

Proteinexpression und die Rolle der Matrixmetalloproteinasen bei der Kollateralgefäßentwicklung am Herzen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Vorgelegt von Seied Abdollah Afsah-Hedjri
aus Teheran / Iran

Giessen

2001

Aus dem Max-Planck-Institut
für Physiologische und Klinische Forschung
Kerkhoff-Institut
Abteilung Experimentelle Kardiologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper
In Bad Nauheim

Gutachter: Prof. Dr. Dr. h. c. J. Schaper
Gutachter: Prof. Dr. K. Preissner

Tag der Disputation: 12. Juli 2002

für Farzaneh, meine Eltern, Ebrahim und Esmail

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1. <i>Tiermodell</i>	<i>3</i>
2.2. <i>Gewebeentnahme und -bearbeitung</i>	<i>4</i>
2.2.1. <i>Aufblocken.....</i>	<i>5</i>
2.2.2. <i>Mikrotomie</i>	<i>5</i>
2.3. <i>Histologie.....</i>	<i>6</i>
2.3.1. <i>Toluidinfärbung</i>	<i>6</i>
2.3.2. <i>HE-Färbung</i>	<i>6</i>
2.4. <i>Immunhistochemie.....</i>	<i>6</i>
2.4.1. <i>Allgemeines Protokoll.....</i>	<i>7</i>
2.4.2. <i>Fixierung</i>	<i>8</i>
2.4.3. <i>Unspezifische Bindungen</i>	<i>8</i>
2.4.4. <i>Erster Antikörper</i>	<i>8</i>
2.4.5. <i>Zweiter Antikörper</i>	<i>8</i>
2.4.6. <i>Fluorochrom</i>	<i>10</i>
2.4.7. <i>Kernfärbung.....</i>	<i>10</i>
2.5. <i>Eindeckeln</i>	<i>10</i>
2.6. <i>Kontrollen.....</i>	<i>10</i>
2.7. <i>Dokumentation.....</i>	<i>10</i>
2.7.1. <i>Mikroskopie</i>	<i>10</i>
2.7.1.1. <i>Konfokale Mikroskopie.....</i>	<i>11</i>
2.7.2. <i>Fluoreszenzmikroskopie.....</i>	<i>13</i>
2.7.3. <i>Fotografie</i>	<i>14</i>
2.7.4. <i>Bildverarbeitung.....</i>	<i>14</i>
2.7.5. <i>Auswertung.....</i>	<i>16</i>
2.7.5.1. <i>Helligkeitsmessung.....</i>	<i>16</i>
2.7.5.2. <i>Statistische Auswertung</i>	<i>19</i>

3.	Ergebnisse.....	20
3.1.	<i>Normale Gefäßmorphologie</i>	<i>20</i>
3.2.	<i>Struktur wachsender Kollateralgefäße.....</i>	<i>21</i>
3.2.1.	Neointima.....	21
3.3.	<i>Auswahl und Einteilung der Präparate</i>	<i>21</i>
3.4.	<i>Proteine.....</i>	<i>23</i>
3.4.1.	Intrazelluläre Proteine	23
3.4.1.1.	Kontraktile Proteine	23
3.4.1.1.1.	alpha-smooth muscle Aktin.....	23
3.4.1.1.2.	Calponin	25
3.4.1.2.	Zytosklettäre Proteine	27
3.4.1.2.1.	Desmin	27
3.4.2.	Extrazelluläre Matrixproteine	29
3.4.2.1.	Laminin	29
3.4.2.2.	Fibronectin	31
3.4.3.	Proliferationsmarkierung.....	33
3.4.3.1.	Ki-67	33
3.4.4.	Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren	33
3.4.4.1.	MMP-2, MMP-3 und MMP-9.....	35
3.4.4.2.	Tissue Inhibitor of MMPs (TIMP-1).....	36

4.	Diskussion.....	41
5.	Zusammenfassung.....	59
6.	Literatur.....	61
7.	Rezepte und Abkürzungen.....	78
7.1.	<i>MMP-2, -3, -9.....</i>	78
7.2.	<i>TIMP-1</i>	79
7.3.	<i>HE-Färbung</i>	80
7.4.	<i>Ki-67</i>	81
7.5.	<i>Citronensäuremonohydrat (Citratpuffer).....</i>	82
7.6.	<i>Desmin, Calponin</i>	82
7.7.	<i>Laminin.....</i>	83
7.8.	<i>Fibronectin</i>	84
7.9.	<i>alpha-smooth muscle Aktin</i>	85
7.10.	<i>Serumalbumin vom Rind (= BSA), 5%</i>	86
7.11.	<i>Beschichtung der Objektträger</i>	86
7.12.	<i>Abkürzungen</i>	87
8.	Danksagung	88
9.	Lebenslauf.....	90

1. Einleitung

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) ist eine weitverbreitete Volkskrankheit, die in den Industrieländern die häufigste Todesursache darstellt. Sie wird durch die Arteriosklerose, die zur Stenose oder gar zum Verschluss der Koronararterien mit der Folge des Angina pectoris (Stenokardie) führt, ausgelöst. Bleibt dieser Zustand bei unveränderter Belastung des Herzens bestehen, kann in seiner Folge ein Herzinfarkt entstehen.

Es fiel jedoch auf, dass nicht alle Patienten mit Arteriosklerose zwangsweise Angina pectoris oder gar einen Herzinfarkt erlitten. Man beobachtete, dass diese Patienten präexistente Kollateralgefäße besaßen, die sich der O₂-Mangelsituation des Myokards durch Wachstum angepasst haben.

Die Ausbildung und das Vorhandensein dieser kollateralen Gefäße ist für die Absicherung ischämiegefährdeter Gewebsareale überlebenswichtig, da die Infarzierung den frühzeitigen Zelluntergang und damit den Gewebstod bedeuten würde.

Kollateralen am Herzen sind definiert als Anastomosen zwischen den drei Hauptästen des Koronarsystems (interkoronare Kollateralen) oder zwischen einzelnen Ästen eines Hauptastes (intrakoronare Kollateralen). Kommt es nun zu einer allmählichen Stenose der Herzkranzgefäße mit einer resultierenden Insuffizienz im distalen Gewebsabschnitt, bilden sich aus präexistenten kapillären Gefäßverbindungen die lebensnotwendigen Kollateralgefäße, durch die die „Area of risk“ dennoch versorgt werden kann ¹.

Schon 1881 befaßten sich *Cohnheim* und von *Schultheiss-Rechberg* mit den Koronararterien und definierten sie als physiologische Endarterien. Auch konnten sie sich die Existenz von Anastomosen zwischen den Koronargefäßen vorstellen, wiesen ihnen jedoch keine besondere Bedeutung zu.

Ihnen folgten einige Wissenschaftler, die versuchten eine Bedeutung und Funktion im Vorhandensein dieser Anastomosen zu ergründen.

Die grundlegenden Arbeiten von *Fulton* (1965) bedeuten den Beginn einer wissenschaftlichen Bearbeitung der Pathophysiologie des Koronarkreislaufs. Er wies nach, dass sowohl physiologisch, als auch pathologisch veränderte menschliche Koronargefäße durch Kollateralen miteinander verbunden waren und dass diese bei Bedarf, bei Unterperfusion eines Myokardareals, sich stark ausdehnen können ².

Schaper et al. konnten zeigen, dass das Wachstum von Kollateralgefäßen mit dem Vorhandensein präexistenter kleiner Arterien einhergeht, und dass typische

Veränderungen, wie Ruptur der Lamina elastica interna und das Auftreten einer Neointima, typische Veränderungen beim Gefäßwachstum darstellen^{1,3-5}. Während des Kollateralgefäßwachstums ist die Balance zwischen Synthese und Degradation der extrazellulären Matrix in der Gefäßwand für den Remodelingprozess essentiell notwendig⁶.

Aufbauend auf diesen Arbeiten sollten in der vorliegenden Arbeit Umbauvorgänge in der Gefäßwand bei der Bildung kollateraler Koronargefäße zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht werden.

Es interessierten jedoch nicht nur die morphologischen Veränderungen, sondern auch die Expression verschiedener, für das „*Vascular remodeling*“ wichtigen Proteine, wie Laminin, Fibronectin, alpha-smooth muscle Aktin, Calponin oder Desmin. Des weiteren interessierten in diesem Zusammenhang besonders die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) MMP-2, MMP-3 und MMP-9 und ihr entsprechender Inhibitor TIMP-1.

Es sollte untersucht werden, inwieweit die Proteine in einem quantitativen Gleichgewicht stehen und welchen Unterschied sie in ihrer Expression im Zeitverlauf der Kollateralentwicklung aufzeigen.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Methode zu entwickeln, mit der man die Fluoreszenz der immunhistochemisch bearbeiteten Präparate quantitativ bestimmen konnte.

Im weiteren sollten die quantitativ bestimmten Veränderungen der Proteinexpression, beobachtet bei Wachstum von Kollateralgefäßen, ausgewertet und im pathophysiologischen Zusammenhang interpretiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermodell

Fünf Mischlingshunde mit einem Gewicht von 18-20 kg wurden am „National Institute Institute of Cardiology“, in Budapest unter der Anleitung und Aufsicht von Frau Dr. Sofie Koltai operiert.

Die Tierhaltung und die Durchführung der Experimente orientierten sich an den Richtlinien der „American Physiological Society“ und an den „Guide for care and use of laboratory animals“.

Die Hunde wurden mit Nembutal prämediziert und mit Pentobarbital narkotisiert. Pentobarbital wurde in einer Dosierung von 138 mmol/Kg Körpergewicht verabreicht. Eine künstliche Beatmung während der Operation war erforderlich.

Unter sterilen Bedingungen wurde eine mediane Sternotomie des Thorax durchgeführt. Das Perikard wurde sorgfältig eröffnet. Nun wurde der Ramus circumflexus (RCX) der Arteria coronaria sinistra aufgesucht und freipräpariert, um den Ameroidkonstriktor um die freigelegte Arterie zu legen.

Der Konstriktor (Abb. 1) besteht aus einem geschlitzten Metallring, der mit hygroskopischem Material gefüllt ist. Dieses Material hat die Eigenschaft, Gewebsflüssigkeit aufzusaugen und so zu einer Verringerung des Ringquerschnittlumens, in dem das Gefäß eingebettet liegt, zu führen.

Die Einengung des Gefäßquerschnittes resultiert in Stenose und Okklusion, die zur Mangelperfusion führt.

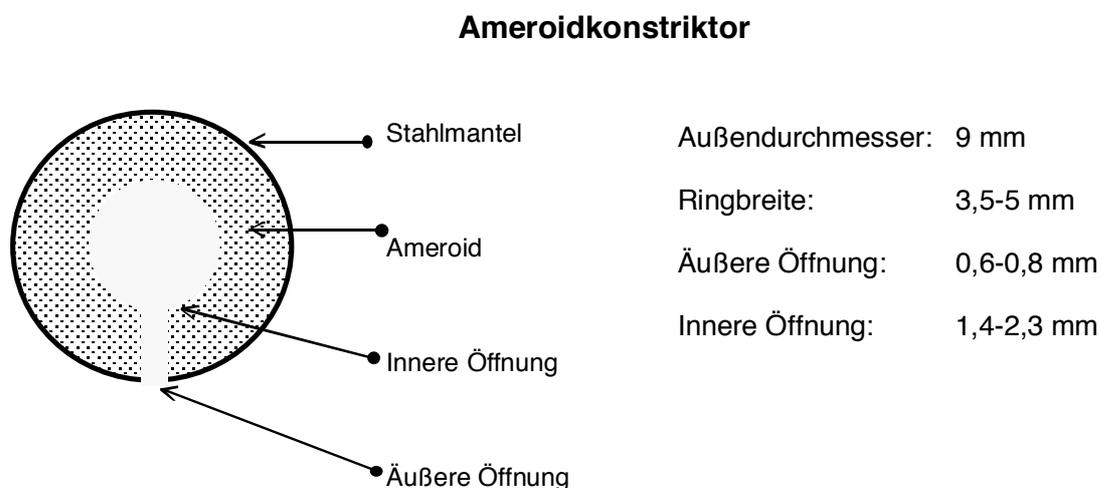


Abb. 1 Schematische Darstellung eines Ameroidkonstriktors im Querschnitt

Nach zirka zwei bis vier Tagen entsteht eine hämodynamisch wirksame Stenose. Ein vollständiger Gefäßverschluß tritt nach ungefähr drei Wochen ein.

Perikard und Thoraxwand wurden wieder verschlossen und die Tiere postoperativ mit Antibiotika und Schmerzmitteln behandelt. Sie erholten sich innerhalb einer Woche von der Operation.

2.2. Gewebeentnahme und -bearbeitung

Nach acht Wochen beziehungsweise sechs Monaten wurde bei einer zweiten Operation das Herz explantiert, wobei sich Prämedikation und Narkose nicht von der ersten Operation unterschieden.

Es wurden nur Gewebe von Herzen entnommen, bei denen der Konstriktor völlig geschlossen und es trotzdem nicht zum Herzinfarkt gekommen war. Die gesuchten Kollateralarterien sind im Epikard lokalisiert, wie aus Arbeiten von Schaper et al. bekannt war ¹.

Aus den Gebieten der linksanterioren Vorderwand des Herzens (Abb. 2) bis hin zur Herzspitze wurden 5 – 8 makroskopisch sichtbare Kollateralgefäße entnommen. Die Kontrollgefäße entstammten aus dem Gebiet des rechten Ventrikels.

Sofort nach der Entnahme wurden die Gewebestücke in flüssigem Stickstoff

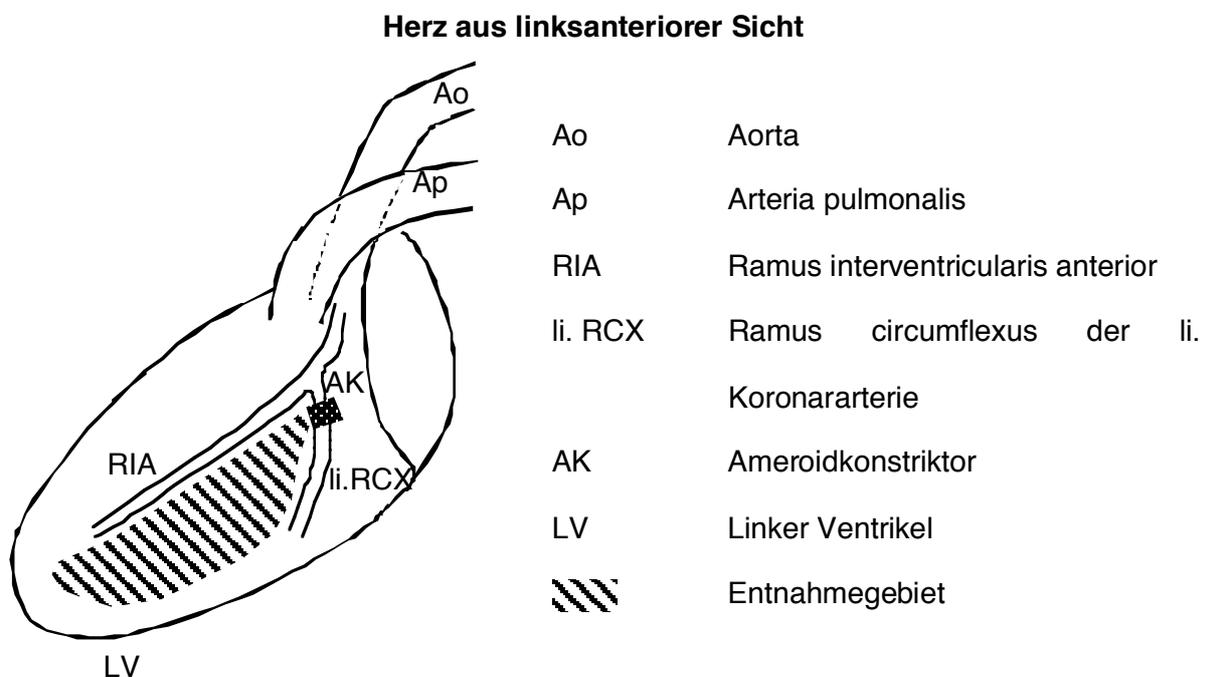


Abb. 2 Schematische Darstellung eines Hundeherzens aus linksanteriorer Sicht mit angelegtem Ameroidkonstriktor an der linken Herzkranzarterie.

tiefgefroren und dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C in der Kühltruhe aufbewahrt (Abb. 2).

2.2.1. **Aufblocken**

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die tiefgefrorenen Gewebestücke in Tissue Tek[®] (Firma Miles, O.T.C. Compound 4583, USA), einem Einbettmedium, das bei tiefen Temperaturen hart wird und dennoch gute Schneideeigenschaften bewahrt, auf vorher beschriftete Aluminiumgewebekasserolle aufgeblickt.

Abgesehen von der Schneideeigenschaft, die durch die gewebeähnliche Elastizität des Materials erreicht wird, wirkt Tissue Tek[®] als zusätzlicher Temperaturschutz.

2.2.2. **Mikrotomie**

Die so aufgeblickten Gewebestücke wurden in einem Gefriermikrotom (Kryostat CM 3000, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) eingespannt.

Es wurden Gewebeschnitte mit einer Schichtdicke von $5\ \mu\text{m}$ bei -28°C mit einem Messer des Schliffes C geschnitten und anschließend mit einem raumwarmen Objektträger aufgenommen.

Für das Aufnehmen der Schnitte sind Objektträger verwendet worden, die mit Silikon beschichtet waren. Das Beschichten war notwendig, damit sich die Schnitte bei der weiteren Bearbeitung nicht ablösen.

Beschichtung der Objektträger mit Silikon:

Die Objektträger wurden mit Extran[®] (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) entfettet und ausgiebig, mindestens aber eine halbe Stunde, mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann kamen sie über Nacht in den Wärmeschrank, um beim Vorgang des Beschichtens völlig trocken zu sein.

Herstellung der Silikonlösung:

- 200ml reines Aceton + 4 ml 3-Aminopropyltriethoxy-Silane (Sigma, St. Louis, USA) => 2%ige Lösung
- Aceton
- destilliertes Wasser
- destilliertes Wasser

Die Objektträger wurden nun bei jedem Schritt mindestens 5 Sekunden eingetaucht und dann wieder über Nacht im Wärmeschrank getrocknet.

Anschließend wurden die Objektträger staubfrei abgedeckt. Es wurden ungefähr 10 Schnitte von jedem Präparat angefertigt.

2.3. Histologie

2.3.1. Toluidinfärbung

Um beurteilen zu können, wie groß die Gefäße sind, welche Verlaufsrichtung sie haben und um zu wissen, in welcher Tiefe die richtige Schnittebene im Gewebblock erreicht ist, wurden die Schnitte nach dem Lufttrocknen mit einem Tropfen Toluidinblau zirka 10 Sekunden gefärbt.

Unter fließendem Wasser wurden die Schnitte anschließend gespült und direkt im Lichtmikroskop (Aristoplan, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) betrachtet.

2.3.2. HE-Färbung

Als Übersichtsfärbung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendet. Hierbei färben sich die Zellkerne bläulich und das Zytoplasma rötlich an. Folgende Kriterien waren hier zu beobachten:

- Schnittrichtung und Größe der Gefäße
- Dicke der einzelnen Wandschichten
- Überblick über die Zellanordnung im Gewebe

2.4. Immunhistozytochemie

Zur Klärung der Fragestellung dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper benutzt, die in einem Mehrschrittverfahren auf der Basis der Antigen-Antikörperreaktion mit den Zielproteinen reagierten.

2.4.1. Allgemeines Protokoll

- | | |
|---|---------------|
| 1. Schneiden von zirka 5 μ m dicken Schnitten | |
| 2. Lufttrocknen | > 5 Minuten |
| 3. Fixierung in 4% Paraformaldehyd (=PFA)
oder Carnoy's-Lösung | 5-20 Minuten |
| 4. Waschen in Phosphate Buffered Saline (=PBS) | 3 x 3 Minuten |
| 5. 5% BSA (=Serumalbumin vom Rind) (Firma Sigma,
Steinheim, Deutschland) + 0,5% Glycin (Firma Fluka, Neu-
Ulm, Deutschland) | 15 Minuten |
| 6. 1. Antikörper bei 4°C in feuchte Kammer | Über Nacht |
| 7. Waschen in PBS | 3 x 3 Minuten |
| 8. 2. Antikörper bei Raumtemperatur in feuchte Kammer | 1 Stunde |
| 9. Waschen in PBS | 3 x 3 Minuten |
| 10. streptavidinkonjugiertes Cy-2
(Raumtemperatur in feuchter Kammer) | 30 Minuten |
| 11. Waschen in PBS | 3 x 3 Minuten |
| 12. Kernfärbung, Propidiumjodid
(Molecular Probes, Eugene, Oregon USA) | 3-4 Minuten |
| 13. Waschen in PBS | 3 x 3 Minuten |
| 14. Eindeckeln mit Mowiol®
(Hoechst, Frankfurt a.M., Deutschland) | Trocknen |

Das hier verwandte PBS von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland, setzte sich wie folgt zusammen:

- NaCl 137,0 mmol
- KCl 2,7 mmol
- KH₂PO₄ 1,5 mmol
- Na₂HPO₄ 8,0 mmol
- pH 7,40

2.4.2 Fixierung

Bei der Gewebefixierung standen zwei Möglichkeiten zur Auswahl, je nachdem welcher Antikörper benutzt werden sollte.

Fixierung in 4%igem Paraformaldehyd, 20 Minuten bei Raumtemperatur

Fixierung in Carnoy's Lösung, 5 Minuten Raumtemperatur (Matrixmetalloproteinasen)

Herstellung von Carnoy's Lösung:

- 60 ml Ethanol absolut
- 30 ml Trichlormethan
- 10 ml Essigsäure

2.4.3. Unspezifische Bindungen

Gewebe besitzt neben den zu untersuchenden Epitopen auch unspezifische Epitope, die die Fluoreszenzwiedergabe nachteilig beeinflussen. Um diese unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte für zirka 15-20 Minuten mit einer Mischung aus 5%igem BSA (Firma Sigma, Steinheim, Deutschland) und 0,5%igem Glycin (Firma Fluka, Neu-Ulm, Deutschland) behandelt und anschließend mit PBS gewaschen.

2.4.4. Erster Antikörper

Um die verschiedenen Zielstrukturen pro Gewebeschnitt auf der Basis einer Antigen-Antikörper-Reaktion darstellen zu können, mußten zirka 50 µl eines entsprechend verdünnten Antikörpers (siehe Tabelle 1) gegen die betreffende Zielstruktur aufgetragen werden. Er mußte über Nacht in einer feuchten Kammer inkubieren und mit dem Gewebsschnitt reagieren.

2.4.5. Zweiter Antikörper

Nach der Inkubation mit dem ersten Antikörper wurden die Schnitte wiederum in PBS gewaschen, um den zweiten Antikörper auftragen zu können.

Der zweite Antikörper muß gegen das Wirtstier gerichtet sein, aus dem der erste Antikörper stammt. Er wird verdünnt und dann aufgetragen, um zirka 1 Stunde in einer feuchten Kammer mit dem 1. Antikörper zu reagieren.

In der Inkubationszeit können sich nun die mit Biotin (Vitamin H) gekoppelten zweiten Antikörper an den ersten binden.

Tabelle 1: 1. Antikörper

Antikörper	Wirtstier	Hersteller	Verdünnung	Klon
Ki67 / MIB 5	Maus	Dianova, D	1:10	
alpha-smooth muscle Aktin	Maus	Sigma, D	1:200	1A4
Desmin	Maus	Sigma, D	1:50	DE-U-10
Calponin	Maus	Sigma, D	1:100	
Laminin	Ratte	Immunotech, F	1:50	A112
Fibronectin	Kaninchen	ICN, Immuno Biologicals, USA	1:100	R122
Matrixmetalloproteinase- 2	Kaninchen	Biotrend Chemikalien GmbH, D	1:100	polyclonal
Matrixmetalloproteinase- 3	Kaninchen	Biotrend Chemikalien GmbH, D	1:30	polyclonal
Matrixmetalloproteinase- 9	Kaninchen	Biotrend Chemikalien GmbH, D	1:50	polyclonal
TIMP-1	Maus	Calbiochem, U.K.	1:20	polyclonal

Tabelle 2: 2. Antikörper

Antikörper	Wirtstier	Hersteller	Verdünnung
Biotin-SP-Conjugated-Affinipure Donkey-Anti-Maus-IgG	Esel	Dianova, Hamburg, D	1:250
Biotin-SP-Conjugated-Affinipure Donkey-Anti-Rabbit-IgG	Esel	Dianova, Hamburg, D	1:100
Biotin-SP-Conjugated-Affinipure Donkey-Anti-Rat-IgG	Schaf	Dianova, Hamburg, D	1:100

2.4.6. Fluorochrom

Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen und mit streptavidinkonjugiertem Cy-2 (Firma Biotrend Chemikalien, Köln, Deutschland) für zirka 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

2.4.7. Kernfärbung

Die Kerne wurden in einer 1:1000 verdünnten Lösung von Propidiumjodid (Firma Molecular Probes, Eugene, USA) gefärbt.

2.5. Eindeckeln

2 – 3 Tropfen Mowiol® (Firma Hoechst, Frankfurt a. M., Deutschland) wurden auf den Schnitt gegeben und dieser mit einem Deckgläschen blasenfrei verschlossen.

Die Eigenfluoreszenz von Mowiol ist sehr gering, so dass es sich zur Fluoreszenzmikroskopie sehr gut eignet.

2.6. Kontrollen

Um gewährleisten zu können, dass die Antikörperreaktion spezifisch ist und innerhalb der Arbeitsschritte keine Versuchsfehler auftraten war es nötig, Negativ- und Positivkontrollen herzustellen.

Für die Negativkontrolle wurde statt des ersten Antikörpers PBS verwandt und alle anderen Schritte gemäß dem oben beschriebenen Protokoll weitergeführt. Als Positivkontrolle wurden Myokard, Leber, Niere oder auch Darm verwandt.

2.7. Dokumentation

2.7.1. Mikroskopie

Es standen ein Lichtmikroskop mit der Ausrüstung zur Fluoreszenzmikroskopie, mit einer aufgesetzten Kamera (Firma Leica, Leitz DM RB, Bensheim, Deutschland) und ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (Firma Leica, TCS D4, Bensheim, Deutschland) zur histologischen Bildbetrachtung zur Verfügung.

Folgende Immersionsobjektive der Firma Leitz, Wetzlar, Deutschland standen zur Verfügung:

- PL APO 40x/1.00 Oil
- PL 100x/1,32 Oil
- PL APO 40x/0,75
- PL 25x/50

Die Lichtquelle war eine Hg-Hochdrucklampe der Firma Osram vom Typ HBO 50W. Zur Bildbetrachtung standen folgende optische Filter zur Verfügung:

- Filterblock N2,1 im Anregungsbereich Blau
- Anregungsfilter BP 515-560
- Sperrfilter LP 580; Absorption 495nm; Emission 528nm

2.7.1.1. Konfokale Mikroskopie

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie entdeckte Marvin Minsky, Professor am Massachusetts Institute of Technology (MIT) in Cambridge. Er entwickelte ein Lichtmikroskop, welches in der Lage war, von relativ dicken Präparaten sehr scharfe Bilder zu erhalten, ohne diese vorher in dünne Schnitte zerlegen zu müssen.

Das Präparat wird durch Auflicht beleuchtet. Dieses Prinzip ist bei der Fluoreszenzmikroskopie oder bei der Untersuchung opaker Proben verwirklicht. Bei dicken lichtdurchlässigen Schnitten ist eine schichtweise Betrachtung der einzelnen Ebenen zwar möglich, doch behindern die nicht aus der Fokusebene kommenden Streustrahlen die Schärfe. Hinzu kommt, dass die Lichtstreuung den Kontrast herabsetzt.

Um zu einem funktionierendem konfokalen Mikroskop zu kommen, mußte Minsky einige Veränderungen an einem „normalen“ Mikroskop vornehmen: Er veränderte das Mikroskop in der Weise, dass nur Licht aus der gewünschten Ebene eingefangen wurde, indem er Streulicht verhinderte:

- Minsky benützte Auflicht, das einen sanduhrenförmigen Strahlengang hat und in seiner Taille einen scharfen, hellen Lichtpunkt besitzt. So konnte er die gewünschte Fokusebene bestrahlen, ohne aus der gesamten Umgebung zusätzliche Reflexionen zu erhalten.
- Er brachte eine Lochblende an, um die Reflexionen des Gewebes, welche oberhalb und unterhalb der Fokusebene im Strahlengang lagen, zu minimieren. So wurde erreicht, dass das gesamte, relevante Licht, ohne Streustrahlung den Detektor erreichten.
- Der Detektor besteht aus einem Photomultiplier, der die optischen in elektrische Signale umsetzt, die man auf dem Bildschirm erkennen kann, vergleichbar mit den verwandten Radarbildschirmen.

Auf diese Weise wird ein nahezu perfekt abgebildeter Fleck, frei von Streustrahlen und Unschärfen durch Fremdlicht, gebildet. Um die Abbildung einer Fläche zu erhalten, muß das Präparat in jeder Zeile und Spalte der Fokusebene gerastert werden. Durch diese Rasteraufnahmen entsteht eine komplette Fläche⁷.

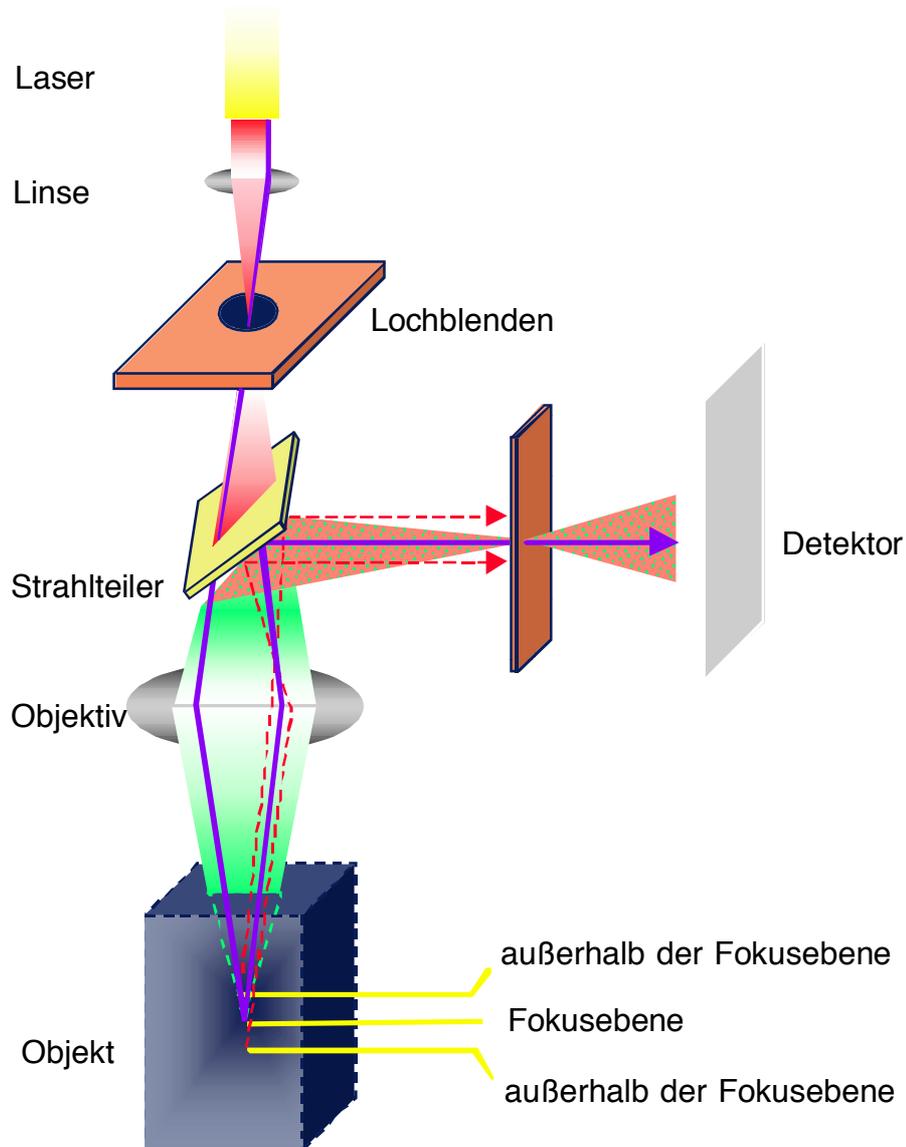


Abb. 3 Strahlengang des konfokalen Mikroskops.

Im konfokalen Mikroskop wird ein Ar/Kr-Laser zur Fluoreszenzanregung verwendet. Mit ihm stehen im sichtbaren Spektralbereich die Linien 488 nm, 568 nm und 647 nm zur Verfügung.

Zur UV-Anregung wird ein Ar-Laser der Wellenlänge 351 nm und 364 nm eingesetzt.

Das konfokale Prinzip (Abb. 3) fordert zunächst punktförmige Beleuchtung. Dies wird idealerweise durch kleine Lochblenden erreicht. Der Laserstrahl wird nach seinem Austritt aus der Laser auf die erste Lochblende fokussiert. Die so erreichte

punktförmige Lichtquelle wird in der Brennebene des Mikroskopobjektives abgebildet und auf einen Punkt im Objekt fokussiert. Der über dem Objektiv befindliche Strahlteiler bekommt nun die vom Objekt emittierten Strahlen durch das Objektiv zurück. Eine zweite Lochblende ermöglicht es, dass nur Licht auf den Detektor fällt, das auch tatsächlich aus der Fokusebene stammt. Alle anderen Streustrahlen, die das Bild weiter unscharf machen würden, werden von der Lochblende abgeschirmt.

Die nachfolgenden Objektive und Filter der Firma Leica aus Bensheim, Deutschland, wurden für das konfokale Mikroskop verwandt:

- PL Fluotar 25x/0,75
- PL Fluotar 40x/1.00-0.50 Oil
- Anregungsstrahlteiler TK 510
- Sperrfilter LP 510

2.7.2. Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 4.) beruht auf dem Fluoreszieren von epitopgebundenen Molekülen, die Licht absorbieren und bei einer längeren Wellenlänge emittieren. Der Vorteil dieser Methode liegt in seiner hohen Sensitivität, verstärkt noch durch das Biotin-Streptavidin-System.

Eine Vielzahl fluoreszierender Farbstoffe stehen zur Verfügung. In unseren Versuchen arbeiteten wir mit Cyanfarbstoff (Cy-2) und Rhodamin ⁸.

2.7.3. Fotografie

Am Fluoreszenz- und Lichtmikroskop wurden Kodak „Elite“ Diafilme mit einer Empfindlichkeit von 100 beziehungsweise 200 ASA verwendet. Am konfokalen Lasermikroskop wurden nur Filme der Empfindlichkeit 100 ASA verwendet.

2.7.4. Bildverarbeitung

Die digitale Bildverarbeitung erlaubt eine standardisierte Bildanalyse, wie sie im folgenden Abschnitt erläutert wird.

Die Rohdaten der Bilder, die am konfokalen Mikroskop gefertigt wurden, wurden über Ethernet-Netzverbindung auf eine INDY[®]-Workstation (Fa. Silicon Graphics, USA) transferiert.

Hier wurde mit dem Programm IMARIS® (Fa. Bitplane, Schweiz) die Bildverarbeitung weiter durchgeführt, wie zum Beispiel Kontrasterhöhung, Rauschunterdrückung oder eine dreidimensionale Rekonstruktion.

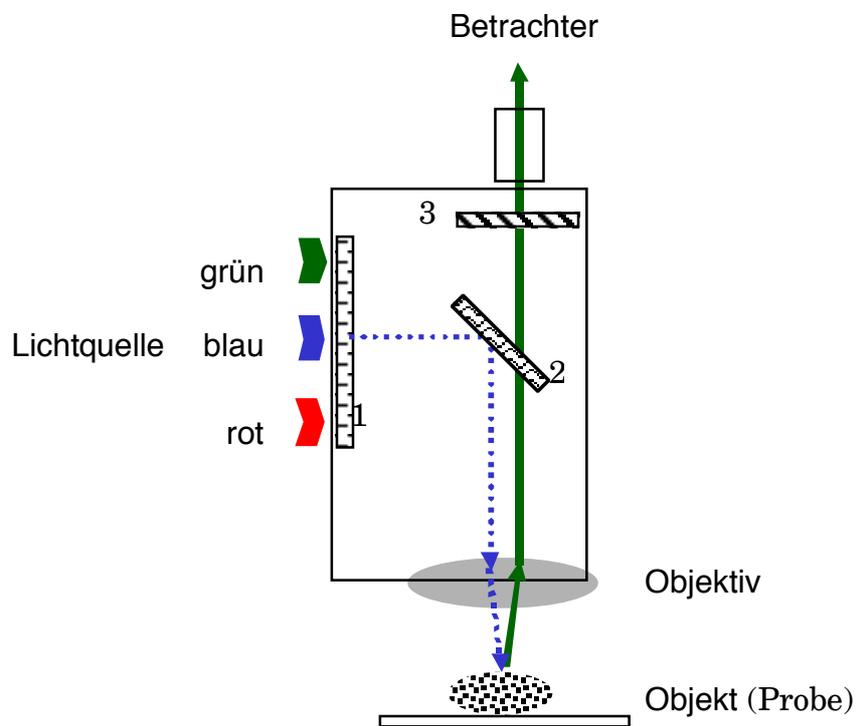


Abb. 4

1. Nur Blaulicht mit einer Wellenlänge von 450 nm bis 490 nm kann durch den Filter treten.
2. Strahlenteiler Spiegel: reflektiert Licht unterhalb 510 nm, läßt jedoch Licht oberhalb 510 nm hindurch.
3. Zweites Sperrfilter: verhindert den Durchtritt unerwünschter Fluoreszenzsignale, aber läßt die spezifische grüne Fluoreszenzemission zwischen 520 nm und 560 nm passieren

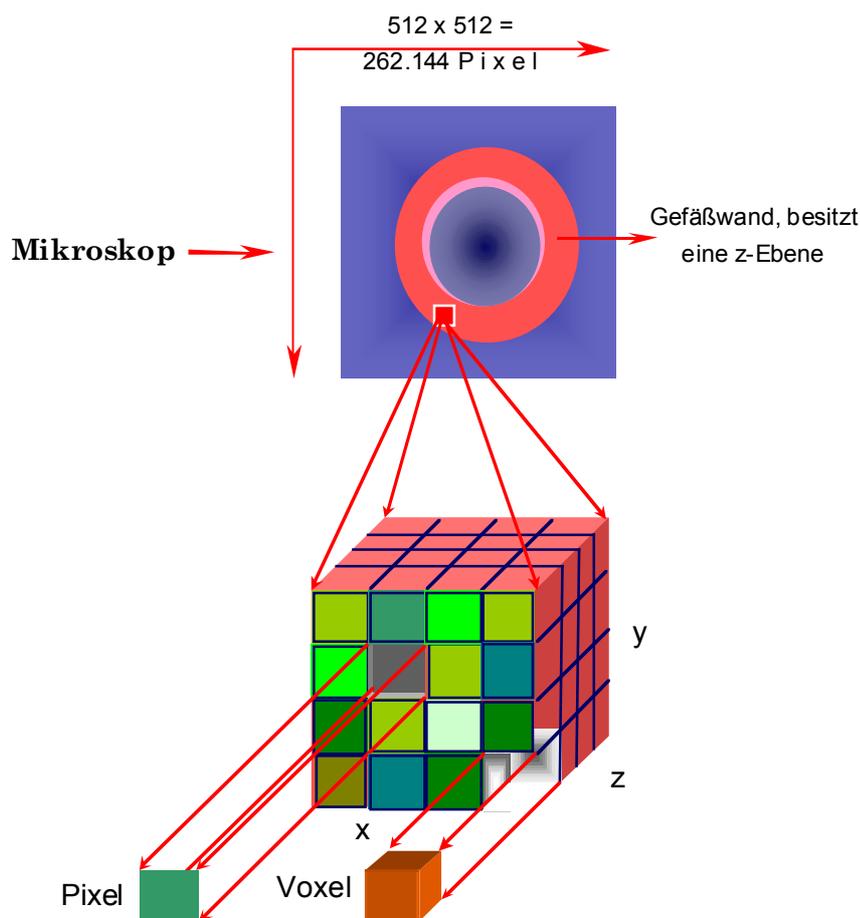


Abb. 5 Prinzip der quantitativen Fluoreszenzmessung

Um die Fülle der Daten verwalten zu können, wurde das Programm SELIMA[®] (Fa. Bitplane, Schweiz) verwendet, wodurch es möglich wurde, die Rohdaten auf Festplatte oder mit Hilfe eines externen Magneto Optical Disk Laufwerks (Fa. Pinnacle Micro, USA) zu speichern.

Um die gewählten Bilder auf Diapositive zu belichten, wurde ein, an die INDY[®] angeschlossener Computer Quadra 700 (Fa. Apple Macintosh, USA) und ein Belichter LFR Mark II (Fa. Lasergraphics, USA) verwendet.

Es wurden Kodak Ektachrome Diafilme mit einer Lichtempfindlichkeit von 100 ASA benützt.

2.7.5. Auswertung

2.7.5.1. Helligkeitsmessung

Jeder Bildschirm besitzt eine bestimmte Anzahl von Pixels. Dies sind die kleinsten Bildelemente, die sogenannten *picture elements* (Abb. 5). Je mehr Pixels ein Bildschirm hat, desto mehr Möglichkeiten sind gegeben, Farbabstufungen darzustellen, und sie in verschiedenen Helligkeitsstufen wiederzugeben. Für das menschliche Auge ergibt diese Anhäufung von verschiedenfarbigen „Flecken“ ein ganzheitliches Bild, in dem man das Fleckenhafte nicht mehr erkennt. Die Farbnuancen gehen ineinander über und ergeben so ein „weiches“ Bild. Für den Rechner ist das Bild jedoch weiterhin ein Konvolut aus kleinen, verschieden hellen und weniger hellen Quadraten, die einer bestimmten Fläche zugehören, nämlich der gesamten Bildschirmfläche. Hier bestand der Bildschirm aus $512 \times 512 = 262.144$ Pixels (Abb. 5).

Die Helligkeit ist an dem, am konfokalen Mikroskop angeschlossenen TCS D4-Rechner, in einer Bandbreite von 0 (= schwarz) bis 255 (= weiß) definiert (Abb. 6; Abb. 7).

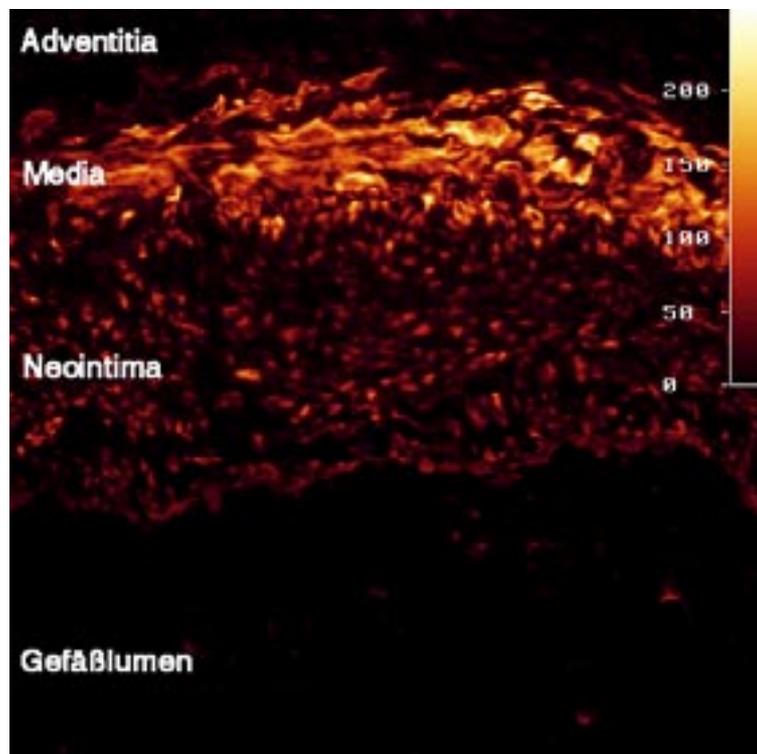


Abb. 6 In diesem Bild eines 8-wöchigen Gefäßes ist die Gesamthelligkeit des Bildes von Helligkeitsstufe 0 (=schwarz) bis 255 (=weiß) dargestellt. Auf der Scalebar im rechten oberen Bildeck sind die Farbnuancen als Zahl definiert.

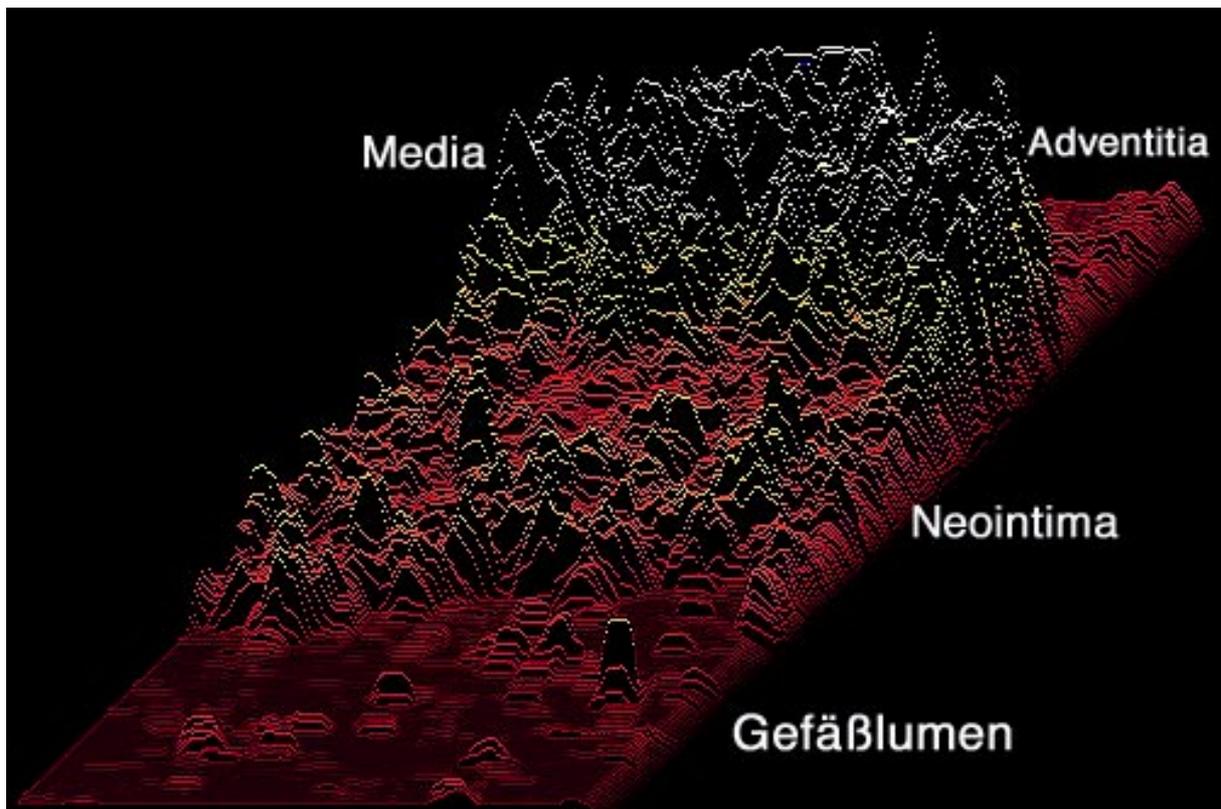


Abb.7 Die in der Abb.6 zweidimensional dargestellten Helligkeitsunterschiede sind hier dreidimensional zu sehen. Die Helligkeitsverteilung ist anhand der „Höhenunterschiede“ gut beurteilbar

Durch die beiden beschriebenen Umstände, a) Definition einer bestimmten Fläche und b) Zuordnung von Zahlen zur entsprechenden Helligkeit, ist es nun möglich, die Helligkeit bezogen auf eine bestimmte Fläche genau zu erfassen und damit Messungen durchzuführen.

Um die Helligkeitsfläche unterhalb der Kurve erfassen zu können, muß jede Intensitätsstärke (definierte Helligkeitspunkte von 0 bis 255) mit der Anzahl ihrer Pixel multipliziert werden. Die so entstehenden Werte geben das Gesamtvorkommen für den einzelnen Helligkeitspunkt. Um die totale Intensität zu bekommen, müssen nun die einzelnen Gesamtwerte der Helligkeitspunkte addiert werden. So erhält man die Gesamtzahl der Pixel unterhalb der Kurve (Abb. 8).

Die Einstellung der Bildhelligkeit ist für die korrekte Bildanalyse sehr wichtig. Es mußte darauf geachtet werden, dass die gewählte Laserstärke die Probe nicht überbelichtet oder umgekehrt bei zu schwachem Laser unterbelichtet.

Bei einer Überbelichtung würden die mit Antikörper schwach markierten Areale trotzdem ein starkes Signal emittieren, die stark markierten Areale hingegen würden alle auf der Helligkeitsskala in der maximalen Stärke von 255 erscheinen.

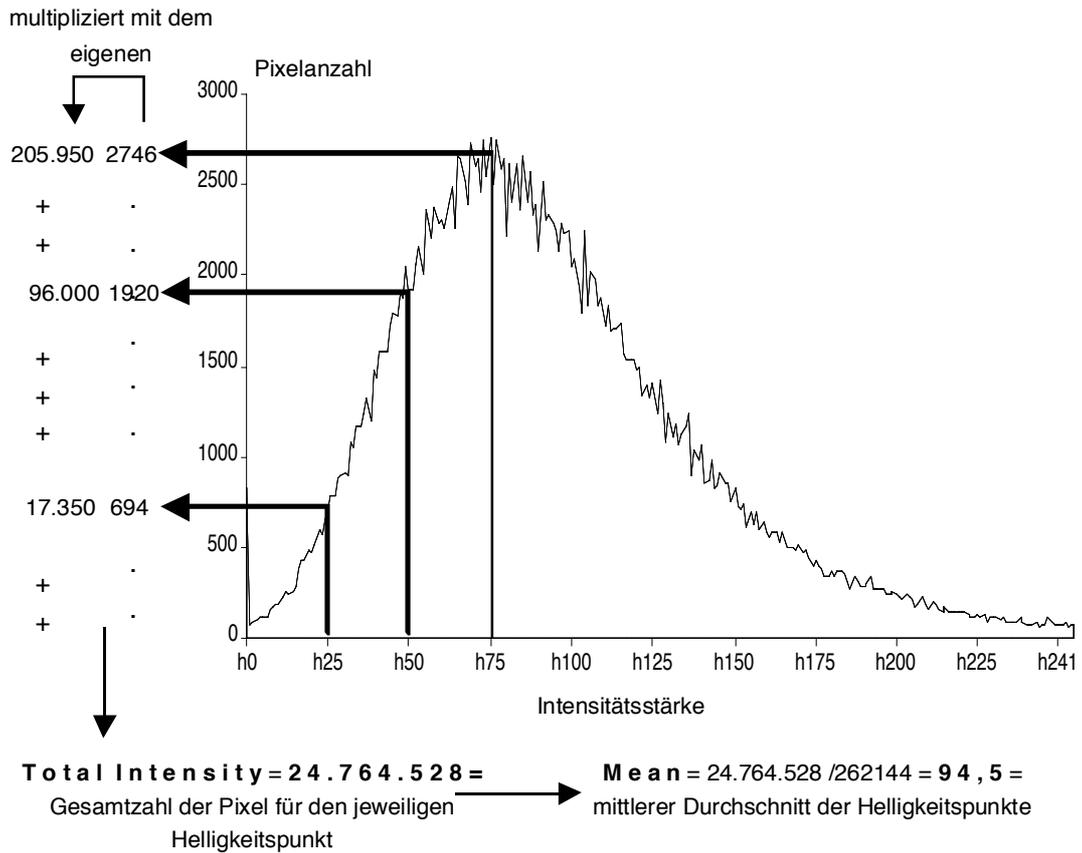


Abb. 8 Schema zur Errechnung der Gesamtpixelzahl und der durchschnittlichen Helligkeit eines Bildpunktes.

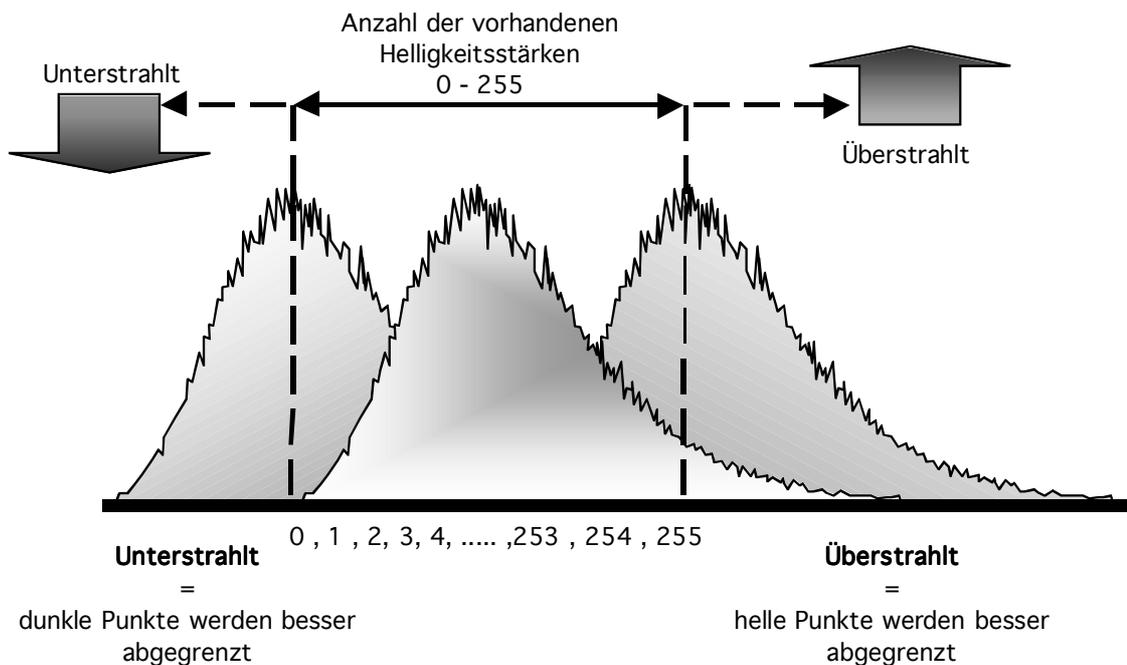


Abb. 9 Einstellung der korrekten Helligkeit während der Helligkeitsmessung durch das konfokale Mikroskop.

Bei der Benützung eines zu schwach eingestellten Lasers würde das Gegenteil eintreten, das heißt die schwach markierten Areale, die für die Helligkeitsmessung jedoch ebenso wichtig sind, würden auf dem Detektor als schwarze Areale untergehen und in der Berechnung nicht berücksichtigt werden (Abb. 9). Daher ist es wichtig eine optimale Laserstärke zu justieren und diese zu verwenden. Dazu ist eine Programmabfolge im Computer vorgesehen, die die überbelichteten Areale als Blau darstellt und bei zunehmender Justierung verschwinden läßt.

2.7.5.2. Statistische Auswertung

Um ein objektives Maß für die Unterschiede der Proteinexpression in der Media und Neointima eines jeden Präparates zu bekommen, wurden alle Messungen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Zu beachten waren dabei folgende Punkte:

1. Immunhistologische Darstellung dreier Gefäßquerschnitte pro Gewebsblock unter standardisierten Bedingungen
2. Exaktes Färbeprotokoll
3. Messung direkt nach der Färbung, um Meßfehler durch Ausbleichen zu verhindern
4. Konstante Einstellung am konfokalen Mikroskop: pinhole, voltage
5. Flächenunabhängige Helligkeitsangabe durch Bildung der Ratio zwischen mittlerer Pixelzahl und gemessener Fläche (μm^2)

3. Ergebnisse

3.1. Normale Gefäßmorphologie

Das arterielle System besteht aus drei Teilsystemen:

Die elastischen Arterien, die eine Media aus konzentrisch gelagerten elastischen Fasern und glatter Muskulatur haben. Zu diesem Arterientyp zählen z.B. die Aorta, ihre Hauptäste oder die A. subclavia. Makroskopisch sehen sie gelblich aus, da ein hoher Anteil der elastischen Fasern in der Media enthalten ist.

Die muskulären Arterien, die eine deutlich abgesetzte Media aus glatter Muskulatur besitzen. Die Tunica media wird von einer Lamina elastica interna zum Lumen hin begrenzt, wie z.B. bei Koronararterien. Die Muskelschicht kann bis zu 40 Lagen Muskelzellen aufweisen

Die kleinsten Arterien des arteriellen Systems stellen die Arteriolen dar, die nur ein bis zwei Lagen glatter Muskulatur haben. Sie haben einen Durchmesser von 30 – 300 μm . Ihre Intima besteht aus dem Endothel, die subendotheliale Schicht ist kaum entwickelt. Die Elastica interna ist häufig ausgebildet. Die Adventitia ist dürrftig entwickelt und schmal.

Arteriolen sind Widerstandsgefäße, die den arteriellen Blutdruck durch ihren Durchmesser regulieren können ^{9,10}. Die Kollateralgefäße gehören strukturell zu den arteriolären Gefäßen und bestehen aus folgenden Schichten:

Tunica intima (Intima):

Sie besteht aus einem einschichtigen Endothel aus 50-150 μm langen Endothelzellen, die die innere Oberfläche der Gefäße lückenlos auskleiden und dem Stratum subendotheliale. Dieses kommt nach dem Endothel und besteht aus lockerem Bindegewebe und kann einzelne glatte Muskelzellen enthalten. Die Membrana elastica interna (IEL) gehört anatomisch noch zur Tunica intima und grenzt Intima von Media ab.

Die IEL erscheint bei nicht perfusionsfixierten Gefäßen im Mikroskop gewellt. Sie besitzt Eigenfluoreszenz.

Tunica media (Media):

Die Media besteht aus zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen, die in extrazelluläre Matrixproteine eingebettet sind. In unterschiedlichen Mengen kommen hier Elastin, Kollagene (Typ I und III) und Proteoglycane vor. Die Media

größerer Gefäße wird von einer Membrana elastica externa ummantelt, die die glatten Muskelzellen von der Adventitia abgrenzt.

Tunica externa (Adventitia):

Die Adventitia besteht hauptsächlich aus Bindegewebe, Fibroblasten und elastischen Fasern, vor allem das Typ I Kollagen⁹.

3.2. Struktur der wachsenden Kollateralgefäße

3.2.1. Neointima

Diese neu gebildete Zellschicht besteht aus proliferierenden Zellen, die lumenwärts vom Endothel begrenzt werden. Die Zellkerne der Neointima wirken vergrößert, da die Kern-Plasma-Relation zu Gunsten des Kerns verschoben ist. Sie sind radiär zum Lumen hin angeordnet. Die Zellen haben ihre typisch regelmäßige Anordnung verloren. Die auffallend zirkuläre Anordnung der glatten Muskelzellen ist aufgehoben. Das neointimale Dickenwachstum ist an manchen Stellen ungleichmäßig vorhanden. Die Grenze zwischen Intima und Media, durch die Membrana elastica interna gebildet, ist nicht mehr deutlich, da die elastische Membran rupturiert oder in ihrer Dicke stark eingeschränkt ist. Es kommen auch Gefäße vor, bei denen sie völlig fehlt.

Tunica media (Media):

Diese Schicht ist, verglichen mit der physiologischen Mediadicke sehr stark verschmälert. Die einzelnen Muskelzellen sind histomorphologisch nicht verändert. Die Schichtenrelation ist jedoch deutlich zu Gunsten der Neointima hin verschoben.

Tunica externa (Adventitia):

Die Tunica externa ist unverändert und fällt im histologischen Vergleich zu den Kontrollgefäßen nicht pathologisch auf.

3.3. Auswahl und Einteilung der Präparate

Die untersuchten Gefäße haben alle durchschnittlich einen Durchmesser von zirka 300 bis 1000 μm und eine Wanddicke von ungefähr 20 bis 200 μm .

Es wurden nur Gefäße aus dem Versorgungsgebiet der vorher verschlossenen Arterie entnommen.

Kontrollgefäße entsprachen histomorphologisch gesunden Gefäßen, die aus Intima/Endothel, subendothelialer Schicht, der Lamina elastica interna, der Tunica

media und der Adventitia zusammengesetzt waren. Sie mußten folgende Kriterien erfüllen:

- Die Tunica media muß aus gleichmäßig angeordneten glatten Muskelzellen bestehen
- Die Lamina elastica interna muß durchgehend sein
- Die Tunica intima sollte aus einer Zellreihe Endothelzellen und subendothelialelem Gewebe bestehen
- Es dürfen keine Ki-67-positiven Zellen im Gefäß nachweisbar sein.

Die Kollateralgefäße wurden vergleichend betrachtet:

- Hämatoxylin-Eosin-Färbung zur Überprüfung der Histomorphologie.
- Vergleich zwischen den Matrixmetalloproteinasen (MMP-2, MMP-3, MMP-9) und den intrazellulären (alpha-smooth muscle Aktin, Calponin, Desmin) und extrazellulären Proteinen (Laminin, Fibronectin).
- Ki-67-Färbung, um eine Proliferation der Zellen in der Gefäßwand gegebenenfalls nachzuweisen.
- Die erwähnten Strukturänderungen sahen im Vergleich zum gesunden Gefäß wie folgt aus:

Tabelle 3

Gesunde Arterie	Kollateralarterie + Neointima
Adventitia mit Vasa vasorum	Adventitia mit Vasa vasorum
Zirkulär, geordnet liegende glatte Muskelzellen, die ein mehrfaches der intimalen Wanddicke ausmachten	Sehr dünne, teilweise nicht vorhandene Tunica media
Eine durchgehende, stark gefaltete, gut sichtbare Lamina elastica interna	Die Lamina elastica interna war nicht in ihrer vollen Länge sichtbar; sie hatte starke Einrisse und wirkte partiell lysiert
In einer gesunden Arterie ist keine Neointima vorhanden	Neointima: bestehend aus unregelmäßig angeordneten glatten Muskelzellen und abundant vorkommender ECM
Intaktes Endothel	Intaktes Endothel

3.4. Proteine

Die 8-Wochen und 6-Monats-Kollateralen, sowie die Kontrollgruppen wurden mit verschiedenen Antikörpern gegen intrazelluläre, extrazelluläre Proteine, gegen Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitor gefärbt

Desweiteren wurde Ki-67 als Proliferationsmarker benützt, um Zellteilungsvorgänge im Gefäß deutlich zu machen. Es sollte gezeigt werden, ob bei den 8-Wochen und 6-Monatsgefäßen proliferierende Muskelzellen vorhanden sind.

3.4.1. Intrazelluläre Proteine

3.4.1.1. Kontraktile Proteine

Die quantitative Verteilung von alpha-smooth muscle Aktin und Calponin im medialen beziehungsweise neointimalen Gefäßabschnitt wurden untersucht.

3.4.1.1.1. alpha-smooth muscle Aktin

alpha-smooth muscle Aktin markiert das für glatte Muskulatur typische Aktin. Es wurde benützt, um glatte Muskelzellen zu identifizieren ¹¹.

In den Kontrollgefäßen (Abb. 10) erschienen die einzelnen Muskelzellen als gleichmäßig, im Zellverband liegende, spindelförmige Zellen. Die Endothelzellen und das adventitielle Gewebe wurden indessen nicht angefärbt. Im neointimalen Bereich war bei den Kollateralgefäßen Aktin vorhanden. Die Markierung war relativ unregelmäßig, da manche Zellen stark, andere hingegen schwach markiert waren, welches ein Zeichen für die verschiedenen Reifungsphasen der Zellen darstellte.

Die Tunica media der Versuchs- und Kontrollgefäße waren annähernd gleichstark markiert (Abb. 10-12). Die quantitative Fluoreszenzmessung unterstützt die schon beschriebenen subjektiven Eindrücke beim Betrachten der Fluoreszenzergebnisse: Die Tunica media aller drei Gefäßgruppen (Kontrolle, 8-wöchige und 6-monatige Kollateralgefäße) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 34). Beim alleinigen Vergleich der Neointima innerhalb der Kollateralgefäße ließ sich ein signifikanter Fluoreszenzanstieg innerhalb der glatten Muskelzellen feststellen (Abb. 35). Der Vergleich der beiden Gefäßabschnitte bei 8 Wochen und 6 Monaten ergab, dass die Fluoreszenz zu Gunsten der Tunica media verschoben war (Abb. 36-37).

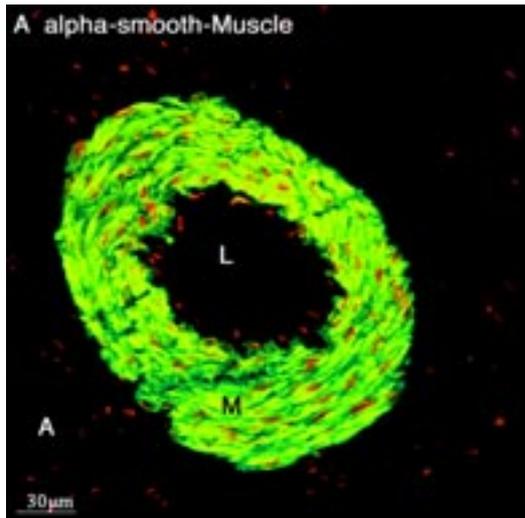


Abb. 10 Kontrollgefäß

Die glatten Muskelzellen liegen gleichmäßig im Verband.

Die Adventitia wurde nicht angefärbt. Eine Neointima ist nicht vorhanden.

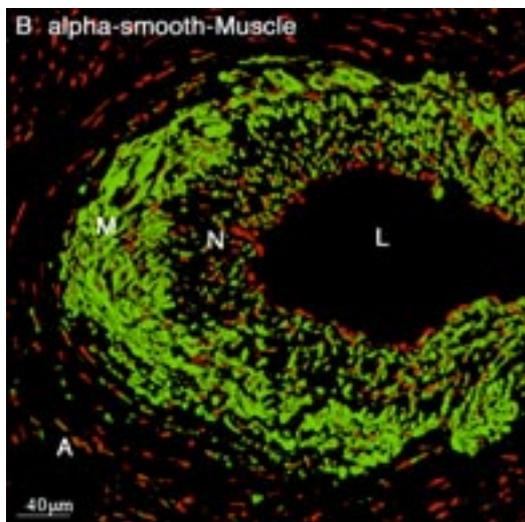


Abb. 11 8-wöchiges Kollateralgefäß

Deutlich zu erkennende Neointima, mit einer deutlich geringeren Fluoreszenz. Die Tunica media ist kräftig angefärbt.

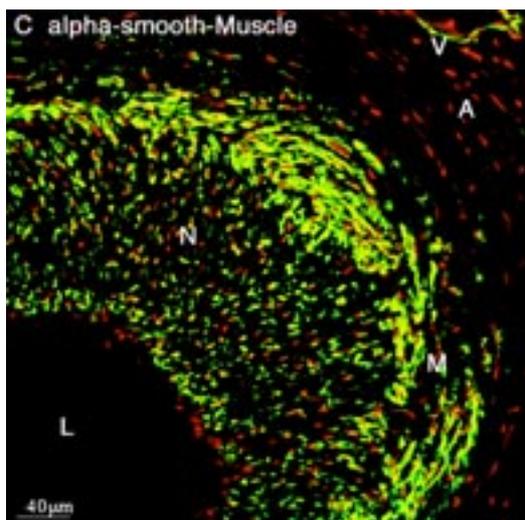


Abb. 12 6-monatiges Kollateralgefäß

Eine deutlich ausgeprägte neointimale Gefäßwandschicht, die ein Mehrfaches der Mediadicke erreicht hat.

In der rechten oberen Ecke des Bildes erkennt man eine angefärbte Vene.

A	=	Adventitia
K	=	mitotische Kerne
L	=	Lumen
M	=	Tunica media
qM	=	Muskulatur
N	=	Neointima
V	=	Vene

3.4.1.1.2. Calponin

Calponin ergab eine deutlich positive Markierung in der Tunica media der Kontrollgefäße. Im Gegensatz hierzu wurden Adventitia und Endothel nicht gefärbt (Abb. 13).

In den Kollateralgefäßen war Calponin im neointimalen Bereich viel schwächer und unregelmäßiger exprimiert als im medialen Bereich.

Es erscheint jedoch im peripheren Abschnitt der Neointima von den 8-wöchigen Kollateralen zu den 6-monatigen Kollateralen hin eine deutliche Zellreifung stattzufinden, wie man anhand der zunehmenden Proteinexpression (Abb. 35) und in Anlehnung an Arbeiten von Duband et al. und Gimona et al. entnehmen kann ^{12,13}.

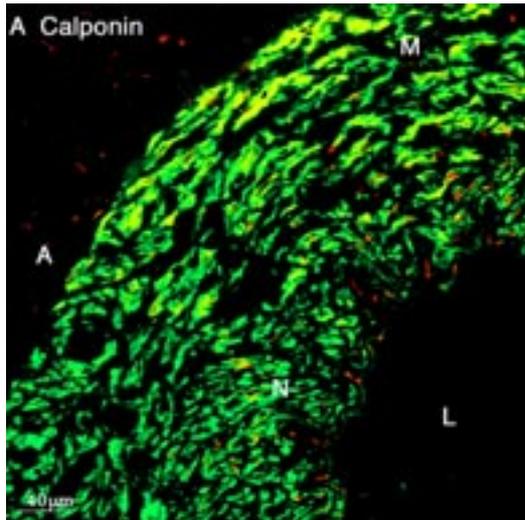
Die Zellen liegen zwar radiär zum Lumen, doch wirken sie gleichmäßig innerhalb der peripheren Neointima verteilt.

Die Mediamarkierung der Kollateralgefäße war, verglichen mit den, Kontrollgefäßen erhöht (Abb. 34).

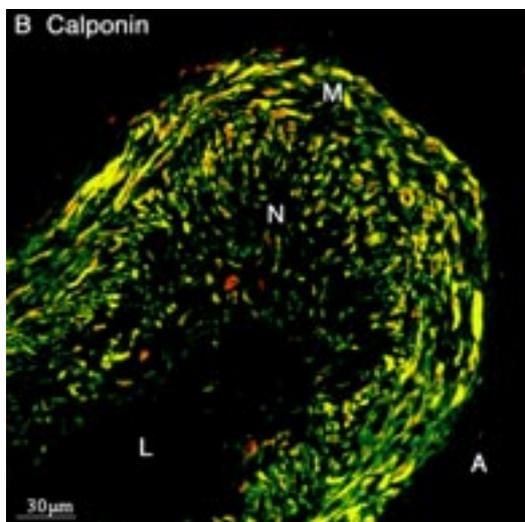
Innerhalb der Kollateralgefäße war die Exprimierung von Calponin in der Media bei den 6-Monatsgefäßen im Vergleich zu den 8-Wochengefäßen stärker erhöht (Abb. 34). Auch bei den Kollateralgefäßen wies die Adventitia keine Markierung auf. Auch in der quantitativen Fluoreszenzmessung entsprachen die Ergebnisse weitestgehend der subjektiven Beurteilung. Die Mediafluoreszenz der Kontrollgruppe war verglichen mit den 8-wöchigen und 6-monatigen Gefäßen gering. Die 6-monatigen Kollateralen hatten in ihrer Media die höchste Calponinexpression (Abb. 34-35), wohingegen die Mediaexpression der 8-wöchigen Kollateralen nur gering höher war als die Kontrolle (Abb. 34).

Der neointimale Vergleich ergab, dass es zu einer signifikanten Steigerung der Calponinexpression in der Neointima bei 6 Monaten gegenüber der Neointima bei 8 Wochen gekommen war (Abb. 35).

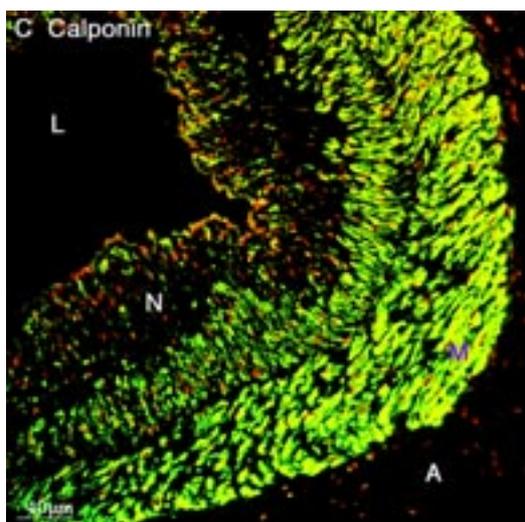
Der Zeitvergleich zeigte bei Calponin innerhalb der Tunica media bei den 8-wöchigen Kollateralen eine etwas geringere Calponinexpression als bei den 6-monatigen Gefäßen (Abb. 34). Jedoch war die Mediafluoreszenz deutlich gegenüber der Neointimafluoreszenz in den beiden Zeitabschnitten erhöht (Abb. 36-37).



*Abb. 13 Kontrollgefäß
Kräftige Markierung von Calponin in der
Tunica media.
Perivaskulär ist keine Markierung erfolgt.
Das Mumen ist frei.*



*Abb. 14 8-wöchiges Kollateralgefäß
Adventitia ist nicht markiert. Tunica media,
verglichen mit der Neointima , deutlich
markiert. Das Lumen ist frei.*



*Abb. 15 6-monatiges Kollateralgefäß
Eine deutliche Grenze zwischen Tunica media
und Neointima ist zu sehen. Die Markierung
nimmt kontinuierlich von Peripher zum
Lumen hin ab. Die Adventitia ist nicht
markiert. Das Lumen ist frei.*

3.4.1.2. Zytoskelettäre Proteine

Das Zytoskeletts besteht aus drei verschiedenen Proteingruppen:

- Intermediärfilamente
- Mikrotubuli
- Zytoskelettäre Aktinfilamente

Das intermediäre Filament Desmin spielt für die Funktion der glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle und wurde deshalb hier untersucht ¹⁴.

3.4.1.2.1. Desmin

Bei den Kontrollgeweben waren Adventitia und das Endothel ungefärbt, die Media war deutlich angefärbt. Die regelmäßige Faserrichtung der Muskelstruktur war gut zu erkennen (Abb. 16).

Jedoch sind in der Media auch Muskelzellen vorhanden, die kein Desmin exprimieren, so dass das Bild nicht gleichmäßig ausfällt.

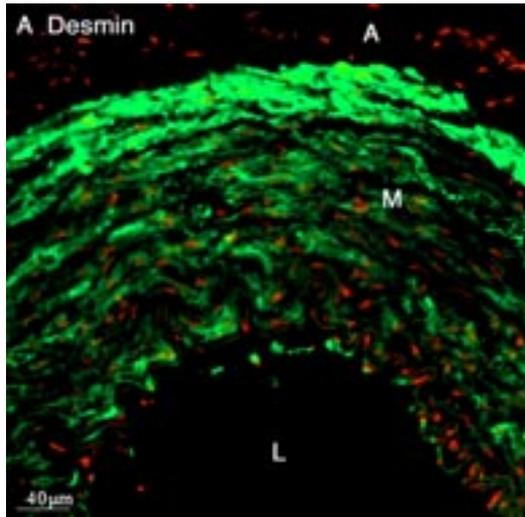
In der Mediaperipherie der 8 Wochen und 6 Monate alten Gefäße war Desmin stärker angefärbt als in den weiter innen liegenden Bereichen (Abb.17-18).

In der neointimalen Zone war die Desminexpression sehr gering. Dies war sowohl 8 Wochen, als auch 6 Monaten nach Konstriktorimplantation zu beobachten (Abb. 17-18).

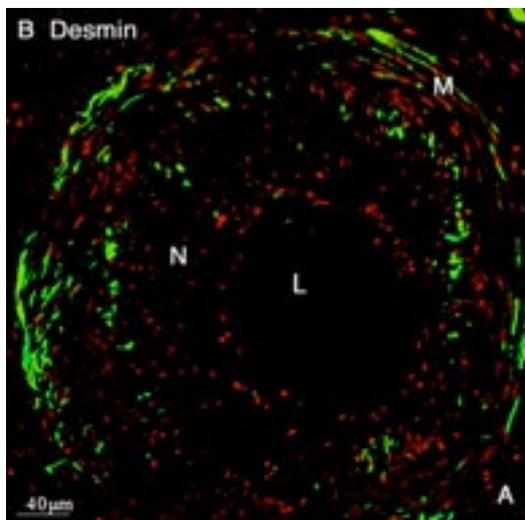
In der Tunica media waren die Kontrollgefäße in ihrer Desminexpression mit den 8-wöchigen Kollateralen vergleichbar (Abb. 16-18).

In der quantitativen Fluoreszenz war kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontroll- und Kollateralgefäßen feststellbar (Abb. 34).

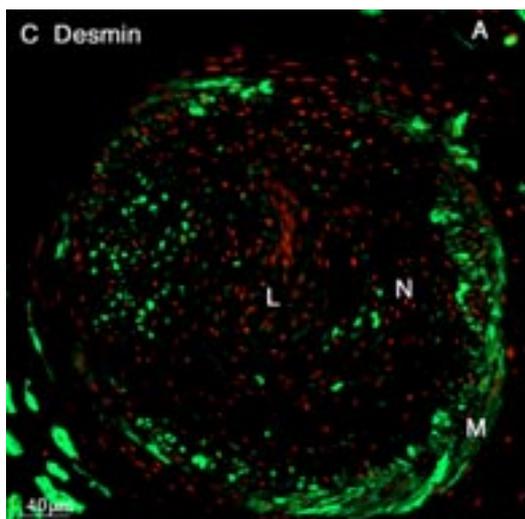
Die Neointima der 8-wöchigen Kollateralen war deutlich weniger markiert als die der 6-monatigen Kollateralen. Im direkten Vergleich war die Tunica media bei beiden Zeitpunkten signifikant stärker markiert als die Neointima (Abb. 34). Da den Herzmuskelzellen Desmin als zytoskelettärer Bestandteil zugehört, ist eine direkte positive Kontrolle der Färbung durch das Myokardgewebe gegeben (Abb. 18).



*Abb. 16 Kontrollgefäß
Gleichmäßige Verteilung des Desmin in der Tunica media. Die scheinbar erhöhte Fluoreszenz in den peripheren Bereichen der Media sind artefaktbedingt*



*Abb. 17 8-wöchiges Kollateralgefäß
Klar erkennbares Lumen, das von Neointima umgeben ist. Die Desminexpression ist deutlich verringert, im Vergleich zur Media.*



*Abb. 18 6-monatiges Kollateralgefäß
Ein komplett, durch die Neointima verschlossenes Gefäß. Dennoch sind die Proteinverteilungsmuster deutlich.
Die Media ist stärker markiert als die Neointima, die fast den gesamten Gefäßquerschnitt ausmacht.*

3.4.2. Extrazelluläre Matrixproteine

Ein Großteil des Gewebsvolumens wird vom extrazellulären Raum, der extrazellulären Matrix, eingenommen, die hauptsächlich von Fibroblasten exprimiert wird. Die extrazelluläre Matrix besteht aus Makromolekülen, die sich zu einem strukturierten Maschenwerk zusammenlagern. Sie ist verantwortlich für die zelluläre Regelmäßigkeit, die strukturelle Integrität, für die dreidimensionale Ausrichtung der Zellen im Gewebe und nicht zuletzt für die metabolischen Funktionen im Gewebe ¹⁵⁻¹⁷.

3.4.2.1. Laminin

Laminin markiert, neben Kollagen IV, die Basalmembran. Daher kann man Laminin als feine Begrenzung der Myozyten, der Endothel- und der glatten Muskelzellen beobachten ¹⁸⁻²⁰ (Abb. 19-20). Es ist das quantitativ wichtigste nichtkollagene Matrixprotein der Basalmembran ²¹.

Die Tunica media war stark mit Laminin markiert (Abb. 19-21). Im Bereich der proliferierenden Neointima wurde die Lamininmarkierung zum Lumen hin stärker (Abb. 20). In der Adventitia ist nur eine geringe Lamininmarkierung nachweisbar. Die Adventitia wurde nicht angefärbt, wohingegen Myozyten deutlich gefärbt waren (Abb. 19-21).

In der quantitativen Fluoreszenz fiel auf, dass die Kontrollgefäße in ihrer Intensität den 8-wöchigen Kollateralen relativ gleichgestellt waren (Abb. 34).

Hingegen gab es zwischen den 8-wöchigen und 6-monatigen Kollateralen eine deutliche Steigerung zu Gunsten der 6-monatigen Gefäße (Abb. 34).

Der alleinige Vergleich der Neointima zeigte, dass die 6-monatigen Gefäße eine stärkere Proteinmarkierung aufzeigten (Abb. 35).

Die Gegenüberstellung der Kollateralen bezogen auf die Zeit nach Ameroidimplantation zeigte, dass die Proteinexpression sowohl der Media als auch der Neointima bei 6-monatigen Gefäßen deutlich erhöht war (Abb. 37).

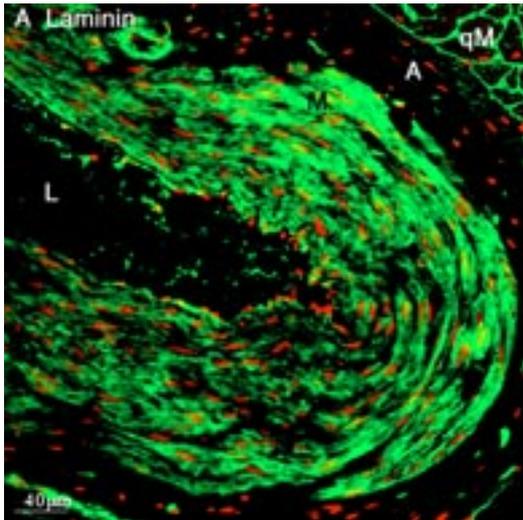


Abb. 19 Kontrollgefäß

Gleichmäßiges Verteilungsmuster von Laminin. Auch quergetroffene Herzmuskelzellen sind zu sehen (qM). Das Lumen ist frei. Die Anordnung der glatten Muskelzellen ist regelmäßig.

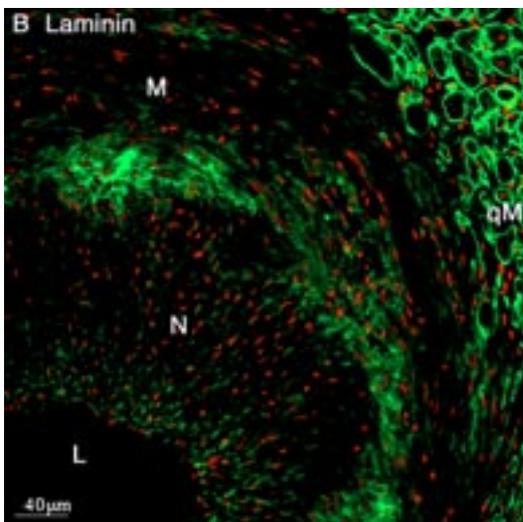


Abb. 20 8-wöchiges Kollateralgefäß

Deutlich sichtbare Neointima mit radiär zum Lumen hin orientierten Kernen. Im rechten Bildrand sind querschnittene Herzmuskelzellen zu sehen.

Der unterschiedliche Verlauf der Zellkerne von Media und Neointima ist auf dem Bild klar sichtbar.

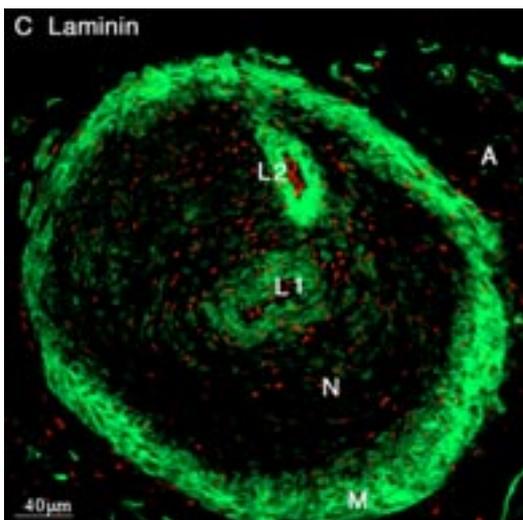


Abb. 21 6-monatiges Kollateralgefäß

Das Lumen (L1) ist nahezu vollständig verschlossen. Reaktiv hat sich innerhalb der Neointima ein zweites Lumen (L2) gebildet. Die Fluoreszenzverteilung um L2 spricht für das Vorhandensein glatter adulter Muskelzellen.

3.4.2.2. Fibronectin

Fibronectin kommt ubiquitär als Zell-Zell oder Zell-Matrix-Adhäsionsprotein vor²². Es ist ein Dimer mit einer relativ hohen Molekulargewicht von 440 kDa.

Fibronectin spielt eine Rolle bei der Wundheilung und der Gerinnung²³⁻²⁵. In Zusammenhang mit dieser Arbeit ist wichtig, dass Fibronectin die zelluläre Adhäsion und Proliferation fördert^{26,27}.

Die Tunica media ist im Gegensatz der Tunica adventitia bei allen drei Gefäßgruppen stark angefärbt (Abb. 22-24).

In den Kollateralgefäßen ist eine besonders starke Färbung in der Neointima zu beobachten, die lumenwärts zunimmt. Dies ist besonders bei den 8-wöchigen Gefäßen sichtbar (Abb. 23).

Die Zone zwischen der Tunica media und der stark angefärbten lumennahen Zone der Neointima erscheint bei den 6-monatigen Kollateralgefäßen deutlicher und gleichmäßiger markiert (Abb. 24).

Die Tunica media der Kontrollgefäße und der Kollateralgefäße unterscheiden sich in der Expressionsstärke nur wenig voneinander (Abb. 34).

Die quantitative Fluoreszenz zeigt im direkten Vergleich der Mediazonen der drei Gefäßgruppen, dass die Mediamarkierung der 8-wöchigen Gefäße signifikant im Vergleich zu den 6-monatigen Gefäßen stärker ist (Abb. 34). Die Neointimamarkierung ist bei beiden Entnahmezeitpunkten vergleichbar (Abb. 36-37).

Betrachtet man Media und Neointima gemeinsam, bezogen auf den Entnahmezeitpunkt, zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Neointimamarkierung der 6-monatigen Gefäße gegenüber den 8-wöchigen Gefäßen (Abb. 36-37).

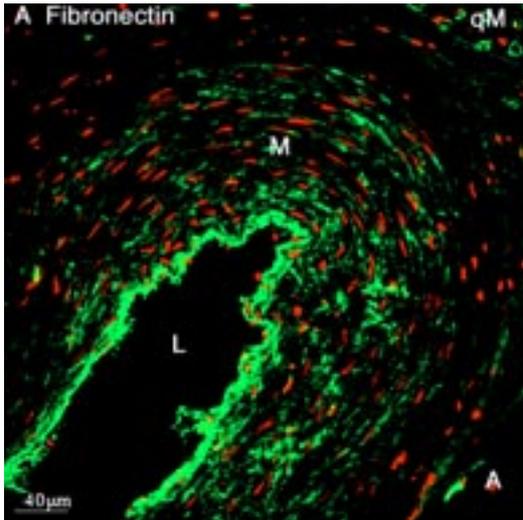


Abb. 22 Kontrollgefäß

Die stark angefärbte Endothelregion des Gefäßes ist artefaktbedingt. Die Verteilung des Fibronectins und die Ausrichtung der Zellkerne innerhalb der Tunica media ist gleichmäßig.

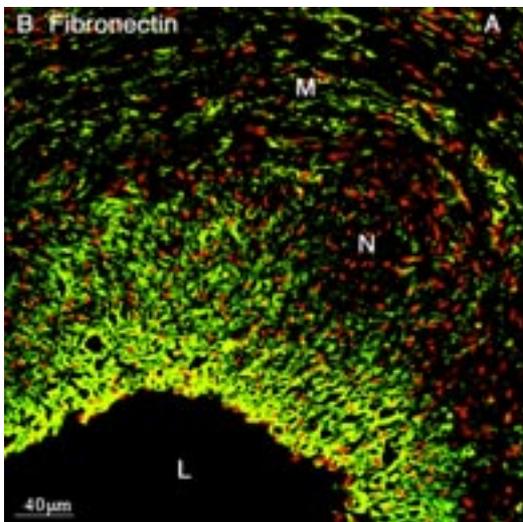


Abb. 23 8-wöchiges Kollateralgefäß

Der Fluoreszenzunterschied zwischen Media und Neointima ist sichtbar. Auch der unterschiedliche Verlauf der Zellkerne wird deutlich.

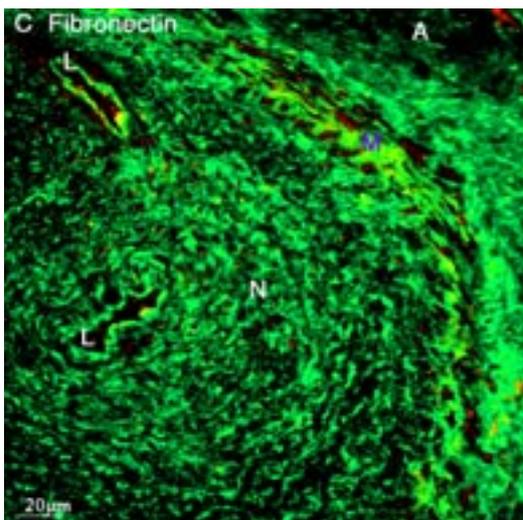


Abb. 24 6-monatiges Kollateralgefäß

Innerhalb des verschlossenen Gefäßes ist die Proteinverteilung von Fibronectin in der Media deutlich höher als in der Neointima.

3.4.3. Proliferationsmarkierung

Proliferationsmarker wurden benützt, um festzustellen, ob Umbauprozesse ablaufen, die unter dem Begriff „*vascular remodeling*“ zusammengefasst werden.

3.4.3.1. Ki-67

Der monoklonale Antikörper Ki-67 reagiert mit Zellkernantigenen, die in proliferierenden Zellen vorhanden sind, das heißt innerhalb der Zellzyklusphasen G₁, S, G₂ und der Mitose. In Zellen, die sich während der G₀-Phase in der Ruhephase befinden, fehlen sie ²⁸⁻³⁰.

8 Wochen nach Implantation zeigte sich bei den Gefäßen eine deutliche Proliferationszone innerhalb der Neointima (Abb. 26). Jedoch konnten wir auch bei den Gefäßen, sechs Monate nach Implantation, noch eindeutige Proliferationszonen innerhalb der Neointima entdecken (Abb. 27), was für einen noch nicht abgeschlossenen Umbauprozess innerhalb der Gefäßwand spricht.

3.4.4. Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind proteolytische Enzyme ³¹. Sie werden auch Kollagenasen oder Matrixins genannt. Sie funktionieren bei neutralem pH und zersetzen synergistisch alle Makromoleküle der Matrix ³²⁻³⁶. MMPs sind unabhängig von den Entzündungszellen im Gewebe und liegen als inaktive Form vor, die in eine aktive umgewandelt werden kann.

Da die meisten MMPs als Zymogene geschützt sind, ist ihre Aktivität im extrazellulären Raum abhängig von der Aktivierung des Zymogens, ³⁷⁻⁴⁰ die durch aktive MMPs ^{41,42} oder durch hohe Plasminkonzentrationen möglich ist ⁴³⁻⁴⁵.

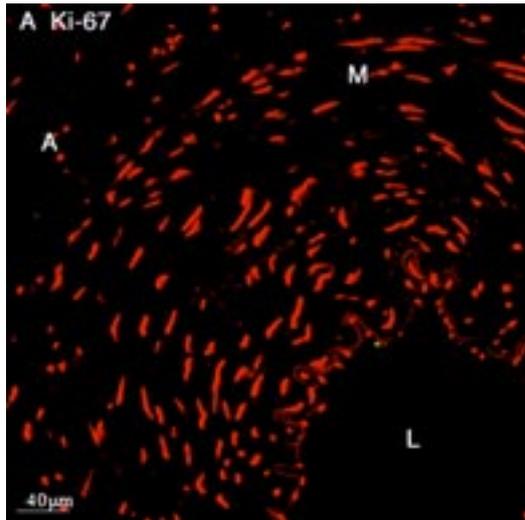


Abb. 25 Kontrollgefäß

Eine Proliferation der Zellkerne ist bei diesen adulten glatten Muskelzellen nicht zu beobachten.

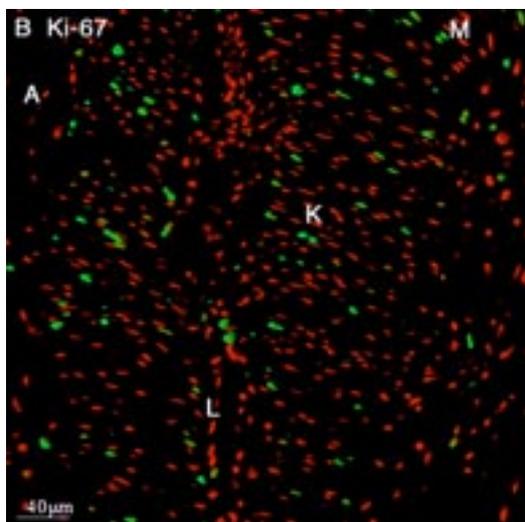


Abb. 26 8-wöchiges-Kollateralgefäß

Eine auffällige Zellkernaktivität der glatten Muskelzellen ist zu sehen. Die hier grün markierten Zellkerne sind in die Zellteilung eingeschaltet.

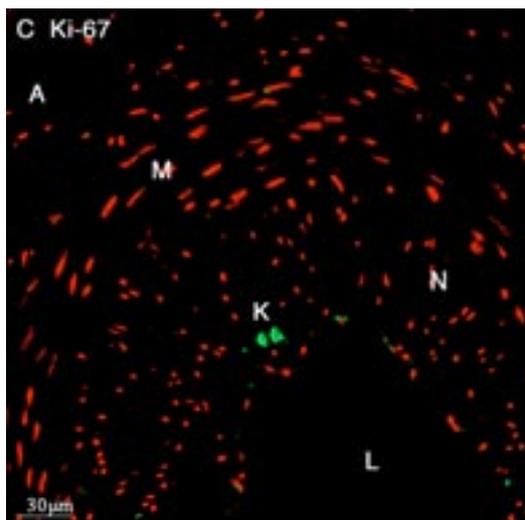


Abb. 27 6-monatiges Kollateralgefäß

Der unterschiedliche Verlauf der Media- und Neointima-Zellkerne ist zu sehen. Die Proliferationsaktivität hat deutlich abgenommen. Es sind nur noch zwei Zellen (K), die mitotisch aktiv sind.

Tabelle 4 46

Enzyme	Untergruppe	Synonym	Substrat
Kollagenasen	<i>MMP-1</i>	Interstitial collagenase (EC 3, 4, 24, 7)	Coll Typ I, II, III, VII, X, Gelatins, Proteoglycane, EntAktin
	<i>MMP-8</i>	Neutrophil collagenase (EC 3, 4, 24, 34)	Coll Typ I, II, III
Gelatinasen	<i>MMP-2</i>	<i>Gelatinase A</i> , 72 kD Kollagenase Typ IV (EC 3, 4, 24, 24)	Gelatins, Coll Typ IV, V, VII, XI, <i>Fibronectin</i> , <i>Laminin</i> , Elastin, Proteoglycane
	<i>MMP-9</i>	<i>Gelatinase B</i> , 92 kD Kollagenase Typ IV (EC 3, 4, 24, 35)	Gelatins, Coll Typ IV, V, Elastin, EntAktin, Proteoglycane
Stromelysine	<i>MMP-3</i>	<i>Stromelysin 1</i> (EC 3, 4, 24, 17)	Gelatins, Coll Typ III, IV, IX, X, Kollagen Telopeptidasen, Proteoglycane, <i>Fibronectin</i> , <i>Laminin</i>
	<i>MMP-10</i>	Stromelysin 2 (EC 3, 4, 24, 22)	Coll Typ IV, Proteoglycane, Laminin, Fibronectin
	<i>MMP-11</i>	Stromelysin 3	Unbekannt
Andere	<i>MMP-7</i>	Matrilysin, PUMP-1 (EC 3, 4, 24, 33)	Proteoglycane, Fibronectin, Gelatine, Coll Typ IV, Elastin, EntAktin
	<i>MMP-12</i>	Metalloelastase (EC 3, 4, 24, 65)	Elastin
	<i>MT-MMP</i>	Membrane-type MMP	Coll Typ IV, Gelatin, proMMP-2

3.4.4.1. MMP-2, MMP-3 und MMP-9

Von den zirka 20 bekannten Mitgliedern der Matrixmetalloproteinasen-Familie wurden in der vorliegenden Arbeit MMP-2, MMP-3, MMP-9 und deren Inhibitor TIMP-1 untersucht.

Es werden die MMP-2, -3 und -9 in ihren Ergebnissen zusammenfassend erläutert, da keine gravierenden Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen auftraten.

In den Kontrollgefäßen waren die MMPs im Endothel zu finden. Adventitia und Tunica media waren nur geringgradig und unregelmäßig angefärbt (Abb. 28).

Verglichen mit den Kontrollgefäßen zeigt sich sowohl in den 8-wöchigen, als auch in den 6-monatigen Gefäßen innerhalb der Media ein deutlicher Unterschied der MMP-Expression zu Gunsten der Kontrollgefäße (Abb. 28-30).

Innerhalb der Neointima ergibt sich bei MMP-2 und MMP-3 eine erhöhte Neointimamarkierung bei den 8-wöchigen Gefäßen, wohingegen die MMP-9-markierten Neointimabereiche beider Entnahmezeitpunkte nahezu gleichstark markiert waren (Abb. 35).

Bei dem Vergleich der beiden Zeitpunkte untereinander ergab sich, dass die Markierung der MMP-Expression der Neointima 8 Wochen nach Konstriktorimplantation stärker war als die Markierung der 6 Monatsgefäße (Abb. 36-37). Die MMP-Expression innerhalb der Media bei beiden Zeitabschnitten war im Vergleich zur Neointima deutlich geringer (Abb. 34-35).

3.4.4.2. Tissue Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen

Die Aktivität von MMPs wird durch ihre natürlichen Inhibitoren reguliert, den TIMPs und den Plasminogenaktivatoren. TIMP-1 wird von einer Vielzahl von Zellen, einschließlich den Endothelzellen, Fibroblasten und den SMC (smooth muscle-cells) sezerniert ⁴⁷⁻⁵⁰.

TIMP hemmt die MMPs und verhindert die proteolytische Zersetzung einer breiten Reihe von Komponenten, wie Elastin, Laminin, Proteoglycane, Fibronectin (MMP-3, 57 kD; MMP-12, 57 kD), Kollagen I, III (MMP-1, 55 kD) und Kollagen IV (MMP-9, 92 kD) ⁵¹. Durch die Blockade von Plasminogenaktivatoren wird die MMP-Aktivität gehemmt ⁵².

Der Inhibitor reagiert nahezu entgegengesetzt zu den MMPs. Im medialen Bereich war eine starke, gleichmäßige Färbung zu beobachten, wohingegen die Adventitia und das Endothel für TIMP-1 negativ waren (Abb. 31).

Die Markierung des MMP-Inhibitors TIMP-1 in der Media war in den Kontrollgefäßen deutlich schwächer als bei den 8-wöchigen und 6-monatigen Gefäßen (Abb. 34).

Eine relativ geringe Expression des TIMP-1 ergab sich bei beiden Neointimagruppen. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass die Expression von TIMP-1 im Zeitverlauf auf zirka das Doppelte in der Neointima anstieg (Abb. 36-37).

Im Zeitvergleich ist ein Abfall der Mediaexpression und eine Zunahme der Neointimaexpression festzustellen.

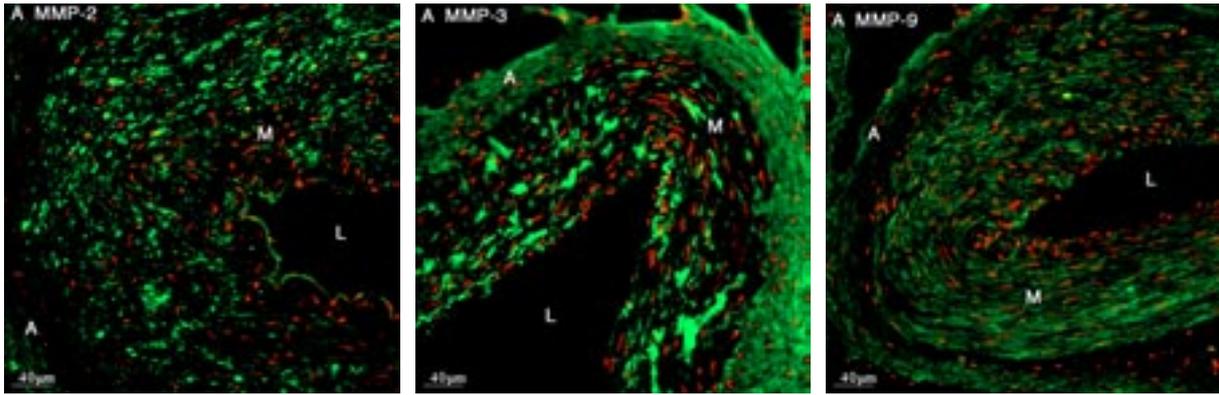


Abb. 28 Kontrollgefäße

Die Verteilung der Matrixmetalloproteinasen-2, -3 und -9 innerhalb der Tunica media ist gleichmäßig. Die Adventitia ist mäßig angefärbt. Das lumen ist frei.

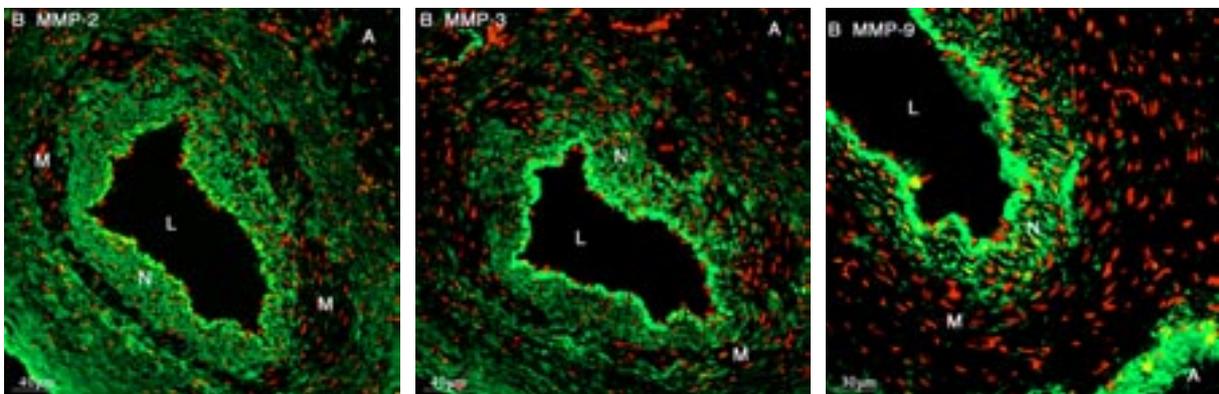


Abb. 29 8-wöchige Kollateralgefäße

Eine deutlich stärkere Fluoreszenz in der Neointima bei allen drei MMPs als Zeichen hoher Migrationsaktivität ist zu beobachten. Die Fluoreszenzstärke in der Media hat abgenommen.

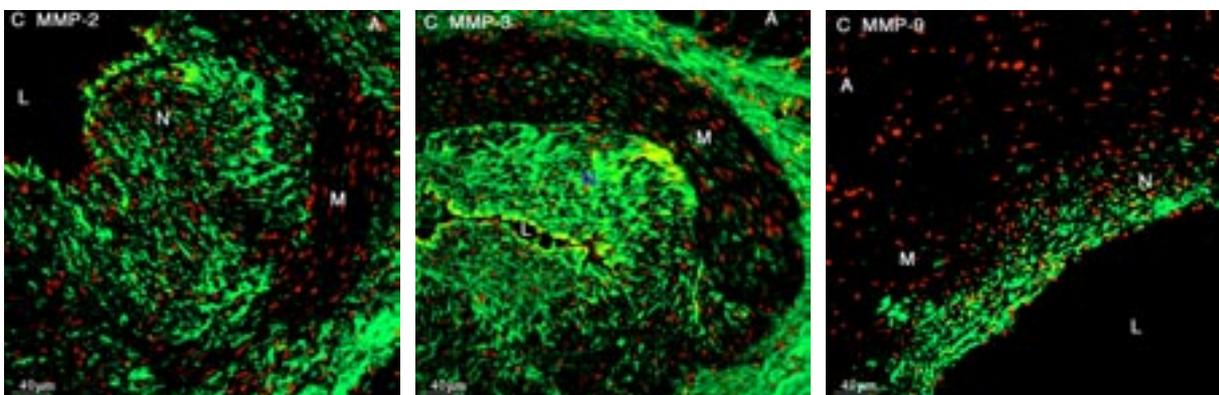


Abb. 30 6-monatige Kollateralgefäße

Auch hier sind die Unterschiede zwischen neointimaler und mediaer Fluoreszenzstärke erkennbar.

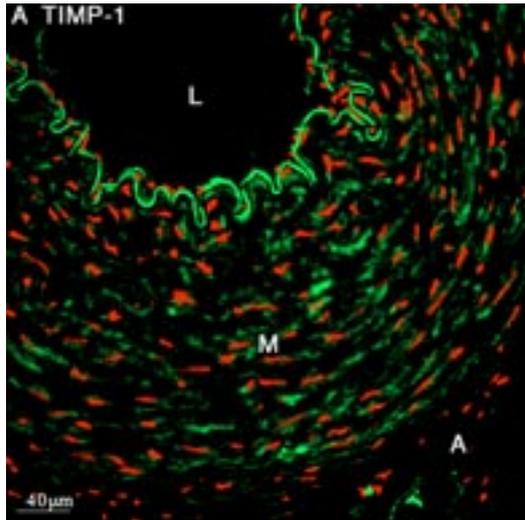


Abb. 31 Konrollgefäß

Die Verteilung von TIMP-1 in der Media ist gleichmäßig. Vergleicht man die Fluoreszenzstärke mit den MMPs (Abb. 28), so ist sie vergleichbar.

Die auffällige Färbung der Endothelregion entsteht durch die Autofluoreszenz der Membrana elastica interna.

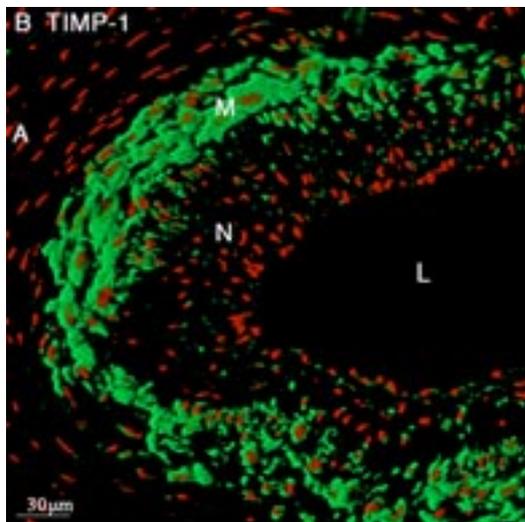


Abb. 32 8-wöchiges Kollateralgefäß

Adventitia und Neointima sind kaum angefärbt. Es zeigt sich hier ein gegensätzliches Bild zu der Fluoreszenzstärke von MMP (Abb. 29).

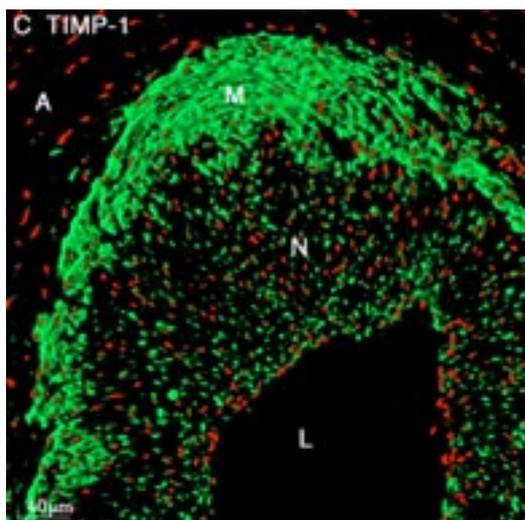


Abb. 33 6-monatiges Kollateralgefäß

Das Verteilungsmuster von TIMP-1 zeigt eine starkes Aufkommen in der Media und eine geringe Expression in der Neointima.

Das gegensätzliche Verteilungsmuster ist bei den MMPs zu beobachten (Abb. 30).

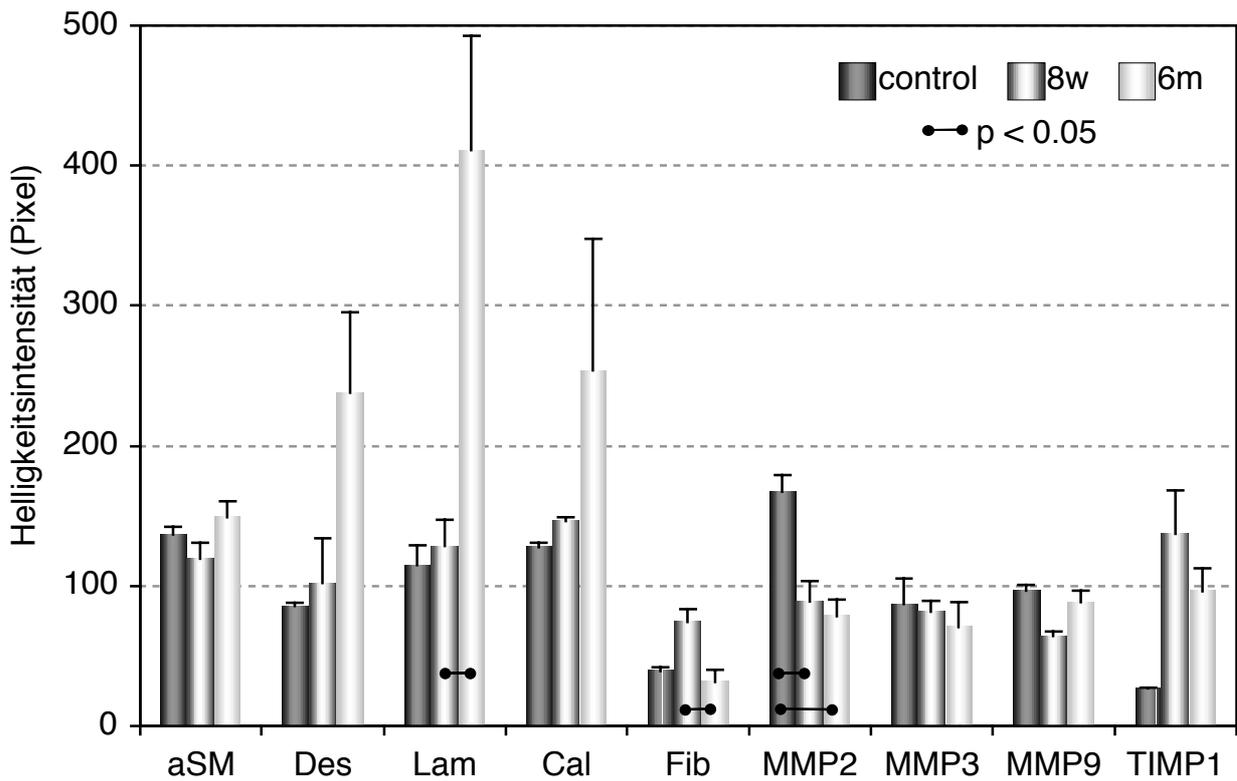


Abb. 34 Fluoreszenzintensität innerhalb der Tunica media

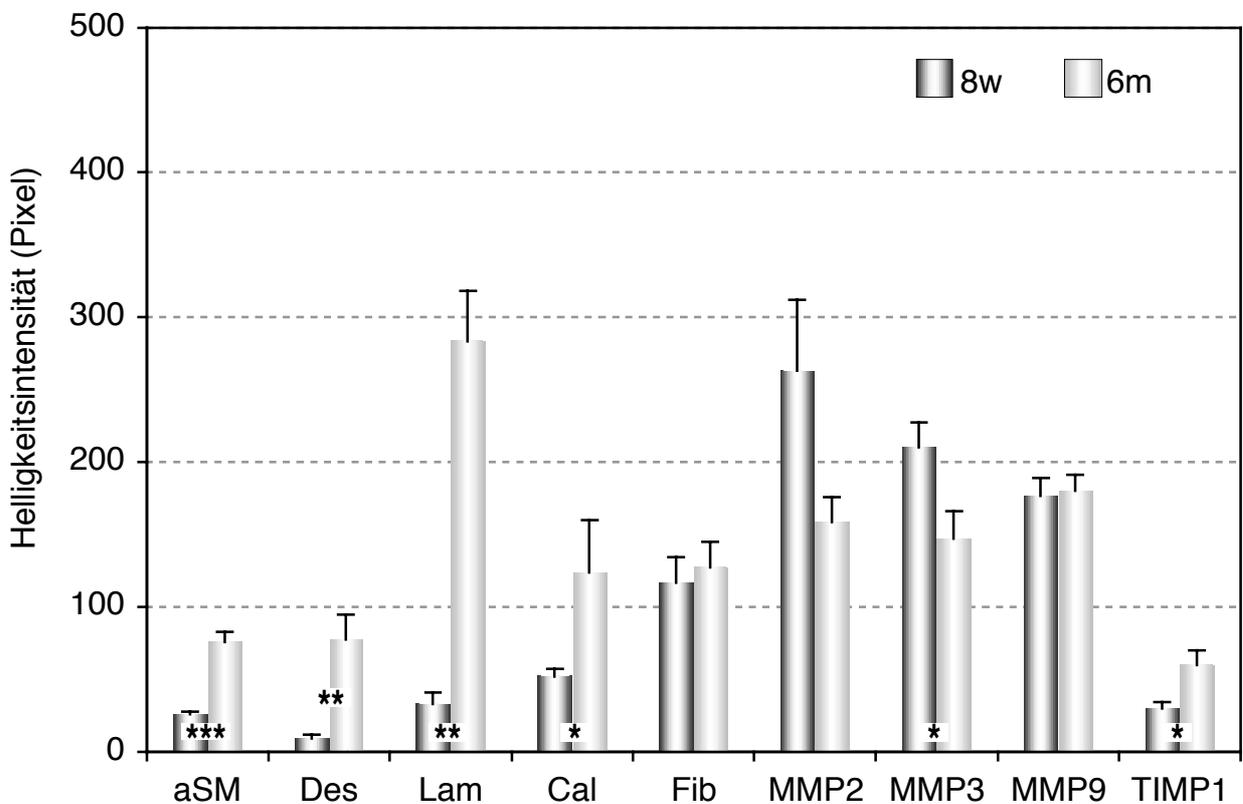


Abb. 35 Fluoreszenzintensität innerhalb der Neointima

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

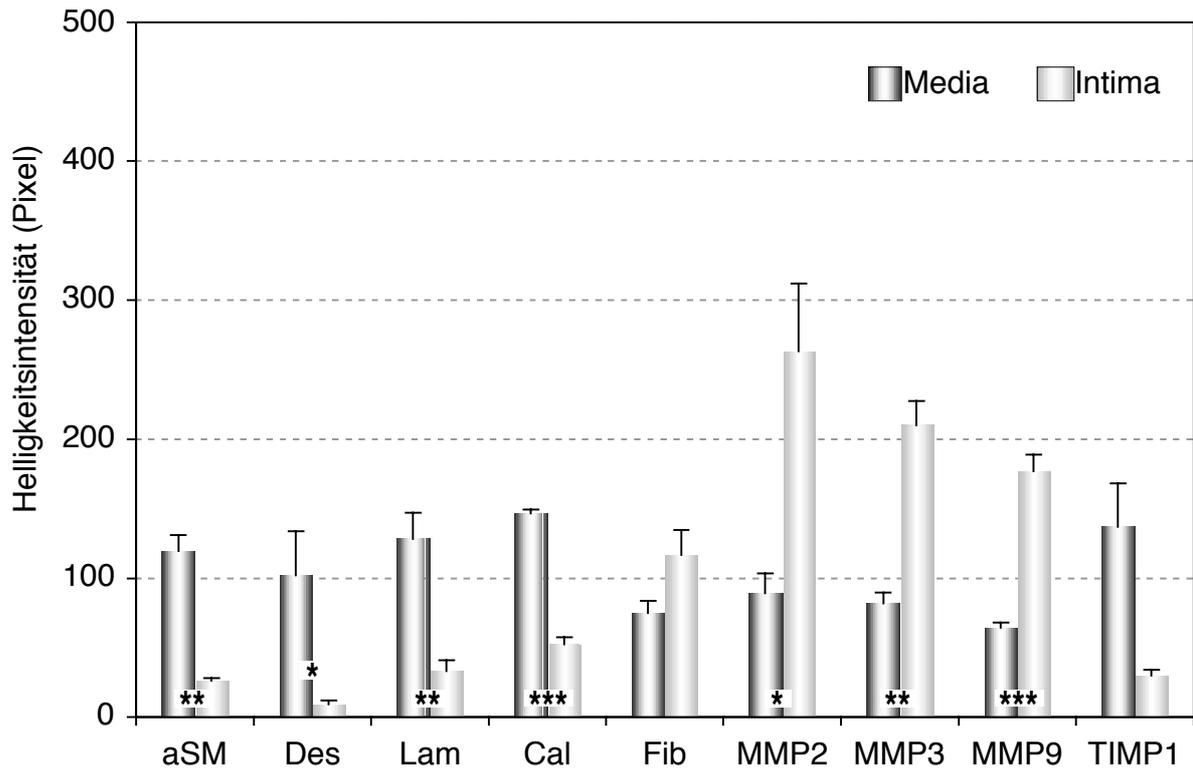


Abb. 36 Vergleich der Fluoreszenzintensität von Tunica media und Neointima bei 8 Wochen nach Ameroidimplantation. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

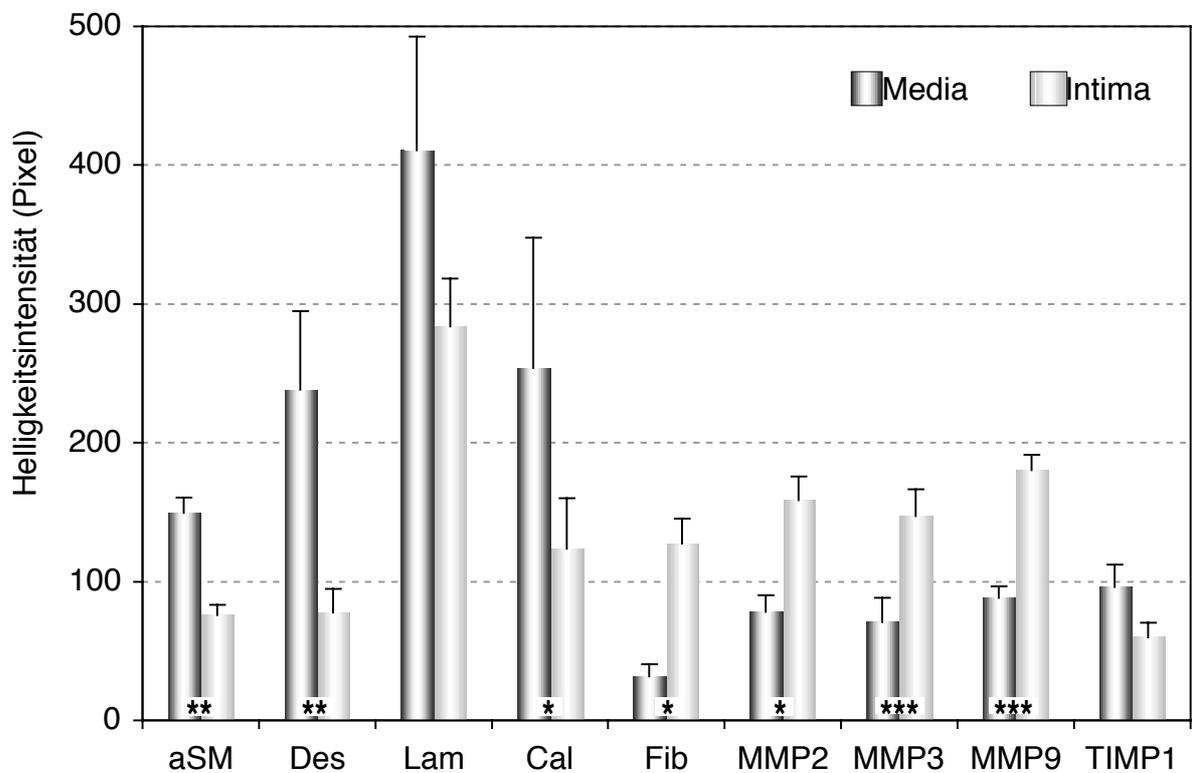


Abb. 37 Vergleich der Fluoreszenzintensität von Tunica media und Neointima bei 6 Monaten nach Ameroidimplantation. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

4. Diskussion

Koronarer Kollateralkreislauf

Schon 1669 fand Lower heraus, dass „...Gefäße, die am Herzen Blut führen..., zusammenkommen und hier und dort durch Anastomosen verbunden sind“⁵³. Albrecht von Haller demonstrierte 1757 die Existenz von Anastomosen, indem er sie freipräparierte⁵⁴. Ihm widersprachen einige der damals bekannten Anatomen, wie Hyrtl⁵⁵, Henle⁵⁶, Cohnheim und von Schultheiss-Rechenberg⁵⁷ oder auch Dragneff⁵⁸. Sie lehnten die Existenz solcher Gefäße kategorisch ab und definierten diese als Endarterien.

Erst Spalteholz gelang es, durch Darstellung der Gefäße mittels Injektion, die Existenz von Anastomosen der Gefäße am Herzen klar darzulegen. Er definierte Kollateralarterien als Verbindungen zwischen Abzweigungen von Gefäßen, die das gleiche Areal versorgen. Anastomosen hingegen definierte er als Verbindung zwischen zwei unabhängigen Arterien^{59,60}.

Durch die damals neu eingeführte Röntgentechnik konnten Jamin und Merkel Arteriographien durchführen, die die Ergebnisse Spalteholz' bestätigten⁶¹. Dies führte Gross zur Annahme, dass Anastomosen am Herzen notwendig sind und dass sie reichlich vorkommen müssen⁶².

Durch seine genauen Arbeiten konnte schliesslich Fulton die Anastomosen des gesunden und kranken menschlichen Herzens genau und unwiderlegbar darstellen².

Der koronare Kollateralkreislauf beim Menschen ist meist nur ungenügend ausgebildet. Im Gegensatz dazu haben zum Beispiel Meerschweinchen, Katzen oder auch Hunde präexistente Arteriolen, die im subepikardialen Bereich liegen und bei Bedarf proliferieren können. Sie kommen einem Kollateralkreislauf gleich, der für die Blutversorgung gefährdeter Myokardabschnitte verantwortlich ist¹.

In Abhängigkeit von bestimmten Faktoren, die im Folgenden noch näher beschrieben werden, werden die Kollateralgefäße restrukturiert und einem Vascular remodeling unterworfen. Mit „*Remodeling*“ ist die Veränderung der extrazellulären Matrix und die räumliche Umorientierung von Zellen und intrazellulären Komponenten mit der daraus resultierende Größenveränderung des Gefäßes gemeint^{1,3,5,15,63}.

Schon früh wiesen Schaper et al. dem Vascular remodeling als Reaktion auf hämodynamische Veränderungen, wie veränderter Blutfluß oder vasoaktive

Substanzen, als Folge einer Gefäßstenose oder eines Gefäßverschlusses eine wichtige Rolle zu ^{1,64-66}. Später wurden diese Arbeiten von anderen Arbeitsgruppen bestätigt.

1963 nannte Liebow drei prinzipielle Faktoren, die für das Gefäßwachstum von Bedeutung sind. Diese wurden von anderen Arbeitsgruppen ergänzt und vervollständigt ⁶⁷:

1. Mechanische Beanspruchung

- a) Blutdruck innerhalb des Gefäßes ⁶⁰;
- b) Druckgradient innerhalb der Kollateralen ⁶⁸
- c) Blutfluß und –geschwindigkeit im Gefäß ⁶⁹⁻⁷².
- d) Die tangentielle Beanspruchung (Scherkräfte) der Gefäßwand triggert die Zellproliferation ⁶⁴. Erstmals konnte die Zellproliferation innerhalb der Gefäßwand von Schaper et al. quantitativ durch Autoradiographie untermauert werden ⁶⁵. Sie waren die ersten, die mit Hilfe der Autoradiographie die DNA-Synthese bei wachsenden Kollateralgefäßen darstellten ¹

2. Chemische Einflüsse

Hypoxie, beziehungsweise ein Mißverhältniss zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Myokards. Der Hauptreiz der Angiogenese ist Sauerstoffmangel, der zur Expression von „Hypoxia-Inducible Factor“ (HIF) führt ⁷³. HIF bindet an den Promotor des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Gens. VEGF ist ein endothelspezifisches Mitogen und erhöht die Gefäßpermeabilität. Er ist der stärkste bisher bekannte Angiogenesetrigger. Ein Fehlen des Gens ist für den Organismus tödlich, da er unfähig ist, Gefäße zu bilden ⁷⁴.

3. Hereditäre Faktoren

Die genetische Disposition spielt bei dem Wachstum kollateraler Gefäße eine wichtige Rolle. Das wird deutlich, wenn man sich das Verteilungsmusters der Kollateralgefäße, die sich von Spezies zu Spezies unterscheiden, betrachtet:

bei Hunden und Schafen überwiegt die linke Koronararterie. Bei Schweinen kommt gleichmäßig sowohl der „Linkstyp“ als auch der „Rechtstyp“ vor. Beim Menschen kann sowohl die erste, als auch die zweite Variante vorkommen ⁷⁵.

Es können zwei verschiedene Formen des Gefäßwachstums unterschieden werden:

1. Die *Angiogenese*, die Kapillaren durch „sprouting“ *neu* entstehen lässt, und
2. Die *Arteriogenese*, die das Wachstum *präexistenter* Arteriolen im Gewebe beschreibt ^{4,76,77}.

Der grundlegende Unterschied zwischen Arteriogenese und Angiogenese ist die Tatsache, dass bei der Arteriogenese die ursprüngliche Anzahl der präexistenten Kollateralen zu Gunsten einiger großer Kollateralgefäße dezimiert werden. Bei der Angiogenese hingegen steigt die Anzahl der Kollateralkapillaren.

Der Anstieg des Durchmessers einzelner größerer Gefäße ist funktionell viel bedeutsamer als viele Kapillaren zusammen. Dieser Unterschied wurde auch durch Blutdruckmessungen in den distalen Gefäßanschnitten bei Arteriogenese⁷⁸ und Angiogenese⁷⁹ beobachtet.

1971 wurde von der Arbeitsgruppe um Schaper die Bedeutung der Blutdruckdifferenz für die Arteriogenese beschrieben. Sie beschrieben den Shear-Stress innerhalb der präexistenten Kollateralgefäße, als den stärksten Reiz für die Arteriogenese. Kommt es zur Stenose, so steigt der Druckgradient in den Gefäßen proximal (Hochdruck) und distal (Niederdruck) der Stenose stark an. Es kommt zu Scherkräften innerhalb des Gefäßes, die über dem Hundertfachen der Norm liegen¹. Dies führt zur Endothelaktivierung mit der Folge der gesteigerten Expression von Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), das zur Einschwemmung von Monozyten in die Gefäßwand führt. Die Endothelaktivierung beinhaltet ebenfalls die erhöhte Stimulierung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1⁸⁰. Die Monozyten aktivieren und exprimieren ihrerseits Proteinase, vor allem die MMPs, um ein kontrolliertes Remodeling des präexistenten Gefäßes zu ermöglichen. Die entstandenen Endothelläsionen führen zur Extravasation von Plasmaproteinen in die Adventitia⁸¹.

Kommt es nun zu einem Gefäßverschluß, so unterziehen sich die präexistenten Arteriolen einem strukturellen Remodeling^{1,3,82-84}. Es kommt zu einer Verdickung der Kollateralgefäßwand, wobei das Lumen nicht verengt werden sollte⁸¹.

Dies ist ein wichtiges Kriterium, da nur das Vorhandensein eines Lumens den Blutfluß und damit die Sauerstoffversorgung und somit das Überleben des Myokards sichert.

Kommt es jedoch im Verlauf des Remodeling zu Fehlern in der Proteinmatrix oder zum Fehlen von Proteinen, führt dies zu einer Störung des endothelialen Zellgefüges und damit zum Ausbleiben des Gefäßwachstums^{85,86}.

Die Zusammensetzung und etwaige Veränderungen dieser Proteinmatrix wurde am Hundeherzen untersucht. Aus zwei Gründen wurde das Modell des Hundeherzens gewählt:

Erstens enthält das Hundeherz eine Vielzahl präexistenter Gefäße, die zum Wachstum angeregt werden können, wenn eines der Hauptversorgungsgefäße verschlossen wird.

Zweitens tritt im Hundeherzen zum einen nach einer langsamen Okklusion einer Herzkranzarterie sehr viel seltener ein Myokardinfarkt auf und zum anderen läßt sich die Kollateralgefäßentwicklung gut beobachten ^{1,3}.

Da das Vascular remodeling nicht ohne Proteolyse und Antiproteolyse erfolgt, galt das Interesse den Proteinen und ihrem Expressionsmuster in der Gefäßwand innerhalb der verschiedenen Zeitphasen der Kollateralgefäßentwicklung. Die morphologischen und immunzytochemischen Untersuchungen fanden sowohl während (8 Wochen nach Ameroidkonstriktorimplantation) als auch nach (6 Monate nach Ameroidkonstriktorimplantation) der aktiven Wachstumsphase statt.

Die hier behandelten Fragestellungen führen die 1997 verfasste Arbeit von Frau Claudia Wolf mit dem Titel „*Veränderungen der Proteinexpression in myokardialen Kollateralgefäßen mit besonderem Aspekt der extrazellulären Matrix*“ und die Dissertation von Frau Regina Vosschulte von 1999 mit dem Arbeitstitel „*Kollateralwachstum: Einflüsse von Wachstumsfaktoren und Matrixmetalloproteinasen auf die Zellproliferation und Zellmigration*“ durch Quantifizierung der Proteinexpression weiter.

Neointima

In einem physiologischen Koronargefäß findet sich eine definierte Schichtenfolge der Gefäßwandstruktur. Von peripher hin zum Lumen werden Tunica adventitia, Tunica media und die Tunica intima unterschieden. Die letzten zwei Schichten sind durch die Lamina elastica interna voneinander getrennt. Die Tunica intima ist nach Sary et al. definiert als eine Region zwischen der endothelialen Oberfläche und der Lamina elastica interna, welche die luminale Grenze zur Tunica media darstellt ⁸⁷.

Der zarten Lamina elastica interna kommt hier bei der Erhaltung der Schichtgrenzen des Gefäßes eine wichtige Rolle zuteil. Ihre anatomische Funktion als Trennmantel zwischen Tunica media und Tunica intima ist für den Erhalt der physiologischen, einschichtigen Tunica intima sehr wichtig.

Aus Arbeiten von Schaper et al. und Cai et al. geht hervor, dass ein Reißen der Lamina elastica interna unter anderem eine Bildung einer Neointima zur Folge

hat, die aus einer gesteigerten Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen resultiert ^{1,3,66}.

Die Integrität der Lamina elastica interna kann durch verschiedene Parameter beeinflusst werden. Es können direkte, indirekte oder auch physiologische Parameter zu einem Gefäßumbau führen:

Zum einen können invasive medizinische Eingriffe, wie die Ballondilatation verengter Koronargefäße oder auch Embolektomien dafür verantwortlich sein, dass die elastische Membran brüchig wird oder an einigen Stellen reißt, und damit zur Bildung einer Neointima führt.

Zum anderen können aber auch Mechanismen, die vordergründig mit einer Verletzung der Tunica intima nichts zu tun haben ein Neointimawachstum hervorrufen, wie Claussel et al. in ihrer Arbeit beschreiben. Hier scheinen auch indirekte Faktoren, wie eine Immunreaktion mit Expression von Entzündungsmediatoren, positiven Einfluß auf die Entstehung einer Neointima zu haben ⁸⁸.

Eine Vergrößerung der Arterien Durchmesser ist auch physiologisch als Anpassungsvorgang der Gefäße auf veränderte Milieubedingungen von Mann et al. beschrieben worden. Er untersuchte schon 1972 bei Masai-Stammesangehörigen in Afrika die Größenveränderungen der Koronarterien in Abhängigkeit zum Alter.

Er stellte fest, dass das Koronararterienlumen mit zunehmendem Alter zunahm und folgerte daraus, dass dies eine protektive Regulation darstellte, wodurch es trotz Arteriosklerose nicht zu einer Koronarstenose kommt ⁸⁹. Auch Herity et al. stellt das Vascular remodeling als protektive Regulation der Arterien zur Diskussion ⁹⁰.

Ein weiterer Aspekt für das physiologische Vorkommen des Vascular remodeling innerhalb der Gefäßentwicklung zeigt die Arbeitsgruppe von Gittenberger-de Groot et al. auf. Sie beschreiben den Verschluss des Ductus arteriosus Botalli als einen physiologischen Prozess, der ganz und gar auf die Verdickung der Intima angewiesen ist:

Der Ductus ist eine muskuläre Arterie, die den Truncus pulmonalis und den Aortenbogen während der Fetalperiode miteinander verbindet. Normalerweise beginnt der Verschluss des Ductus im zweiten Trimenon der Schwangerschaft und obliteriert vollständig kurz nach der Geburt ⁹¹.

Bei dem Auftreten einer Stenose im Gefäßsystem werden die präexistenten Kollateralgefäße rekrutiert. Die Blutmenge, die physiologischerweise durch die

sonst offene Arterie fließt, wird nun durch die vorhandenen, jedoch im Lumendurchmesser sehr kleinen Kollateralen gepresst.

Die so entstandene sehr grosse Durchflussrate führt zu einem grossen Abscherstress, „Shear-Stress“, der die Innenwand der Gefässe, durch den auf sie ausgeübten Druck, stark belastet. Dieser Shear-Stress hat einen großen Einfluß auf die Proteinturnover-Rate innerhalb der Gefäßwand ⁹².

Diesen Vorgang beschrieb Laplace wie folgt in seiner Gleichung: Der Druck (p), welcher in einem Hohlorgan von einer bestimmten Wandspannung (T) erzeugt wird, nimmt mit dem Radius des Hohlorgans ab ($p \sim T/p$).

Wird nun das präexistente Gefäß durch den erhöhten Blutfluss stark belastet, dehnen sich die Gefäßwände, die Wandspannung nimmt stark zu, wobei die Wanddicke abnimmt. Es kommt zum teilweise Einreißen der Lamina elastica interna und zu einem starken Anstieg der Scherkräfte auf die Gefäßwand.

Die hohen Scherkräfte führen zu einer Aktivierung des Endothels, welches auf diese Weise seine Permeabilität steigert. Es kommt zur Extravasation und auf diesem Wege zur eventuellen Koagulationsgefahr innerhalb des Gefäßsystems. Im weiteren kommt es zur Stimulation des Plasminogenaktivierungs-Systems, dem extrazellulären Plasminogen-Pool.

Plasmin transferiert die Zymogene des MMPs, das Pro-MMP, in die aktive Form ^{39,40,93,94}. Die aktiven MMPs können nun ihrer Aufgabe als Proteinasen nachkommen und die Degradation von extrazellulären Matrixproteinen beginnen, die letztlich zur Neointimabildung führt ⁹⁵.

Auch auf einem zweiten Wege können die Pro-MMPs aktiviert werden. Die schon oben angesprochene Endothelaktivierung beinhaltet auch die Aktivierung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF und PDGF ^{96,97}. Diese führen zur Proteinexpression, Zellmigration und Zellproliferation. Die so aktivierten Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen aktivieren ihrerseits wieder die Pro-MMPs.

Es kommt zu einer Veränderung der Intimaschicht, die physiologischerweise aus einer Schicht aus Endothel, Basallamina und Lamina elastica interna besteht und nun zu einer mehrschichtigen, 4- bis 6-schichtigen Zellage anwächst. Die Zellschichten erscheinen ungeordnet und in ihrer Proteinexpression ganz anders als in einem vollausgebildeten „reifen“ Gefäß.

In einem Gefäß, das dem Vascular remodeling unterlag, liegen die meisten intimalen glatten Muskelzellen, im Gegensatz zu ihrer physiologischen, zirkulären

Richtung, in einer longitudinalen und sind eingebettet zwischen Kollagen- und Elastingeflecht. Die intimale Verdickung, die auch als *Intimakissen* bezeichnet wird, kann konzentrisch (diffus) oder exzentrisch (fokal) sein ⁸⁷. Dies wurde an zahlreichen wachsenden Kollateralgefäßen gleichfalls beobachtet.

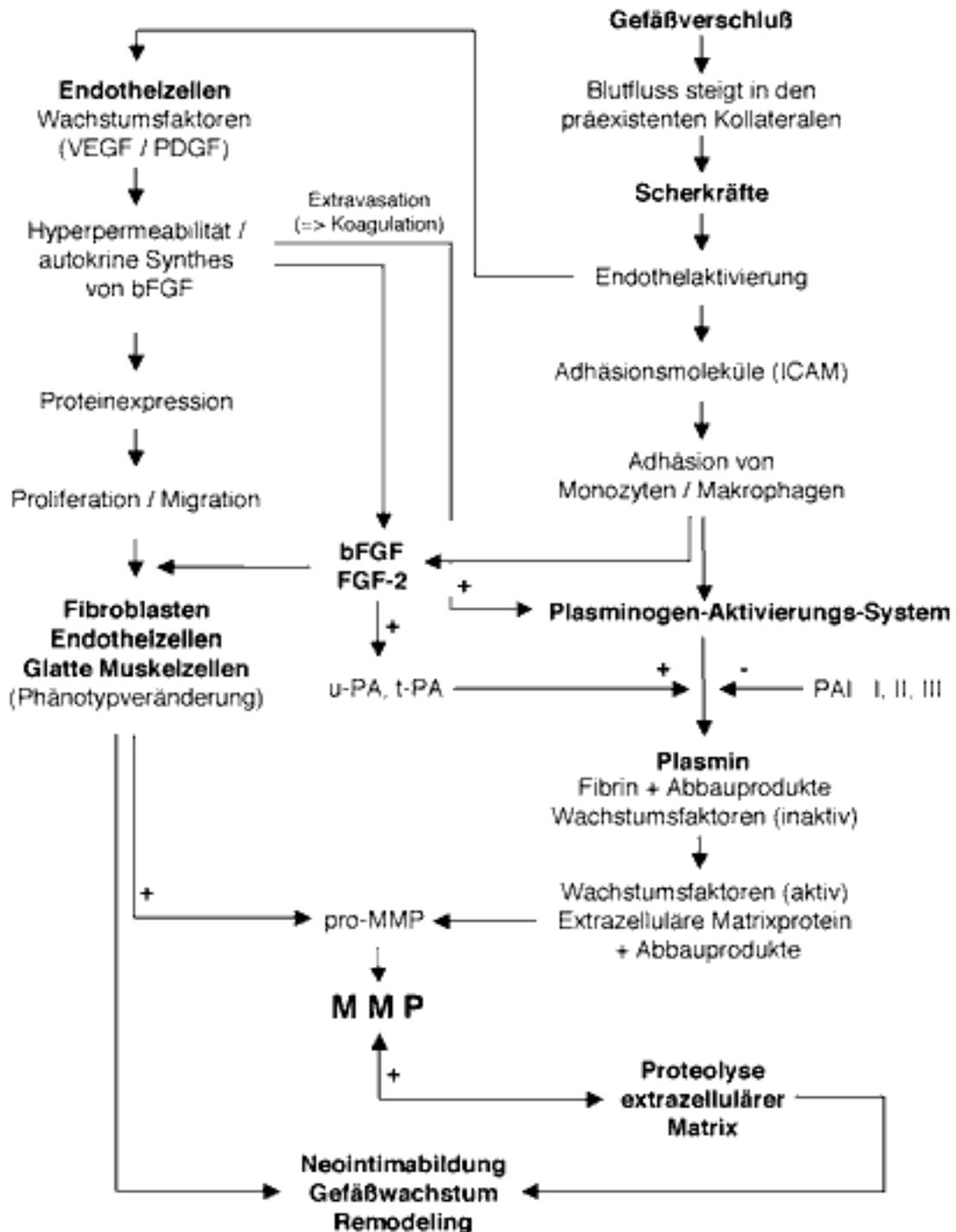


Abb. 38: *Vascular remodeling: Schema zum möglichen Mechanismus und Interaktion der unterschiedlichen Faktoren, die bei Gefäßwachstum eine Rolle spielen.*

Intrazelluläre Proteine

Kontraktile Proteine

Auch alpha-smooth muscle Aktin⁹⁸⁻¹⁰⁰ und Desmin^{101,102} wurden als Marker verwendet, um das Vorhandensein glatter Muskelzellen zu verifizieren.

alpha-smooth muscle Aktin

alpha-smooth muscle Aktin wurde aus zwei Gründen gewählt:

Der *erste Grund* lag darin, eine verlässliche Markierung glatter Muskelzellen zu haben, um das Vorhandensein anderer Zellen in der Neointima weitestgehend auszuschliessen. Wie aus verschiedenen Arbeiten zu entnehmen war, kam hierfür in erster Linie alpha-smooth muscle Aktin in Frage⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Der *zweite Grund* lag in der Hypothese, dass migrierende glatte Muskelzellen innerhalb der Neointima eine Differenzierung von entdifferenzierten hin zu adulten Zellen durchlaufen.

Saga und Gabbiani et. al beschrieben alpha-smooth muscle Aktin als einen geeigneten Marker für glatte Muskelzellen, da Aktin während der Reifung glatter Muskelzellen zunehmend exprimiert wird. Dies kann man sich zur Identifizierung glatter Muskelzellen zu Nutze machen^{11,99}. Die so beschriebenen Eigenschaften wurden im Versuchsverlauf bestätigt.

Innerhalb der Neointima kam es in einer Zeitspanne von zirka vier Monaten zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz bei alpha-smooth muscle Aktin. Dieser Anstieg beschreibt die im Zeitverlauf sich ausdifferenzierenden, migrierten glatten Muskelzellen der Neointima.

Die konstant bleibende Fluoreszenzstärke in der Media im gleichen Zeitraum belegt die Hypothese, da hier eine Differenzierung der Zellen bereits stattgefunden hat und so keine Änderung der Fluoreszenzstärke zu erwarten ist.

Calponin

Auch das intrazelluläre Protein Calponin ist ein wichtiger Differenzierungsmarker für glatte Muskelzellen¹². Ein dreidimensionales Modell des Calponinmoleküls ist in der Abbildung 39 dargestellt.

Die Arbeitsgruppe um Gimona konnte eine veränderte Expression des Calponin in zeitlicher Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Muskelzelle nachweisen¹³.

Die Bedeutung des Calponins liegt jedoch nicht nur in seiner Eigenschaft als Differenzierungsmarker, sondern auch in seiner Fähigkeit, eine Interaktion mit Aktin und Myosin innerhalb der Muskelzelle einzugehen^{103,104}. Durch diese Interaktion beeinflusst Calponin die Kontraktion der Muskelzelle in drei wesentlichen Punkten, die durch Windler et al. detailliert dargestellt wurden¹⁰⁵:

- 1) Während langer Kontraktionszeiten der Muskelzelle dient Calponin als „energiekonservierendes“ Protein, indem es die Bewegung des Aktinfilaments über dem immobilisierten Myosin inhibiert.
- 2) Calponin ermöglicht der Zelle eine Ca^{2+} -unabhängige Kontraktion, indem es durch die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert wird.
- 3) Calponin kann den Zustand der Relaxation der Muskelzelle aufrechterhalten.

Diese Eigenschaften machen deutlich, warum eine Expression des Calponins für die Funktionalität der Muskelzelle wichtig ist.

Es konnten in der quantitativen Fluoreszenzmessungen innerhalb der Media keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollgefäßen und den 8-Wochen-Gefäßen beobachtet werden. Jedoch konnte ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität innerhalb der Media und der Neointima im Zeitverlauf beobachtet werden. Hierfür könnten folgende Erklärungsansätze dienen:

- Es könnte darauf hindeuten, dass die Anpassungszeit des Gefäßes an die neuen rheologischen Gegebenheiten wahrscheinlich länger als 6 Monate dauert. Hier würde man eventuell bei längeren Okklusionszeiten als 6 Monate noch einen Abfall der Fluoreszenzstärke, auf den Wert der Kontrollgefäße, beobachten können.
- Zum anderen können die veränderten Fließeigenschaften des Blutes innerhalb der Kollateralarterien die neointimalen Zellen im Sinne eines Shear-Stress so stark beanspruchen, dass eine Aufregulierung des Calponins für die Zell- und Gefäßstabilität notwendig ist.

Um dies abschließend klären zu können, müssten noch weitere Untersuchungen, speziell am Protein Calponin, durchgeführt werden.

Zytosklettäre Proteine

Desmin

Desmin gehört zu den zytosklettären Proteinen, die sowohl in quergestreifter, als auch in glatter Muskulatur exprimiert werden¹⁰². Es gehört zu den muskelspezifischen Intermediärfilamenten, ist einer der frühesten Marker für Skelett- und Herzmuskelgewebe, markiert in allen Kardiomyozyten die Z-Banden und die Glanzstreifen¹⁰⁶ und verbindet den kontraktilem Apparat mit dem Sarkolemm und dem Nukleus¹⁰¹.

Arbeiten von Capetanaki et al. wiesen nach, dass Desmin-Null-Mäuse eine schwere Störungen im Muskelaufbau und der Muskelfaserarchitektur zeigten¹⁰¹. Dies macht die Bedeutung Desmins für die Muskelzellendifferenzierung deutlich.

Li et al. sprechen Desmin sogar eine Schlüsselrolle in der Myogenese zu¹⁰⁷. Sie beschreiben einen Unterschied in der Expressionsstärke des Desmin in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Myozyten und weisen nach, dass Desmin bei gesunden Myoblasten in niedrigen Mengen exprimiert wird. Zu Beginn von Differenzierungsphasen jedoch, wird diese Expressionsmenge um ein Vielfaches gesteigert¹⁰⁸.

Die von Li et al. beschriebenen quantitativen Unterschiede, abhängig vom Differenzierungsgrad, konnte ebenfalls bestätigt werden. Es konnte bei den Kollateralgefäßen im Zeitverlauf eine signifikante Expressionssteigerung für Desmin in Media und Neointima im Vergleich zu den Kontrollgefäßen festgestellt werden. Eine signifikante Erhöhung der Desminexpression zeigte sich vor allem innerhalb der Neointima im Zeitverlauf.

Desmin scheint während der Differenzierungsphase der Myozyten sein Expressionsverhalten als Reaktion auf die veränderten Umgebungsverhältnisse zu steigern, um, wie Darnell et al. und Kostin et al. beschreiben, der Muskelzelle und den Myofibrillen in ihr eine räumliche Ausrichtung und Ordnung im Zellgefüge zu ermöglichen^{14,109}. Dies würde auch die enorme Expressionssteigerung von Desmin von 8 Wochen-Gefäßen hin zu den 6 Monatsgefäßen innerhalb der Neointima erklären, die in den unseren Messungen beobachtet wurden.

Extrazelluläre Matrixproteine

Der extrazelluläre Matrixraum, der aus Elastin, Kollagen, Proteoglycanen, Wachstumsfaktoren, Proteinasen und Antiproteinase besteht, wird während der Kollateralgefäßentwicklung verändert und restrukturiert ⁸²⁻⁸⁴.

Die extrazelluläre Matrix unterstützt die zelluläre Regelmässigkeit, die strukturelle Integrität des Gewebes, die dreidimensionale Ausrichtung der Zellen im Raum und schliesslich die metabolischen Funktionen des Gewebes ^{15-17,110}.

Laminin

Laminin gehört, wie man in der Abbildung 40 erkennen kann zu den Makromolekülen mit einem komplexen Strukturaufbau.

Neben anderen Makromolekülen in der Basallamina ist Laminin als Teil einer spezialisierten Matrixstruktur lokalisiert und quantitativ das wichtigste nichtkollagene Matrixprotein der Basalmembran ^{18,20,21,111}.

Es gehört einer Familie von Basalmembran-Glycoproteinen an, die biologisch sehr aktiv ist ¹¹²⁻¹¹⁴ und in der Lage ist, die Zelladhäsion, das Zellwachstum, die Zellmorphologie, und auch die Zellmigration zu beeinflussen und die endgültige Realisierung der Zellfunktion zu ermöglichen ^{115,116}.

Neben den beschriebenen Eigenschaften ist Laminin, wie Thyberg et al. nachwies, auch in der Lage die Differenzierung von Phänotypen glatter Muskelzellen zu fördern ¹¹⁷. Risau und Lemmon zeigten, dass mit dem Maß an Gefäßreifung bei Hühnerembryos auch die Expression von Laminin zunahm ¹¹⁸.

Diese Eigenschaften des Laminin konnte in unseren Ergebnissen bei den 8 Wochen nach Okklusion und 6 Monaten nach Okklusion untersuchten Gefäßen im Hinblick auf die Expressionshöhe im Differenzierungsverlauf der glatten Muskelzellen bestätigt werden. Das Expressionsverhalten innerhalb der Media und Neointima war bei den Gefäßen 6 Monate nach Okklusion, im Vergleich zu den 8-Wochen-Gefäßen, signifikant erhöht. Dies läßt eine fortschreitende Reifung der Myozyten annehmen.

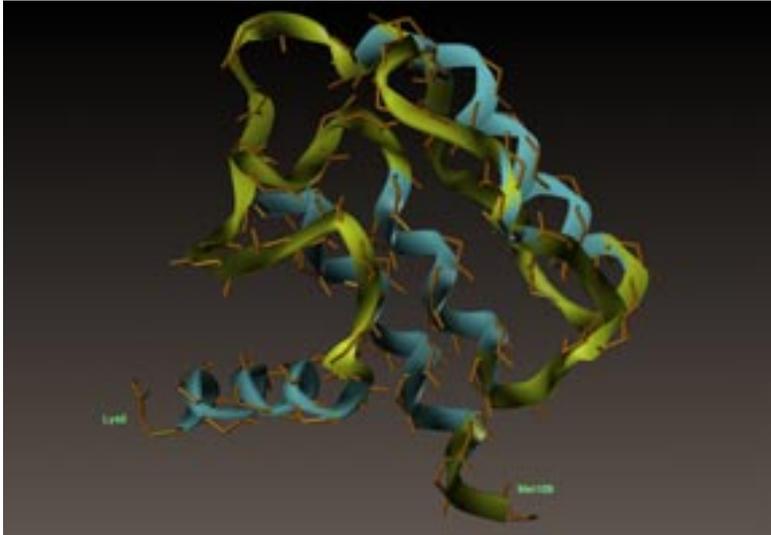


Abb. 39 *Dreidimensionale Darstellung des Calponinmoleküls.*

Bañuelos, S. et al.: Structure; 6; 1998; 1419-1431.

Software: SYBYL 6.5, Tripos inc., Mo; USA

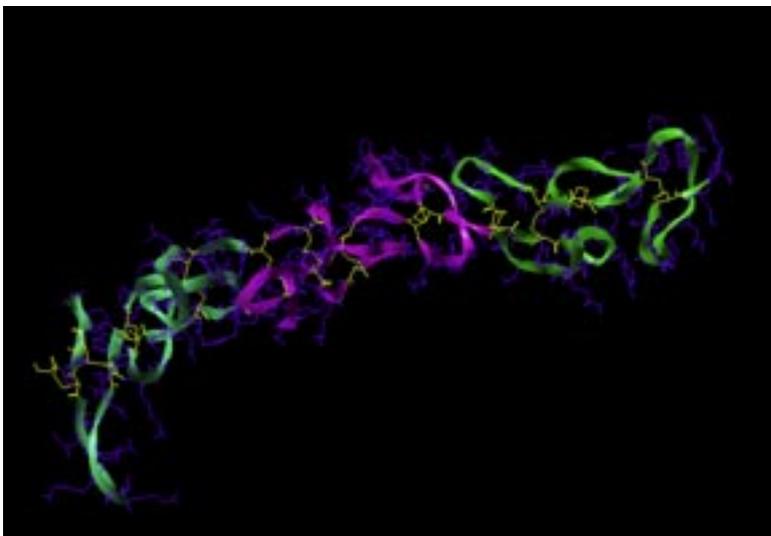


Abb. 40 *Dreidimensionale Darstellung des Lamininmoleküls.*

Stetefeld, J. et al.: Journal of Molecular Biology; 257; 1996; 644-657

Software: SYBYL 6.5, Tripos inc., Mo; USA

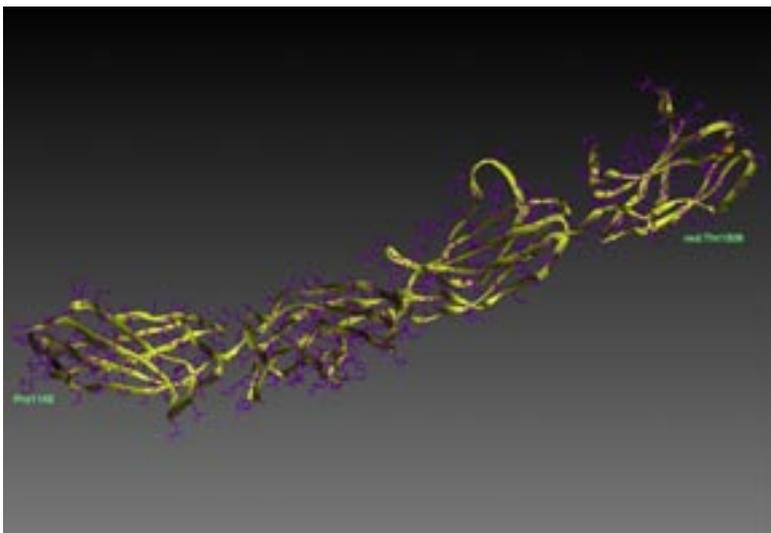


Abb. 41 *Dreidimensionale Darstellung des Fibronectinmoleküls.*

Leahy, D.J. et al.: Cell; 84(1); 1996; 155-164.

Software: SYBYL 6.5, Tripos inc., Mo; USA

Fibronectin

Fibronectin ist ein dimeres Glycoprotein mit einer Molekülmasse von 400 kDa (Abb. 41), das in Plasma, Körperflüssigkeiten und im Gewebe zahlreicher Spezies vorkommt ¹¹⁹. Fibronectin fördert die Adhäsion und Ausbreitung von Zellen in Kultur ^{22,120}, spielt bei der Blutgerinnung und der Wundheilung eine wichtige Rolle ^{24,121-124}.

Nicht zuletzt reguliert unter anderem Fibronectin in embryonalem Gewebe die Wachstumstätigkeit ^{22,125}. Daher kommt es fast ubiquitär im Körper vor ¹²⁶. Es steht dem Körper in zwei Formen als extrazelluläres Matrixprotein zur Verfügung:

- a) lösliche Form
- b) gewebsständige Form.

Das lösliche Fibronectin findet sich in allen Körperflüssigkeiten und ist somit die „mobile“ Form. Das unlösliche, zelluläre, gewebsständige Fibronectin gehört zur extrazellulären Matrix ^{22,127} und verteilt sich bei entzündlichen Prozessen jeglicher Genese frei im Gewebe ¹²⁸⁻¹³¹.

Fibronectin wird von verschiedenen Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Hepatozyten ^{132,133} oder auch Makrophagen ¹²⁴ sezerniert.

Fibronectin kommt in gesunden Gefäßen in der Media und Adventitia nur in sehr geringen Mengen vor ¹³⁴, wohingegen die Markierung in wachsenden Gefäßwänden deutlich ist. Gefäße, die sich noch in der Zellorganisation befinden, zeigen eine deutlich gesteigerte Expression von Fibronectin in allen Gefäßschichten ¹¹⁸.

Die Umwandlung der glatten Muskelzellen von einem kontraktile in einen synthetischen Phänotyp ist die Voraussetzung einer Proliferation. Fibronectin beeinflusst diese Umwandlung indirekt ²⁶, indem durch die Hemmung des Fibronectin sein proliferationsfördernder Effekt entfällt ¹³⁵.

Die Wichtigkeit des Fibronectins bei Umbauvorgängen im Gewebe wurde erst durch dessen Abwesenheit verdeutlicht: es kam zu Störungen im endothelialen Zellgefüge ^{85,86}. So war die Zelladhäsion stark eingeschränkt ^{132,133,136}.

Auch deuten die Ergebnisse von Castellani et al. auf die Bedeutung des Fibronectin hin, da sie bei Wachstum und Migration von Endothelzellen große Mengen Fibronectin in der extrazellulären Matrix nachweisen konnten ¹³⁷.

Neben der Förderung der Zelladhäsion ist Fibronectin auch in der Lage, die Expression der Matrixmetalloproteinasen, auf die später eingegangen wird, zu

stimulieren. Hieraus kann der hohe quantitative Anteil des Fibronectin an der extrazellulären Matrix während der Gewebsneuorientierung unter anderem erklärt werden ¹³⁸.

Im Gegensatz zu Laminin, das während der Gewebsreifung quantitativ zunimmt, kommt es bei Fibronectin nach Untersuchungen von Oyama und Ffrench-Constant et al. zu einem decrescendierenden Verlauf mit Zunahme der Reifung, bis hin zu einem nur noch spärlichen Vorhandensein bei adulten Zellen ^{134,139}.

Quantitativ wurde in der Tunica media ein signifikanter Unterschied in der Exprimierungsstärke zwischen den Kontrollgefäßen und den Gefäßen, 8 Wochen nach Okklusion, zu Gunsten der letztgenannten feststellen. Im Zeitverlauf sank die Exprimierung jedoch, bei den Gefäßen 6 Monate nach Okklusion, auf annähernd den Wert der Kontrollmedia ab.

Dies zeigte, dass die Tunica media, mehr als vermutet, Ort einer sichtbaren pathophysiologischen Veränderung innerhalb des Vascular remodeling darstellt.

Es scheint, dass glatte Muskelzellen 8 Wochen nach der Okklusion einen höheren Dedifferenzierungsgrad besitzen als die Zellen 6 Monate nach Okklusion. Der fast normale Fibronectingehalt in der Media, der älteren Gefäße könnte für die wahrscheinlich annähernd beendete Zellmigration aus der Media stehen.

Auch gibt es bei der Betrachtung der Neointima 8 Wochen und 6 Monate nach Okklusion ein anderes Bild als bei den zuvor beschriebenen Proteinen, bei denen die Expression der jeweiligen Proteine bis zum 6. Monat nach Okklusion stark angestiegen war. Die Fibronectinwerte nähern sich im Zeitverlauf denen der Kontrollgefäße.

Im Vergleich zur Expressionsstärke in der Tunica media sind zwar die neointimalen Werte beider Zeitpunkte deutlich höher, doch besteht hier nicht der deutliche Unterschied zwischen den 8 Wochen- und den 6 Monats-Gefäßen, den man in der Media beobachten kann.

Dieser deutliche quantitative Unterschied zwischen Neointima und Media deutet auf die wahrscheinlich viel höhere Beanspruchung der Neointima, im Sinne eines höheren Blutflusses und eines höheren Blutdrucks hin.

Hier müsste eine weitere Untersuchung zu einem späteren Zeitpunkt Aufklärung darüber bringen, ob die Kollateralgefäße sich schließlich im Sinne eines ausgeglichenen Proteinverteilungsmusters völlig an die neue Situation adaptiert haben oder ob es dauerhafte Veränderung in der Proteinverteilung gibt.

Proliferationsmarkierung Ki-67

Um die Proliferationsfähigkeit glatter Muskelzellen nach der Okklusion verifizieren zu können, musste ein Antikörper verwendet werden, der die Fähigkeit hat, mit nukleären Antigenen zu reagieren und so die Zellen zeigt, die sich in der Zellzyklusphase G₁ befinden²⁸⁻³⁰.

Erwartungsgemäß wurde in den Kontrollgefäßen keine proliferierenden Zellen nachgewiesen. Dies sprach für das Vorliegen adulter, enddifferenzierter Zellen.

Hingegen wurde in den Kollateralgefäßen, 8 Wochen nach Okklusion deutliche Ki-67 Markierungen gefunden, die für die mitotische Aktivität der Muskelzellen innerhalb der Gefäßwand sprach. Diese Ergebnisse wurden erwartet, da nach nur 8 Wochen nicht von einer abgeschlossenen Zelldifferenzierung ausgegangen werden konnte.

Jedoch wurde, entgegen den Erwartungen auch noch in neointimalen Zellen, 6 Monate nach einer Okklusion, deutliche Ki-67 Markierungen gefunden. Dies zeigte, dass offensichtlich auch noch 6 Monate nach einer Gefäßokklusion die sich ausdifferenzierenden Kollateralgefäße nicht zur Enddifferenzierung gelangt waren. Dieses überraschende Ergebnis verdeutlicht die Beanspruchung der Neointima beim „Remodeling“-Prozess und kann ansatzweise den über einen so langen Zeitraum hochregulierten Proteinturnover mit der in seiner Folge enorm verdickten Gefäßwand erklären.

Es scheint, als könne innerhalb der neu entstandenen Neointima zu jeder Zeit eine Zellproliferation stattfinden. Dieser Mechanismus macht die Neointima als Gewebsverband gegenüber wechselnden Milieuverhältnissen ausserordentlich flexibel. Die auch noch lange nach Okklusion bestehende Möglichkeit der Zellvermehrung macht die Gefäßwand gegenüber äußeren, auf sie wirkende Ereignisse flexibel.

Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitor

MMP-2, MMP-3, MMP-9

TIMP-1

Im folgenden sollen die Matrixmetalloproteine und ihr Inhibitor TIMP-1 zusammenfassend diskutiert werden.

Die MMPs sind in der Lage die wesentlichen Komponenten der extrazellulären Matrix (Kollagene, Laminin, Elastin, Fibronectin) abzubauen^{51,95} und werden als inaktive Proenzyme vor allem von Bindegewebszellen wie Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten und Endothelzellen aber auch von verschiedenen Tumorzellen, Makrophagen oder neutrophile Granulozyten sezerniert^{32,95}. Der streng regulierte Umbau der extrazellulären Matrix bei der Embryogenese, der Organ- und Gefäßbildung oder der Wundheilung zählt ebenso zu ihrem Einflussgebiet wie die dysregulierte Proteaseaktivität bei der rheumatoiden Arthritis, der Leberfibrose oder dem Wachstum und der Metastasierung von Tumoren^{140,141}.

Matrixmetalloproteinasen wird eine besondere Rolle bei der angiogenetischen Aktivität von Kollateralgefäßen zugesprochen^{83,142}. Dies konnte in den Versuchen bestätigt werden, da ihre Expression während der Kollateralgefäßentwicklung variierten.

Die meisten MMPs (Abb. 42) werden bei Bedarf *de novo* exprimiert. Die Aktivierung ist relativ komplex, da hierbei mehrere lösliche und membrangebundene Proteasen, Rezeptoren und Inhibitoren beteiligt sind⁹⁵ wie zum Beispiel Cathepsin G, Gewebekallikrein und hohe Plasminspiegel^{43-45,143} (Abb. 38).

Eine Aktivierung der pro-MMPs durch MMPs als positiver Feedback wurde ebenfalls beschrieben^{41,42} (Abb. 38).

Die Aktivität der MMPs werden durch ihre natürlichen Inhibitoren, den TIMPs, reguliert^{38,47-50} (Abb. 43). Das Molekül TIMP ist in der Lage Zellen die Migration zu blockieren. Eine Hochregulierung dieses Proteins hat in *in vitro* Versuchen die Migration von glatten Muskelzellen gehemmt^{144,145} oder sogar die metastatischen Fähigkeiten von Zellen unterdrückt¹⁴⁶.

Physiologischerweise werden die MMP-2, -3 und -9 in normalen Gefäßen sehr gering exprimiert, wie unsere Untersuchungen bei gesunden Gefäßen zeigten.

Hinzu kommt, dass der Turnover der Matrixproteine unter physiologischen Bedingungen sehr gering ist.

Es konnte ferner ein Gleichgewicht zwischen der Proteolyse und Antiproteolyse, das nicht nur bei gesunden Gefäßen, sondern auch bei Gefäßen, die mit der Proliferation abgeschlossen hatten, beobachtet werden. Bei den Messungen wurde ein bestimmtes Gleichgewicht zwischen MMPs und ihrem Inhibitor TIMP-1 deutlich, das zur Balance zwischen Proteolyse und Antiproteolyse notwendig zu sein scheint. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt^{38,147,148}. In gesunden Gefäßen war der Anteil an TIMP-1 gegenüber MMPs wesentlich höher. Dieses Verhältnis zugunsten der TIMPs ist anscheinend notwendig um das Gefäß nicht in die Gefahr einer Proteolyse oder einer unbeabsichtigten Zellmigration zu bringen. Diese Hypothese wird auch von Dollery und Forough et al. unterstützt^{144,145}.

In der Media war der Expressionsunterschied zwischen den Kontrollgefäßen, den 8 Wochen und den 6 Monaten nach Okklusion beobachteten Gefäßen, vernachlässigbar. Innerhalb der Kontrollgefäße lag die Menge des TIMP-1 unter den gemessenen MMP-Werten, jedoch kann man davon ausgehen, dass eine Proteolyse in der Tunica media der Kontrollgefäße nicht stattfinden konnte. Zusammenfassend unterschied sich die Tunica media der Kollateralgefäße nicht signifikant von der Kontrollmedia.

Anders sah es innerhalb der Neointima aus, wo man eine deutliche Diskrepanz der Expression zugunsten der frühen Kollateralgefäße beobachten konnte. Der Abfall der MMP-Menge im Laufe der Zeit schien sich der von gesunden Gefäße zu nähern. Es ist möglich, dass eine abfallende Expression der MMPs für die Adaptation und den nahenden Abschluß des Vascular remodelings spricht. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Gleichgewichtsverteilung zwischen TIMP-1 und den MMPs vom wachsenden bis zum ausgewachsenen Gefäß in Richtung Antiproteolyse verschoben wird.

Auch die entgegengesetzte Verteilung von TIMP-1 unterstützt diese Vorstellung, wie auch aus Arbeiten von Allaire et al. bekannt ist⁵².

Es liegt also ein Gleichgewicht zwischen diesen zwei Gegenspielern vor, oder falls nicht, tendiert der Organismus dazu, ein Gleichgewicht herzustellen, um einen physiologischen Proteinturnover zu haben^{38,148}.

Interessanterweise kann man bei unseren Messungen nachweisen, dass es zu einer parallelen Aufregulierung beziehungsweise Herunterregulierung von MMP und

TIMP-1 innerhalb der Neointimabildung kommt und dass die Aktivität von MMP und TIMP-1 entgegengesetzt zueinander verlaufen.

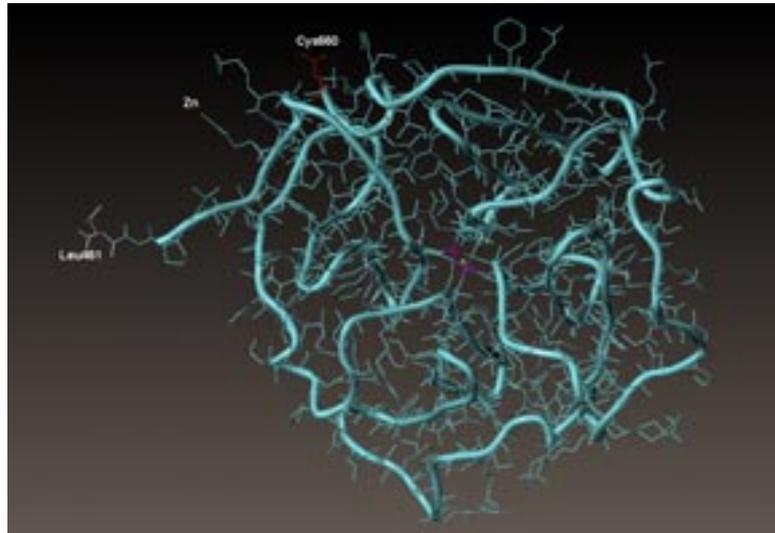


Abb. 42 Dreidimensionale Darstellung eines MMP-2-Moleküls des Menschen.
Libson, A.M. et al.: *Nature Structural Biology*; 2(11); 1995; 938-942
Software: SYBYL 6.5, Tripos inc., Mo; USA

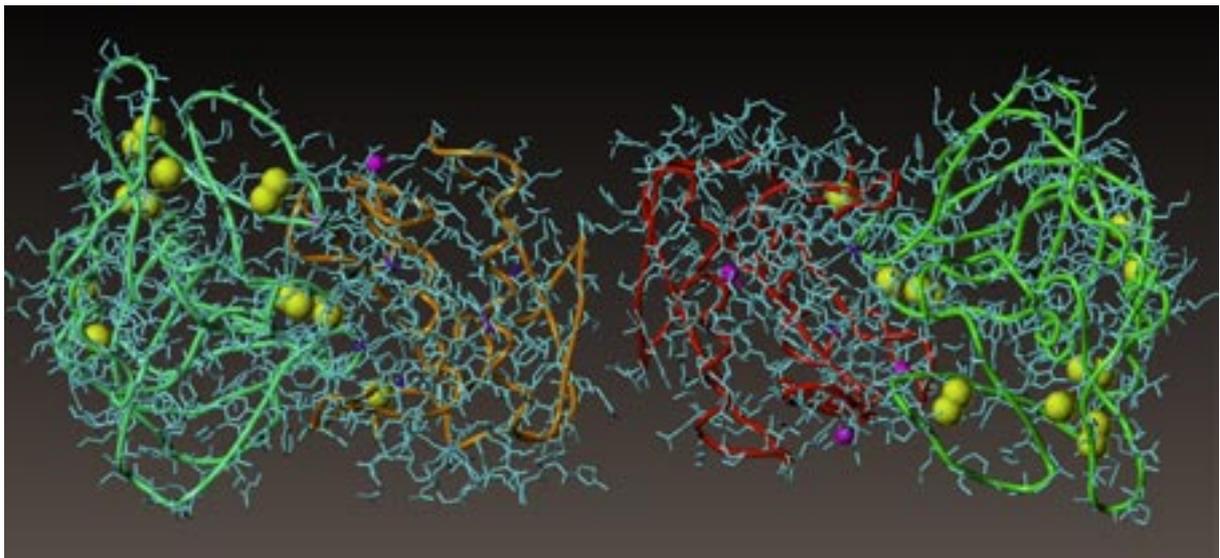


Abb. 43 Dreidimensionale Darstellung zweier unabhängiger Komplexe eines, von TIMP-1 (grün) blockierten humanen MMP3 (braun / rot)
Gomis-Ruth, F.X. et al.: *Nature*; 389(6646); 1997; 77-81
Software: SYBYL 6.5, Tripos inc., Mo; USA

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, *zum einen* die Proteinverteilungsmuster der beteiligten Proteine während des Vascular remodeling bei der Kollateralgefäßentwicklung zu untersuchen und *zum anderen* eine reproduzierbare und objektive Methode zu finden, die es erlaubt, die immunhistochemischen Ergebnisse zu vergleichen.

Als Tiermodell wurde das Hundeherz gewählt, bei dem durch ein Ameroidkonstriktor die Gefäßokklusion und in dessen Folge die Rekrutierung von Kollateralkreisläufen, induziert wurde.

Betrachtet wurden die Kollateralgefäße zu zwei bestimmten Zeitpunkten, 8 Wochen und 6 Monate nach Ameroidkonstriktor-Implantation. Sie wurden mit den Kontrollgefäßen unter folgenden Fragestellungen verglichen:

1. Expressionsmuster der intrazellulären Proteine
(alpha-smooth muscle Aktin, Desmin, Calponin)
2. Expressionsmuster der extrazellulären Proteine
(Laminin, Fibronectin)
3. Proliferationsverhalten der Zellen im Beobachtungszeitraum
(Ki-67)
4. Vergleich zwischen dem Expressionsverhalten der drei untersuchten Matrixmetalloproteinasen (MMP-2, -3, -9) und ihrem Inhibitor (TIMP-1)
5. Phänotypveränderungen der Muskelzellen im Beobachtungszeitraum

Das Expressionsmuster der verschiedenen Proteine zu beiden Zeitpunkten zeigt eine hohe Dynamik, sowohl innerhalb der Media als auch innerhalb der neu entstandenen Neointima.

Auch konnte im beobachteten Zeitraum ein Anstieg der intrazellulären Proteine (alpha-smooth muscle Aktin, Desmin, Calponin) und extrazellulären Proteine (Laminin, Fibronectin) in Media und Neointima beobachtet werden.

Verglichen mit den Kontrollgefäßen, konnte sowohl zum frühen (8 Wochen), als auch zum späten (6 Monate) Zeitpunkt Zellproliferation beobachtet werden. Es scheint, dass auch nach 6 Monaten noch ein genügend hoher Reiz auf die Gefäßwand vorhanden ist, um Zellen proliferieren zu lassen. So kann man davon ausgehen, dass 6 Monate zur endgültigen Anpassung des Gefäßes nach Okklusion an die veränderte Rheologie anscheinend nicht ausreichen.

Es wurde die Aufregulierung der MMPs in der Neointima im Gegensatz zur Media innerhalb des vascular remodeling aufgezeigt. MMP-2, MMP-3 und MMP-9 waren in der Intima bei 8 Wochen stark erhöht, und immer noch vermehrt bei 6 Monate. Entgegengesetzt des MMP-Expressionsmusters verhält sich das des TIMP-1.

Innerhalb adulter Gefäße wechselt die Präsenz von MMPs und ihrem Inhibitor: es kommt zu einer Reduzierung der Matrixmetalloproteinasen und einer Aufregulierung von TIMP-1.

Anhand des Expressionsmusters der einzelnen Proteine wurden Rückschlüsse auf den Phänotyp der glatten Muskelzellen während des Untersuchungszeitraumes gezogen. Im Vergleich zu den kontraktilen, adulten glatten Muskelzellen der Kontrollgefäße, wurde im Zeitverlauf bei den Kollateralgefäßen eine Dedifferenzierung zum synthetischen und den Beginn einer Differenzierung zum kontraktilen Phänotyp beobachtet. Dies war am ehesten durch die Expressionsverteilung von alpha-smooth muscle Aktin und Desmin zu beobachten.

Auf der Basis der Pixelzählung im konfokalen Mikroskop wurde eine reproduzierbare Methode entwickelt, die die immunhistochemischen Ergebnisse quantifizierbar und somit vergleichbar macht. Auf diese Weise konnte das Gleichgewicht und Zusammenspiel zwischen den Proteinen, die bei dem vascular remodeling innerhalb der Gefäßwand beteiligt sind, gezeigt werden.

Ebenso wurde verdeutlicht, dass das vascular remodeling ein dynamischer Prozess ist, der sich in seinem Verlauf nicht nur auf die neu gebildete Neointima beschränkt, sondern welcher alle Gefäßwandschichten in diesen Prozess einbezieht.

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass Proteolyse und Antiproteolyse in der Entwicklung der Kollateralgefäße eine wichtige Rolle spielen und dass die, innerhalb des vascular remodeling beteiligten Proteine, in einem empfindlichen Gleichgewicht zueinander stehen.

6. Literatur

1. Schaper W. The Collateral Circulation of the Heart. Amsterdam London: Elsevier North Holland Publishing Company; 1971.
2. Fulton WF. The coronary arteries. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. 1965.
3. Schaper W, Flameng W, De Brabander M. Comparative aspects of coronary collateral circulation. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. 1972;22:267-76.
4. Schaper W, Bernotat-Danielowski S, Nienaber C, Schaper J. Collateral circulation. In: Fozzard H, Haber E, Jennings R, Katz A, Morgan H, eds. *The Heart and Cardiovascular System*. New York: Raven Press; 1992: 1427-1464.
5. Cai WJ, Vosschulte R, Afsah-Hedjri A, Koltai S, Koscić E, Scholz D, Kostin S, Schaper W, Schaper J. Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2000;32:997-1011.
6. Schaper W. Control of coronary angiogenesis. *Eur Heart J (Suppl C)*. 1995;16:66-68.
7. Lichtman JW. Konfokale Mikroskopie: Eine Kombination verschiedener Techniken ermöglicht bestechend klare Schichtbilder winziger Objekte-und sogar deren dreidimensionale Darstellung. *Spektrum der Wissenschaft*. 1994;10:78-84.
8. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Bestimmte Moleküle lassen sich in Zellen durch Fluoreszenz-Mikroskopie nachweisen in: *Molekularbiologie der Zelle*. 1995;166-167.
9. Junqueira. *Histologie*, Springer-Verlag. 255-260.
10. Stevens. *Histologie des Menschen*, Chapman & Hall. 137-146.

11. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, de Ckhashtonay C, Vandekerckhove J, Weber K, Franke WW. Vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells: predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78:298-302.
12. Duband JL, Gimona M, Scatena M, Sartore S, Small JV. Calponin and SM 22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development. *Differentiation*. 1993;55:1-11.
13. Gimona M, Herzog M, Vandekerckhove J, Small JV. Smooth muscle specific expression of calponin. *FEBS Letters*. 1990;274:159-62.
14. Kostin S, Scholz D, Shimada T, Maeno Y, Mollnau H, Hein S, Schaper J. The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell & Tissue Research*. 1998;294:449-460.
15. Tyagi SC. Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. *Molecular & Cellular Biochemistry*. 1997;168:1-12.
16. Borg TK, Burgess ML. Holding it all together: organization and function(s) of the extracellular matrix of the heart. *Heart Failure*. 1993;8:230-238.
17. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens J. Collagen network of the myocardium: Function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26:279-292.
18. Miettinen M, Foidart JM, Ekblom P. Immunohistochemical demonstration of laminin, the major glycoprotein of basement membranes, as an aid in the diagnosis of soft tissue tumors. *American Journal of Clinical Pathology*. 1983;79:306-311.

19. Kosmehl H, Langbein L, Katenkamp D, Vogel W, Berndt A. Laminin matrix formation and S-100 protein and/or desmin-positive cells in malignant fibrous histiocytoma (MFH). *Histology & Histopathology*. 1993;8:425-428.
20. D'Ardenne AJ. Use of basement membrane makers in tumour diagnosis. *J Clin Pathol*. 1989;42:449-457.
21. Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch*. 1996;429:311-322.
22. Yamada KM, Akiyama SK, Hasegawa T, Hasegawa E, Humphries MJ, Kennedy DW, Nagata K, Urushihara H, Olden K, Chan WT. Recent advances in research on fibronectin and other cell attachment proteins. *J Cell Biochem*. 1985;28:79-97.
23. Mosher DF. Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin stabilizing factor. *J Biol*. 1975;66:14-6621.
24. Ruoslahti E, Vaheri A. Interaction of soluble fibroblast surface antigen with fibrinogen and fibrin. *Journal of Experimental Medicine*. 1975;141:497-501.
25. Kleinman HK, McGowan EB, Rennard SL, Martin GR. Preparation of collagen substrates for cell attachment: effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal Biochem*. 1979;93:308-316.
26. Thyberg J. Thyrphostin A9 and wortmannin perturb the Golgi complex and block proliferation of vascular smooth muscle cells. *European Journal of Cell Biology*. 1998;1:33-42.
27. Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol*. 1997;4:1349-1360.

28. Klein G, Steiner M, Wiener F, Klein E. Human leukemia-associated anti-nuclear reactivity. *Proc natl Acad Sci USA*. 1974;71:685-689.
29. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. *Adv Immunol*. 1982;33:167-240.
30. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with the human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31:13-20.
31. Davies MJ. Aortic Aneurysm Formation. *Circulation*. 1998;98:193-195.
32. Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Diseases*. 1996;2 (1):70-76.
33. Mecham RP, Broekelmann TJ, Filszar CJ, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM. Elastin degradation by matrix metalloproteinases: cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis. *J. Biol. Chem*. 1997;272: 18071-18076.
34. Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ. Matrixmetalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan: a quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J*. 1991;277:277-279.
35. Okada Y, Morodomi T, Enghild JJ, Suzuki K, Yasui A, Nakanishi I, Salvesen G, Nagase H. Matrix metalloproteinase-2 from human rheumatoid synovial fibroblasts: purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur. J. Biochem*. 1990;194:721-730.
36. Shipley JM, Doyle GAR, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM. The structural basis for the elatinolytic activity of the 92-kDa- and 72-kDa- gelatinases. *J. Biol. Chem*. 1996;8:4335-4341.

37. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993;4:197-250.
38. Murphy G, Reynolds JJ. Extracellular matrix degradation. In: Royce P.M., Steinmann B., eds. *Connective Tissue and Its Heritable Disorders. Molecular, Genetic, and Medical Aspects.* New York: Wiley-Liss. 1993;287-316.
39. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991;5:2145-2154.
40. Docherty AJ, Murphy G. The Tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNA and recombinant proteins. *Ann Rheum Dis.* 1990;49:469-479.
41. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature.* 1994;370:61-65.
42. Kinoshita T, Sato H, Takino T, Itoh M, Akizawa T, Seiki M. Processing of a precursor of 72-kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res.* 1996;56:2535-2538.
43. Murphy G, Atkinson S, Ward R, Gavrilovic J, Reynolds JJ. The role of plasminogen activators in the regulation of connective tissue metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci.* 1992;667:1-12.
44. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor of the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 1992;267:3581-3584.
45. Desrivières S, Lu H, Peyri N, Soria C, Legrand Y, Ménéashi S. Activation of the 92 kDa type IV collagenase by tissue kallikrein. *J Cell Physiol.* 1993;157:578-593.

46. Cleutjens JPM. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovascular Research*. 1996;32:816-821.
47. Stricklin GP, Welgus HG. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. *J Biol Chem*. 1983;258:12252-12258.
48. De Clerck Y, Yean T, Ratzkin B, Lu H, Langley K. Purification and characterization of two related and distinct metalloproteinase inhibitors secreted by bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 1989;264:17445-17453.
49. Gavrilovic J, Hembry RM, Reynolds JJ, Murphy G. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) regulates extracellular type I collagen I degradation by chondrocytes and endothelial cells. *J Cell Sci*. 1987;87:357-362.
50. Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic J, Werb Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. *J Biol Chem*. 1986;261:2814-2818.
51. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*. 1995;77:863-868.
52. Allaire E, Hasenstab D, Kenagy R, Starcher B, Clowes MM, Clowes AW. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation*. 1998;98:249-255.
53. Lower R. *Tractus de corde*. Elsevier, Amsterdam. 1669.
54. von Haller A. *Elementa physiologicae corporis humani*. Lausanne. 1757.
55. Hyrtl J. *Die Korrosionsanatomie und ihre Ergebnisse*. Wien. 1873.
56. Henle FGJ. *Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen*; Viewig, Braunschweig. 1879.

57. Cohnheim J, von Schultheiss-Rechenberg A. Über die Folgen der Kranzarterienverschiessung auf das herz. Virchows Arch. Pathol. Anat. 1881;85:503.
58. Dragneff S. Recherches anatomiques sur les artères coronaires chez l'homme. Thèse de Nancy. 1897.
59. Spalteholz W. Die Koronararterien des Herzens. Verhandl. Anat. Gesellschaft. 1907;21:141.
60. Spalteholz W. Die Arterien der Herzwand. Hizele, Leipzig. 1924.
61. Jamin F, Merkel H. Die Koronararterien des menschlichen Herzens unter normalen und pathologischen Verhältnissen, dargestellt in stereoskopischen Röntgenbildern. Jena: Gustav Fischer; 1907.
62. Gross L. The blood supply to the heart. In: Press OU, eds. NY: 1921.
63. Tyagi SC. Vasculogenesis and angiogenesis: extracellular matrix remodeling in coronary collateral arteries and the ischemic heart. Journal of Cellular Biochemistry. 1997;65:388-94.
64. Schaper W. The collateral circulation in the canine coronary system. Thesis, Leuven. 1967.
65. Schaper W, Even Pv. [Exposition and development of autoradiographic preparations]. Pflugers Archiv - European Journal of Physiology. 1969;312:126-8.
66. Cai WJ, Vosschulte R, Koltai S, Maeno Y, Schaper W, Schaper J In J Mol Cell Cardiol; pp Th7 (abstr); 1997.
67. Liebow AS. Situations which lead to changes in vascular pattern. American Physiological Society, Washington, D.C. Handbook of physiology, Section II. 1963;2:1251.

68. Gregg DE. Coronary circulation in health and disease. Lea and Febiger, Philadelphia. 1950.
69. von Recklinghausen FD. Handbuch der allgemeinen Pathologie des Kreislaufs und der Ernährung. Stuttgart: 1883.
70. Thoma R. Untersuchung über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems. Enke, Stuttgart. 1893.
71. Sewell WH, Koth DR. Basic observations on ability of newly formed capillaries to develop into collateral arteries. Surg. Forum. 1958;9:227.
72. Schoop W, Jahn W. Entwicklungsstadien arterieller Kollateralen und ihre begriffliche Definition. Zur Kreislaufforschung. 1961;50:249.
73. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. Journal of Biological Chemistry. 1994;269:23757-23763.
74. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature. 1996;380:435-439.
75. Bloor CM, Leon AS, Pitt B. The inheritance of coronary artery anatomic patterns in rats. Circulation. 1967;36:771-776.
76. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic Factors. Science. 1987;235:442-448.
77. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997;386:671-674.
78. Schaper W. The pathophysiology of Myocardial Perfusion. Elsevier/North-Holland; Amsterdam. Biomedical Press. 1979.

79. Gorge G, Schmidt T, Ito BR, Pantely GA, Schaper W. Microvascular and collateral adaptation in swine hearts following progressive coronary artery stenosis. *Basic Research in Cardiology*. 1989;84:524-535.
80. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Archiv*. 2000;436:257-270.
81. Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Koltai S, Mousavipour D, Scholz D, Afsah-Hedjri A, Schaper W, Schaper J. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1998;11:2291-2305.
82. Angus JA, Ward JE, Smolich JJ, McPherson GA. Reactivity of canine isolated epicardial collateral coronary arteries (Relation to vessel structure). *Circ Res*. 1991;69:1340-1353.
83. Tyagi SC, Meyer L, Schmaltz RA, Reddy HK, Voelker DJ. Proteinases and restenosis in human coronary artery: Extracellular matrix production exceeds the expression of proteolytic activity. *Atherosclerosis*. 1995;116:43-57.
84. Tyagi SC, Kumar S, Cassatt S, Parker JL. Temporal expression of extracellular matrix metalloproteinases and tissue plasminogen activator in the development of collateral vessels in the canine model of coronary occlusion. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*. 1996;74: 983-995.
85. Lohler J, Timpl R, Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell*. 1984;38:597-607.
86. Newby AC, George SJ. Proposed roles for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular pathologies. *Cardiovascular Research*. 1993;27:1173-1183.

87. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Jr., Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1992;85:391-405.
88. Clausell N, de Lima VC, Molossi S, Liu P, Turley E, Gotlieb AI, Adelman AG, Rabinovitch M. Expression of tumour necrosis factor alpha and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy. *Br Heart J*. 1995;6:534-539.
89. Mann GV, Spoerry A, Gray M, Jarashow D. Atherosclerosis in the Masai. *American Journal of Epidemiology*. 1972;95:26-37.
90. Herity NA, Ward MR, Lo S, Yeung AC. Review: Clinical aspects of vascular remodeling. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*. 1999;10:1016-24.
91. Gittenberger-de Groot AC, van Ertbruggen I, Moulart AJ, Harinck E. The ductus arteriosus in the preterm infant: histologic and clinical observations. *Journal of Pediatrics*. 1980;96:88-93.
92. Davies MJ, Mitchell CA, Maley MA, Grounds MD, Harvey AR, Plant GW, Wood DJ, Hong Y, Chirila TV. In vitro assessment of the biological activity of basic fibroblast growth factor released from various polymers and biomatrices. *Journal of Biomaterials Applications*. 1997;12:31-56.
93. Baramova EN. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Lett*. 1997;405:157-162.

94. Mazziere R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Oniszo M, Garbisa S, Mignatti P. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO Journal*. 1997;16:2319-2332.
95. Tschesche H, Farr M. Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren. *Bioforum*. 1998;12:767-772.
96. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Lippy P. Cytocine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a component of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ res*. 1994;75:181-189.
97. van Leeuwen RTJ. Extracellular proteolysis and the migration of vascular smooth muscle cell. *Fibrinolysis*. 1996;10:57-74.
98. Dettman RW, Denetclaw W, Jr., Ordahl CP, Bristow J. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Developmental Biology (Orlando)*. 1998;193:169-181.
99. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *Journal of Cell Biology*. 1986;103:2787-2796.
100. Glukhova MA, Kabakov AE, Frid MG, Ornatsky OI, Belkin AM, Mukhin DN, Orekhov AN, Koteliansky VE, Smirnov VN. Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85:9542-9546.

101. Capetanaki Y, Milner DJ, Weitzer G. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Structure & Function*. 1997;22:103-116.
102. Milner DJ, Taffet GE, Wang X, Pham T, Tamura T, Hartley C, Gerdes AM, Capetanaki Y. The absence of desmin leads to cardiomyocyte hypertrophy and cardiac dilation with compromised systolic function. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 1999;31:2063-2076.
103. Jaworowski A, Anderson KI, Arner A, Engstrom M, Gimona M, Strasser P, Small JV. Calponin reduces shortening velocity in skinned taenia coli smooth muscle fibres. *FEBS Letters*. 1995;365:167-171.
104. North AJ, Gimona M, Cross RA, Small JV. Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. *Journal of Cell Science*. 1994;107:437-444.
105. Windler SJ, Allen BG, Clement-Chomienne O, Walsh MP. Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1998;4:415-426.
106. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 1991;83:504-514.
107. Li H, Choudhary SK, Milner DJ, Munir MI, Kuisk IR, Capetanaki Y. Inhibition of desmin expression blocks myoblast fusion and interferes with the myogenic regulators MyoD and myogenin. *Journal of Cell Biology*. 1994;124:827-841.
108. Li H, Capetanaki Y. Regulation of the mouse desmin gene: transactivated by MyoD, myogenin, MRF4 and Myf5. *Nucleic Acids Research*. 1993;21:335-343.

109. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Desmin. *Molecular Cell Biology*. 1990;894-895.
110. Tyagi SC, Bheemanathini V, Mandi D, Reddy HK, Voelker DJ. Role of extracellular matrix in cardiac remodeling. *Heart Failure Reviews*. 1996;1:73-80.
111. Walker-Caprioglio HM, Hunter DD, McGuire PG, Little SA, McGuffee LJ. Composition in situ and in vitro of vascular smooth muscle laminin in the rat. *Cell & Tissue Research*. 1995;281:187-196.
112. Kleinman HK, Weeks BS, Schnaper HW, Kibbey MC, Yamamura K, Grant DS. The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases. *Vitam Horm*. 1993;161-186.
113. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 1979;254:9933-9937.
114. Foidart JM, Bere EW, Jr., Yaar M, Rennard SI, Gullino M, Martin GR, Katz SI. Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. *Laboratory Investigation*. 1980;42:336-342.
115. Langbein L, Kosmehl H, Katenkamp D, Neupert G, Stiller KJ. Experimentally induced murine rhabdomyosarcomas - correlations between cellular contacts, matrix formation and cellular differentiation. *Differentiation*. 1990;44:185-196.
116. Mark Kvd, Öcalan M. Antagonistic effects of laminin and fibronectin expression on the myogenic phenotype. *Differentiation*. 1989;40:150-157.

117. Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell & Tissue Research*. 1995;281:421-133.
118. Risau W, Lemmon V. Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Developmental Biology (Orlando)*. 1988;125:441-450.
119. Hynes RO. Fibronectins. In: eds. *Molecular Biology*. NY, Berlin, heidelberg: Springer; 1990.
120. Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *Journal of Cell Biology*. 1982;95:369-377.
121. Fibronectin (a); Hynes RO, Ed.; Springer Verlag: NY, Berlin, Heidelberg, 1990, 349-364.
122. Grinnell F, Billingham RE, Burgess L. Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 1981;76:181-189.
123. Repesh LA, Fitzgerald TJ, Furcht LT. Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1982;30:351-358.
124. Brown LF, Dubin D, Lavigne L, Logan B, Dvorak HF, Van de Water L. Macrophages and fibroblasts express embryonic fibronectins during cutaneous wound healing. *American Journal of Pathology*. 1993;142:793-801.
125. Fibronectin (b); Hynes RO, Ed.; Springer Verlag: NY, Berlin, Heidelberg, 1990, 281-300.
126. Bocaut JC, Darribere T, Boulekbache H, Thiery JP. Prevention of gastrulation but not neurulation by antibodies to fibronectin in amphibian embryos. *Nature*. 1982;307:364-367.

127. Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG. Fibronectin: current concepts of its structure and function. *Collagen Research*. 1981;95-99.
128. Linder E, Stenman S, Letho VP, Vaheri A. Distribution of fibronectin in human tissues and relationship to other connective tissue components. *Ann NY Acad Sci*. 1978;312:1151-1159.
129. Mosesson MW, Colman RW, Sherry S. Chronic intravascular coagulation syndrome. Report of a case with special studies of an associated plasma cryoprecipitate. *N Engl J Med*. 1968;278:815-821.
130. Petterson EE, Colvin RB. Cold-insoluble globulin (Fibronectin, LETS protein) in normal and diseased human glomeruli: Papainsensitive attachment to normal clomeruli and deposition in crescents. *Clin Immunol Immunopathol*. 1978;11:425-436.
131. Weiss MA, Ooi YM, Engrall E, Ruoslahti E. Immunofluorescent localization of fibronectin in the human kidney. *Lab Invest*. 1979;340-347.
132. Yamada KM, Olden K. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*. 1978;179-185.
133. Mosher DF. Fibronectin. *Progress in hemostasis and thrombosis*. 1980;5:111-151.
134. Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF, Hynes RO. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *Journal of Cell Biology*. 1989;109:903-914.
135. Mercurius KO, Morla AO. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circulation Research*. 1998;5:548-556.
136. Grinnell F. Cellular adhesiveness and extracellular substrata. *Int Rev Cytol*. 1978;53:65-144.

137. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis [published erratum appears in *Int J Cancer* 1995 Jul 4;62(1):118]. *International Journal of Cancer*. 1994;59:612-618.
138. Shofuda K, Nagashima Y, Kawaharra K, Yasumitsu H, Miki K, Miyazaki K. Elevated expression of membrane-type 1 and 3 matrix metalloproteinases in rat vascular smooth muscle cells activated by arterial injury. *Laboratory Investigation*. 1998;8:915-923.
139. Oyama F, Hirohashi S, Shimosato Y, Titani K, Sekiguchi K. Oncodevelopmental regulation of the alternative splicing of fibronectin pre-messenger RNA in human lung tissues. *Cancer Research*. 1990;50:1075-1078.
140. Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Investigational New drugs*. 1997;15(1):61-75.
141. Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. *Gut*. 1998;6:791-797.
142. Tyagi SC, Borders S, Kumar SG, Cassatt S, Parker JL. Expression of matrix metalloproteinase activity in coronary collateral arteries. *Circulation*. 1995;92 (Suppl):1-169.
143. Murphy G, Crabbe T. Gelatinases A and B. *Methods Enzymol*. 1995;148:470-487.
144. Dollery CM, Humphries SE, McClelland A, Latchman DS, McEwan JR. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 by use of an adenoviral vector inhibits smooth muscle migration and reduces neointimal hyperplasia in the rat model of vascular ballon injury. *Circulation*. 1999;99:3199-3205.

145. Forough R, Koyama N, Hasenstab D, Lea H, Clower M, Nikkari ST, Clowes AW. Overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 inhibits vascular smooth muscle cell functions in vitro and in vivo. *Circ Res.* 1996;79:812-820.
146. Khokha R, Zimmer MJ, Wilson SM, Chambers AF. Up-regulation of TIMP-1 expression in F16-F10 melanoma cells supresses their metastatic ability in chick embryo. *Clin Exp Metastasis.* 1992;10:365-370.
147. Brophy CM, Reilly JM, Smith GJ, Tilson MD. The role of inflammation in nonspecific abdominal aortic aneurysm sisease. *Ann Vasc Surg.* 1991;5:229-233.
148. Werb Z. Degradation of collagen. In Weiss JB, Jayson MIV, eds. *Collagen in Health and Disease.* Edinburgh: Churchill Livingstone. 1982;121-134.

7.2. TIMP-1

Anfertigen von 5 μ m-Schnitten

Fixieren PFA 4% 20 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Hintergrund abfangen:

Schnitte in 5% BSA + 0,4% Glycin 15-20 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper:

TIMP-1 1:20 über Nacht

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper:

Biotin-Mouse-Antiserum 1:100 1 Stunde

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper:

Cy-2-Streptavidin 1:100 (gut schütteln!!!) 30 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Kernfärbung:

Propidiumjodid 1:1000 3-4 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Eindeckeln mit Mowiol[®]

7.3. HE-Färbung

Anfertigen von 5 μ m-Schnitten

Fixieren PFA 4%	5Minuten
Waschen in PBS	3x3 Minuten
Hämalaunbad	6 Minuten (Kerne + Nucleoli)
Waschen in PBS	3x3 Minuten
bläuen bei fließendem, lauwarmem Wasser	4 Minuten
Waschen in Aqua dest, bis die Spülflüssigkeit ganz klar ist	
Eosinbad	8 Minuten (Zytopl. + Kollagen)
aufsteigende Alkoholreihe:	
95% Alkohol	kurz eintauchen
100% Alkohol	5 sec.
100% Alkohol	1 Minuten
Xylol	mindestens 5 Minuten
Eindeckeln mit Entellan®	

7.4. Ki-67 (MIB-5)

Anfertigen von 5 μ m-Schnitten

Fixieren PFA 4% 20 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Citronensäuremonohydrat (Citratpuffer) 3 Minuten

dann Objektträger mit Citratpuffer in der Mikrowelle bei 720 W für 25 Minuten
sehr langsam abkühlen lassen

Waschen in PBS 6x3 min

Antikörper:

Ki 67 1:10 über Nacht

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Negativkontrolle: statt 1. Antikörper PBS verwenden

Positivkontrolle: statt Hundegewebe Darmgewebe (Hund) benutzen

Antikörper:

Biotin-Anti-Mouse 1:100 1 Stunde

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper

Cy-2-Streptavidin 1:100 30 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Kernfärbung:

Propidiumjodid 1:1000 3-4 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Eindeckeln in Mowiol®

7.5. Citronensäuremonohydrat (Citratpuffer)

1,68 g Citronenmonohydrat in zirka 700 ml Aqua dest. Rühren mit NaOH pH auf 6,0 titrieren, dann mit Aqua dest auf einen Liter auffüllen.

7.6. Desmin, Calponin

Anfertigen von 5 μ m-Schnitten

Fixieren PFA 4%	10 Minuten
Waschen in PBS	3x3 Minuten
Hintergrund abfangen:	
Schnitte in 5% BSA + 0,4% Glycin	15-20 Minuten
Waschen in PBS	3x3 Minuten
Antikörper:	
Desmin 1:50	über Nacht
Calponin 1:100	
Waschen in PBS	3x3 Minuten
Antikörper:	
Biotin-Anti-Mouse 1:100	1 Stunde
Waschen in PBS	3x3 Minuten
Antikörper	
Cy-2-Streptavidin 1:100	30 Minuten
Waschen in PBS	3x3 Minuten
Kernfärbung:	
Propidiumjodid 1:1000	3-4 Minuten
Waschen in PBS	3x3 Minuten
Eindeckeln in Mowiol [®]	

7.7. Laminin

schneiden 5 μ m

Fixieren PFA 4% 10 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Hintergrund abfangen:

Schnitte in 5% BSA + 0,4% Glycin 15-20 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper:

Laminin 1:50 über Nacht

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper:

Biotin-Anti-Rat 1:100 1 Stunde

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper

Cy-2-Streptavidin 1:100 30 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Kernfärbung:

Propidiumjodid 1:1000 3-4 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Eindeckeln in Mowiol®

7.8. Fibronectin

Anfertigen von 5 μ m-Schnitten

Fixieren PFA 4% 10 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Hintergrund abfangen:

Schnitte in 5% BSA + 0,4% Glycin 15-20 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper:

Fibronectin 1:100 über Nacht

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper:

Biotin-Anti-Mouse 1:100 1 Stunde

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper

Cy-2-Streptavidin 1:100 30 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Kernfärbung:

Propidiumjodid 1:1000 3-4 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Eindeckeln in Mowiol[®]

7.9. alpha-smooth muscle Aktin

schneiden 5 μ m

Fixieren PFA 4% 10 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Hintergrund abfangen:

Schnitte in 5% BSA + 0,4% Glycin 15-20 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper:

alpha-smooth muscle Aktin 1:200 über Nacht

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper:

Biotin-Anti-Mouse 1:100 1 Stunde

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Antikörper

Cy-2-Streptavidin 1:100 30 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Kernfärbung:

Propidiumjodid 1:1000 3-4 Minuten

Waschen in PBS 3x3 Minuten

Eindeckeln in Mowiol[®]

7.10. 5% BSA / 0,4% Glycin-Lösung

50 ml PBS + 2,5 g BSA + 0,2 g Glycin

Mowiol

200ml PBS auf pH 8,0 einstellen

unter Rühren langsam 50 g Mowiol® dazugeben 16 h

25 ml Glycerin (wasserfrei, reinst) dazugeben

rühren 16 h

zentrifugieren bei 12.000R/min bei 4°C 15 min

in sterile Gefäße abfüllen

7.11. Beschichtung der Objektträger

Objektträger fettfrei waschen

Im Wärmeschrank gut trocknen lassen über Nacht

Objektträger in Körbchen stellen und nacheinander in folgende Bäder tauchen:

2% Silane in purem Aceton 5 sec.

Aceton 5 sec.

Aqua dest 5 sec.

Aqua dest. 5 sec.

Im Wärmeschrank trocknen lassen über Nacht

7.12. Abkürzungen

μm	Mykrometer
AK	Ameroidkonstriktor
Ao	Aorta
Ap	Arteria pulmonalis
BSA	Bovine Serum Albumine
Cal	Calponin
Des	Desmin
Fib	Fibronectin
HE	Hämatoxilin-Eosin
IEL	Intern Elastic Lamina
KCl	Kaliumchlorid
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Lam	Laminin
li. RCX	Ramus circumflexus der linken Koronararterie
LV	linker Ventrikel
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PFA	Paraformaldehyd
RCX	Ramus circumflexus
RIA	Ramus interventricularis anterior
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinasis
UV	Ultraviolett

8. Danksagung

Jeder, der eine Arbeit beginnt und dann irgendwann beendet, wird sich im Verlauf dieser Mühen klar, dass es ab einen bestimmten Punkt fast unmöglich wird ohne Hilfe anderer sein Ziel, die Fertigstellung dieser Arbeit, zu erreichen.

Bis zu diesem Zeitpunkt lag es am persönlichen Engagement. Nun hängt jedoch vieles von der Kompetenz, der Möglichkeit und nicht zuletzt ganz einfach von der Hilfsbereitschaft aller Mitarbeiter ab, die mit vereinten Kräften eine wissenschaftliche Arbeit zur „Druckreife“ bringen.

Glücklicherweise darf ich mich zu Jenen zählen, denen diese Möglichkeit des Arbeitens zuteil wurde und die auf die Mithilfe und Unterstützung der Mitarbeiter und Kollegen voll und ganz zählen konnten.

Ich danke ganz besonders Frau Professor Schaper, die mir die Möglichkeit gab meine Dissertation zu beenden und mir mit Rat und Hilfe während der gesamten Zeit beistand. Abgesehen von der fachlichen Kompetenz, lernte ich Frau Professor Schaper als einen besonderen Menschen kennen, die auch in persönlich schwierigen Situationen immer eine große Hilfe war. Vielen Danke!

Was wäre eine Doktorarbeit in der heutigen Zeit ohne die vielen Möglichkeiten und Stolperfallen der EDV? Einen großen Dank für die Überwindung dieser Stolperfallen an Herrn Gerhard Stämmler und Herrn Gunther Schuster für ihre erstaunliche Geduld und Kreativität bei der Lösung nicht weniger Wünsche.

Für die schönen Bilder der Proteinmoleküle danke ich herzlich Frau Brigitte Mohsin, die sie mit viel Mühe bearbeitet und mir zur Verfügung gestellt hat.

Wenn man an einem neuen Arbeitsplatz beginnt, hängt vieles von der Einarbeitung ab. Es kommen schier unüberwindbare Probleme auf einen zu, an die man später kaum einen Gedanken verschwendet.

Für eine wunderbare Einarbeitung in die immunzytochemischen Arbeitstechniken will ich hier ganz herzlich Frau Beate Grohmann und Frau Dr. Regina Vosschulte danken.

Für die Einarbeitung in die Arbeit mit dem konfokalen Mikroskop danke ich herzlich Frau Brigitte Matzke.

Meiner Mutter, meiner Frau und Frau Dr. Veronika Persson möchte ich herzlich für das Korrekturlesen der Arbeit danken.

Ganz besonders bin ich meiner lieben Frau, Farzaneh, zu Dank verpflichtet, denn sie war es, die mich mit dem wissenschaftlichen Team von Frau Prof. Schaper bekannt machte. Auch danke ich ihr für die seelische und liebevolle Unterstützung bei den nicht wenigen Tiefs, und für das herzliche Mitfreuen bei den Hochs.

Zum Schluß ein Wort an meine Eltern:

Ich danke Euch, auch im Namen meiner Brüder, dass Ihr mit uns durch Dick und Dünn gegangen seid und uns immer unterstützt habt.

Ihr ward die, die uns beigebracht habt eine begonnene Sache so gut es geht zu beenden und seinem Ziel nachzugehen.

Ich danke Euch für eure Kraft, mit der Ihr auch uns gestärkt habt.

9. Lebenslauf

Abdollah Afsah-Hedjri, geboren am 8. März 1970 in Teheran, Iran

Eltern und Geschwister

Mehdi Afsah-Hedjri, Dipl. Ing. Agr.

Johanna Afsah-Hedjri, geborene Brych, Fachlehrerin für Hauswirtschaft

Ebrahim Afsah-Hedjri, Politikwissenschaftler

Esmail Afsah-Hedjri, Literaturwissenschaftler

Schulbildung

1976-1979	Grundschule Rafsendjan / Iran
1979-1980	Grundschule Garbenteich
1980-1981	Grundschule Laubach
1981-1983	Pestalozzischule Giessen
1983-1990	Liebigschule Giessen
1990	Abitur

Zivildienst

Gemeinnütziges Gemeinschaftskrankenhaus Witten Herdecke

Studium

SS 1992	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen
SS 1995	Ärztliche Vorprüfung
SS 1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 1998	wissenschaftliche Tätigkeit am Max-Planck-Institut, Abt. für Experimentelle Kardiologie in Bad Nauheim
SS 1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 1999	Beginn des Praktischen Jahres in der Asklepiosklinik in Lich. Wahlfach: Anästhesie
8. Mai 2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1. Juni 2000	Beginn des Arzt im Praktikum an der Asklepiosklinik in Lich, Abteilung für Allgemein- und Unfallchirurgie