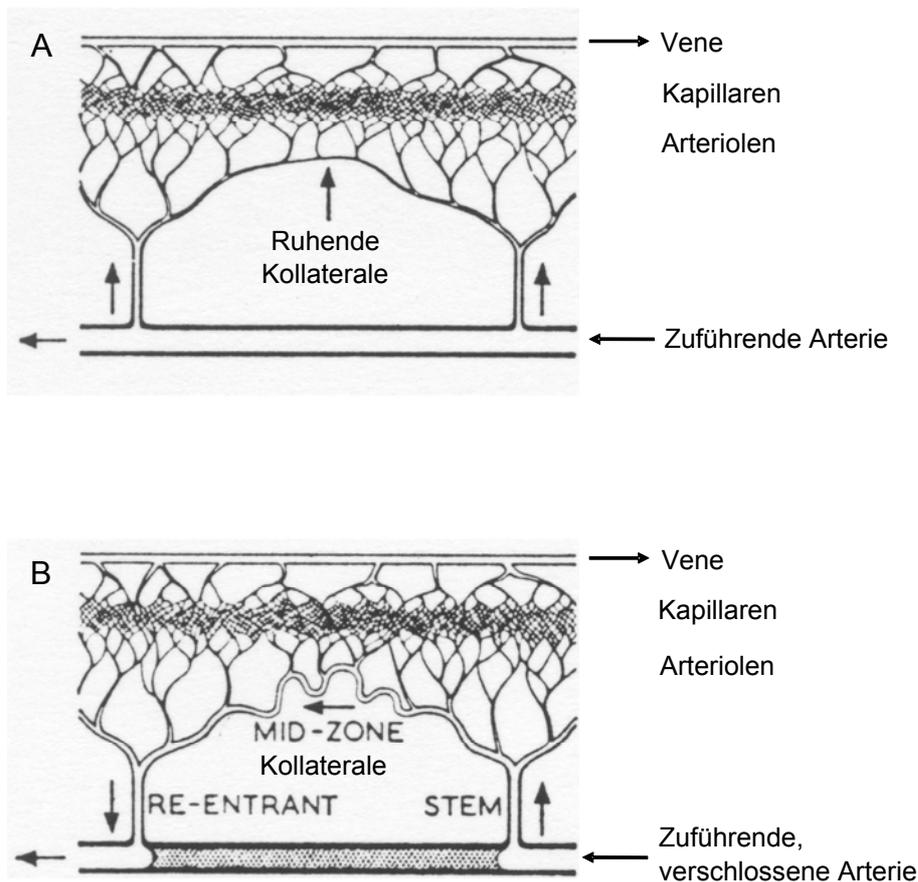
Angiogenese ist jedoch nicht nur auf das Wachstum des embryonalen Gefäßnetzwerkes beschränkt, sondern erfüllt auch im adulten Organismus wichtige Funktionen. Zu den physiologischen Aspekten zählen Vorgänge während des weiblichen Zyklus und der Wundheilung (Jang et al. 1999). Durch überschießendes oder fehlendes Gefäßwachstum kann es jedoch auch zu zahlreichen pathologischen Vorgängen kommen. Beispiele für abnormale und übersteigerte Angiogenese sind Tumorwachstum, Retinopathien, autoimmune Funktionsstörungen, Endometriose, allergische Dermatitis und rheumatische Arthritis. Krankheiten, die durch insuffiziente Angiogenese oder Zurückentwicklung von Gefäßen verursacht werden, sind Alzheimer, Apoplexie, Atherosklerose, Hypertension und Diabetes mellitus (Folkman 1976; Folkman und Shing 1992; Carmeliet 2003).

### **2.1.3 Arteriogenese**

Arteriogenese bezeichnet die Weiterentwicklung schon präexistent im Gewebe liegender arterio-arteriöler Anastomosen (Heil et al. 2006) durch Zellproliferation und Umstrukturierung (Remodelling). Relevant werden diese Verbindungen, wenn sich im arteriellen Gefäßbaum eine hämodynamisch relevante Stenose entwickelt. In diesem Falle stellen prä-existent angelegte kollaterale Anastomosen die einzige Verbindung mit der minderperfundierten peripheren Gefäßregion dar. Da der Blutfluss dem niedrigsten peripheren Widerstand folgt, nimmt konsekutiv die Flussgeschwindigkeit in den Kollateralgefäßen signifikant zu. Durch biomechanische Kräfte, besonders die Schubspannung, werden die arteriölen Anastomosen aktiviert und der Prozess der Arteriogenese induziert (Schaper 2004). Die Mechanismen der Arteriogenese wurden zunächst für das koronare Gefäßsystem beim Menschen beschrieben. Mittlerweile ist bekannt, dass diese Kollateralenbildung auch in der Gefäßperipherie und im Gehirn (Busch et al. 2003; Buschmann et al. 2003) spezieübergreifend beispielsweise bei Menschen, Mäusen (Scholz et al. 2002), Ratten (Herzog et al. 2002), Kaninchen (Arras et al. 1998) und Schweinen (Buschmann et al. 2003; Voskuil et al. 2003) stattfindet.

### 2.1.3.1 Historischer Überblick Kollateralarterien

Die Existenz kollateralartiger Verbindungen zwischen zwei Gefäßterritorien wurde erstmals im 17. Jahrhundert von Lower beschrieben (1669). Die Funktion und klinische Bedeutung dieser Gefäße wurde im vorangegangenen Jahrhundert von Morphologen, Anatomen sowie Gefäßmedizinern kontrovers diskutiert. Baroldi et al. ging 1956 davon aus, dass insbesondere im Herzen die Koronargefäße funktionelle Endgefäße darstellen, während andere Untersucher eindeutige Hinweise auf arterioläre Anastomosen demonstrieren konnten. Hier zu nennen sind insbesondere Fulton im Bereich der Koronarzirkulation (1956) und Longland mit dem Beweis von Kollateralgefäßen in der Peripherie im Jahre 1953 (Abb. 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung einer entstehenden Kollaterale.** (A) Vor Entwicklung einer hämodynamisch relevanten Stenose ist der Blutfluss direkt von Arterie über Arteriolen und Kapillaren zur Venolen und Venen. (B) Nach Okklusion der zuführenden Arterie kommt es zu einer deutlichen Veränderung des Blutflusses, da dieser nun komplett durch die Kollaterale geleitet wird. Die dadurch entstehende Schubspannung führt zu Umgestaltungsprozessen der Kollaterale. Zusätzlich kann man die Einteilung in Anfangsteil (Stem), Mittelteil (Mid-Zone) und Endteil (Re-Entrant) mit der durch Längenwachstum entstehenden korkenzieherförmigen Struktur der Kollaterale erkennen (nach Longland 1953).

Aktive Proliferation von Kollateralarterien nach Verschluss eines Gefäßes konnte Anfang der 70er Jahre von Schaper et al. (1971) bewiesen werden, nachdem zuvor lediglich von Durchmesserergrößerung durch Vasodilatation ausgegangen worden war. Er war es auch, der den Begriff Arteriogenese für das aktive Größenwachstum von präexistenten kollateralen Arteriolen in Abgrenzung zum Begriff der Angiogenese einführte (Schaper und Scholz 2003) (Tab. 1).

	<b>Angiogenese</b>	<b>Arteriogenese</b>
<b>Definition</b>	Wachstum von Kapillaren durch Sprossung aus bestehenden Gefäßen	Wachstum von präexistierenden Arteriolen zu Kollateralarterien
<b>Sauerstoffstatus</b>	Hypoxie	Normoxie
<b>Trigger</b>	Ischämie	Schubspannung
<b>max. Blutflußsteigerung</b>	1,5- bis 1,7-fach	10- bis 20-fach
<b>Fähigkeit zur Kompensation einer okkludierten Arterie</b>	Nein	Ja

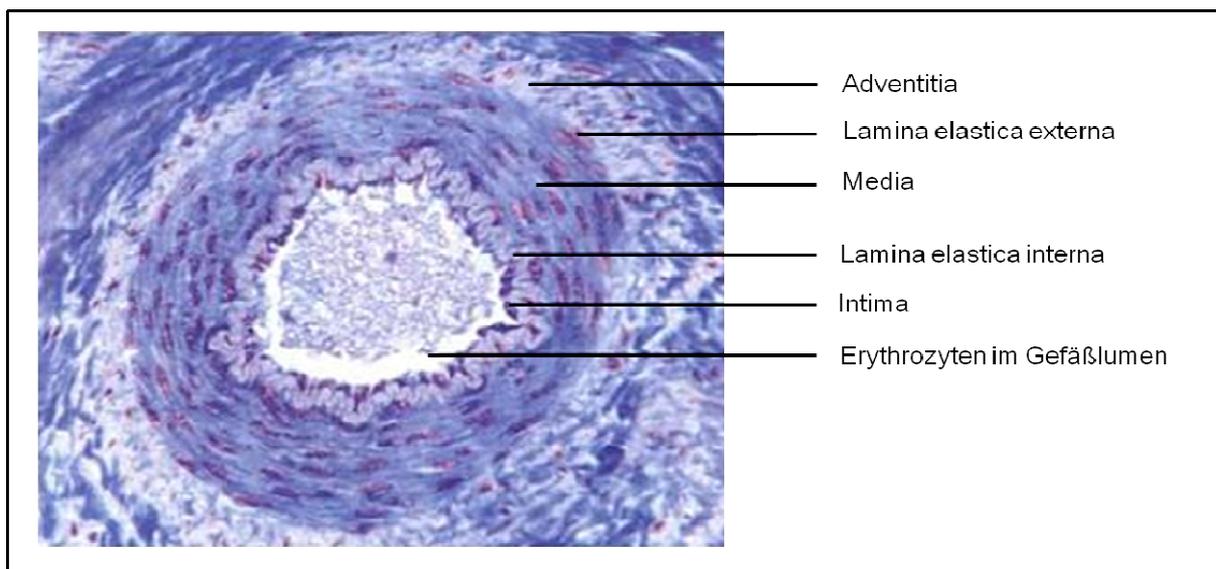
**Tabelle 1: Unterschiede zwischen Angiogenese und Arteriogenese** (modifiziert nach Schaper und Scholz 2003)

Mittlerweile steht die klinische Bedeutung von Kollateralarterien außer Frage: in zahlreichen Beispielen an Patienten zeigen sich z.T. komplette arterielle Verschlüsse, die von kollateralen Anastomosen sehr effizient kompensiert werden, so dass es in einigen Fällen zu keinerlei Funktionsausfällen durch das Perfusionsdefizit des verschlossenen Hauptgefäßes kommt. Sowohl im Herzen als auch in der Peripherie und im Gehirn spielt somit die kollaterale Zirkulation im Falle von chronisch progredienten Gefäßstenosen eine wichtige Rolle (Zbinden et al. 2007).

### 2.1.3.2 Morphologie

#### ***Morphologie von präexistierenden Kollateralarterien***

Präexistent im Gewebe vorkommende Kollateralen gleichen morphologisch kleinen Arteriolen und haben einen Durchmesser von etwa 50 µm (Scholz et al. 2000). Histologisch lassen sich von innen nach außen drei Wandschichten unterscheiden: Intima, Media und Adventitia (Abb. 3). Als Intima wird das lumenauskleidende einschichtige Epithel mit der aus elastischen Fasern bestehenden aufliegenden Lamina elastica interna bezeichnet. Die darauf folgende Media besteht aus ein bis zwei Schichten glatter Muskelzellen, welche nach außen hin von einer Lamina elastica externa begrenzt sind. Die äußerste Schicht einer Arteriole, die Adventitia, enthält große Mengen an Bindegewebe (meist Kollagenfasern), außerdem Kapillaren, Venolen, Nervenfasern, aber auch glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten. Die Adventitia dient der Einbettung des Gefäßes sowie der Stabilisierung (Rohen JW 2000).



**Abbildung 3: Dickwandige Arterie mit ausgeprägter Tunica media, deren Muskelzellen meist zirkulär, teilweise auch spiralig verläuft. Diese Arterie entspricht einer ausgereiften Kollaterale, ruhende Kollateralarterien hingegen haben einen kleineren Durchmesser und eine dünnere Media.** Darmgekröse, Hund; Färbung Azon; Vergr. 250fach (aus Liebich; Funktionelle Histologie der Haussäugetiere 2004)

Diese ruhenden Kollateralarterien sind Teil eines arkadenartigen Gefäßnetzwerkes im Perforationsgebiet, welches vor allem in der Skelettmuskulatur vorkommt. Sie verbinden den Muskel am proximalen und distalen Ende versorgende Arterien im mittleren Teil des Muskels. Der Blutfluss in ruhenden Kollateralen ist nicht unidirektional, sondern oszillierend.

### ***Histologische Veränderungen während der Arteriogenese***

Das erste elektronenmikroskopisch sichtbare Zeichen der beginnenden Arteriogenese ist ein ödemartiges Anschwellen der Endothelzellen. Einige Stunden später kommt es zur Einwanderung von Monozyten, welche zunächst in die Intima eindringen. Im weiteren Verlauf sind sie jedoch vor allem in der Adventitia zu finden, wo sie eine entzündliche Umgebung schaffen. Diese hat sowohl die Auflösung der Basalmembran als auch die Schaffung von Raum für das sich entwickelnde Gefäß zur Folge (Buschmann und Schaper 1999).

Im Verlauf der Arteriogenese nehmen die Arteriolen nach und nach die Gestalt von Arterien an und erweitern ihren Durchmesser auf das 25-fache (Cai et al. 2001). Die glatten Muskelzellen dedifferenzieren in den sog. Synthese-Typ und beginnen stark zu proliferieren. Durch Migration bilden sie eine Neointima, wobei sie sich sowohl zirkulär als auch longitudinal anordnen und Matrix, Kollagen und Elastin synthetisieren (Schaper und Ito 1996). Auch Endothelzellen zeigen verstärkte Mitosen und Migrationsaktivität. Neben der Dicke- kommt es auch zu einer Längenzunahme des Gefäßes, wodurch unter anderem die entstehende korkenzieherartige Form der Kollateralen begründet ist (Helisch und Schaper 2003).

#### **2.1.3.3 Schubspannung**

##### ***Begriffe und Definitionen aus der Strömungslehre***

Die Schubspannung gehört neben druckbedingten Kräften (zirkumferentiell, radial und longitudinal) zu den von der Blutströmung erzeugten Einflüssen, die auf das Endothel einwirken. Sie bezeichnet die Kraft, die das strömende Blut auf die laminare Seite der Endothelschicht ausübt. Sie ist nach Newton proportional zur Scherrate und ist definiert als Kraft pro Fläche mit der Einheit  $\text{dyn/cm}^2$ . In Abhängigkeit von der Blutviskosität  $\eta$  wird sie berechnet durch

$$\tau = \frac{4\eta Q}{R^3\pi}$$

Die Schubspannung ist proportional zum Blutfluss (Q) und der Blutviskosität und steht in umgekehrter Beziehung zur 3. Potenz des Radius (R) des Gefäßes (Schaper 2004).

### ***Schubspannung als Trigger der Arteriogenese***

Die Schubspannung ist als Hauptstimulus für die Arteriogenese mittlerweile unumstritten (Pipp et al. 2004). Vor Stenosierung einer Arterie herrscht in der ruhenden Kollaterale lediglich ein oszillierender Blutfluss. Nach Verschluss der Arterie fällt der Blutdruck in den distalen Arealen deutlich ab, was zu einer Änderung des Druckgradienten in den Kollateralen führt. Es kommt zu einem unidirektionalen Fluss durch die Kollateralen, die nun von einem stark gesteigerten Blutvolumen durchflossen werden. Die normalerweise in der A. femoralis vorherrschende Schubspannung beträgt  $4,8 \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$ . Nach Okklusion der Arterie vervielfacht sich die Schubspannung in den noch ruhenden Kollateralarterien fast um das 200fache (Buschmann und Schaper 1999). Die Kräfte, welche auf die Endothelschicht einwirken, führen über noch weitestgehend ungeklärte Mechanismen zur Aktivierung der Endothelzellen und zur Induktion der Arteriogenese (Heil und Schaper 2004).

Da die Schubspannung in umgekehrter Beziehung zur 3. Potenz des Gefäßradius steht, hat dieser somit den entscheidenden Einfluß auf die Stromstärke. Dies äußert sich in der unzureichenden arteriogenen Antwort beim einfachen Ischämiemodell in der Peripherie, da bereits nach geringer Vergrößerung des Lumens keine ausreichende Schubspannung zur Aktivierung des Endothels mehr bereitsteht (Pipp et al. 2004).

#### **2.1.3.4 Zeitverlauf der Arteriogenese**

Aufgrund ihres zeitlichen Verlaufes kann die Arteriogenese in vier Abschnitte unterteilt werden, welche als **Initialisierung**, **Proliferation**, **Synthese / Migration** und **Reifung** bezeichnet werden können (Scholz et al. 2000).

Die **initiale Phase** beginnt schon wenige Minuten nach Okklusion eines Gefäßes mit der Aktivierung der Endothelzellen durch die erhöhte Schubspannung. Auch wenn dieser Vorgang noch nicht vollständig erforscht ist, handelt es sich vermutlich zunächst um eine Öffnung von Ionenkanälen (Nilius et al. 1996). Die Signaltransduktion erfolgt u.a. über Proteine, die im Zellkern an das sog. *Schubspannungs-verantwortliche Element* (*shear-stress-responsive-element*, SSRE) in der Promoter-Region von Zielgenen binden. Bisher wurden über 40 Gene beschrieben, welche das SSRE in ihrem Promoter enthalten (Heil und Schaper

2004). Der biomechanische Stimulus führt dadurch z.B. zur Expression der *endothelialen Stickstoff-Synthetase* (eNOS), des *platelet derived growth factors* (PDGF) und des *monocyte chemoattractant proteins 1* (MCP-1) (Shyy et al. 1994; Buschmann und Schaper 1999). Es folgt die Induktion und/oder Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen wie des *vascular adhesion molecule* (VCAM-1) und des *intracellular adhesion molecule* (ICAM-1) (Scholz et al. 2000; Deindl und Schaper 2005). MCP-1 und die Adhäsionsmoleküle stimulieren die Anlockung von Monozyten aus dem Blut, welche mit den Endothelzellen interagieren, adhären und schließlich transmigrieren (Schaper und Ito 1996). Die aktivierten Monozyten synthetisieren ebenfalls forciert Wachstumsfaktoren und Zytokine wie MCP-1, *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) und *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF  $\alpha$ ) und die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1. Zusätzlich haften Plättchen am aktivierten Endothel, welche weitere Wachstumsfaktoren freisetzen (z.B. Interleukin-4 und *platelet-derived growth factor* (PDGF)). Das Endothel bildet vermehrt den *granulocyte-makrophage-colony-stimulating-factor* (GM-CSF), welcher die Überlebenszeit der Monozyten verlängert und zur weiteren Anlockung von Monozyten führt.

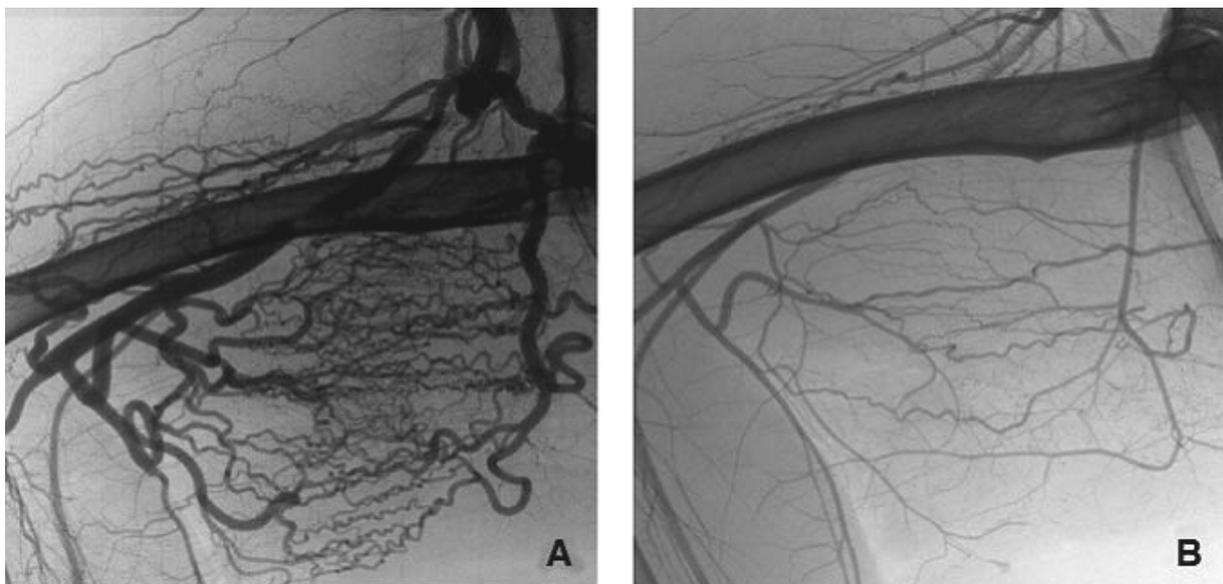
Die **Proliferationsphase**, welche ein bis drei Tage nach Okklusion des Gefäßes stattfindet, lässt sich durch eine maximale mitotische Aktivität der Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten beschreiben.

Die anschließende **Synthese- bzw. Wachstumsphase** dauert etwa von Tag 3 bis Tag 14. In dieser findet das hauptsächliche Größenwachstum, Herunterregulation mitotischer und Initialisierung syntethisierender und proteolytischer Aktivität glatter Gefäßmuskelzellen statt.

Die Phase der **Reifung** beginnt 14 bis 21 Tage nach Okklusion und ist charakterisiert durch verminderte Proliferation, Migration und proteolytische Aktivität und durch eine Transdifferenzierung der meisten glatten Gefäßmuskelzellen vom Synthese-Typ zum kontraktiven Phänotyp (Scholz et al. 2000).

### 2.1.3.5 Unvollständigkeit der Arteriogenese

Die vollständige Anpassung der Kollateralarterien an die neuen Blutflussgegebenheiten nach Okklusion eines Gefäßes durch Kollateralarterien ist durch die schnelle Normalisierung der Schubspannung unter Normalbedingungen nicht gegeben (Kamiya und Togawa 1980; Zarins et al. 1987; Unthank et al. 1996). Durch die Umgehungskreisläufe kann lediglich 40% der Kapazität der verschlossenen Arterie ersetzt werden. Deshalb ist es für mögliche Therapieansätze wichtig, den Prozess der Arteriogenese zu verlängern. Pipp et al. (2004) und Eitenmüller et al. (2006) etablierten die Kombination eines arteriovenösen-Shunts mit dem klassischen Ischämiemodell in der Peripherie. Durch Herstellung einer arteriovenösen Anastomose distal der Ligatur der A. femoralis wurde ein großer permanenter Druckgradient hervorgerufen. Der größte Teil des durch die Kollateralen fließenden Blutes wurde direkt in das venöse System geleitet und nur ein kleiner gelangte in die periphere Zirkulation. Der dadurch entstehende deutliche Anstieg des Blutflusses in den Kollateralen führte zu einer chronischen Verstärkung der Wandschubspannung und dadurch zu einer Erhöhung und Verlängerung der arteriogenen Antwort (Abb. 4). Erstmals konnte in diesen Tierversuchen der Blutfluss in der Peripherie nicht nur komplett normalisiert, sondern sogar gesteigert werden.



**Abbildung 4: Postmortem Angiographien von Ratten-Hintergliedmaßen** A: 4 Wochen nach Shunt-Operation; B: 4 Wochen nach Ligatur; deutlich zu sehen ist die immens gesteigerte Kollateralenbildung nach Shunt im Vergleich zu einfacher Ligatur (aus Eitenmüller et al. 2006).

## 2.2 TRP-Kanäle und Regulation des vaskulären Tonus

Bei Expressionsanalysen in Kollateralen von Ratten nach Ligatur der A. femoralis und zusätzlicher Shunt-Operation wurde eine 4,5fache Hochregulation eines endothelialen mechanosensitiven Kalziumkanals gefunden (Troidl et al. 2008). Es handelt sich hierbei um den TRPV4-Kanal, von welchem bereits bekannt ist, dass er eine wichtige Rolle bei der Regulation des vaskulären Tonus spielt und dass seine Aktivierung zu einer Vasodilatation mittels Kalzium-Einstrom führt (Nilius et al. 2003).

TRP-Kanäle wurden erstmalig im Jahre 1969 in Photorezeptorzellen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben, wobei bei den Versuchen Wildtypen sowie basendeletierte sogenannte dTRP-Mutanten verwendet wurden. Nach Photostimulation fiel auf, dass bei den Rezeptorzellen des Wildtyps eine lang anhaltende Phase der Repolarisation folgte, bei den Mutanten trat diese hingegen nur transient auf. Dies führte zu einem kompletten Verlust des Sehvermögens (Hotta und Benzer 1969). Das mutierte Gen wurde nach dem Phänotyp der Mutante *transient receptor potential* (trp) genannt. Die molekulare Charakterisierung des Kanals erfolgte im Jahre 1989 durch Montell und Rubin. Aufgrund struktureller Homologien konnte eine ganze Reihe verwandter Kanäle identifiziert werden, welche in fast allen Organismen vom Bakterium bis zum Säugetier vorkommen. Alleine beim Säugetier sind mittlerweile 28 TRP Kanäle beschrieben, welche sich in 6 Familien einordnen lassen (Christensen und Corey 2007). Ebenso mannigfaltig wie die Kanäle selbst zeigen sich die Funktionen, wie zum Beispiel Vasodilatation/Vasokonstriktion, Migration/Proliferation von Zellen, Sinneswahrnehmung wie Wärme, Kälte, Geschmack und Schmerz und pH- und Osmoregulation.

Bei Dysfunktion der Kanäle sind diverse vaskuläre und kardiovaskuläre Pathologien wie Atherosklerose, Hypertension und Herzinsuffizienz beschrieben (Inoue et al. 2006; Inoue et al. 2008).

### 2.2.1 Die verschiedenen TRP-Familien

Die bei den Säugetieren vorkommenden TRP-Kanäle werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit in sechs Familien eingeteilt (Clapham et al. 2005):

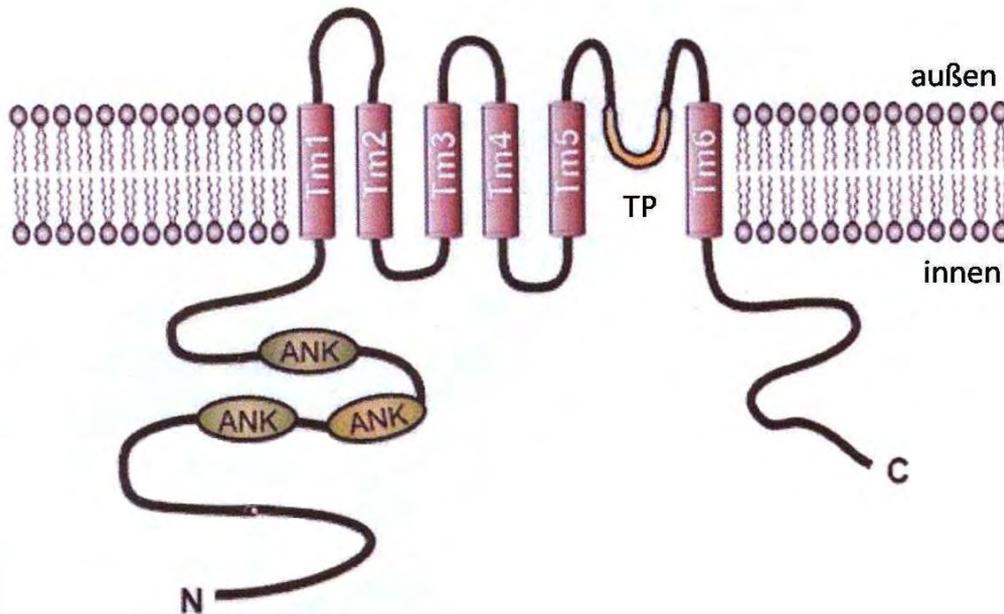
- TRPC (klassische TRPs)
- TRPV (Vanilloidrezeptor TRPs)
- TRPM (Melastatin oder lange TRPs)
- TRPA (Ankyrinreiche TRPs)
- TRPP (Polycystin TRPs )
- TRPML (Mucolipin TRPs)

### 2.2.2 Eigenschaften der TRP-Kanäle

Die meisten TRP-Kanäle, wie auch TRPV4, leiten unselektiv Kationen und sind mäßig spannungsabhängig. Die Mehrzahl der Kanäle ist durchlässig für Na<sup>+</sup>-, K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ionen. TRPV5 und TRPV6 leiten sehr selektiv Ca<sup>2+</sup>-Ionen, TRPM4 und TRPM5 sind selektiv für monovalente Kationen.

### 2.2.3 Allgemeine Struktur der TRP-Kanäle

Das gemeinsame Hauptmerkmal der TRP-Kanäle ist ihre Struktur mit sechs die Plasmamembran durchspannenden Abschnitten und einer Pore zwischen der fünften und der sechsten Transmembrandomäne (Abb. 5). Darüber hinaus gibt es jedoch noch weitere Gemeinsamkeiten zwischen verschiedenen Mitgliedern der Familie, so kommen z.B. in den aminoterminalen Sequenzabschnitten von Mitgliedern der TRPC, TRPV und TRPA-Familien sogenannte Ankyrin-Repeats in variabler Zahl vor. Als Ankyrin-Repeat wird eine Sequenz bezeichnet, welche aus 33 Aminosäureresten besteht und sich zu einer  $\beta$ - $\alpha$ -- $\alpha$ - $\beta$  Struktur faltet. Wahrscheinlich dient sie als Modul für die Wechselwirkung von Proteinen miteinander (Sedgwick und Smerdon 1999).



**Abbildung 5: Vereinfachte Struktur des TRPV4-Kanals.** Tm = Transmembrandomäne; TP = Transmembranpore; ANK = Ankyrinwiederholungen; N = N-Terminus; C = C-Terminus (nach O'Neil et al. 2005)

Der C-terminale Teil von TRPC und TRPM enthält die TRP Domäne, eine konservierte Strecke von 25 Aminosäuren.

Zusätzlich besitzen alle TRP-Kanäle unterschiedliche regulatorische und mit Proteinen interagierende Stellen. So gibt es zum Beispiel diverse Phosphorylierungsstellen (*Proteinkinase A*- (PKA), *Proteinkinase C*- (PKC), cAMP- oder src family kinase-abhängig) (Watanabe et al. 2008).

#### 2.2.4 TRPV-Familie

Die TRPV-Familie besteht aus 6 Mitgliedern welche als TRPV1 bis TRPV6 bezeichnet werden. Allen gemeinsam sind mehrere Ankyrin-Wiederholungen im aminoterminalen Bereich (Erler et al. 2004).

Das erste Mitglied der TRPV-Familie, TRPV1, wurde bei der Suche nach dem Rezeptor für das Vanilloid Capsaicin (scharfer Inhaltsstoff von Pflanzen der Gattung Capsicum, wie zum Beispiel des Cayennepfeffers oder der Chilischoten) in den sensorischen Neuronen identifiziert (Caterina et al. 1997). Weitere Aktivatoren für TRPV1 sind Temperaturen oberhalb von 43°C und das im Körper vorkommende Anandamit (ein Arachidonsäurederivat, welches auch ein Ligand für Canabinoidrezeptoren ist). Aufgrund dessen schloss man auf eine Beteiligung an der chemisch oder physikalisch induzierten Nozizeption. TRPV2 ist zu 50% mit TRPV1

identisch, wird aber nicht durch Capsaicin aktiviert. Die Stimulation erfolgt durch Temperaturen über 52°C (Caterina et al. 1999), die Öffnung von TRPV3 bereits bei 31°C (Peier et al. 2002). TRPV3 wird in denselben Neuronen wie TRPV1 exprimiert, in Keratinozyten (Peier et al. 2002) und auf der Oberfläche der Zunge (Xu et al. 2002).

Die zweite Unterfamilie wird gebildet von TRPV5 und TRPV6, welche mit hoher Selektivität  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen leiten (Vennekens et al. 2000). Beide Kanäle werden insbesondere in Niere, Darm und Plazenta exprimiert und weisen eine 80%ige Homologie zueinander auf.

### 2.2.5 TRPV4

Der TRPV4-Kanal wurde zunächst im Bereich der Osmoregulation im neurosensorischen System beschrieben, wo er durch hypotone Zellschwellung aktiviert wird (Liedtke et al. 2000). Da der Kanal gleichzeitig von mehreren Gruppen entdeckt wurde, war er zunächst unter verschiedenen Synonymen bekannt: VR-OAC (Liedtke et al. 2000), OTRPC4 (Strotmann et al. 2000), TRP12 (Wissenbach et al. 2000), VRL-2 (Delany et al. 2001).

#### Struktur

Die häufigste Isoform von TRPV4 besteht aus 871 Aminosäuren. Amino- und Carboxyl-Terminus sind zytoplasmatisch lokalisiert und flankieren die Kernregion, welche aus 6 *Transmembrandomänen* (TM1-6) und einer Kernpore zwischen TM5 und TM6 besteht (Liedtke et al. 2000; Strotmann et al. 2000; Wissenbach et al. 2000).

Mehr als die Hälfte des TRPV4-Proteins besteht aus dem Amino-Terminus. Dieser enthält drei Ankyrinwiederholungssequenzen, deren Funktion noch nicht vollständig erforscht wurde. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Domänen, welche die Wechselbeziehung zweier Proteine beeinflussen und damit eine Bindung der Kanäle an die Membran oder die Multimerisation von Kanalkomplexen bedingen (Erlor et al. 2004).

Die membranüberspannende Kernregion weist zwischen TM5 und TM6 eine kurze hydrophobe Strecke auf, welche die Kernpore darstellt. Zudem sind innerhalb der Kernregion verschiedene Phosphorylierungs- und Glykosylierungsstellen vorhanden, welche Einfluss auf die Modifizierung und Aktivierung von TRPV4 haben.

Der Carboxyl-Terminus enthält sowohl eine Bindestelle für Calmodulin, welche mit der komplexen  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit von TRPV4 zusammenhängt (Strotmann et al. 2003), als auch für das *microfilament associated protein 7* (MAP7), welches die Dichte des Kanals in der Membran kontrolliert (Suzuki et al. 2003).

### **Vorkommen**

Bei TRPV4 handelt es sich um einen weit verbreiteten Kanal. Eine hohe Konzentration wurde in der Niere gefunden, in welcher der Kanal in der basolateralen Membran der wasserimpermeablen Nephronsegmente lokalisiert ist (Tian et al. 2004).

Weitere Gewebe, in denen eine Expression des Kanals bekannt ist, sind Endothelzellen, Epithelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen (O'Neil und Heller 2005), Leber, Herz, Cochlea, sensorische Neuronen, Trachea, Merckelsche Zellen und Keratinozyten (Christensen und Corey 2007).

### **Aktivierung des Kanals**

TRPV4 ist ein multimodaler Kanal, welcher durch diverse physikalische und chemische Stimuli aktiviert wird. Ursprünglich wurde TRPV4 aufgrund seiner Sensitivität für hypoosmotische Zellschwellung (Liedtke et al. 2000) beschrieben. Ein weiterer mechanischer Stress, welcher zur Aktivierung führt, ist eine erhöhte Schubspannung in Gefäßen oder Nierentubuli (O'Neil und Heller 2005). Auch moderate Wärme ( $< 27^\circ\text{C}$ ) (Guler et al. 2002) und niedriger pH (Suzuki et al. 2003) führen zur Stimulation des Kanals. Ein pharmakologischer Ligand ist der nicht-PKC-aktivierende synthetische Phorbolster *4 $\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate* (4 $\alpha$ PDD). Dieser stimuliert den Kanal bereits bei relativ geringen Konzentrationen und wirkt spezifisch, da er kein anderes Mitglied der TRPV-Familie aktiviert (Watanabe et al. 2002). Endogene Agonisten des Kanals stellen Arachidonsäure und sein Metabolit 5,6-Epoxyeicosatriensäure dar (Watanabe et al. 2003).

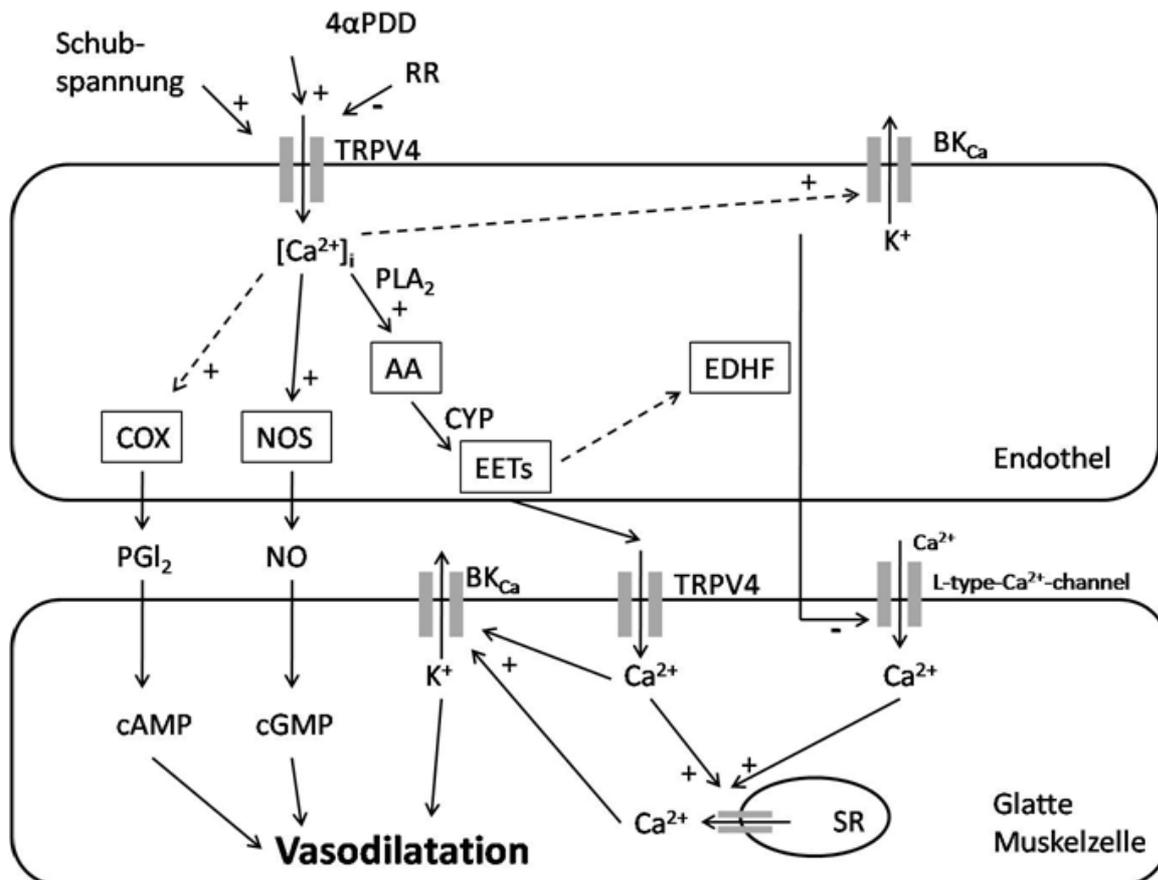
Gehemmt wird TRPV4 unspezifisch durch *Ruthenium Rot* (RR), welches auch als Antagonist der meisten anderen TRPV-Kanäle bekannt ist (Watanabe et al. 2002).

### Funktion von TRPV4 in Gefäßen

Bei TRPV4 handelt es sich um einen nicht selektiven, für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  permeablen Kationenkanal, wobei das Verhältnis  $P_{\text{Ca}} : P_{\text{Na}} \sim 6$  beträgt (O'Neil und Heller 2005).

Durch Stimulation von TRPV4 in Gefäßendothelien werden drei Typen von vasodilatatorischen Faktoren produziert: *Stickstoffmonoxid* (NO), *Prostacyclin* ( $\text{PGI}_2$ ) und der *endothelium-derived hyperpolarizing factor* (EDHF). Bei EDHF handelt es sich um einen Faktor, welcher aus verschiedenen Komponenten bestehen kann. Im Zusammenhang mit TRPV4 wird sowohl *Eicosatriensäure* (EET) als auch ein elektrisches Phänomen als EDHF bezeichnet. Bei letzterem breitet sich die initiale endotheliale Hyperpolarisation durch Öffnung  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierter  $\text{K}^+$ -Kanäle über gap junctions auf die glatte Muskulatur aus und führt zu einer Schließung von spannungsabhängigen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und damit zu einer Vasorelaxation (Busse et al. 2002; Griffith 2004). Eine weitere Form des EDHF stellt EET dar (Earley, Heppner et al. 2005), welches nach Aktivierung von TRPV4 im Endothel durch Abbau von *Arachidonsäure* (AA) produziert wird. EET führt zu einer Aktivierung von TRPV4 in den glatten Muskelzellen. Durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kommt es zu einer lokalen Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Endo et al. 1970), was auch als *Kalziumfunke* bezeichnet wird. Dieser *Funke* führt zu einer Öffnung der  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ -Kanäle (Spannungs- und  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Kanäle glatter Muskelzellen mit hoher Leitfähigkeit für  $\text{K}^+$ -Ionen (Marty und Neher 1985)), dadurch zur Hyperpolarisierung der glatten Muskelzellen und zu Vasodilatation (Earley et al. 2005) (Abb. 6).

Die Synthese von NO und  $\text{PGI}_2$ , welche direkt über cAMP bzw. cGMP zur Vasodilatation führen, ist ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig. Die endotheliale Stickstoffsynthese wird  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängig aktiviert (Bredt und Snyder 1990) und die Prostaglandinsynthese durch Cyclooxygenase setzt die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Freisetzung von Arachidonsäure durch Phospholipase A2 voraus.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rolle von TRPV4 im Endothel.** 4αPDD, 4α-phorbol-12,13-didecanoate; AA, Arachidonsäure; EETs, Epoxyeicosatriensäure; COX, Cyclooxygenase 1; CYP, Cytochrom P450 Epoxygenase; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; SR, Sarkoplasmatisches Retikulum; BK<sub>Ca</sub>, Ca<sup>2+</sup>-aktivierbare K<sup>+</sup>-Kanäle; NOS, endotheliale Stickstoffsynthase; NO, Stickstoffmonoxid; PGI<sub>2</sub>, Prostacyclin; RR, Ruthenium Rot (nach Liedtke 2007).

Zusätzlich zu dem schnellen KalziumEinstrom, welcher zu Vasodilatation führt, wurde von Berridge et al. (2003) beschrieben, dass TRP-Kanäle zu einer sog. „niedrigen Konduktanz“ neigen. Dieser langsame KalziumEinstrom führt zu keiner lokalen Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum, so dass der Kanal längere Zeit aktiv sein kann, ohne die Zelle mit Kalzium zu überschwemmen.

**Zusammenhang mit Arteriogenese**

In Untersuchungen von Kollateralarterien nach chronisch erhöhter Schubspannung durch Anlegen eines AV-Shunts im Ratten- bzw. Kaninchenmodell wurde eine erhöhte Expression von TRPV4 gefunden (Sayed et al. 2010). Auch Stimulation porciner Endothelzellen in der Zellkultur mit 4 $\alpha$ PDD führte zu einer dosisabhängigen Expression von TRPV4 und einer erhöhten Anzahl sich in der Proliferation befindlicher Zellen (Troidl et al. 2008). Aus diesen Ergebnissen wurde auf einen positiven Einfluss von TRPV4 auf die Arteriogenese geschlossen. Es wurde vermutet, dass der Kalziumkanal als Sensor für die Schubspannung als Haupttrigger der Kollateralenbildung dient, wobei die genauen Mechanismen bisher weitgehend unbekannt sind.

## 2.3 Kalziumabhängige Faktoren

Auf der Suche nach möglichen downstream targets von TRPV4 fanden sich vier  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Transkriptionsfaktoren, welche möglicherweise ebenfalls im Zusammenhang mit Arteriogenese stehen.

### 2.3.1 Dream

Bei Dream (andere Bezeichnungen: *Calsenilin* oder *Kv channel-interacting protein 3* („KChIP3“)) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor mit vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomänen (Carrion et al. 1999), welcher in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  spezifisch an der DRE-Sequenz im Promoter verschiedener Zielgene bindet und so deren Transkription verhindert (Mellstrom und Naranjo 2001). Zu den dadurch unterdrückten Genen gehören c-fos (Carrion et al. 1999), CREB1 (Ledo et al. 2002) und ABRA (Troidl 2007). Durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es zur Besetzung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomänen und dadurch zu einer Konformationsänderung des Repressors. Diese führt zu einer verringerten Affinität von Dream zur DRE und zu einer Translokation des Repressors ins Zytoplasma. Durch den Wegfall der Hemmung können die zuvor unterdrückten Gene transkribiert werden.

### 2.3.2 NFATc1

NFATc1 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, welcher für die Formation eines komplexen vaskulären Systems, für ein funktionelles Immunsystems (Flanagan et al. 1991), für verschiedene Aspekte des nervösen Systems und für komplexe adaptive, für Vertebraten charakteristische Reaktionen notwendig ist (Crabtree und Olson 2002).

NFATc1 wirkt als Signalübermittler zwischen intrazellulärem Kalzium und Calcineurin und der Expression verschiedener Gene, wie GM-CSF,  $\text{TNF}\alpha$  (Klein et al. 2006), welches wiederum die Transkription von MCP-1 bewirkt (Fujii et al. 2006) und des Adäsionsmoleküls ICAM-1 (Xue et al. 2009), welches als proarteriogenetischer Faktor bekannt ist.

In ruhenden Zellen befinden sich NFATc1-Proteine phosphoryliert im Zytoplasma. Nach Stimulation werden sie durch Calcineurin dephosphoryliert, translozieren in den

Zellkern und werden transkriptional aktiv (Hogan et al. 2003). Sobald die Stimulation durch  $\text{Ca}^{2+}$  oder Calcineurin wegfällt, wird NFATc1 durch Proteinkinasen rephosphoryliert und transloziert ins Zytoplasma ( $t_{1/2} \sim 15$  min), wodurch die NFAT-abhängige Genexpression beendet wird (Garrity et al. 1994; Loh et al. 1996).

NFAT bindet DNA mit niedriger Affinität und agiert normalerweise im Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1, MEF2c, CREB1 oder GATA4 (Rao et al. 1997; Garcia-Rodriguez und Rao 1998; Molkentin et al. 1998; Naya et al. 2000; Macian et al. 2001).

Weitere Faktoren, welche den nukleären Import von NFATc1 triggern, wurden bereits von verschiedenen Gruppen beschrieben. Hier zu nennen sind VEGF $\alpha$ , welches über Calcineurin den nukleären Import in Endothelzellen der Pulmonalklappe, welche aus einem postnatalen humanen Herzen isoliert wurden (Johnson et al. 2003) initiiert. 20-Hydroxyarachidonsäure induziert den nukleären Transport von NFATc1 in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (Yaghi und Sims 2005).

### 2.3.3 CREB1

Bei CREB1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, dessen Phosphorylierung an Serin-133 und damit Aktivierung durch verschiedene Gruppen von Serin/Threonin-Kinasen katalysiert wird. Hier zu nennen sind die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase, *mitogenaktivierte Proteinkinasen* (MAPK), *Proteinkinase A* (PKA) und *Proteinkinase G* (PKG) (Gonzalez et al. 1989; Sheng, Thompson et al. 1991; Tan et al. 1996; Xing et al. 1996). Interessant ist vor allem die Aktivierung durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase, da es durch Stimulation von TRPV4 zu einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und damit Aktivierung verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktionswege kommt und durch die MAPK, da diese bereits als Teil eines zentralen Signalwegs während der Arteriogenese beschrieben wurde (Eitenmuller et al. 2006). Nach der Aktivierung bindet CREB1 an eine spezifische CRE (*cAMP responsive element*)-Region der DNA und es kommt zur Transkription einer großen Anzahl von Genen. Von vielen dieser Gene ist bereits eine Beteiligung an der Arteriogenese beschrieben, z.B. ICAM-1 (Scholz et al. 2000; Hoefler et al. 2004), PDGF (de Paula et al. 2009; Schierling et al. 2009), TNF $\alpha$  (Grundmann et al. 2005) und TGF $\beta$  (Grundmann et al. 2007).

Die für unsere Untersuchungen wichtigste Funktion von CREB1 ist die Co-Aktivierung von NFATc1 (Garcia-Rodriguez und Rao 1998) und AP-1 (Hai und

Curran 1991; De Graeve et al. 1999). Die nachgeschalteten Gene von CREB1 gleichen somit denen dieser Transkriptionsfaktoren (z.B. ABRA, ICAM-1, VCAM-1 TNF $\alpha$ ).

#### **2.3.4 AP-1**

Der Transkriptionsfaktor AP-1 besteht klassischerweise aus einem Jun-Fos-Heterodimer oder aus einem Jun-Jun-Homodimer. Er spielt eine zentrale Rolle im regulatorischen Netzwerk eukaryotischer Genexpression (Angel und Karin 1991) und ist wichtig für Zelldifferenzierung und Tumorbildung (Curran und Franzoso 1988; Angel und Karin 1991). So sterben Föten von C-JUN-knockout-Mäusen zwischen Tag 12,5 und 13,5 (Hilberg et al. 1993) mit interventrikulären Septumdefekten des Herzens und vaskulären Defekten in intra- und extraembryonalem Gewebe (Eferl et al. 1999). C-fos-knockout-Mäuse sind lebensfähig und fertil, sie zeigen jedoch eine extramedulläre Hämatopoese und Knochendefekte durch fehlende Osteoklasten (Wang et al. 1992).

C-JUN und c-fos bilden als Heterodimer den Transkriptionsfaktor AP-1 (activator protein 1), welcher mit den Transkriptionsfaktoren CREB1 (Jalvy et al. 2007) und NFATc1 (Hogan et al. 2003) interagiert, wodurch weitere an der Kollateralenbildung beteiligte Proteine transkribiert werden können. Außerdem kommt es durch AP-1 zur vermehrten Bildung von MCP-1 (Demicheva et al. 2008), welches maßgeblich an den Umbauprozessen der Arteriogenese beteiligt ist (Park et al. 2008).

## 2.4 Tiermodelle in der Arteriogenese

In der Vergangenheit wurden bereits diverse experimentelle Ansätze an verschiedenen Tierarten zur Untersuchung zentraler und peripherer Ischämie und zur Rekonstitution der Perfusion beschrieben. Bereits in den 60er und 70er Jahren wiesen Schaper et al. (1971) große epikardiale Kollateralen im Hundemodell nach. Weiter wurde festgestellt, dass kleinere intramyokardiale Kollateralen typisch für das Schwein zu sein scheinen (Schaper et al. 1967). Beide Modelle sind auf den Menschen anwendbar, denn dort wurden sowohl große epikardiale Kollateralen als auch zahlreiche Kapillarverbindungen nachgewiesen.

In den nächsten Jahrzehnten folgten Versuche an Kleintieren wie Mäusen (Asahara et al. 1997; Couffinhal et al. 1998), Kaninchen (Ito et al. 1997; Tsurumi et al. 1997) und Ratten (Takeshita et al. 1997; Mack et al. 1998). Bei diesen Tierarten wurde jedoch meist mit Ligatur der A. femoralis gearbeitet.

### 2.4.1 Wahl der Methode

Die Okklusion von Koronararterien zur Induktion der Arteriogenese wird aufgrund der technischen Schwierigkeiten bei kleineren Tieren vor allem an Hunden und Schweinen durchgeführt. Bei Hunden wird dazu der Ramus circumflexus der linken Koronararterie über einen längeren Zeitraum langsam verschlossen (Schaper et al. 1971). Dies wird durch einen um das Gefäß gelegten, über mehrere Wochen langsam okkludierenden Ameroid-Konstriktor erreicht (Litvas et al. 1957). Durch Arteriogenese vervielfachen die präformiert angelegten Anastomosen ihren Durchmesser von 40 µm durch Proliferation der Endothel- und Gefäßmuskelzellen fast um den Faktor 20.

Bei Schweinen kann zwar die gleiche Methode angewendet werden, jedoch entstehen hier keine großen epikardialen Kollateralen, sondern viele kleine, über das gesamte Risikogebiet verteilten Gefäße, welche kaum größer sind als Kapillaren. Sie besitzen keine glatten Muskelzellen und häufen sich um Mikronekrosen (Schaper et al. 1967). Diese Unterschiede werden verursacht durch die Differenzen der präexistent im Gewebe ruhenden Kollateralen (Hearse 2000). So ist das Kollateralarterienetz im Hundeherz von Geburt an sehr deutlich ausgeprägt. Beim Schwein hingegen ist die Kollateralisierung im Herzen sehr schwach, wodurch diese Tierart sehr viel empfindlicher auf Manipulationen und Gefäßverschlüsse reagiert.

Bei dem Ligaturmodell in der Peripherie wird die A. femoralis im Bereich des Oberschenkels zweimal im Abstand von 1-3 cm (je nach Größe der Tierart) ligiert. Die doppelte Ligatur dient dazu, den Einfluss sogenannter Brückenkollateralen zu verhindern, die die Okklusionsstelle auf kürzestem Wege umgehen können. Aus diesem Grunde wird ebenfalls die an dieser Stelle abgehende A. circumflexa femoris ligiert. Der Verschluss der A. femoralis muss distal des Abgangs der A. profunda femoris liegen, die als Ursprungsgefäß für potentielle Kollateralarterien dient. Die Schubspannung als Trigger der Arteriogenese wird durch die Ligatur plötzlich erhöht, da das gesamte Blutvolumen, welches vom prästenotischen Hochdruckgebiet ins poststenotische Niederdruckgebiet geleitet wird, nun zunächst die präformierten Kollateralen durchfließen muss.

Die Schubspannung beim Ligaturmodell in der Peripherie kann durch zusätzliches Anlegen eines arteriovenösen Shunts chronisch erhöht werden. Dazu werden A. femoralis und die dazugehörige Vene unmittelbar distal der Ligatur durch eine Seit-zu-Seit-Anastomose chirurgisch verbunden. Der kollaterale Blutfluss wird dadurch größtenteils direkt in das venöse System abgeleitet und nur ein kleiner Teil gelangt in die periphere Zirkulation. Dies führt zu einem drastischen Anstieg der Geschwindigkeit und des Volumens der Kollateraldurchblutung und erhöht damit die Schubspannung. Durch dieses Modell kommt es nicht nur zu einer kompletten Normalisierung sondern sogar zu einer Überkompensation des Blutflusses im poststenotischen Gebiet. Die chronisch erhöhte Schubspannung führt zu einem erheblich verlängerten Wachstumsprozess der Kollateralarterien.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde das Ligaturmodell in der Peripherie gewählt. Ein Grund dafür ist die deutlich geringere Mortalität im Vergleich zur Ligatur von Koronargefäßen, ein weiterer die Möglichkeit der Shunt-Operation und damit der Vergleich zwischen einfacher Ligatur des Gefäßes und Überkompensation aufgrund drastisch erhöhter Schubspannung. Diese wiederum konnte verglichen werden mit der Verbesserung der natürlichen Arteriogenese durch pharmakologische Stimulation mittels 4 $\alpha$ PDD.

### **2.4.2 Wahl der Tierart**

Versuche an Kleintieren wie Mäusen, Ratten und Kaninchen haben neben dem einfachen Handling auch finanzielle sowie platzsparende Vorteile. Zudem können gezielte Fragestellungen durch Verwendung von genmanipulierten Mäusen besser beantwortet werden. Auf der anderen Seite sind anatomische Abgrenzungen und damit das Ligieren der Gefäße an definierten Stellen, sowie morphologische Untersuchungen durch Angiographien und intravasale Druckmessungen vor allem bei Mäusen deutlich erschwert. Hinzu kommt der unterschiedliche Zeitverlauf der Arteriogenese im Vergleich zum Menschen, da eine Kollaterale bei der Maus nur eine bis zwei Zellteilungen der glatten Muskelzellen benötigt, um ihren finalen Diameter (das doppelte des ursprünglichen Durchmessers) zu erreichen. Schon beim Kaninchen muss der Diameter auf das siebenfache anwachsen, bei Hunden, Schweinen oder auch beim Menschen bis auf das 20fache. Die Zellen müssen dadurch um das hundertfache proliferieren, um die Scherkräfte nach dem Hagen-Poiseuillschen Gesetz zu normalisieren (Schaper 2004). Da der Zellzyklus der Endothel- und glatten Muskelzellen immer ca. 20 Stunden dauert, resultiert hieraus der deutliche Unterschied der benötigten Zeit bis zur adäquaten Wiederherstellung der Perfusion (Schaper und Buschmann 1999).

Die Entscheidung, das Schwein als Versuchstier in dieser Arbeit zu verwenden, hatte mehrere Gründe. Hier ist zum einen die anatomische Vergleichbarkeit der Kollateralen zum Menschen und die dadurch bedingte hohe klinische Relevanz zu nennen. Zum anderen spielten Gründe der Praktikabilität intravasaler Druckmessungen und Angiographien, sowie der Anlegung eines arteriovenösen Shunts eine große Rolle.

### 3 Methoden

#### 3.1 Versuchsplan

37 Schweine wurden randomisiert auf die Versuchsgruppen verteilt. Die erste Form der Einteilung erfolgte aufgrund der Operationsmethode. Den Tieren der Gruppe A wurde keine Pumpe implantiert, sie wurden lediglich zur Kontrolle sham operiert. Bei den Gruppen B bis E wurde eine Ligatur der A. femoralis durchgeführt, bei den Tieren der Gruppen F und G wurde außerdem ein arteriovenöser Shunt angelegt. Die zweite Form der Einteilung erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Füllung der osmotischen Minipumpen (NaCl, verschiedene Konzentrationen von 4 $\alpha$ PDD oder Ruthenium Rot). Angaben zu den Gruppeneinteilungen enthält Tab. 2.

Gruppe	Operation	verabreichte Substanz	Dosis	Versuchstierzahl
A	Sham	-	-	n = 5
B	Ligatur	NaCl	2 ml	n = 6
C	Ligatur	4 $\alpha$ PDD	9 $\mu$ g/kg/d	n = 5
D	Ligatur	4 $\alpha$ PDD	18 $\mu$ g/kg/d	n = 6
E	Ligatur	4 $\alpha$ PDD	36 $\mu$ g/kg/d	n = 5
F	Shunt + Ligatur	NaCl	2 ml	n = 5
G	Shunt + Ligatur	Ruthenium Rot	750 $\mu$ g/kg/d	n = 5

**Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Schweine** (a) nach Art der Operation; (b) nach Füllung der Pumpe. Insgesamt wurden 37 Tiere operiert. 5 davon wurden sham-operiert, bei 22 wurde eine Ligatur der A. femoralis durchgeführt und bei 10 Schweinen wurde zusätzlich zur Ligatur ein arteriovenöser Shunt zwischen A. und V. femoralis angelegt. Bis auf die sham-operierten Schweine wurde allen Tieren eine osmotische Minipumpe implantiert, welche nach der Tabelle mit NaCl, 4 $\alpha$ PDD oder RR gefüllt war.

An allen Schweinen wurden zwei operative Eingriffe durchgeführt. Bei der ersten Operation (Tag 0) wurde je eine osmotische Minipumpe implantiert und die linke A. femoralis ligiert, in in den Gruppen F + G wurde zusätzlich ein AV-Shunt angelegt. Weiterhin wurden intravasale periphere und zentrale Druckmessungen sowie Angiographien durchgeführt. Die zweite Operation an Tag 7 umfasste zunächst ebenfalls intravasale Druckmessungen und Angiographien. Anschließend wurden die Tiere euthanasiert und es wurden Gewebeproben nach einem standardisierten Entnahmeprotokoll entnommen.

## **3.2 Tierversuche**

Das Versuchsvorhaben wurde gemäß §8 Abs.1 des Deutschen Tierschutzgesetzes vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt. Tierhaltung und Tierversuche befolgten das Europäische Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere (Europarat, Straßburg 1986) und die Leitsätze der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS).

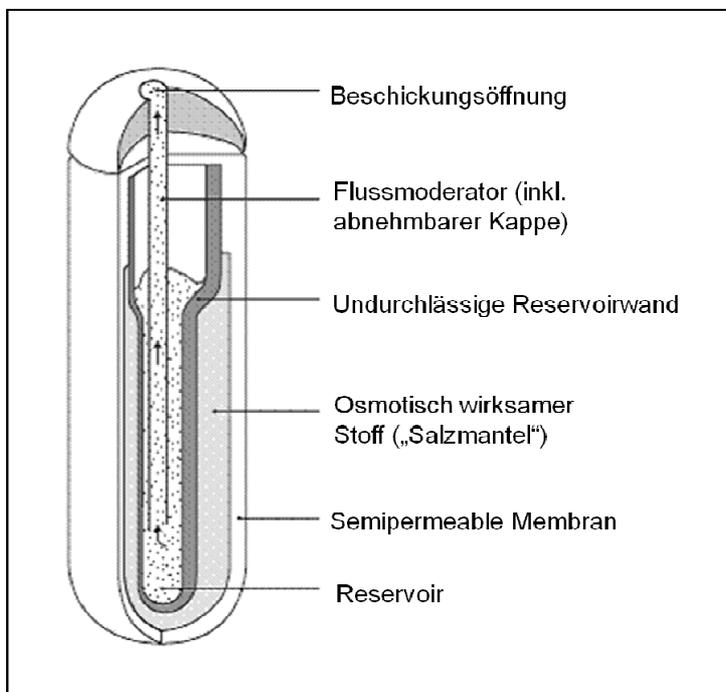
### **3.2.1 Versuchstiere**

Für die Versuche wurden insgesamt 37 männliche, kastrierte Hybridschweine (Deutsches Edelschwein x Landrasse) im Alter von  $75 \pm 12$  Tagen verwendet, welche bei Einstellung  $38 \pm 4,6$  kg wogen. Alle Tiere stammten von einem privaten hessischen Zuchtbetrieb. Nach der Einstellung, welche zur Akklimatisierung eine Woche vor der ersten Operation stattfand, erfolgte eine allgemeine Untersuchung zur Überprüfung des Gesundheitszustandes. Die Schweine wurden in Einzelboxen auf Stroh gehalten und hatten Geruchs- und Sichtkontakt zu ihren Artgenossen. Die Fütterung erfolgte mit handelsüblichem Schweinefutter, Wasser stand ad libitum über eine Selbsttränke zur Verfügung.

### 3.2.2 Aufbau und Beschickung der osmotischen Minipumpen

Zur lokalen Applikation der Testsubstanzen wurden osmotisch aktivierte Pumpen mit einer Pumpleistung von 10  $\mu\text{l/h}$  über einen Zeitraum von 7 Tagen verwendet. Das Prinzip dieser Pumpen beruht auf dem osmotischen Druckgradienten zwischen der sogenannten Salzhülle, einem Kompartiment der Pumpe, und dem sie umgebenden Gewebe. Durch die hohe Osmolarität des Salzmantels kommt es durch die semipermeable Membran zu einem Einstrom von Wasser aus dem umliegenden Gewebe. Aus der zunehmenden Kompression des mit einer flexiblen Hülle ausgestatteten Reservoirs resultiert eine Verdrängung und damit Freisetzung der darin vorhandenen Lösung (ALZET osmotic pumps Company) (Abb. 7).

Die nach Tab. 2 benötigte Menge 4 $\alpha$ -PDD (Aktivator des TRPV4) wurde steril in 1 ml DMSO gelöst und mit 1 ml isotonischer *Kochsalzlösung* (NaCl) auf das in die Pumpe passende Volumen von 2 ml aufgefüllt, die 200 mg Ruthenium Rot (Hemmer des TRPV4) konnten direkt in 2 ml NaCl gelöst werden. Vor dem Einbau wurden die geladenen Pumpen 6-8 Stunden bei 37°C in 0,9%iger Kochsalzlösung inkubiert und somit aktiviert. Dies gewährleistete die Substanzapplikation bereits unmittelbar nach der Pumpenimplantation.



**Abbildung 7: Aufbau einer osmotischen Minipumpe (modifiziert nach ALZET® (ALZET osmotic pumps Company)).** Der Flussmoderator wirkt als Grenze und verhindert sowohl den Einstrom von Luft als auch das unkontrollierte Ausfließen der in der Minipumpe befindlichen Flüssigkeit.

### 3.2.3 Prämedikation und Operationsvorbereitung

Jeweils 3 Tage vor den Operationen erhielten die Schweine täglich 100 mg Acetylsalicylsäure und 75 mg Clopidogrel per os zur Thrombozytenaggregationshemmung. 12 Stunden vor den Operationen wurden die Tiere in eine Einzelbox ohne Einstreu, dafür aber mit Lochgummimatte und Wärmelampe umgestellt. Die Schweine wurden ab diesem Zeitpunkt nüchtern gehalten, Wasser stand weiterhin ad libitum über eine Selbsttränke zur Verfügung.

Die Prämedikation erfolgte durch intramuskuläre Injektion von 4 mg/kg KG Azaperon, 20 mg/kg KG Ketamin und 0,5 mg Atropinsulfat. Nach Erreichen einer ausreichenden Sedation wurden die Schweine im warmen Seifenbad gewaschen. Anschließend wurden die Operationsfelder und Elektrodenkontaktstellen rasiert und jedem Schwein ein Venenverweilkatheter in die Vena auricularis magna gelegt. Zum Erreichen der Intubationsfähigkeit wurde den Schweinen 3-4 mg/kg KG Midazolam intravenös injiziert, anschließend wurden sie unter laryngoskopischer Kontrolle endotracheal intubiert und in Rückenlage ausgebunden.

### 3.2.4 Narkose

Die Einleitung der Anästhesie erfolgte mit einer intravenösen Bolusgabe von 1,5 mg/kg KG Propofol, welche über einen Perfusor gesteuert wurde. Die Erhaltungsdosis betrug 4-6 mg/kg KG/h, wobei die Bewertung der Narkosetiefe anhand von Vitalparametern, Lid- und Schmerzreflexen, Bulbusstellung und Spontanbewegungen erfolgte. Aufgrund der atemdepressiven Wirkung des Propofols wurden die Tiere kontinuierlich mit einem Luft-Sauerstoff-Gemisch (O<sub>2</sub>-Gehalt = 43%) druckkontrolliert im BIPAP-ASB-Modus (*biphasic intermittent positive airway pressure* mit *assisted spontaneous breathing*) maschinell beatmet, so dass jederzeit Spontanatmung möglich war. Der *positiv endexpiratorische Druck* (PEEP) betrug hierbei 5 mbar. Atemfrequenz, Beatmungsdruck und Inspirationsdauer wurden individuell so angepasst, dass eine ausreichende Sauerstoffsättigung des Blutes (> 97%) und ein endexpiratorischer CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 36-42 mmHg gewährleistet werden konnten. Die Überwachung der Vitalfunktionen erfolgte mit Oberflächen-EKG und einem Kapnographen.

Zur Muskelrelaxation wurden nach Bedarf Repetitionsgaben von 2 mg Pancuroniumbromid intravenös verabreicht, die intraoperative Analgesie erfolgte mit

intravenösen Piritramiddosen von 0,2 mg/kg KG. Außerdem erhielten die Tiere zu Beginn der Operation eine Infektionsprophylaxe mit 2 g Cephazolin i.v. als Kurzinfusion. Die Flüssigkeitssubstitution wurde durch eine Dauertropfinfusion mit 10 ml/kg KG/h isotonischer Natriumchlorid-Lösung 0,9% gewährleistet.

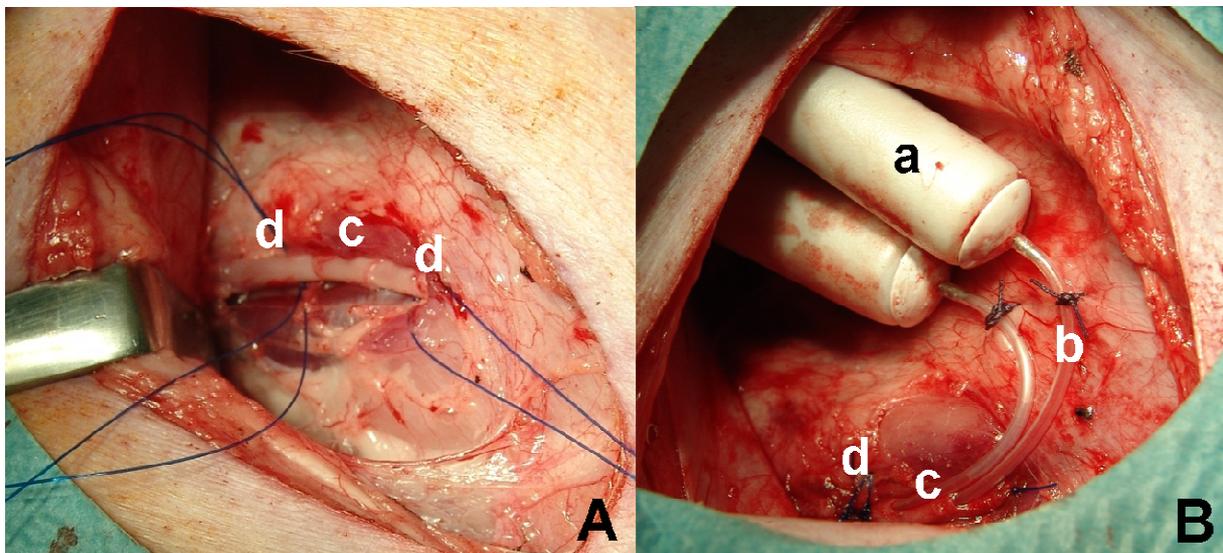
### **3.2.5 Vorgehen bei der ersten OP**

#### **a) Operation mit Ligatur der linken A. femoralis**

Nach gründlicher Hautdesinfektion erfolgte unter sterilen Kautelen der initiale Hautschnitt im linken Schenkelspalt (Abb. 8b) und es wurde in der Tiefe die A. femoralis mobilisiert (Abb. 9). Anschließend wurde ein Hautschnitt auf der medialen Seite des linken Hinterlaufes vom Tarsalgelenk ca. 10 cm nach proximal verlaufend durchgeführt (Abb. 8c) und die darunter liegende A. saphena dargestellt. In Seldinger-Technik wurde eine 5F-Schleuse in die Arterie gelegt und ein elektrischer Druckwandler (in Herzhöhe auf dem Tisch angebracht) angeschlossen. Über diesen wurde der intravasale Druck an das Monitoring-System übertragen und dort numerisch und in Form von Wechselkurven angezeigt. Ein weiterer, ca. 15 cm langer Schnitt wurde in der Drosselrinne etwa 5 cm rechtslateral vom Manubrium sterni durchgeführt (Abb. 8a) und sowohl A. carotis als auch V. jugularis interna dargestellt. In diese wurden in Seldinger-Technik je eine 7F-Schleuse gelegt und abermals ein Drucktransducer angeschlossen. Nach Ablesung der zentralen und peripheren intravasalen Drücke wurden Angiographien der Bereiche zwischen A. poplitea communis, A. femoralis und A. saphena durchgeführt, wobei als Kontrastmittel Iomeprol verwendet wurde. Als nächster Schritt wurde der Schlauch der je nach Gruppenzugehörigkeit gefüllten ALZET<sup>®</sup>-Pumpe über einen Führungsdraht retrograd in die A. femoralis eingeführt und diese danach distal des Schlauches doppelt ligiert (Prolene 4-0). Auch die A. circumflexa femoris wurde ligiert, um ein direktes und kurzes Kollateralwachstum von diesem Gefäß aus zu verhindern. Nach Festnähen der Pumpe in der entstandenen Tasche im Schenkelspalt wurde der Schnitt mit einer Muskel- und einer Hautnaht verschlossen. Nachfolgend wurden weitere Angiographien angefertigt und die zentralen und peripheren intravasalen Drücke abgelesen. Abschließend wurden die Schleusen aus der A. saphena, A. carotis und V. jugularis entfernt, die Gefäße mittels eines Verschlusssystems (Angioseal) verschlossen und die Wunden vernäht (Abb. 11).



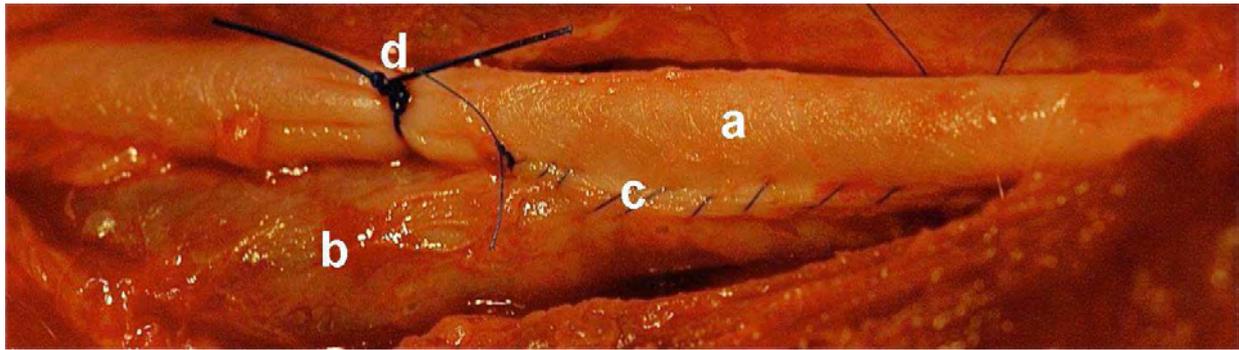
**Abbildung 8: Schwein auf dem Operationstisch mit den Inzisionsstellen.** (a) Zugang zur A. carotis und V. jugularis; (b) Zugang zur A. femoralis; (c) Zugang zur A. saphena.



**Abbildung 9: Operationsfeld.** **A:** Vorlegen des Fadens für die Ligatur der A. femoralis **B:** 2 ALZET-Pumpen mit je 5 mg 4 $\alpha$ PDD. (a) ALZET-Pumpe; (b) Schlauch; (c) A. femoralis; (d) Ligatur

### **b) Operation mit Anlegen eines arteriovenösen Shunts**

Bei dieser Operation wurden zunächst die gleichen Schritte wie bei a) durchgeführt. Vor der Implantation der ALZET-Pumpe wurde der Blutfluss in der A. und V. femoralis mit Hilfe von Gefäßklemmen temporär unterbunden. Nach Eröffnung der beiden Gefäße an der einander zugewandten Seite wurden die nun entstandenen Wundränder mit einem 7-0-Prolenefaden so verbunden, dass ein AV-Shunt entstand (Abb. 10 und Abb. 12). Anschließend wurde der PVC-Schlauch der je nach Gruppenzugehörigkeit gefüllten ALZET-Pumpe proximal des Shunts in die A. femoralis eingeführt und diese danach distal doppelt ligiert. Die weitere Operation erfolgte wie in 3.2.5 a) beschrieben.



**Abbildung 10: AV-Shunt direkt nach Operation** (a) A. femoralis; (b) V. femoralis; (c) AV-Shunt zwischen A. und V. femoralis; (d) Ligatur der A. femoralis

### 3.2.6 Postoperative Versorgung

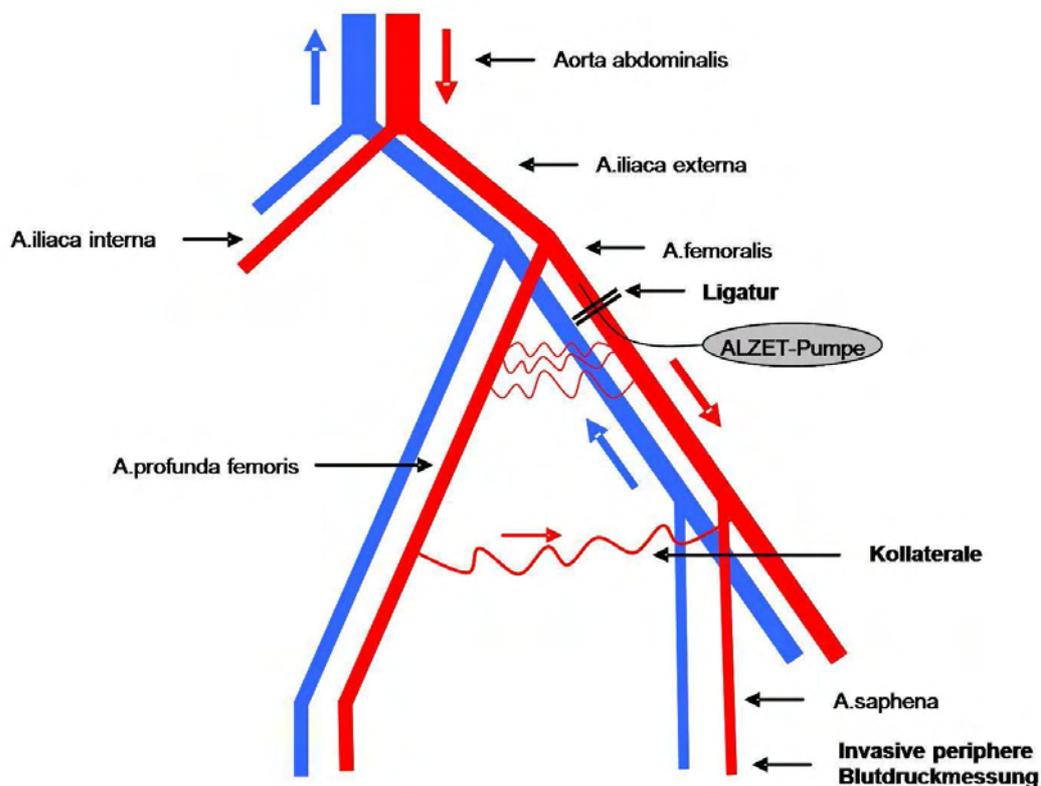
Nachdem die Schweine wieder regelmäßig selbständig atmeten, wurden sie extubiert und zurück in den Versuchsstall gebracht. Die Tiere erhielten als Infektionsprophylaxe über 3 Tage intramuskulär 2 mg/kg KG Cefquinom. Die postoperative Analgesie erfolgte über 3 Tage transdermal mit einem Fentanylpflaster (25 µg/h).

### 3.2.7 Vorgehen bei der zweiten OP nach 7 Tagen

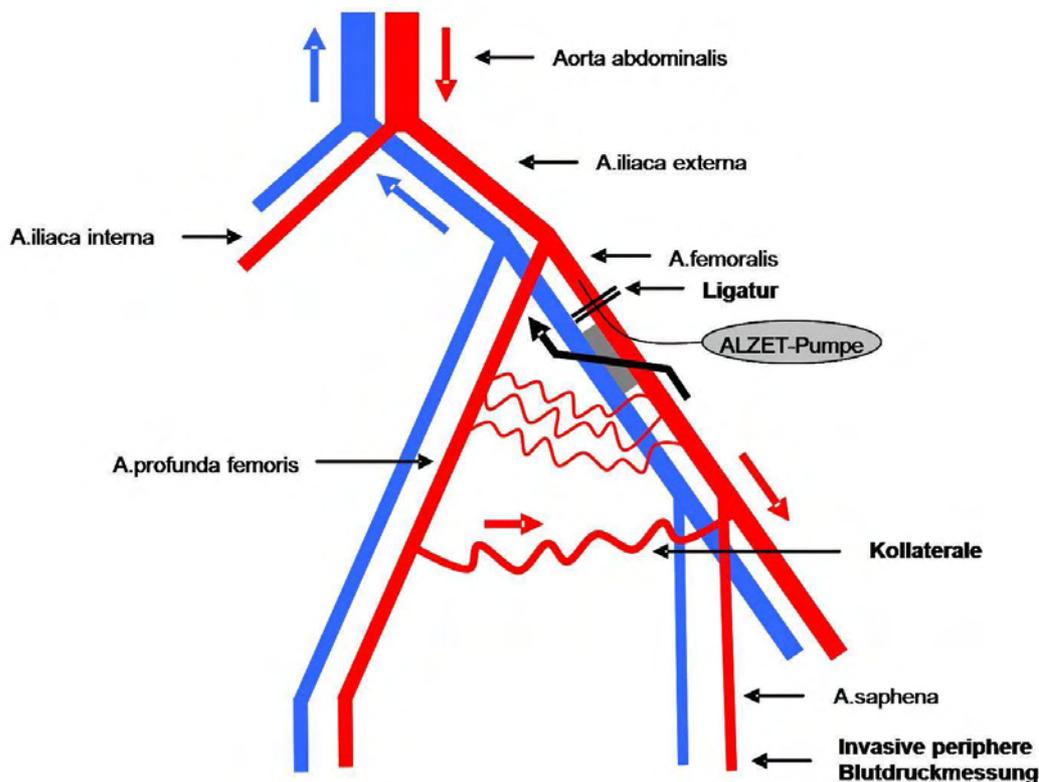
Die Vorbereitung der Tiere und die Narkose an Tag 7 glich dem Vorgehen bei der ersten Operation. Die Nähte oberhalb des Tarsalgelenkes und in der Drosselrinne wurden wieder geöffnet, es wurden Katheter in die A. saphena, A. carotis und V. jugularis gelegt und Druckwandler angeschlossen. Nach Ablesung der zentralen und peripheren intravasalen Drücke wurden Angiographien der Bereiche zwischen A. poplitea communis, A. femoralis und A. saphena durchgeführt, um mögliche dort vorhandene Kollateralen sichtbar zu machen. Dafür wurde das Kontrastmittel über einen Katheter in die A. profunda femoris appliziert. Anschließend wurde die Narkose mit intravenösen Bolusgaben von insgesamt 2,5 g Thiopental-Natrium vertieft, bevor die Tiere mit 1,5 mval/kg KG Kaliumchlorid euthanasiert wurden. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und alle distal der A. renalis von der Aorta abgehenden Gefäße doppelt ligiert. Anschließend wurde die linke A. iliaca externa inzidiert und mit 40 ml NaCl und anschließend mit 70 ml des auf 40°C erwärmten Gelatine-Kontrastmittels infundiert, um das Gefäßsystem darzustellen. Nachdem Proben aus A. saphena und Skelettmuskel des rechten Hinterlaufes entnommen worden waren, wurde das linke Hinterbein komplett abgesetzt und für eine Stunde auf Eis gelegt. Anschließend

wurden die nun blau gefärbten und gefüllten Gefäße präpariert, es wurden Skelettmuskulatur (M. adductor magnus, M. adductor brevis und M. gracilis) und einzelne Kollateralen entnommen. Alle Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Einen schematischen Vergleich über die unterschiedlichen Operationsmethoden und den Verlauf aller Gefäße, insbesondere der entstehenden Kollateralen, zeigen Abb. 11 für die Operation mit einfacher Ligatur und Abb. 12 für das zusätzliche Anlegen eines AV-Shunts zwischen A. und V. femoralis.



**Abbildung 11: Schema des Gefäßsystems der hinteren linken Gliedmaße an Tag 7 nach Ligatur der A. femoralis.** Es sind sowohl die die Ligatur als auch die osmotische Minipumpe mit ihrem nach proximal ziehenden Schlauch eingezeichnet. Die geschwängelten Gefäße verdeutlichen die häufigsten Lagen der Kollateralen in der Adduktorenmuskulatur. Rot = Arterien; blau = Venen.



**Abbildung 12:** Schema des Gefäßsystems der hinteren linken Gliedmaße an Tag 7 nach Anlegen eines arteriovenösen Shunts und mit Ligatur der A. femoralis. Der durch den Shunt entstehende Blutstrom von der A. femoralis direkt in die V. femoralis ist durch den dicken schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Durch die chronische Erhöhung der Schubspannung kommt es zu einer deutlichen Durchmesserzunahme der Kollateralen. Rot = Arterien; blau = Venen.

### 3.2.8 Collateral flow index (CFI)

Seiler et al. veröffentlichte 2001 eine Studie, in der bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit der Einfluss einer intrakoronaren und subkutanen Therapie mit dem Wachstumsfaktor GM-CSF auf die Entwicklung von funktionellen Kollateralarterien untersucht wurde. Als Parameter des kollateralen Blutflusses diente die Berechnung eines Flussindex aus distalem koronarem Verschlussdruck und Aortendruck (*collateral flow index*, CFI). Mit dieser Methode ließen sich auch kleinere Unterschiede in der poststenotischen Durchblutung detektieren. Dieser Index gilt nicht nur für die koronare Kollateralisierung, sondern lässt sich ebenso auf die Peripherie übertragen. Mit diesem Parameter stand uns eine sensitive Möglichkeit zur Beurteilung der kollateralen Blutversorgung zur Verfügung.

Der CFI ist definiert als die Höhe des Blutflusses, der über die Kollateralen in die periphere vaskuläre Region geleitet wird im Vergleich zu dem, welcher über die normalen gesunden Gefäße fließt (Pijls et al. 1993). Berechnet wird der CFI sowohl vor als auch nach Ligatur aus den in der Operation intravasal gemessenen

Druckwerten (Seiler et al. 1998). Bei dem CFI handelt es sich um einen einheitslosen Wert zwischen 0 und 1.

$$CFI = \frac{P_{Occl} - CVP}{P_{Ao} - CVP}$$

$P_{Ao}$  bezeichnet den Blutdruck in der Aorta,  $P_{Occl}$  denjenigen im poststenotischen Gebiet. Der CVP ist der zentrale Venendruck.

### **3.3 Immunhistochemie**

#### **3.3.1 Herstellung der silanebeschichteten Objektträger**

Zur Vermeidung des Ablösens der Schnitte bei den Inkubations- und Waschschrritten wurden ausschließlich beschichtete Objektträger verwendet. Dazu wurden die Objektträger mit in Wasser gelöstem Extran gereinigt, in Aqua dest. gespült und bei 40°C im Wärmeschrank über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger für 5 sec in eine 2%ige 3-Aminopropyltriethoxysilane getaucht, anschließend kurz in Aceton und Aqua dest. gewaschen und abermals über Nacht getrocknet.

#### **3.3.2 Herstellung der Gefrierschnitte**

Für das Herstellen der Gefrierschnitte wurden die Blöcke zunächst mit Tissue Tek auf Aluminiumhalterungen aufgebracht. Anschließend wurden sie mit Hilfe eines Gefriermikrotoms bei -28°C 6 µm dick geschnitten, mit den silanebeschichteten Objektträgern aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet.

### 3.3.3 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur vorläufigen Beurteilung der Probenbeschaffenheit und Anschnittsrichtung der Muskelfasern (erwünscht waren Querschnitte) wurden zunächst von allen Proben *Hämalaun-Eosin*-(HE) Färbungen angefertigt (Tab. 3).

Schritt	Substanz	Dauer	
1	Kernfärbung	Hämalaun nach Mayer	10 min
2	Bläuen	fließendes warmes Leitungswasser	5 min
3	Waschen	Aqua dest.	Eintauchen
4	Färben	Eosin 2%	5 min
5	Entwässern	aufsteigende Alkoholreihe (95%, 100%, 100%)	Eintauchen
6	Klären	Xylol	1 min
7	Eindecken	Entellan <sup>®</sup>	

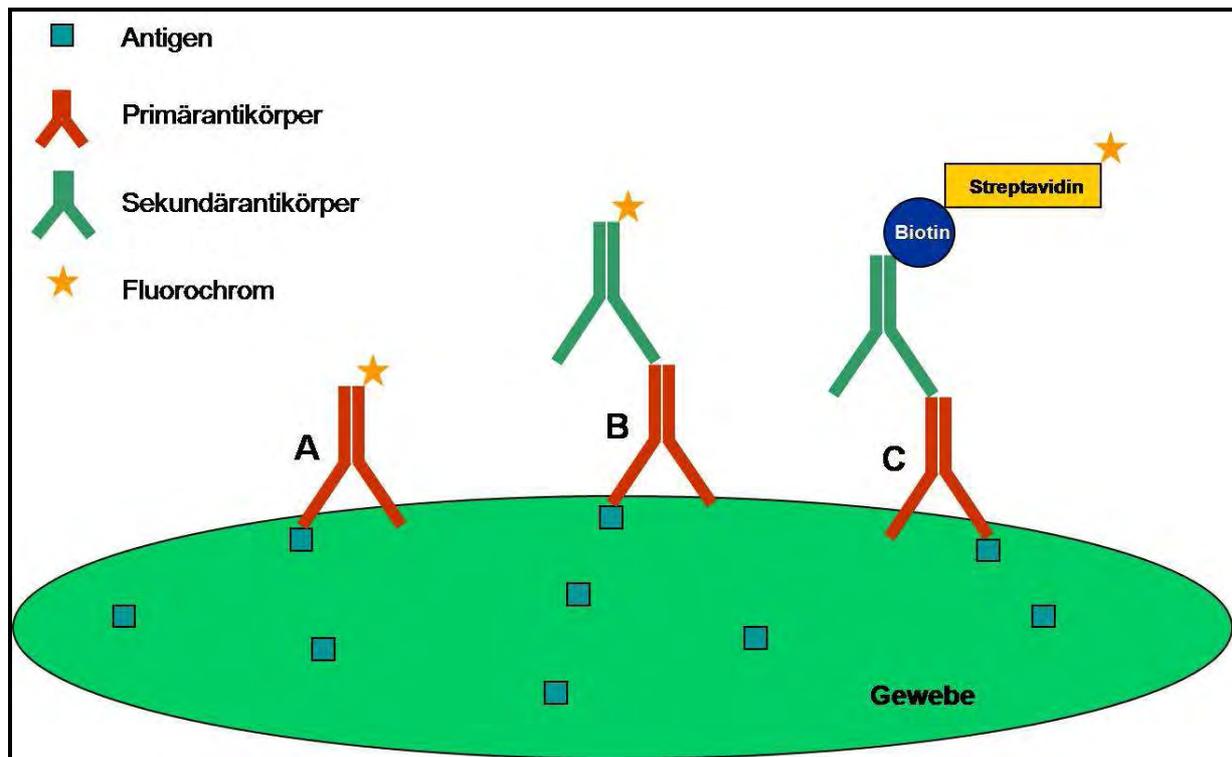
**Tabelle 3: Färbeprotokoll für HE-Färbung zur vorläufigen Beurteilung der Probenbeschaffenheit und Anschnittsrichtung der Muskelfasern.**

### 3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Das Prinzip der Immunhistochemie basiert auf dem Nachweis antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten mit Hilfe spezifischer mono- oder polyklonaler Antikörper. Die Sichtbarmachung der entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt durch direkte oder indirekte Markierungsverfahren, welche beide in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden.

Bei der direkten Methode bindet der mit einem Fluorochrom konjugierte Antikörper an das Antigen und kann dadurch im Fluoreszenzmikroskop durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Vorteil dieser Methode ist die geringe Hintergrund-Fluoreszenz, allerdings besitzt diese Färbung eine relativ geringe Sensitivität.

Bei dem indirekten Verfahren wird die 2-Schritt- und die 3-Schritt-Methode unterschieden. Bei ersterer erfolgt die Inkubation mit einem weiteren (Sekundär-) Antikörper, welcher markiert und gegen den nicht fluorochromierten spezifischen Erstantikörper gerichtet ist. Die zweite Form basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (ein Protein des Strahlenpilzes *Streptomyces avidinii*) zu dem Vitamin Biotin. Hierbei bindet fluorochromiertes Streptavidin an einen biotinylierten Sekundärantikörper (Abb. 13).



**Abbildung 13: unterschiedliche Verfahren der Immunhistochemie.** A: direkte Methode, in der ein fluorchromgekoppelter Antikörper an das Antigen bindet und dieses direkt sichtbar macht. B: indirekte Methode (2-Schritt), bei welcher der Erstantikörper nicht markiert ist, jedoch der Zweitantikörper, welcher spezifisch an den Erstantikörper bindet. C: indirekte Methode (3-Schritt), bei der ein biotinylierter Zweitantikörper spezifisch an den unmarkierten Erstantikörper bindet. Durch die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin bindet fluorchromiertes Streptavidin an den biotinylierten Sekundärantikörper.

### 3.3.4.1 Färbeprotokolle

Die Proben wurden 5 min lang mit 4% Paraformaldehydlösung fixiert, da dieses schnell in die Zellen eindringt und aushärtet, ohne sie porös zu machen. Nach anschließendem Waschen in *phosphatgepufferter Kochsalzlösung* (PBS) erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in einer feuchten Kammer, wodurch ein Eintrocknen und Ausbleichen der Schnitte vermieden wurde. Zum Nachweis bestimmter Proteine wurden dafür spezifische mono- und polyklonale, fluorchromierte oder native Primärantikörper verwendet. Nach 12 Stunden bei 4°C wurde der Erstantikörper durch gründliches Waschen in PBS entfernt. Anschließend wurde der Fluorchrom-konjugierte Sekundärantikörper aufgetragen, welcher eine Stunde auf dem Schnitt inkubierte. Bei Anwendung der Biotin-Streptavidin-Methode wurden dabei biotinylierte Sekundärantikörper, welche gegen den Erstantikörper gerichtet waren, verwendet. Nach erneutem Waschen in PBS wurde zur Detektion

der biotinylierten Antikörper mit Carbocyaninen konjugiertes Streptavidin verwendet. Diese Farbstoffe zeichnen sich durch ihre hohe Leuchtkraft und Photostabilität aus. Nach wiederum einer Stunde wurden die Schnitte gründlich gewaschen. Zur Detektion der Zellkerne wurden spezifisch an die DNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Um die Darstellung sowohl im Fluoreszenz- als auch im konfokalen Mikroskop zu gewährleisten wurde eine Kombinationsfärbung mit DAPI und Draq5 mit einer Verdünnung von je 1:1000 und 20-minütiger Inkubation verwendet.

Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit Mowiol, welches bei der anschließenden Lagerung der Objektträger im Kühlschrank aushärtete.

Bei jeder Färbereihe wurde ein Objektträger mit 1-2 Schnitten als Negativkontrolle verarbeitet, bei welchem kein Erstantikörper aufgebracht wurde. Daran konnte das Maß der Hintergrundfärbung ermittelt und falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die nachfolgende Tab. 4 gilt für TRPV4, NFATc1 und C-JUN, da bei diesen Färbungen die Biotin-Streptavidin-Methode angewendet wurde. Für CREB1 fallen lediglich die Schritte 7 und 8 weg, da diese Proteine mit der indirekten 2-Schritt-Methode angefärbt wurden.

Schritt	Substanz	Temp.	Dauer
1	Fixierung	PFA 4%	RT 5 min
2	Waschen	PBS	RT 3 x 3 min
3	Inkubation	Erstantikörper	4°C über Nacht
4	Waschen	PBS	RT 3 x 3 min
5	Inkubation	Zweitantikörper	RT 60 min
6	Waschen	PBS	RT 3 x 3 min
7	Inkubation	cy-konjugiertes Streptavidin	RT 60 min
8	Waschen	PBS	RT 3 x 3 min
9	Inkubation	2. Erstantikörper (anti- $\alpha$ SMA)	RT 60 min
10	Waschen	PBS	RT 3 x 3 min
11	Kernfärbung	Dapi/Draq5	RT 20 min
12	Waschen	PBS	RT 3 x 3 min
13	Eindecken	Mowiol	

**Tabelle 4: Färbeprotokoll für TRPV4, NFATc1, CREB1, C-JUN und  $\alpha$ SMA.** Bei CREB1 fallen die Schritte 7 und 8 weg, da bei diesen Proteinen die indirekte 2-Schritt-Methode gewählt wurde.

Für die Anfärbung des Proliferationsmarkers Ki67 wurden die Schnitte zur DNA-Denaturierung in Zitratpuffer gewaschen und dann 9 min in der Mikrowelle gekocht. Anschließend erfolgte eine langsame Abkühlphase bei Raumtemperatur, um ein Ablösen der Schnitte von den Objektträgern zu vermeiden. Nach gründlichem Waschen in PBS, um Kristallbildung vorzubeugen, erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper. Der Rest des Protokolls glich der oben erklärten Färbung und wird in Tab. 5 genauer beschrieben.

	<b>Schritt</b>	<b>Substanz</b>	<b>Temp./ Leistung</b>	<b>Dauer</b>
1	Fixierung	PFA 4%	RT	20 min
2	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
3	Waschen	Zitratpuffer	RT	1 x 3 min
4	Kochen	Zitratpuffer	720 W	9 min
5	Abkühlen	Zitratpuffer	RT	60 min
6	Waschen	PBS	RT	4 x 3 min
7	Inkubation	Erstantikörper (Ki67)	4°C	über Nacht
8	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
9	Inkubation	Zweitantikörper (anti-Mouse-Cy3)	RT	60 min
10	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
11	Inkubation	2. Erstantikörper (anti- $\alpha$ SMA-FITC)	RT	60 min
12	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
13	Kernfärbung	Dapi/Draq5	RT	20 min
14	Waschen	PBS	RT	3 x 3 min
15	Eindecken	Mowiol		

**Tabelle 5: Färbeprotokoll für Ki67.**

### **3.3.5 Mikroskopie**

#### ***Durchlichtmikroskopie***

Die Auswertung der HE-Übersichtsfärbung erfolgte bei 10- und 25-facher Vergrößerung (Objektive PL Fluotar 10x und 25x Öl) im DM-RB Mikroskop. Hierbei wurde besondere Rücksicht auf Anschnittsrichtung, Unversehrtheit und Beschaffenheit der Muskeln und Nerven, sowie die Häufigkeit der vorhandenen Gefäße genommen. Aufgrund der Ergebnisse wurden geeignete Proben für die immunhistochemische Untersuchung ausgewählt.

#### ***Fluoreszenzmikroskopie***

Zur Darstellung der immunhistochemisch markierten Strukturen wurde ebenfalls das DM-RB Mikroskop verwendet, diesmal jedoch mit Verwendung einer 100W Quecksilberdampfampe. Durch entsprechende Farbfilter wurde kurzwelliges Licht geeigneter Wellenlänge erzeugt, um die Fluorophore zur Emission längerwelliger Strahlung anzuregen. Mit Hilfe des Leica Kamerasystems wurden anschließend digitale Bilder mit 25-facher und 40-facher Vergrößerung (Objektive PL Fluotar 25x und 40x Öl) erzeugt. Dieses Verfahren wurde für alle quantitativen Auswertungen verwendet.

#### ***Konfokale Lasermikroskopie***

Durch die konfokale Lasermikroskopie können verschiedene Ebenen eines Präparates mit einer deutlichen Erhöhung von Schärfe und Kontrast im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Die besonderen Vorteile der konfokalen Mikroskopie bestehen dabei darin, dass das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene gesammelt werden kann. Eine zur Fokusebene konjugiert angeordnete Lochblende sorgt dafür, dass nur das aus dieser Ebene stammende Licht vom Detektor erfasst wird. Der durch punkt- und zeilenweises Abtasten mit einem Laserstrahl erzeugte Schnitt ist ein kontrastreiches, hochaufgelöstes Bild der Probe. Durch schrittweises Verschieben der Fokusebene lassen sich die Bilder zu einem dreidimensionalen Bild zusammensetzen.

Alle in dieser Arbeit veröffentlichten Bilder wurden mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie hergestellt.

### **3.3.6 Zählung der Arteriendichte**

Zur Feststellung einer möglichen Erhöhung der Arteriendichte wurden Schnitte der Adduktorenmuskulatur aus dem Kollateralgebiet mit  $\alpha$ SMA und DRAQ5 gefärbt und jeweils 15 repräsentative Bilder jeder Gruppe mit einer 25fachen Vergrößerung angefertigt. Es wurden jeweils alle mit  $\alpha$ SMA gefärbten Gefäße eines Gesichtsfeldes ausgezählt und anhand der Messskala in Arteriolen pro  $\text{mm}^2$  umgerechnet.

### **3.3.7 Ki67-Zählung**

Zur Quantifizierung der Zellproliferation wurden Schnitte der Adduktorenmuskulatur aus dem Kollateralgebiet mit Ki67,  $\alpha$ SMA und DRAQ5 gefärbt, danach wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop 15 randomisierte Bilder pro Gruppe angefertigt. Bei der anschließenden Quantifizierung wurden alle Zellkerne jeweils eines Gefäßes (in Endothel, Media und Adventita) ausgezählt und der prozentuale Anteil Ki67-positiver Zellkerne in diesem Gefäß ermittelt.

### 3.4 Quantitative Analyse von RNA

Die Real Time PCR-Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Zum PCR-Ansatz wird neben den spezifischen Primern ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (CyberGreen) hinzugegeben. Entsprechend der Amplifikation des PCR-Fragmentes steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional. Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten CT-Wert (*threshold cycle*). Dieser drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird.

#### 3.4.1 RNA-Isolation

Gesamt-RNA wurde aus den entnommenen Kollateralen aller untersuchten Tiere isoliert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits, welches RLT-, RW1- und RPE-Puffer sowie RNeasy Mini-Spinsäulen enthielt. Die Gewebeprobe wurde in 300 µl RLT-Puffer gegeben und 4 min bei 20.000 Hz in der Kugel-Schwingmühle homogenisiert. Nach Zentrifugieren (3 min) des Homogenats wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Der weitere Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 590 µl RNase-freien Wassers. Nach einer Inkubation von 10 min bei 55°C wurde zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß pipettiert. Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 450 µl Ethanol über Säulen. Durch 15 sekündiges Zentrifugieren wurden Flüssigkeit und die auf der Säule verbleibende RNA getrennt. Zur Entfernung von Kontaminationen wurden zunächst 700 µl RW1-Puffer und anschließend 2x je 500 µl RPE-Puffer zur Säule pipettiert und jeweils 15 Sekunden abzentrifugiert. Die RNA wurde mit 30 µl RNase-freien Wassers eluiert. Anschließend wurde ein DNA-Verdau mit dem Turbo DNasefree Kit durchgeführt, dazu wurde Turbo DNase Puffer und Turbo DNase zur Probe gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte mit einem Inaktivierungsreagenz. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Probe 90 Sekunden abzentrifugiert und der die RNA enthaltende Überstand in ein neues Gefäß pipettiert. Die Konzentration der gewonnenen RNA sowie die Qualität wurden photometrisch im

Nano Drop bestimmt. Ab einer Konzentration von 50 ng /  $\mu$ l und einem  $OD_{260/280}$ -Quotienten von mindestens 1,8 wurde die isolierte RNA in die Studie eingeschlossen.

### 3.4.2 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription erfolgte bei allen Proben mit einer RNA-Gesamtmenge von 500 ng in einem Volumen von 20  $\mu$ l nach dem SuperscriptII Protokoll von Invitrogen. Dazu wurde ein Reaktionsansatz aus 500 ng Gesamt-RNA, 1  $\mu$ l 10 mM dNTP's, 0,5  $\mu$ l Random Hexamere (Konzentration der Hexamer 500  $\mu$ g/ml) hergestellt und mit Aqua dest. auf 12  $\mu$ l aufgefüllt. Zum Primer-Annealing und zur Lösung vorhandener Sekundärstrukturen wurde die Probe 5 min bei 65°C inkubiert. Nach 2 min Abkühlung auf Eis und Zugabe von 4  $\mu$ l 5 x First Strand Buffer, 2  $\mu$ l 0,1 M DTT und 1  $\mu$ l RNAsin (Konzentration 40 U/ml) erfolgte eine Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur und danach für 2 min bei 42 °C. Anschließend wurde 1  $\mu$ l Superscript-II-Reverse-Transkriptase (Konzentration 200 U/l) hinzugefügt und bei 42°C für 50 min inkubiert. Die Inaktivierung der Transkriptase erfolgte durch Erhitzung auf 70°C für 15 min.

### 3.4.3 Primer-Auswahl

Die verwendeten PCR-Primer-Oligonukleotide wurden ausgehend von den entsprechenden cDNA-Sequenzen computergestützt mit Hilfe des Programmes FastPCR nach folgenden Kriterien ausgewählt (Primersequenzen aller verwendeten Primer siehe Anhang):

- Länge des Primers 18-26 Basen
- GC-Gehalt zwischen 30 und 70%
- keine repetitiven Sequenzen
- Transkriptspezifität
- Größe des PCR-Produktes zwischen 50 und 150 Basenpaaren
- Überspannen einer Exongrenze

Alle Primer wurden anhand einer Endpunkt-PCR mit anschließender analytischer Agarose-Gelelektrophorese getestet.

### 3.4.4 Qualitative real-time PCR

Für jede durchzuführende PCR wurden die Effizienz und ihr dynamischer Bereich ermittelt, indem die cDNA über vier Zehnerpotenzen verdünnt eingesetzt wurde. Die real-time PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 2 µl cDNA
- 100 nM forward Primer
- 100 nM reverse Primer
- IQ SYBR Green Supermix (1x) (enthält Taq-Polymerase, Reaktionspuffer, Nukleotid-Mix und CyberGreen)

Zusätzlich wurde für jede PCR ein Gen-spezifisches Thermoprofil ermittelt. Um festzustellen, ob nur ein spezifisches PCR-Produkt entstanden war, wurde nach jeder PCR eine Schmelzpunktanalyse vorgenommen. Pro analysierten Zeitpunkt wurden drei unabhängige RT-Reaktionen unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt und die daraus gewonnenen CT-Werte gemittelt.

### 3.5 Western Blot

Das Prinzip des Western Blots beruht auf einer Auftrennung von Proteinen mittels *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese* (SDS-PAGE), woran sich ein elektrophoretischer Transfer (*blotting*) der Proteine auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose anschließt. Die zu untersuchenden Proteinbanden können mit Hilfe spezifischer Primärantikörper detektiert und mittels enzymmarkierter Sekundärantikörper visualisiert werden.

#### 3.5.1 Proteinextraktion aus dem Probengewebe

Im Rahmen dieser Dissertation war es nötig, zytoplasmatische und nukleäre Proteinfraction getrennt zu untersuchen. Zur Isolation wurde der *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit* verwendet. Nach Homogenisierung der Proben in einer Kugel-Schweinsmühle, Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde dem entstandenen Pellet 100 µl des mit Protease-Inhibitor (Roche complete) versetzten CER I – Puffers beigefügt. Durch intensives vortexen wurde dieses Pellet resuspendiert, bevor 5,5 µl des zweiten Puffers (CER II) zum Aufschließen der Zellmembran (nicht aber der des Kerns) hinzugegeben wurde. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand und damit die zytoplasmatische Fraktion abgenommen. Das Pellet wurde in mit Protease-Inhibitoren versetztem NER-Puffer (50 µl) gelöst und 40 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand (nukleäre Proteinfraction) bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 3.5.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Lowry et al. verwendet (1951), deren Prinzip zunächst auf der Verbindung der Proteine mit Kupferionen in alkalischer Lösung beruht. Anschließend erfolgt eine Reduktion der Phosphor-Molybdänsäure und Phosphorwolframsäure durch die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, wodurch ein Farbumschlag nach blau erfolgt. Die Intensität der Färbung wird photometrisch bestimmt und ist linear proportional zur Proteinkonzentration.

Durchgeführt wurde die Messung mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Protein-Assays, welcher nach Herstellerangaben durchgeführt wurde. Als Standard diente

eine mit Rinderserumalbumin hergestellte Kalibrierungskurve. Die photometrische Auswertung fand 15 min nach Zugabe des Lowry-Reagenzes im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 690 nm statt.

### 3.5.3 SDS-Gelelektrophorese

Für die Durchführung der SDS-Gelelektrophorese wurden kommerziell erhältliche 4-12% SDS-Gele und eine Elektrophoresezelle verwendet. 30 µg Proteinlysate wurde in doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O und Ladepuffer (4x) aufgenommen und in die entsprechenden Taschen des Gels pipettiert. Zur Proteingrößenbestimmung wurde ein Protein-Marker verwendet. Die Elektrophorese wurde 45 Minuten bei 170 Volt durchgeführt.

### 3.5.4 Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran

Zum Transfer der Proteine wurden das SDS-Gel, die Nitrozellulosemembran und 6 Blätter Filterpapier zunächst einige Minuten lang in 20x Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran luftblasenfrei auf die Rückseite der Gels aufgebracht und zusammen mit dem Filterpapier in Sandwich-Technik in eine Elektrophorese-Transferkammer geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 70 Volt über 2 Stunden. Zur Kontrolle wurden alle Membranen anschließend mit Ponceau-S Lösung gefärbt. Zur weiteren Verwendung wurde die Membran 2 min lang mit dd H<sub>2</sub>O entfärbt.

### 3.5.5 Immunfärbung

Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4°C in einer Lösung aus 5%igem fettfreien Magermilchpulver und TBST-Puffer geblockt, um unspezifische Bindungsstellen für die anschließende Immundetektion zu vermeiden. Nach mehreren Waschschritten der Membran mit TBST-Puffer schloss sich die Inkubation mit einem Dream- bzw. NFATc1-Antikörper über Nacht bei 4°C an. Nach weiterem Waschen mit TBST-Puffer folgte die Inkubation der Membran (1h bei Raumtemperatur) mit einem *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper und HRP-gekoppelten Streptaktin (zur Sichtbarmachung des

Protein-Markern). Anschließend wurde die Membran erneut mit TBST-Puffer gewaschen und mit dem CCD imager fotografiert.

### **3.6 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm Graph Pad prism für Windows (Version 4). Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM (*Standard error of mean*) angegeben. Die Ergebnisse aller Untersuchungen wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Ergab die Varianzanalyse signifikante Unterschiede, so wurde zum multiplen Vergleich zweier Gruppen als post-hoc Test ein Bonferroni-Holmes-Test durchgeführt. Ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ( $p < 0,05$ ) galt als signifikant.

Bei allen Versuchen wurden die Werte der Kontrollgruppe auf 1 und die aller anderen Tiere dazu ins Verhältnis gesetzt.

Wenn nicht anders angegeben beziehen sich beschriebene Signifikanzen auf die Ligaturgruppe.

## 4 Ergebnisse

Insgesamt wurden 37 Schweine in die vorliegende Arbeit eingeschlossen. Dabei handelte es sich um 5 Kontrolltiere mit Sham-Operation, bei 22 Schweinen wurde eine Ligatur der A. femoralis durchgeführt und bei 10 Tieren wurde zusätzlich ein Shunt zwischen A. und V. femoralis angelegt. Nach einer Erholungsphase von 2 Stunden bewegten sich die Tiere ohne Einschränkung. In den folgenden 7 Tagen waren Nahrungsaufnahme und Trinkverhalten normal.

Alle implantierten Pumpen funktionierten einwandfrei und waren bei Explantation nach einer Woche entleert.

Insgesamt wurden 5 Schweine (3x Ligatur und 2x Shunt) aus den Versuchen ausgeschlossen und durch neue Tiere ersetzt. Bei den 3 Schweinen mit Ligatur-Operation wurden im Rahmen der Angiographie an Tag 7 Thromben im Bereich der A. profunda femoris gefunden. Bei den ausgeschlossenen Tieren mit Shunt-Operation handelte es sich um Schweine, welche in den postoperativen Tagen durch eingeschränkte Beweglichkeit aufgefallen waren. Desweiteren zeigten sich bei beiden Nekrosen der Adduktorenmuskulatur aufgrund zu groß angelegter Shunts.

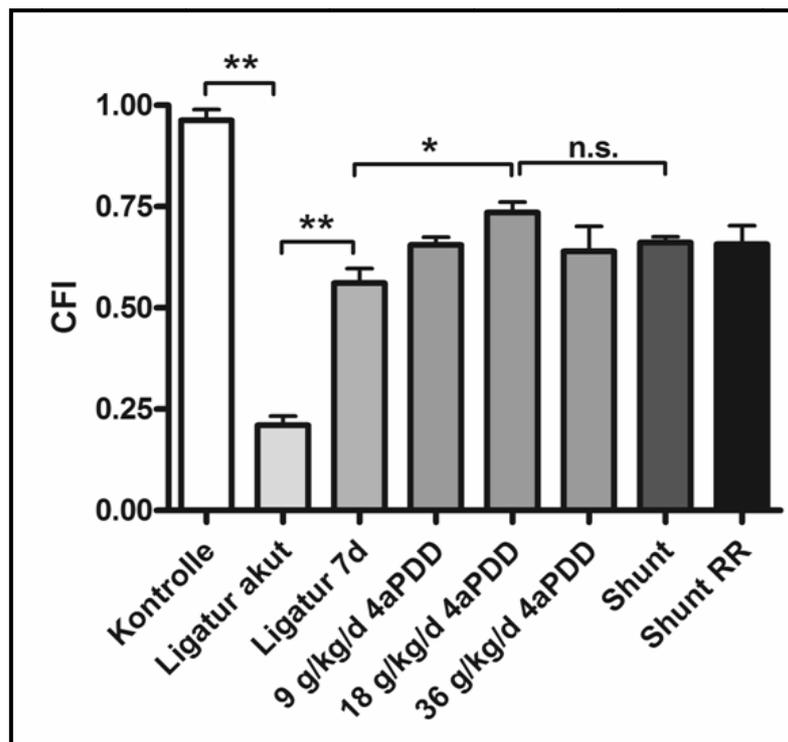
Während der Operationen wurden Druckmessungen durchgeführt und daraus der CFI berechnet. Außerdem wurden bei allen Schweinen Angiographien angefertigt.

An Tag 7 wurde nach Euthanasie und Perfusion des gelatinehaltigen Kontrastmittels das linke Hinterbein präpariert, um Kollateralen darzustellen und für weitere Untersuchungen zu isolieren. Ausgegangen wurde hierbei zum einen von der A. profunda femoris, zum anderen von der A. femoralis. Die korkenzieherförmigen Kollateralarterien fanden sich sowohl in der Adduktorenmuskulatur (M. adductor magnus und M. adductor brevis) zwischen den beiden Gefäßen als auch in dem medial davon gelegenen M. gracilis und wurden für qRT-PCR-Untersuchungen präpariert. Für immunhistochemische Experimente wurden Kollateralen enthaltende Gewebestücke der Adduktorenmuskulatur gewonnen.

#### 4.1 Druckmessungen und CFI

Während der Operationen an Tag 0 (vor und direkt nach Ligatur bzw. Anlegen des Shunts) und an Tag 7 wurden die mittleren arteriellen Drücke (MAP) in der Aorta und in der A. saphena gemessen und damit jeweils der prä- und poststenotische Blutdruck bestimmt. Als weitere Messung wurde der zentrale Venendruck über den Katheter in der V. jugularis ermittelt. Aus den gemessenen Druckwerten wurde der jeweilige collateral flow index berechnet.

Die Abb. 14 zeigt die errechneten CFI-Werte aller Gruppen.



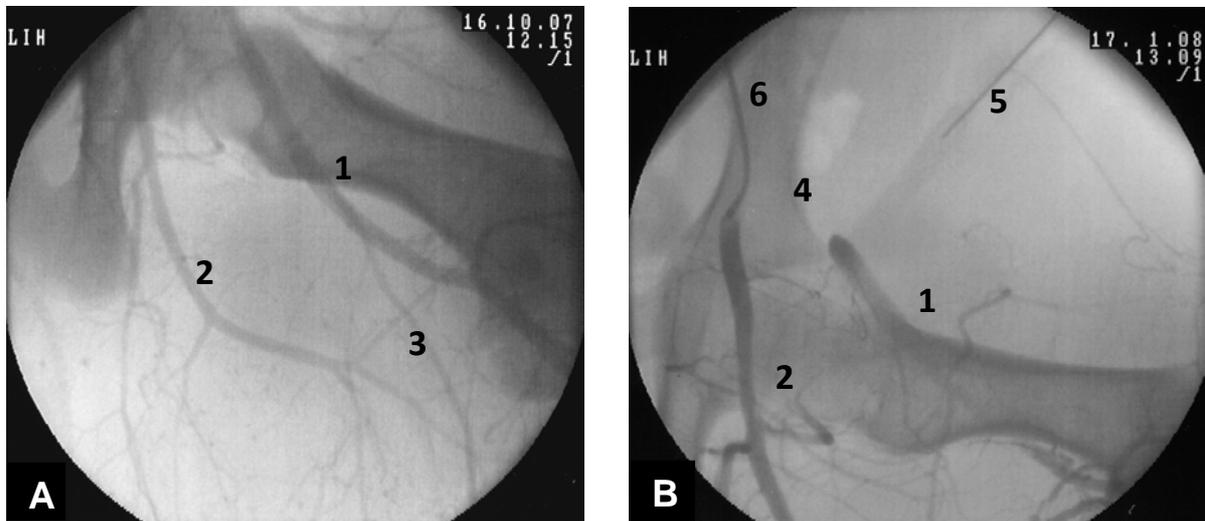
**Abbildung 14: CFI.** Durch 4aPDD-Behandlung war eine konzentrationsabhängige Steigerung der CFI zu verzeichnen, wobei die optimale Konzentration zur Stimulation der Arteriogenese bei 18  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  lag. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,001$

Bei den Schweinen vor bzw. ohne Ligatur der A. femoralis, d.h. mit normaler Perfusion des Hinterbeines, betrug der CFI mit  $0,96 \pm 0,05$  ( $n = 37$ ) nahezu 1, d.h. der Druck in Aorta und A. saphena war in etwa gleich. Direkt nach Ligatur war ein starker Abfall des CFI auf  $0,21 \pm 0,04$  ( $n = 22$ ;  $p < 0,001$ ) zu verzeichnen. In der Gruppe mit einfacher Ligatur stieg der CFI nach einer Woche auf einen Wert von  $0,53 \pm 0,09$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,001$ ) an. Nach 4aPDD-Behandlung erhöhte sich der CFI im Vergleich zur Gruppe mit einfacher Ligatur konzentrationsabhängig auf  $0,66 \pm 0,04$  (9  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ;  $n = 5$ ; n.s.),  $0,73 \pm 0,06$  (18  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ) und  $0,64 \pm 0,14$  (36  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ ;  $n = 5$ ; n.s.). Bei den Tieren mit 18  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$  4aPDD zeigte sich somit eine

signifikante Steigerung zu den Schweinen nur mit Ligatur. Die Shunt-Behandlung ergab keinen signifikanten Zuwachs des CFI im Vergleich zu normaler Ligatur ( $0,66 \pm 0,03$ ;  $n = 5$ ; n.s.). Bei zusätzlicher Behandlung mit dem TRPV4-Inhibitor Ruthenium Rot konnte ein leichter Abfall auf  $0,65 \pm 0,1$  ( $n = 5$ ; n.s.) verzeichnet werden.

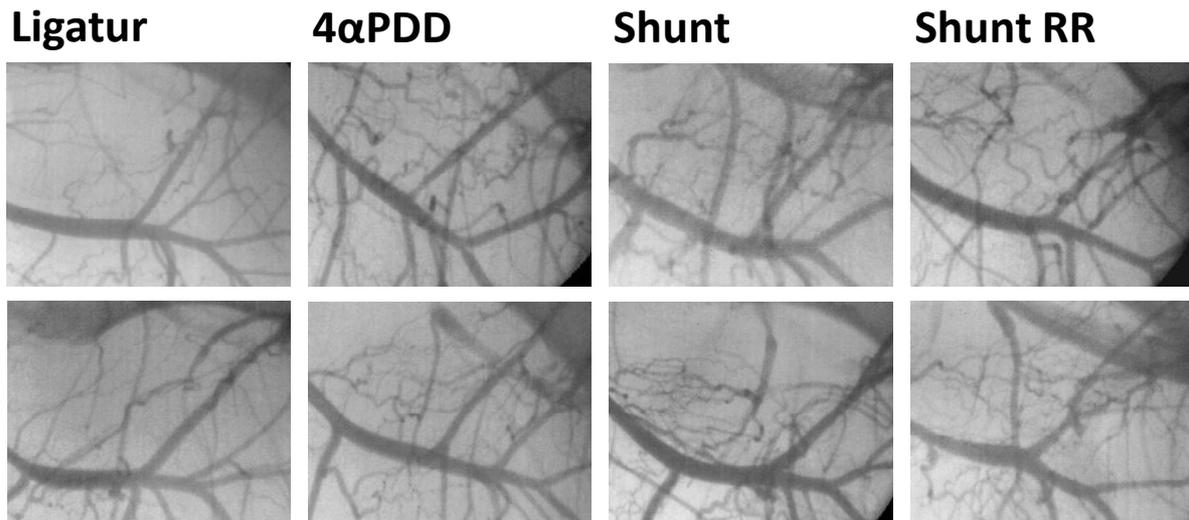
## 4.2 Angiographien

Während der Operationen an Tag 0 vor und direkt nach Ligatur und an Tag 7 wurden bei allen Tieren Angiographien in vivo durchgeführt. Dies diente der Beurteilung des entwickelten Gefäßsystems und der Visualisierung des Kollateralarterienkreislaufs.



**Abbildung 15: Darstellung des Kollateralgebietes während der ersten Operation.** Es ist sowohl der Zustand vor Ligatur zu sehen (A) als auch der Zustand direkt nach Ligatur mit Katheter zur Gabe des Kontrastmittels, ALZET-Pumpe und der Ligaturstelle (B). (1) A. femoralis; (2) A. profunda femoris; (3) A. saphena; (4) Ligatur; (5) ALZET-Pumpe; (6) Katheter zur Infusion des Kontrastmittels.

Vor Ligatur konnten bei den intraoperativen Angiographien sowohl die A. profunda femoris als auch A. femoralis und die von ihr abgehende A. saphena auf ihrer vollen Länge dargestellt werden (Abb. 15A). Nach akuter Ligatur war die Okklusionsstelle ebenso wie die implantierte osmotische Minipumpe erkennbar. Allerdings war der poststenotische Bereich der A. femoralis kaum und die A. saphena gar nicht mehr darstellbar, was den nur noch rudimentären Blutfluss in der Peripherie verdeutlichte (Abb. 15B).

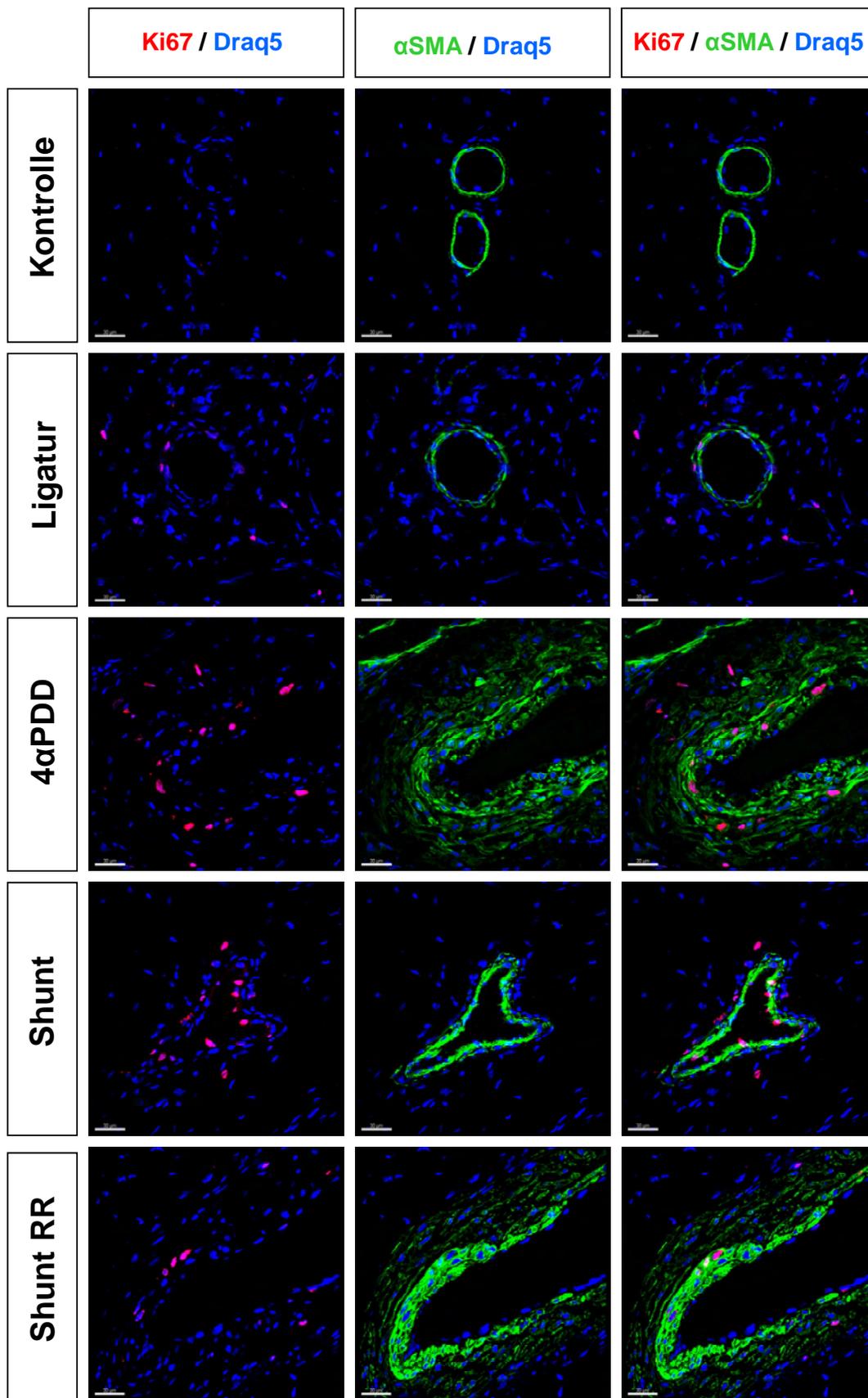


**Abbildung 16: Angiographien des Kollateralgebietes während der zweiten Operation.** Lediglich nach 4 $\alpha$ PDD-Behandlung und nach Shunt-Operation sind deutliche Kollateralen in der Adduktorenmuskuatur zwischen A. profunda femoris und A. femoralis zu erkennen.

Die Angiographien bei der Operation an Tag 7 zeigten, dass nach einfacher Ligatur ein Kollateralenwachstum zu diesem Zeitpunkt makroskopisch nicht sichtbar gemacht werden konnte. Auch die Femoralarterie konnte nicht dargestellt werden. Nach Behandlung mit 4 $\alpha$ PDD und durch Shunt kam es aufgrund des gesteigerten Kollateralwachstums zu einer retrograden Kontrastmittelfüllung der A. femoralis distal der Ligatur. Die kornenzieherförmigen Kollateralarterien entsprangen hauptsächlich der A. profunda femoris, zogen sich durch die Adduktorenmuskulatur und mündeten in die distale A. femoralis. Nach Gabe von Ruthenium Rot zusätzlich zur Operation des AV-Shunts stellte sich das angiographische Bild ähnlich wie bei reiner Ligatur dar, es konnten makroskopisch nur wenige Kollateralen identifiziert werden.

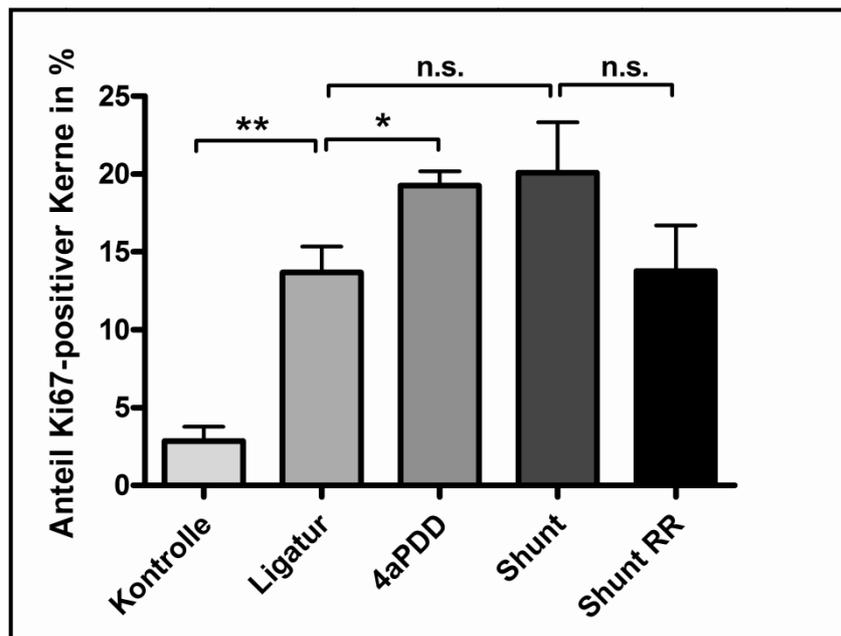
### **4.3 Zellproliferation**

Es wurden zunächst Gefrierschnitte der Adduktorenmuskulatur, in welcher sich das hauptsächliche Kollateralengebiet befand, durchgeführt. Durch anschließende immunhistologische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 wurden alle sich in einem Mitosestadium befindlichen Zellkerne rot angefärbt. Die Cofärbung mit Anti- $\alpha$ -smooth-muscle-actin (anti- $\alpha$ SMA) machte eine Zuordnung der einzelnen Zellkerne zu den vorhandenen Gefäßen möglich (Abb. 17). Zur Quantifizierung wurde bei 15 repräsentativen Bildern pro Gruppe jeweils die Anzahl Ki67-positiver Zellen der gesamten Zellkernanzahl des Gefäßes gegenübergestellt.



**Abbildung 17:** Kryoschnitte der Adduktorenmuskulatur wurden mit Anti-Ki67 (rot) und Anti- $\alpha$ SMA (grün) fluoreszenzgefärbt. Die allgemeine Kernfärbung erfolgte mit DRAQ5 (blau); (Maßstab 30  $\mu$ m). Die Intensität der Färbung steigerte sich von den Kontrollschweinen über die Ligaturgruppe, die Tiere mit 4 $\alpha$ PDD-Behandlung bis hin zur Shunt-operierten Gruppe. Nach zusätzlicher Applikation von RR zeigte sich ein Abfall der Färbung.

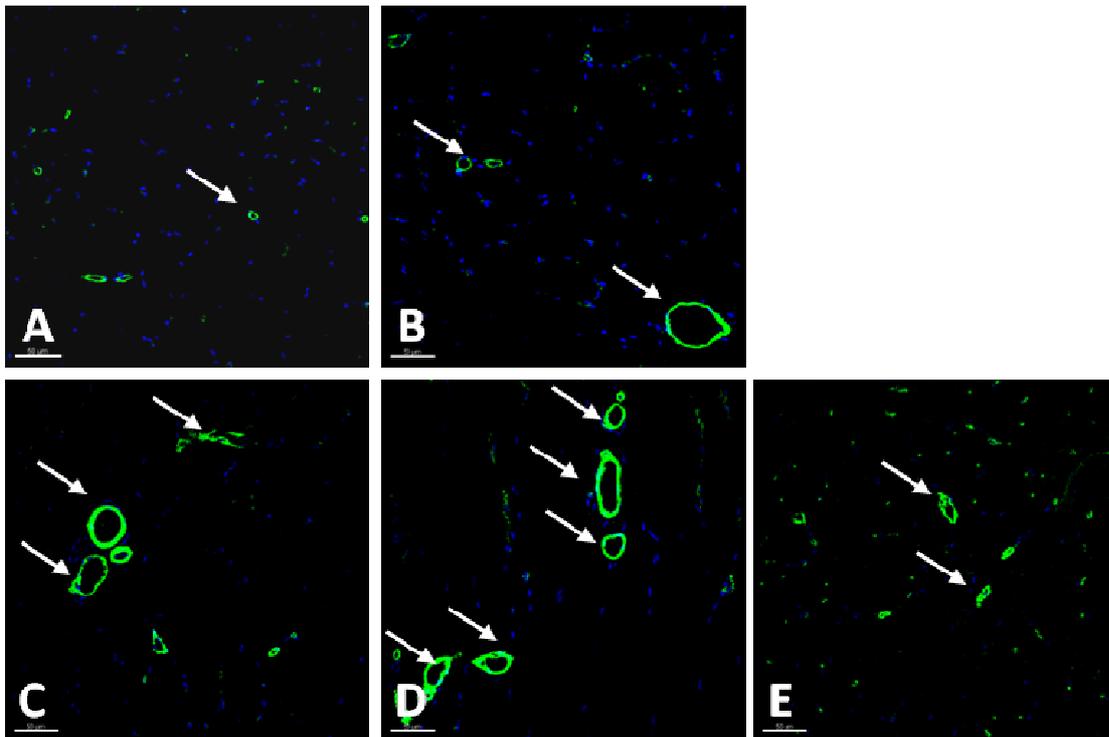
Bei der Färbung (Abb. 17) und anschließender Quantifizierung (Abb. 18) von Schnitten der Adduktorenmuskulatur wurde die Proliferationsaktivität als Anteil der Ki67-positiven Kerne an der Gesamtzahl der Zellkerne von Intima und Media eines Gefäßes berechnet und in Prozent ausgedrückt. Es zeigte sich bereits nach einfacher Ligatur ( $13,70\% \pm 6,40$ ;  $n = 15$ ) eine signifikante Steigerung Ki67-positiver Zellkerne im Vergleich zu Kontrolltieren ( $2,84\% \pm 3,35$ ;  $n = 15$ ;  $p < 0,001$ ). Durch 4 $\alpha$ PDD-Behandlung ( $19,26\% \pm 7,57$ ;  $n = 15$ ) war im Vergleich zu einfacher Ligatur ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ). Nach chronischer Erhöhung der Schubspannung durch Shunt-Operation ( $20,08\% \pm 9,69$ ;  $n = 15$ ; n.s.) zeigte sich aufgrund stark schwankender Werte ein lediglich tendenzieller Anstieg der Proliferation im Vergleich zu einfacher Ligatur. Durch zusätzliche Behandlung mit RR ( $13,78\% \pm 7,16$ ;  $n = 15$ ; n.s.) kam es zu einem tendenziellen Abfall der Proliferationsaktivität auf ähnliche Werte wie nach einfacher Ligatur.



**Abbildung 18: Anteil Ki67-positiver Kerne an der Gesamtzahl der Zellkerne eines Gefäßes, ausgedrückt in Prozent.** Zwischen den Kontrolltieren und der Gruppe mit einfacher Ligatur ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied des Proliferationsindex. Nach zusätzlicher 4 $\alpha$ PDD-Behandlung zeigte sich eine signifikante Steigerung der Proliferation. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

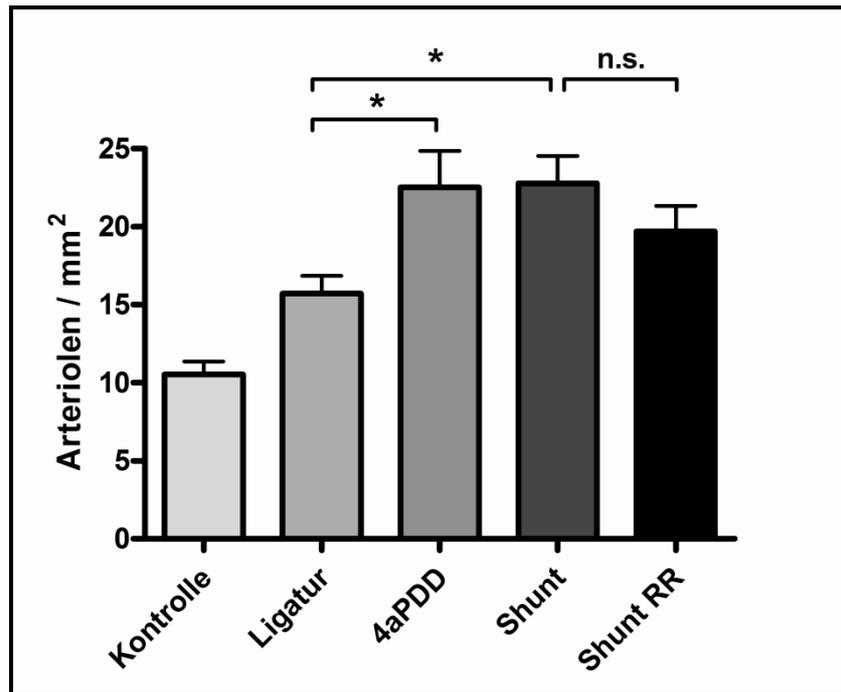
#### 4.4 Arterien-/Arterioldichte in der Adduktorenmuskulatur

Nach immunhistochemischer Färbung von Gefrierschnitten der Adduktorenmuskeln aus dem Kollateralgebiet mit Anti- $\alpha$ SMA und DRAQ5 (Kernfärbung) wurden jeweils 15 repräsentative Gesichtsfelder jeder Gruppe mit einer 25fachen Vergrößerung angefertigt.



**Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten der Adduktorenmuskulatur mit Anti- $\alpha$ SMA (grün) und DRAQ5 (blau).** (A) Kontrolle, (B) Ligatur, (C) 4 $\alpha$ PDD-Behandlung, (D) Shunt, (E) Shunt und RR-Behandlung. Von den Kontrolltieren über die Ligaturgruppe, zusätzliche 4 $\alpha$ PDD-Behandlung und die Schweine nach Shunt-Operation war eine deutliche Zunahme der Arterioldichte (grün angefärbt) zu erkennen, nach Behandlung mit RR kam es zu einem Abfall. (Maßstab 50  $\mu$ m)

Durch die Darstellung der Media mittels der  $\alpha$ SMA-Färbung konnten alle Arteriolen und Arterien eines Schnittes identifiziert und quantifiziert werden. Bei der anschließenden Zählung wurden deshalb alle Gefäße mit glatten Muskelzellen ausgewertet. Anhand der Messskala wurden die Werte in Arteriolen pro  $\text{mm}^2$  ( $A/\text{mm}^2$ ) umgerechnet (Abb. 20).

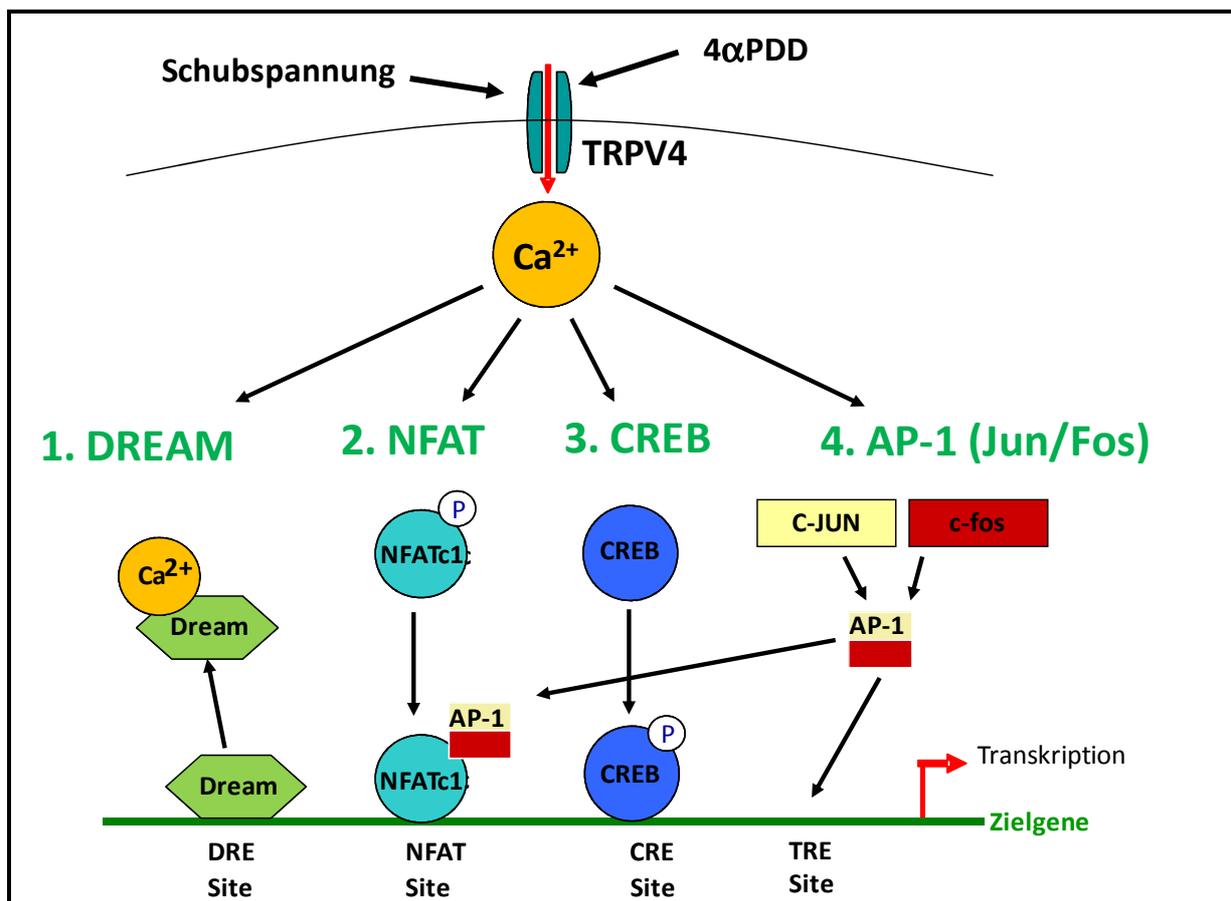


**Abbildung 20: Zählung der Arteriolen pro mm<sup>2</sup>.** Bei der quantitativen Auswertung zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Arterioldichte bei 4αPDD-behandelten und Shunt-operierten Schweinen jeweils im Vergleich zu der Gruppe mit reiner Ligatur. \* =  $p < 0,05$

Bei den Kontrolltieren ergab die Zählung eine Anzahl von  $1,59 \pm 0,13$  A/mm<sup>2</sup> ( $n = 15$ ). 7 Tage nach einfacher Ligatur stieg der Wert auf  $2,38 \pm 0,17$  ( $n = 15$ ; n.s.). Sowohl nach 4αPDD-Behandlung ( $3,40 \pm 0,35$ ;  $n = 15$ ;  $p < 0,05$ ) als auch nach Shunt-Operation ( $3,44 \pm 0,26$ ;  $n = 15$ ;  $p < 0,05$ ) erhöhte sich die Anzahl der Arteriolen im Vergleich zu einfacher Ligatur signifikant. Nach Shunt-Operation und zusätzlicher Gabe von RR war ein leichter Abfall der Arterioldichte auf  $2,98 \pm 0,25$  ( $n = 15$ ; n.s.) im Vergleich zu einfachem Shunt zu verzeichnen.

## 4.5 Untersuchung molekularer Mechanismen der Arteriogenese

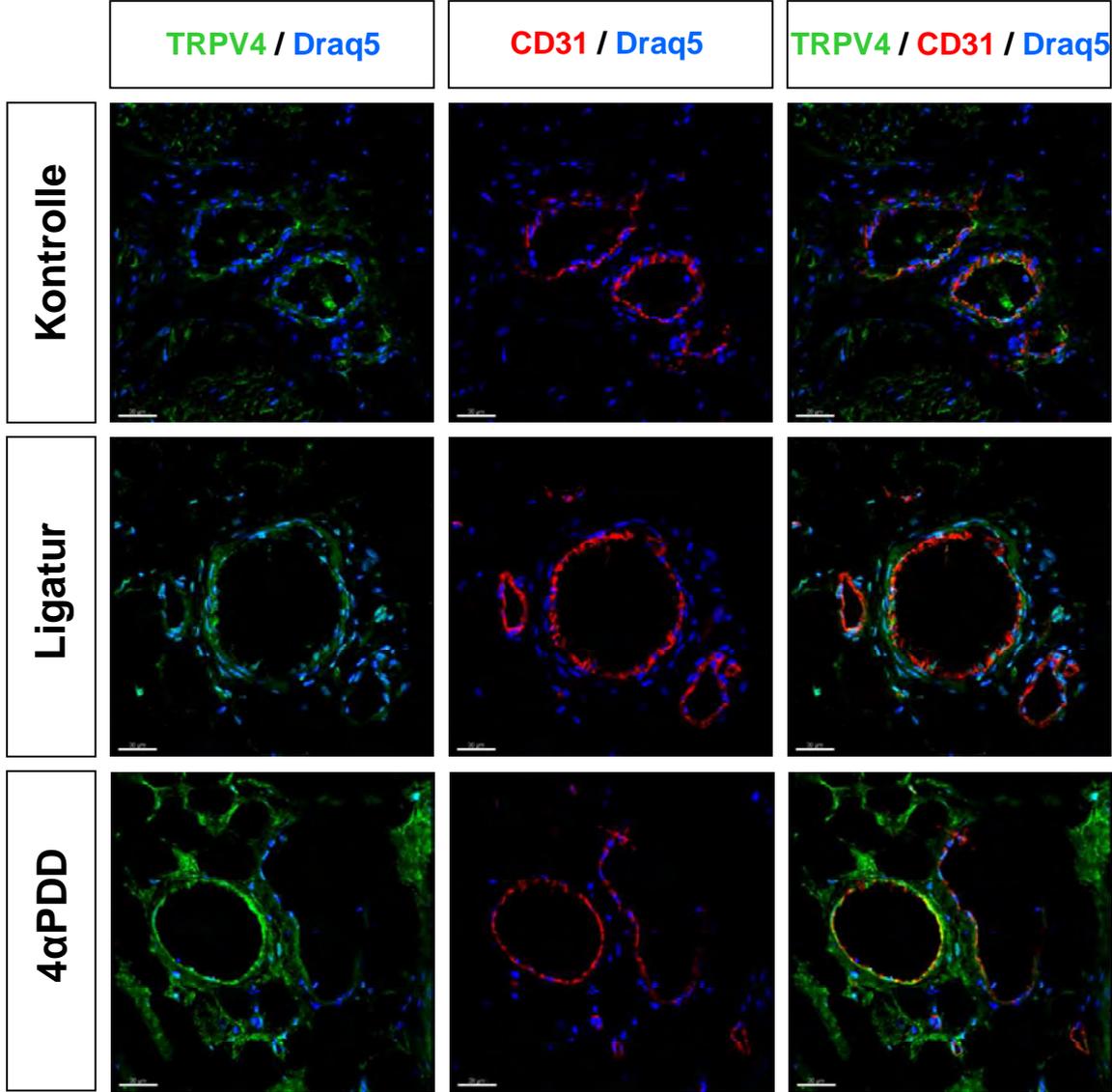
Wie bereits durch Versuche an Kaninchen und Ratten demonstriert wurde wird das Gefäßwachstum während der Arteriogenese durch TRPV4 positiv beeinflusst (Troidl et al. 2008). Obgleich erhöhte zytosolische Kalziumkonzentration nach TRPV4-Aktivierung schon häufig beschrieben wurden (Peng und Hediger 2002; Arniges et al. 2004; Reiter et al. 2006; Marrelli et al. 2007), wurde eine  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte Transkriptionskontrolle proarteriogenetischer Faktoren bislang noch nicht gezeigt. In den folgenden Experimenten wurde daher die Modulation wichtiger kalziumabhängiger Transkriptionsfaktoren untersucht. Dazu zählen Dream (auch bekannt als *Kv channel interacting protein 3*, KCNIP3) (Carrion et al. 1999; Mellstrom und Naranjo 2001), NFATc1 (Hogan et al. 2003), CREB1 (Sheng et al. 1991) und AP-1 (Whitmarsh und Davis 1996; Cuschieri et al. 2003).

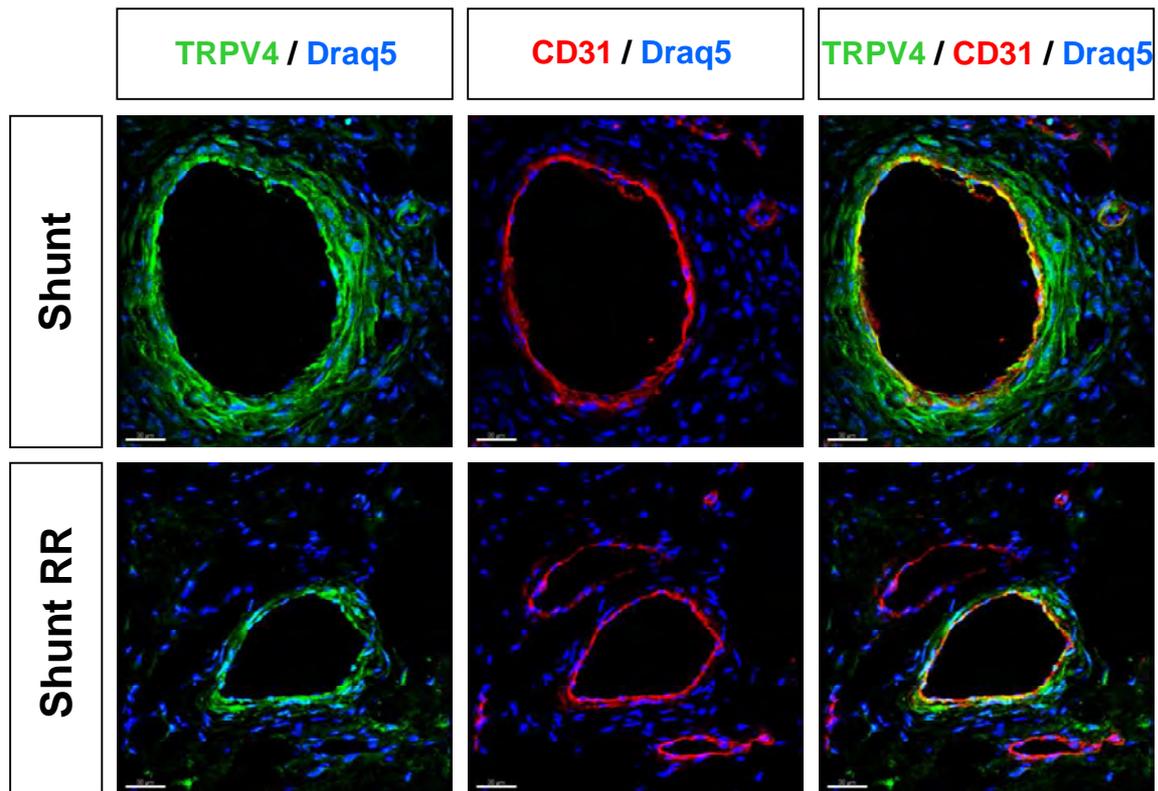


**Abbildung 21: Mögliche dem TRPV4 nachgeschaltete Signaltransduktionswege mit Einfluss auf die Arteriogenese.** Jeder der Transkriptionsfaktoren NFATc1, CREB1, C-JUN und c-fos wird durch Kalzium und/oder einen der anderen Transkriptionsfaktoren aktiviert und führt zur Transkription von Proteinen, welche für die Arteriogenese notwendig sind. Dream ist ein Repressor, welcher durch Kalzium inaktiviert wird und ins Zytoplasma transloziert. Dadurch können nachgeschaltete Gene transkribiert werden.

### 4.5.1 TRPV4

Zur immunhistochemischen Darstellung des Kanals wurden Gefrierschnitte der Adduktorenmuskulatur mit Anti-TRPV4 fluoreszenzgefärbt. Um die Lokalisation von TRPV4 im Gefäß darzustellen wurden die Schnitte mit CD31, einem Endothelzellmarker, gegengefärbt.

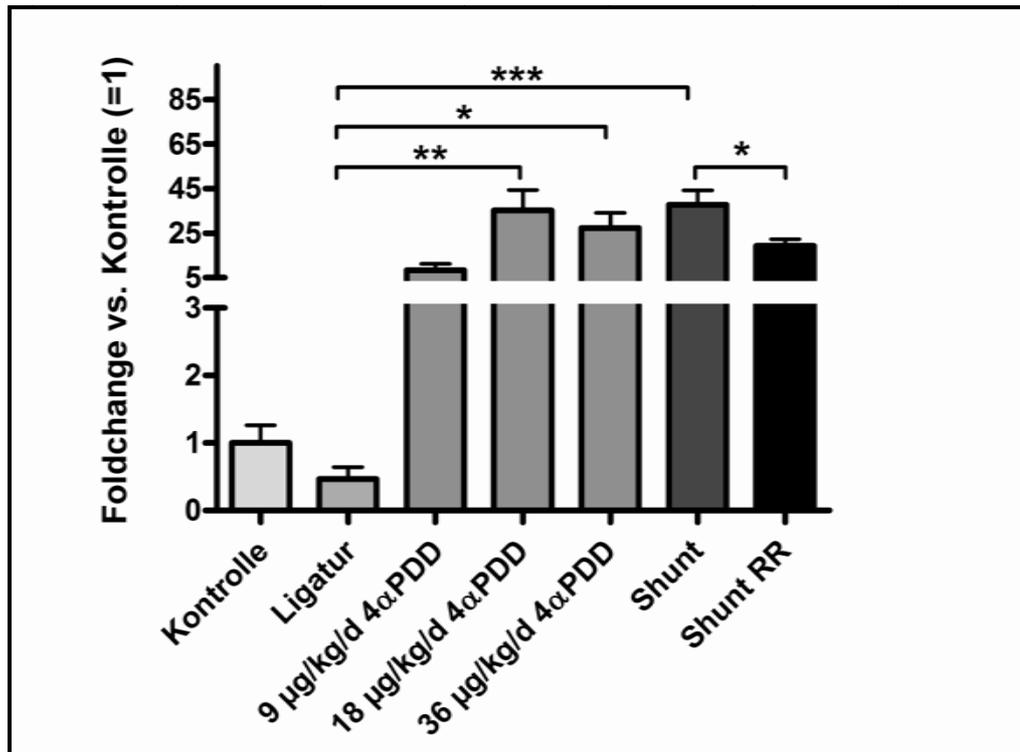




**Abbildung 22: Lokalisation von TRPV4 in der Gefäßwand nach den verschiedenen Eingriffen.** Kryoschnitte der Adduktorenmuskulatur jeder Gruppe wurden mit Anti-TRPV4 (grün) und Anti-CD31 (rot) angefärbt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DRAQ5 (blau). Bei den Kontrolltieren und der Gruppe nach einfacher Ligatur war der Kanal kaum anfärbbar. Nach 4 $\alpha$ PDD-Behandlung und Shunt-Operation mit zusätzlicher RR-Gabe zeigte sich eine Zunahme der Markierung vor allem innerhalb der Endothelzellschicht. Nach Shunt-Operation ohne Substitution von RR war die deutlichste Anfärbung des TRPV4-Kanals, hier auch im Bereich der Media, zu erkennen (Maßstab 30  $\mu$ m).

Sowohl bei den Sham-operierten Tieren als auch 7 Tage nach einfacher Ligatur war der TRPV4-Kanal kaum anfärbbar. Eine deutliche Steigerung ließ sich nach 4 $\alpha$ PDD-Behandlung erkennen. Am stärksten war das Signal 7 Tage nach Shunt-Operation. Eine ähnliche Beobachtung wie nach 4 $\alpha$ PDD-Behandlung wurde auch bei den Shunt-operierten und mit RR behandelten Schweinen gemacht.

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression wurden qRT-PCRs aller Gruppen mit TRPV4-spezifischen Primern durchgeführt (Abb. 23).



**Abbildung 23: qRT-PCR von TRPV4.** Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der TRPV4-Expression bei den mit 18 µg/kg/d und 36 µg/kg/d 4αPDD behandelten Tieren und bei den Shunt-operierten Schweinen im Vergleich zu der Gruppe mit einfacher Ligatur. Nach Shunt-Operation und zusätzlicher RR-Gabe kam es zu einem signifikanten Abfall der Expression im Vergleich der Gruppe mit einfachem Shunt. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

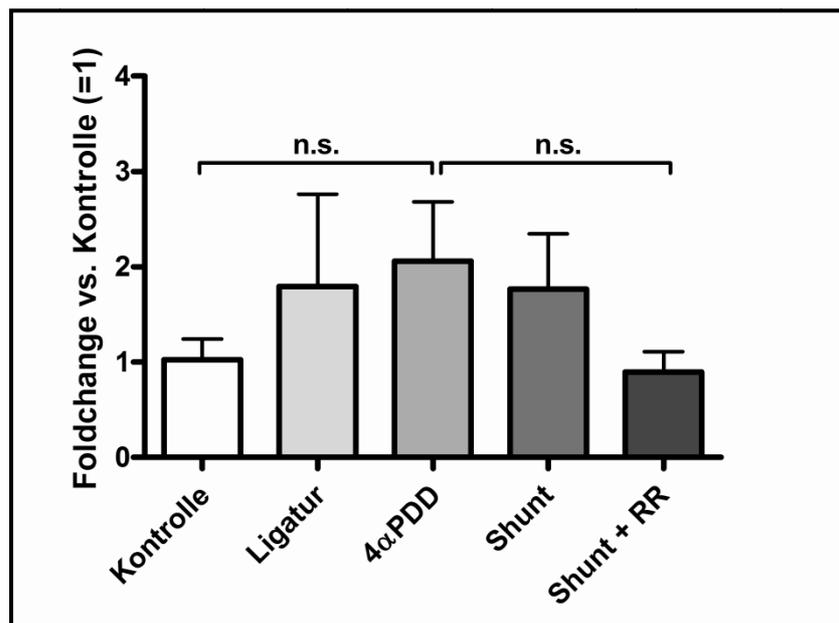
7 Tage nach einfacher Ligatur ( $0,47 \pm 0,18$ ;  $n = 6$ ) zeigte sich keine signifikante Änderung der Expression im Vergleich zu Kontrolltieren ( $1,00 \pm 0,26$ ;  $n = 5$ ; n.s.). In Kombination mit 4αPDD-Behandlung war jedoch eine konzentrationsabhängige, signifikante Steigerung der mRNA-Menge im Vergleich zu den Kontrolltieren und zu einfacher Ligatur zu verzeichnen ( $8,28 \pm 2,86$  bei 9 µg/kg/d;  $n = 5$ ; n.s.;  $35,23 \pm 9,11$  bei 18 µg/kg/d;  $n = 6$ ;  $p < 0,01$ ;  $27,39 \pm 6,64$  bei 36 µg/kg/d;  $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ). Nach Shunt-Behandlung zeigte sich ein signifikanter Zuwachs im Vergleich zu den Kontrolltieren und denen nach einfacher Ligatur auf  $37,72 \pm 6,41$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,001$ ). Durch RR-Behandlung in Kombination mit Shunt hingegen kam es zu einer signifikanten Verminderung der TRPV4-Transkription auf  $19,17 \pm 2,99$  ( $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu Shunt-Operation.

Durch die Ergebnisse der TRPV4-Untersuchung sollte ebenso wie durch den errechneten CFI die für unsere Versuche am besten geeignete 4αPDD-Konzentration

evaluiert werden. Die Quantifizierung der TRPV4-mRNA zeigt den stärksten Anstieg nach Gabe von 18 µg/kg/d 4αPDD. Dies konnte auch durch die Messung des CFI (Abb. 14) bestätigt werden. Aus diesem Grunde wurden in allen nachfolgenden Experimenten eine Applikation von 18 µg/kg/d 4αPDD verwendet.

#### 4.5.2 Downstream regulatory element antagonist modulator (Dream)

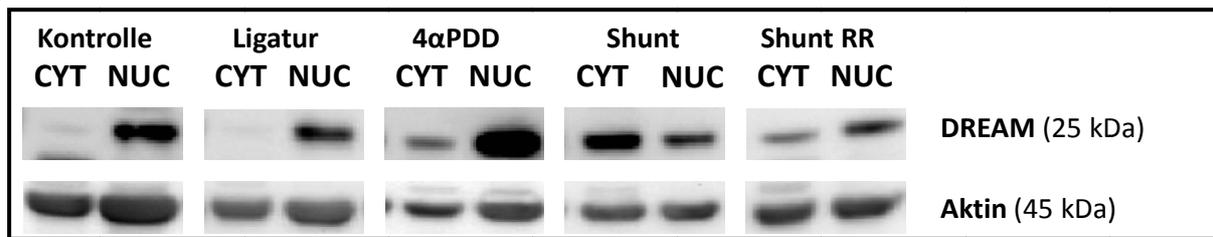
Es wurden qRT-PCRs mit Dream-spezifischen Primern durchgeführt.



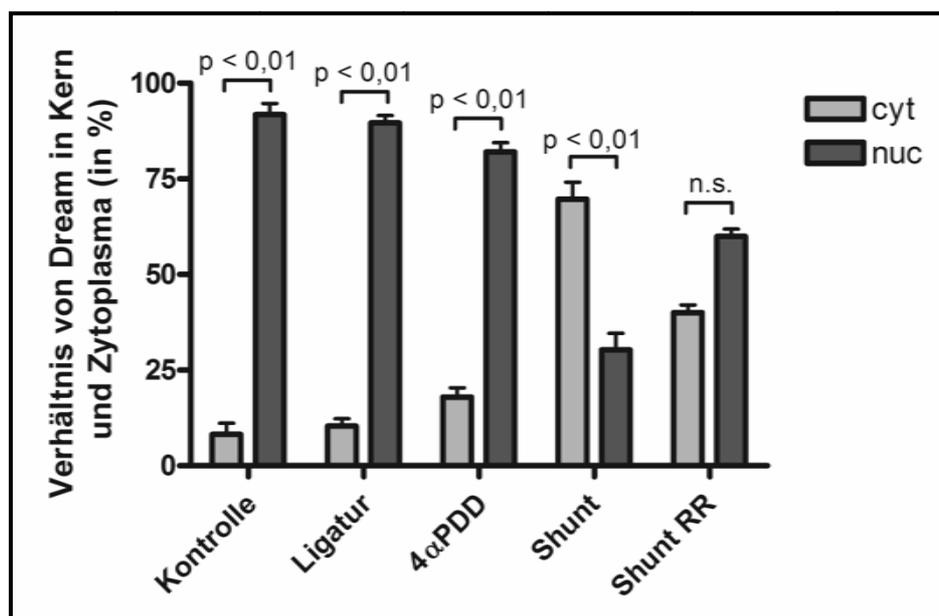
**Abbildung 24: qRT-PCR von Dream.** Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Bei der Auswertung der qRT-PCR mit zeigte sich, dass nach 7 Tagen keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Menge von Dream bei den verschiedenen Gruppen zu erkennen waren (Kontrolle  $1,00 \pm 0,24$ ;  $n = 5$ ; Ligatur  $1,80 \pm 0,97$ ;  $n = 6$ ; 4αPDD  $1,64 \pm 0,42$ ;  $n = 6$ ; Shunt  $1,77 \pm 0,58$ ;  $n = 5$ ; Shunt RR  $0,90 \pm 0,21$ ;  $n = 5$ ; Abb. 24).

Es wurden Western Blots jeder Gruppe jeweils mit der nukleären und der zytoplasmatischen Proteinfraction mit einem Antikörper gegen Dream durchgeführt. Die erhaltenen Banden wurden stets in einer parallel laufenden Immunreaktion gegen Aktin abgeglichen (Abb. 25).



**Abbildung 25: Repräsentativer Western Blot der nukleären und zytoplasmatischen Proteinfraction der Kollateralen jeder Gruppe mit einem Dream-Antikörper und als Kontrolle mit Anti-Aktin.** Von der Kontrollgruppe über die Tiere mit Ligatur, zusätzlicher 4αPDD-Behandlung und Shunt-Operation zeigte sich eine Verschiebung der Proteinmenge zugunsten der zytoplasmatischen Fraktion. Bei den zusätzlich mit RR behandelten Schweinen nahm die Proteinkonzentration im Zytoplasma im Vergleich zu der Gruppe mit einfachem Shunt zugunsten der nukleären Fraktion ab.

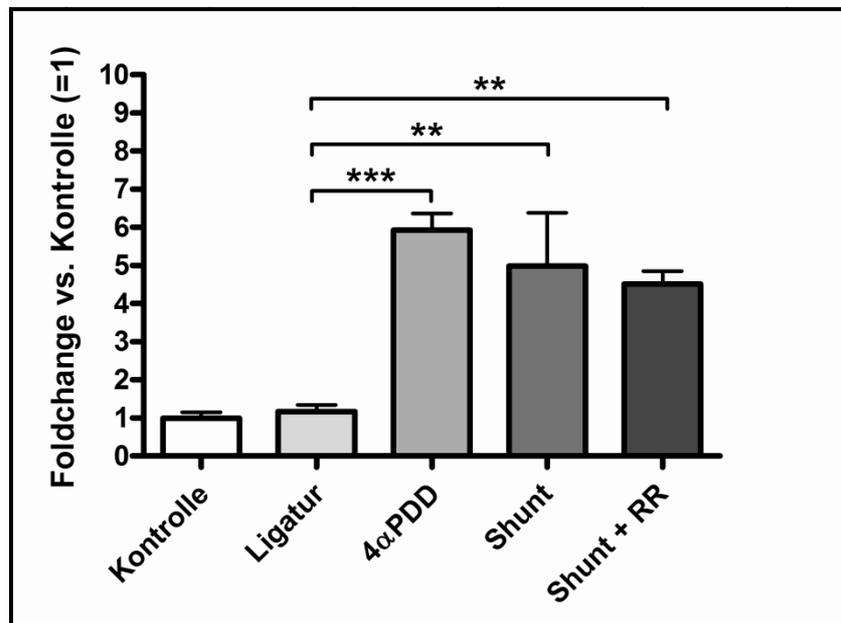


**Abbildung 26: Quantitative Auswertung des Western Blots von Dream.** Es wird jeweils die Proteinkonzentration von Dream in Kern und Zytoplasma gezeigt. Zu sehen ist vor allem die Konzentrationsumkehr bei den Shunt-operierten Schweinen zugunsten des Zytoplasmas im Unterschied zu allen anderen Gruppen.

Bei der Auswertung der Western Blots zeigte sich eine Translokation von Dream aus dem Zellkern in das Zytoplasma. In Kontrolltieren und nach einfacher Ligatur war Dream fast ausschließlich im Kern lokalisiert. In 4αPDD-behandelten Schweinen translozierte Dream teilweise ins Zytoplasma. Bei Shunt-operierten Tieren war eine Umkehr der Konzentration zugunsten des zytoplasmatischen Dream zu verzeichnen. Nach zusätzlicher Behandlung mit RR war wieder etwas mehr Protein im Kern vorhanden.

### 4.5.3 NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells)

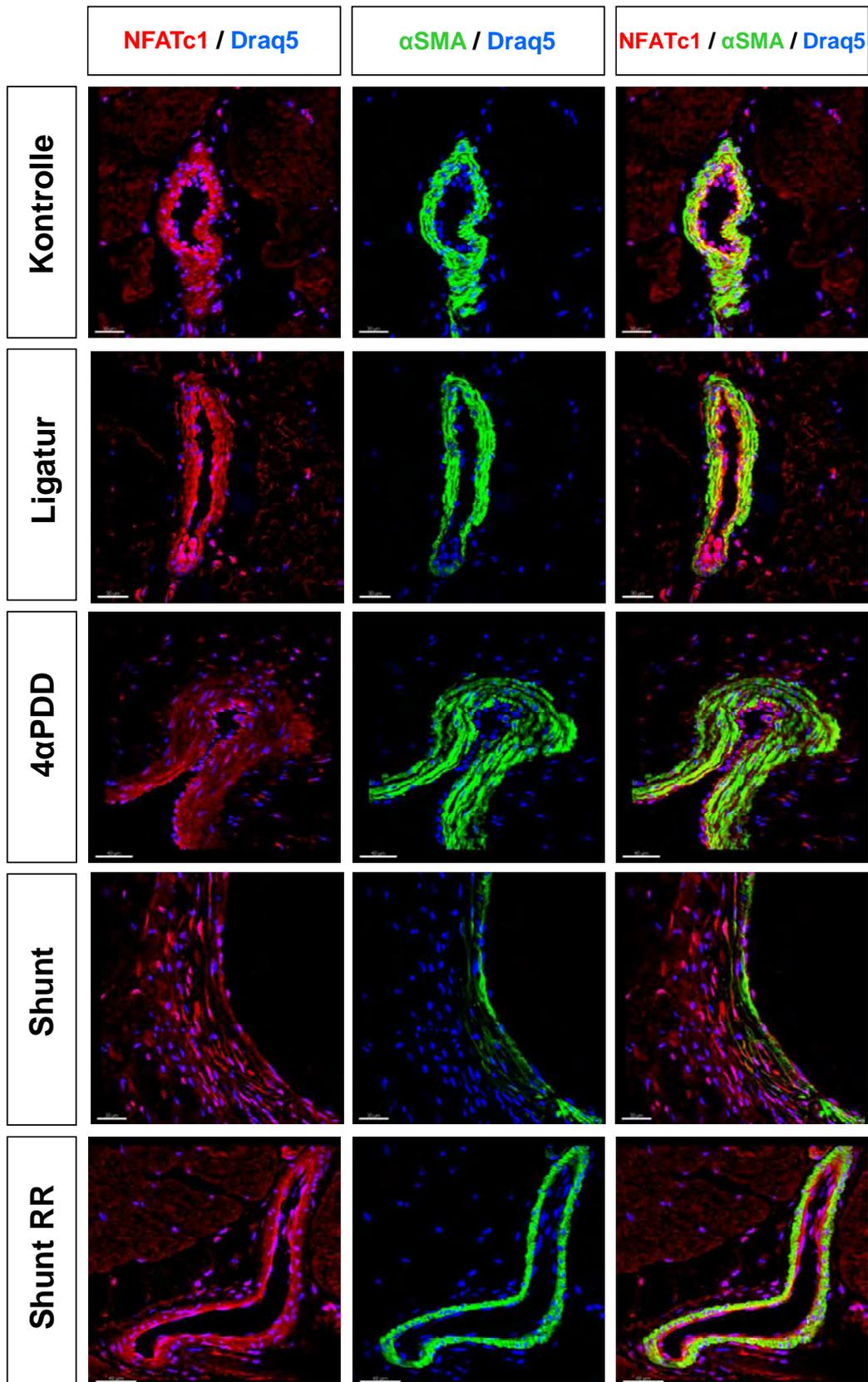
Zum quantitativen Nachweis der Genexpression wurden qRT-PCRs aller Gruppen mit spezifischen NFATc1-Primern angefertigt (Abb. 26).



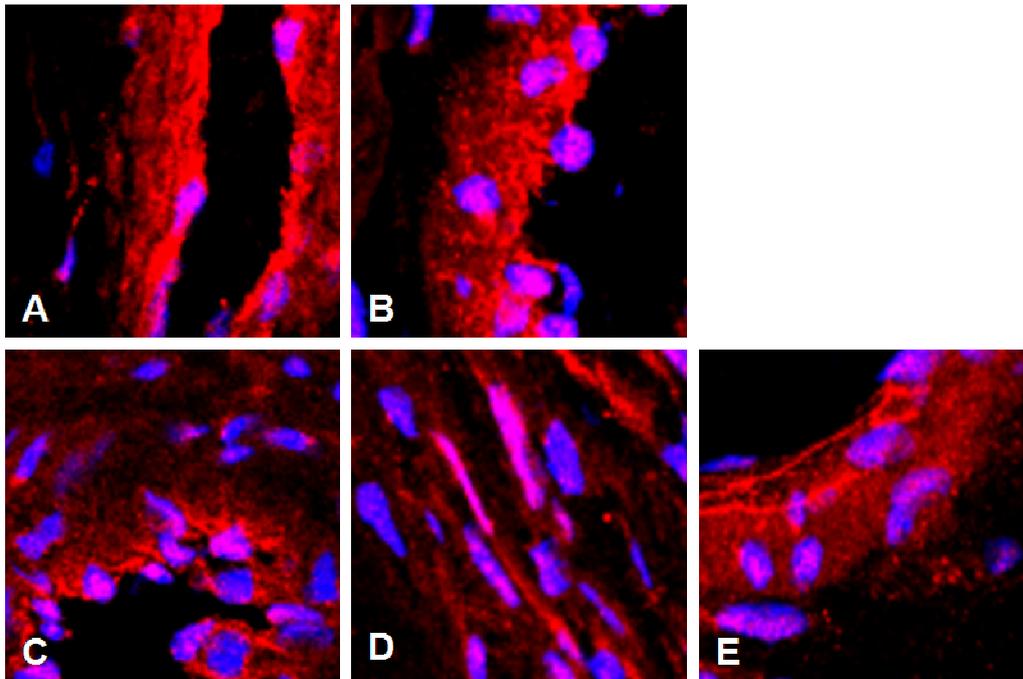
**Abbildung 27: qRT-PCR von NFATc1.** Bestimmung der mRNA Expression in den Kollateralen der verschiedenen Gruppen, normiert auf die Werte der unbehandelten Kontrollschweine. Zwischen Kontrolle bzw. der Gruppe mit einfacher Ligatur und jeweils den mit 4αPDD-, Shunt- und Shunt + RR-behandelten Tieren zeigte sich ein signifikanter Unterschied der mRNA-Menge. \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ;

Während nach einfacher Ligatur ( $1,17 \pm 0,18$ ;  $n = 6$ ) keine Veränderung der mRNA-Menge von NFATc1 beobachtet werden konnte, zeigte sich in Schweinen, die gleichzeitig mit 4αPDD behandelt wurden eine 5,93fache ( $\pm 0,44$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,001$ ) Steigerung der mRNA. Nach Shunt-Operation ( $4,98 \pm 1,40$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,01$ ) und Shunt in Kombination mit RR-Behandlung ( $4,51 \pm 0,34$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,01$ ) erhöhte sich die NFATc1-Transkription im Vergleich zur Ligatur signifikant.

Die immunhistochemische Untersuchung erfolgte mit einem NFATc1-Antikörper. Da aktiviertes NFATc1-Protein in den Zellkern transloziert, wurde bei der Beurteilung besondere Rücksicht auf die Lokalisation genommen (Abb. 28).



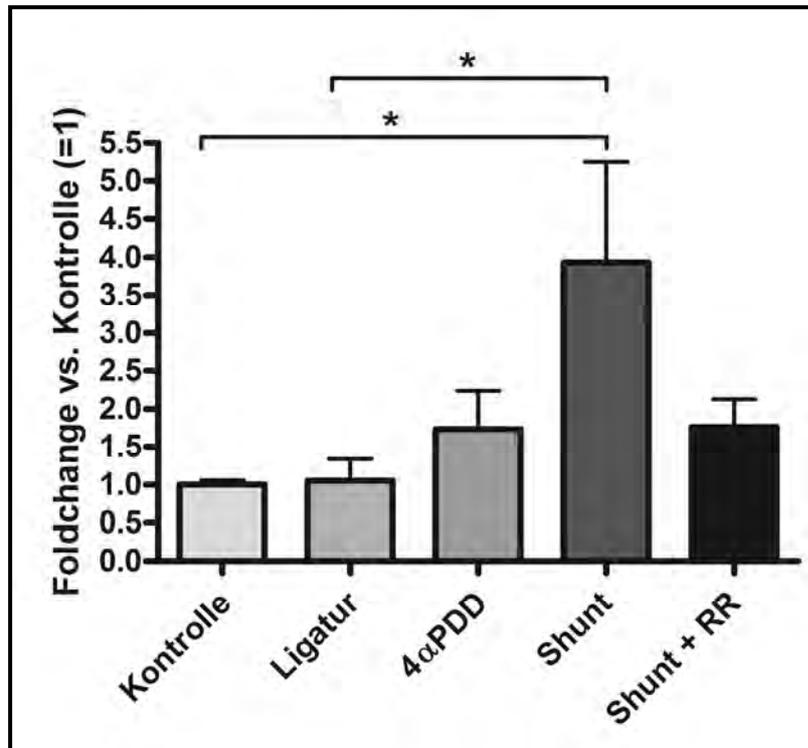
**Abbildung 28: Kryoschnitte der Adduktorenmuskulatur, welche mit Anti-NFATc1 (rot) und Anti- $\alpha$ SMA (grün) angefärbt wurden. Die Kernfärbung erfolgte mit DRAQ5 (blau). Während bei den Kontrolltieren und den Schweinen nach einfacher Ligatur das NFATc1-Protein überwiegend im Zytoplasma angefärbt wurde zeigte sich nach 4 $\alpha$ PDD- und Shunt-Behandlung innerhalb der Kollateralen eine Verlagerung der Färbung zugunsten der Kerne. Nach Verabreichung von RR war im Vergleich zu einfacher Shunt-Operation mehr NFATc1 im Zytoplasma zu verzeichnen (Maßstab 30  $\mu$ m).**



**Abbildung 29: Vergrößerte Ausschnitte der einzelnen Bilder aus Abbildung 28. (A) Kontrolle, (B) Ligatur, (C) 4 $\alpha$ PDD, (D) Shunt, (E) Shunt und RR-Behandlung.** Dargestellt sind lediglich die NFATc1 (rot)- und Kernfärbung (blau). Bei den mit 4 $\alpha$ PDD und Shunt behandelten Gruppen ist die Verlagerung des Proteins zugunsten der Zellkerne zu erkennen.

NFATc1 konnte in allen Gruppen am deutlichsten in der Intima, aber auch in der Media dargestellt werden. Bei den Sham-operierten Kontrolltieren (Abb. 29A) und nach einfacher Ligatur (Abb. 29B) war NFATc1 vor allem im Zytoplasma lokalisiert. Nach Ligatur und zusätzlicher 4 $\alpha$ PDD-Behandlung (Abb. 29C) ebenso wie nach Shunt-Operation in Kombination mit RR (Abb. 29E) ließ sich das Protein deutlich weniger im Zytoplasma und etwas mehr im Kern nachweisen. Nach chronisch erhöhter Schubspannung durch Anlegen eines Shunts (Abb.29D) war NFATc1 kaum noch im Zytoplasma aber umso deutlicher im Kern vorhanden.

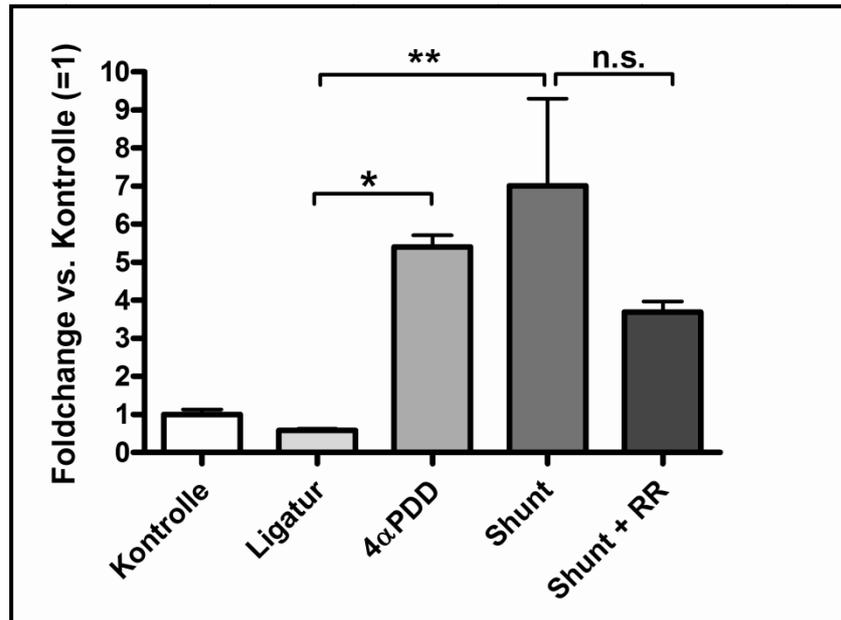
**VEGF $\alpha$**  triggert über Calcineurin die Aktivierung und den nukleären Import von NFATc1 (Johnson et al. 2003) Es wurden qRT-PCRs mit VEGF $\alpha$ -Primern durchgeführt.



**Abbildung 30: qRT-PCR von VEGF $\alpha$**  Die mRNA-Expression wurde in den Kollateralen aller Gruppen gemessen. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Shunt-operierten Tieren und der Kontrollgruppe bzw. den Schweinen mit einfacher Ligatur. \* =  $p < 0,05$ .

Schweine mit 4 $\alpha$ PDD Behandlung zeigten einen leichten Zuwachs der Expression im Vergleich zu einfacher Ligatur ( $1,74 \pm 0,51$ ;  $n = 6$  vs.  $1,05 \pm 0,29$ ;  $n = 6$ ; n.s.; Abb. 30). Nach Shunt-Operation ( $3,93 \pm 1,32$ ;  $n = 5$ ) konnte eine signifikante Hochregulation der VEGF $\alpha$ -Expression im Vergleich zu einfacher Ligatur ( $p < 0,05$ ) und den Kontrolltieren ( $1,00 \pm 0,13$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) beobachtet werden. Durch zusätzliche Behandlung mit RR ( $1,76 \pm 0,37$ ;  $n = 5$ ; n.s.) ergab sich ein tendenzieller Abfall der Genexpression im Vergleich zu einfacher Shunt-Operation.

Die Quantifizierung der Expression von **Calcineurin** erfolgte mittels qRT-PCR aller Gruppen mit Calcineurin-Primern.

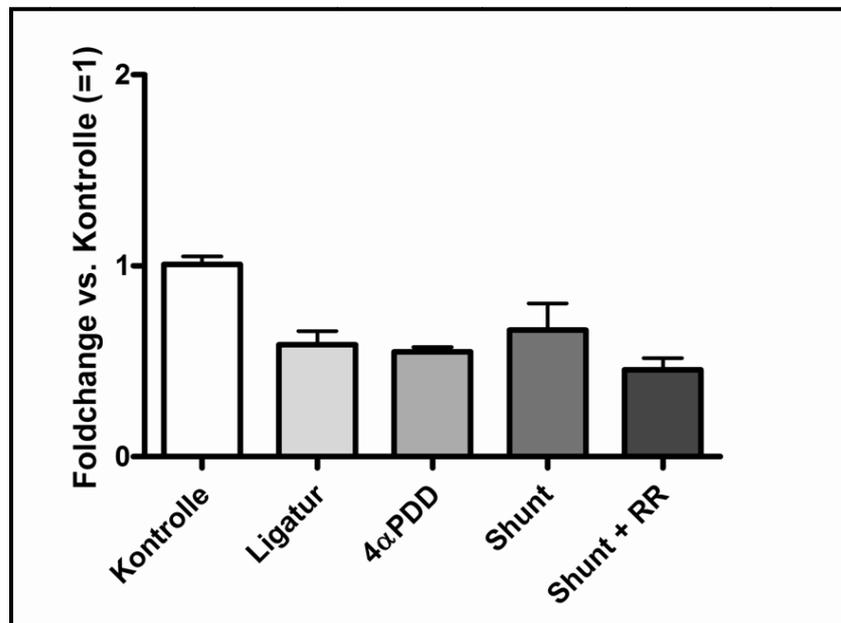


**Abbildung 31: qRT-PCR von Calcineurin.** Die mRNA-Expression wurde in den Kollateralen aller Gruppen gemessen. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen 4αPDD-behandelten und Shunt-operierten Tieren und der Gruppe mit einfacher Ligatur. \* =  $p < 0,01$ , \*\* =  $p < 0,001$

Die qRT-PCR ergab signifikant höhere Werte der mit 4αPDD- ( $5,40 \pm 0,31$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,01$ ) und Shunt- ( $7,01 \pm 2,28$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,001$ ) behandelten Tiere im Vergleich zu den Schweinen nach einfacher Ligatur ( $0,58 \pm 0,04$ ;  $n = 6$ ). Nach Shunt-Operation und zusätzlicher Behandlung mit RR ( $3,70 \pm 0,28$ ;  $n = 5$ ; n.s.) zeigte sich ein Abfall der mRNA-Menge von Calcineurin (Abb. 31).

#### 4.5.4 CREB1 (cAMP responsive element binding protein 1)

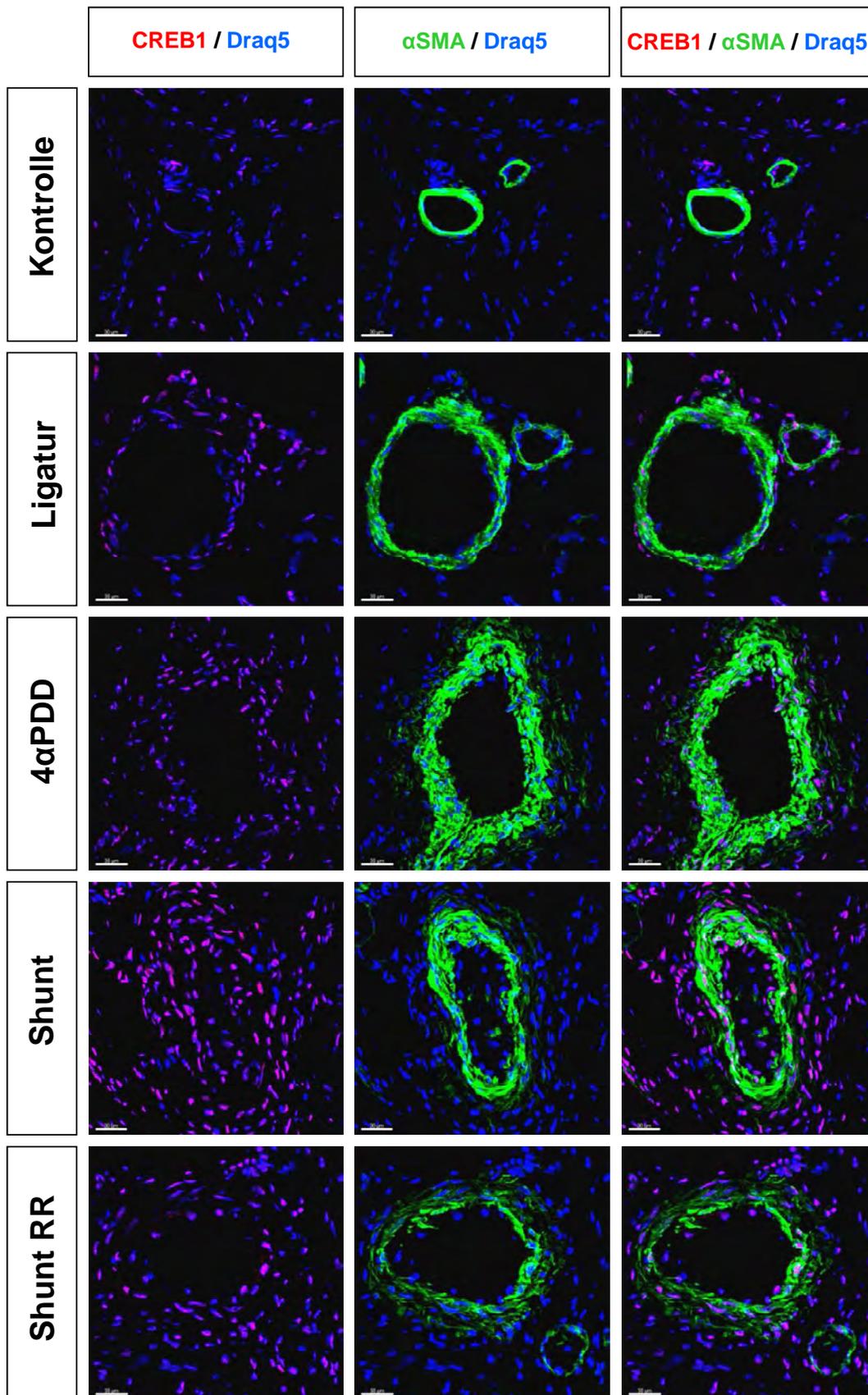
Zur relativen Quantifizierung von CREB1 wurden qRT-PCRs mit spezifischen Primern durchgeführt (Abb. 32).



**Abbildung 32: qRT-PCR von CREB1.** Die relative Genexpression wurde in den Kollateralen aller Gruppen gemessen, wobei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten.

Auf Transkriptionsebene zeigten sich zwischen keinen Gruppen signifikante Unterschiede. Bei allen behandelten Tieren kam es jedoch zu einer tendenziellen Verminderung der CREB1-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle  $1,00 \pm 0,04$ ;  $n = 5$ ; Ligatur  $0,59 \pm 0,07$ ;  $n = 6$ ; n.s.; 4αPDD  $0,55 \pm 0,03$ ;  $n = 6$ ; n.s.; Shunt  $0,66 \pm 0,14$ ;  $n = 5$ ; n.s.; Shunt RR  $0,46 \pm 0,06$ ;  $n = 5$ ; n.s.; Abb. 32).

Zur Sichtbarmachung des Proteins wurde CREB1 immunhistologisch untersucht. Die Gegenfärbung erfolgte mit αSMA, um CREB1 in Gefäßmuskelzellen zu lokalisieren.



**Abbildung 33: Immunhistologische Schnitte der Adduktorenmuskulatur. CREB1 ist rot,  $\alpha$ SMA grün und die Kerne sind blau angefärbt. Während bei der Kontrollgruppe und nach einfacher Ligatur nur wenige Kerne schwach angefärbt wurden zeigte sich bei den 4 $\alpha$ PDD- und Shunt + RR-behandelten Tieren eine Zunahme der roten Markierung. Am deutlichsten färbte sich das Protein bei der Gruppe nach einfachem Shunt an (Maßstab 30  $\mu$ m).**

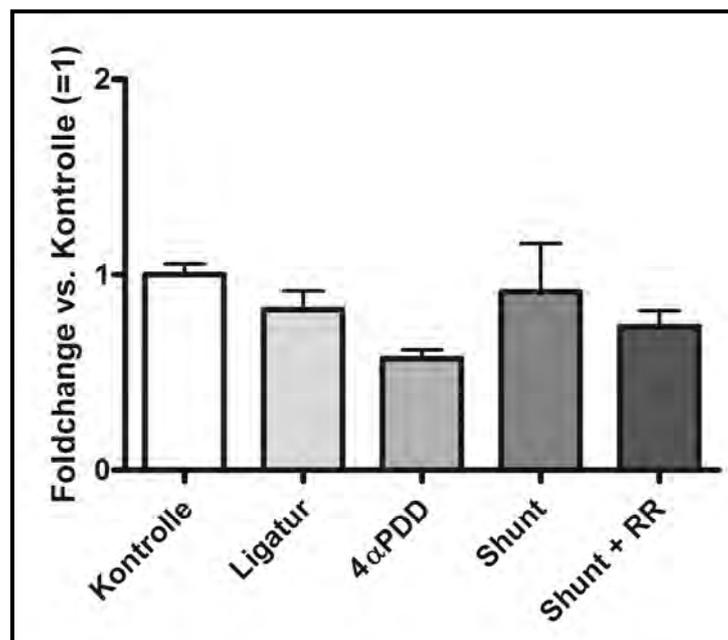
Bei der Lokalisation von CREB1 im Gefäß fiel auf, dass das Protein in allen Schichten (Intima, Media und Adventitia) anfärbbar war (Abb. 33). Bei den einzelnen Gruppen war eine deutliche Zunahme der Proteinfärbung von Kontrolltieren über reine Ligatur, zusätzliche 4 $\alpha$ PDD-Behandlung bis hin zu Shunt-operierten Tieren zu sehen. Bei RR-Behandlung zusätzlich zum Shunt kam es wieder zu einem leichten Abfall der Färbung.

#### 4.5.5 AP-1

Da es sich bei dem Transkriptionsfaktor AP-1 um ein Jun-fos-Heterodimer handelt, wurden beide Faktoren einzeln untersucht.

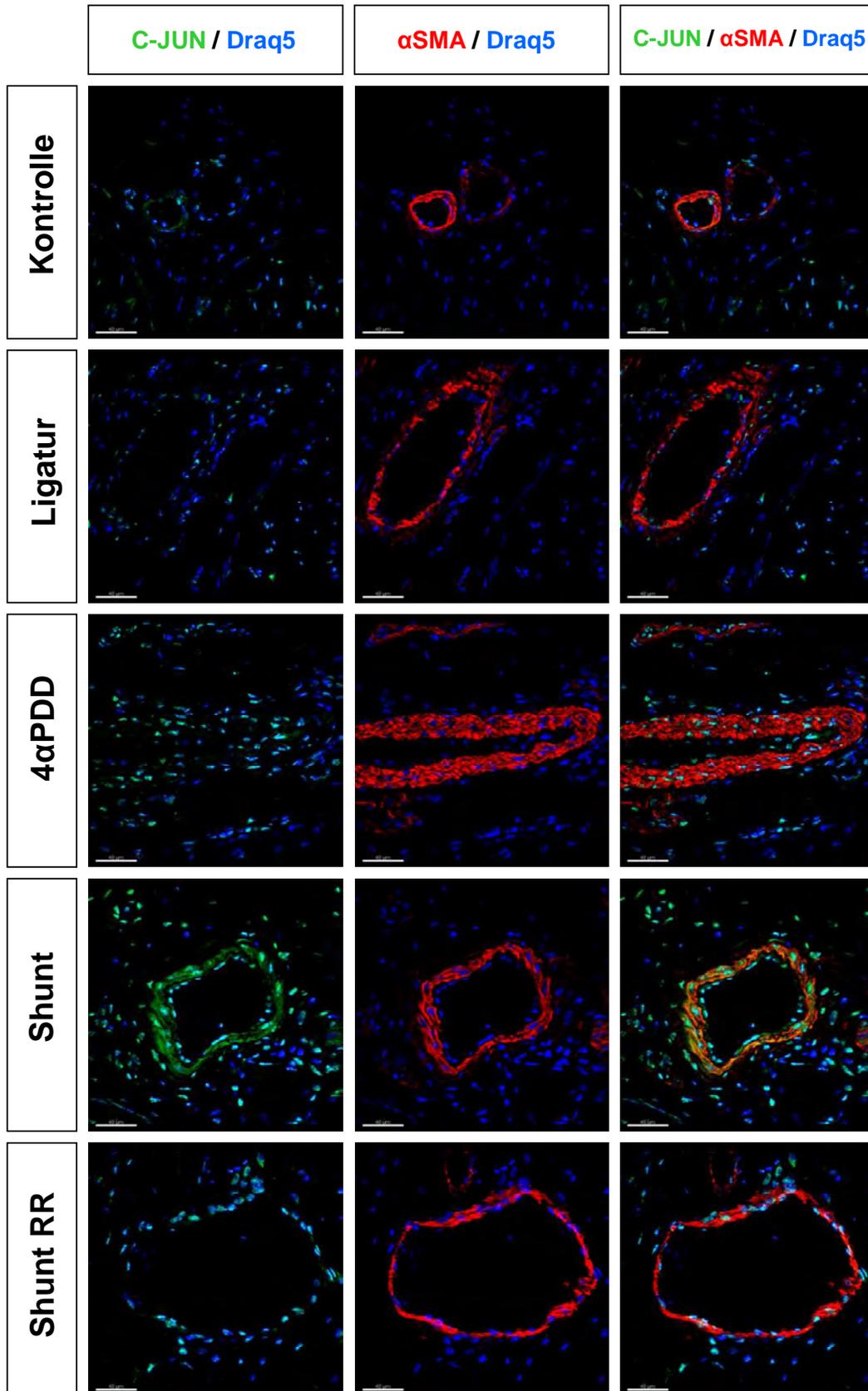
##### 4.5.5.1 C-JUN (V-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog)

Die Quantifizierung der Expression auf mRNA-Ebene erfolgte über qRT-PCRs aller Gruppen mit spezifischen C-JUN-Primern (Abb. 35).



**Abbildung 34: qRT-PCR von C-JUN.** Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen führte zu keinen signifikanten Unterschieden der mRNA-Menge (Kontrolle  $1,00 \pm 0,06$ ;  $n = 5$ ; Ligatur  $0,82 \pm 0,10$ ;  $n = 6$ ; 4 $\alpha$ PDD  $0,58 \pm 0,04$ ;  $n = 6$ ; Shunt  $0,91 \pm 0,25$ ;  $n = 5$ ; Shunt RR  $0,73 \pm 0,08$ ;  $n = 5$ ).

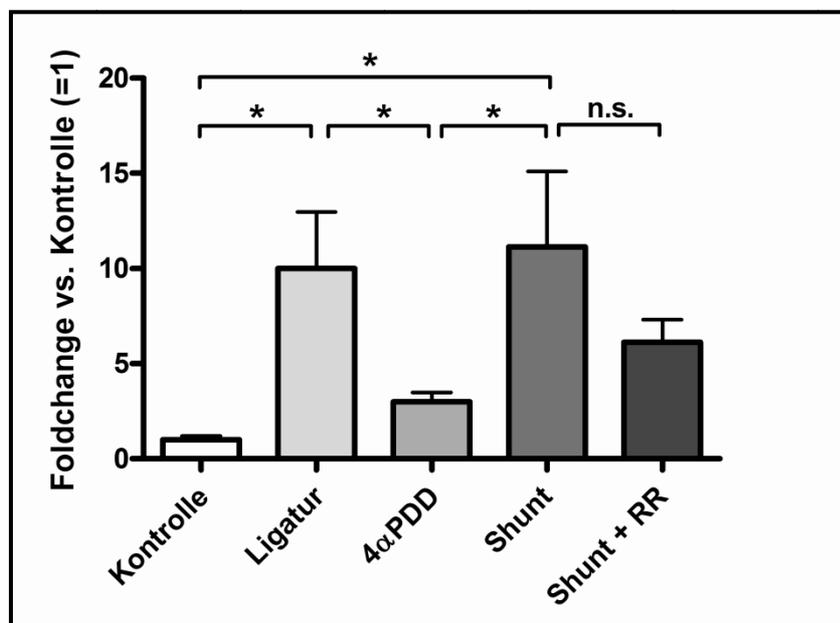


**Abbildung 35: Immunhistologisch angefärbte Schnitte der Adduktorenmuskulatur.** C-JUN ist grün,  $\alpha$ SMA rot und die Kerne sind blau dargestellt. Während bei der Kontrollgruppe und den Schweinen nach einfacher Ligatur die Färbung kaum zu erkennen war, zeigte sie sich deutlich bei den mit 4 $\alpha$ PDD und Shunt + RR behandelten Tieren. Nach einfacher Shunt-Operation war das stärkste Signal zu sehen (Maßstab 30  $\mu$ m).

Sowohl bei Kontrolltieren als auch bei den Schweinen mit einfacher Ligatur wurde C-JUN kaum angefärbt (Abb. 36). Nach 4 $\alpha$ PDD- und Shunt + RR-Behandlung zeigte sich eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals von C-JUN vor allem in den Kernen von Intima und Media. Nach Shunt-Behandlung wurden sowohl die gesamte Media mit Zytoplasma und Kernen als auch die Kerne der Intima angefärbt, hier war die Intensität von allen Gruppen am höchsten ausgeprägt.

#### 4.5.5.2 c-fos (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog)

Zur Quantifizierung von c-fos wurden qRT-PCRs mit c-fos-Primern durchgeführt (Abb. 38).



**Abbildung 36: qRT-PCR von c-fos.** Die relative Genexpression wurde in den Kollateralen aller Gruppen gemessen, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit Ligatur- bzw. Shunt-Operation und Kontrolltieren festgestellt wurde. \* =  $p < 0,05$

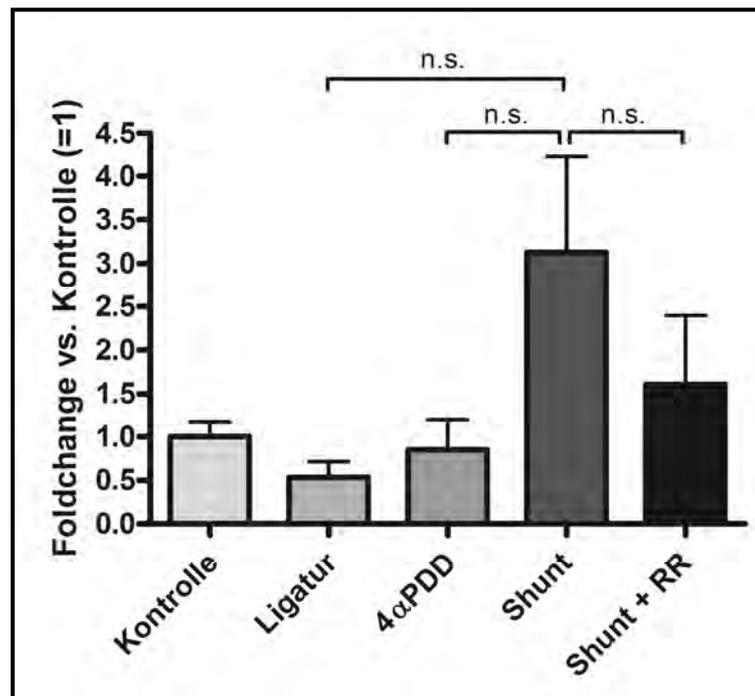
C-fos war bei den Schweinen mit einfacher Ligatur ( $10,00 \pm 2,98$ ;  $n = 6$ ) und mit Shunt-Operation ( $11,14 \pm 3,96$ ;  $n = 5$ ) im Vergleich zu den Sham-operierten Kontrolltieren ( $1,00 \pm 0,20$ ;  $n = 5$ ) signifikant hochreguliert (jeweils  $p < 0,05$ ; Abb. 38). 4 $\alpha$ PDD-Behandlung ( $3,00 \pm 0,48$ ;  $n = 6$ ) führte zu einer Abnahme der c-fos mRNA-Menge im Vergleich zu einfacher Ligatur ( $p < 0,05$ ). Die Shunt-operierten Schweine, welche zusätzlich mit RR behandelt wurden, zeigten einen Abfall der Transkription ( $6,12 \pm 1,19$ ;  $n = 5$ ) im Vergleich zu den Shunt-operierten Tieren (n.s.).

#### 4.5.6 Den untersuchten Transkriptionsfaktoren nachgeschaltete Gene

Um die Aktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Transkriptionsfaktoren zu verifizieren, wurden verschiedene nachgeschaltete Gene untersucht. Zu diesen gehören  $\text{TNF}\alpha$ , *c-fos*, *ABRA*, *ICAM-1* und *VCAM-1*.

Die qRT-PCR von *c-fos* wurde bereits oben beschrieben, hier ergab sich ein signifikanter Anstieg der Transkription bei Ligatur- und Shunt-operierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die mit 4 $\alpha$ PDD behandelten Schweine zeigten eine tendenzielle Herunterregulation.

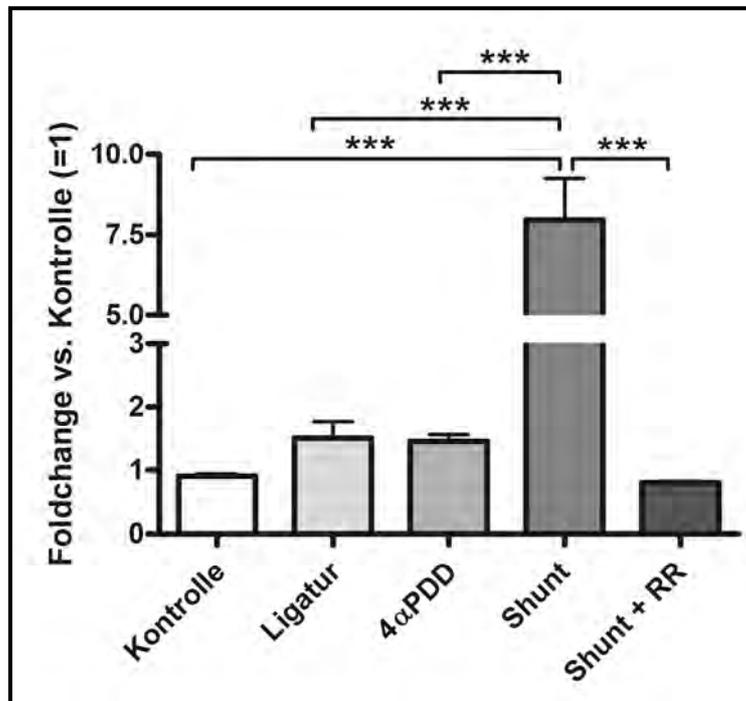
Im Promoter von **ABRA** (Actin binding rho activating protein) wurde eine Bindungsstelle von Dream entdeckt (Schaper 2009). Dieser Faktor wurde mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 39).



**Abbildung 37: qRT-PCR von ABRA.** Die mRNA-Expression wurde in den Kollateralen aller Gruppen gemessen. Auch wenn keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnte, so ergab sich doch eine tendenzielle Hochregulation bei den Shunt-operierten Schweinen.

Zwischen den einzelnen Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, jedoch zeigte sich eine tendenzielle Steigerung der Werte bei der Shunt-operierten Gruppe (Kontrolle  $1,00 \pm 0,13$ ;  $n = 6$ ; Ligatur  $0,54 \pm 0,12$ ;  $n = 5$ ; 4 $\alpha$ PDD  $1,35 \pm 0,47$ ;  $n = 6$ ; Shunt  $3,13 \pm 1,10$ ;  $n = 5$ ; Shunt + RR  $1,61 \pm 0,79$ ;  $n = 5$ ; Abb. 39).

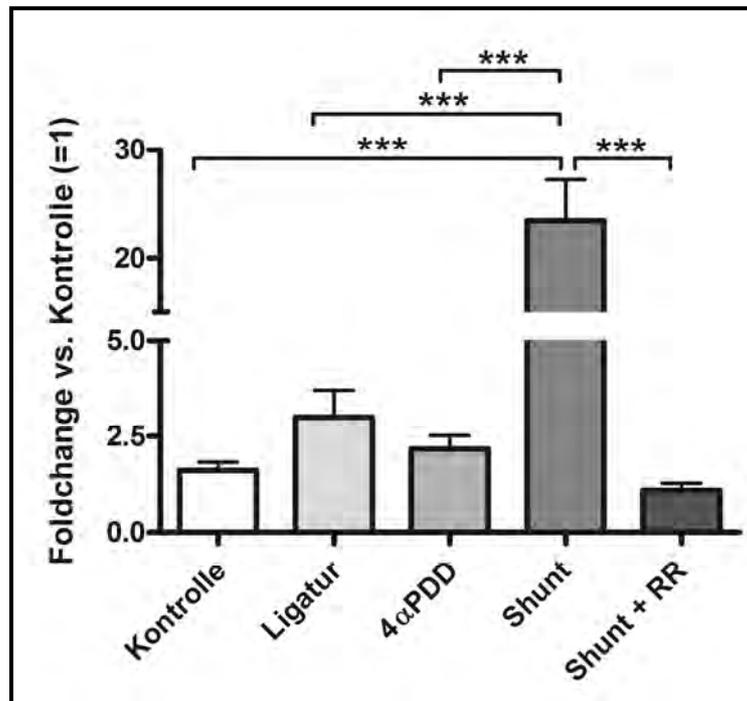
Im Promoter von **ICAM-1** wurden Bindungsregionen für NFATc1(Xue et al. 2009) und C-JUN (Demicheva et al. 2008) gefunden. Aufgrund dessen wurde eine qRT-PCR von ICAM-1 angefertigt.



**Abbildung 38: qRT-PCR von ICAM-1.** Bei der Untersuchung der relativen Genexpression zeigte sich eine hochsignifikante Hochregulation bei den Shunt-operierten Tieren im Vergleich zu allen anderen Gruppen. \*\*\* =  $p < 0,001$

Die qRT-PCR von ICAM-1 (Abb. 40) ergab eine hochsignifikante Vervielfachung der Werte der Shunt-operierten Tiere ( $7,97 \pm 1,28$ ;  $n = 5$ ) im Vergleich zu allen anderen Gruppen (Kontrolle  $0,91 \pm 0,04$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,001$ ; Ligatur  $1,50 \pm 0,26$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,001$ ; 4αPDD  $1,45 \pm 0,26$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,001$ ; Shunt RR  $0,80 \pm 0,03$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,001$ ).

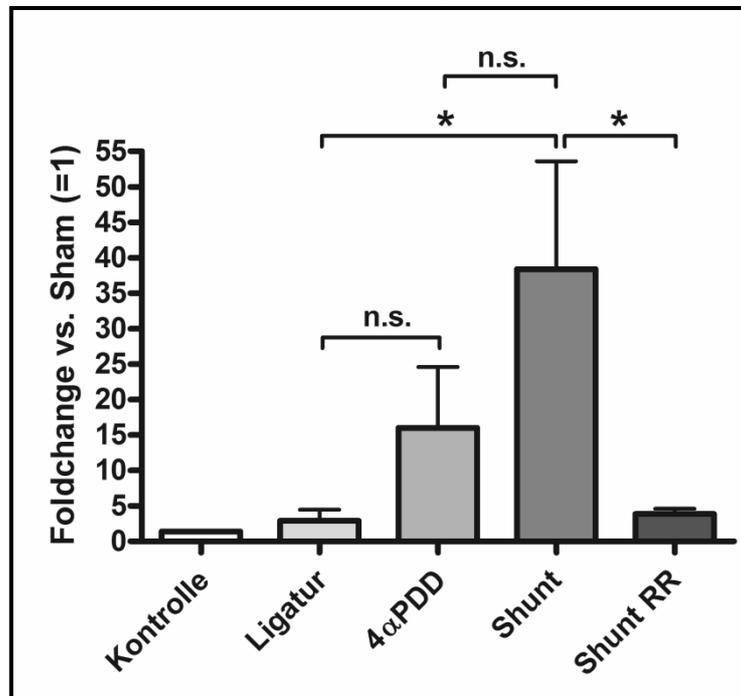
Der Promoter von **VCAM-1** wies eine Bindungsstelle für AP-1 (Demicheva et al. 2008) auf. Auf mRNA-Ebene zeigten sich anhand von qRT-PCR folgende Ergebnisse:



**Abbildung 39: qRT-PCR von VCAM-1.** Bei der Untersuchung der relativen Genexpression zeigte sich eine hochsignifikante Hochregulation bei den Shunt-operierten Tieren im Vergleich zu allen anderen Gruppen. \*\*\* =  $p < 0,001$

Bei der qRT-PCR von VCAM-1 wurde eine hochsignifikante Steigerung der mRNA-Menge bei den Shunt-operierten Tieren ( $23,45 \pm 3,81$ ;  $n = 5$ ) im Vergleich zu allen anderen Gruppen (Kontrolle  $1,61 \pm 0,22$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,001$ ; Ligatur  $2,99 \pm 0,71$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,001$ ; 4αPDD  $2,17 \pm 0,35$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,001$ ; Shunt RR  $1,09 \pm 0,18$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,001$ ) gefunden (Abb. 41).

**TNF $\alpha$**  wird sowohl durch NFATc1 als auch durch CREB1 reguliert und führt seinerseits zur Migration von Monozyten in das Kollateralengebiet. Die Untersuchung mittels qRT-PCR ergab für TNF $\alpha$  auf mRNA-Ebene folgende Ergebnisse:



**Abbildung 40: qRT-PCR von TNF $\alpha$ .** Die relative Genexpression wurde in den Kollateralen aller Gruppen gemessen, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit Ligatur- bzw. Shunt-Operation und Kontrolltieren festgestellt wurde. \* =  $p < 0,05$

Nach Shunt-Operation ( $38,37 \pm 15,22$ ;  $n = 5$ ) zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mRNA-Menge von TNF $\alpha$  sowohl im Vergleich zu zusätzlicher RR-Behandlung ( $3,88 \pm 0,72$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) als auch zu einfacher Ligatur ( $2,93 \pm 1,54$ ;  $n = 5$ ;  $p < 0,05$ ) und zu der Kontrollgruppe ( $1,38 \pm 0,12$ ;  $n = 6$ ;  $p < 0,05$ ). 4 $\alpha$ PDD-Behandlung ( $16,03 \pm 8,56$ ;  $n = 6$ ) führte im Gegensatz zu den Schweinen mit einfacher Ligatur (n.s.) zu einer tendenziellen Steigerung der mRNA-Menge und im Vergleich zu den Tieren nach Shunt-Operation (n.s.) zu einer nicht signifikanten Reduktion von TNF $\alpha$ -mRNA (Abbildung 40).

## 5 Diskussion

Nach dem Verschluss einer Arterie bleibt die natürliche Wiederherstellung der arteriellen Perfusion distal der Okklusionstelle unvollständig. Lediglich 40% des ursprünglichen Blutflusses werden durch spontanes Wachstum von Kollateralen erreicht (Ito et al. 1997). Voraussetzung für die Entwicklung einer pharmakologischen Stimulation dieses Prozesses ist die Aufklärung molekularer Mechanismen der Arteriogenese.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten mit dem mechanosensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal TRPV4 einen möglichen initialen Stimulus für die Arteriogenese identifizieren (Troidl et al. 2008). Dieser und ihm nachgeschaltete Signaltransduktionswege mit Einfluss auf das Kollateralenwachstum waren Gegenstand der hier vorgestellten Untersuchungen.

### 5.1 Tiermodell

#### 5.1.1 Das Schwein als Versuchstier

In der Vergangenheit wurden die meisten Erkenntnisse der Arteriogeneseforschung durch Experimente an Mäusen, Kaninchen und Ratten gewonnen. Die Vorteile dieser Tierarten im Rahmen von Versuchsreihen liegen im durch die geringe Körpergröße bedingten einfachen Handling sowie dem geringen finanziellen und räumlichen Aufwand. Zusätzlich ist bei Mäusen und Ratten das Genom vollständig sequenziert und es steht eine sehr große Anzahl an Antikörpern zur Verfügung.

Allerdings werden bei diesen Tierarten die Verhältnisse im Menschen nur ungenügend abgebildet (Voskuil et al. 2003). Während die im Gewebe ruhenden präexistenten Kollateralen bei großen wie kleinen Tierarten einen ähnlichen Durchmesser von 30-100 $\mu\text{m}$  aufweisen, steigt der zu erreichende Diameter der Gefäße mit der Größe des Organismus an. Bei kleinen Spezies, wie zum Beispiel der Maus, ist schon nach wenigen Zellteilungen ein funktioneller Durchmesser erreicht. Bei Schwein und Mensch verläuft das Wachstum hingegen in einem deutlich längeren Prozess (Voskuil et al. 2003) und führt bei diesen bis zu einer Verzwanzigfachung des Gefäßdurchmessers (Troidl 2007). Aus diesem Grund repräsentiert das Schwein mit seinen großlumigen maturierten Kollateralgefäßen die

Situation im menschlichen Patienten im Vergleich zu den anderen Versuchstieren am Besten (Buschmann et al. 2003). Gleichzeitig ist auch der Einsatz üblicher klinischer Bildgebungsverfahren, wie der perkutanen transluminalen Angiographie, möglich.

Mögliche Limitationen des Schweinmodells im Vergleich zu Versuchen mit Mäusen und Ratten bestehen neben dem höheren finanziellen und organisatorischen Aufwand auch in der geringeren Anzahl verfügbarer Antikörper zur Anwendung im Schwein hinsichtlich weiterer molekularbiologischer Arbeitsmethoden (Western Blot, Immunhistochemie). Dennoch macht die hohe Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Verhältnisse im Menschen das Schwein zum optimalen Modell für diese Arbeit.

### **5.1.2 Einfache Ligatur der A. femoralis vs. Shunt-Operation**

Das Ischämiemodell mit einfacher Ligatur der A. femoralis ist in der Arteriogeneseforschung am weitesten verbreitet. In der Vergangenheit wurde es bereits an Mäusen (Scholz et al. 2002), Ratten (Herzog et al. 2002), Kaninchen (Scholz et al. 2000) und Schweinen (Pipp et al. 2004) durchgeführt und imitiert die natürlichen Vorgänge eines akuten Gefäßverschlusses sehr gut. Eitenmüller et al. konnten in diesem Modell mit experimentellen Studien an Kaninchen und Ratten zeigen, dass der frühe Abbruch der Arteriogenese durch eine vorzeitige Normalisierung der Schubspannung verursacht wird (Eitenmüller et al. 2006). Dieser Vorgang ist erklärbar durch das Hagen-Poiseuillesche Gesetz: Die Schubspannung wird in der dritten Potenz des Radius reduziert und bereits eine geringe Zunahme des Diameters führt so zu einem Wegfall dieses Hauptstimulus. Eitenmüller et al. (2006) und Pipp et al. (2004) konnten durch Etablierung eines neuen Modells mit einem arterio-venösen Shunt bei Kaninchen bzw. Schwein beweisen, dass diese Selbstinhibierung durch eine chronische Verstärkung der Schubspannung auf anderem Wege (hier Anlage des AV-Shunts) umgangen werden kann. Auf diese Weise kommt es nicht nur zu einer kompletten Normalisierung des Blutflusses, sondern nach Anlage eines AV-Shunts bereits nach vier Wochen zu einer Verdopplung der Kapazität des Kollateralgefäßsystems distal der Ligatur im Vergleich zu einfacher Ligatur. Damit war der Beweis erbracht, dass die vollständige Wiederherstellung des Blutflusses prinzipiell möglich ist und nicht, wie bislang angenommen, durch morphologische und anatomische Restriktionen begrenzt wird. Eine Problematik dieser Methode liegt in der Anlegung eines möglicherweise zu großen Shunts, wodurch das Potenzial der Kollateralisierung deutlich eingegrenzt

wird. Hierdurch kann es zu Ischämie und infolge dessen zur Nekrose poststenotischer Gebiete kommen. Das Konzept des AV-Shunts im Tierversuch eröffnet aber ein großes Potenzial für molekularbiologische Untersuchungen, wenngleich die therapeutische Anwendung dieses Eingriffs beim Menschen aufgrund des Komplikationsreichtums ausgeschlossen ist.

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Versuchen wurden sowohl einfache Ligaturen als auch Operationen mit zusätzlichem AV-Shunt durchgeführt. Es sollten sowohl der Einfluss des TRPV4-Aktivators 4 $\alpha$ PDD auf einen Gefäßverschluss untersucht, als auch der Vergleich zur erhöhten Schubspannung nach Shunt-Anlage gezogen werden. Das Ziel bestand darin, durch pharmakologische Stimulation von TRPV4 ein ähnlich gesteigertes Kollateralwachstum zu erreichen, wie es durch eine chronisch erhöhte Schubspannung erzielt wird. Gleichzeitig sollte die Beteiligung des Kanals an der Schubspannungsvermittlung bewiesen werden, indem die Shunt-Operation mit zusätzlicher Hemmung von TRPV4 durch RR angewandt wurde.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde in den Operationen verschiedenen Aspekten besondere Beachtung geschenkt. Zum einen ist hier die Größe der angelegten Shunts zu nennen. Bei zwei Schweinen mit Shunt-Operation zeigten sich funktionelle Einschränkungen in Form von Lahmheiten. Bei der zweiten Operation nach sieben Tagen fanden sich bei beiden Tieren Nekrosen der Adduktorenmuskulatur. Die Ursache bestand in beiden Fällen in zu groß angelegten Shunts, weshalb es nachfolgend zur Ischämie des distalen Perfusionsgebietes kam. Diese Tiere wurden aus den Versuchen ausgeschlossen und durch neue ersetzt. Bei allen anderen Schweinen hingegen war der Shunt nach einer Woche offen, von einer vergleichbaren Größe und es waren keine Nekrosen oder weitere Anzeichen anhaltender Ischämie im distalen Perfusionsgebiet zu erkennen.

Zum anderen musste bei beiden Operationsmethoden bei der Ligatur der A. femoralis darauf geachtet werden, ebenfalls die nach lateral ziehende A. circumflexa femoris zu verschließen, da es sonst lediglich zu einem direkten und kurzen Kollateralwachstum von diesem Gefäß aus gekommen wäre. Dies konnte bei allen operierten Tieren erfolgreich umgesetzt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass beide Operationsmethoden unter Beachtung der genannten Punkte geeignete Modelle für die hier durchzuführenden Untersuchungen darstellen, die mit einer hohen Vergleichbarkeit einhergehen.

## 5.2 Hämodynamische Parameter

Der CFI wurde von Seiler et al. (1998) eingeführt, um neben der Bestimmung der angiographisch oder histologisch detektierbaren Zunahme der Gefäßanzahl einen weiteren Parameter für den Erfolg der Arteriogenese zu etablieren. Es wurde festgestellt, dass die Anzahl der Gefäße alleine kaum Korrelation zur Gewebperfusion besitzt. So findet bei Patienten, die nur eine geringe Anzahl nachweisbarer Kollateralen aufweisen, teilweise dennoch eine deutliche Adaptation an verschlossene Koronararterien statt (Billinger et al. 1999). Ziel einer Behandlung zur Stimulation des Kollateralarterienwachstums ist demzufolge weniger die absolute Zunahme der Gefäßanzahl, sondern vielmehr eine Verbesserung der Blut- und damit Sauerstoffversorgung des poststenotischen Gebietes.

Der CFI diente in dieser Studie als Parameter für die distale Perfusion nach Ligatur der A. femoralis. Anhand der Werte des CFI wurde mittels einer Dosis-Wirkungs-Kurve zunächst die optimale Konzentration von 4 $\alpha$ PDD ermittelt. Der Index zeigte ähnliche Werte bei einer Behandlung mit einer Dosis von 9  $\mu$ g/kg/d bzw. 36  $\mu$ g/kg/d 4 $\alpha$ PDD und eine deutliche Steigerung bei 18  $\mu$ g/kg/d 4 $\alpha$ PDD. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis ist eine noch nicht wirksame Dosis bei 9  $\mu$ g/kg/d bzw. eine schon toxische Dosis bei 36  $\mu$ g/kg/d. Demzufolge wurde eine Konzentration von 18  $\mu$ g/kg/d 4 $\alpha$ PDD für die durchgeführten Versuche festgelegt.

Bei den Kontrollschweinen mit einfacher Ligatur zeigte sich in den 7 Tagen nach der Ligatur ein Zuwachs des CFI von 0,21 auf 0,56, was einer Regeneration des Blutflusses um mehr als 50% entspricht. Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Untersuchungen, in denen etwa 40-50% der maximalen Konduktanz der verschlossenen Arterie durch natürliches Kollateralarterienwachstum erreicht wurde (Lazarous et al. 1996; Ito et al. 1997). Die Beobachtung, dass eine 4 $\alpha$ PDD-Behandlung im Vergleich zu einfacher Ligatur den Blutfluss um 17% (CFI 0,73) ansteigen ließ, deutet darauf hin, dass die Aktivierung von TRPV4 einen wichtigen Einfluss auf die Arteriogenese ausübt.

Die Werte nach Shunt-Operation unterschieden sich nicht signifikant von denen nach 4 $\alpha$ PDD-Behandlung (CFI 0,66), was die Annahme unterstützt, dass der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom nach Öffnung des TRPV4-Kanals von entscheidender Bedeutung für die Arteriogenese ist. Allerdings war bei Hemmung des Ca<sup>2+</sup>-Kanals durch zusätzliche

Behandlung mit RR keine Veränderung im Vergleich zu Shunt-Tieren dokumentierbar.

Die Ergebnisse der Shunt-operierten und mit RR behandelten Tiere stellten sich insgesamt in den Versuchen als widersprüchlich dar. Laut Hypothese müsste die durch Shunt-Operation (chronische Schubspannungserhöhung und dauerhafte Öffnung von TRPV4) erzeugte gesteigerte Arteriogenese nach Gabe des TRP-Inhibitors RR aufgehoben werden können. Diese These deckt sich mit vielen der im Weiteren beschriebenen Resultate der IHC und qRT-PCR, jedoch nicht mit denen der Druckmessungen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Wahl einer nicht geeigneten Dosis von RR sein, da aufgrund mangelnder in vivo Studien der Wert von 750 µg/kg/d empirisch ermittelt worden war. Bei den wenigen vorhandenen Studien handelte es sich nur um kurzfristige Experimente, bei denen 126 µg/kg/min über 5 Minuten in die A. renalis von Mäusen und Ratten infundiert worden waren, um eine Vasokonstriktion zu bewirken (Thai und Arendshorst 2008). Die bei unserem Versuchen erwünschte über sieben Tagen andauernde dauerhafte Hemmung von TRPV4 war somit mit diesen Experimenten nicht vergleichbar.

Zudem weist RR eine schwere Löslichkeit auf, sodass eine zwischenzeitliche Verklumpung und ungleichmäßige Abgabe nicht auszuschließen ist, wenn auch darauf geachtet wurde, dass alle Pumpen nach 7 Tagen restlos entleert waren.

Eine weitere mögliche Ursache ist in der Unspezifität von RR zu suchen. Mangels eines spezifischen Inhibitors für TRPV4 musste auf RR als unspezifischen Hemmer aller TRP-Kanäle zurückgegriffen werden. Durch die ständige Hemmung aller TRP-Kanäle könnte es zu einer dauerhaften Vasokonstriktion gekommen sein, was zur Folge hatte, dass es zu nicht- validen Druckmessungen bei den mit RR behandelten Schweinen kam. Welchen weiteren Einfluss RR dadurch auf die Arteriogenese ausübte ist aufgrund der vielfältigen Funktionen aller TRP-Kanäle unklar. In den nachfolgenden Experimenten zeigte sich jedoch eine der Hypothese folgende verminderte Arteriogenese bei Shunt-operierten und mit RR behandelten Schweinen, nachgewiesen durch Angiographie, Arterienzählung und Validierung der Proliferationsaktivität. Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass die widersprüchlichen Erkenntnisse des CFI am ehesten mit der dauerhaften Vasokonstriktion aufgrund Hemmung aller TRP-Kanäle in Zusammenhang stehen wohingegen die Arteriogenese laut Hypothese negativ beeinflusst wurde.

## 5.3 Morphologische Parameter

### 5.3.1 Angiographie

Angiographien wurden angefertigt, um eine qualitative Auswertung der entstandenen Kollateralen zu erhalten und die bereits gezeigten hämodynamischen Ergebnisse zu illustrieren. Da Kollateralarterien definitionsgemäß korkenzieherförmig gewunden sind, können sie angiographisch gut von anderen Gefäßen unterschieden werden. Zudem sollte mit der Angiographie festgestellt werden, in welchen Muskeln es zu verstärkter Arteriogenese kam, um diese nach Euthanasie der Schweine und Perfusion des Beines präparieren zu können.

Bei der Auswertung der Angiographien waren lediglich nach 4 $\alpha$ PDD-Behandlung und nach Shunt-Operation makroskopisch sichtbare Kollateralen erkennbar. Auf eine Quantifizierung wurde aus verschiedenen Gründen verzichtet. Zum einen haben Angiogramme und die Anzahl der darauf sichtbaren Kollateralen keine Aussagekraft über Perfusionsverhältnisse, da die unterschiedliche Größe der Gefäße zu beachten ist. Durch einen Prozess, der als *pruning* bezeichnet wird, nimmt die Gesamtzahl der sichtbaren Kollateralarterien mit der Zeit ab, da sich viele kleinere Gefäße zugunsten des Wachstums von wenigen großen Kollateralen zurückbilden (Zakrzewicz et al. 2002). Hoefler et al. (2001) stellten in einer Studie fest, dass sich im Kaninchenmodell eine Woche nach Okklusion der Femoralarterie und MCP-1-Behandlung angiographisch ca. 30 Gefäße nachweisen liessen, nach vier Wochen lag die Anzahl der Gefäße jedoch nur noch bei ca. 10 größeren Kollateralarterien. Zum anderen ist bei der Einschätzung der Gefäßgröße wiederum das Hagen-Poiseuillesche Gesetz zu berücksichtigen. Wertet man die Angiogramme quantitativ aus, so ist zu beachten, dass sich der Blutstrom eines Gefäßes umgekehrt proportional zur dritten Potenz des Radius verhält. Eine Fehleinschätzung der Gefäßgröße um 10% resultiert damit in einem 33-%igem Fehler in der Einschätzung des Blutvolumens, das dieses Gefäß pro Zeit führen kann ( $1,1^3 = 1,33$ ). Da sowohl bei einer visuellen Auswertung eines angiographischen Bildes als auch bei der Durchmesserbestimmung eines Gefäßes hohe Fehlerquoten, bedingt durch eine nicht gleichmäßige Applikation des Kontrastmittels, Unterschiede in Belichtung und Kontrast oder Projektionseffekte durch unterschiedlichen Film-Fokus-Abstand bestehen, ist eine quantitative Auswertung wenig aussagekräftig und wurde aus diesen Gründen bei den Versuchen unterlassen.

Obgleich eine objektive Bewertung aus genannten Gründen nicht durchgeführt werden konnte, zeigte sich subjektiv dennoch eine deutliche Zunahme von korkenzieherförmigen Kollateralarterien bei mit 4 $\alpha$ PDD-behandelten und Shunt-operierten Schweinen. Zudem konnte die Lokalisation der Kollateralen für weitere Untersuchungen im Bereich des M. adductor magnus, des M. adductor brevis und des M. gracilis festgestellt werden.

### 5.3.2 Arterienzählung und Proliferation vaskulärer Zellen

Es konnte bislang hinreichend gezeigt werden, dass eine Aktivierung von TRPV4 zu einem erhöhten intrazellulären Kalziumlevel führt (Liedtke et al. 2000; Nilius et al. 2003; Liedtke 2006; Vennekens et al. 2008). Von Loot et al. (2008), Hartmannsgruber et al. (2007) und anderen Autoren wurde bereits vielfach beschrieben, dass TRPV4 eine Vasodilatation auslöst, wenn ein schneller Kalziumeinstrom durch die Zellmembran zu einer weiteren intrazellulären Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und nachfolgend zu einer Depolarisierung des Endothels führt. Im Gegensatz dazu besteht Arteriogenese aus aktiver Proliferation vaskulärer Zellen. Berridge et al. (2003) konnten zeigen, dass TRP-Kanäle neben dem schnellen Kalziumeinfluss zu einer langsamen Konduktanz neigen und eine längere Zeit aktiv sein können, ohne die Zelle mit Kalzium zu überschwemmen. Weiterhin ist bekannt, dass Kalzium viele wichtige zelluläre Funktionen wie Erregbarkeit von Nervenzellen, Fruchtbarkeit, Immunantwort, Sekretion und Proliferation reguliert (Berridge et al. 2000; Clapham 2007; Roderick und Cook 2008). Mittels der Arterienzählung und dem Nachweis erhöhter proliferativer Aktivität sollte gezeigt werden, dass die beobachtete Verbesserung des Blutflusses der distalen Gliedmaße auf aktivem Gefäßwachstum und Umwandlung des Gewebes und nicht auf reiner Vasodilatation beruht.

Bei der Zählung der Arterien wurden mit  $\alpha$ SMA gefärbte Gefäße ausgezählt und als Arterien / mm<sup>2</sup> angegeben. Es ergab sich eine signifikante Steigerung der Dichte sowohl bei 4 $\alpha$ PDD-behandelten Tieren als auch nach Shunt-Operation im Vergleich zu einfacher Ligatur.

Von einigen Arbeitsgruppen wurden zur Quantifizierung lediglich die Kapillaren (Endothelfärbung mit CD31) ausgezählt (Pelisek et al. 2003; Lan et al. 2005). Es ist jedoch bekannt, dass die Zunahme dieser Gefäße charakteristisch für die

Angiogenese, nicht aber für die Arteriogenese ist (Risau 1997). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit nur Arteriolen und Arterien (bestehend aus Endothel und Media) ausgezählt, deren Zunahme für eine Steigerung der Kollateralenbildung spricht, wodurch eine Abgrenzung zur Angiogenese ermöglicht wird.

Die Ergebnisse der Arterienzählung verdeutlichen die gesteigerte Kollateralenbildung, unterstreichen die Resultate der Angiographien und schließen eine rein funktionelle Anpassung der hämodynamischen Verhältnisse durch Vasodilatation aus.

Darüberhinaus wurde die Proliferation von Endothel und Media der Kollateralarterien quantifiziert, um das dem Prozess der Arteriogenese zugrundeliegende aktive Wachstum vaskulärer Zellen zu demonstrieren.

1984 wurde von Gerdes et al. ein Antikörper namens Ki67 hergestellt, der im Mausmodell ein Zellkernantigen erkennt, das nur in proliferierenden Zellen synthetisiert wird. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass dieses nie in der G<sub>0</sub>-, jedoch in der G<sub>1</sub>-, der G<sub>2</sub>-, M- und S-Phase nachweisbar ist. Mittlerweile ist der Ki67-Antikörper als immunhistologischer Marker mit einer hohen Genauigkeit für proliferierende Zellen etabliert (Baisch und Gerdes 1990).

Bei meinen Versuchen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Proliferationsaktivität aller behandelten Gruppen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Schaper et al. stellte bereits vor 40 Jahren fest, dass die Proliferation einen wesentlichen Faktor bei der Durchmesserergrößerung von Kollateralarterien nach Okklusion eines Gefäßes darstellt (Schaper et al. 1971). Demgegenüber stellen lediglich gesteigerte hämodynamische Parameter ohne kollateralarterielle Proliferation andere Mechanismen, wie beispielsweise Angiogenese, dar.

Die dargestellten Ergebnisse in Zusammenhang mit den hämodynamischen und morphologischen Kriterien (CFI, Arteriolenzählung und Angiographien) beweisen eine gesteigerte Arteriogenese bei den mit 4αPDD-behandelten und Shunt-operierten Gruppen und ermöglichen eine Abgrenzung zu Angiogenese oder Vasodilatation als kompensatorische Mechanismen.

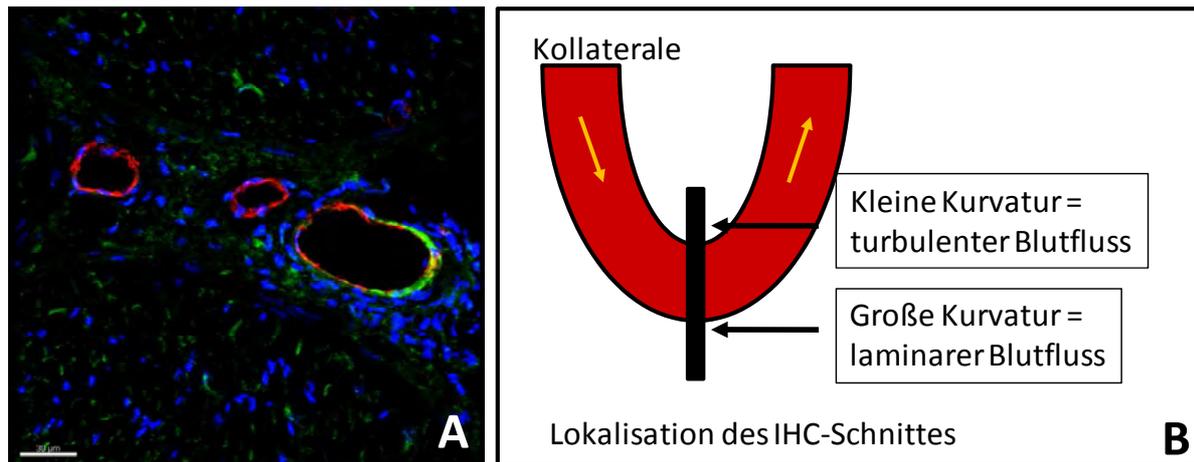
## 5.4 TRPV4

Die Aktivierung von TRPV4 führt bekanntermaßen zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle (Liedtke et al. 2000; Nilius et al. 2003; Liedtke 2006; Vennekens et al. 2008) und je nach Konduktanz bei schnellem Kalziumeinfluss zu Vasodilatation durch Depolarisierung (Holtz et al. 1984; Eichler et al. 2003; Nilius et al. 2003) und bei lang andauerndem, aber langsamem Einstrom zu weiteren wichtigen zellulären Funktionen. Die für die hier vorliegende Arbeit wichtigsten Aufgaben von Kalzium beinhalten vor allem Sekretion und Proliferation (Berridge et al. 2000; Clapham 2007; Roderick und Cook 2008).

Aufbauend auf diesen bereits veröffentlichten Ergebnissen kann angenommen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem TRPV4-medierten Kalziumeinstrom und dem Wachstum vaskulärer Zellen, welche zu Kollateralwachstum führen, gibt.

Bei der relativen Quantifizierung der Genexpression von TRPV4 ergab sich eine starke Hochregulation bei den 4 $\alpha$ PDD-behandelten bzw. Shunt-operierten Gruppen im Vergleich zur einfachen Ligatur. Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe der Immunhistochemie bestätigt werden. Hier zeigte sich ebenfalls eine deutlich erhöhte Konzentration des Proteins nach 4 $\alpha$ PDD-Behandlung und Shunt-Operation und eine Erniedrigung nach Shunt-Operation und zusätzlicher RR-Behandlung. Wenn auch bisher hinreichend durch Patch-clamp-Techniken bewiesen wurde, dass TRPV4 durch 4 $\alpha$ PDD und erhöhte Schubspannung aktiviert wird (Watanabe et al. 2002; Kohler et al. 2006; Hartmannsgruber et al. 2007; Wu et al. 2007), so war über eine dadurch ausgelöste erhöhte Expression des Kanals nur wenig bekannt (Zhang et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es durch Aktivierung des Kanals mittels Verabreichung von 4 $\alpha$ PDD bzw. durch künstlich erhöhte Schubspannung nach 7 Tagen zu einer signifikant gesteigerten Expression von TRPV4 kommt, was durch einen positiven Feedback-Mechanismus erklärbar ist. Denkbar wäre auch, dass die hierdurch erhöhte Dichte des Kalzium-Kanals die Sensitivität des Gewebes für gesteigerte Schubspannung und damit auch die Wachstumsgeschwindigkeit steigern kann.

Gestützt wird diese Vermutung (positives Feedback) durch Beobachtungen der Lokalisation von TRPV4 anhand von Immunhistochemie. Hier zeigte sich eine heterogene Verteilung der TRPV4-Anfärbung in Kollateralgefäßen. (Abbildung 41A).



**Abbildung 41: A: IHC-Schnitt der Kollaterale eines mit 4 $\alpha$ PDD behandelten Schweines. TRPV4 ist grün, das Endothel (CD31) ist rot und die Kerne sind blau dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, das TRPV4 nur auf der rechten Seite angefärbt ist. B: Schema der Lokalisation des Schnittes aus A. An der äußeren Seite der Biegung (große Kurvatur) setzt eine laminare Schubspannung an. Durch das positive Feedback wird TRPV4 mehr exprimiert als auf der inneren Seite (kleine Kurvatur).**

Eine hypothetische Erklärung hierfür bietet der ungleichmäßig verteilte Blutfluss. Durch die Zunahme im Durchmesser und in der Länge entwickeln Kollateralen ihre zunächst wellige Form, aufgrund derer sich vor allem in den Kurven die Schubspannung deutlich unterscheidet. Im Bereich der großen Kurvatur fließt das Blut zwar weiterhin laminar, jedoch mit einer gesteigerten Strömungsgeschwindigkeit vorbei, während es im Bereich der kleinen Kurvatur zu einem turbulenten Blutfluss kommt (Abbildung 41B). TRPV4 scheint jedoch nur durch einen laminaren Strom aktiviert zu werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen von Won et al. (2007), bei denen die Expression endothelialer Stickstoffsynthase (eNOS) in Mausarten und Endothelzellexperimenten untersucht wurde. Von eNOS war schon im Vorfeld bekannt, dass es unter anderem nach erhöhter Schubspannung durch die Öffnung von TRPV4 aktiviert wird (Liedtke 2007). Bei den Versuchen von Won et al. stellte sich heraus, dass im Bereich der kleinen Kurvatur (der Bereich mit dem turbulenten Fluss) die eNOS signifikant reduziert, im Gegensatz dazu jedoch im Bereich der großen Kurvatur hochreguliert war. Mittels Zellexperimenten konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Diese Untersuchungen stützen die These, dass TRPV4 vor allem auf der Seite der großen Kurvatur aktiviert wird. Durch den möglichen positiven Feedback könnte sich die Expression von TRPV4 vor allem in den Bereichen des Gefäßes mit laminaren Scherkräften verstärken. Die dadurch gesteigerte Sensitivität für Schubspannung führt daraufhin möglicherweise zu einem

gesteigerten Wachstum an diesen Stellen und somit zur Entwicklung der typischen Korkenzieherform.

## **5.5 Kalziumabhängige Wachstumsfaktoren**

In der Vergangenheit wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Aktivierung von TRPV4 zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration führt (Liedtke et al. 2000; Vennekens et al. 2000; Nilius et al. 2003; Liedtke 2006).

Weiterhin ist bekannt, dass Kalzium viele wichtige zelluläre Funktionen wie Erregbarkeit von Nervenzellen, Fruchtbarkeit, Blutgerinnung, Immunantwort, Sekretion und Proliferation reguliert (Vines 1921; Berridge et al. 2000; Clapham 2007; Roderick und Cook 2008). Da Arteriogenese hauptsächlich aus dem Wachstum vaskulärer Zellen besteht könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen Kalziumeinstrom und Kollateralwachstum bestehen. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit kalziumabhängige Signaltransduktionswege untersucht. Zu den untersuchten Transkriptionsfaktoren gehören Dream (Carrion et al. 1999; Mellstrom und Naranjo 2001), NFATc1 (Hogan et al. 2003), CREB1 (Sheng et al. 1991) und AP-1 (Whitmarsh und Davis 1996; Cuschieri et al. 2003), da diese zumindest teilweise schon in Zusammenhang mit Arteriogenese beschrieben wurden.

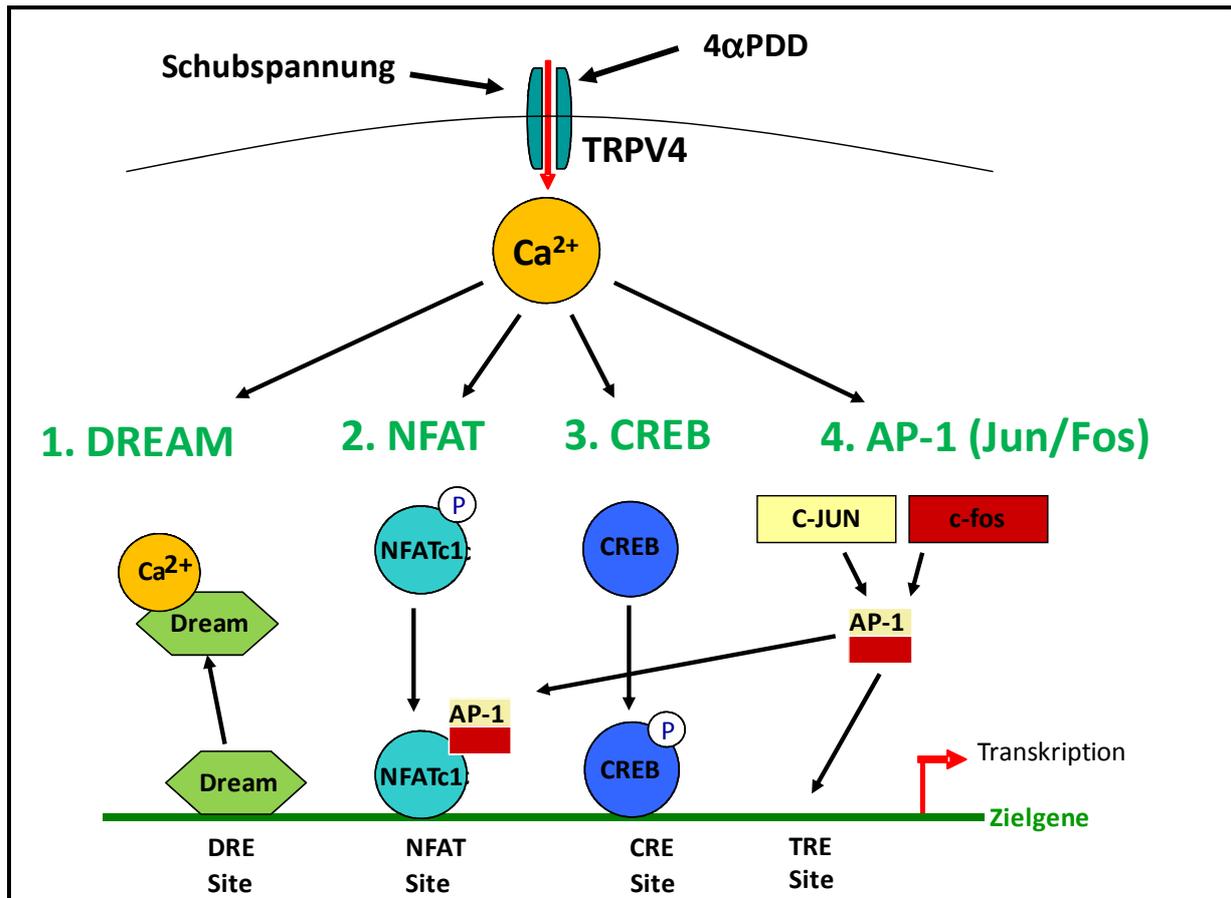


Abbildung 42: Schema des Signaltransduktionsweges von TRPV4 bis hin zu den kalziumabhängigen Transkriptionsfaktoren.

Bei Dream handelt es sich um einen transkriptionalen Repressor, welcher nach einer Konformationsänderung durch Binden an Kalzium aus dem Kern transloziert und dadurch eine De-Repression der Promotoren seiner Zielgene bewirkt (Mellstrom und Naranjo 2001).

Nach 4αPDD-Behandlung und nach Shunt-Operation kam es zwar zu keiner Steigerung der mRNA-Menge, aber zu einer Translokation von Dream aus dem Nukleus ins Zytoplasma. Nach Shunt und RR-Behandlung veränderte sich das Verhältnis der Proteinkonzentration zwischen Nukleus und Zytoplasma zugunsten des Zytoplasmas.

In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die De-Repression von Dream zu einer Aktivierung von c-fos (Cheng et al. 2002)- und CREB1 (Ledo et al. 2002)-abhängiger Transkription beispielweise im Zusammenhang mit Schmerzmodulation führt. Das gleiche zeigte sich in unseren Untersuchungen in wachsenden Kollateralen. Hier waren C-JUN und c-fos, welche den AP-1-Komplex

bilden, auf dem Proteinlevel in den Kernen vaskulärer und perivaskulärer Zellen hochreguliert. Dies führt zu der Annahme, dass die De-Repression von Dream durch TRPV4-abhängige Kalzium-Modulation Teil des Signalnetzwerkes während der Arteriogenese ist.

Bei ABRA handelt es sich um ein weiteres Zielgen, welches durch Dream unterdrückt wird. ABRA (auch bekannt als STARS) wurde 2002 von Arai et al. zunächst als neues unbekanntes Gen identifiziert, welches im frühen embryonalen Herz exprimiert wird. Da sie es ausschließlich in Herz- und Skelettmuskel fanden, bezeichneten sie es als *striated muscle activator of Rho-dependent signalling* (STARS). Experimentell wurden zwei Regionen identifiziert, welche Aktin binden. Weiterhin fanden sie, dass durch die hierdurch bedingte Stabilisierung des Aktinzytoskeletts die transkriptionale Aktivität des *serum response factors* (SRF) und damit die Expression muskelspezifischer Gene stimuliert wird. Sie bezeichneten ABRA als Vermittler zwischen zytoskelettalen Signalen, die über den Rho Signalweg die SRF abhängige Transkription aktivieren (Kuwahara et al. 2005). Troidl (2007) konnte zeigen, dass ABRA nicht nur im gestreiften Muskel, sondern ebenfalls in Endothelzellen und glatten Muskelzellen proliferierender Gefäße exprimiert wird und einen mitogenen Faktor für glatte Muskelzellen und somit einen Stimulator für die Arteriogenese darstellt. Von Eitenmüller et al. (2006) wurde beschrieben, dass Mitglieder des Rho-Signalwegs während der Arteriogenese hochreguliert sind und dass die Kollateralenbildung durch eine Hemmung von Rho verhindert werden kann. Bei unseren Untersuchungen von ABRA zeigte sich bei 4 $\alpha$ PDD- und bei Shunt-behandelten Tieren eine Steigerung der mRNA-Menge im Vergleich zur einfachen Ligatur. Nach Shunt-Behandlung und zusätzlicher Applikation des TRP-Inhibitors RR verminderte sich die Menge im Vergleich zu Shunt-operierten Tieren. Diese Ergebnisse lassen eine Kalzium- und Dream-abhängige Aktivierung von ABRA nach Öffnung des TRPV4-Kanals und daraufhin eine Beteiligung des Rho/ROCK-Signalweges vermuten, über welchen es zu Umbauprozessen des Aktinzytoskeletts, Migration von Monozyten und Proliferation glatter Muskelzellen während der Arteriogenese kommt (Schaper 2004).

Auch wenn CREB1 bislang nicht im Zusammenhang mit Arteriogenese beschrieben wurde, so gibt es doch Anhaltspunkte für seine Beteiligung. Nach der Aktivierung bindet CREB1 an eine spezifische CRE (*cAMP responsive element*)-Region der DNA und es kommt zur Transkription einer großen Anzahl von Genen (z.B. ICAM-1 (Scholz et al. 2000; Hoefler et al. 2004), PDGF (de Paula et al. 2009; Schierling et al. 2009), TNF $\alpha$  (Grundmann et al. 2005) und TGF $\beta$  (Grundmann et al. 2007)), deren Zusammenhang mit der Kollateralenbildung bereits beschrieben wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Steigerung der Transkription von CREB1 gezeigt werden. Allerdings war auf Proteinebene mit Hilfe der Immunhistochemie eine Zunahme des Proteins bei 4 $\alpha$ PDD-behandelten und Shunt-operierten Schweinen zu erkennen.

Die für die hier gezeigten Untersuchungen wichtigste Funktion von CREB1 ist die Co-Aktivierung von NFATc1 (Garcia-Rodriguez und Rao 1998) und AP-1 (Hai und Curran 1991; De Graeve et al. 1999). Die nachgeschalteten Gene von CREB1 gleichen somit denen dieser Transkriptionsfaktoren (z.B. ABRA, ICAM-1, VCAM-1, TNF $\alpha$ ).

Bei NFATc1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher sich in ruhenden Zellen phosphoryliert im Zytoplasma befindet und nach Aktivierung und Dephosphorylierung durch Kalzium in den Kern transloziert (Hogan et al. 2003). Masuyama et al. (2008) konnten kürzlich zeigen, dass TRPV4 vermittelte zytosolische Veränderungen des Kalziumlevels zur transkriptionalen Regulation über CaN und NFATc1 führen und eine Differenzierung von Osteoklasten induzieren. Von anderen Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, dass die Proliferationsaktivität glatter Gefäßmuskelzellen, welche für Arteriogenese unabdinglich ist, durch die Hemmung von NFATc1 unterdrückt werden kann (Karpurapu et al. 2008).

Sowohl mittels Immunhistologie als auch bei der qRT-PCR zeigte sich eine Steigerung von NFATc1 bei den mit 4 $\alpha$ PDD und Shunt behandelten Gruppen im Vergleich zur Gruppe mit einfacher Ligatur und eine Verlagerung zugunsten der nukleären Fraktion. Shunt + RR-Behandlung führte zu einer Abnahme der mRNA-Menge und zu einer vermehrten zytoplasmatischen Anfärbung des Proteins. Diese Ergebnisse belegen die Aktivierung von NFATc1 im Rahmen der Arteriogenese durch erhöhte Schubspannung und eine chemische Öffnung des TRPV4-Kanals.

Bestätigt werden die Resultate durch die Untersuchungen von Rinne et al. (2009), nach welchen nur ein lang andauernder extrazellulärer Kalziumeinfluss (z.B. über den TRPV4-Kanal) zu einer NFATc1 Aktivierung und Translokation führte, während selbst hochgradige intrazelluläre Kalziumfreisetzungen unwirksam blieben.

Bei der Untersuchung von Calcineurin, welches sowohl bei NFATc1 als auch bei CREB1 als Mediator für die Aktivierung durch  $Ca^{2+}$  dient (Hogan et al. 2003), wurde auf mRNA-Ebene zwischen Kontrolltieren und den Schweinen nach einfacher Ligatur kein Unterschied festgestellt. Nach 4 $\alpha$ PDD-Behandlung und Shunt-Operation kam es hingegen zu einer signifikanten Erhöhung, nach zusätzlicher RR-Applikation zu einem Abfall der mRNA-Menge. Die Ergebnisse zeigen, dass Calcineurin von TRPV4 bzw. seiner Aktivierung durch 4 $\alpha$ PDD und von erhöhter Schubspannung abhängt und eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion während der Arteriogenese spielt. Auch wenn Calcineurin bislang nicht im Zusammenhang mit TRPV4 oder Arteriogenese beschrieben wurde, so decken sich diese Ergebnisse mit Untersuchungen zu verwandten Kalzium-Kanälen wie TRPC6. Kuwahara et al. (2006) beschrieben diesen Kanal als positiven Regulator des Calcineurin-NFAT-Signalweges.

VEGF $\alpha$  wurde in der vorliegenden Dissertation als weiterer Aktivator von NFATc1 untersucht. Die Rolle von VEGF $\alpha$  innerhalb der Arteriogenese wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert, da dieser Wachstumsfaktor zunächst im Zusammenhang mit Angiogenese beschrieben wurde (Toyota et al. 2004). Es wurde gezeigt, dass Hypoxie (der Schlüsselreiz der Angiogenese, nicht aber der Arteriogenese) einen Stimulus für Transkription und Translation von VEGF $\alpha$  darstellt (Semenza 1999; Matsunaga et al. 2000). Von Schaper (2009) konnte hingegen bewiesen werden, dass VEGF $\alpha$  tatsächlich eine notwendige Komponente der Arteriogenese repräsentiert, ohne dass Ischämie den Stimulus darstellt. VEGF $\alpha$  wird während der Arteriogenese im Endothel wachsender Kollateralen exprimiert, welche konstant von oxygeniertem Blut durchflossen werden. Eine mögliche Erklärung findet sich laut Schaper möglicherweise in der nach Schubspannungsabhängiger Öffnung von TRPV4 bedingten Aktivierung von eNOS, welche VEGF $\alpha$  induziert. Durch VEGF $\alpha$  wiederum wird MCP-1 in glatten Gefäßmuskelzellen hochreguliert, welches Monozyten anlockt, die weitere Wachstumsfaktoren produzieren.

Bei meinen Untersuchungen zeigte sich auf mRNA-Ebene eine signifikante Hochregulierung von VEGF $\alpha$  bei Shunt-operierten Tieren im Vergleich zu Schweinen nach einfacher Ligatur. 4 $\alpha$ PDD- und Shunt + RR-Behandlung führten im Vergleich zu Ligatur lediglich zu einer leichten Zunahme der mRNA. VEGF $\alpha$  scheint demzufolge nicht nur über TRPV4, sondern über einen weiteren schubspannungsaktivierten Mechanismus reguliert zu werden. Ein möglicher Kandidat als Aktivator für VEGF $\alpha$  könnte PDGF sein. Es wurde bereits früher beschrieben, dass PDGF über Scherkräfte stimuliert wird (Dardik et al. 2005) und seinerseits VEGF $\alpha$  aktivieren kann (Dong et al. 2004).

Bei der Untersuchung von TNF $\alpha$ , dessen Transkription von NFATc1 reguliert wird, wurde mittels qRT-PCR eine gesteigerte mRNA-Menge bei den mit 4 $\alpha$ PDD und Shunt behandelten Tieren gefunden. Die Rolle von TNF $\alpha$  in der Arteriogenese wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Immunhistochemische Untersuchungen an Ratten zeigten, dass Monozyten, welche sich rund um Kollateralen ansammelten, vermehrt TNF $\alpha$  exprimierten. Jedoch konnte die Arteriogenese nach Substitution von bakteriellem Endotoxin, einem der stärksten Stimulatoren von TNF $\alpha$ , nicht signifikant erhöht werden (Arras et al. 1998). Allerdings zeigten TNF $\alpha$ - und TNF $\alpha$ -Rezeptor-knockout-Mäuse eine verminderte Arteriogenese, welche zumindest eine Beteiligung des Proteins impliziert (Hoefler et al. 2002). Insgesamt kann hieraus geschlossen werden, dass TNF $\alpha$  in der hier vorliegenden Arbeit bei der initialen inflammatorischen Antwort eine wichtige Rolle durch die Rekrutierung von Monozyten, welche wiederum Mitogene vaskulärer Zellen produzieren, zu spielen scheint.

Bei AP-1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher klassischerweise aus einem Jun-Fos-Heterodimer oder aus einem Jun-Jun-Homodimer besteht und eine wichtige Rolle bei Zelldifferenzierung und Tumorförderung spielt (Curran und Franza 1988; Angel und Karin 1991).

Bei unseren Versuchen war auf mRNA-Ebene keine Veränderung von C-JUN erkennbar, jedoch zeigte sich bei der immunhistochemischen Untersuchung eine vermehrte Expression bei 4 $\alpha$ PDD-behandelten und Shunt-operierten Gruppen im Vergleich zur Gruppe mit einfacher Ligatur. Die qRT-PCR von c-fos ergab eine signifikante Erhöhung der mRNA-Menge nach einfacher Ligatur und nach Shunt im Vergleich zur Kontrolle und zu 4 $\alpha$ PDD-behandelten Tieren.

Die Hochregulierung von C-JUN deckt sich mit früheren Untersuchungen, da für den Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 bereits wichtige Funktionen während der Arteriogenese beschrieben wurden. Während des Anfangsstadiums des Kollateralwachstums wird durch die Scherkräfte über  $\text{Ca}^{2+}$  und den Ras/MEKK/JNK-Weg die Transkription (Gan et al. 2000) und Translokation von AP-1 in den Kern initiiert. Von Demicheva et al. (2008) wurde festgestellt, dass es durch die Aktivierung von AP-1 sowohl zu einer Expression von MCP-1 und nachfolgend zur Rekrutierung von Monozyten als auch zu einer vermehrten Expression weiterer Zielgene, wie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, kommt. Diese Adhäsionsmoleküle waren in unseren Versuchen auf mRNA-Ebene bei den Shunt-operierten Tieren ebenfalls signifikant hochreguliert.

Die fehlende Korrelation zwischen Transkriptions- und Translationsebene bei C-JUN ist durch verschiedene Faktoren, wie mRNA-Spleißvarianten, mRNA-Stabilität, posttranskriptionelle Regulation der Proteinexpression oder Proteinstabilität erklärbar. So ist vorstellbar, dass zum Zeitpunkt der Probenentnahme die Expression auf Proteinebene erhöht, die recht instabile mRNA jedoch bereits wieder abgebaut war. Alternativ könnte dieses Ergebnis auch für einen weiteren Aktivierungsmechanismus von C-JUN sprechen, welcher zwar schubspannungsabhängig, aber nicht durch TRPV4 vermittelt ist. Als Beispiel hierfür kommt Endothelin-1 in Frage, welches kürzlich von Morawietz et al. (2008) als Übermittler zwischen Schubspannung und der Aktivierung von C-JUN beschrieben wurde. Das Ergebnis der Immunhistochemie für C-JUN könnte beide Vermutungen unterstreichen. Für die These des alternativen Aktivierungsmechanismus spricht, dass C-JUN nur nach Shunt-Behandlung, nicht aber nach 4 $\alpha$ PDD-Applikation signifikant hochreguliert ist. RR-Behandlung und damit Inhibition des TRP-Kanals führte jedoch zu einer Verminderung des Proteins, was auf eine TRP-abhängige Aktivierung und damit beispielsweise auf eine hohe Proteinstabilität hinweist.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass es nach erhöhter Schubspannung und nach 4 $\alpha$ PDD-Substitution durch die Öffnung des TRPV4-Kanals zu einem Einstrom von Kalzium in die Zelle kommt, welches über den Ras/MEKK/JNK-Signalweg zu einer Hochregulierung und Aktivierung von AP-1 führt. Dies konnte auch bereits schon von anderen Gruppen beschrieben werden (Zhou et al. 2003; Iqbal und Zaidi 2005). Über Koaktivierung mit CREB1 und NFATc1 kommt es zu einer erhöhten Transkription der für Arteriogenese notwendigen Proteine MCP-

1, ICAM-1 und VCAM-1. Diese führen zur Anlockung, Adhäsion und Migration zirkulierender Monozyten mit nachfolgender Reifung zu Makrophagen (Schaper et al. 1976), welche eine initiale Inflammation bewirken und große Mengen an Wachstumsfaktoren produzieren (Polverini et al. 1977; van Royen et al. 2002).

## 5.6 Schlussfolgerung

Eine Steigerung des Kollateralwachstums, gefolgt von erhöhter Perfusion des distalen Versorgungsgebietes kann für Menschen mit okklusiven arteriellen Erkrankungen organprotektiv oder sogar lebensrettend sein. Aus diesem Grunde würde ein proarteriogenetischer therapeutischer Ansatz die Behandlungsstrategien der kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Koronaren Herzerkrankung und der peripheren Arteriellen Verschlusskrankheit revolutionieren. Erst kürzlich konnte die Beteiligung des mechanosensitiven Kalziumkanals TRPV4 an der Arteriogenese gezeigt werden. Es wurde festgestellt, dass Kollateralwachstum, welches durch AV-Shunts induziert und damit chronischen Schubkräften ausgesetzt war, mit deutlichen Steigerungen von TRPV4-mRNA in den Gefäßwänden wachsender Kollateralen vergesellschaftet war. Sieben Tage nach einfacher Ligatur war hingegen keine TRPV4-mRNA nachweisbar (Troidl et al. 2008). Da Schubspannung sich umgekehrt proportional zu der dritten Potenz des Radius verhält kommt es durch einen sich erhöhenden Gefäßdurchmesser nach einfacher Ligatur früh zu einer Verminderung der Schubspannung.

Die Hauptziele der vorliegenden Arbeit waren es, (1) die funktionelle Rolle einer pharmakologischen TRPV4-Aktivierung in einem klinisch relevanten Modell am Schwein zu untersuchen und (2) subzelluläre Mechanismen TRPV4-vermittelter Arteriogenese zu ermitteln.

Aufgrund dessen wurden physiologische und morphologische Parameter betrachtet und Kollateralen nach Ligatur und zusätzlicher 4 $\alpha$ PDD-Behandlung bzw. nach Shunt-Operation mit und ohne Applikation von RR immunhistologisch und molekularbiologisch untersucht. Die Ergebnisse wurden jeweils mit der Gruppe nach einfacher Ligatur ohne weitere Behandlung verglichen.

Bei den hier vorliegenden Untersuchungen zeigte sich bei den Schweinen mit einfacher Ligatur ein Anstieg des CFI innerhalb der 7 Tage von 0,21 auf 0,53, was

einer Erholung des Blutflusses um mehr als 50% geichkommt. Dieses Ergebnis deckt sich mit Untersuchungen anderer Gruppen, in welchen natürliches Kollateralwachstum lediglich 40-50% der maximalen Konduktanz der verschlossenen Arterie erreichte (Lazarous et al. 1996; Ito et al. 1997). Die Beobachtung, dass 4 $\alpha$ PDD-Behandlung die Regeneration des Blutflusses im Vergleich zu einfacher Ligatur um 17% erhöhte (CFI 0,73), beweist, dass die Aktivierung von TRPV4 ein wichtiges Ereignis zu Beginn der Arteriogenese darstellt. Kollateralwachstum durch gesteigerte Schubspannung bei Shunt-operierten Tieren führte zu vergleichbaren Ergebnissen (CFI 0,66), was die These unterstützt, dass Kalzium-Einstrom für den Prozess der Arteriogenese entscheidend ist. Die beobachtete Verbesserung des Blutflusses beruht auf einer Umwandlung des Gewebes und aktivem vaskulären Wachstum. Eine lediglich auf Vasodilatation beruhende rein funktionelle Anpassung kann durch die Beobachtung der erhöhten Arteriendichte und proliferativen Aktivität nach Behandlung ausgeschlossen werden. Es wurde bislang hinreichend gezeigt, dass eine Aktivierung von TRPV4 zu erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentrationen führt (Liedtke et al. 2000; Nilius et al. 2003; Liedtke 2006; Vennekens et al. 2008). Obwohl TRPV4 bei einem schnellen Kalzium-Einstrom über die Zellmembran, welche zu Depolarisierung des Endothels führt, Vasodilatation bewirkt (Holtz et al. 1984; Eichler et al. 2003; Nilius et al. 2003), neigen TRP-Kanäle zu einer sog. langsamen Konduktanz und können deshalb längere Zeit geöffnet sein ohne die Zelle mit Kalzium zu überschwemmen (Berridge et al. 2003). Weiterhin ist bekannt, dass Kalzium viele wichtige Zellfunktionen, eingeschlossen Synapsenplastizität, Fruchtbarkeit, Immunantwort, Sekretion und Proliferation, reguliert (Berridge et al. 2000; Clapham 2007; Roderick und Cook 2008). Basierend auf diesen schon veröffentlichten Ergebnissen kann man annehmen, dass es einen Zusammenhang zwischen TRPV4-induziertem Kalziumeinstrom und dem anschließenden Wachstum vaskulärer Zellen, welche zu Kollateralwachstum führen, gibt. Diese These wird unterstützt durch Beobachtungen von Muramatsu et al. (2007) und Masuyama et al. (2008), welche kürzlich zeigen konnten, dass TRPV4-induzierte zytosolische Veränderung des Kalziumlevels zu einer transkriptionellen Regulation über Calcineurin und NFATc1 im Zusammenhang mit der Differenzierung von Osteoklasten beitragen. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass NFATc1 und Calcineurin in wachsenden Kollateralen nach der Aktivierung von TRPV4 stark hochreguliert waren. Durch die kalziumabhängige

Dephosphorylierung wurde NFATc1 aktiviert und translozierte in den Kern (Hogan et al. 2003). Die Beobachtung, dass die Aktivierung von NFATc1 von einem konstant erhöhten extrazellulären Kalziumeinfluss über TRPV4 abhängt deckt sich mit Veröffentlichungen von Rinne et al. (2009), welche aufzeigten, dass nur ein lang andauernder extrazellulärer Kalziumeinfluss zu NFAT-Aktivierung und Translokation führt, während durch eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung bedingte höhere Kalziummengen ineffektiv blieben.

Neben NFATc1 wurden auch drei andere bedeutende und direkt kalziumabhängige transkriptionelle Regulatoren beschrieben (Savignac et al. 2007). Der transkriptionelle Repressor Dream transloziert nach Binden an Kalzium aus dem Kern und gibt damit die Promotoren seiner Zielgene frei (Carrion et al. 1999). Auch wenn sich die Menge der mRNA von Dream nach der Aktivierung von TRPV4 nicht veränderte, so konnte doch durch Western Blot-Analysen gezeigt werden, dass es zu einer Translokation von Dream vom Kern ins Zytoplasma kam. Von Cheng et al. wurde bereits beschrieben, dass eine De-Repression von Dream zu einer Aktivierung von AP-1- und CREB-abhängiger Transkription im Zusammenhang mit Schmerzmodulation führt (Cheng et al. 2002). Dies ist ebenso der Fall in wachsenden Kollateralen, in welchen C-JUN und c-fos, welche den transkriptionalen Komplex AP-1 bilden, auf dem Proteinlevel in den Kernen vaskulärer und perivaskulärer Zellen hochreguliert sind. Dies führt zu der Annahme, dass De-Repression von Dream über TRPV4-getriggerte zytosolische und nukleäre Kalziummodulation einen Teil des Signalnetzwerkes während des Kollateralwachstums darstellt. Dies wird unterstützt durch die Untersuchungen von Demicheva et al. (2008), in welchen die wichtige Rolle von AP-1 während der Arteriogenese gezeigt wurde.

Mit den dieser Dissertation zugrundeliegenden Untersuchungen konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass vier wichtige, kalziumabhängige Transkriptionsfaktoren (NFATc1, Dream, CREB1, AP-1) durch eine 4 $\alpha$ PDD- oder Shunt-induzierte Arteriogenese moduliert werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass durch TRPV4 eingeleitete und durch Kalzium übermittelte Signaltransduktion eine entscheidende Rolle während der Arteriogenese zu spielen scheint. Um einen therapeutischen Ansatz zur Induktion der Arteriogenese voranzutreiben sind jedoch noch weitere Aufschlüsselungen molekularbiologischer Mechanismen erforderlich.

## 6 Zusammenfassung

Der Verschluss einer Arterie führt über erhöhte Schubspannung zur Ausbildung von Kollateralkreisläufen, ein Prozess, welcher als Arteriogenese bezeichnet wird. Kürzlich konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen diesem Vorgang und Aktivierung des mechanosensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals *transient receptor potential channel, subfamily V, member 4* (TRPV4) festgestellt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, in einem klinisch relevanten Schweinemodell zu untersuchen, ob durch eine pharmakologische Aktivierung des Kanals hämodynamische und morphologische Parameter positiv beeinflusst werden. Im Fokus standen dabei kalziumabhängige Transkriptionsfaktoren, sowie dem TRPV4 nachgeschaltete, an der Arteriogenese beteiligten Gene.

Hausschweine ( $n=37$ ;  $38 \pm 5,7$  kg) wurden randomisiert auf 7 Versuchsgruppen verteilt. (1) Sham-operierte Tiere (*Kontroll-Gruppe*), (2) Ligatur der A. femoralis (*einfache Ligatur-Gruppe*), (3-5) Ligatur der A. femoralis und Implantation einer osmotischen Minipumpe, welche  $4\alpha$ -Phorbol-12,13-didecanoate ( $4\alpha$ -PDD, Trpv4-Aktivator) in 3 verschiedenen Konzentrationen proximal der Ligatur in die A. femoralis applizierte ( *$4\alpha$ PDD-Gruppe*), (6) Operation eines AV-Shunts zwischen A. und V. femoralis und Ligatur der A. femoralis zur chronischen Erhöhung der Schubspannung (*Shunt-Gruppe*), (7) Shunt-Operation und zusätzliche Implantation einer osmotischen Minipumpe mit Ruthenium Rot (RR, Trpv4-Inhibitor) (*Shunt + RR-Gruppe*). Vor, direkt nach Ligatur sowie nach 7 Tagen wurden invasive Messungen des zentralen Venendruckes, des zentral-arteriellen Druckes (Aorta) und des peripher-arteriellen Druckes (A. saphena) durchgeführt. Aus den erhobenen Druckwerten wurde der „collateral flow index (CFI)“ berechnet, zusätzlich wurden Angiographien angefertigt. Nach 7 Tagen wurden die Schweine euthanasiert. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Gewebeproben aus dem Kollateralgebiet im M. adductor magnus, M. adductor brevis und M. gracilis und für quantitative real-time PCR (qRT-PCR) einzelne Kollateralen aus dem umliegenden Muskelgewebe freipräpariert. Es wurde immunhistochemische Untersuchungen zur Feststellung von Proliferation und Arterienanzahl, von TRPV4 sowie kalziumabhängiger Transkriptionsfaktoren (NFATc1, Dream, AP-1 und CREB1) und nachgeschalteter Gene (ABRA,  $\text{TNF}\alpha$ , ICAM-1 und VCAM-1) durchgeführt.

Die Angiographien zeigten eine Steigerung der Kollateralenbildung bei 4 $\alpha$ PDD-behandelten und Shunt-operierten Tieren. Der CFI ergab an Tag 7 einen signifikanten Unterschied zwischen der Ligatur-Gruppe und der 4 $\alpha$ PDD- und Shunt-Gruppe. Immunhistochemisch konnte durch Quantifizierung Ki67-positiver Zellkerne eine signifikante Zunahme der Proliferation in Gefäßen und durch Färbung mit  $\alpha$ SMA ein hochsignifikanter Anstieg der Arterienzahl bei 4 $\alpha$ PDD-behandelten und Shunt-operierten Schweine gegenüber der Ligatur-Gruppe festgestellt werden. Der quantitative Transkriptionsnachweis von TRPV4 zeigte eine signifikante Steigerung der Expression bei 4 $\alpha$ PDD-behandelten Schweinen im Vergleich zur Ligatur-Gruppe. Auch bei den Transkriptionsfaktoren und nachgeschalteten Genen zeigte sich meist eine Hochregulierung und/oder Aktivierung.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nach Ligatur und 4 $\alpha$ PDD-Behandlung und noch deutlicher nach Shunt-Operation (chronisch erhöhte Schubspannung) durch die Aktivierung von TRPV4 eine Verbesserung physiologischer und morphologischer Parameter erreicht werden kann. Dies konnte durch eine gesteigerte Arteriogenese in Form vermehrter Proliferation und Arterienanzahl und eine Zunahme des CFI dokumentiert werden. Außerdem konnte erstmalig gezeigt werden, dass vier große kalziumabhängige Transkriptionsfaktoren (NFATc1, Dream, AP-1, CREB1) während der 4 $\alpha$ PDD- oder Shunt-getriggerten Arteriogenese moduliert werden.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass TRPV4- und Kalzium-abhängige Signaltransduktionswege eine zentrale Rolle während der Arteriogenese spielen.

## 7 Summary

Occlusion of a large artery leads to collateral vessel growth through an increase of shear stress, a process called arteriogenesis. Recently it was established that a possible relationship between this process and the activation of a mechanosensitive  $Ca^{2+}$ -channel called *transient receptor potential channel subfamily V* (TRPV4) existed. The aim of this study was to examine in a clinical relevant pig model if a pharmacological activation of the channel can have a positive effect on the hemodynamical and morphological parameters and if downstream targets of TRPV4 participate in arteriogenesis.

Pigs ( $n = 37$ ;  $38 \pm 5,7\text{kg}$ ) were randomly assigned into seven groups. (1) Sham-operated pigs (control-group), (2) ligation of the femoral artery (only ligation-group), (3-5) ligation of the femoral artery and implantation of an osmotic minipump filled with  $4\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate ( $4\alpha$ PDD) in three different concentrations applied proximal of the ligation into the femoral artery ( $4\alpha$ PDD-group), (6) operation of an arteriovenous shunt between femoral artery and vein for chronic shear stress improvement (shunt-group), (7) shunt-operation and additionally implantation of an osmotic minipump filled with ruthenium red (shunt + RR-group). Before, directly after ligation and seven days after first surgery invasive flow measurements of central vein pressure, central arterial pressure (aortic) and peripheral arterial pressure (arteria saphena) were performed. "Collateral flow index" (CFI) was generated out of detected pressures and also there were angiographies made. After seven days pigs were euthanized. Tissue samples from the collateral area of the adductor magnus muscle, adductor brevis muscle and gracilis muscle for immunohistochemical analysis and collateral arteries were dissected free from muscle tissue for quantitative real-time PCR. Immunohistochemical investigation was obtained for detection of proliferation, number of arterials, TRPV4, calcium-dependent transcription factors (NFATc1, Dream, AP-1 and CREB1) and downstream targets (ABRA, TNF $\alpha$ , ICAM-1 and VCAM-1).

Growing of collaterals was demonstrated in angiographies in  $4\alpha$ PDD-treated and shunt-operated animals. CFI showed a significant increase in  $4\alpha$ PDD- and shunt-group compared to control pigs on day 7. Through immunohistochemical analysis there could be a significant increase of proliferation in vessels (Ki67) revealed and a high significant rise of arterial number ( $\alpha$ SMA) in  $4\alpha$ PDD- and shunt-treated animals compared to the control group. Quantitative transcription analysis of TRPV4

---

presented an increase of expression in 4 $\alpha$ PDD-treated pigs compared to the ligation-group. Also transcription factors and downstream targets mostly indicated an increase and/or activation.

These results implicate an enhancement of physiological and morphological parameters through activation of TRPV4 after occlusion of A.femoralis and even more after shunt-operation (chronical increase of shear stress). This could be documented through an increase of arteriogenesis in form of augmented proliferation and number of arterials and an enhancement of CFI. Furthermore, it could be demonstrated for the first time that three major calcium-dependent transcriptional effectors (NFATc1, Dream, AP-1, CREB1) are modulated during 4 $\alpha$ PDD-triggered or AV-shunt-induced arteriogenesis. This leads to the conclusion that TRPV4-triggered and calcium-mediated signalling plays a pivotal role in arteriogenesis.

## 8 Literaturverzeichnis

- ALZET osmotic pumps Company, C., USA ALZET technical information manual.
- Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." Biochim Biophys Acta **1072**(2-3): 129-57.
- Arai, A., J. A. Spencer, et al. (2002). "STARS, a striated muscle activator of Rho signaling and serum response factor-dependent transcription." J Biol Chem **277**(27): 24453-9.
- Arniges, M., E. Vazquez, et al. (2004). "Swelling-activated Ca<sup>2+</sup> entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia." J Biol Chem **279**(52): 54062-8.
- Arras, M., W. D. Ito, et al. (1998). "Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb." J Clin Invest **101**(1): 40-50.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-7.
- Baisch, H. and J. Gerdes (1990). "Identification of proliferating cells by Ki-67 antibody." Methods Cell Biol **33**: 217-26.
- Baroldi, G., O. Mantero, et al. (1956). "The collaterals of the coronary arteries in normal and pathologic hearts." Circ Res **4**(2): 223-9.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-29.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Billinger, M., M. Fleisch, et al. (1999). "Is the development of myocardial tolerance to repeated ischemia in humans due to preconditioning or to collateral recruitment?" J Am Coll Cardiol **33**(4): 1027-35.
- Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1990). "Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(2): 682-5.

- Busch, H. J., I. R. Buschmann, et al. (2003). "Arteriogenesis in hypoperfused rat brain." J Cereb Blood Flow Metab **23**(5): 621-8.
- Buschmann, I. and W. Schaper (1999). "Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth." News Physiol Sci **14**: 121-125.
- Buschmann, I. R., H. J. Busch, et al. (2003). "Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Circulation **108**(5): 610-5.
- Buschmann, I. R., M. Voskuil, et al. (2003). "Invasive and non-invasive evaluation of spontaneous arteriogenesis in a novel porcine model for peripheral arterial obstructive disease." Atherosclerosis **167**(1): 33-43.
- Busse, R., G. Edwards, et al. (2002). "EDHF: bringing the concepts together." Trends Pharmacol Sci **23**(8): 374-80.
- Cai, W. J., S. Koltai, et al. (2001). "Connexin37, not Cx40 and Cx43, is induced in vascular smooth muscle cells during coronary arteriogenesis." J Mol Cell Cardiol **33**(5): 957-67.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-95.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **9**(6): 653-60.
- Carrion, A. M., W. A. Link, et al. (1999). "DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor." Nature **398**(6722): 80-4.
- Caterina, M. J., T. A. Rosen, et al. (1999). "A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat." Nature **398**(6726): 436-41.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, et al. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature **389**(6653): 816-24.
- Cheng, H. Y., G. M. Pitcher, et al. (2002). "DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation." Cell **108**(1): 31-43.
- Christensen, A. P. and D. P. Corey (2007). "TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation?" Nat Rev Neurosci **8**(7): 510-21.
- Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." Cell **131**(6): 1047-58.

- Clapham, D. E., D. Julius, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels." Pharmacol Rev **57**(4): 427-50.
- Conway, E. M., D. Collen, et al. (2001). "Molecular mechanisms of blood vessel growth." Cardiovasc Res **49**(3): 507-21.
- Couffinhal, T., M. Silver, et al. (1998). "Mouse model of angiogenesis." Am J Pathol **152**(6): 1667-79.
- Crabtree, G. R. and E. N. Olson (2002). "NFAT signaling: choreographing the social lives of cells." Cell **109** **Suppl**: S67-79.
- Curran, T. and B. R. Franza, Jr. (1988). "Fos and Jun: the AP-1 connection." Cell **55**(3): 395-7.
- Cuschieri, J., D. Gourlay, et al. (2003). "Modulation of endotoxin-induced endothelial function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase." Shock **20**(2): 176-82.
- Dardik, A., A. Yamashita, et al. (2005). "Shear stress-stimulated endothelial cells induce smooth muscle cell chemotaxis via platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1alpha." J Vasc Surg **41**(2): 321-31.
- De Graeve, F., A. Bahr, et al. (1999). "Role of the ATFa/JNK2 complex in Jun activation." Oncogene **18**(23): 3491-500.
- de Paula, E. V., M. C. Flores-Nascimento, et al. (2009). "Dual gene transfer of fibroblast growth factor-2 and platelet derived growth factor-BB using plasmid deoxyribonucleic acid promotes effective angiogenesis and arteriogenesis in a rodent model of hindlimb ischemia." Transl Res **153**(5): 232-9.
- Deindl, E. and W. Schaper (2005). "The art of arteriogenesis." Cell Biochem Biophys **43**(1): 1-15.
- Delany, N. S., M. Hurle, et al. (2001). "Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2." Physiol Genomics **4**(3): 165-74.
- Demicheva, E., M. Hecker, et al. (2008). "Stretch-induced activation of the transcription factor activator protein-1 controls monocyte chemoattractant protein-1 expression during arteriogenesis." Circ Res **103**(5): 477-84.

- Dong, J., J. Grunstein, et al. (2004). "VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis." EMBO J **23**(14): 2800-10.
- Earley, S., T. J. Heppner, et al. (2005). "TRPV4 forms a novel Ca<sup>2+</sup> signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels." Circ Res **97**(12): 1270-9.
- Eferl, R., M. Sibilica, et al. (1999). "Functions of c-Jun in liver and heart development." J Cell Biol **145**(5): 1049-61.
- Eichler, I., J. Wibawa, et al. (2003). "Selective blockade of endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated small- and intermediate-conductance K<sup>+</sup>-channels suppresses EDHF-mediated vasodilation." Br J Pharmacol **138**(4): 594-601.
- Eitenmuller, I., O. Volger, et al. (2006). "The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion." Circ Res **99**(6): 656-62.
- Endo, M., M. Tanaka, et al. (1970). "Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres." Nature **228**(5266): 34-6.
- Erler, I., D. Hirnet, et al. (2004). "Ca<sup>2+</sup>-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat." J Biol Chem **279**(33): 34456-63.
- Europarat. (1986). "Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere." from <http://conventions.coe.int/Treaty/ger/Treaties/Html/123.htm>.
- Flanagan, W. M., B. Corthesy, et al. (1991). "Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A." Nature **352**(6338): 803-7.
- Folkman, J. (1976). "The vascularization of tumors." Sci Am **234**(5): 58-64, 70-3.
- Folkman, J. and Y. Shing (1992). "Angiogenesis." J Biol Chem **267**(16): 10931-4.
- Fujii, T., Y. Yonemitsu, et al. (2006). "Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(11): 2483-9.

- Fulton, W. F. (1956). "Chronic generalized myocardial ischaemia with advanced coronary artery disease." Br Heart J **18**(3): 341-54.
- Gan, L., R. Doroudi, et al. (2000). "Differential immediate-early gene responses to shear stress and intraluminal pressure in intact human conduit vessels." FEBS Lett **477**(1-2): 89-94.
- Garcia-Rodriguez, C. and A. Rao (1998). "Nuclear factor of activated T cells (NFAT)-dependent transactivation regulated by the coactivators p300/CREB-binding protein (CBP)." J Exp Med **187**(12): 2031-6.
- Garrity, P. A., D. Chen, et al. (1994). "Interleukin-2 transcription is regulated in vivo at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors." Mol Cell Biol **14**(3): 2159-69.
- Gerdes, J., H. Lemke, et al. (1984). "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67." J Immunol **133**(4): 1710-5.
- Gerdes, J., U. Schwab, et al. (1983). "Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation." Int J Cancer **31**(1): 13-20.
- Gonzalez, G. A., K. K. Yamamoto, et al. (1989). "A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence." Nature **337**(6209): 749-52.
- Griffith, T. M. (2004). "Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?" Br J Pharmacol **141**(6): 881-903.
- Grundmann, S., I. Hoefler, et al. (2005). "Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  therapies attenuate adaptive arteriogenesis in the rabbit." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(4): H1497-505.
- Grundmann, S., N. van Royen, et al. (2007). "A new intra-arterial delivery platform for pro-arteriogenic compounds to stimulate collateral artery growth via transforming growth factor-beta1 release." J Am Coll Cardiol **50**(4): 351-8.
- Guler, A. D., H. Lee, et al. (2002). "Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4." J Neurosci **22**(15): 6408-14.
- GV-SOLAS. "Publikationen." from <http://www.gv-solas.de/publ/pub.html>.

- Hai, T. and T. Curran (1991). "Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3720-4.
- Hamawy, A. H., L. Y. Lee, et al. (1999). "Cardiac angiogenesis and gene therapy: a strategy for myocardial revascularization." Curr Opin Cardiol **14**(6): 515-22.
- Hartmannsgruber, V., W. T. Heyken, et al. (2007). "Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression." PLoS ONE **2**(9): e827.
- Hearse, D. J. (2000). "Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction." Cardiovasc Res **45**(1): 213-9.
- Heil, M., I. Eitenmuller, et al. (2006). "Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences." J Cell Mol Med **10**(1): 45-55.
- Heil, M. and W. Schaper (2004). "Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis)." Circ Res **95**(5): 449-58.
- Helisch, A. and W. Schaper (2003). "Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries." Microcirculation **10**(1): 83-97.
- Herzog, S., H. Sager, et al. (2002). "Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(5): H2012-20.
- Hilberg, F., A. Aguzzi, et al. (1993). "c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis." Nature **365**(6442): 179-81.
- Hoefler, I. E., N. van Royen, et al. (2001). "Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit." Cardiovasc Res **49**(3): 609-17.
- Hoefler, I. E., N. van Royen, et al. (2002). "Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis." Circulation **105**(14): 1639-41.
- Hoefler, I. E., N. van Royen, et al. (2004). "Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms." Circ Res **94**(9): 1179-85.
- Hogan, P. G., L. Chen, et al. (2003). "Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT." Genes Dev **17**(18): 2205-32.

- Holtz, J., U. Forstermann, et al. (1984). "Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition." J Cardiovasc Pharmacol **6**(6): 1161-9.
- Hotta, Y. and S. Benzer (1969). "Abnormal electroretinograms in visual mutants of *Drosophila*." Nature **222**(5191): 354-6.
- Inoue, R., L. Hai, et al. (2008). "Pathophysiological implications of transient receptor potential channels in vascular function." Curr Opin Nephrol Hypertens **17**(2): 193-8.
- Inoue, R., L. J. Jensen, et al. (2006). "Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease." Circ Res **99**(2): 119-31.
- Iqbal, J. and M. Zaidi (2005). "Molecular regulation of mechanotransduction." Biochem Biophys Res Commun **328**(3): 751-5.
- Ito, W. D., M. Arras, et al. (1997). "Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion." Am J Physiol **273**(3 Pt 2): H1255-65.
- Ito, W. D., M. Arras, et al. (1997). "Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion." Circ Res **80**(6): 829-37.
- Jalvy, S., M. A. Renault, et al. (2007). "CREB mediates UTP-directed arterial smooth muscle cell migration and expression of the chemotactic protein osteopontin via its interaction with activator protein-1 sites." Circ Res **100**(9): 1292-9.
- Jang, Y. C., S. Arumugam, et al. (1999). "Role of alpha(v) integrins and angiogenesis during wound repair." Wound Repair Regen **7**(5): 375-80.
- Johnson, E. N., Y. M. Lee, et al. (2003). "NFATc1 mediates vascular endothelial growth factor-induced proliferation of human pulmonary valve endothelial cells." J Biol Chem **278**(3): 1686-92.
- Kamiya, A. and T. Togawa (1980). "Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery." Am J Physiol **239**(1): H14-21.
- Karpurapu, M., D. Wang, et al. (2008). "NFATc1 targets cyclin A in the regulation of vascular smooth muscle cell multiplication during restenosis." J Biol Chem **283**(39): 26577-90.

- Katritsis, D., L. Kaiktsis, et al. (2007). "Wall shear stress: theoretical considerations and methods of measurement." Prog Cardiovasc Dis **49**(5): 307-29.
- Kim, I., H. G. Kim, et al. (2000). "Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway." Circ Res **86**(1): 24-9.
- Kimura, H., A. Weisz, et al. (2000). "Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide." Blood **95**(1): 189-97.
- Klein, M., S. Klein-Hessling, et al. (2006). "Specific and redundant roles for NFAT transcription factors in the expression of mast cell-derived cytokines." J Immunol **177**(10): 6667-74.
- Kohler, R., W. T. Heyken, et al. (2006). "Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): 1495-502.
- Kuwahara, K., T. Barrientos, et al. (2005). "Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor." Mol Cell Biol **25**(8): 3173-81.
- Kuwahara, K., Y. Wang, et al. (2006). "TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling." J Clin Invest **116**(12): 3114-26.
- Lan, R. F., Z. X. Liu, et al. (2005). "CD151 promotes neovascularization and improves blood perfusion in a rat hind-limb ischemia model." J Endovasc Ther **12**(4): 469-78.
- Lazarous, D. F., M. Shou, et al. (1996). "Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury." Circulation **94**(5): 1074-82.
- Ledo, F., L. Kremer, et al. (2002). "Ca<sup>2+</sup>-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM." EMBO J **21**(17): 4583-92.
- Liebich, H. (2004). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Schattauer Verlag.
- Liedtke, W. (2006). "Transient receptor potential vanilloid channels functioning in transduction of osmotic stimuli." J Endocrinol **191**(3): 515-23.

- Liedtke, W. (2007). TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades, Taylor & Francis Group.
- Liedtke, W., Y. Choe, et al. (2000). "Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor." Cell **103**(3): 525-35.
- Litvak, J., L. E. Siderides, et al. (1957). "The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion." Am Heart J **53**(4): 505-18.
- Loh, C., J. A. Carew, et al. (1996). "T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1." Mol Cell Biol **16**(7): 3945-54.
- Loh, C., K. T. Shaw, et al. (1996). "Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity." J Biol Chem **271**(18): 10884-91.
- Longland, C. J. (1953). "Collateral circulation in the limb." Postgrad Med J **29**(335): 456-8.
- Loot, A. E., R. Popp, et al. (2008). "Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilatation." Cardiovasc Res **80**(3): 445-52.
- Lower, R. (1669). Tractatus de corde. Item de motu & colore sanguinis et chyli in eum transitu. . London, Impensis J. Allestry.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, et al. (2001). "Partners in transcription: NFAT and AP-1." Oncogene **20**(19): 2476-89.
- Mack, C. A., C. J. Magovern, et al. (1998). "Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion." J Vasc Surg **27**(4): 699-709.
- Marrelli, S. P., G. O'Neil R, et al. (2007). "PLA2 and TRPV4 channels regulate endothelial calcium in cerebral arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(3): H1390-7.

- Marty, A. and E. Neher (1985). "Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells." J Physiol **367**: 117-41.
- Masuyama, R., J. Vriens, et al. (2008). "TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts." Cell Metab **8**(3): 257-65.
- Matsunaga, T., D. C. Warltier, et al. (2000). "Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide." Circulation **102**(25): 3098-103.
- Mellstrom, B. and J. R. Naranjo (2001). "Ca<sup>2+</sup>-dependent transcriptional repression and derepression: DREAM, a direct effector." Semin Cell Dev Biol **12**(1): 59-63.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, et al. (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." Cell **93**(2): 215-28.
- Montell, C. and G. M. Rubin (1989). "Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." Neuron **2**(4): 1313-23.
- Morawietz, H., A. H. Wagner, et al. (2008). "Endothelin receptor B-mediated induction of c-jun and AP-1 in response to shear stress in human endothelial cells." Can J Physiol Pharmacol **86**(8): 499-504.
- Muramatsu, S., M. Wakabayashi, et al. (2007). "Functional gene screening system identified TRPV4 as a regulator of chondrogenic differentiation." J Biol Chem **282**(44): 32158-67.
- Murasawa, S. and T. Asahara (2005). "Endothelial progenitor cells for vasculogenesis." Physiology (Bethesda) **20**: 36-42.
- Naya, F. J., B. Mercer, et al. (2000). "Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo." J Biol Chem **275**(7): 4545-8.
- Nilius, B., G. Droogmans, et al. (2003). "Transient receptor potential channels in endothelium: solving the calcium entry puzzle?" Endothelium **10**(1): 5-15.
- Nilius, B., J. Eggermont, et al. (1996). "Volume-activated Cl<sup>-</sup> channels." Gen Pharmacol **27**(7): 1131-40.

- O'Neil, R. G. and S. Heller (2005). "The mechanosensitive nature of TRPV channels." Pflugers Arch **451**(1): 193-203.
- Park, H. J., K. Chang, et al. (2008). "Coronary collaterals: the role of MCP-1 during the early phase of acute myocardial infarction." Int J Cardiol **130**(3): 409-13.
- Peier, A. M., A. J. Reeve, et al. (2002). "A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes." Science **296**(5575): 2046-9.
- Pelisek, J., A. Fuchs, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor response in porcine coronary and peripheral arteries using nonsurgical occlusion model, local delivery, and liposome-mediated gene transfer." Endothelium **10**(4-5): 247-55.
- Peng, J. B. and M. A. Hediger (2002). "A family of calcium-permeable channels in the kidney: distinct roles in renal calcium handling." Curr Opin Nephrol Hypertens **11**(5): 555-61.
- Pijls, N. H., J. A. van Son, et al. (1993). "Experimental basis of determining maximum coronary, myocardial, and collateral blood flow by pressure measurements for assessing functional stenosis severity before and after percutaneous transluminal coronary angioplasty." Circulation **87**(4): 1354-67.
- Pipp, F., S. Boehm, et al. (2004). "Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(9): 1664-8.
- Polverini, P. J., P. S. Cotran, et al. (1977). "Activated macrophages induce vascular proliferation." Nature **269**(5631): 804-6.
- Rao, A., C. Luo, et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." Annu Rev Immunol **15**: 707-47.
- Reiter, B., R. Kraft, et al. (2006). "TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability." Faseb J **20**(11): 1802-12.
- Ribatti, D., A. Vacca, et al. (2001). "Postnatal vasculogenesis." Mech Dev **100**(2): 157-63.
- Rinne, A., K. Banach, et al. (2009). "Regulation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) in vascular endothelial cells." J Mol Cell Cardiol **47**(3): 400-10.

- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-4.
- Roderick, H. L. and S. J. Cook (2008). "Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival." Nat Rev Cancer **8**(5): 361-75.
- Rohen JW, L.-D. E. (2000). Funktionelle Histologie, Schattauer GmbH.
- Roskamm H, R. H. (1996). "Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie." Heidelberg: Springer-Verlag.
- Savignac, M., B. Mellstrom, et al. (2007). "Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes." Pflugers Arch **454**(4): 523-33.
- Sayed, A., W. Schierling, et al. (2010). "Exercise Linked to Transient Increase in Expression and Activity of Cation Channels in Newly Formed Hind-limb Collaterals." Eur J Vasc Endovasc Surg.
- Schaper, J., R. König, et al. (1976). "The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study." Virchows Arch A Pathol Anat Histol **370**(3): 193-205.
- Schaper, W. Arteriogenesis, Kluwer Publishers, 2004.
- Schaper, W. (2009). "Collateral circulation: past and present." Basic Res Cardiol **104**(1): 5-21.
- Schaper, W. and I. Buschmann (1999). "Arteriogenesis, the good and bad of it." Cardiovasc Res **43**(4): 835-7.
- Schaper, W., M. De Brabander, et al. (1971). "DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog." Circ Res **28**(6): 671-9.
- Schaper, W. and W. D. Ito (1996). "Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth." Circ Res **79**(5): 911-9.
- Schaper, W., A. Jageneau, et al. (1967). "The development of collateral circulation in the pig and dog heart." Cardiologia **51**(6): 321-35.
- Schaper, W. and D. Scholz (2003). "Factors regulating arteriogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1143-51.

- Schierling, W., K. Troidl, et al. (2009). "The Role of Angiogenic Growth Factors in Arteriogenesis." J Vasc Res **46**(4): 365-374.
- Scholz, D., W. Ito, et al. (2000). "Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)." Virchows Arch **436**(3): 257-70.
- Scholz, D., T. Ziegelhoeffer, et al. (2002). "Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice." J Mol Cell Cardiol **34**(7): 775-87.
- Sedgwick, S. G. and S. J. Smerdon (1999). "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework." Trends Biochem Sci **24**(8): 311-6.
- Seiler, C., M. Fleisch, et al. (1998). "Coronary collateral quantitation in patients with coronary artery disease using intravascular flow velocity or pressure measurements." J Am Coll Cardiol **32**(5): 1272-9.
- Seiler, C., T. Pohl, et al. (2001). "Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study." Circulation **104**(17): 2012-7.
- Semenza, G. L. (1999). "Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 551-78.
- Sheng, M., M. A. Thompson, et al. (1991). "CREB: a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases." Science **252**(5011): 1427-30.
- Shyy, Y. J., H. J. Hsieh, et al. (1994). "Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4678-82.
- Strotmann, R., C. Harteneck, et al. (2000). "OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity." Nat Cell Biol **2**(10): 695-702.
- Strotmann, R., G. Schultz, et al. (2003). "Ca<sup>2+</sup>-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a C-terminal calmodulin binding site." J Biol Chem **278**(29): 26541-9.

- Suzuki, M., A. Hirao, et al. (2003). "Microtubule-associated [corrected] protein 7 increases the membrane expression of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)." J Biol Chem **278**(51): 51448-53.
- Suzuki, M., A. Mizuno, et al. (2003). "Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4." J Biol Chem **278**(25): 22664-8.
- Takehita, S., T. Isshiki, et al. (1997). "Microangiographic assessment of collateral vessel formation following direct gene transfer of vascular endothelial growth factor in rats." Cardiovasc Res **35**(3): 547-52.
- Tan, Y., J. Rouse, et al. (1996). "FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2." Embo J **15**(17): 4629-42.
- Thai, T. L. and W. J. Arendshorst (2008). "ADP-ribosyl cyclase and ryanodine receptors mediate endothelin ETA and ETB receptor-induced renal vasoconstriction in vivo." Am J Physiol Renal Physiol **295**(2): F360-8.
- Tian, W., M. Salanova, et al. (2004). "Renal expression of osmotically responsive cation channel TRPV4 is restricted to water-impermeant nephron segments." Am J Physiol Renal Physiol **287**(1): F17-24.
- Toyota, E., T. Matsunaga, et al. (2004). "Myocardial angiogenesis." Mol Cell Biochem **264**(1-2): 35-44.
- Troidl, C., K. Troidl, et al. (2008). "Trpv4 induces collateral vessel growth during regeneration of the arterial circulation." J Cell Mol Med.
- Troidl, K. (2007). Die Rolle des „Actin-binding Rho activating protein“ (Abra) während der Arteriogenese.
- Tsurumi, Y., M. Kearney, et al. (1997). "Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene." Circulation **96**(9 Suppl): II-382-8.
- Unthank, J. L., S. W. Fath, et al. (1996). "Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat." Circ Res **79**(5): 1015-23.
- van Royen, N., I. Hoefler, et al. (2002). "Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation." Faseb J **16**(3): 432-4.

- Vennekens, R., J. G. Hoenderop, et al. (2000). "Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel." J Biol Chem **275**(6): 3963-9.
- Vennekens, R., G. Owsianik, et al. (2008). "Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview." Curr Pharm Des **14**(1): 18-31.
- Vines, H. W. (1921). "The coagulation of the blood: Part I. The role of calcium." J Physiol **55**(1-2): 86-99.
- Voskuil, M., N. van Royen, et al. (2003). "Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(4): H1422-8.
- Wang, Z. Q., C. Ovitt, et al. (1992). "Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos." Nature **360**(6406): 741-5.
- Watanabe, H., J. B. Davis, et al. (2002). "Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives." J Biol Chem **277**(16): 13569-77.
- Watanabe, H., M. Murakami, et al. (2008). "TRP channel and cardiovascular disease." Pharmacol Ther **118**(3): 337-51.
- Watanabe, H., J. Vriens, et al. (2003). "Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels." Nature **424**(6947): 434-8.
- Whitmarsh, A. J. and R. J. Davis (1996). "Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways." J Mol Med **74**(10): 589-607.
- WHO (2004). "The World Health Report 2004."
- WHO. (2005). from [http://www.who.int/topics/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/en/).
- Wissenbach, U., M. Boddling, et al. (2000). "Trp12, a novel Trp related protein from kidney." FEBS Lett **485**(2-3): 127-34.
- Witzenbichler, B., P. C. Maisonpierre, et al. (1998). "Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2." J Biol Chem **273**(29): 18514-21.

- Won, D., S. N. Zhu, et al. (2007). "Relative reduction of endothelial nitric-oxide synthase expression and transcription in atherosclerosis-prone regions of the mouse aorta and in an in vitro model of disturbed flow." Am J Pathol **171**(5): 1691-704.
- Wu, L., X. Gao, et al. (2007). "Dual role of the TRPV4 channel as a sensor of flow and osmolality in renal epithelial cells." Am J Physiol Renal Physiol **293**(5): F1699-713.
- Xing, J., D. D. Ginty, et al. (1996). "Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase." Science **273**(5277): 959-63.
- Xu, H., I. S. Ramsey, et al. (2002). "TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel." Nature **418**(6894): 181-6.
- Xue, J., P. B. Thippogowda, et al. (2009). "NF-kappaB regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in cooperation with NFAT by binding to the intronic NF-kappaB site in the ICAM-1 gene." Physiol Genomics **38**(1): 42-53.
- Yaghi, A. and S. M. Sims (2005). "Constrictor-induced translocation of NFAT3 in human and rat pulmonary artery smooth muscle." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **289**(6): L1061-74.
- Zakrzewicz, A., T. W. Secomb, et al. (2002). "Angioadaptation: keeping the vascular system in shape." News Physiol Sci **17**: 197-201.
- Zarins, C. K., M. A. Zatina, et al. (1987). "Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis." J Vasc Surg **5**(3): 413-20.
- Zbinden, R., S. Zbinden, et al. (2007). "Coronary collateral flow in response to endurance exercise training." Eur J Cardiovasc Prev Rehabil **14**(2): 250-7.
- Zhang, Y., Y. H. Wang, et al. (2008). "A transient receptor potential vanilloid 4 contributes to mechanical allodynia following chronic compression of dorsal root ganglion in rats." Neurosci Lett **432**(3): 222-7.
- Zhou, L., A. Tan, et al. (2003). "Ras and mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1 coregulate activator protein-1- and nuclear factor-kappaB-mediated gene expression in airway epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(6): 762-9.

## 9 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: MECHANISMEN DES GEFÄßWACHSTUMS NACH CARMELIET. ....	4
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER ENTSTEHENDEN KOLLATERALE .....	8
ABBILDUNG 3: DICKWANDIGE ARTERIE MIT AUSGEPRÄGTER TUNICA MEDIA. ....	10
ABBILDUNG 4: POSTMORTEM ANGIOGRAPHIEN VON RATTEN-HINTERGLIEDMAßEN. ....	14
ABBILDUNG 5: VEREINFACHTE STRUKTUR DES TRPV4-KANALS. ....	17
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ROLLE VON TRPV4 IM ENDOTHEL.....	21
ABBILDUNG 7: AUFBAU EINER OSMOTISCHEN MINIPUMPE. ....	31
ABBILDUNG 8: SCHWEIN AUF DEM OPERATIONSTISCH MIT DEN INZISIONSSTELLEN.....	34
ABBILDUNG 9: OPERATIONSFELD. ....	34
ABBILDUNG 10: AV-SHUNT DIREKT NACH OPERATION .....	35
ABBILDUNG 11: SCHEMA DES GEFÄßSYSTEMS DER HINTEREN LINKEN GLIEDMAÙE AN TAG 7 (LIGATUR) .....	36
ABBILDUNG 12: SCHEMA DES GEFÄßSYSTEMS DER HINTEREN LINKEN GLIEDMAÙE AN TAG 7 (SHUNT). ....	37
ABBILDUNG 13: UNTERSCHIEDLICHE VERFAHREN DER IMMUNHISTOCHEMIE.....	40
ABBILDUNG 14: CFI. ....	52
ABBILDUNG 15: DARSTELLUNG DES KOLLATERALGEBIETES WÄHREND DER ERSTEN OPERATION. ....	53
ABBILDUNG 16: ANGIOGRAPHIEN DES KOLLATERALGEBIETES WÄHREND DER ZWEITEN OPERATION.. ....	54
ABBILDUNG 17: IHC MIT ANTI-KI67 (ROT) UND ANTI-ASMA (GRÜN) .....	56
ABBILDUNG 18: ANTEIL KI67-POSITIVER KERNE AN DER GESAMZAHL DER ZELLKERNE.....	57
ABBILDUNG 19: IHC MIT ANTI-ASMA (GRÜN) UND DRAQ5 (BLAU).....	58
ABBILDUNG 20: ZÄHLUNG DER ARTERIOLEN PRO MM <sup>2</sup> .....	59
ABBILDUNG 21: MÖGLICHE DEM TRPV4 NACHGESCHALTETE SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE .....	60
ABBILDUNG 22: LOKALISATION VON TRPV4 IN DER GEFÄßWAND.....	62
ABBILDUNG 23: QRT-PCR VON TRPV4. ....	63
ABBILDUNG 24: QRT-PCR VON DREAM. ....	64
ABBILDUNG 25: WESTERN BLOT MIT EINEM DREAM-ANTIKÖRPER.....	65
ABBILDUNG 26: QUANTITATIVE AUSWERTUNG DES WESTERN BLOTS VON DREAM.....	65
ABBILDUNG 27: QRT-PCR VON NFATC1.....	66
ABBILDUNG 28: IHC MIT ANTI-NFATC1 (ROT) UND ANTI-ASMA (GRÜN). ....	67
ABBILDUNG 29: VERGRÖßERTE AUSSCHNITTE DER EINZELNEN BILDER AUS ABBILDUNG 28.....	68
ABBILDUNG 30: QRT-PCR VON VEGFA.....	69
ABBILDUNG 31: QRT-PCR VON CALCINEURIN.....	70
ABBILDUNG 32: QRT-PCR VON CREB1. ....	71
ABBILDUNG 33: IHC MIT ANTI-CREB1 (ROT) UND ANTI-ASMA (GRÜN).....	72
ABBILDUNG 34: QRT-PCR VON C-JUN. ....	73
ABBILDUNG 35: IHC MIT ANTI-JUN (GRÜN) UND ANTI-ASMA (ROT). ....	74
ABBILDUNG 36: QRT-PCR VON C-FOS. ....	75
ABBILDUNG 37: QRT-PCR VON ABRA. ....	76

---

ABBILDUNG 38: QRT-PCR VON ICAM-1.....	77
ABBILDUNG 39: QRT-PCR VON VCAM-1. ....	78
ABBILDUNG 40: QRT-PCR VON TNFA. ....	79
ABBILDUNG 41: A: IHC MIT ANTI-TRPV4 (GRÜN) UND ANTI-CD31 (ROT).....	89
ABBILDUNG 42: SCHEMA DES SIGNALTRANSDUKTIONSWEGES VON TRPV4. ....	91

## 10 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN ANGIOGENESE UND ARTERIOGENESE.....	9
TABELLE 2: GRUPPENEINTEILUNG DER SCHWEINE.....	29
TABELLE 3: FÄRBEPROTOKOLL FÜR HE-FÄRBUNG.....	39
TABELLE 4: FÄRBEPROTOKOLL FÜR TRPV4, NFATC1, CREB1, C-JUN UND ASMA.....	41
TABELLE 5: FÄRBEPROTOKOLL FÜR KI67.....	42

## 11 Anhang

### 11.1 Operationszubehör

#### 11.1.1 Medikamente und Chemikalien

Medikament	Hersteller
4αPDD	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Acetylsalicylsäure (ASS-ratiopharm® 100mg TAH)	Ratiopharm, Ulm, D
Adenosin (Adrekar®)	Sanofi Aventis, Frankfurt a.M., D
Atropinsulfat	B.Braun AG, Melsungen, D
Azaperon (Stresnil®)	Janssen-Cilag, Neuss, D
Cefquinom (Cobactan® 2,5%)	Intervet GmbH, Unterschleißheim, D
Cephazolin 2g	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Clopidogrel (Plavix® 75mg)	Sanofi Aventis, Frankfurt a.M., D
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Fentanyl (Durogesic® 25µg/h transdermales Pflaster)	Janssen-Cilag, Neuss, D
Heparin-Natrium (Liquemin® N 25000)	Hoffman-La Roche AG, Grenzach- Wyhlen, D
Iomeprol (Imeron® 350)	Bracco ALTANA Pharma, Konstanz, D
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	B.Braun AG, Melsungen, D
Kaliumchlorid (1M-KCl-Lösung)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10%)	Medistar GmbH, Holzwickede, D
Midazolam	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, D
Pancuroniumbromid (Pancuronium duplex®)	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, D
Piritramid (Dipidolor®)	Janssen-Cilag, Neuss, D
Propofol 2%	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Thiopental-Natrium (Trapanal® 2,5g)	Altana Pharma GmbH, Konstanz, D

### 11.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav V-65	Systec, Wettenberg, D
C-Bogen (Siremobil Compact)	Siemens, München, D
elektrische Druckwandler (RT 2000)	BD Medical, Heidelberg, D
Elektrokauter Aaron 1250™	Bovie Medical Corp., St. Petersburg, NL
Kapnograph mit Pulsoximeter (Capnox)	Medlab GmbH, Karlsruhe, D
Monitoring-System (Siemens Sirecust 1281)	Siemens, München, D
Oxylog 3000	Dräger Medical GmbH, Lübeck, D
Perfusor („GENIE“ Syringe Pump)	Ken Scientific Corp., Connecticut, USA

### 11.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
3-Wege-Hahn (Discofix®)	B.Braun AG, Melsungen, D
5F- und 7F-Schleuse	Cordis Corporation, Miami, USA
7F-Swan-Ganz-Thermodilutionskatheter	Edwards Lifesciences, Irvine, USA
arterieller Katheter (Arterial Line Kit)	Argon Medical Devices, Texas, USA
Führungsdraht	Smiths Medical GmbH, Kirchseeon, D
Hautdesinfizienz (Cutasept® G)	Bode Chemie, Hamburg, D
HME-Beatmungsfilter (Medisize® Hygrovent S)	Medisize, Hillegom, NL
Katheter 5F	Cordis Corporation, Miami, USA
Nahtmaterial (Prolene 2-0, 4-0, 7-0; Vinyl 2-0)	Ethicon GmbH, Norderstedt, D
osmotische Minipumpe (ALZET® 2ML1)	ALZET® osmotic pumps Company, Cupertino, USA
Trachealtubus mit Cuff (Gr. 6,5-7,5)	Rüsch GmbH, Kernen, D
Venenverweilkatheter (Vasofix®)	B.Braun AG, Melsungen, D

## 11.2 Laborzubehör

### 11.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
CCD imager (Appendix D ChemiDoc XRS)	Bio-Rad, München, D
Digitalkamera Leica DFC 300 FX	Leica Microsystems GmbH, Bensheim, D
Elektrophoretetransferkammer	Bio-Rad, München, D
Elektrophoresezelle (MimCell <sup>®</sup> )	Invitrogen, Groningen, NL
ELISA-Reader Sunrise <sup>™</sup>	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
Gefriermikrotom Kryostat CM 3050 S	Leica Microsystems GmbH, Bensheim, D
Konfokales Laser Scanning-Mikroskop TCS SP	Leica Microsystems GmbH, Bensheim, D
Kugel-Schwingmühle (Mixer Mill)	Retsch, Haan, D
Lichtmikroskop mit Fluoreszenzvorrichtung DM-RB	Leica Microsystems GmbH, Bensheim, D
Magnetrührer IKAMAG <sup>®</sup> RH	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Nano Drop	peqLab, Erlangen, D
pH-Meter inoLab pH 720	WTW GmbH, Weilheim, D
Sterilbank, Microflow	Nunc, Wiesbaden, D
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, D
Waage	Sartorius, Göttingen, D
Wärmeschrank UM 500	Memmert GmbH, Schwabach, D
Wasserbad	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Zentrifuge Sorvall <sup>®</sup> RC-5B	Kendro, Hamburg, D

### 11.2.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
2%ige 3-Aminopropyltriethoxysilane	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
20x Transferpuffer	Invitrogen, Groningen, NL
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
DAPI	Invitrogen, Groningen, NL
Draq5	Axxora Deutschland, Lörrach, D
Eindeckmedium (Entellan <sup>®</sup> )	Merck, Darmstadt, D
Eindeckmedium (Mowiol 4-88 <sup>®</sup> )	Roth, Karlsruhe, D
Eosin 2%	Waldeck GmbH, Münster, D
Ethanol >99,8%, DAB, reinst Ethylalkohol	Roth, Karlsruhe, D
Extran	Merck, Darmstadt, D
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, D
Hämalaun nach Mayer	Waldeck GmbH, Münster, D
HCl	Merck, Darmstadt, D
IQ SYBR Green Supermix	BioRad, München, D
KCl	Merck, Darmstadt, D
Ladepuffer (LDS sample buffer)	Invitrogen, Groningen, NL
Lowry Protein-Assay (bestehend aus Reagenz A (alkalische Kupfertartratlösung), Reagenz B (verdünntes Folin-Reagenz) und Reagenz S	Bio-Rad, München, D
Magermilchpulver	BioRad, München, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt, D
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (bestehend aus CER I, CER II und NER)	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PonceauS Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Protein-Marker (Precision Plus <sup>®</sup> )	Bio-Rad, München, D
Proteinase K (20 mg/ml)	Roth, Karlsruhe, D
Rindergelatine, gemahlen	Merck, Darmstadt, D
RNeasy minikit <sup>®</sup> (bestehend aus RLT-, RW1-, RLP-Puffer und Spin-Säulen)	Qiagen GmbH, Hilden, D
Roche complete	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
Streptaktin-HRP Konjugat	Bio-Rad, München, D
Superscript II Reverse Transcriptase (bestehend aus SuperScriptII RT, 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ) und 0.1 M DTT	Invitrogen, Groningen, NL
Tissue Tek	OTC Compound, Miles Inc, USA
Tris-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Turbo DNasefree <sup>®</sup> (bestehend aus TURBO DNase Puffer, TURBO DNase und DNase Inaktivierungsreagenz)	Ambion, Austin, USA
TWEEN 20	Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D
Zitronensäure	Fluka BioChemika, Buchs, CH
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

### 11.2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
100 W Quecksilberdampflampe	Osram, München, D
4-12% SDS-Gele (NuPage <sup>®</sup> )	Invitrogen, Groningen, NL
96Well PCR-Platten	Biorad, München, D
Aluminiumhalterungen	eigene Herstellung
Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Filterpapier (Whatman <sup>®</sup> )	Invitrogen, Groningen, NL
Nitrozellulosemembran	Invitrogen, Groningen, NL
Objektträger, Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Optical Sealing Tape für PCR-Platten	Biorad, München, D
Petrischalen	BD Biosciences, Heidelberg, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
ZK 24-Well Platten	BD Biosciences, Heidelberg, D

## 11.3 Antikörper

### 11.3.1 Primärantikörper für Immunhistochemie

Verwendete	Klon	Wirt	Hersteller	Konz.
<b>Primärantikörper</b>				
TRPV4	Q9ERZ8	Kaninchen	Alomone Labs, Jerusalem, IL	1 : 100
Ki67	MIB1	Maus	Dako, Glostrup, DK	1 : 20
NFATc1	K-18	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1 : 50
C-JUN / AP1 (Ab-1)	polyklonal	Kaninchen	Merck, Darmstadt, D	1 : 20
CREB1	48H2	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D	1 : 400
CD31	monoklonal	Maus	Antigenix, New York, USA	1 : 100

$\alpha$ SM-Actin-Cy3	1A4	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D	1 : 300
$\alpha$ SM-Actin-FITC	1A4	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D	1 : 100

### 11.3.2 Sekundärantikörper für Immunhistochemie

verwendete Sekundärantikörper	Hersteller	Konz.
Biotin-SP-conjugated Anti-Rabbit IgG	Dianova, Hamburg, D	1:100
cy3-conjugated Anti-Rabbit IgG	Milipore, Billerica, MA, USA	1:300
cy3-conjugated Anti-Mouse IgG	Milipore, Billerica, MA, USA	1:300

### 11.3.3 Detektionssystem für biotinylierte Sekundärantikörper (Immunhistochemie)

Name	Emissionsfarbe	Hersteller	Konz.
cy2-conjugated Streptavidin	Grün	Rockland, Gilbertsville, PA, USA	1:100
cy3-conjugated Streptavidin	Rot	Rockland, Gilbertsville, PA, USA	1:300

### 11.3.4 Primärantikörper für Western Blot

Verwendete Primärantikörper	Klon	Wirt	Hersteller	Konz.
NFATc1	K-18	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:200
cSen / Dream	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge, MA, USA	1:500

### 11.3.5 Sekundärantikörper für Western Blot

Verwendete Sekundärantikörper	Wirt	Hersteller	Konz.
ECL anti-rabbit IgG HRP-gekoppelt	Affe	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK	1:2000

### 11.4 Verwendete Primer-Oligonukleotide

Primer		Sequenz	annealing-Temp.
TRPV4	sense	5'-ACGAGATGCTGGCCGTGGAA-3'	65°C
	antisense	5'-AGGCTGGTAGTAACGGTGA-3'	
ABRA	sense	5'-AGAAGACAGCGGCTACGGAG-3'	58-60°C
	antisense	5'-TGTATTTCCGCTGGGCTTTGCA-3'	
NFATc1	sense	5'-GAATTCCTTGGTGGTTCGAGA-3'	58-60°C
	antisense	5'-TGCTGGTACTGGCTCCTCTT-3'	
Dream	sense	5'-TCAAGTGGATCCTGTCCAG-3'	58-60°C
	antisense	5'-CTGCAGCTCCTTCTTGGTGAA-3'	
Calcineurin	sense	5'-GAATCCAACGTGCAAGAGGT-3'	58-60°C
	antisense	5'-CGTTCACGGTAACGAACCTT-3'	
c-fos	sense	5'-AGAATCCGAAGGGAAAGGAA-3'	58-60°C
	antisense	5'-CTTCTCCTTCAGCAGGTTGG-3'	
CREB1	sense	5'-TTCAAGCTGCCTCTGGAGAT-3'	60°C
	antisense	5'-GTGCTGCTTCCCTGTTCTTC-3'	
VEGF $\alpha$	sense	5'-CCTTGCCTTGCTGCTCTACC-3'	54,5°C
	antisense	5'-CGTCCATGAACTTCACCACTTC-3'	
ICAM-1	sense	5'-AGCTGTGGTGACTGAACG-3'	60°C
	antisense	5'-CACCTGGGTCTGGTTCTTGT-3'	
TNF $\alpha$	sense	5'-CCCTTGAGCATCAACCCTCTGG-3'	60°C
	antisense	5'-TGGAGCTGTCCCTCGGCTTTGAC-3'	
C-JUN	sense	5'-CCCAAGATCCTGAAGCAGAG-3'	58-60°C
	antisense	5'-GATGTGCCCGTTACTGGACT-3'	

## **11.5 Herstellung von Puffern**

### **11.5.1 Herstellung des Gelatine-Kontrastmittels**

Zur Herstellung des Kontrastmittels wurden zunächst 80 g gemahlene Rindergelatine langsam in 200 ml kaltes Aqua dest. eingerührt. Nach Erhitzen des Gemisches auf 80°C in der Mikrowelle wurde so lange weitergerührt, bis die Gelatine sich vollständig gelöst hatte. Zur Färbung der Lösung wurde nun etwa eine Spatelspitze Bromphenolblau eingerührt, bis sich das Kontrastmittel dunkelblau verfärbte. Bis zur Verwendung wurde es bei 4°C aufbewahrt und unmittelbar vor Gebrauch auf 40°C erwärmt.

### **11.5.2 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)**

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 397,4 g NaCl, 10 g KCl, 10 g H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sowie 88,75 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O mit Aqua dest. auf ein Volumen von 5 l aufgefüllt. Für die Gebrauchslösung wurden 500 ml des Stocks 10fach mit Aqua dest. (ad 5 l) verdünnt und anschließend vorsichtig mit Hilfe einmolarer HCl auf pH 7,4 eingestellt.

### **11.5.3 Mowiol 4-88**

Für die Herstellung des gebrauchsfähigen Eindeckmediums wurden zunächst 50 g des schwer löslichen Mowiol 4-88 mit 200 ml PBS (pH 8,0) vermischt und 16 h gerührt. An die anschließende Zugabe von 25ml wasserfreien Glycins schloss sich abermals eine 16-stündige Rührperiode an. Schließlich wurde das Gemisch bei 12000 rpm 15 min lang zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei 4°C gelagert.

### **11.5.4 4%ige Formaldehydlösung**

Für die 4%ige Formaldehydlösung wurden 40 g Paraformaldehyd in 1 l PBS gelöst und mit Hilfe von Natriumhydroxid-Plätzchen auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Gebrauchslösung in 50 ml Falcons eingefroren und jeweils kurz vor Gebrauch aufgetaut.

### **11.5.5 Zitratpuffer**

Zur Herstellung des Zitratpuffers wurden 2,1 g Zitronensäure mit 1 l Aqua dest. verrührt und mit Hilfe von NaOH-Plätzchen oder einmolarer NaOH-Lösung auf pH 6,0 eingestellt.

### **11.5.6 TBST-Puffer**

Für die Herstellung der 10x TBS-Stocklösung wurden 48,4 g Tris-Base und 160 g NaCl mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt und darin gelöst. Mit Hilfe konzentrierter HCl-Lösung wurde der pH-Wert am pH-Meter auf 7,6 eingestellt. Zum Ansetzen der Gebrauchslösung wurden 100 ml des Stocks mit 900 ml Aqua dest. und 1 ml TWEEN 20 vermischt.

### **11.5.7 Transferpuffer**

Für die Gebrauchslösung des Transferpuffers wurden 50 ml des 20x Transferpuffers mit 200 ml Methanol und 750 ml Aqua dest. verdünnt.

## 12 Eigene Veröffentlichungen

1. **Troidl C, Nef H, Voss S, Schilp A, Kostin S, Troidl K, Szardien S, Rolf A, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Hamm CW, Elsässer A, Möllmann H.** Calcium-dependent signalling is essential during collateral growth in the pig hind limb-ischemia model. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jul;49(1):142-51.

### Abstracts

1. **Troidl C, Möllmann H, Nef H, Voss S, Schilp A, Troidl K, Hamm C, Elsässer A.** Activation of TRPV4 triggers collateral growth in the pig hind limb ischemia model. *Eur Heart J* 2008, Suppl 1: P1487
2. **Troidl C, Möllmann H, Nef H, Voss S, Schilp A, Kostin S, Troidl K, Hamm C, Elsässer A.** Tool drug induced activation of transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 triggers collateral growth after femoral artery ligation in pigs. *Circulation* 2008: 118 (18), 448-448, Suppl 2

## 13 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Anna-Sophia Schilp

## 14 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Kerckhoffklinik Bad Nauheim, Arbeitsgruppe Experimentelle Kardiologie, angefertigt. Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Albrecht Elsässer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Reiner danke ich sehr herzlich für die Bereitschaft, die Dissertation von Seiten des Fachbereichs Veterinärmedizin der Universität Gießen zu betreuen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Helge Möllmann und PD Dr. Holger Nef für die Gelegenheit, in dieser Arbeitsgruppe wissenschaftliches Arbeiten kennenlernen zu dürfen, für ihre Unterstützung (insbesondere dir, Holger, für viele Male Korrekturlesen) und ihren Enthusiasmus, mit dem sie die Forschung unserer Gruppe vorantreiben.

Ganz herzlich möchte ich mich bei unserem Laborleiter Dr. Christian Troidl für die intensive und herzliche Betreuung meiner Doktorarbeit, unermüdliches Korrekturlesen und die immerzu vorhandene Bereitschaft zur Diskussion bedanken.

Frau Dr. Sandra Voss danke ich für die engagierte Planung und geduldige Anleitung bei den Operationen der Schweine.

Bei Prof. Dr. Schmitz-Rixen möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung und die Einführung in die Geheimnisse der AV-Shunt-Operationen bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Monika Rieschel, Sigrun Sass, Annette Hasper und Anett Kirchhof für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit und den Schweineversuchen sowie die nette gemeinsame Zeit in und außerhalb des Labors bedanken.

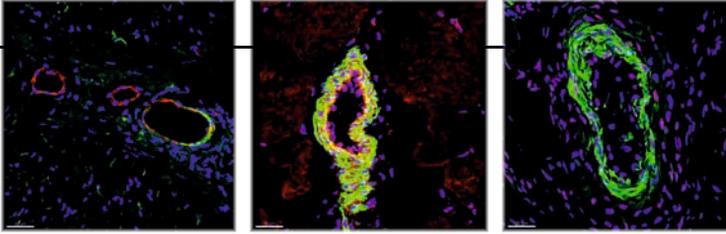
Bei allen Doktoranden bedanke ich mich ganz herzlich für die Unterstützung bei zahlreichen Schweineversuchen und für die netten Kaffeepausen.

Dem ganzen Team im Sprudelhof danke ich für viele Ratschläge auf dem Gebiet der Immunhistochemie. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei unserer „Histo-Fee“ Brigitte Matzke, nicht nur für die unentwegte Hilfe am konfokalen Lasermikroskop, sondern auch für viele nette Gespräche und fachliche wie seelische Unterstützung. Auch Dr. Kerstin Troidl und Uta Eule sei für viele gute Ratschläge und Hilfestellungen ganz herzlich gedankt.

Kurt Steinhauer danke ich ganz herzlich für die tolle Betreuung der Versuchsschweine.

All meinen Freunden danke ich für die schöne Studienzeit, die Unterstützung bei meiner Promotion und dass sie mir zu jeder Tages- und Nachtzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich mit viel Liebe, Stolz und Engagement nicht nur durch Schule und Studium sondern auch durch die Zeit der Promotion begleitet haben.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5876-0



9 78 3 8359 5876 0