

“Trpv4-abhängige Regulation der endothelialen Genexpression
in einem nichtlaminaren Strömungsmodell
sowie der neointimalen Proliferation nach Stentimplantation“

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Gesche Markus
aus Altenkirchen

Gießen, 2012

Aus dem Franz-Grödel-Institut Bad Nauheim, AG Experimentelle Kardiologie

unter der Leitung von:

Prof. Dr. med. Holger Nef

Prof. Dr. med. Helge Möllmann

Dr. phil. nat. Christian Troidl

Dr. med. vet. Sandra Voss

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Nef

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Schulz

Tag der Disputation:

02.05.2013

Was lange währt, wird endlich gut.

(Volksmund)

meinen Eltern

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Histologie der Koronararterien | 1 |
| 1.2 | Hämorrheologie | 3 |
| 1.2.1 | Grundlagen | 3 |
| 1.2.2 | Strömungsformen | 4 |
| 1.3 | Schubspannungsmodelle in der Forschung | 6 |
| 1.3.1 | <i>In vitro</i> -Modelle | 6 |
| 1.3.2 | <i>Ex vivo</i> -Modelle | 7 |
| 1.3.3 | <i>In vivo</i> -Modelle | 7 |
| 1.4 | Der Stent als Region turbulenter Wandschubspannung | 8 |
| 1.4.1 | Die Problematik der Restenose nach PTCA und Stentimplantation | 8 |
| 1.4.2 | Neointimahyperplasie aufgrund pathologischer Hämodynamik | 13 |
| 1.5 | Kalziumabhängige Genexpression nach Trpv4-Aktivierung | 19 |
| 1.5.1 | Signalling durch Kalzium | 19 |
| 1.5.2 | Transient receptor potential channel, type vanilloid, member 4 (Trpv4) | 22 |
| 1.5.3 | Schubspannung und Endothel | 25 |
| 1.6 | Zielsetzung | 34 |
| 2 | Methodik | 35 |
| 2.1 | Zellkultur | 35 |
| 2.1.1 | Versuchsplan | 35 |
| 2.1.2 | Anziehen der Zellen | 35 |
| 2.1.3 | Ernten der Zellen | 36 |
| 2.2 | Tierversuche | 37 |
| 2.2.1 | Versuchstiere und Haltungsbedingungen | 37 |
| 2.2.2 | Versuchsplan | 37 |
| 2.2.3 | Prämedikation und Operationsvorbereitung | 38 |
| 2.2.4 | Stenting | 38 |
| 2.2.5 | Postoperative Versorgung | 40 |
| 2.2.6 | Euthanasie und Entnahme der Stents | 40 |
| 2.3 | Quantitative Analyse von RNA | 41 |
| 2.3.1 | RNA-Isolation | 41 |
| 2.3.2 | Reverse Transkription | 43 |
| 2.3.3 | Primer-Auswahl | 44 |
| 2.3.4 | Detektion der mRNA mit quantitativer real-time PCR und SYBR-Green | 44 |
| 2.3.5 | Schmelzkurvenanalyse | 46 |
| 2.4 | Immunfluoreszenz | 46 |
| 2.4.1 | Herstellung der silanebeschichteten Objektträger | 47 |
| 2.4.2 | Herstellung der Gefrierschnitte | 47 |
| 2.4.3 | Färbeprotokolle | 47 |
| 2.4.4 | Mikroskopie | 49 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 2.5 | Histomorphometrie | 51 |
| 2.5.1 | Einbettung in Methacrylat | 51 |
| 2.5.2 | Färbung mit Toluidinblau | 51 |
| 2.5.3 | Durchlichtmikroskopie | 52 |
| 2.6 | Statistik | 54 |
| 3 | Ergebnisse | 55 |
| 3.1 | Genexpression in der Zellkultur | 55 |
| 3.1.1 | Genexpression unter nichtlaminarer Strömung | 55 |
| 3.1.2 | Genexpression statisch kultivierter PAEC | 60 |
| 3.2 | Großtiermodell | 63 |
| 3.2.1 | Genexpression | 63 |
| 3.2.2 | Immunfluoreszenz | 67 |
| 3.2.3 | Histomorphometrie | 73 |
| 4 | Diskussion | 76 |
| 4.1 | Methodik | 76 |
| 4.2 | Ergebnisse der Zellkultur | 79 |
| 4.2.1 | Genexpression unter nichtlaminarer Strömung | 79 |
| 4.2.2 | Genexpression statisch kultivierter PAEC | 81 |
| 4.2.3 | Genexpression unter Ruthenium Rot | 81 |
| 4.3 | Ergebnisse des Großtiermodells | 83 |
| 4.3.1 | Genexpression | 83 |
| 4.3.2 | Immunfluoreszenz | 85 |
| 4.3.3 | Die Instent-Restenose in Abhängigkeit von Trpv4 | 86 |
| 4.4 | Schlussfolgerung und Ausblick | 88 |
| 5 | Zusammenfassung | 89 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 92 |
| 7 | Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 94 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 96 |
| 9 | Anhang | 108 |
| 9.1 | Operationszubehör | 108 |
| 9.2 | Laborzubehör | 110 |
| 9.3 | Antikörper | 113 |
| 9.4 | Verwendete Primer-Oligonukleotide | 114 |
| 9.5 | EDV-Programme | 115 |
| 9.6 | Herstellung von Puffern und Lösungen | 116 |
| 10 | Erklärung zur Dissertation | 117 |
| 11 | Danksagung | 118 |

1 Einleitung

Der Blutfluss hat unmittelbare Auswirkung auf die Morphologie und Funktion der Blutgefäße. Über unterschiedliche Signalwege kommt es zur kurzfristigen Regulation der Gefäßweite sowie langfristig zu Wachstumsprozessen, wie z. B. Angiogenese oder Arteriosklerose. Umgekehrt bedingt die vaskuläre Anatomie die Dynamik des Blutstroms. Zusätzlich wirken sich auch iatrogene Manipulationen, wie Ballondilatation (Perkutane transluminale koronare Angioplastie, PTCA) und Stentimplantation, auf den Flusscharakter aus. Die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen stehen im Fokus intensiver Forschung. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* existieren Modelle, anhand derer Mikrobiologie bis hin zur Makropathologie untersucht und beschrieben wurden.

Eine entscheidende Rolle in der Umwandlung physikalischer Reize in chemische Signale des Zellinneren spielen die mechanosensitiven endothelialen Rezeptoren, zu denen der Kalziumkanal Trpv4 (*engl.: transient receptor potential channel, type vanilloid, member 4*) gezählt wird. Seine Aktivität konnte in Zellkultur und im Großtiermodell nachgewiesen werden und ist zusammen mit anderen Genen Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

1.1 Histologie der Koronararterien

Die Interaktion zwischen Blutstrom und Gefäßwand ist entscheidend von deren Morphologie und Funktionszustand abhängig. Prinzipiell entspricht die Schichtung der Koronararterien dem allgemeinen Aufbau arterieller Gefäße vom muskulären Typ ¹⁶⁴ (s. Abb. 1.1). Von innen nach außen werden die Tunica intima (kurz: Intima), Tunica media (kurz: Media) und Tunica adventitia (kurz: Adventitia) unterschieden. Zur Intima zählen das einschichtige und lückenlose Endothel, welches auf einer Basalmembran liegt, und eine subendotheliale zellarme Bindegewebsschicht. Der intraendotheliale Zusammenhalt durch parazelluläre Barrieren (*engl.: tight junctions, lat.: zonula occludens*) dient als Diffusionshindernis zwischen Blut und extravasalem Raum.

Die Media enthält bis zu 30 Schichten konzentrisch angeordneter glatter Muskelzellen (*engl.: vascular smooth muscle cell; VSMC*), sowie elastische und kollagene Fasern, Proteoglykane und Fibronectin. Zell-Zell-Kanäle (*engl.: gap junctions, lat.: nexus*) zwischen den VSMCs dienen der elektrischen Kopplung.

Die bindegewebige Adventitia besteht aus kollagenen und elastischen Fasern, Fibroblasten sowie den versorgenden Vasa vasorum und Nerven. Sie bildet den Übergang zu umgebenden Geweben. Zwischen Intima und Media sowie Media und Adventitia liegt jeweils ein Bereich elastischer Fasern (lamina elastica interna bzw. externa, LEI bzw. LEE).¹⁶⁴

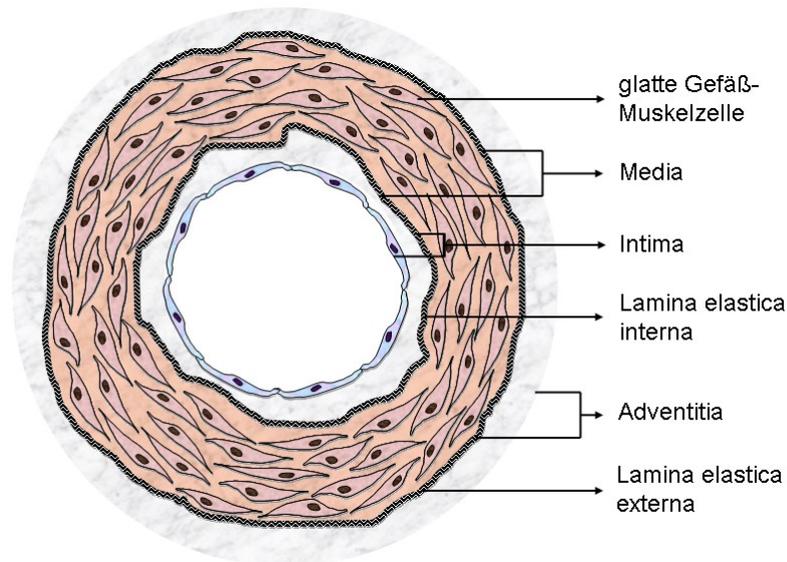


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der vaskulären Anatomie

Die Schichtung aller Blutgefäße umfasst von luminal nach peripher die Intima mit Endothel und subendotheliales Bindegewebe, die Media mit glatten Muskelzellen und die bindegewebige Adventitia. Die Lamina elastica interna bildet den intima-medialen Übergang. Die Lamina elastica externa grenzt die Media zur Adventitia ab.

(mod. n. Welsch, Lehrbuch Histologie, 2003¹⁶⁴)

1.2 Hämorheologie

1.2.1 Grundlagen

Auf die Gefäßwand wirken *in vivo* hauptsächlich zwei Kräfte: Der Blutdruck ist quer zur Gefäßachse gerichtet und wird vor allem durch die muskelstarke Media kompensiert. In tangentialer Richtung wirkt der Blutfluss in Form von Wandschubspannung (WSS, Syn.: Scherspannung, *engl.*: *shear stress*) auf die Endothelzellen² (s. Abb. 1.2).

Wandschubspannung τ wird definiert als in tagentiale Richtung wirkende Kraft F pro Flächeneinheit A , bedingt durch die in einem Rohr (z. B. Arterie) fließende Flüssigkeit. Die Einheit wird mit dyn/cm^2 , N/m^2 oder Pa ($1 \text{ dyn/cm}^2 = 0,1 \text{ Pa} = 0,1 \text{ N/m}^2$) angegeben und liegt in Blutgefäßen im Mittel zwischen 10 und 40 dyn/cm^2 .¹³³

Durch die Reibung an der Gefäßwand und die Verschiebung der Flüssigkeitsschichten gegeneinander, entsteht eine parabole Flusskurve, wobei die höchste Geschwindigkeit im Zentrum des Querschnittes erreicht wird. Dabei bezeichnet die Scherrate (γ ; (s^{-1})) (Syn.: Schergeschwindigkeit, Geschwindigkeitsgefälle, *engl.*: *shear rate*, *strain rate*) den Geschwindigkeitsgradienten, welcher sich aus der Ableitung der Geschwindigkeit v nach einer zur Geschwindigkeitsrichtung senkrechten Raumkoordinate x ergibt, also den Ausdruck dv/dx . In Newtonschen Flüssigkeiten besteht zwischen Scherrate und Schubspannung eine lineare Beziehung und die Viskosität kann als temperaturabhängige Materialkonstante betrachtet werden. Diesen Zusammenhang gibt das Newtonsche Gesetz wieder, nach welchem die Schubspannung τ sowohl proportional zur Viskosität η als auch zur Scherrate γ ist: $\tau = \eta \cdot \gamma$.^{2, 47, 166}

Da Blut als Suspension aus Zellen und Serum eine variierende Viskosität besitzt und damit streng genommen nicht zu Newtonschen Flüssigkeiten gerechnet werden kann, ist diese Theorie nur bedingt auf das Kreislaufsystem übertragbar. Die Viskosität hängt von Faktoren wie Hämatokrit (Anteil der Erythrozyten am Blutvolumen), Schubspannung und Druckdifferenz ab, kann außerdem je nach Alter und Geschlecht variieren. Als Anhaltswert gilt, dass die Viskosität des Blutes etwa 4,5-mal so groß ist wie die des Wassers, die des Plasmas nur etwa 2-mal so groß. In Gefäßdurchmessern unter 300 μm kommt der Fahraeus-Lindqvist-Effekt im Sinne einer Abnahme der effektiven Viskosität aufgrund geldrollenartiger Anordnung der Erythrozyten im Axialstrom zum Tragen. Dadurch wirkt das Plasma zwischen Zellen und Wand wie eine Schmierschicht und senkt den Reibungswiderstand.¹³⁹

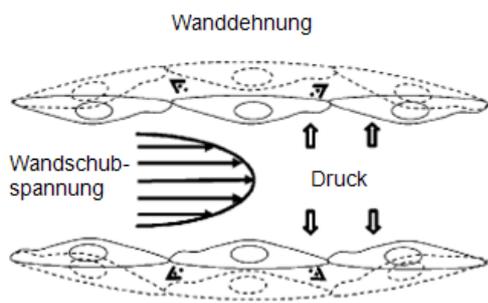
1.2.2 Strömungsformen

Laminare Strömung bzw. sogenannte Schichtenströmung ist durch axiale zylindrische Schichten gekennzeichnet, in denen sich alle Teilchen ausschließlich parallel zur Gefäßachse bewegen. Das Geschwindigkeitsmaximum liegt im Axialstrom. Dieser ist durch einen hohen Anteil großer korpuskulärer Bestandteile (z. B. Erythrozyten) gekennzeichnet und wird von einem Plasmamantel umhüllt.¹³⁹

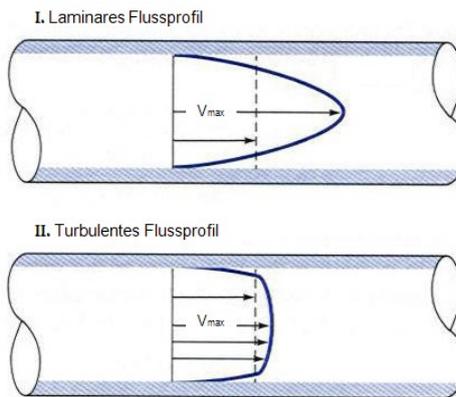
Bei Turbulenzen kommt es zu einer Abflachung des Flussprofils mit einer Verkürzung des Geschwindigkeitsvektors V_{\max} (s. Abb. 1.3). Dieses Phänomen beruht auf Wirbeln mit einer quer zur Gefäßachse gerichteten Teilchenbewegung, weshalb die Geschwindigkeit wegen der Durchmischung der verschiedenen Geschwindigkeitszonen mit Ausnahme der Rohrwandnähe über den ganzen Rohrquerschnitt nahezu konstant ist.³⁸

Eine große Bedeutung für das Strömungsprofil besitzt die Gefäßgeometrie. Ändert sich diese, kann es zur Strömungsseparation kommen, bei der sich einige Flüssigkeitsteilchen getrennt vom Hauptstrom weiterbewegen. Dabei kann deren Richtung auch der des Hauptstromes entgegen gerichtet sein. Bei hohen Fließgeschwindigkeiten finden sich durch Sekundärströmungen gekennzeichnete Rezirkulationszonen. Hier existieren neben dem axial orientierten Hauptstrom Bereiche, die sich weder als rein turbulent noch rein laminar beschreiben lassen. Prädisponierte Gefäßabschnitte sind vor allem Stenosen mit Kalibersprüngen, Verzweigungen und Kurven.^{53, 169} Dementsprechend reichen die WSS-Werte je nach Abweichung des Hauptvektors vom Negativen, über null (Zonen mit Strömungsseparation) bis über 40 dyn/cm².^{2, 133, 174} Zarins et al.¹⁷⁴ sprechen von Spitzenwerten um 600 dyn/cm² in der Carotidenbifurkation.

Allerdings ist die Nomenklatur nichtlaminarer Strömungen bzw. Schubspannung (NLSS) uneinheitlich. Je nach Autor werden unterschiedliche Begriffe, wie oszillierende (*engl.: oscillatory*) oder turbulente (*engl.: turbulent*) Schubspannung sowie unruhige (*engl.: disturbed*), kreisende (*engl.: orbital*) oder verwirbelte (*engl.: vortex*) Strömungen, bevorzugt, woraus man schließen kann, dass NLSS aus vielen verschiedenen Strömungsqualitäten besteht und je nach lokalen morphologischen Gegebenheiten einzelne Aspekte dominieren können.^{32, 57, 133}



1.2



1.3

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der hämorrheologischen Faktoren

In tangentialer Richtung wirkt die strömungsbedingte Wandschubspannung. Durch den pulsierenden Druck kommt es in radialer Richtung zum Gefäßquerschnitt zu einer Dehnung der Gefäßwand.

(mod. n. Wassermann et al., 2004 ¹⁵⁹)

Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines laminaren (I) und turbulenten (II) Flussprofils

Unter laminaren Bedingungen bildet sich eine Parabolform aus, deren Maximalgeschwindigkeit V_{max} im Zentrum des Rohres liegt. Bei Turbulenzen kommt es zur Abflachung der Flusskurve mit geringerem V_{max} .

(mod. n. <http://engineeringskills.wikidot.com/concepts> ³⁸)

1.3 Schubspannungsmodelle in der Forschung

Es existieren verschiedene Modelle, die die unterschiedlichen Qualitäten von Schubspannung simulieren können. Dennoch bleiben es Modellversuche, da die Physiologie nie in allen Punkten exakt nachvollzogen werden kann. Grundsätzlich werden *in vivo*-, *in vitro*- und *ex vivo*-Systeme unterschieden.

1.3.1 *In vitro*-Modelle

Zu den *in vitro*-Modellen gehört die Zellkultur. Hier gelingt es, eine spezielle Zellreihe standardisiert zu untersuchen und dabei die ungewollten Variablen auf ein Minimum zu reduzieren. Bei guter Überschaubarkeit der Parameter ist die Reproduzierbarkeit hoch. Allerdings lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse nicht immer auf die Pathophysiologie der Organismen übertragen, weshalb sich *in vivo*-Versuche in der Regel anschließen.

Einige Autoren entwickelten komplizierte Apparaturen, welche es ermöglichen, gezielt laminaren, turbulenten oder pulsatilen Fluss zu simulieren.^{32, 129, 176}

Die einfachste Möglichkeit, kultivierte Zellen einer laminaren Strömung auszusetzen, sind flache Kulturschalen, die in einen Kreislauf integriert sind, in dem durch einen Pumpenantrieb kontinuierlich oder pulsatil Medium fließt. Die Höhe der WSS ist in diesen Flusskammern exakt einstellbar. Aber auch durch Einsatz eines Drehkreisels kann das Kulturmedium beschleunigt werden und somit orbitale WSS erzeugen. Dabei ist die Strömungsgeschwindigkeit in der Peripherie höher als die im Zentrum, mit entsprechender Auswirkung auf die Genexpression.³² Zur Erzeugung NLSS entwickelten Nagel et al.¹²⁴ ein Modell mit den Qualitäten der Flusseparation und Rezirkulation, einem sogenannten *Reattachment*-Punkt und signifikanten zeitlichen und räumlichen Gradienten von WSS. Der Punkt des *Reattachments* bezeichnet dabei jenen Punkt, an dem die laminare Strömung einsetzt.

Bisher existiert allerdings kein *in vitro*-Modell, das den komplexen strömungsbedingten Bedingungen *in vivo* vollständig gerecht wird, welche der Atherosklerose und der Instent-Restenose zugrunde liegen könnten. In der Regel imitieren die jeweiligen Studien nur einen oder wenige Aspekte von NLSS *in vivo*.¹³³

1.3.2 *Ex vivo*-Modelle

Eine Sonderstellung nehmen die *ex vivo*-Modelle ein. Durch Entnahme vollständiger Gewebestrukturen und deren Kultivierung außerhalb des Organismus ist es möglich, die Funktion des Gewebeverbandes unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen. Vorteilhaft ist außerdem, dass die Dosierung chemischer Zusätze exakt bestimmt werden kann. Sowohl arterielle als auch venöse Gefäße können in Perfusionsmodelle integriert und so unterschiedlicher Flussdynamik ausgesetzt werden.^{8, 96, 151}

1.3.3 *In vivo*-Modelle

Die *in vivo*-Systeme haben den Vorteil, dass sie am lebenden Organismus und damit unter physiologischen Gegebenheiten durchführbar sind. Allerdings ist es schwierig, zwischen den gewollten und ungewollten biochemischen Effekten zu differenzieren und gezielt Faktoren auszuschalten, ohne den gesamten Organismus zu beeinflussen. Insbesondere sind *in vivo*-Experimente immer abhängig von der jeweiligen Spezies und den jeweiligen individuellen Unterschieden innerhalb einer Gruppe. Umso mehr sind ausreichende Gruppengrößen von Bedeutung. Die Erforschung der Instent-Restenose bedient sich in der Regel *in vivo*-Studien an Mensch und Tier.

Das Schwein als Tiermodell in der Herzforschung. Die Verwendung des Schweines ist aufgrund der Ähnlichkeit porciner und menschlicher Anatomie und Größe als *in vivo*-Modell zu Forschungszwecken anerkannt. Auch bezüglich der neointimalen Antwort (Zellgröße, -dichte, histopathologische Erscheinung) erweist sich das Koronarmodell des Schweines als vergleichbar mit der des Menschen.¹⁵³

Schweineherzen sind stumpfkegelförmig und erreichen ein Gewicht von ca. 500 g. Das Koronargefäßsystem besteht aus funktionellen Endarterien, welche oberhalb der Semilunarklappen aus der Aorta ascendens entspringen und subepikardial verlaufen.¹⁴⁰

1.4 Der Stent als Region turbulenter Wandschubspannung

Als Stent werden Endoprothesen bezeichnet, welche zur Überbrückung und Erhaltung des Lumens von Hohlgorganen zum Einsatz kommen. Stents werden unter endoskopischer oder radiologischer Kontrolle in z. B. tumorbedingte Stenosen (Trachea, Exkretionsgänge) oder arteriosklerotische Stenosen (Koronararterien) eingebracht. Die Bezeichnung „Stent“ geht vermutlich auf den englischen Zahnarzt Charles Stent zurück, welcher 1856 ein Material für Kiefer- und Zahnabdrücke erfand.¹³²

Bereits 1912 hatte der Chirurg Alexis Carrel die Idee, Glasröhrchen zum Ersatz der Aorta einzusetzen. In den 60er Jahren gelang es Charles Dotter und Julio Plamaz erstmals, selbst gefertigte Gefäßstützen erfolgreich in Gefäße der Extremitäten einzusetzen.⁶³ Seitdem haben sich die Stents durch stetige Verbesserung von Design und Implantationstechnik zu festen Bestandteilen der Kathetertechnik, insbesondere bei der Versorgung atherosklerotischer Koronararterien, entwickelt.

Der Gesamtdurchmesser eines scherengitterartigen Koronar-Stents variiert zwischen 2,25 und 5 mm bei einem Struttdurchmesser von 80-90 µm. Zusätzliche Beschichtung der Stents mit zytostatischen Medikamenten (*engl.: drug eluting stent, DES*), wie Tacrolimus, Everolimus oder Zotarolimus, sollen die In-stent-Restenoserate im Vergleich zu den konventionellen Stents (*engl.: bare metal stent, BMS*) verringern.

1.4.1 Die Problematik der Restenose nach PTCA und Stentimplantation

Nach Durchführung einer koronaren Intervention mit Einsetzen eines Stents (unabhängig ob BMS oder DES) kommt es in 10-30 % der Fälle innerhalb der folgenden sechs bis acht Monate zu einer sehr komplexen Gefäßantwort, die erneut zu pectanginösen Beschwerden bis hin zum manifesten Myokardinfarkt führen kann.^{16, 63, 116} Bei PTCA ohne Stenting liegt die angiographische Restenose-Rate bei 30-50 % innerhalb der ersten 4-6 Monate.^{26, 163} Offiziell spricht man von einer In-stent-Restenose (ISR), wenn der angiographisch ermittelte Lumenverlust einschließlich des Stents mindestens 50 % beträgt.^{81, 116}

Im Vergleich zu Ballondilatation führt Stenting zu einer Besserung des Erfolges direkt nach dem Eingriff und einer verminderten Rate der angiographisch nachweisbaren Restenosierung. Zu verzeichnen sind zudem weniger klinische Ereignisse nach 6 Monaten und eine geringere Notwendigkeit zur erneuten Revaskularisation, und dies

trotz einer erhöhten Inzidenz für subakute Thrombosen.^{46, 51} Faktoren, die zu einem erhöhten Risiko der ISR führen, sind Diabetes mellitus, Implantation mehrerer Stents, kleine (< 3 mm im Durchmesser) und lange Stents, Überlappungen und das Einsetzen in venöse Transplantate sowie in chronisch vollständig okkludierte Gefäße.¹¹⁶

Pathogenese. Der Prozess der Restenosierung eines koronaren Gefäßes basiert auf mehreren sich zeitlich überschneidenden und z. T. verbundenen Mechanismen (s. Abb. 1.3). Das stenosierende Gewebe enthält reichlich glatte Muskelzellen und extrazelluläre Matrix (ECM). Die akute Lumenverringerung in der frühen Phase beruht auf elastischen Rückstellkräften (*engl.: elastic recoil*). Die Verletzung des Endothels und die Freilegung der darunter gelegenen Gewebe führt zu einer Aktivierung der Thrombozyten mit Bildung eines Thrombus, dessen intimaler Massenanteil zu einer erheblichen Lumeneinengung führen kann.⁶³ Durch Proliferation und Migration glatter Muskelzellen sowie deren Sekretion einer extrazellulären Matrix bildet sich eine Neointima. Umbauvorgänge (*engl.: remodelling*) prägen als chronische Prozesse die Arterienwand.²⁶

Elastische Rückstellkräfte (*engl.: recoiling*). Unmittelbar nach durchgeführter PTCA reagiert das dilatierte Gefäß mit einer auf die Überdehnung der Laminae elasticae interna und externa zurückzuführenden Vasokonstriktion, die von wenigen Minuten bis zu 24 Stunden anhalten und mit einem Lumenverlust von 40 % einhergehen kann. Durch die Stabilisierung der Gefäßwand durch einen Stent wird der Grad der *recoil*-bedingten Lumenverringerung signifikant gesenkt, was sich positiv auf die Verringerung der IRS-Rate auswirkt.⁷

Thrombosierung. Die Dilatation der Arterie durch einen Ballon führt zu einem Verlust der Integrität des Endothels. Oft reicht die Verletzung des intimalen Gewebes bis zur Lamina elastica interna, wodurch kollagene Strukturen und die hochgradig thrombogen wirkende ECM freigelegt werden.²⁶ Nach Bildung eines stabilen Thrombus im Rahmen der Hämostase bewirken einwandernde Phagozyten und glatte Muskelzellen, welche proliferieren und schrittweise thrombotisches Material ersetzen, eine Thrombusorganisation.⁶³ Wird zusätzlich durch Stenting ein Fremdkörper in den zuvor dilatierten Gefäßabschnitt eingebracht, bleibt dauerhaft ein thrombogener Reiz bestehen, wodurch die Inzidenz einer subakuten Thrombose erhöht ist, verbunden mit einer hohen Myokardinfarktrate und Letalität.^{46, 47 168}

Die Kriterien des Academic Research Consortium liefern eine einheitliche Definition der Stentthrombose, welche nach dem Zeitpunkt des Auftretens in akut (innerhalb 24

Stunden nach Implantation), subakut (1–30 Tage), spät (31 Tage bis 1 Jahr) und sehr spät (später als 1 Jahr) eingeteilt werden.¹⁶⁸ Der Großteil findet dabei innerhalb der ersten 6 Monate statt.^{22, 73}

Ein erhöhtes Risiko geht von vulnerablen Lipidplaques aus, bei deren Ruptur es durch einen okklusiven Thrombus zum plötzlichen Herztod kommen kann.⁵⁰ Der Grad der Thrombosierung korreliert mit der Inzidenz und dem Schweregrad der RS.⁴⁷ Eine präventive Wirkung wird der mittelfristigen Comedikation mit Thrombozytenaggregationshemmern zugesprochen, während der Einsatz beschichteter Stents dagegen die Inzidenz Stentthrombose nach einem Jahr anhebt. Neuere Studien beziffern die Rate der subakuten Stentthrombosen unabhängig ob DES oder BMS mit < 1 %. Dagegen wurden sehr späte Stentthrombosen nach DES-Implantation um 0,4–0,6 % häufiger beobachtet. Nach 3 Jahren war die Häufigkeit angiographisch gesicherter Stentthrombosen auf 2,9 % nach DES-Implantation gestiegen.¹⁶⁸

Chronische Umbauprozesse. Unter den als *Remodelling* bezeichneten langfristigen Umbauprozessen wird ein aktiver Prozess verstanden, der zu strukturellen und plastischen Umbauvorgängen der Arterienwand führt, die eine Verringerung der Gesamtdurchschnittsfläche des Gefäßes zur Folge haben. Als zugrundeliegender Mechanismus wird die Ersetzung der Hyaluronsäuren durch Kollagen und die Kontraktion dieses Narbengewebes beschrieben.^{63, 134} Das *Remodelling* besitzt daher für die interventionelle Therapie durch Stenting mit entsprechender Gefäß-Stabilisierung eine geringere Bedeutung als für die PTCA.

Neointimale Hyperplasie. Dem Prozess der neointimalen Formierung kommt die größte Bedeutung der ISR zu. Hauptsächlich handelt es sich dabei um Proliferation und lumengerichteter Migration von glatten Muskelzellen sowie um Produktion von extrazellulärer Matrix bereits in den ersten Wochen nach Stentimplantation.^{16, 49} Bisher beschriebene Ursachen umfassen mechanische Strapazierung, Ruptur der Lamina elastica interna und ggf. die Verletzung der Media, vor allem durch Überdehnung und des daraus folgenden Einreißen des Gewebes. Zusätzlich wirkt sich das Eindringen der Struts in die Lipidschicht des Artheroms steigend auf ISR aus.^{7, 49, 81} Histologische Untersuchungen von Grewe et al.⁶¹ ergaben folgenden zeitlichen Verlauf der Entwicklung einer Neointima:

Reparationsphase. Diese erste Phase führt zu einer Abdeckung des durch das Stenting gesetzten Defektes und der Struts. Ein intramurales Hämatom, hervorgerufen

durch die Ruptur der Plaque oder mediale Dissektion, und ein membranöser muraler Thrombus, bestehend aus Erythrozyten, Neutrophilen und Thrombozytenaggregationen, bilden die Hauptkomponenten. Extrazelluläre Matrixstrukturen lassen sich zu diesem Zeitpunkt kaum nachweisen. Wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Antwort sind Lymphozyten, welche sich im gesamten gestenteten Areal wiederfinden, in höherer Dichte vor allem aber im Bereich der Struts, sowie Makrophagen. Bereits nach 28 Tagen wurde eine vollständige Lumenauskleidung mit Gewebe gefunden. Diese misst bis zu 120 µm von der Media bis zum Lumen über den Bereichen zwischen den Struts, während direkt über den Struts nur einige µm erreicht werden.

Proliferationsphase. Diese Phase ist durch das Einwandern von glatten Muskelzellen (*engl.: smooth muscle cell, VSMC*) in den membranösen Thrombus und Proliferation gekennzeichnet, mit einem Maximum ca. 7 Tage nach Stentimplantation. Die VSMCs sind für die Produktion der Matrix verantwortlich. ^{100, 136}

Die für die vollständige Heilung des gestenteten Segmentes notwendige endotheliale Entwicklung spielt sich in drei Phasen ab, wie Grewe et al. zeigten: ^{47 61}

Endotheliale Denudation. In der frühen Phase konnten keine Endothelzellen nachgewiesen werden. Den Abschluss zum Lumen bildet in den ersten Wochen nach der Stentimplantation ein membranöser Thrombus.

Reendothelialisierung. Bis zur 12. Woche nach Intervention sind VSMCs an der neoinimalen Abgrenzung beteiligt, welche langsam von der sich neu bildenden Endothelschicht übernommen wird.

Neoendothelium. Der früheste Nachweis einer geschlossenen Endothelschicht gelang Grewe et al. am 96. Tag nach dem Stenting. Das Neoendothelium ist zu einer normalen Funktion nicht in der Lage, wie die erhöhte Anfälligkeit für Thrombenbildung auch Wochen nach Intervention zeigen. ^{61, 63}

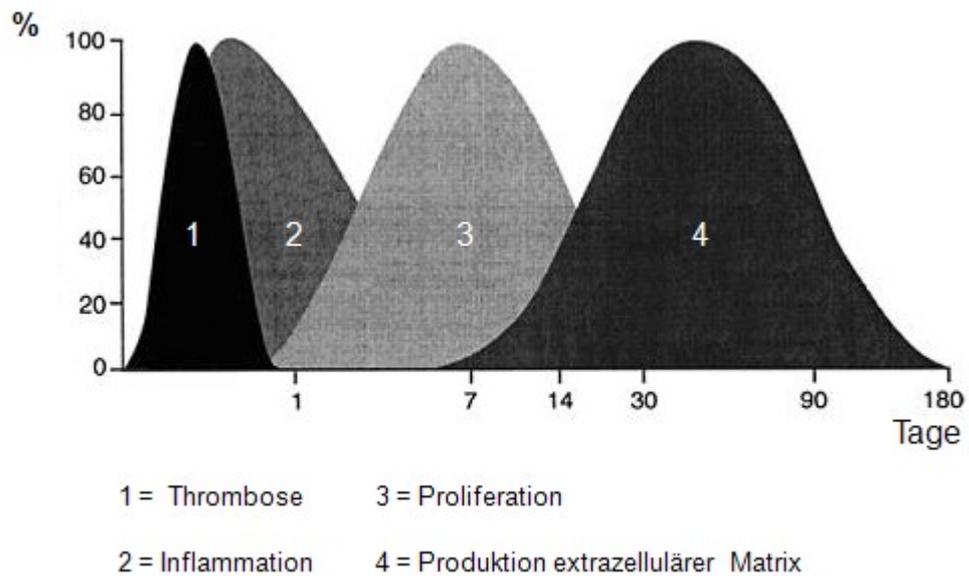


Abbildung 1.4: Zeitliche Abfolge der wichtigsten Prozesse der Restenose

Thrombosierung und Inflammation sind die wesentlichen Pathomechanismen innerhalb der ersten Wochen nach Intervention. Längerfristig sind Proliferation und Produktion der extrazellulären Matrix von Bedeutung.

(mod. n. Weintraub et al.; 2007 ¹⁶³)

1.4.2 Neointimahyperplasie aufgrund pathologischer Hämodynamik

Veröffentlichungen haben gezeigt, dass das unmittelbare geometrische Umfeld eines implantierten Stents den regionalen Blutfluss sowie das Schubspannungsprofil beeinflussen kann und somit mitbestimmend für das Verteilungsmuster der neointimalen Hyperplasie ist.^{3, 47, 90, 117, 152, 165} Mathematische und numerische Modelle erlauben Berechnungen und Simulationen des Blutflusses und die präzise Bestimmung lokaler hämodynamischer Effekte.^{58, 138} Realistische dreidimensionale (3D) geometrische Rekonstruktionen basieren auf einer Kombination aus konventioneller Koronarangiographie und intravaskulärem Ultraschall sowie numerischer Simulationen von Blutflussverhalten (*engl.: computational fluid dynamics, CFD*). Ergänzend kann die Berechnung pulsatiler Strömungen durchgeführt werden. Damit ergibt sich eine umfassende und präzise Darstellung des räumlichen Schubspannungsprofils der simulierten Gefäße und dessen Veränderung in Abhängigkeit von zeitlichen Flussschwankungen, z. B. bedingt durch den Herzzyklus.^{3, 47, 90, 93} Die Kalkulationen beruhen vereinfachend auf der Annahme Newtonscher Flüssigkeiten, einer laminaren Strömung und eines parabolischen Geschwindigkeitsprofils.^{93, 138}

Allerdings verhält sich Blut nur in Regionen mit hoher WSS wie eine Newtonsche Flüssigkeit, sodass es innerhalb des Stents aufgrund der Ausbildung von Zonen niedriger WSS unterschiedliches Verhalten geben könnte.⁴⁷ Ebenso muss das Vorliegen eines laminaren Blutflusses in Parabolform als ideal betrachtet werden. Folglich sind die Ergebnisse solcher Simulationen nicht bedenkenlos auf die Vorgänge *in vivo* übertragbar.

Flussdynamik innerhalb des Stents. Die Quantifizierung der Veränderungen der Schubspannung in axialer Richtung einer gestenteten Arterie erbrachte folgendes Ergebnis:

An den Übergangszonen des gestenteten zum ungestenteten Areal (proximales und distales Stentende) finden sich je nach Platzierung des Stents erhöhte WSS-Gradienten.⁹¹ Insbesondere an den Kanten des ersten proximalen sowie des letzten distalen Stentstruts wurde eine gesteigerte WSS ermittelt. Einige Publikationen sprechen allerdings auch von vergleichsweise geringerer WSS an den Stentenden.^{92, 138} In jedem Fall bedingt die Implantation eines Stents eine dauerhafte Versteifung dieses Gefäßabschnittes, wodurch es an den Übergangszonen zu unterschiedlichen

Veränderungen der Hämodynamik im Sinne von Beschleunigungen, Stagnationen und Verwirbelungen kommen kann.^{3, 116}

Über die gesamte axiale Stentlänge hinweg entsteht eine durch die Strutgeometrie bedingte Abfolge sehr niedriger Schubspannungswerte im Wechsel mit Schubspannungsspitzen⁹¹ (s. Abb. 1.5). Je regelmäßiger die Gestalt eines Stents ist, umso gleichförmiger verhält sich auch der Blutfluss.³ Die Darstellung des hämodynamischen Profils in Abhängigkeit des pulsatilen Blutflusses zeigt, dass die größten Schubspannungswerte bei maximaler Fließgeschwindigkeit erreicht werden, während die Zonen geringer Schubspannung bei minimaler Geschwindigkeit ihre größte Ausdehnung erreichen.^{91, 93}

Zusätzlich konnten im virtuellen computer-gestützten Vergleich unflexibler Stents mit flexiblen Stents⁹³, welche sich der vorgegebenen Gefäßkrümmung anpassen, ein homogeneres Schubspannungsprofil im flexiblen Stent nachgewiesen werden^{91, 93}. Praktische Anwendung finden flexible Stents zum Beispiel mit dem FlexStent[®] der Firma Flexible Stenting Solution[®] für den Bereich der oberflächlichen A. femoralis oder der A. poplitea¹⁷. Koronare flexible Stents sind bislang jedoch nicht auf dem Markt.

Hämodynamik auf Strutebene. Die 3D-Simulationen gestenteter Gefäße ergeben ein komplexes Verteilungsmuster von Blutfluss und WSS (s. Abb. 1.7). Wesentlicher Bestandteil der Hämodynamik innerhalb eines Stents sind sekundäre Strömungen, welche bis zu 30 % der axialen Hauptströmung ausmachen können⁴⁷. Die sekundäre Strömung ist der Fluss, welcher sich senkrecht zur Hauptströmungsrichtung verhält, jedoch nicht den Querschnittsmittelpunkt erreicht, sondern sich auf den Wandsaum beschränkt und vor allem in Strutnähe entsteht. In Regionen ohne zur Hauptströmung senkrecht stehende Struts fehlt sekundäre Strömung.⁴⁷ Unmittelbar vor einem Strut ist der Vektor radialer Strömungen lumenwärts gerichtet, wohingegen sich direkt nach einem Strut Rezirkulationszonen finden, deren Vektor auf die Arterienwand zeigt.^{47 90}¹⁴² Dieses Phänomen ist am stärksten an orthogonalen Struts ausgeprägt, die im 90°-Winkel zur Gefäßachse liegen⁹⁰ (s. Abb. 1.6). LaDisa et al.^{90, 93} sprechen zudem von einer Kanalisierung wandnaher Blutlagen, deren Strömungsrichtung durch die Strutgeometrie bestimmt wird, sowie von Zonen der Stagnation um die Struts herum. Dementsprechend werden in Strutnähe durch diese vom axialen Hauptfluss abweichenden Strömungen nur geringe Schubspannungswerte erreicht, da WSS definitionsgemäß durch einen tangentialen Vektor bestimmt wird.³ Ähnlich verhält es sich an den Verbindungspunkten der Struts, im Gegensatz zu den Strutoberflächen selber, welche durch erhöhte WSS gekennzeichnet sind.^{3, 47, 90} Je größer die Abstände

der Struts sind, umso höhere Schubspannungswerte werden über den strutbegrenzten Feldern erreicht.^{3, 92} Bei geringeren Strutabständen als deren sechsfacher Durchmesser verschmelzen die strutanliegenden Stagnationszonen, während größere Abstände zur Separierung führen.¹¹

Hämodynamik bestimmt Zellproliferation und -migration in Stents. Die in Kapitel 1.4.1 als ursächlich beschriebenen Faktoren (Inflammation, Koagulation etc.) sind vor allem systemischer Natur und geben nicht ausreichend Antwort auf die Frage, warum Restenosierung innerhalb eines Stents oft sehr unsymmetrisch auftritt.^{112, 165} Daher liegt die Hypothese nahe, dass der ISR eine Änderung der lokalen Blutflussdynamik zugrunde liegen könnte, wie sie bei Stentimplantation auftritt.^{47, 90, 93, 142, 165} Ob die vorliegenden atherosklerotischen Plaques durch ihre Verteilung ebenfalls die Lokalität bestimmen, erscheint naheliegend, wurde bisher allerdings nicht hinreichend geklärt.¹⁶⁵

Die nach Stenting zu beobachtende komplexe Gefäßantwort unterliegt dem kombinierten Einfluss eines räumlichen Schubspannungsprofils und -gradienten einerseits, sowie den Veränderungen dieser in Abhängigkeit des pulsativem Blutstromes auf der anderen Seite.⁹³ Das Endothel ist wichtiger Bestandteil der Kompensationsmechanismen, die die Schubspannung zwischen 15-20 dyn/cm² konstant halten. Regionen mit hohen Schubspannungsraten (>12 dyn/cm²) scheinen weniger von intimaler Hyperplasie betroffen zu sein, als Zonen geringer (<4 dyn/cm²) oder oszillierender Schubspannung (-7 bis 4 dyn/cm²).^{88, 90, 108, 117, 165} Ähnlich wie bei atherosklerotischen Prozessen konnte Restenosierung zusätzlich in Zonen oszillierender und nichtlaminarer Strömungseinflüsse nachgewiesen werden.^{30, 86, 88, 90} Außerdem wurde, parallel zur beobachteten Reduktion der ISR durch Strömungsbeschleunigung, auch eine Verminderung des Verletzungs- sowie des Inflammationsgrades gefunden.^{18, 135} Faik et al.⁴⁷ begründen dies durch die Beeinflussung der endothelialen Erneuerung und Plättchen-Adhäsion durch lokale Hämodynamik. Sie vermuten aber zudem, dass hohe Schubspannungswerte an den Strutspitzen Erythrozyten zerstören könnten, woraufhin das austretende Hämoglobin die ISR fördert.

In klinischen Studien konnte belegt werden, dass neben der Gefäßgröße vor allem Stentdesign und -größe wichtige Faktoren in hyperplastischen Prozessen darstellen.^{78-80, 128} Gleiches wurde neben Computersimulationen auch durch Tierexperimente gezeigt. Demnach wirkt sich die Implantation metallreicher¹⁵² und rigider⁵² Stents stimulierend auf neointimale Hyperplasieprozesse aus. Rogers et al.¹³⁵ messen der Stentgeometrie und dem Oberflächenmaterial sogar eine größere Bedeutung bei, als

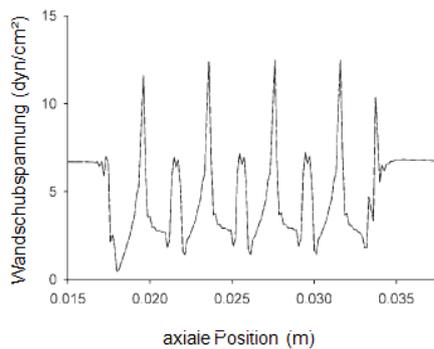
dem postinterventionellem Gefäßdurchmesser. LaDisa et al.⁹³ formulieren die Hypothese, dass die Begradigung des gestenteten Areals durch Implantation eines unflexiblen Stents auf die Hämodynamik Einfluss nehmen könnte. Zusätzlich könnten auch Struttdimension und Rastermaße, sowie Art der Dilatation bei Implantation und Geometrie des Lumenquerschnittes von Bedeutung sein.^{3, 91, 135, 152}

Die ISAR-STEREO-Studien von Pache und Kastrati et al.^{79, 128} bewiesen, dass dünnere (50 µm) im Vergleich zu dickeren (140 µm) Stentstruts eine günstigere Prognose bezüglich der Restenose aufweisen. Insbesondere scheinen Patienten mit komplexeren Läsionen von dünnen Struts zu profitieren.⁶⁵

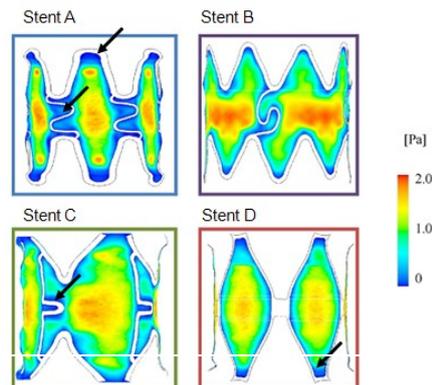
Im porcinen Stentimplantationsmodell wurde allerdings kein Zusammenhang zwischen Stentlänge (8 mm vs. 16 mm) und ISR festgestellt.⁸⁷ Im computersimulierten Vergleich zirkulärer und polygonaler Stents, zeigten die polygonalen mit wenigen Struts ein von geringer WSS und höheren Gradienten geprägtes hämodynamisches Profil, weshalb letztere prädisponiert für ISR sein könnten.^{56, 91} Balossino et al.³ sehen in der erhöhten Gleichmäßigkeit der Stentgestalt eine Möglichkeit der Reduktion der ISR.

Detaillierte computergestützte Untersuchungen der Hämodynamik lassen darauf schließen, dass die Klassifikation der ISR von Mehran et al.^{81, 112} auf lokalen Eigenschaften und Umständen des jeweiligen Stents beruhen könnte.

Wentzel et al.¹⁶⁵ fanden eine negative Korrelation von Schubspannung und Neointimahyperplasie (NH). Demnach wurde die größte intimale Dicke in der dem Myokard aufliegenden konvexen Gefäßkurve gefunden, welche durch geringe Schubspannung gekennzeichnet ist. Auf der gegenüberliegenden konkaven Seite fand sich dagegen bei hoher Schubspannung vergleichsweise geringe Hyperplasie. An den proximalen und distalen Übergangszonen des Stents zur unberührten Arterie (sog. Edge-Zonen) ist die NH besonders ausgeprägt.^{90-92, 116} Niedrige Schubspannungswerte innerhalb eines Stents und seinen Kanten gehen mit neointimaler Proliferation einher⁴⁷, wobei LaDisa et al.⁹¹ einräumen, dass ein erhöhter Schubspannungsgradient die per se protektive Wirkung von Schubspannung ausgleichen oder sogar überwiegen kann. Allerdings weisen die Regionen mit ISR-förderlicher Hämodynamik (Strutnahe Bereiche) oft auch einen interventionsbedingten erhöhten Verletzungsgrad auf, was ebenfalls in einer Intimaproliferation resultiert. Im Zuge der NH verändert sich die Verteilung der WSS und es kommt zu einer Glättung des WSS-Profiles⁹² (s. Abb. 1.7).



1.5



1.6

Abbildung 1.5: Wandschubspannungsprofil innerhalb eines Stents

Durch die periodische Abfolge der Stentstruts bildet sich ein heterogenes Schubspannungsmuster aus mit von WSS-Spitzen gefolgt von WSS-Tälern.

(mod. n. LaDisa et al.; 2005⁹¹)

Abbildung 1.6: Wandschubspannungsprofil unterschiedlicher Stenttypen

Die farbige Markierung der Schubspannungswerte zeigt die Abhängigkeit der Strömung vom Stentdesign. Stent A zeigt deutlich Zonen mit geringer WSS während Stent B und C zusätzlich größere Flächen mit hohen Werten aufweisen. Stent D zeigt ein vergleichsweise ausgewogenes WSS-Muster. Vor allem die quer zur Strömungsrichtung gelegenen Struts bilden an den Rändern Stagnationszonen aus (Pfeile).

(mod. n. Balossino et al.; 2008³)

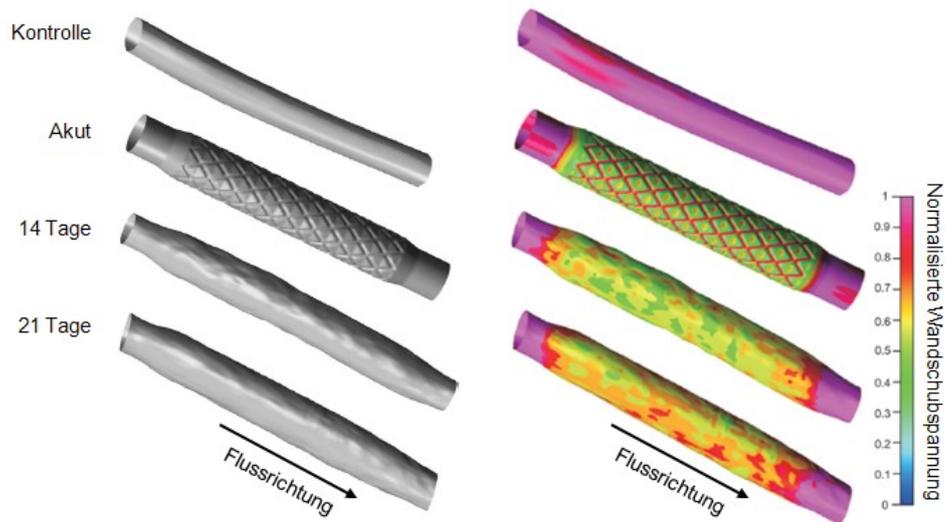


Abbildung 1.7: Computergestützte Simulation des Oberflächen-profils nach Stentimplantation

Links: Innerhalb von 21 Tagen glättet sich die luminale Oberfläche des gestenteten Gefäßes. Rechts: Die Wandschubspannung wurde auf Werte zwischen 0 und 1 normalisiert. Das durch das Strut-Raster verursachte WSS-Muster verstreicht im Verlauf.

(mod. n. La Disa et al. 2006⁹³)

1.5 Kalziumabhängige Genexpression nach Trpv4-Aktivierung

1.5.1 Signalling durch Kalzium

Intrazelluläres Kalzium ist in vielen Signalwegen der Proliferation, Apoptose, Differenzierung oder Zellmotilität zu finden. Man unterscheidet kurzfristige Effekte, wie Kontraktion, Sekretion, Exozytose und sensorische Signaltransduktion von langfristigen Antworten, wie bspw. Zellwachstum, -teilung und -tod. Amplitude und räumliche bzw. zeitliche Dynamik bestimmen dabei die Vielfalt der kalziumvermittelten Prozesse. So soll akute Schubspannung bspw. einen biphasischen Kalziumanstieg induzieren.^{2, 9, 10, 162}

Kalziumpotenzial. Kalziumionen fungieren als allosterische Aktivatoren oder Inhibitoren intrazellulärer Enzyme des Zytosols, der Organellen und des Kerns. Die zytosolische Konzentration schwankt je nach Aktivitätszustand der Zellen zwischen 100 nM und 10 μ M.¹⁰ Anstiege resultieren aus dem Einstrom extrazellulären Kalziums sowie aus der Mobilisierung aus intrazellulären Kalziumspeichern, wie dem endo- bzw. sarkoplasmatische Retikulum. Der schnelle Anstieg ist durch Entleerung der intrazellulären Speicher bedingt, die langfristige Aufrechterhaltung durch die transmembranären Ströme. Dabei handelt es sich weniger um einen generellen Anstieg, als um oszillierende Schwankungen auf hohem Konzentrationsniveau.² Mit Pumpen wie der Ca^{2+} -ATPase und dem $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher wird das Kalzium schließlich wieder aus dem Zytoplasma entfernt.^{10, 122} Sogenannte Kalziumbindende Proteine (*engl.: calcium binding proteins*) agieren als Kalziumpuffer und bestimmen damit Amplitude und Dauer des Signals. Beispiele sind Parvalbumin, Calbindin-D und Calretinin.¹⁰

Kalziumkanäle. Die wesentlichen Kalziumkanäle werden in Ligandengesteuerte, Rezeptor-, Dehnungs- und Spannungsabhängige Kationenkanäle eingeteilt.¹⁶² Allerdings konnten bislang die molekularen Strukturen nur unvollständig identifiziert werden. Eine wichtige Gruppe, die in den letzten Jahren ins Licht der Forschung rückte, ist die Familie der Trp-Kanäle (*engl.: transient receptor potential*). Allerdings sind nicht alle dieser Kanäle ausschließlich kalziumspezifisch. Auch andere Kationen (Natrium etc.) können via einiger Trp-Typen Membranen passieren.

Die Bezeichnung *transient receptor potential* beschreibt den Phänotyp einer Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, in deren Photorezeptoren in den 1960er-Jahren ein Kanal gefunden wurde, der auf Lichtreize mit einem transienten, d. h. einem

schnell inaktivierten Ionenstrom reagierte. Im Gegensatz dazu traf dies nicht auf den Wildtyp zu, welcher unter Lichtreiz oder Depolarisation den Membranstrom aufrechterhielt. Erst 1992 gelang es, das verantwortliche Protein zu klonieren.^{113, 162}

Neben muskulären Geweben wie Herz, Skelettmuskel und der Media von Gefäßen, werden Trp-Kanäle von Neuronen, Fibroblasten und Nierenzellen exprimiert. Dementsprechend vielfältig sind auch die Funktionen. Insbesondere die sensorische Wahrnehmung von verschiedenen Geschmacksrichtungen, Temperaturempfinden und Nozizeption sind Trp-vermittelt.^{31, 62, 114} Aber auch in kardiovaskulären Prozessen sind Trp-Mitglieder involviert.^{89, 162, 167} Bislang wurden 28 verschiedene Trp-Kanäle charakterisiert, die man in sieben Untergruppen einteilt. Neben den Trpc- (c für *canonical*), Trpp- (p für *polycystin*), Trpml- (ml für *mukolipin*), Trpn- (n für *NOMPC*), Trpa- (a für *ankyrin*) und den Trpm-Kanälen (m für *melastatin*) existiert die Trpv-Subfamilie (v für *vanilloid*), zu welcher die Kanäle Trpv1-6 gehören.^{115, 162} Letztere weisen eine Sensibilität bezüglich Hitze, Osmolaritätsschwankungen, Duftstoffen und mechanischen Reizen auf.¹¹⁵ Auf den Trpv4-Kanal wird gesondert in Kapitel 1.5.2 eingegangen. Trp-Mutationen werden für verschiedene menschliche Erkrankungen verantwortlich gemacht, bspw. auch Tumorleiden.^{115, 131}

Kalziumabhängige Signalwege. Durch Bindung der Ionen an Proteine, welche dadurch in ihrer Konformation geändert werden, können nachgeschaltete Signalwege aktiviert werden. Zu den klassischen Vertretern zählen Troponin C (TnC), ein Bestandteil der muskulären Sarkomerstruktur, und Calmodulin (CaM), ein Schlüsselement proliferativer Prozesse. Letzteres reguliert unter anderem die Familie der Kalzium-Calmodulin-abhängigen Kinasen Typ II (CaMKII) und einige Membrankanäle. Andere kalziumabhängige Enzyme sind an der Regulation des Zellzyklus beteiligt.^{10, 77}

Über die Aktivierung von zytoplasmatischen und nukleären Transkriptionsfaktoren (TF) können Gene in ihrer Expressivität reguliert werden. Durch die Stimulation der Proteinphosphatase Calcineurin wird bspw. NFATc kalziumabhängig dephosphoryliert und kann in den Kern translozieren, wo es an die DNS bindet. CREB wird hingegen im Kern durch die CaMK II und CaMK IV phosphoryliert. Ebenso gehört das CREB-bindende Protein (CBP), ein Coaktivator, zu den kalziumsensiblen Faktoren.^{9, 10, 20, 21, 34, 85, 122} Kalzium stellt auch in Verbindung mit MAPK-Signalwegen und durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren einen wichtigen Faktor der Proliferationsmechanismen dar.¹⁰ In die MEF2C-Aktivierungsfunktion (Myozyten-

unterstützender Faktor, *engl.: myocyte-specific enhancer factor 2C*) einer dieser MAP-Kinasen (BMK1, *engl.: big MAP kinase 1*) in Endothelzellen ist Kalzium involviert. ¹⁷¹

Oft sind die einzelnen Mechanismen über Feedback-Reaktionen miteinander verknüpft. Beispielsweise interagiert Kalzium mit dem ubiquitär vorkommenden cAMP. Einige Isoformen werden kalziumabhängig stimuliert, während andere inhibiert werden. Umgekehrt hat der zytoplasmatische cAMP-Spiegel Auswirkung auf Ca^{2+} -Konzentration, wie zum Beispiel in Herz- und Skelettmuskel über die Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals vom L-Typ. ¹⁰

Kalzium in Gefäßen. In Gefäßen spielt Kalzium eine wichtige Rolle in der Vermittlung hämodynamischer Einflüsse. Ausgelöst durch unterschiedliche Reize erfolgen Ionenströme (neben Ca^{2+} -Ionen vor allem auch K^{+} -Ionen) in Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Endothelzellen unterscheiden zwischen akuten (Tonus- und Permeabilitätsänderungen) und länger andauernden Antworten (Zellmorphologie und Genexpression). ³⁶ Insbesondere die EDH-Dilatation (*engl.: endothelium-dependent hyperpolarization*) stellt einen prominenten kalziumabhängigen Mechanismus dar. Glatte Gefäßmuskelzellen sind in der Lage, durch massiven Kalziumeinstrom über die Bindung an die kontraktilen Elemente ihren Tonus zu regulieren. ³⁵ Die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase sowie der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (*engl.: nitric oxid*, NO), welches unter benachbarten Zellen zu den parakrinen Kommunikationswegen zählt, wurde ebenfalls als kalziumabhängig beschrieben. Durch NO werden glatte Muskelzellen animiert, cGMP zu produzieren, was wiederum in zytoplasmatischer Freisetzung von Kalzium münden soll. ¹⁰

Die auslösenden Reize Ca^{2+} -abhängiger Signaltransduktionen sind ähnlich vielfältig wie die kalziumbeeinflussten Prozesse. Bislang konnten Mechanismen, wie bspw. oxidierende Radikale oder mechanische Kräfte der Hämodynamik identifiziert werden. ^{36, 101, 154} Wesentlich beteiligt sind die Trp-Kanäle. Mindestens 19 (alle Trpc-Mitglieder, Trpv1, -v2, -v4, alle Trpm-Mitglieder (außer -m5), Trpp1, -p2) werden von Endothelzellen exprimiert. Durch sie werden die intrazelluläre Kalziumkonzentration und das Membranpotenzial reguliert. ⁸⁹ In weiteren Schritten hängen Funktionen wie Vasodilatation und -kontraktion, Angiogenese sowie die Aufrechterhaltung der endothelialen Barriere von den Kalziumsignalen ab. ^{89, 155}

1.5.2 Transient receptor potential channel, type vanilloid, member 4 (Trpv4)

Charakteristik. Der Trpv4-Kanal gehört zu den mechano- und osmosensitiven Kalzium-Kanälen. Erstmals beschrieben wurde Trpv4 in den Jahren 2000/01 unter den Synonymen OTRPC4 (*engl.: OSM-p-like TRP channel 4*), VROAC (*engl.: vanilloid receptor related osmotically activated channel*), Trp12 (*engl.: transient receptor potential channel 12*) und VRL-2 (*engl.: vanilloid receptor-like channel 2*).^{33, 41, 149, 167}

Trpv4 besteht aus 871 Aminosäuren und ist durch sechs transmembranäre Domänen (S1-6) gekennzeichnet (s. Abb. 1.8). Die amino-terminale Domäne und der Carboxylterminus sind intrazellulär lokalisiert. Erstere enthält drei hintereinandergeschaltete Ankyrindomänen. Zwischen den transmembranären Abschnitten S5 und S6 befindet sich eine Schleifenregion, welche funktionell als Pore dient. In Säugetierzellen ist Trpv4 ein für Kalzium weitgehend selektiver Ionenkanal ($P_{Ca}/P_{Na} = 6$).^{97, 162, 167} Voets et al.¹⁵⁶ bezeichneten die 672. und 682. Aminosäure (jeweils Aspartat) als entscheidende Determinanten der Kalziumsensitivität.

Expression. Wissenbach et al.¹⁶⁷ identifizierten Trpv4 in erhöhtem Maße in der Niere. Ebenfalls wurden in Herz, Hirn und Leber vermehrte Expression gefunden. Neben dem Endothel exprimieren auch das Epithel der Atemwege und das autonome Nervensystem Trpv4.^{89, 97, 155}

Osmolarität. Die Aktivität des Trpv4-Kanals ist abhängig vom extrazellulären Milieu. In isotonischem Medium ist Trpv4 aktiv. Unter hypotonischen Bedingungen (Zellschwellung) kommt es zu einer Steigerung der Kanalaktivität (bei 270 mOsm/l um 50 %), während die intrazelluläre Kalziumkonzentration unter hypertonen Konditionen konstant bleibt oder absinkt. Dabei scheint die Temperatur einen regulierenden Einfluss zu besitzen. Bedeutungsvoll ist Trpv4 als Osmorezeptor z. B. in menschlichen glatten Muskelzellen der Atemwege, im wasserundurchlässigen Segment des Nephrons und in nozizeptiven Afferenzen peripherer Nerven.^{97, 149, 167}

Temperatursensitivität. Unter 24°C scheint Trpv4 temperaturabhängig deaktivierbar zu sein. Watanabe et al.¹⁶¹ vermuten hier einen Zusammenhang zwischen der Abkühlung peripheren Blutes und der reflektorischen Vasokonstriktion. So diskutieren sie eine grundlegende Offenwahrscheinlichkeit von Trpv4 zwischen 25 und 43°C als Ursache für kontinuierliche NO-Produktion. Bei physiologischen 37°C wird also eine höhere Offenwahrscheinlichkeit angenommen, als bei niedrigeren Temperaturen.

Mechanosensitivität. Die Mechanosensitivität von Trpv4 wurde in Zelltypen, wie z. B. in renalen Tubulusepithelzellen, nachgewiesen. Ähnliche Kalziumsignale in Abhängigkeit von gesteigertem Fluss konnten sowohl in kultivierten Endothelzellen, als auch in intakten Gefäßen beobachtet werden. Bei gesteigerter Schubspannung induzieren Trpv4-vermittelte Prozesse Vasodilatation und Arteriogenese. Bislang konnte jedoch der vollständige Mechanismus Trpv4-abhängiger Prozesse nicht geklärt werden.^{48, 67, 71, 84, 155}

Stimulation durch 4 α PDD. Neben Zellschwellung und moderaten Temperaturen (> 27°C) reagiert Trpv4 sensibel auf chemische Verbindungen wie z. B. 4 α -phorbol Ester.¹⁵⁷ Watanabe et al.¹⁶⁰ zeigten an Aorten-Endothelzellen aus Mäusen die Wirksamkeit der Phorbolester. 4 α PDD induziert einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Einströmen extrazellulärer Kalziumionen. Untersuchungen an HEK (*engl.: human embryonic kidney cells*) zeigten, dass 4 α PDD die höchste Wirksamkeit (~ 50-fach) verglichen mit anderen 4 α -Stereoisomeren (4 α -PMA, 4 α -phorbol) besitzt.¹⁷⁰ Die Latenzzeit zwischen 4 α PDD-Applikation und Wirkungsbeginn sowie ein verzögerter wash-out lassen eine intrazelluläre Bindungsseite vermuten. Zusätzlich konnten Vriens et al.¹⁵⁷ den transmembranären Domänen TM3 und TM4, mit einer dazwischenliegenden Bindungstasche, eine wichtige Beteiligung an der chemischen Kanalaktivierung durch 4 α -PDD zuordnen.

Neben mechanischem Stress, Hitze und chemischen Substanzen reagiert Trpv4 auf inflammatorische Stoffe wie Anandamide, Arachidonsäure und Epoxyeicosatriensäuren.¹⁶² Außerdem beschrieben Zhang und Mitarbeiter einen Zusammenhang zwischen verminderter Relaxation unter Acetylcholin-Stimulation bei endothelialer Trpv4-Blockade.¹⁷⁵

Inhibition durch Ruthenium Rot. Ruthenium Rot (RuR) ist ein polykationisches Molekül, das Mitglieder der Trpv-Familie unspezifisch und reversibel inhibiert. Dabei erfolgt die Bindung in der Kanalpore von extrazellulär aus. Durch Konzentrationen im mikro- und nanomolaren Bereich lassen sich einwärts-gerichtete Kalziumströme spannungsabhängig komplett hemmen.^{126, 156} Die Studien von Voets et al.¹⁵⁶ identifizierten die Aminosäure Asp⁶⁸² als möglichen Angriffspunkt, da deren Neutralisation die Affinität von RuR stark herabsetzt.

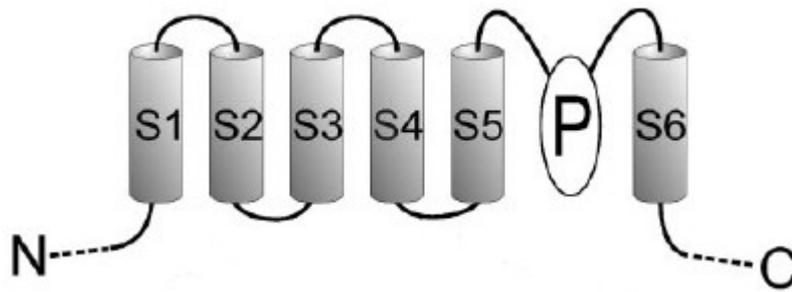


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Struktur von Trpv4

Trpv4 besteht aus sechs transmembranären Domänen (**S1-6**). Die aminoterminal Domäne (**N**) und der Carboxylterminus (**C**) sind intrazellulär lokalisiert. Zwischen den transmembranären Abschnitten **S5** und **S6** befindet sich eine Schleifenregion, welche funktionell als Pore (**P**) dient.

(mod. n. Vriens et al.; 2007 ¹⁵⁷)

1.5.3 Schubspannung und Endothel

Die zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen der Insten-Restenose (ISR) sind nur unvollständig geklärt. Eine Rolle spielen in erster Linie verletzungsbedingte Reaktionen auf Endothelverlust sowie auf das Einreißen von Lamina elastica interna und Media. Zusätzlich zu diesen akuten Effekten ist das gestentete Areal einer veränderten, in der Summe heterogenen Hämodynamik ausgesetzt (s. Kap. 1.4.2). Innerhalb einer Woche nach Implantation eines Stents infiltrieren Monozyten die Neointima. Am siebten Tag erreicht die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und inflammatorischer Zellen einen Höhepunkt, der über die folgenden Wochen persistiert. Im Rahmen des Remodellings drei Wochen postinterventionell findet Einlagerung von Kollagen in Media und Adventitia statt.¹¹⁷ In die Genese der ISR (s. Kap. 1.4.1) sind also die meisten Zellen der Gefäßwand, als auch des Blutes involviert, doch steht das Endothel an einer Schlüsselposition der vaskulären Pathophysiologie. Sowohl WSS, durch das Strömen des Blutes, als auch zyklische Dehnung, aufgrund Konstriktion und Dilatation der Gefäßwand sowie der pulsatilen Flussdynamik, beeinflussen die Endothelzellen (EC). Diese verfügen über komplizierte Mechanismen, um der Belastung standzuhalten und sich entsprechend anzupassen. Daher prädestinieren gestörte Integrität und Dysfunktion zu pathologischen Gefäßveränderungen, wie der Atherosklerose.^{27, 86}

Während die endotheliale Antwort auf laminaren Fluss durch zahlreiche Autoren charakterisiert wurde, ist über das Verhalten bei nichtlaminaren Strömungen relativ wenig bekannt.^{32, 106, 123}

Umfassende Untersuchungen der Expression von 11397 Genen an kultivierten Endothelzellen in Abhängigkeit statischer, laminarer (LSS, 10 dyn/cm²) und turbulenter (NLSS) Bedingungen erbrachten folgende Ergebnisse:⁵⁷

1. Für 100 Gene konnten signifikante Unterschiede ihrer Expression gezeigt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass kultivierte Endothelzellen in der Lage sind, zwischen unterschiedlichen Strömungsqualitäten zu differenzieren.^{57, 67}

2. Sowohl LSS als auch NLSS führt zu einer überwiegenden Suppression der Genexpression. Dabei scheint jedoch die laminare gegenüber der turbulenten Strömung ein stärkerer Stimulus bezüglich der Genregulierung zu sein. Für viele der durch laminare Schubspannung herunter regulierten Genprodukte wurde eine Beteiligung in Transkriptions- und Differenzierungsprozessen beschrieben.⁵⁷

Als mechanosensitive Elemente der Zellmembran spielen vor allem Zytoskelett, Adhäsionsmoleküle, Zell-Zell-Kontakte, Membranrezeptoren und Ionenkanäle eine Rolle. Über Secondmessenger (z. B. Kalzium, PKC, MAPK) weitergeleitet, beeinflussen die Signale Genexpression, Zellzyklus und die Morphologie des Zytoskeletts. ^{12, 24, 54, 57, 66, 75, 76, 107, 111, 120, 121, 143, 146}

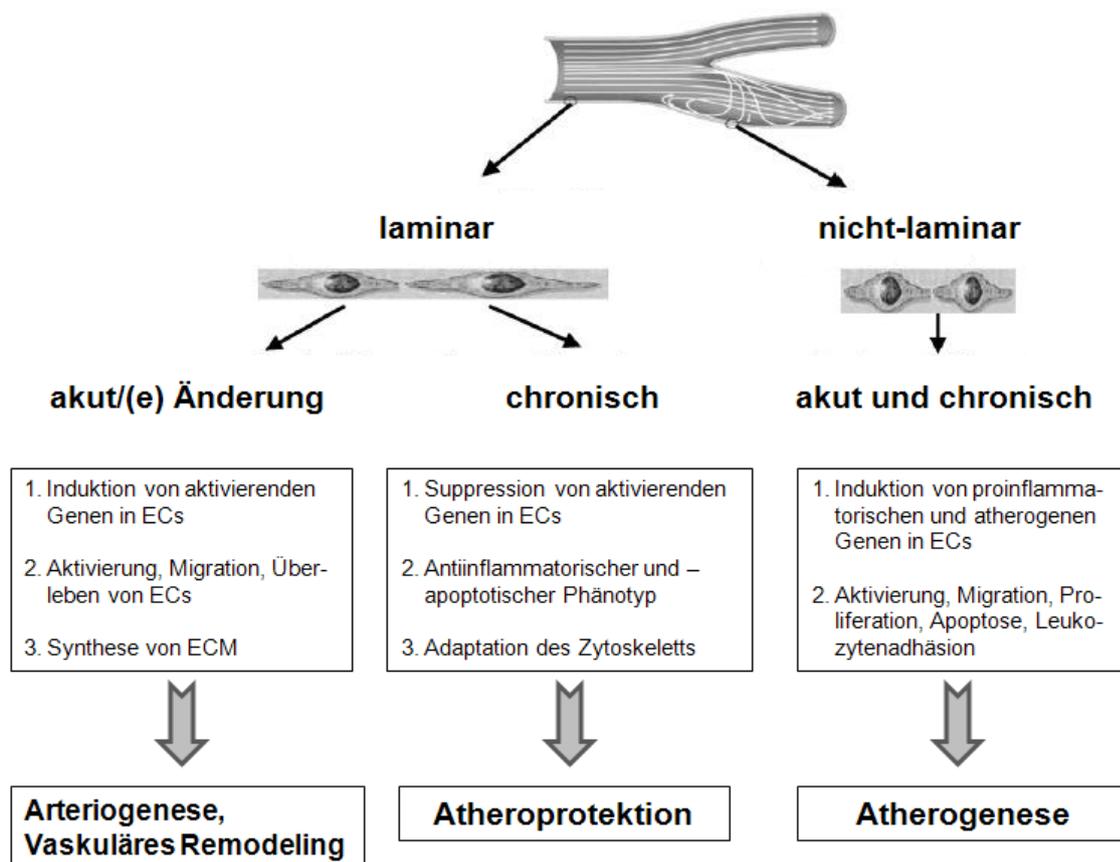


Abbildung 1.9 Qualitäten der Schubspannung in Blutgefäßen:

Die Pathomechanismen hängen von der Qualität der Wandschubspannung ab. Während chronische laminare Strömung atheroprotektiv wirkt, führen akute laminare und nichtlaminare Schubspannung zu proliferativen und inflammatorischen Prozessen.

(mod. n. Resnick et al.; 2003 ¹³³)

Es gilt zwischen akuter und chronischer WSS-Belastung zu differenzieren (s. Abb. 1.9). Akute WSS liegt dann vor, wenn ECs bislang keiner Strömung ausgesetzt waren und innerhalb von Sekunden bis zu wenigen Stunden mit WSS konfrontiert werden. Eine

solche Situation liegt vor allem in *in vitro*-Experimenten vor, bei denen ECs bis zu ihrem Einsatz unter statischen Bedingungen kultiviert wurden. Ein charakteristisches Beispiel für akuter WSS *in vivo* wäre die interventionelle Eröffnung eines thrombosierten Gefäßes. Chronische WSS dagegen ist physiologisch und existiert über Tage bis Wochen.² Interessanterweise spielen die infolge akuter WSS exprimierten Gene *in vivo* eine Rolle in Inflammation und Atherosklerose, während die chronische laminare WSS eher antiinflammatorische oder -proliferative Gene induziert.¹³³

Ionenkanäle. Wie bereits in Kapitel 1.5.2 ausgeführt, stellt der Trpv4-Kanal ein wichtiges sensorisches Element der ECs dar. Dabei liegt hier eine Spezifität für WSS vor. Ähnliches gilt auch für den Komplex aus Trpp1 (PKD1) und Trpp2 (PKD2). Andere endotheliale Trp-Kanäle dagegen, wie Trpc1 und Trpv2, sind dehnungssensibel oder, wie Trpm4 und Trpc6, drucksensibel. Diskutiert wird außerdem die Hypothese, dass die Aktivierung nicht durch den mechanischen Reiz selbst, sondern durch ausgeschüttete endogene Liganden erfolgen kann.¹⁷³

Neben einigen Kalziumkanälen aus der Trp-Familie existieren weitere mechanosensitive Membranproteine. Zu den empfindlichsten WSS-Sensoren von ECs gehören apikale Ionenkanäle, wie z. B. ein einwärts gerichteter K^+ -Kanal, welcher Ca^{2+} -abhängig aktiviert wird und dessen Transkription durch WSS reguliert wird. Die resultierende Hyperpolarisation bildet den Startpunkt nachfolgender Signalkaskaden.² Durch Barakat et al.⁴ wurde gezeigt, dass auch Chloridionen in die mechanosensitive Signaltransduktion involviert sind.

Kalziumsignale. Wie in Kapitel 1.5.1 erwähnt, wird das Ca^{2+} -Signal durch Freisetzung der Ionen aus intra- und extrazellulären Speicher gebildet. In ECs konnte die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und A2 (PLA2), und infolgedessen die Freisetzung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3), Diacylglycerol (DAG) und Arachidonsäure durch WSS und Ca^{2+} -Ionen gezeigt werden.² Ebenso bewirkt WSS die Sekretion der Vasodilatoren NO und Prostazyklin, deren Produktion auch durch Ca^{2+} -Agonisten induzierbar war. Allerdings hat die Inhibition des Ausstroms von Kalzium aus intrazellulären Speichern keine Wirkung auf die WSS-abhängige Freisetzung von NO und Prostazyklin. Dagegen scheint in diesem Zusammenhang die Bedeutung eher in den extrazellulären Vorräten zu liegen, insbesondere in einwärtsgerichteten Ca^{2+} -Strömen.² Auf eine mögliche Beteiligung von Trpv4 weisen die Ausführungen von Hartmannsgruber et al.⁶⁴ hin, deren Studien zufolge funktionslose Trpv4-Kanäle zu einer unzureichenden WSS-induzierten Vasodilatation führen.

Bestandteil kalziumvermittelter Signalwege sind Calcineurin und der nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT), der in fünf Typen (c1-5) eingeteilt wird.²⁹ Calcineurin ist ein Proteinphosphatase, die durch Dephosphorylation die zytoplasmatische Form von NFAT aktiviert. Als prominente Hemmstoffe des Calcineurins gelten Tacrolimus und Ciclosporin A.²⁸ Die kerngängige dephosphorylierte Form des NFAT bindet DNS z. T. mit anderen TFs wie z. B. AP-1 (s. u.). Studien an Lymphozyten haben gezeigt, dass NFAT vor allem auf langsame Kalziumsignale mit geringer Amplitude reagiert. Ähnlich verhält es sich in Kardiomyozyten, in denen ein dauerhafter Kalziumstrom die nukleäre Translokation von NFAT bewirkt. Bislang konnten jedoch nur Trpc-Mitglieder in diesem Zusammenhang identifiziert werden. Zudem wurde in deren Promoterregion NFAT-Bindungsstellen gefunden, weshalb ein positiver Feedbackmechanismus nach NFAT-Aktivierung möglich erscheint.^{28, 162} Dass in Endothelzellen der Calcineurin- / NFAT-Signalweg durch Trpv4 aktiviert werden kann, konnte zumindest für verstärkten laminaren Fluss im porcinen Tiermodell nachgewiesen werden.¹⁵⁵ Ob NLSS ähnliche Signale bedingt, ist u. a. Gegenstand dieser Arbeit. Ein schematischer Überblick über einige für diese Arbeit wichtige molekularbiologischen Mechanismen ist der Abbildung 1.10 zu entnehmen.

Zytoskelett und Adhäsionsmoleküle. Experimente an kultivierten humanen Aorten-ECs konnten zeigen, dass, verglichen mit statischen Bedingungen, die Migrationsgeschwindigkeit durch Fluss (15 dyn/cm²) signifikant gesteigert wird.¹⁴⁸ Eine der raschen Reaktionen der ECs liegt in der Anpassung ihres Zytoskeletts an die Fließrichtung, insbesondere durch De- und Repolimerisation von Aktinfilamenten. Die Verteilung der Adhäsionsanker und Integrine ändert sich dabei zugunsten der stromaufwärts zeigenden Zellenden. Ursache ist möglicherweise die kernbedingte Wölbung ins Lumen, welche verstärkt WSS ausgesetzt ist. Beide Prozesse sind durch intra- und extrazelluläre Kalziumchelatoren und durch Tyrosinkinasehemmer inhibierbar. Ein Zusammenhang zwischen Aktindepolymerisation durch WSS und gefolgter Endothelin-1-Expression konnte in porcinen Aortenendothelzellen (PAEC) nachgewiesen werden. Darüber hinaus scheinen auch Kalzium und die Proteinkinase C (PKC) vermittelnde Elemente zwischen WSS und zytoskelettaler Reaktionen zu sein.¹¹⁹

Bei chronischer WSS-Belastung adaptieren ECs. Die Neuformation des aktiven Zytoskeletts insbesondere in die Peripherie in dichter Beziehung zur Plasmamembran führt langfristig zu einer Abflachung der Zellkörper. Außerdem steigen die Zahl stabilisierender Zell-Zell-Kontakte und Adhäsionsmoleküle sowie die zytoskelettale Dichte.²

Zu den Adhäsionsmolekülen gehört ICAM-1 (*engl.: intercellular adhesion molecule 1*). Es handelt sich um ein Oberflächenglykoprotein, welches typischerweise auf Endothelzellen und Immunzellen exprimiert wird. Als Bindungsstation für das Integrin $\alpha L\beta 2$ (bzw. lymphozytäres funktionsassoziiertes Antigen 1, LFA-1) ist es vor allem in Entzündungsprozesse eingebunden und vermittelt unter physiologischem Fluss die transendotheliale Migration polymorphonukleärer Leukozyten.^{45, 109, 172}

Ein weiteres Oberflächenmolekül ist VCAM-1 (*engl.: vascular cell adhesion molecule 1*). Sein Gen kodiert für zwei Isoformen der zur Immunglobulin-Superfamilie gehörenden Sialoglykoproteine, die auf der Oberfläche zytokinaktivierter ECs exprimiert werden.⁴³ VCAM-1 vermittelt die Adhäsion von Leukozyten am Endothel. Die Bedeutung von VCAM-1 und ICAM-1 für strömungsinduzierte vaskuläre Prozesse wurde in verschiedenen Arbeiten bestätigt.^{1, 25, 74, 123, 150}

Proliferation und Apoptose. Proliferation und selbstinduzierter Zelltod sind durch komplexe Mechanismen gesteuert, die durch vielfältige Reize initiiert werden können. Zu den wesentlichen Auslösern gehören Stressoren wie Hypoxie, Osmolaritätsänderungen und Wandschubspannung. Dardik et al.³² beschrieben die Endothelzellen, die statischen und nichtlaminarem Fluss ausgesetzt sind, als aktivierten Phänotyp, welcher sich durch eine erhöhte Proliferations- und Apoptoserate auszeichnet und der für Atherogenese und neointimale Hyperplasie verantwortlich sein soll. Im Gegensatz dazu wurden bei Endothelzellen, die längere Zeit einem gleichförmigen Maß an Schubspannung ausgesetzt sind, adaptive Prozesse nachgewiesen, die sich in einer Veränderung der Genexpression, Morphologie, axialer Ausrichtung, sowie zytoskelettaler Anpassung äußern.¹⁵⁹ Dieser Phänotyp wird mit Atheroprotektion verbunden.¹³³ (siehe Abb. 1.9)

Zu den Transkriptionsfaktoren, deren Bindung an die DNS Proliferation und Differenzierung beeinflusst, gehören c-jun und c-fos. Das zelluläre c-jun entspricht einem Protein des gallinen Retrovirus ASV17. Mit der sog. Leucin-Zipper-Region bildet c-jun Homodimere und dimerisiert mit Mitgliedern der fos-Familie zum AP1-Komplex, einem Transkriptionsfaktor, der an der Regulierung diverser zellulärer Prozesse beteiligt ist. In humanen Endothelzellen soll die homodimere Form des AP-1 dominieren. Die Bindung an die DNA über die TREs (*engl.: TPA response elements*) beeinflusst neben Proliferation und Differenzierung auch Reaktionen auf Zellschäden.^{23, 42, 118} C-fos wird zu den Protoonkogenen gezählt und seine Aktivität und Stabilität wird durch PK-vermittelte Phosphorylierung verändert. Stimulatoren einer vermehrten Expression der Gene c-fos und c-jun und der Erhöhung der Bindungsaktivität von AP-1

in vaskulärem Gewebe waren *in vivo* akute Hypertension und verletzende Eingriffe wie die Angioplastie.¹⁷⁷ In mehreren Studien konnte eine Abhängigkeit der Expression von c-fos, c-jun und AP1 in Blutgefäßen gezeigt werden. In Abhängigkeit von Qualität und Höhe der WSS verhielten sich die jeweiligen Gene jedoch oft unterschiedlich und z. T. gegensinnig.^{55, 94, 95, 118, 125} Gemeinsam scheint die unmittelbar nach Einsetzen des Reizes beginnende Expressionsantwort. So erreichten c-fos und c-jun ihr transkriptionales Maximum im Experiment bereits innerhalb von 30 Minuten bis 3 Stunden.^{23, 106}

Ebenfalls DNS-bindende Transkriptionsfaktoren sind die Mitglieder der cAMP-responsive element-Bindende Proteine CREB-1 und -2, die mit ihrer sogenannten bZIP-Domäne in der Lage sind, Homodimere zu bilden. Voraussetzung ist die Phosphorylierung durch eine Proteinkinase. Durch Bindung von CREB-Dimeren an die CRE-Sequenz (*cAMP response element*), spezifische Nukleotidsequenzen im Promoter bestimmter Gene, werden letztere verstärkt transkribiert. Zu den Genen, die CRE in ihrer Promoterregion aufweisen, gehört bspw. c-fos.^{5, 40, 44, 110} Neben verschiedenen anderen Signaltransduktionswegen (cAMP, PKA etc.), wird CREB1 über die Ca²⁺/Calmodulinabhängige Proteinkinase (CaMK) auch kalziumgesteuert aktiviert.^{60, 144}

CREB-2 wurde synonym als Aktivierungs-TF 4 bzw. cAMP-abhängiger Transkriptionsfaktor (ATF-4) beschrieben. Es wirkt regulatorisch in Apoptose- und Inflammationsprozessen. Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen Induktion des TF und Intimahyperplasie nach Ballonangioplastie.¹⁰⁵ Weitere Zellstressoren, wie Hypoxie¹³, Mangel an Aminosäuren⁸² oder Blockade des Endoplasmatischen Retikulums¹⁰² werden ebenfalls als Aktivatoren von ATF-4 beschrieben.

Wirkung von WSS auf die glatte Gefäßmuskulatur. Die glatte Gefäßmuskulatur kann durch ihre Kontraktilität Einfluss auf die Gefäßweite nehmen. Außerdem sind die VSMCs durch Migration und Proliferation an Umbauprozessen wie der Arteriogenese, Atherosklerose oder Intenst-Restenose beteiligt. *In vivo*-Experimente von Goldman et al.⁵⁹ zeigten, dass sich die Migration glatter Muskelzellen zur Höhe der Schubspannung umgekehrt proportional verhält und in von Turbulenzen geprägten Arealen gesteigert ist. Laminare Schubspannung inhibiert, verglichen mit statischen Bedingungen, endothelinduzierte Migrationsprozesse glatter Muskelzellen.¹⁵⁸ Eine Schlüsselrolle spielt hier das Endothel als sensorisches Element. Voraussetzung für die Signalübertragung zw. intaktem Endothel und Media über die subendothelialen

Schichten hinweg sind Mediatoren. Deutliche Hinweise dafür liefern Co-Kultivierungen beider Zelltypen, in der Unterschiede bezüglich Migrationsneigung im Vergleich zur VSMC-Reinkultur aufgezeigt werden konnten.¹³⁷

Prominente Vertreter diese Kommunikationsstoffe sind der Vasodilatator NO und das konstriktorische Endothelin-1. Bedeutung für die Entwicklung des Gefäßsystems besitzt das Polypeptid MEF2C (*engl.: Myocyte-specific enhancer factor 2C bzw. MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C*), welches als Transkriptionsaktivator die kardiale und skelettale Myogenese sowie die der glatten Muskulatur steuert.^{39, 127,}

145

LSS versus NLSS. Es ist bemerkenswert, dass das Endothel sehr empfindlich zwischen unterschiedlichen Strömungsqualitäten zu unterscheiden weiß. Mit Hilfe verschiedener *in vitro*-Modelle gelang es, dies zu zeigen. In einer umfassenden Studie von Brooks et al.¹⁵ (s. Kap. 1.5.3). anhand humaner Aortenendothelzellen konnten über 100 strömungsabhängig unterschiedlich regulierte Gene identifiziert werden. NLSS ist somit nicht nur die Abwesenheit von LSS, sondern eine eigener biomechanischer Stimulus, der von Endothelzellen erkannt und in entsprechende Signalkaskaden umgesetzt werden kann.

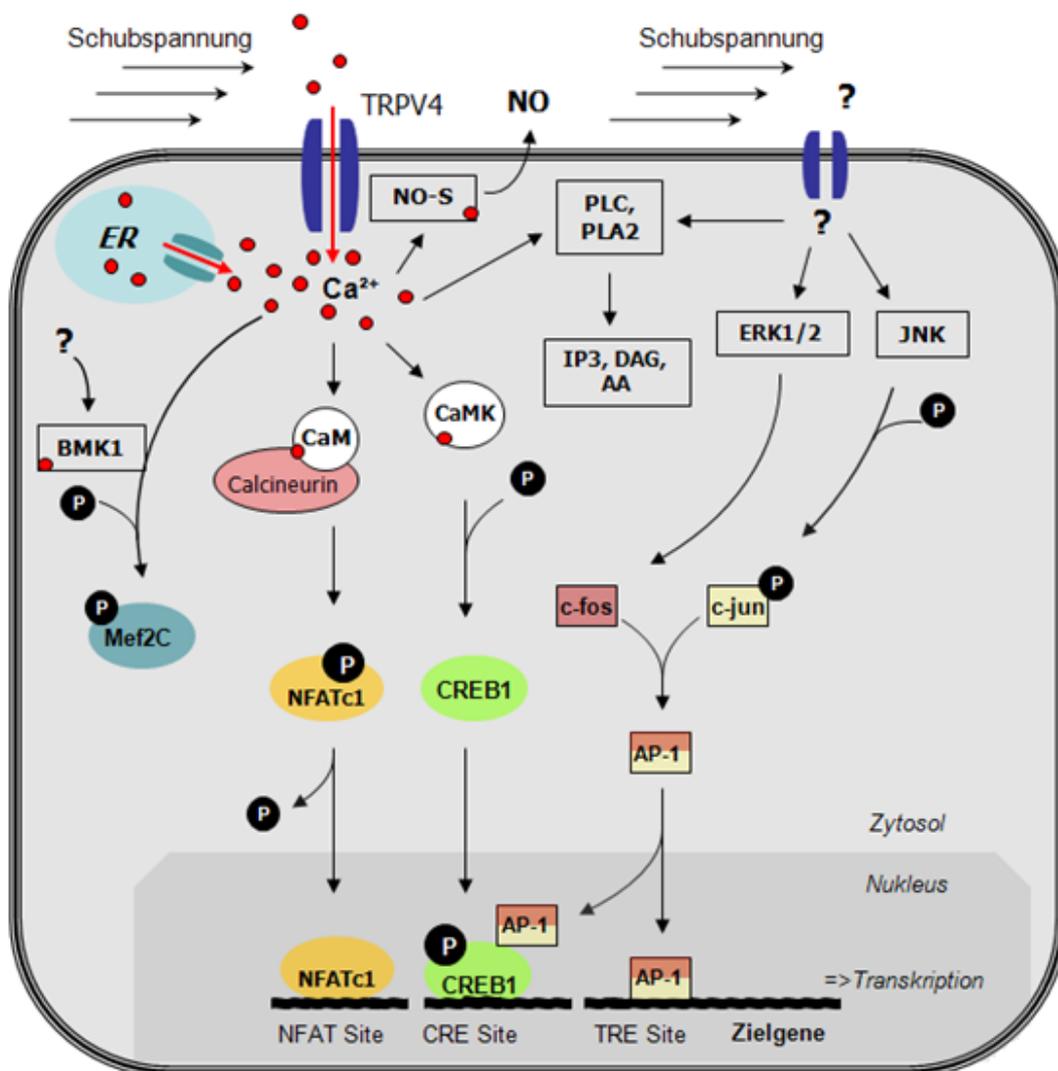


Abbildung 1.10: Hypothese kalziumabhängiger Signalwege in Endothelzellen durch Wandschubspannung

Die strömungsbedingte Öffnung des Trpv4-Kanals (*engl.: transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4*) sowie intrazellulärer Kalziumspeicher (ER, Endoplasmatisches Retikulum) führt zu einer gesteigerten Freisetzung von Ca²⁺ in das Zytosol, gefolgt vom Anstoßen kalziumabhängiger Signalwege. Die Freisetzung des Vasodilatators NO (Stickstoffmonoxid) ist zumindest z. T. kalziumabhängig, wobei vor allem die Ströme von extrazellulär von Bedeutung sein sollen, was eine Beteiligung von Trpv4 wahrscheinlich macht.^{2, 64} In der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren spielt Kalzium eine triggernde Rolle. Das

zytoplasmatische NFAT (*engl.: nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2*) wird mittels Dephosphorylierung durch den Ca^{2+} /Calcineurin-Komplex in die kerngängige Form umgewandelt. CREB1 (*engl.: cAMP responsive element binding protein 1*) und MEF2C (*engl.: myocyte enhancer factor C2*) werden durch Phosphorylierung aktiviert. Bei letzterem sind MAP-Kinasen (BMK1, *engl.: Big MAP-Kinase1*) involviert.^{10, 21, 122} Die wandschubspannungsbedingte Bildung des AP-1-Komplexes aus aktiviertem c-jun und c-fos leitet ebenfalls transkriptionelle Prozesse ein.¹⁴⁸ Unter anderem wurden Kinasen (JNK, ERK1/2), Phospholipasen (PLC, PLA₂) und G-Proteine (IP₃, DAG) im Zusammenhang mit Wandschubspannung beschrieben², die vollständigen Mechanismen sind allerdings ungeklärt. Insbesondere die mechanosensitiven Rezeptoren sind im Einzelnen nicht identifiziert.

(**AA**: Arachidonsäure; **DAG**: Diacylglycerin; **ERK**: Extracellular-signal Regulated Kinase; **IP₃**: Inositoltrisphosphat; **JNK**: c-Jun N-terminale Kinase; **PLC**: Phospholipase C; **PLA₂**: Phospholipase A₂)

1.6 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob nichtlaminare Strömungen *in vitro* und *in vivo* das Expressionsprofil von Zellen der Gefäßwand, speziell der Endothelzellen, beeinflussen und für pathologische Prozesse verantwortlich sind.

Ziel der Experimente ist es, die ISR-Rate in Abhängigkeit des mechanosensitiven Kalziumkanals Trpv4 zu untersuchen und mögliche beteiligte molekularbiologische Mechanismen zu identifizieren.

Zu diesem Zwecke wurde das Expressionsmuster von kultivierten porcinen Aortenendothelzellen unter Einfluss nichtlaminarer Strömung untersucht. Als Kontrolle dienten dabei Aortenendothelzellen, die unter statischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Inhibition des Trpv4-Kanals durch Ruthenium Rot diente der Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Expression von Targetgenen und der Kanalaktivität.

Das Großtiermodell umfasste die molekularbiologische Analyse Trpv4-vermittelter kalziumabhängiger Genexpression nach Stentimplantation sowie die histomorphometrische Auswertung gestenteter Koronararterien zur Ermittlung der ISR unter Einfluss des Trpv4-spezifischen Agonisten 4αPDD.

In der vorliegenden Studie soll untersucht werden, ob neben inflammatorischen und thrombogenen Prozessen auch die Trpv4-induzierte schubspannungsabhängige Genexpression an ISR beteiligt ist.

2 Methodik

2.1 Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter der Arbeitsplatzsicherheitsstufe S1 durchgeführt. Die Nutzung einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten Materialien und Geräten ermöglichte sterile Bedingungen. Die Kultivierung erfolgte unter optimalen Bedingungen im offenen System bei 37°C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 %. Die Zellen wurden in 10 % FCS / DMEM-Kulturmedium angezogen. Alle verwandten Medien und Lösungen wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.1.1 Versuchsplan

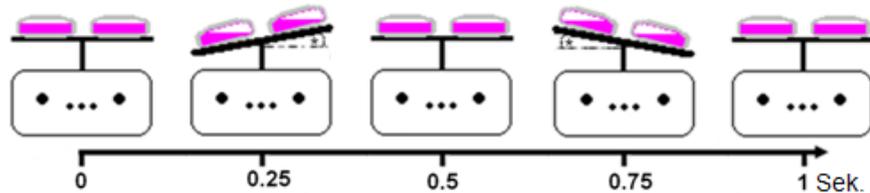
Porcine Aortenendothelzellen (PAEC) wurden nichtlaminarer Strömung ausgesetzt und an unterschiedlichen Zeitpunkten auf die Expression bestimmter Gene untersucht. Als Kontrolle dienten PAEC, deren Inkubation statisch erfolgte. Die Inhibition des Trpv4-Kanals wurde mit Ruthenium Rot versetztem Medium in einer Konzentration von 1µM durchgeführt. Zur Erzeugung der unkontrollierten nichtlaminaren Strömung diente ein Wippschüttler, dessen Platte kontinuierlich 60 vollständige Wipp-Zyklen pro Minute in einem Neigungswinkel von 7° ausführte. Die auf dieser Platte liegenden Kulturschalen wurden so über den festgelegten Zeitraum vergleichbarer Strömung ausgesetzt (s. Abb. 2.1). Zu Beginn der Inkubation besaßen die Zellen 70%ige Konfluenz.

2.1.2 Anziehen der Zellen

Form, Anzahl und Wachstum der Zellen wurden vor jedem Mediumwechsel unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Waren die Zellen noch nicht konfluent, wurden sie alle drei bis vier Tage mit frischem Medium versorgt, d. h. das verbrauchte Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit steriler PBS-1x-Lösung gewaschen. Anschließend wurde gewärmtes Komplettmedium zugegeben.

Ein zu dichter Zellrasen hat eine Wachstumsinhibition zur Folge, sodass bei einer Konfluenz von 70 bis 90 % des Flaschenbodens eine Zellpassage vorgenommen wurde. Das verbrauchte Medium wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und zum Waschen sterile PBS-1x-Lösung zugegeben, vorsichtig geschwenkt und abgesaugt. Nach Zugabe von 3-5 ml Trypsin / EDTA Lösung pro 75 cm² Flasche erfolgte eine fünfminütige Inkubation in einem CO₂-Inkubator. Nach Zugabe von Komplettmedium (50:50) wurde die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde gelöst und in neue Kulturflaschen überführt. Für die

Strömungsmodellversuche wurden die Zellen auf runden Kulturschalen (Cellstar, \varnothing 7,2 cm) ausplattiert.



*) Winkel $\sim 7^\circ$

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Strömungsmodells

Innerhalb einer Sekunde führt der Wippschüttler einen vollständigen Zyklus aus. Die darauf befindlichen Kulturschalen unterliegen so einer nichtlaminaren Strömung.

2.1.3 Ernten der Zellen

Zu dem jeweiligen Zeitpunkt (3h, 18h, 48h) wurden die Kulturschalen aus dem Brutschrank genommen und unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurde der RNeasy-Kit der Firma Qiagen benutzt (s. Anhang in Tab. 9.5). Nach dem Abziehen des Mediums wurde einmal mit PBS (1x) gewaschen. Die Zellen wurden nach Zugabe von 350 μ l einer Mischung aus RLT-Puffer und 1%igem β -Mercaptoethanol mit Hilfe eines Zellschabers vom Schalenboden gelöst. Das Lysat wurde in eine Säule QIAshredder-Säulen (Qiagen) überführt und für 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde bei -80°C konserviert oder direkt weiterverarbeitet (s. Kap. 2.3).

2.2 Tierversuche

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

2.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere stammten von einem privaten hessischen Zuchtbetrieb. Es handelte sich um männliche, kastrierte Hybridschweine (Deutsches Edelschwein x Landrasse) im Alter von 8 Wochen, welche bei Einstellung (eine Woche vor Stentimplantation) 25 ± 3 kg wogen. Nach 6 Wochen war eine Gewichtszunahme von $21,5 \pm 6,5$ kg zu verzeichnen. Eine allgemeine Untersuchung zur Überprüfung des Gesundheitszustandes wurde durchgeführt. Die Schweine wurden in Einzelboxen unter Geruchs- und Sichtkontakt zu ihren Artgenossen auf Stroh gehalten. Die Fütterung erfolgte mit handelsüblichem Schweinefutter, Wasser stand ad libitum über eine Selbsttränke zur Verfügung.

2.2.2 Versuchsplan

Für die Untersuchung der Genexpression wurden bei insgesamt 6 Schweinen je 3 bare-metal-Stents (BMS) implantiert (je 1 Stent in die LAD, RCX und RCA). Nach 1, 3 oder 7 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und der gestentete Teil der Koronararterien zur weiteren Analyse entnommen. Die histomorphologische Analyse sah bei insgesamt 4 Tieren die Implantation von je einem BMS in die LAD und RCX vor, sowie bei zwei Tieren die zusätzliche Applikation von 4 α PDD während der Intervention.

| Gruppe | | Anzahl | Dauer |
|-------------------|--------------------------------|--------------|-----------------|
| Genexpression | Stent | 6 à 3 Stents | 1, 3 und 7 Tage |
| | Kontrolle (proximal des Stent) | | |
| Histomorphometrie | Stent + 4 α PDD | 4 à 2 Stents | 6 Wochen |
| | BMS | | |

Tabelle 2.1: Versuchsplan des Großtiermodells

2.2.3 Prämedikation und Operationsvorbereitung

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

Die Prämedikation bestand aus der intramuskulären Injektion von 4 mg/kg KG Azaperon, 20 mg/kg KG Ketamin und 0,5 mg Atropinsulfat. Nach Erreichen einer ausreichenden Sedation wurden die Schweine im handwarmen Seifenbad gewaschen. Anschließend wurden jedem Schwein ein Venenverweilkatheter in die Vena auricularis magna gelegt und die Operationsfelder (Leiste) und Elektrodenkontaktstellen rasiert. Die Aufrechterhaltung der Sedierung erfolgte durch die intravenöse Applikation von 0,6 mg/kg/h Midazolam. Anschließend wurden die Schweine für die Intervention in Rückenlage ausgebunden. Da eine ausreichende Spontanatmung vorlag, konnte auf Intubation und invasive Beatmung verzichtet werden.

2.2.4 Stenting

Die Intervention wurde unter Kontrolle der Vitalparameter, Lid- und Schmerzreflexe, Bulbusstellung und Spontanbewegungen durchgeführt. Nasale Sauerstoffzufuhr gewährleistete eine ausreichende Sauerstoffsättigung des Blutes (> 97 %). Die Überwachung der Vitalfunktionen erfolgte mit Oberflächen-EKG und Kapnographie.

Außerdem erhielten die Tiere zu Beginn des Eingriffs eine Infektionsprophylaxe mit 2 g Cephazolin i.v. als Kurzinfusion. Die Flüssigkeitssubstitution wurde durch eine Dauertropfinfusion mit 10 ml/h pro kg Körpergewicht isotonischer Natriumchlorid-Lösung 0,9 % gewährleistet.

Nach gründlicher Hautdesinfektion der Leistenregion wurde in Seldinger-Technik eine 5F-Schleuse in die Arteria femoralis gelegt und unter Durchleuchtung ein Katheter über einen Führungsdraht nach kranial bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Der Katheter wurde in die Ostien der Koronararterien eingeführt und diese mit Kontrastmittel dargestellt. Mittels Quantitativer Koronarangiographie (QCA) wurde der Durchmesser des Koronargefäßes ermittelt und über den im Koronargefäß liegenden Katheter der entsprechend gewählte Stent positioniert und mit 16-18 mbar overstretch aufgedehnt. Für die Agonisierung des Trpv4-Kanals wurde mittels Genie-Ballon (s. Abb. 2.2 und 2.3) 4αPDD appliziert.

Nach der Implantation wurden alle Materialien entfernt und die Punktionsstelle der A. femoralis mit einer Hautnaht verschlossen sowie mit einem sterilen Pflaster abgedeckt.



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Genie-Ballonkatheters

Nach Füllung des Schaftes tritt die Flüssigkeit von distal in das Depot ein. Dieses wird durch die luftgefüllten Anteile der distalen und proximalen Enden des Ballons gebildet und verschwindet mit dem manuellen Ablassen des Luftdruckes.

(mod. n. Herdeg et al., 2007⁶⁹)

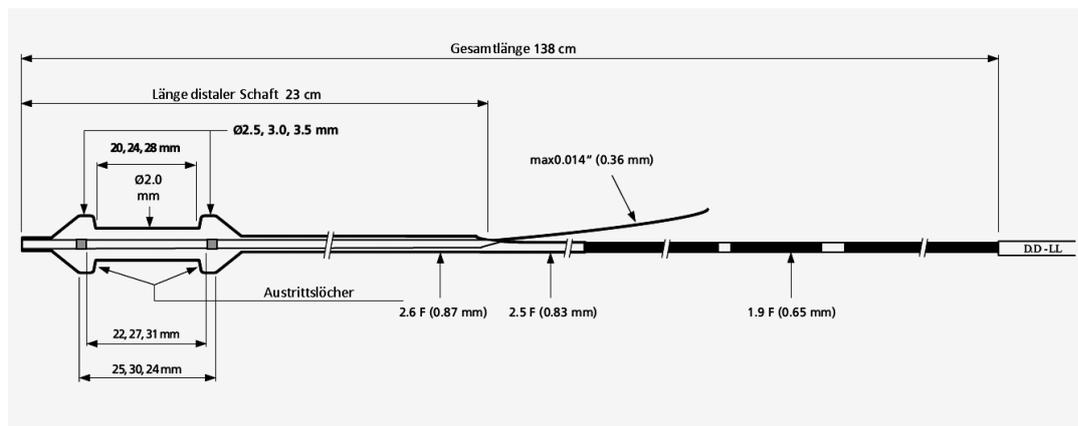


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Genie-Ballonkatheters

(mod. n. www.dynamicmedical.nl³⁷⁾

2.2.5 Postoperative Versorgung

Nach der Intervention wurden die Schweine zurück in den Versuchsstall gebracht. Die Tiere erhielten als Infektionsprophylaxe über 3 Tage intramuskulär 2 mg/kg KG Cefquinom. Die postoperative Analgesie erfolgte über 3 Tage mit Fentanyl (25 µg/h) transdermal.

2.2.6 Euthanasie und Entnahme der Stents

Die Vorbereitung der Tiere und die Sedierung erfolgte entsprechend des Vorgehens bei der Stentimplantation. Anschließend wurde die Sedierung mit intravenösen Bolusgaben von insgesamt 2,5 g Thiopental-Natrium vertieft, bevor die Tiere mit 1,5 mval pro kg KG Kaliumchlorid i.v. euthanasiert wurden.

Nach der Eröffnung des Thorax wurde das Herz vorsichtig entnommen, ohne dabei die Stents durch Druck zu verformen.

Zur Gewinnung von Gewebe zur quantitativen Analyse der mRNA wurden die Koronargefäße unter kontinuierlicher Kühlung mittels Eis aus dem Muskel- und Fettgewebe herauspräpariert, der gestentete Abschnitt in Längsrichtung geteilt und aufgeklappt. Nach vorsichtigem Entfernen des Stents, ohne dabei die Gefäßwand zu beschädigen, wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden die Gefäßabschnitte nach Entfernung des Stents in Querrichtung in TissueTec aufgeblickt und ebenfalls bei -80°C eingefroren.

Für die histomorphometrische Auswertung wurden die Koronararterien nach der Herzentnahme mit 4%iger Formalin / PBS-Lösung (pH 7,4) perfundiert. Anschließend wurden die Gefäßabschnitte sorgfältig aus dem Gefäßbett präpariert und von Herzmuskel- und Fettgewebe befreit. Die Fixierung erfolgte für 24 h in 4%iger Formalinlösung (pH 7,4). Die weitere Gewebearbeitung ist im Kapitel 2.5. beschrieben.

2.3 Quantitative Analyse von RNA

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) dient zur selektiven Vermehrung von doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren (DNA)-Abschnitten mit Hilfe von Oligonukleotidsequenzen (Primern) und DNA-Polymerasen. Dabei nutzt man die temperaturabhängige Hybridisierung und Denaturierung von Nukleotidsequenzen. Die in der vorliegenden Arbeit verwandte Real Time PCR-Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von Fluoreszenzsignale.

2.3.1 RNA-Isolation

Da die als Einzelstrang vorliegende RNA sehr empfindlich gegenüber dem enzymatischen Abbau durch Ribonukleasen (RNasen) ist, muss beim Umgang darauf geachtet werden, dass sämtliche mit der RNA in Berührung kommende Materialien zuvor autoklaviert oder mit RNase-Inhibitoren gereinigt wurden. Während der RNA-Isolierung wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die RNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des RNeasy-Kit der Firma Qiagen. Das Prinzip beruht auf der selektiven Anreicherung von RNA an eine Silikon-Gel-Matrix. Ein spezielles Puffersystem ermöglicht die Bindung von bis zu 100 µg RNA mit einer Länge von über 200 Basenpaaren. Während kleinere RNA-Stränge wie rRNA oder tRNA von der Isolation ausgeschlossen werden, bleibt vor allem die aus über 200 Basenpaaren bestehende mRNA an der Membran gebunden.

RNA-Isolation aus kultivierten Zellen. Zu dem auf Eis angetauten Zellzentrifugat wurden 350 µl einer Mischung (1:100) aus RLT-Puffer und beta-Mercaptoethanol

addiert und bei maximaler Geschwindigkeit 2 Minuten durch die Qiaschredder-Säule abzentrifugiert. Nach Zugabe von 350 µl 70%-EtOH wurde der gesamte Ansatz (700 µl) nun auf eine RNeasy-Mini-Säule pipettiert, die in einem 2 ml-Eppendorf-Gefäß platziert wurde. Das 15-sekündige Zentrifugieren bei 10.000 rpm dient der Bindung der RNA an die Matrix. Die Säule wurde nun mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und erneut für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen erfolgte ein DNase-Verdau auf der Säule. Dazu wurden ein 80µl-Ansatz aus 10 µl DNase 1 stock solution und 70 µl RDD-Puffer auf die Säule gegeben und 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach Addition von 350 µl RW1-Puffer erfolgte das Abzentrifugieren der DNase-Lsg. bei 10.000 rpm über 15 Minuten. Zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE-Puffer zunächst über 15 Sekunden und danach über 2 Minuten schlossen sich an. Das Zentrifugat wurde jedes Mal verworfen. Zum Trocknen des Silikon-Gels erfolgte eine Zentrifugation für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit in einem neuen 2ml-Eppendorfgefäß. Danach wurde die Säule in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß umgesetzt, mit 30 µl RNase-freiem H₂O beschickt und für 1 Minute bei Fullspeed zentrifugiert, um die RNA von der Membran zu eluieren. Die durchgelaufenen 30 µl wurden erneut auf die Säule pipettiert und die Zentrifugation wiederholt.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch mittels Nano Drop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Fa. PEQLAB). Die RNA wurde in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei - 80°C gelagert.

RNA-Isolation aus Koronararterien. Zu Beginn wurden die Gewebeprobe in 300 µl einer Mischung (1:100) aus RLT-Puffer und beta-Mercaptoethanol für 4 Minuten bei 20.000 Hz in einer Kugel-Schwingmühle homogenisiert. Zur Abtrennung von des Zelldebris wurden die Proben 3 Minuten mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und das klare Lysat (ca. 900 µl) in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Der weitere Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 590 µl RNase-freien ddH₂O. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 55°C in einem Thermoblock mit 450 rpm wurde erneut bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß pipettiert. Nach Zugabe von 450 µl 100%-Ethanol wurde der Ansatz auf die RNeasy-Mini-Säule gegeben. Durch 15-sekündiges Zentrifugieren bei 10.000 rpm wurden Flüssigkeit und die auf der Säule verbleibende RNA getrennt. Es folgten die Zugabe von 350 µl RW1-Puffer und anschließend der DNase-Verdau mit 80µl bestehend aus 10 µl DNase 1 stock solution und 70 µl RDD Puffer. Nach 15-minütiger Inkubation in Raumtemperatur wurden weitere 350 µl RW1-

Puffer addiert und der Ansatz 15 Sekunden bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Zur Entfernung von Kontaminationen wurden 2 x je 500 µl RPE-Puffer zur Säule pipettiert und zunächst 15 Sekunden und dann 2 Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Die RNA wurde mit 30 µl RNase-freien Wassers durch 1-minütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit eluiert.

Die Konzentration der gewonnenen RNA sowie die Qualität wurden photometrisch im Nano Drop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Fa. PEQLAB) bestimmt. Ab einer Konzentration von 50 ng/µl und einem OD_{260/280}-Quotienten von mindestens 1,8 wurde die isolierte RNA in die Studie eingeschlossen.

2.3.2 Reverse Transkription

Vor der Reversen Transkription wurde die Qualität der extrahierten RNA anhand mikropapillar-elektrophoretischer Analysen (2100 Bioanalyzer, Agilent) untersucht. Die Reverse Transkription zur Herstellung der cDNA wurde unter Verwendung des SuperScript II Reverse Transcriptase Kit der Firma Invitrogen durchgeführt. Dazu wurden 0,3-2 µg gesamt RNA mit dNTPs und Oligo dT-Primern sowie einem Random Primer, bestehend aus Hexaoligonukleotiden d(N)₆, gemischt (s. Tab. 2.2).

| Menge | Reagenz |
|-------|--|
| 1 µl | 1 µl d(N)TP 200 ng/µl Random Primer |
| 1 µl | dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) |
| 10 µl | 0,3-2 µg RNA ad 10 µl ddH ₂ O |

Tabelle 2.2: Standardpipettierprotokoll Teil 1 der Reversen Transkription

Nach einer Inkubationsdauer von 5 Minuten bei 65°C erfolgt die Zugabe des Gemischs aus Reaktionspuffer („First-Strand Puffer“, 5x, Invitrogen), DTT (0,1 M) und eines RNase-Inhibitors (s. Tab. 2.3).

| Menge | Reagenz |
|-------|------------------------|
| 2 µl | 0,1 M DTT |
| 4 µl | 5x First-Strand Buffer |
| 1 µl | RNaseOut (40 U/µl) |

Tabelle 2.3: Standardpipettierprotokoll Teil 2 der Reversen Transkription

Nach einer 2-minütigen Inkubation bei 25°C wird die Probe auf Eis gestellt und 1 µl SuperScript II RT zugegeben. Es schließt sich eine Inkubationsdauer bei 25°C für weitere 10 Minuten an, bei der das so genannte „Annealing“ (Ankopplung zweier Oligonukleotide) erfolgt. Während der 50-minütigen Verweildauer im Thermocycler bei 42°C wird die cDNA durch das thermostabile Enzym Reverse Transkriptase synthetisiert. Im Anschluss wird der Ansatz bei 70°C für 15 Minuten inaktiviert. Die cDNA wird zur weiteren Verwendung bei - 20°C aufbewahrt. Für die folgenden real-time PCR Experimente wird die cDNA 1:10 verdünnt.

2.3.3 Primer-Auswahl

Die verwendeten PCR-Primer-Oligonukleotide wurden ausgehend von den entsprechenden genomischen DNA-Sequenzen computergestützt mit Hilfe des Programmes FastPCR 5.4 Professional (s. Anhang in Tab. 9.12) nach folgenden Kriterien ausgewählt (Primersequenzen verwendeter Primer s. Anhang in Tab. 9.11):

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

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

2.3.4 Detektion der mRNA mit quantitativer real-time PCR und SYBR-Green

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die enzymatische Herstellung von millionenfachen Kopien bestimmter Nukleotidsequenzen (Matrizen), wodurch auch sehr geringe Mengen an DNA nachweisbar und der Klonierung zugänglich zu machen sind. Das Prinzip der PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung einzelner Reaktionsschritte, was zu einer exponentiellen Amplifikation der Matrize führt. Jeder PCR-Zyklus beginnt mit einer thermischen Denaturierung der zu amplifizierenden dsDNA zu Einzelsträngen bei 95°C. Im zweiten Schritt, dem Annealing, hybridisieren bei 65°C Oligonukleotide (Primer) an die ssDNA. Danach erfolgt durch die DNA-Polymerase die enzymatische Amplifikation der Matrize und es entstehen zwei dsDNA-Fragmente des durch den Primer definierten Genabschnittes.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR (oder

quantitative real-time PCR, qRT-PCR) angewandt, welche auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, jedoch die Quantifizierung der gewonnenen cDNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Am Ende des PCR-Laufs wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

Zum PCR-Ansatz wird neben den sequenzspezifischen Primern auch ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (SYBR-Green) zugegeben, der nur nach seiner Bindung an doppelsträngige DNA Fluoreszenzsignale emittiert. Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragmentes steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional. Die Quantifizierung erfolgt über den C_T -Wert („threshold cycle“). Der C_T -Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der die Fluoreszenzsignale während der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation den vorher definierten „threshold“ erreicht.

Vor jedem PCR-Lauf wird die Effizienz der verwendeten Primer und der dynamischer Bereich der PCR-Reaktion ermittelt, indem die cDNA über vier Zehnerpotenzen verdünnt und in qRT-PCRs eingesetzt werden. Um eine spezifische Bindung der Primer zu überprüfen und Fluoreszenz-Artefakte zu identifizieren, erfolgt auf jeden PCR-Lauf eine Schmelzpunktanalyse (s. u.). Jede qRT-PCR wird als Triplikat durchgeführt um experimentelle Schwankungen zu vermeiden. Jeder qRT-PCR-Ansatz (s. Tab. 2.4) enthält cDNA, vorwärts- und rückwärtsgerichtete Primer, den IQ SYBR Green Supermix (Applied Biosystems) und ddH_2O . Der IQ SYBR-Green Supermix (Applied Biosystems) enthält neben der Taq-Polymerase Reaktionspuffer, Nukleotid-Mix und SYBRGreen.

Die PCR-Reaktion erfolgt in 96-Well Mikrotiterplatten (Abgene) in einem real-time PCR Thermocycler (AB 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) unter folgenden Reaktionsbedingungen: Nach der 2-minütigen Aktivierung der Taq-Polymerase bei $50^\circ C$ erfolgt für 10 Minuten die initiale Denaturierung bei $95^\circ C$. Es schließen sich 40 Zyklen bei $95^\circ C$ im Wechsel mit $60^\circ C$ jeweils für 30 Sekunden an.

Die relative Menge an mRNA des Gens wird gegenüber einem konstitutiv exprimiertem Gen normalisiert (18S). Die relative Quantifizierung der mRNA erfolgt nach der etablierten Methode von Pfaffl und Mitarbeitern¹³⁰ und wird ausgedrückt als relativer „Foldchange“ gegenüber einer Kontroll-RNA. Dabei werden die gemessenen

Fluoreszenzsignale der Kontrolle in der Regel auf 1 gesetzt und die Fluoreszenzsignale als Vielfache von 1 ausgedrückt (Target-Signal / Kontroll-Signal).

| Menge | Reagenz |
|-----------|------------------------------------|
| 1 µl | cDNA |
| je 0,5 µl | forward und reverse Primer (100nM) |
| 12,5 µl | IQ SYBR Green Supermix |
| 10,5 µl | ddH ₂ O |

Tabelle 2.4 Standardpipetierprotokoll für 25 µl qRT-PCR-Ansatz

2.3.5 Schmelzkurvenanalyse

Zur Differenzierung zwischen dem spezifischem PCR-Produkt und unspezifischen PCR-Produkten bzw. Primerdimeren wird im Anschluss an jede vollendete PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Für jedes Oligonukleotid existiert eine charakteristische Schmelztemperatur, bei der ein Doppelstrang in seine Einzelstränge zerfällt. Somit kann das spezifische PCR-Produkt von unspezifisch synthetisierten PCR-Produkte oder Primerdimeren differenziert werden.

2.4 Immunfluoreszenz

Das Prinzip der Immunfluoreszenz basiert auf dem Nachweis antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten mit Hilfe spezifischer mono- oder polyklonaler Antikörper. Zur Sichtbarmachung von Gewebe- bzw. Zellantigenen bedient man sich direkter und indirekter Markierungsverfahren, welche beide in der vorliegenden Arbeit angewendet wurden. Bei der direkten Färbung werden Antikörper definierter Antigenspezifität eingesetzt, die mit einem Fluorochrom konjugiert sind.

Das Antigen kann dadurch im Fluoreszenzmikroskop durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Vorteil dieser Methode ist die geringe Hintergrund-Fluoreszenz, allerdings besitzt diese Färbung teilweise eine relativ geringe Sensitivität.

Zur Verbesserung der Sensitivität kann die indirekte Methode angewendet werden. Dabei sind Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper gegen den antigengebundenen spezifischen Erstantikörper gerichtet. Eine dreistufige Methode stellt die Biotin-Streptavidin-Färbung dar, welche die starke Affinität von Streptavidin (ein Protein des

Strahlenpilzes *Streptomyces avidinii*) für das Vitamin Biotin nutzt ⁷². Hierbei bindet fluorochromiertes Streptavidin an einen biotinylierten Sekundärantikörper (s. Abb. 3.4).

2.4.1 Herstellung der silanebeschichteten Objektträger

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

2.4.2 Herstellung der Gefrierschnitte

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

2.4.3 Färbeprotokolle

Die Proben wurden 5 Minuten lang mit 4 % Paraformaldehydlösung fixiert, da dieses schnell in die Zellen eindringt und aushärtet, ohne sie porös zu machen. Nach anschließendem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper in einer feuchten Kammer, wodurch ein Eintrocknen und Ausbleichen der Schnitte vermieden wurde. Zum Nachweis bestimmter Proteine wurden dafür spezifische mono- und polyklonale, fluorochromierte oder native Primärantikörper verwendet (s. Tab. 2.5). Nach zwölfstündiger Ruhe bei 4°C wurde der Erstantikörper durch gründliches Waschen in PBS entfernt. Anschließend wurde der Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper aufgetragen, welcher eine Stunde auf dem Schnitt inkubierte. Bei Anwendung der Biotin-Streptavidin-Methode wurden dabei biotinylierte Sekundärantikörper, welche gegen den Erstantikörper gerichtet waren, verwendet. Nach abermaligem Waschen in PBS erfolgte die Detektion der biotinylierten Antikörper mit Carbocyanin konjugiertem Streptavidin. Diese Farbstoffe zeichnen sich durch ihre hohe Leuchtkraft und Photostabilität aus. Nach wiederum einer Stunde wurden die Schnitte gründlich gewaschen. Zur Detektion der Zellkerne wurden spezifisch an die DNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe (DAPI und DRAQ5) mit einer Verdünnung von je 1:1000 und 20-minütiger Inkubation eingesetzt.

Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit Mowiol, welches bei der anschließenden Lagerung der Objektträger bei 4°C aushärtete.

Bei jeder Färbereihe wurde ein Objektträger mit 1-2 Schnitten als Negativkontrolle mitgeführt, bei welchem kein Erstantikörper aufgebracht wurde. Daran konnte das Maß der Hintergrundfärbung ermittelt und falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die nachfolgende Tabelle 2.5 gilt für Trpv4 und NFATc1, da bei diesen Färbungen die Biotin-Streptavidin-Methode angewendet wurde. Für CREB1 entfallen die Schritte 7 und 8, da diese Proteine mit der indirekten 2-Schritt-Methode angefärbt wurden. Cofärbungen (Schritt 9 und 10) wurden mit alpha-smooth-mucle-actin (αSMA) oder dem Endothelmarker BS-1-TRITC durchgeführt.

| | Schritt | Substanz | Temp. | Dauer |
|----|----------------|------------------------------|--------------|--------------|
| 1 | Fixierung | PFA 4 % | RT | 5 min |
| 2 | Waschen | PBS | RT | 3 x 3 min |
| 3 | Inkubation | 1. Erstantikörper | 4°C | über Nacht |
| 4 | Waschen | PBS | RT | 3 x 3 min |
| 5 | Inkubation | Zweitantikörper | RT | 60 min |
| 6 | Waschen | PBS | RT | 3 x 3 min |
| 7 | Inkubation | cy-konjugiertes Streptavidin | RT | 60 min |
| 8 | Waschen | PBS | RT | 3 x 3 min |
| 9 | Inkubation | 2. Erstantikörper | RT | 60 min |
| 10 | Waschen | PBS | RT | 3 x 3 min |
| 11 | Kernfärbung | DAPI / DRAQ5 | RT | 20 min |
| 12 | Waschen | PBS | RT | 3 x 3 min |
| 13 | Eindecken | Mowiol | | |

Tabelle 2.5: Färbeprotokoll für Trpv4, NFATc1, CREB1, BS-1 und αSMA

2.4.4 Mikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie. Zur Darstellung der fluorochrommarkierten Strukturen wurde ebenfalls das DM-RB Mikroskop verwendet, diesmal jedoch unter Zuhilfenahme einer 100W Quecksilberdampflampe. Durch entsprechende Farbfilter wurde kurzwelliges Licht geeigneter Wellenlänge erzeugt, um die Fluorophore zur Emission längerwelliger Strahlung anzuregen. Mit Hilfe des Leica Kamerasystems wurden anschließend digitale Bilder mit 30-facher Vergrößerung (Objektiv PL Fluotar 30 x Öl) erzeugt.

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

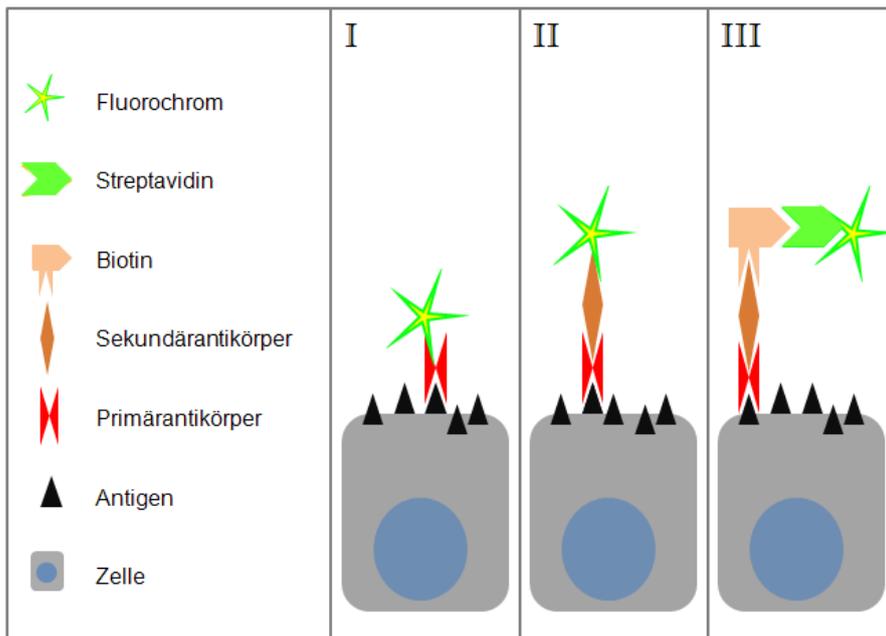


Abbildung 2.4: Verfahren der Immunfluoreszenz

4. direkte Methode: das Fluorochrom ist direkt mit dem Antikörper (AK) verbunden, der gegen antigene Strukturen der Zelloberfläche gerichtet ist;

II) indirekte Methode: ein fluorochromierter Zweit-AK bindet an den antigenspezifischen Erst-AK;

III) indirekte Methode mit biotinyliertem Sekundär-AK: Ein Komplex aus Zweit-AK, Biotin, Streptavidin und Fluorochrom bindet an den Erst-AK.

(mod. n. Herbst et al., 2000⁶⁸)

2.5 Histomorphometrie

2.5.1 Einbettung in Methacrylat

Die histomorphologische Analyse dient der Quantifizierung der Instent-Restenose. Zu diesem Zweck wurden die gestenteten Koronararterien nach der Präparation und einer 24-stündigen Inkubation in 4%igen PFA mit PBS gespült, mit Ethanol entwässert und schließlich in Harz eingebettet. Die Polymerisation erfolgte in 1,5 ml-Eppendorfgläsern. Das Protokoll ist in der Tabelle 2.6 dargestellt. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Eppendorfglas entfernt und die Stents mit der Diamant-Innenlochsäge (Fa. Leica) geschnitten. Dafür wurden die Zylinder senkrecht auf den dafür vorgesehenen Blöcken der Säge mit konventionellem Sekundenkleber aufgeklebt. Die Einstellung der Säge wurde auf eine Schnittdicke von 200 µm festgelegt. Das Schneiden erfolgte unter einem kontinuierlichen Wasserstrahl zur Vermeidung übermäßiger Hitzeentwicklung.

| | Schritt | Substanz | Temp. | Dauer |
|---|-----------------|---|-------|------------|
| 1 | Fixierung | PFA 4 % | RT | 24 h |
| 2 | Spülen | PBS | RT | 5 sec |
| 3 | Entwässerung | aufsteigende Alkoholreihe (EtOH: 70 %, 80 %, 90 %, 99 %) | RT | 3 x 10 min |
| 4 | Präinfiltration | Aktivierte Basislösung (ABL) / EtOH 96 % (1:2) | RT | 2 h |
| 5 | Infiltration | ABL | 4°C | 12 h |
| 6 | Polymerisation | ABL / Härter II | RT | 5 h |

Tabelle 2.6: Einbettung von gestenteten Koronararterien in Methacrylat

2.5.2 Färbung mit Toluidinblau

Nach dem Trocknen wurden die Schnitte für 5 Sekunden in die Toluidinblaulösung getaucht und mit PBS abgespült, getrocknet, und auf unbeschichteten Objektträgern luftblasenfrei mit Histofluid eingedeckt.

2.5.3 Durchlichtmikroskopie

Die Auswertung der Stents erfolgte bei 16-facher Vergrößerung im DM-RB Mikroskop. Die Auswahl der Schnitte, die histomorphometrisch ausgewertet wurden, orientierte sich subjektiv an der Stärke der ISR. Zusätzlich wurden die Querschnitte für die histomorphometrische Analyse fotografiert und mit einem Bildanalyseprogramm (ImageJ, Version 4.1) planimetrisch vermessen. Die Kalibrierung der Skala wurde auf 250 Pixel/1mm festgelegt.

Die Beurteilung geschah anhand folgender Parameter nach der Methode von Schwartz und Mitarbeitern (1992) ¹⁴¹:

Verletzungs- und Entzündungsindex: Zum Vergleich der Gefäßwandverletzung sowie der Inflammation der einzelnen stenttragenden Gefäße, wurde von jedem Querschnitt ein Verletzungs- und Entzündungsindex erstellt. Die Umgebung jedes einzelnen Struts wird mikroskopisch untersucht und je nach Ausmaß der Verletzung bzw. Inflammation subjektiv ein Punktwert (0 – 3) (s. Abb. 2.5) zugeordnet.

Neointimadicke: Ausgehend von jedem einzelnen Strut wurde zum Lumenmittelpunkt eine Gerade gezogen. Gemessen wurde die Länge des Geradenanteils, welcher auf der Neointima lag.

Originallumen (OL): Das Originallumen bezeichnet die Fläche, die nach Stentimplantation dem tatsächlichen Lumen entsprach. Sie ergibt sich aus dem gemessenen Umfang der Lamina elastica interna (LEI).

Residuallumen (RL): Das Lumen, das durch die ISR begrenzt wird, bezeichnet das Residuallumen. Durch Umfahrung dieser lumenseitigen Begrenzung kann der Umfang zur Berechnung der Fläche bestimmt werden.

Fläche innerhalb der Lamina elastica externa (LEE): Die LEE bildet die Grenze von der Media zur Adventitia. Aus ihrem Umfang ergibt sich die Fläche, die Residuallumen, Fläche von Neointima und Media enthält. Durch Subtraktion des RL und der NF erhält man die Fläche der Media.

Aus den gemessenen Werten der Neointimadicke, sowie der Flächen innerhalb der Lamina elastica interna, Lamina elastica externa und des Residuallumens lassen sich weitere Parameter berechnen:

Fläche der Neointima: Die neointimale Fläche (mm²) ergibt sich aus der Subtraktion des RL vom OL.

Prozentuale Stenosefläche: Mit der Formel $1 - (RL/OL) \times 100$ lässt sich die prozentuale Fläche der Stenose berechnen.

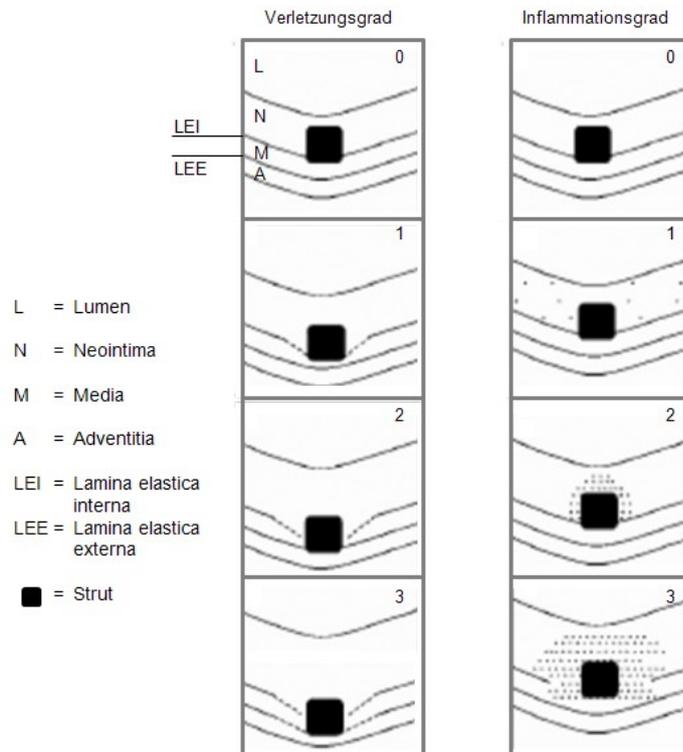


Abbildung 2.5: Verletzungs- und Entzündungsindex

Die Beurteilung der Verletzung richtet sich nach der Läsion der muralen Laminae. Ist die Lamina elastica interna (LEI) unbeeinträchtigt, ergibt sich der Punktwert 0. Bei mäßiger Läsion der LEI wird der Wert 1 vergeben. Wird die Media durch den Strut zerstört, entspricht dies einer 2, bei zusätzlicher Beeinträchtigung der Lamina elastica externa (LEE) einer 3.

Die Einstufung des Inflammationsgrades erfolgt ebenfalls durch Vergabe von Punktwerten. Keine Entzündung entspricht einer 0. Bei geringer oder mäßiger Inflammation, ersichtlich an der Auflockerung der unmittelbaren Umgebung der Struts, ergibt sich eine 1 bzw. 2. Eine sehr starke Entzündung, die die Neointima überschreitet, entspricht dem Wert 3.

(mod. n. Schwartz et al.; 1992¹⁴¹)

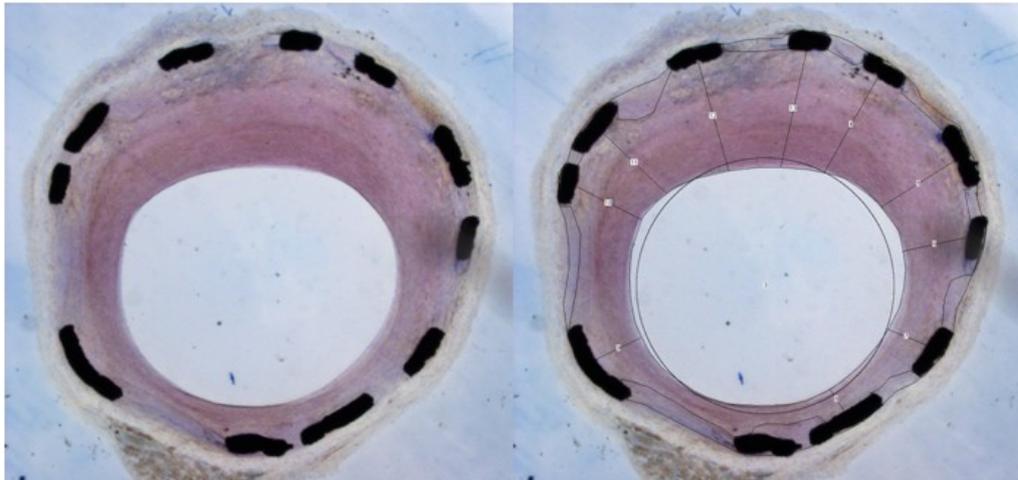


Abbildung 2.6: Histomorphometrische Analyse gestenteter Koronararterien

Das linke Bild zeigt den Querschnitt einer gestenteten Koronararterie vor, das rechte Bild nach der histomorphometrischen Analyse.

Zur Bestimmung der Neointimadicke wurden von einem virtuellen Mittelpunkt des Residuallumens (RL) zu jedem Strut radiäre Linien gezogen. Eine Umfahrung der Lamina elastica interna und externa sowie des RL ermöglicht die Berechnung der übrigen Parameter (Originallumen (OL), Stenosefläche, Fläche der Media und Neointima).

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm Graph Pad Prism für Windows (Version 4) durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (*engl.: standard error of mean*) angegeben. Die Ergebnisse der Zellkultur wurden mit der einfaktorischen Varianzanalyse (One way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test) analysiert, die Resultate des Großtiermodells mit dem Student-t-Test. Ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$) galt als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpression in der Zellkultur

In der Zellkultur wurde die Genexpression von PAECs in einem Strömungsmodell untersucht und mit der von unter statischen Bedingungen kultivierten PAECs verglichen. Dieses Experiment wurde unter Einfluss von 1 μ M Ruthenium Rot (RuR), einem polykationischen Hemmstoff von Trpv4, wiederholt. Die Werte sind als Mittelwert und zugehöriger Standardabweichung (*engl.: Mean \pm SEM; M \pm SEM*) der statischen Kontrolle ohne bzw. mit RuR (stK \neq RuR bzw. stK+RuR) sowie als M \pm SEM unter nichtlaminarer Strömung ohne bzw. mit RuR (\neq RuR bzw. +RuR) aufgeführt. Letztere werden entsprechend um die jeweilige Zeitangabe (3 h, 18 h bzw. 48 h) ergänzt.

3.1.1 Genexpression unter nichtlaminarer Strömung

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 graphisch dargestellt.

Trpv4

In der unbehandelten Gruppe wird das signifikante Maximum nach 18 Stunden erreicht (stK \neq RuR: 0,61 \pm 0,09 vs. 18h \neq RuR: 1,47 \pm 0,13; $p < 0,01$). Nach 48 Stunden sinkt die Expression auf statisches Niveau (18h \neq RuR vs. 48h \neq RuR: 0,41 \pm 0,03; $p < 0,001$).

Unter RuR liegt die basale Expression deutlich höher und steigt über 48 Stunden an (stK \neq RuR vs. stK+RuR: 1,96 \pm 0,02; $p < 0,001$; stK+RuR vs. 48h+RuR: 3,54 \pm 0,36; $p < 0,001$, 48h \neq RuR vs. 48h+RuR; $p < 0,001$).

NFATc1

Die Expression von NFAT erreicht nach 18 Stunden das signifikante Maximum und bleibt auch über 48 Stunden signifikant gesteigert (stK \neq RuR: 0,94 \pm 0,10 vs. 18h \neq RuR: 1,67 \pm 0,05; $p < 0,001$; stK \neq RuR vs. 48h \neq RuR: 1,38 \pm 0,02; $p < 0,001$).

Unter RuR ist die Grundexpression signifikant reduziert und das Maximum wird ohne Signifikanz erst nach 48 Stunden erreicht (stK \neq RuR vs. stK+RuR: 0,07 \pm 0,01; $p < 0,001$, stK+RuR vs. 48h+RuR: 0,17 \pm 0,03; $p > 0,05$). Es unterliegt dabei signifikant dem der unbehandelten Gruppe (48h \neq RuR vs. 48h+RuR; $p < 0,001$).

Calcineurin

Das signifikante Expressionsmaximum liegt bei 18 Stunden (stK \neq RuR: 0,89 \pm 0,06 vs. 18h \neq RuR 1,61 \pm 0,004; $p < 0,001$). Nach 48 Stunden fällt die Expression signifikant ab (18h \neq RuR vs. 48h \neq RuR: 1,16 \pm 0,0; $p < 0,01$). Unter RuR verändert sich die

Expression nicht signifikant bei vergleichbarer Grundexpression (stK≠RuR vs. stK+RuR: $0,98 \pm 0,17$; $p > 0,05$).

MEF2C

In beiden Gruppen liegt das Expressionsmaximum bei 48 Stunden, wobei jedoch nur in der RuR-Gruppe Signifikanz erreicht wird (stK≠RuR: $1,2 \pm 0,21$ vs. 48h≠RuR: $5,9 \pm 0,39$; $p > 0,05$; stK+RuR $628,2 \pm 24,65$ vs. 48h+RuR: $1115 \pm 102,6$; $p < 0,001$). Die Grundexpression unter RuR liegt ca. um den Faktor 500 über der der unbehandelten Gruppe.

c-jun

Die unbehandelte Gruppe zeigt eine steile Expressionskurve mit dem Maximum nach 48 Stunden, wobei Signifikanz bereits nach 18 Stunden erreicht wird (stK≠RuR: $0,97 \pm 0,01$ vs. 18h≠RuR: $1,79 \pm 0,22$; $p < 0,001$; stK≠RuR vs. 48h≠RuR: $3,69 \pm 0,15$; $p < 0,001$).

Dem gegenüber liegt das Maximum der RuR-Gruppe bei 3 Stunden (stK+RuR: $0,87 \pm 0,15$ vs. 3h+RuR: $1,42 \pm 0,13$; $p < 0,05$). Bei vergleichbarer Grundexpression unterliegt nach 18 und 48 Stunden die Transkriptionsrate unter Einfluss von RuR im Vergleich zur unbehandelten Gruppe signifikant (stK≠RuR vs. stK+RuR; $p > 0,05$; 18h≠RuR vs. 18h+RuR: $1,42 \pm 0,13$; $p < 0,001$; 48h≠RuR vs. 48h+RuR: $0,49 \pm 0,06$; $p < 0,001$).

c-fos

Die c-fos-Expression in der unbehandelten Gruppe zeigt über 18 Stunden einen Anstieg, erreicht jedoch keine Signifikanz (stK≠RuR: $1,4 \pm 0,12$ vs. 18h≠RuR: $2,31 \pm 0,06$; $p > 0,05$). Nach 48 Stunden fällt die Transkription wieder ab (18h≠RuR vs. 48h≠RuR: $0,92 \pm 0,004$; $p > 0,05$).

Die Grundexpression der RuR-Gruppe ist bei hoher Standardabweichung mit der der unbehandelten Gruppe vergleichbar. Das Maximum wird bereits nach 3 Stunden erreicht (stK≠RuR vs. stK+RuR: $2,21 \pm 0,74$; $p > 0,05$; stK+RuR vs. 3h+RuR: $4,28 \pm 0,71$; $p > 0,05$). Der Expressionsunterschied beider Gruppen ist nach 3 Stunden signifikant (3h≠RuR: $1,35 \pm 0,32$ vs. 3h+RuR; $p < 0,001$). Nach 18 und 48 Stunden differiert die Expression beider Gruppen nicht mehr signifikant (18h≠RuR vs. 18h+RuR: $0,47 \pm 0,02$; $p > 0,05$; 48h≠RuR vs. 48h+RuR: $0,63 \pm 0,07$; $p > 0,05$).

CREB1

CREB1 zeigt einen linearen signifikanten Anstieg der Expression über 48 Stunden (stK≠RuR: $0,78 \pm 0,1$ vs. 48h≠RuR: $2,1 \pm 0,01$; $p < 0,001$). Unter RuR liegt die Grundexpression zunächst zwar etwas höher, jedoch fällt der Anstieg wesentlich

flacher aus, sodass bei 48 Stunden die beiden Gruppen das gleiche Expressionsniveau erreichen (stK≠RuR vs. stK+RuR: $1,45 \pm 0,05$; $p < 0,05$; 48h≠RuR vs. 48h+RuR: $1,97 \pm 0,28$; $p > 0,05$).

CREB2

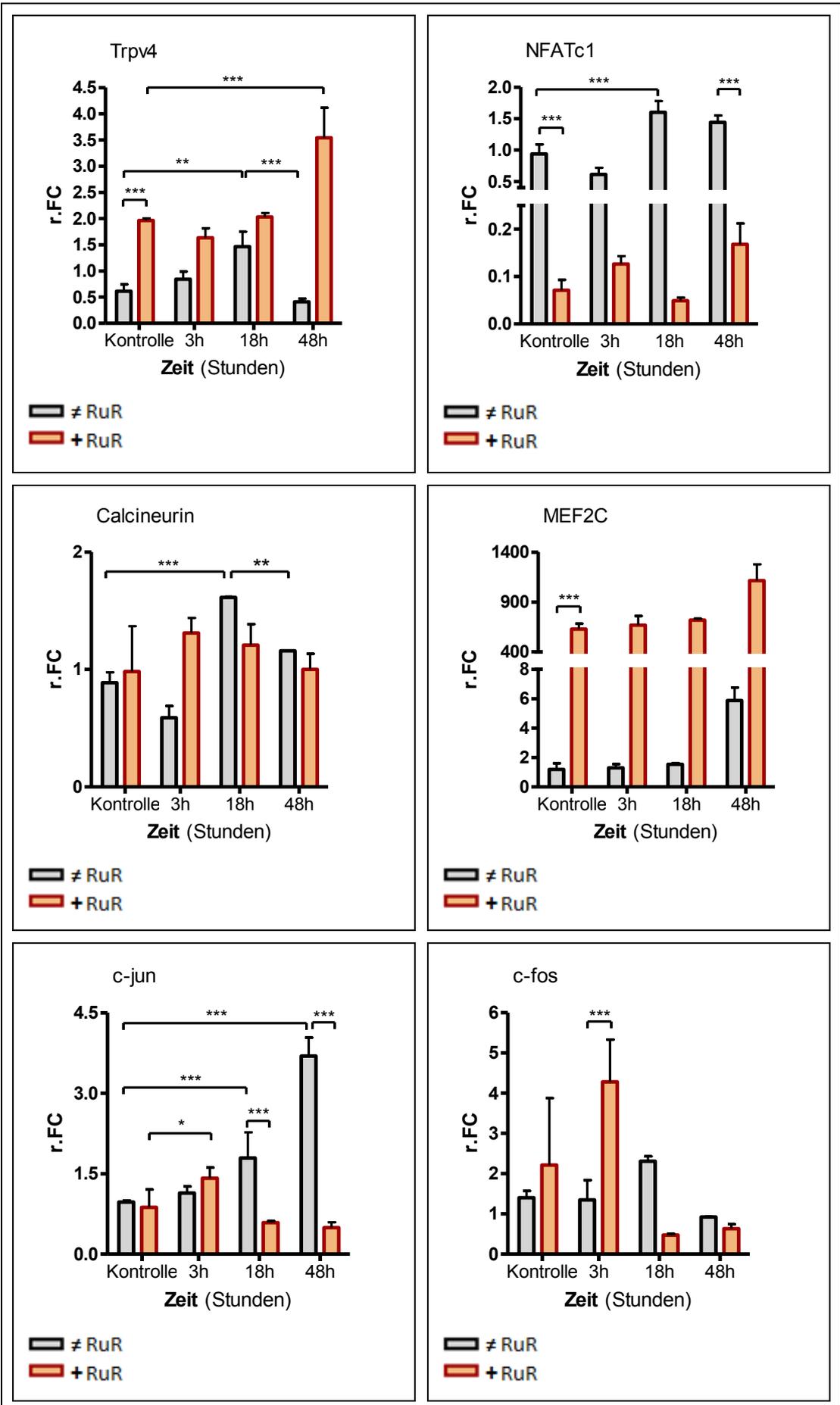
Die Grundexpression liegt in der unbehandelten Gruppe deutlich unter der RuR-Gruppe, nach 48 Stunden gleichen sie sich an. Dabei liegt unter RuR die Expression bereits nach 3 Stunden signifikant über der Grundexpression. (stK≠RuR: $0,71 \pm 0,12$ vs. stK+RuR: $1,67 \pm 0,11$; $p < 0,001$; stK≠RuR vs. 48h≠RuR: $2,28 \pm 0,12$; $p < 0,001$; stK+RuR vs. 3h+RuR: $2,34 \pm 0,14$; $p < 0,01$; 48h≠RuR vs. 48h+RuR $2,34 \pm 0,11$; $p > 0,05$).

ICAM-1

Trotz hoher Standardabweichung zeigt ICAM-1 in beiden Gruppen eine Expressionssteigerung nach 18 bzw. 48 Stunden, jedoch wird keine Signifikanz erreicht (stK≠RuR: $0,75 \pm 0,09$ vs. 18h≠RuR: $1,05 \pm 0,08$; $p > 0,05$; stK+RuR: $0,35 \pm 0,03$ vs. 48h+RuR: $0,54 \pm 0,04$; $p > 0,05$). Die Expression ist in der unbehandelten Gruppe mit Ausnahme der 3-stündigen Kultur signifikant höher als unter RuR-Behandlung (stK≠RuR vs. stK+RuR; $p < 0,01$; 18h≠RuR vs. 18h+RuR: $0,41 \pm 0,005$; $p < 0,001$; 48h≠RuR: $0,94 \pm 0,05$ vs. 48h+RuR; $p < 0,05$).

VCAM-1

Unter RuR zeigt sich eine signifikant stark erniedrigte Grundexpression (stK≠RuR: $0,75 \pm 0,08$ vs. stK+RuR: $0,004 \pm 0,001$; $p < 0,001$). Ein signifikanter Anstieg ist in beiden Gruppen nicht vorhanden. Die Expression liegt in der unbehandelten Gruppe signifikant höher als unter RuR-Behandlung.



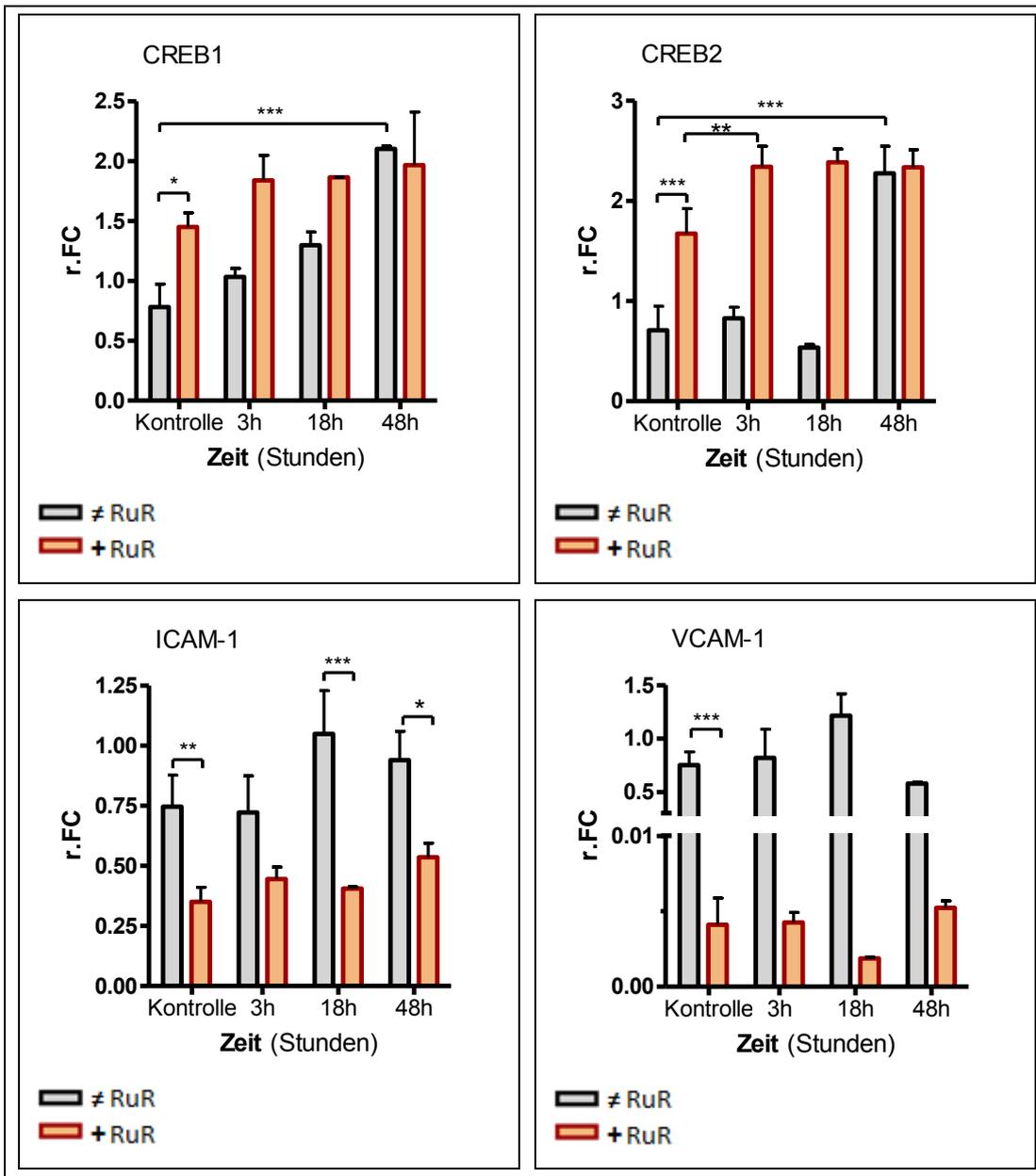


Tabelle 3.1 Genexpression statisch und unter Strömung kultivierter PAEC

(r.F.C = relative Foldchange, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, Nichtsignifikanz ist nicht dargestellt)

3.1.2 Genexpression statisch kultivierter PAEC

Im Vergleich der Expressionsergebnisse unter statischen Bedingungen (3 Stunden vs. 18 Stunden) ohne zusätzliche Gabe von RuR, zeigen alle Gene niedrigere Expression bei längerer Kultivierung. Eine Ausnahme bildet c-fos, bei dem die Expression unverändert bleibt. Eine statistische Auswertung mittels One way ANOVA war in Hinblick auf die zu geringe n-Zahl nicht möglich. Aufgeführt werden daher nur die Mittelwerte. Die graphische Darstellung ist der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Trpv4

stK≠RuR3h: 0,99 vs. stK≠RuR18h: 0,55

NFATc1

stK≠RuR3h: 0,95 vs. stK≠RuR18h: 0,53

Calcineurin

stK≠RuR3h: 0,96 vs. stK≠RuR18h: 0,84

MEF2C

stK≠RuR3h: 1,49 vs. stK≠RuR18h: 0,61

c-jun

stK≠RuR3h: 0,999 vs. stK≠RuR18h: 0,91

c-fos

stK≠RuR3h: 1,51 vs. stK≠RuR18h: 1,50

CREB1

stK≠RuR3h: 0,97 vs. stK≠RuR18h: 0,40

CREB2

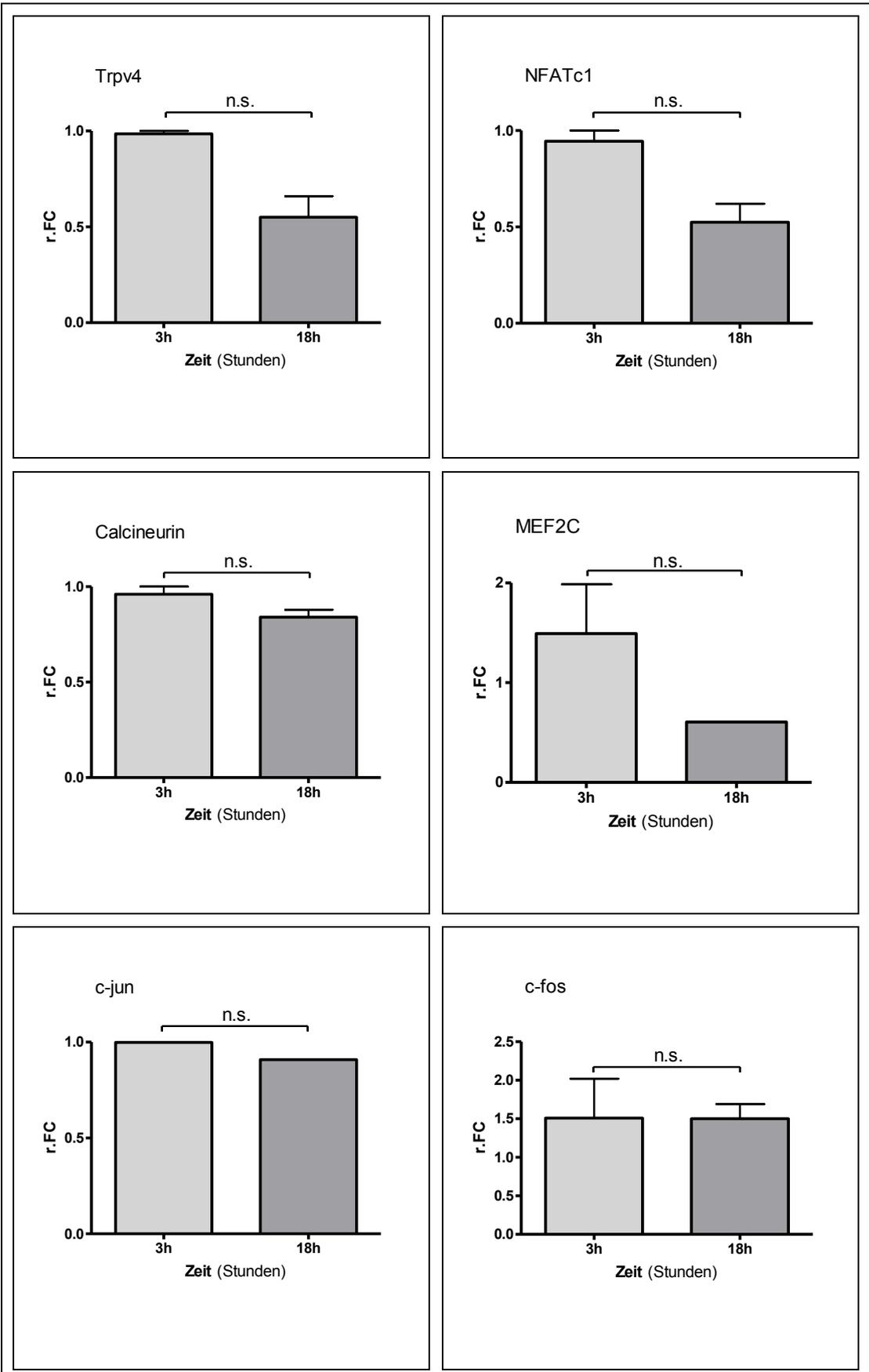
stK≠RuR3h: 0,95 vs. stK≠RuR18h: 0,23

ICAM-1

stK≠RuR3h: 1,04 vs. stK≠RuR18h: 0,48

VCAM-1

stK≠RuR3h: 1,05 vs. stK≠RuR18h: 0,82



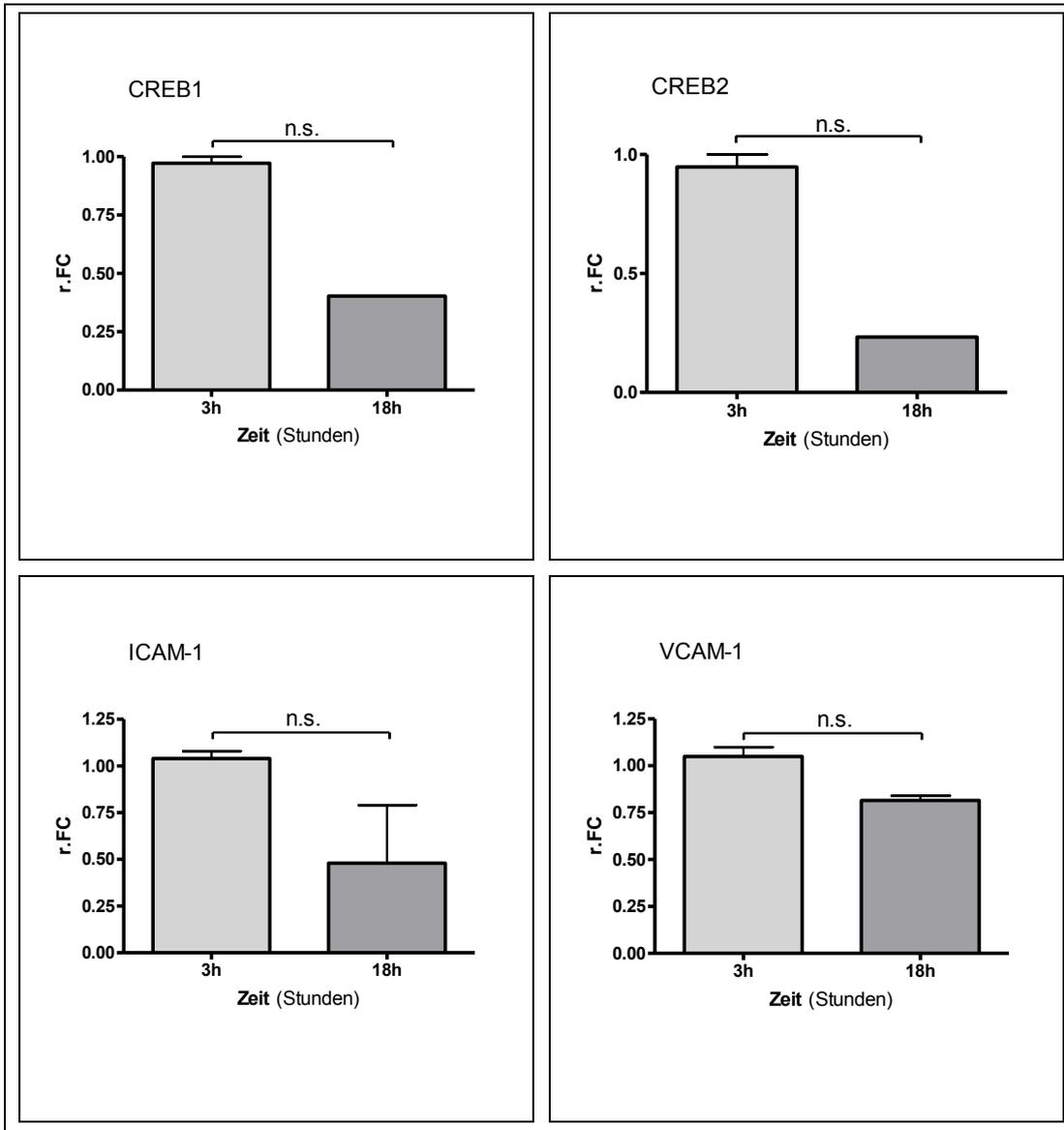


Tabelle 3.2: Genexpression statisch kultivierter PAEC

(r.FC = relative Foldchange, n. s. = Nichtsignifikanz)

3.2 Großtiermodell

3.2.1 Genexpression

Es wurden Koronararterien einen, drei und sieben Tage nach Stentimplantation analysiert. Die Untersuchung der Genexpression erfolgte durch die quantitative Real-Time-PCR.

Den Ergebnissen zufolge lassen sich die untersuchten Gene in solche früher Expression (Maximum innerhalb drei Tage nach Stentimplantation), später Expression (Maximum sieben Tage nach Intervention) sowie in Gene, die keine signifikante Expressionsänderung zeigen, einteilen. Zu der ersten Gruppe gehören Trpv4, Calcineurin, c-fos, CREB2 und ICAM-1. Zur zweiten Gruppe gehört NFATc1. Für VCAM-1, CREB1 und MEF2C war keine gesteigerte Transkription nachweisbar. Die Expression von c-jun war im Stent im Vergleich zur Kontrolle sogar reduziert.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler (*engl.: Mean ± SEM; M±SEM*) der Kontrolle K bzw. des jeweiligen Tages (Tag 1, Tag 3, Tag 7) aufgeführt. Sofern keine Signifikanz ($p > 0,05$) vorliegt, erfolgt die Angabe des genauen p-Wertes.

Die graphische Darstellung ist der Tabelle 3.3 zu entnehmen.

Trpv4

Das signifikante Maximum der Expression wird drei Tage nach Stentimplantation erreicht. Am siebten Tag lässt sich keine gesteigerte Expression mehr nachweisen.

(K: $1,37 \pm 0,16$ vs. Tag1: $1,16 \pm 0,15$; $p = 0,46$; K vs. Tag3: $2,46 \pm 0,71$; $p < 0,05$; K vs. Tag7: $1,37 \pm 0,27$; $p = 0,99$).

NFATc1

Die Expression von NFAT steigt bis zum siebten Tag an. Am dritten Tag wird eine Signifikanz erreicht.

(K: $0,68 \pm 0,07$ vs. Tag 1: $0,81 \pm 0,14$; $p = 0,35$; K vs. Tag3: $0,95 \pm 0,08$; $p = 0,04$; K vs. Tag7: $1,4 \pm 0,24$; $p < 0,001$).

Calcineurin

Bereits einen Tag nach Stentimplantation ergibt sich das Expressionsmaximum. Auch am dritten Tag ist die Expression signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Am siebten Tag fällt die Expression wieder unter das Signifikanzniveau ab.

(K: $0,30 \pm 0,02$ vs. Tag1: $0,52 \pm 0,05$; $p < 0,001$; K vs. Tag3: $0,42 \pm 0,05$; $p < 0,05$; K vs. Tag7: $0,34 \pm 0,02$; $p = 0,43$)

MEF2C

Es zeigt sich keine signifikante Änderung der Expression nach Stentimplantation.

(K: $0,49 \pm 0,05$ vs. Tag1: $0,48 \pm 0,04$; $p = 0,87$; K vs. Tag3: $0,45 \pm 0,04$; $p = 0,66$; K vs. Tag7: $0,44 \pm 0,03$; $p = 0,60$)

c-jun

C-jun wird gegenüber der Kontrolle im Stent geringer exprimiert. Am ersten Tag ist dies signifikant, während die Expression an den Tagen 3 und 7 wieder geringfügig ansteigt. Im Vergleich zur Kontrolle liegt hier kein signifikanter Unterschied mehr vor. Im Vergleich der Tage 1 und 7 wird ebenfalls keine Signifikanz erreicht.

(K: $0,5 \pm 0,05$ vs. Tag1: $0,25 \pm 0,02$; $p < 0,05$; K vs. Tag3: $0,32 \pm 0,04$; $p = 0,06$; K vs. Tag7: $0,34 \pm 0,04$; $p = 0,09$; Tag1 vs. Tag7; $p = 0,09$)

c-fos

Die Expression von c-fos zeigt ihren Gipfel einen Tag nach Stenting. Am dritten und siebten Tag postinterventionell liegt keine Signifikanz mehr vor.

(K: $0,93 \pm 0,1$ vs. Tag1: $2,21 \pm 0,45$; $p < 0,001$; K vs. Tag3: $1,35 \pm 0,20$; $p = 0,06$; K vs. Tag7 $1,33 \pm 0,18$; $p = 0,05$)

CREB1

CREB1 ist nach Stentimplantation im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant exprimiert.

(K: $0,79 \pm 0,05$ vs. Tag1: $0,88 \pm 0,1$; $p = 0,39$; K vs. Tag3: $0,86 \pm 0,05$; $p = 0,44$; K vs. Tag7: $0,89 \pm 0,06$; $p = 0,30$)

CREB2

Die Expression von CREB2 entwickelt das signifikante Expressionsmaximum einen Tag nach Stenting. Am dritten und siebten Tag liegt keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle vor.

(K: $1,09 \pm 0,1$ vs. Tag1: $1,68 \pm 0,2$; $p < 0,01$; K vs. Tag3: $1,02 \pm 0,08$; $p = 0,72$; K vs. Tag7: $1,07 \pm 0,09$; $p = 0,93$)

ICAM-1

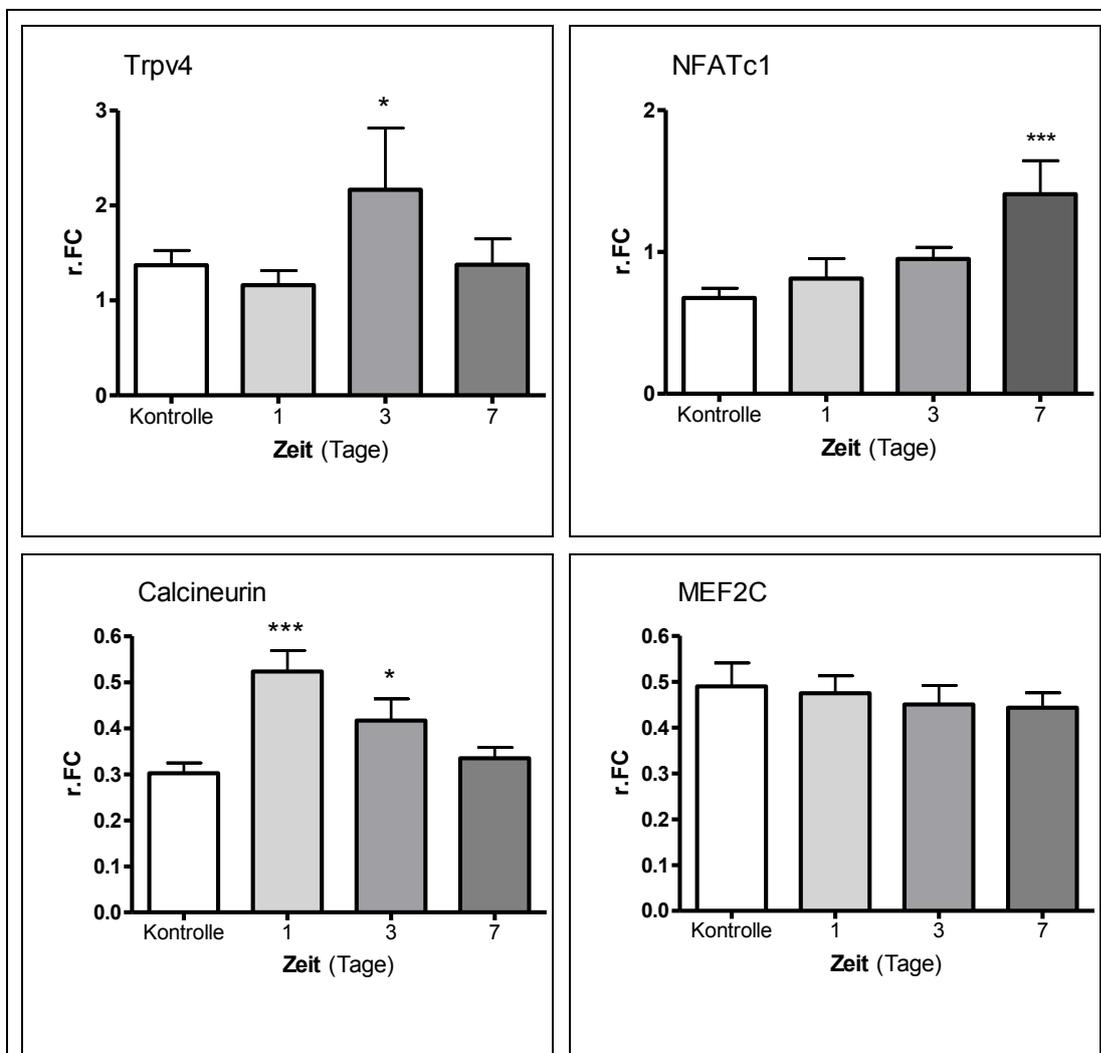
ICAM-1 wird ab dem ersten Tag nach Stentimplantation verstärkt exprimiert und bleibt gegenüber der Kontrolle über sieben Tage signifikant gesteigert

(K: $1,84 \pm 0,35$ vs. Tag1: $4,03 \pm 0,63$; $p < 0,01$; K vs. Tag3: $3,68 \pm 0,63$; $p < 0,05$; K vs. Tag7: $3,38 \pm 0,23$; $p < 0,05$)

VCAM-1

Die Expression erscheint nach Stentimplantation gesteigert, erreicht allerdings keine Signifikanz.

(K: $3,19 \pm 0,39$ vs. Tag1: $4,54 \pm 0,7$; $p = 0,09$; K vs. Tag3: $4,21 \pm 0,77$; $p = 0,21$; K vs. Tag7: $4,21 \pm 0,24$; $p = 0,15$)



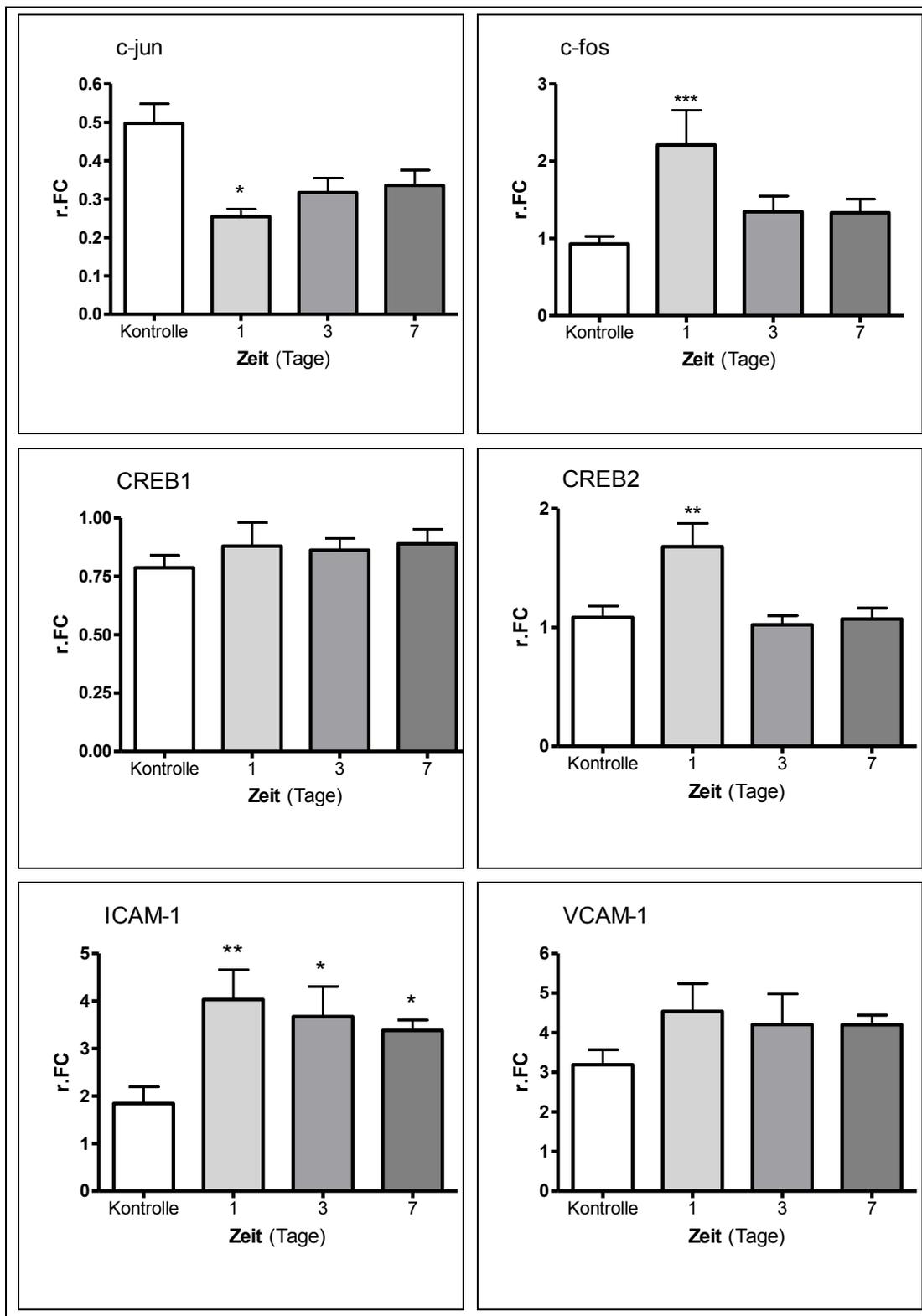


Tabelle 3.3 Genexpression nach Stentimplantation

(r.FC = relative Foldchange, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, fehlende Markierung = Nichtsignifikanz)

3.2.2 Immunfluoreszenz

Die Proteine Trpv4, NFATc1, pNFATc1 und CREB-1 wurden mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Die Koronargefäße wurden nach Entnahme des Stents mit der ungestenteten Kontrolle verglichen.

Trpv4 (s. Abb. 3.1)

Im Vergleich zur Kontrolle und zum ersten Tag nach Stentimplantation liegt eine deutliche Anfärbung (grün = Trpv4) des Endothels am siebten Tag vor (weiße Pfeile). Auffällig erscheint die Markierung der Zellkerne in der Media an Tag 3 und Tag 7. Interessanterweise zeigen am dritten Tag Zellkerne in der Intima ebenfalls eine auffällige Fluoreszenz (gelbe Pfeile).

pNFATc1 (phosphorylierte zytoplasmatische Form, s. Abb. 3.2)

Die ungestentete Kontrolle sowie der Tag 1 weisen eine deutliche zytoplasmatische pNFATc1-Färbung (rot) der Media auf. Die fluoreszierenden Bereiche sind schollig angeordnet. Am Tag 3 liegt weniger Rot-Fluoreszenz vor, am siebten postinterventionellen Tag können kaum noch Rot-Signale in der Media erfasst werden. Das stark leuchtende Endothel zeigt ebenfalls an Tag 7 die schwächste Fluoreszenz. Die Kerne zeigen keine pNFATc1-Signale.

NFATc1 (dephosphorylierte aktive nukleäre Form, s. Abb. 3.3)

Der Stent zeigt insgesamt eine stärkere Färbung als die ungestentete Kontrolle, ohne wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tagen aufzuweisen. Insbesondere das Endothel weist eine deutliche gleichmäßige Fluoreszenz auf. Das Zytoplasma der Mediazellen (VSMCs), erkennbar an der rötlichen Färbung (α – smooth muscle actin), wird postinterventionell von grüner Fluoreszenz (NFATc1) überlagert. Dieses Phänomen erscheint am dritten Tag am stärksten. Auch in der Adventitia finden sich kernnah gelegene grüne Signale.

CREB1 (dephosphorylierte zytoplasmatische inaktive Form, s. Abb. 3.4)

Im Vergleich zur Kontrolle liegt eine deutliche zytoplasmatische Rot-Fluoreszenz des Endothels an allen drei Tagen vor, mit einem leichten Rückgang an Tag 7. In der Media finden sich etliche fluoreszierende Kerne. Die Kerne der Adventitia zeigen ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenz.

Die Abbildung 3.5 zeigt eine Strutnische nach Entfernung des Stents. Die Media ist stark komprimiert. Um die Nische herum lagern sich Zellen mit kugeligen stark fluoreszierenden Kernen an. Das Endothel ist nicht mehr vorhanden.

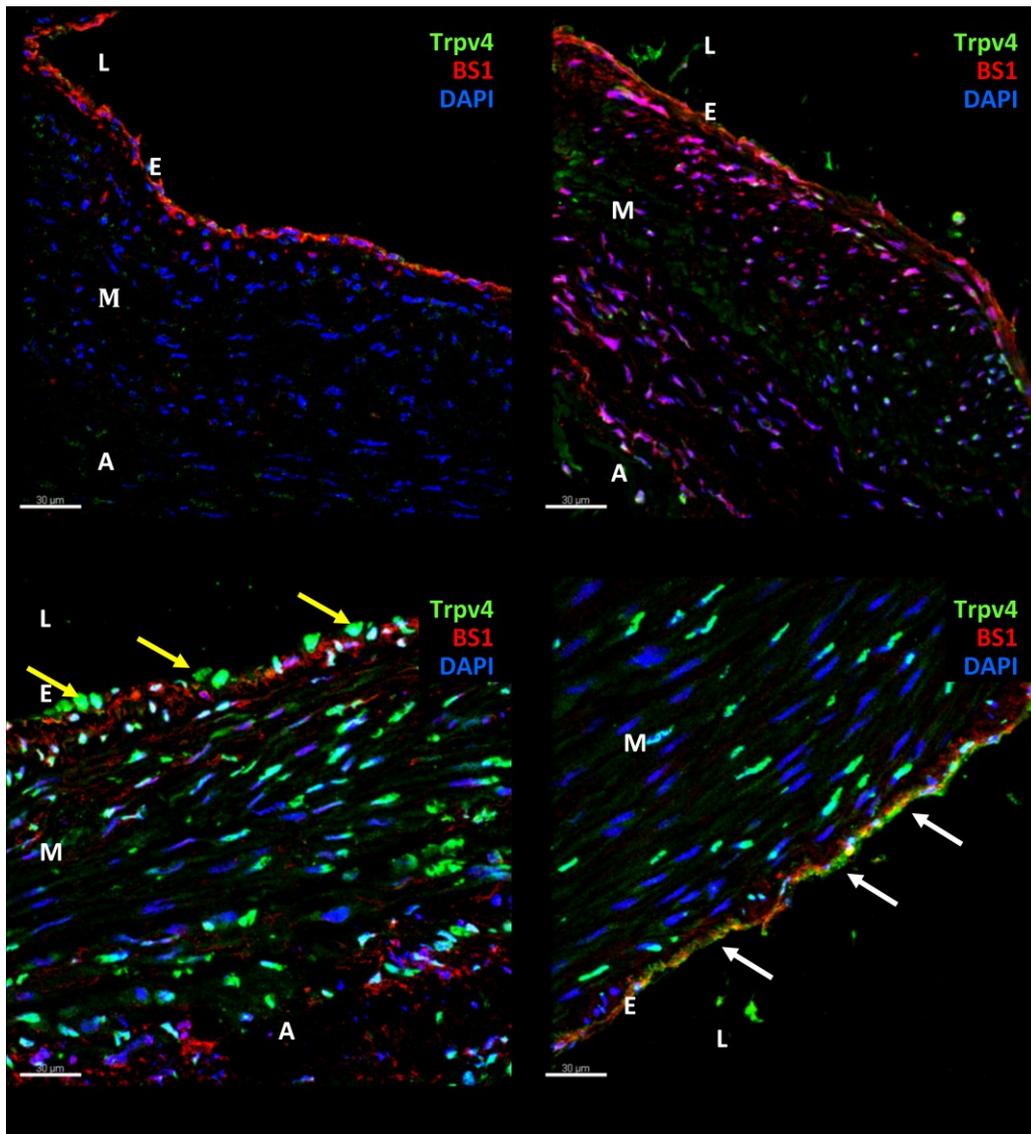


Abbildung 3.1: Immunfluoreszenzfärbung von Trpv4

(Scale bar 30 μm; **L**: Lumen, **E**: Endothel, **M**: Media, **A**: Adventitia; Kernfärbung DAPI: blau, Färbung des Endothels (BS1): rot; Trpv4: grün)

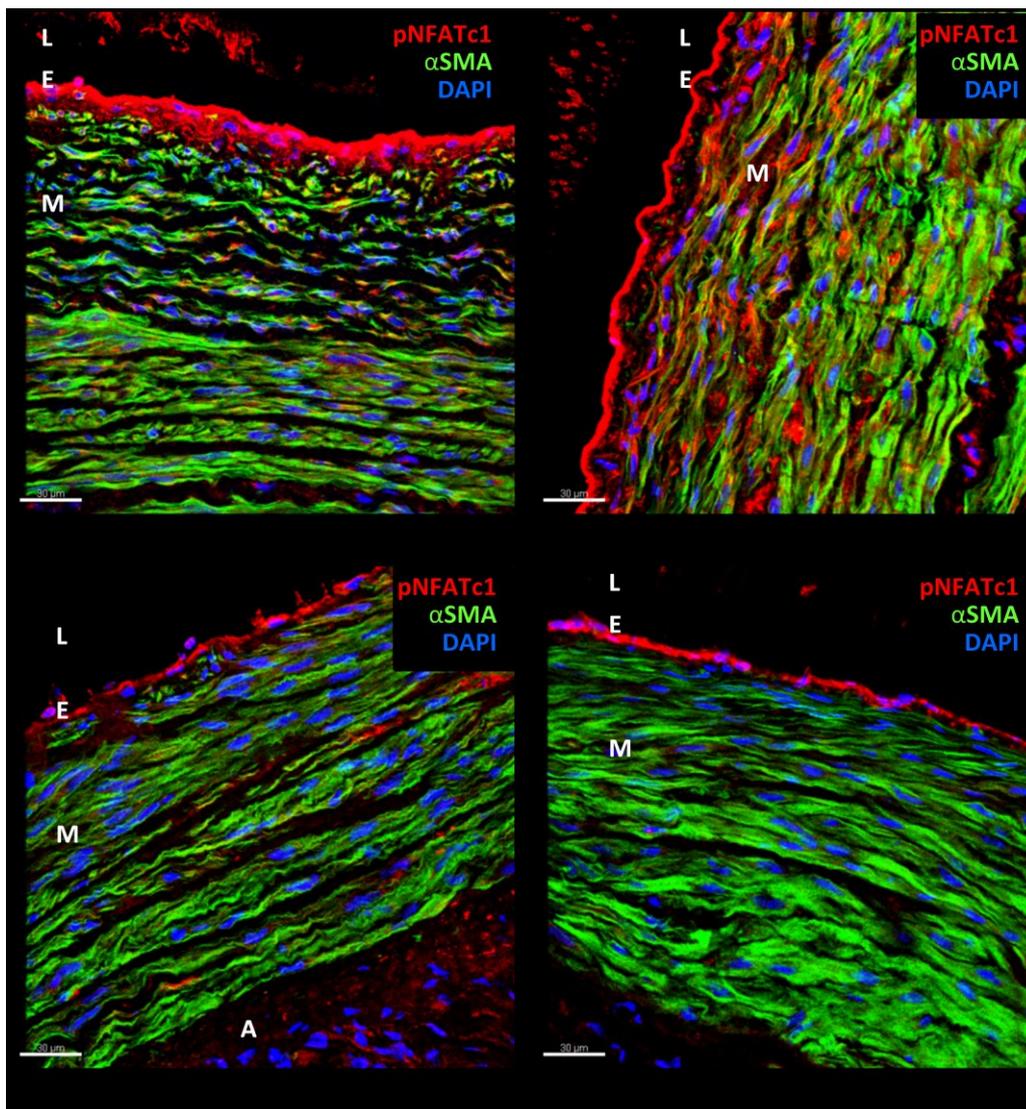


Abbildung 3.2: Immunfluoreszenzfärbung von pNFATc1

(Scale bar 30 μm; L: Lumen, E: Endothel, M: Media, A: Adventitia; Kernfärbung DAPI: blau, Färbung der glatten Muskulatur α-smooth muscle actin (αSMA): grün; pNFATc1: rot)

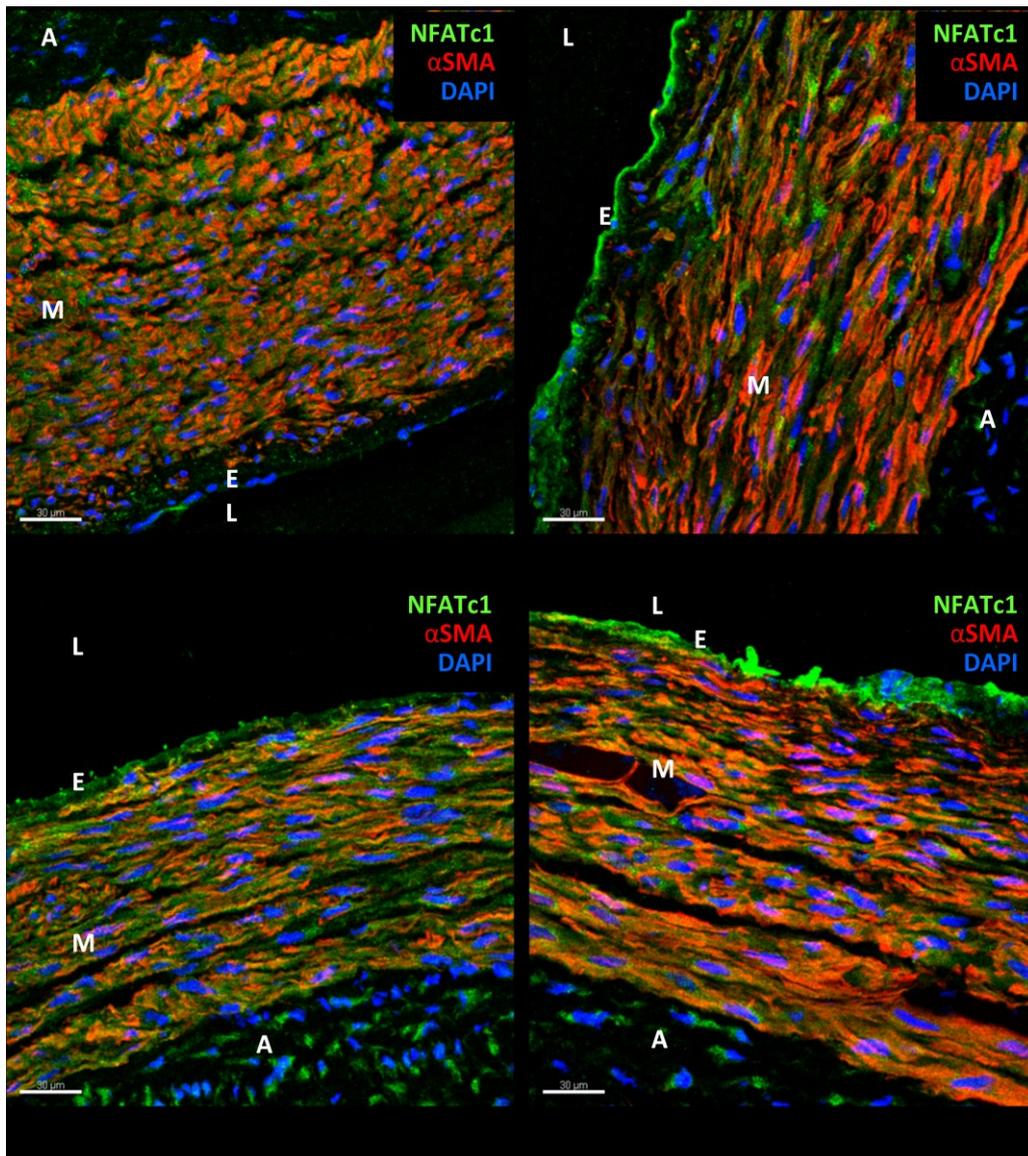


Abbildung 3.3: Immunfluoreszenzfärbung von NFATc1

(Scale bar 30 μm ; L: Lumen, E: Endothel, M: Media, A: Adventitia; Kernfärbung DAPI: blau, Färbung der glatten Muskulatur α -smooth muscle actin (αSMA): rot; NFATc1: grün)

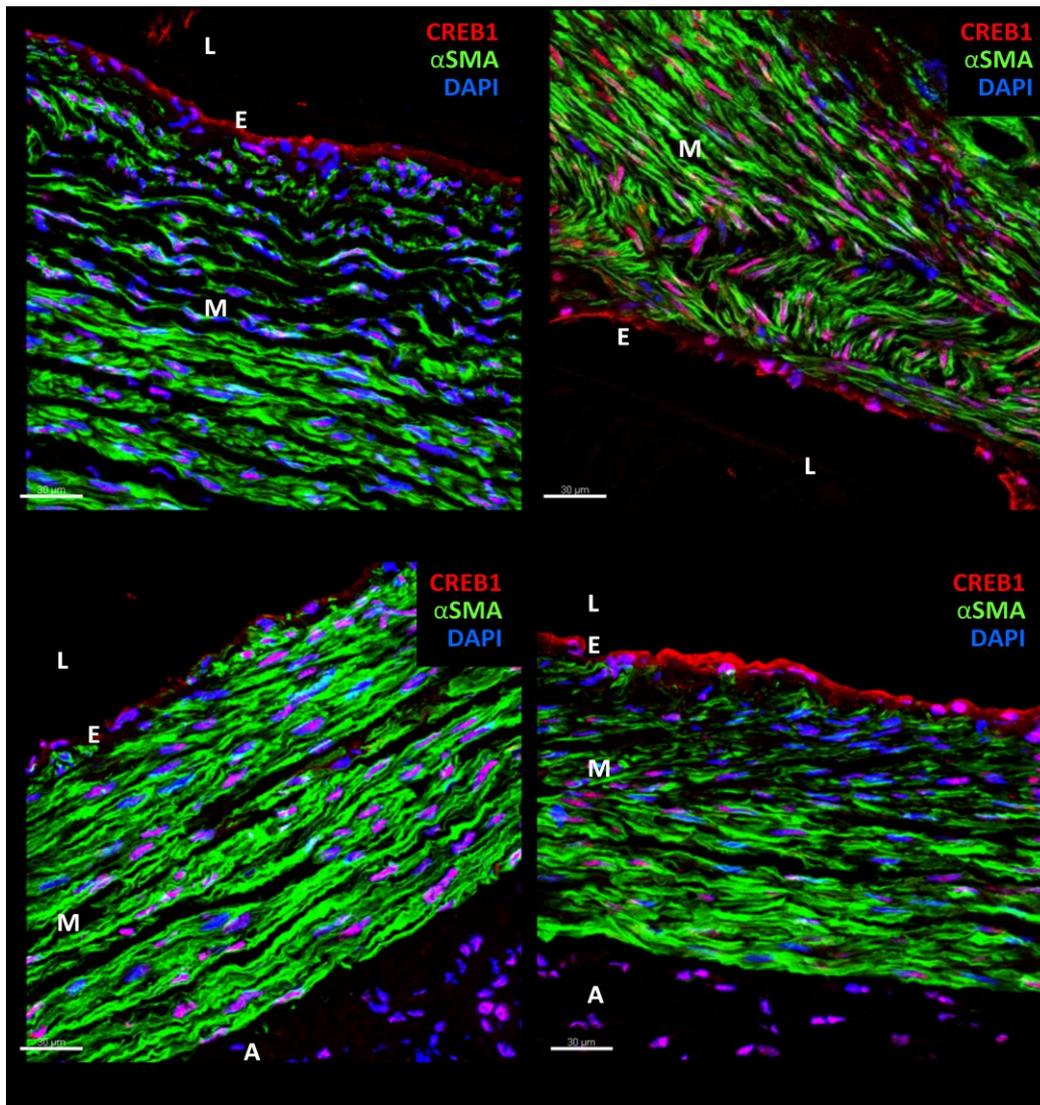


Abbildung 3.4: Immunfluoreszenzfärbung von CREB-1

(Scale bar 30 µm; L: Lumen, E: Endothel, M: Media, A: Adventitia; Kernfärbung DAPI: blau, Färbung der glatten Muskulatur α -smooth muscle actin (α SMA): grün; CREB-1: rot)

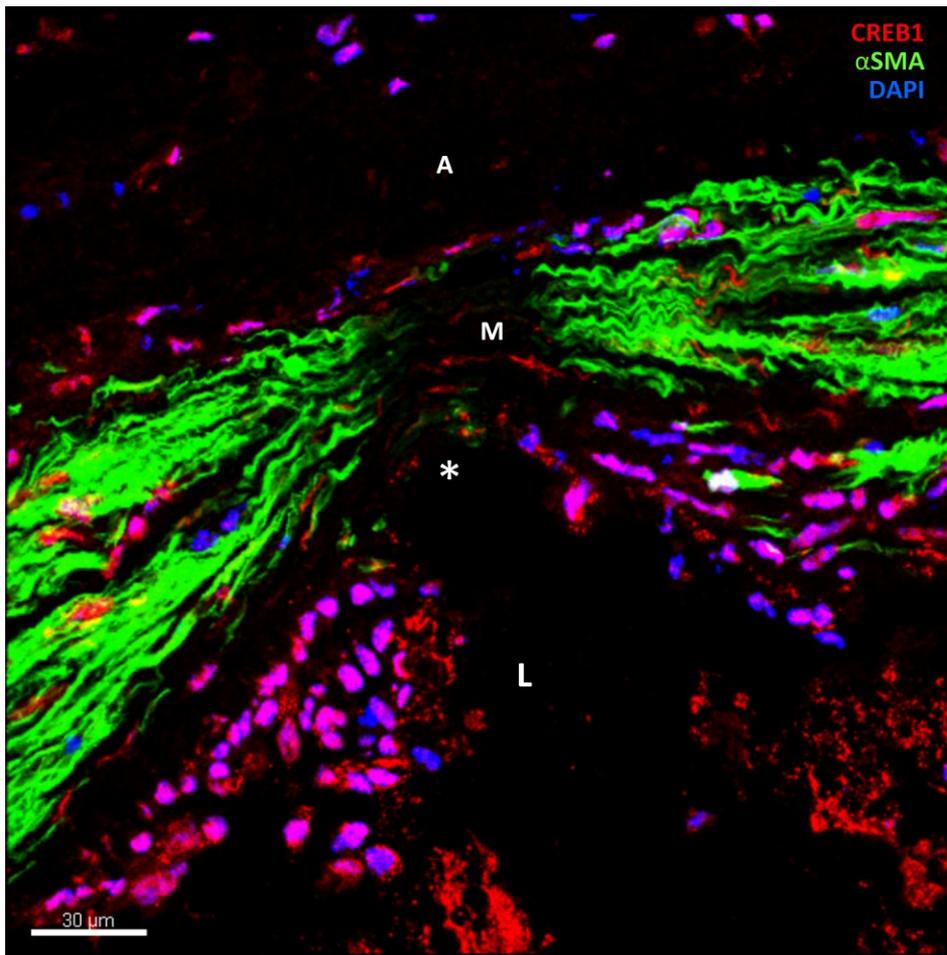


Abbildung 3.5: Immunfluoreszenzfärbung einer Strutnische

Die Abbildung zeigt eine Strutnische. Nach Entfernung des Stents ist die Beschädigung der Media noch deutlich zu erkennen. Das Endothel fehlt. Um die Strutnische herum befinden sich etliche kugelige Zellen, deren Kerne eine intensive CREB-1-Markierung zeigen.

(Scale bar 30 μm ; **L**: Lumen, **M**: Media, **A**: Adventitia, *****: Strutnische; Kernfärbung DAPI: blau, Färbung der glatten Muskulatur α -smooth muscle actin (αSMA): grün; CREB-1: rot)

3.2.3 Histomorphometrie

Die histomorphometrische Auswertung der gestenteten Koronararterien erbrachte nach 6 Wochen eine deutliche Zunahme der Instent-Restenose in der Gruppe der 4αPDD-behandelten Schweine verglichen mit der Kontrollgruppe (K vs. 4αPDD).

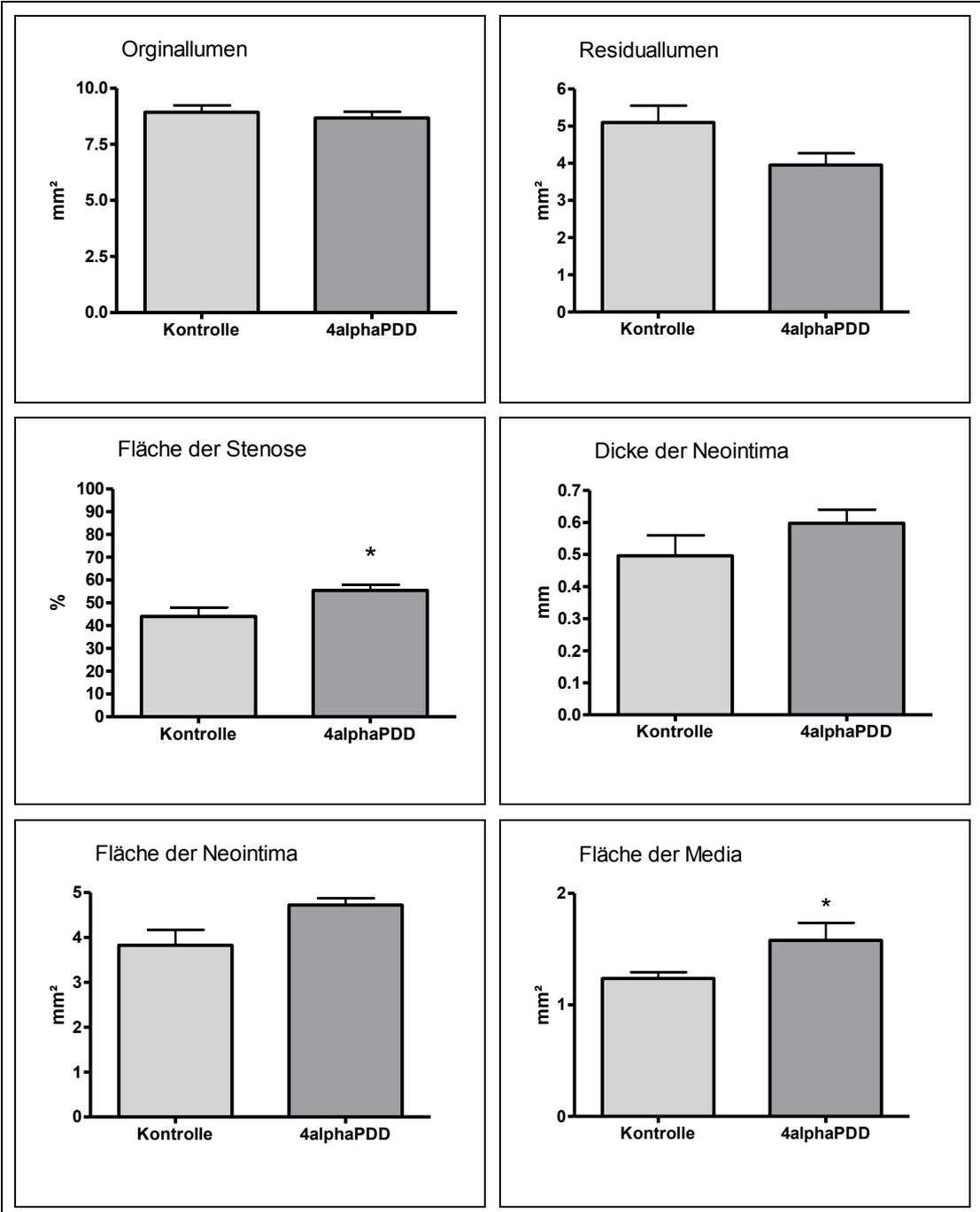
Die graphische Darstellung ist der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Die Ausgangsbedingungen unterscheiden sich dabei nicht signifikant voneinander. Das Originallumen der Gruppe 4αPDD beträgt im Mittel 8,68 mm², das der Kontrollgruppe 8,93 mm² (K: 8,93 ± 0,32 vs. 4αPDD: 8,68 ± 0,26; p = 0,58). Der Injury-Score als Maß für die dehnungsbedingte Verletzung liegt bei beiden Gruppen im Mittel zwischen 2,1 und 2,5 (K: 2,49 ± 0,08 vs. 4αPDD 2,12 ± 0,13; p < 0,05). Der Inflammation-Score (K: 2,07 ± 0,12 vs. 4αPDD: 2,10 ± 0,1; p = 0,82) ergibt für beide Gruppen keinen signifikanten Unterschied des Entzündungsgrades.

Die Parameter zur Quantifizierung der Restenose verhalten sich wie folgt: Das Residualvolumen der 4αPDD-Gruppe beträgt im Mittel 3,95 mm², das der Kontrollgruppe 5,1 mm² (K: 5,1 ± 0,45 vs. 4αPDD: 3,95 ± 0,31; p = 0,07). Obwohl sich keine Signifikanz ergibt, ist dennoch eine deutliche Tendenz erkennbar, dass es unter Gabe von 4αPDD zur Steigerung der Instent-Restenose kommt. Die Stenosefläche der Kontrollgruppe liegt dagegen signifikant unter der der 4αPDD-Gruppe (K: 44,07 ± 3,87 vs. 4αPDD: 55,45 ± 2,49; p < 0,05), was eine Stenosesteigerung um mehr als 20 % bei Einsatz von 4αPDD ergibt.

Die Fläche der Neointima ist mit ca. 4,7 mm² der 4αPDD-Gruppe verglichen mit der der Kontrollgruppe (ca. 3,8 mm²) größer. Dabei wird die Signifikanz jedoch nicht erreicht. (K: 3,83 ± 0,35 vs. 4αPDD: 4,72 ± 0,15; p = 0,053).

Die Neointimadicke der 4αPDD-Gruppe beträgt ca. 0,6 mm, die der Kontrolle nur ca. 0,5 mm (K: 0,5 ± 0,06 vs. 4αPDD: 0,6 ± 0,04; p = 0,25). Trotz mangelnder Signifikanz ist auch hier die Tendenz sichtbar. Gleichsinnig verhält es sich mit der Fläche der Media. (K: 1,24 ± 0,06 vs. 4αPDD 1,58 ± 0,16; p < 0,05). Hier wird eine Signifikanz erreicht.



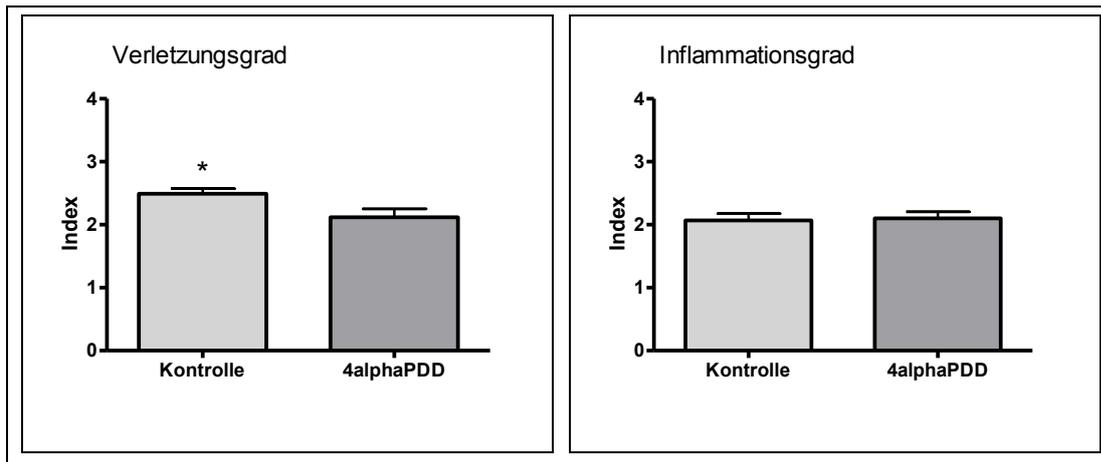


Tabelle 3.4: Histomorphologische Ergebnisse

(r.FC = relative Foldchange, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, fehlende Markierung = Nichtsignifikanz)

4 Diskussion

4.1 Methodik

Wahl der Zellen für die Kultur. Endothelzellen sind, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, das sensorische Element für WSS in Blutgefäßen. Die Wahl der porcinen Endothelzellen aus der Aorta (PAEC) lässt sich dadurch begründen, dass gerade große arterielle Gefäße besonders hohen Schubspannungswerten ausgesetzt sind und entsprechend aktivierte Phänotypen ausbilden.^{2, 99, 133, 174}

Spezies für das Großtiermodell. Das Schwein ist als Spezies der Wahl für die Forschung an Koronararterien anerkannt.¹⁵³ Dies rechtfertigen sowohl Anatomie als auch Pathophysiologie des Herzens, die der des Menschen ähneln. Da die ISR an gesunden porcinen Koronararterien jedoch in erster Linie als Wundheilung eines iatrogenen Schadens bei fehlenden typischen Risikofaktoren betrachtet werden muss, ist die direkte Übertragung auf die Pathologie der humanen ISR bei hochgradig arteriosklerotischen Koronararterien, wie sie in der Klinik beobachtet wird, nicht möglich. Dennoch ist das Stenting von porcinen Koronararterien ein gängiges Verfahren, das wichtige Hinweise zum Verständnis der ISR liefern kann und daher in vielen Studien angewandt wird.^{19, 87, 141}

Für die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass WSS einen der ISR-induzierenden Reize darstellt, ist das Fehlen systemischer Risikofaktoren von untergeordneter Bedeutung, da hier vor allem die lokalen Strömungsbedingungen von Interesse sind.

Wahl der Gruppengröße. Die gewählten Gruppengrößen in Kultur und Großtierprojekt sind zu klein, um die gefundenen Resultate als Fakten zu formulieren. In der vorliegenden Studie geht es jedoch vor allem um eine deskriptive Darstellung. Über die Ermittlung von Tendenzen kann es gelingen, fokussiert Anschlussprojekte zu planen.

Wahl des Flussmodells. Wie in Kapitel 1.3 aufgeführt, existieren unterschiedliche Systeme, anhand derer die verschiedenen Qualitäten einer Strömung imitiert werden. Dabei gelingt es nicht, sämtliche Aspekte in einem *in vitro*-Modell exakt reproduzierbar zu vereinen.

In dem in der vorliegenden Arbeit verwandten Strömungsmodell wurde durch turbulenten Fluss mit Strömungsumkehr akute WSS erzeugt, die für die Atherogenese verantwortlich gemacht wird.¹³³ Möglicherweise sind aber auch akute Änderungen in Form von laminarem Fluss beteiligt, die Resnick et al.¹³³ mit vaskulärem *Remodelling*

und Arteriogenese in Verbindung bringen. Auf jeden Fall kann chronische laminare WSS ausgeschlossen werden, welche ursächlich für Atheroprotektion gilt. Damit liegt ein einfaches aber effektives Strömungsmodell vor.

Inhibition mit Ruthenium Rot. Ruthenium Rot ist als polykationischer Hemmstoff für Trpv4 anerkannt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer Konzentration von 1 μM versetztes Kulturmedium eingesetzt. Damit sind die Bedingungen mit denen anderer Forschungsgruppen vergleichbar.^{84, 126, 156} Der Einsatz mittels RuR-beschichteter Stents im Großtiermodell gelang aufgrund der schlechten Löslichkeit in Ethanol nicht.

Agonisierung mit 4 α PDD. 4 α PDD ist ein gängiger Aktivator des Trpv4-Kanals.^{157, 160, 170} Im Großtiermodell wurde 4 α PDD während der Stentimplantation mit einem Genie-Ballonkatheter lokal appliziert. Somit wurde die höchste Konzentration am gewünschten Wirkort freigesetzt. Zwar erfolgt in Arterien das Auswaschen, bedingt durch den hohen Fluss, relativ rasch, doch kann man davon ausgehen, dass bei peripherer systemischer Gabe die maximal erreichbare lokale Konzentration weit unterschritten wird. Die kontinuierliche lokale Applikation über eine osmotische Minipumpe analog zu den Untersuchungen von Troidl et al.¹⁵⁴, wäre nur über eine risikoreiche Thorakotomie möglich gewesen.

Limitierend ist allerdings die unspezifische Wirkweise der genannten Stoffe zu werten, sodass die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekte auch durch andere molekulare Prozesse bedingt sein können.

Untersuchung mittels Real-Time-PCR. Die Analyse der Genexpression erfolgte an Koronararterien, aus denen der Stent zuvor vorsichtig entfernt worden war. Dadurch waren Gewebeverlust insbesondere in Strutnähe, sowie die Beschädigung intimaler Strukturen nicht vermeidbar. Da die komplette Koronararterie verwendet wurde, ist die Genexpression als Summation aller Gewebetypen zu werten.

Die Genexpression spiegelt allerdings nicht den Aktivitätszustand der Genprodukte wider. Das betrifft insbesondere die translozierenden Transkriptionsfaktoren wie NFATc1 und CREB-1, welche unabhängig von ihrer Transkriptionsrate kalzium- und / oder strömungsabhängig stimuliert werden können.

Untersuchung mittels Immunhistologie. Durch die Untersuchung des Gewebes *in toto* mittels Real-Time-PCR ist es nicht möglich, die Expression einzelner Gene einem spezifischen Zelltyp zuzuordnen. Zu diesem Zweck wurde der immunhistologische Nachweis einiger ausgewählter Genprodukte (s. Kap. 3.2.2) durchgeführt. Zusätzlich lieferte die mikroskopische Untersuchung wichtige Hinweise auf die Folgen der

Entfernung des Stents nach der Gefäßpräparation. Da die histologischen Schnitte nur nach Entfernung des Stents angefertigt werden konnten, waren Beschädigungen des Gewebes nicht vollständig vermeidbar. Insbesondere die Zonen in unmittelbarer Nähe der Struts erwiesen sich als fragil und waren in der Regel für die Präparatfertigung ungeeignet. Wie aus Abbildung 3.5, einer immunhistologischen Darstellung einer Strutnische, ersichtlich wird, wird die Media durch die Stentimplantation stark komprimiert. In diesem Bereich ist die Markierung mit α -SMA sehr schwach. Möglicherweise ist das Gewebe nicht mehr vital. Außerdem fehlt das Endothel. Stattdessen finden sich etliche Zellen in unmittelbarer Strutnähe. Ihr kugelig Zellen ähnelt dem inflammatorischer Zellen. Dies müsste allerdings durch Einsatz geeigneter Antikörper belegt werden.

Die Untersuchung eines gesamten Stents von knapp 2 cm Länge wäre zu umfangreich gewesen, weshalb nur einzelne Stentabschnitte analysiert wurden. Es sollte daher nicht außer Acht gelassen werden, dass sich mögliche Unregelmäßigkeiten des Proteinstoffwechsels, bedingt durch lokale Schwankungen des hämodynamischen Profils, dem Nachweis mittels immunhistologischer Analyse entzogen haben.

Da hier die gleiche Präparationstechnik wie für die PCR angewandt wurde, lassen sich grobe Rückschlüsse auf die anteilmäßige Verteilung der mRNA auf die unterschiedlichen Gewebetypen erzielen. So ist davon auszugehen, dass der Verletzungsgrad des Endothels und der Strukturverlust durch die Stententfernung zu uneinheitlichen Ergebnissen beider Untersuchungsmethoden führen.

Die immunhistologische Färbung erfolgte nach standardisierten Schemata mit zuvor geprüften Antikörpern. Bei jedem Färbvorgang wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Auswertung erfolgte durch eine deskriptive Einschätzung der Signalintensität.

Histomorphometrische Untersuchung. Durch das angewandte spezielle Einbettverfahren in Kunstharz gelang es, histologische Untersuchungen an intakten Koronararterien durchzuführen, ohne zuvor den Stent entfernen zu müssen. Damit blieben die Gefäße im Querschnitt maßstabsgerecht. Da die Stents mit Nummern versehen worden waren, ergab sich eine Verblindung der an der Auswertung beteiligten Personen. Durch den Einsatz spezieller EDV kann von einer standardisierten Auswertung ausgegangen werden.

Leider ist es bislang technisch nicht möglich, die in Kunstharz eingebetteten Schnitte einer immunhistologischen Analyse zuzuführen. Es wäre interessant, an intakten gestenteten Koronararterien Proteine zu markieren und so insbesondere die

neointimalen Bereiche zu untersuchen, die bei den bisherigen Präparierverfahren in der Regel nicht erhalten bleiben.

4.2 Ergebnisse der Zellkultur

Mit Hilfe des Strömungsmodells der Zellkultur wurde die Expression verschiedener Gene auf Abhängigkeit von NLSS und Trpv4 untersucht. Durch den Einsatz des Inhibitors Ruthenium Rot lassen sich mögliche Mitglieder eines Trpv4-Signalweges von unabhängigen Genen unterscheiden.

4.2.1 Genexpression unter nichtlaminarer Strömung

Grundsätzlich weisen alle untersuchten Gene Expressionsänderungen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer auf. Es lassen sich dabei Gene mit früher (bis 18 Stunden) von solchen mit später transkriptioneller Antwort unterscheiden.

Die Expression von Trpv4 zeigt nach 18 Stunden NLSS ein deutliches Expressionsmaximum. Da die Transkription nach 48 Stunden stark abfällt, liegt die Hypothese nahe, dass Trpv4 zu den früh regulierten Genen gehört. Weil das in der vorliegenden Arbeit angewandte Modell allerdings adaptive Prozesse verhindert, wie sie für laminare WSS beschrieben wurden (s. Kap. 1.5.3), bleibt zu spekulieren, ob bspw. über negative Feedbackmechanismen eine überschießende Expression verhindert wird. Die kalziumabhängigen Faktoren NFATc1 und Calcineurin zeigen ebenfalls nach 18 Stunden signifikant die höchste Expression und bleiben auch nach 48 Stunden auf hohem Expressionsniveau. Dies weist daraufhin, dass in dem Modell der vorliegenden Arbeit durch NLSS ein Kalziumeinstrom erfolgt.

Die Adäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie c-fos weisen ebenfalls ein frühes Expressionsmaximum nach 18 Stunden auf, wobei allerdings keine Signifikanz vorliegt. Die Transkriptionsfaktoren c-jun, CREB1, CREB2 und MEF2C entwickeln einen kontinuierlichen Expressionsanstieg mit einem späten Maximum nach 48 Stunden.

Damit entsprechen die vorliegenden Ergebnisse u. a. denen von Nagel et al.¹²⁴, die ebenfalls in Regionen mit NLSS starke c-jun- und c-fos-Expression gefunden haben. Zwar konnten einige Autoren zeigen, dass innerhalb von Minuten bis weniger Stunden die höchste Transkriptionsrate der Protoonkogene erreicht wird, gefolgt von einem deutlichen Rückgang^{23, 55}, doch beschreiben diese Experimente laminare Strömungsbedingungen. Es ist daher anzunehmen, dass gerade die unter NLSS beobachteten

pathologischen Prozesse unter Beteiligung des AP-1-Komplexes angestoßen werden. In gleicher Weise sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dafür, dass CREB1, CREB2 sowie MEF2C unter nichtlaminaren Bedingungen in die Signalwege involviert sein könnten, die in entscheidendem Maße für Proliferation und Differenzierung verantwortlich sind. Allerdings diskutieren Klemm et al.⁸³ CREB als ein durch „Stress“ (Hypoxie, PDGF) deprimiertes Gen, das bei längerer Kultivierung glatter Muskelzellen unter statischen Bedingungen stärker exprimiert wird als unter Einfluss von Stressoren. Eine direkte methodische Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Arbeit besteht jedoch nicht. Es ist also nicht auszuschließen, dass sich die CREB-Regulation in Endothelzellen von der in VSMCs unterscheidet.

Das auch als ATF4 publizierte CREB2 wird durch atheroprotektiven Faktoren, wie Phospholipidoxidation oder Homocysteine, in Ecs induziert und neben anderen Genen für Inflammation sowie anschließender Apoptose verantwortlich gemacht.¹⁰⁴ Das Expressionsmaximum nach 48-stündiger NLSS deutet daraufhin, dass auch mechanische Einflüsse auf Endothelzellen zu den Induktoren von CREB2 gehören.

Das in Endothelzellen exprimierte MEF2C wird durch Vertreter der MAP-Kinasen phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die Experimente von Yan et al.¹⁷¹ zeigten, dass konstante laminare Strömung in bovinen Aorten-ECs BMK1, einen diesen MEF2C-Aktivatoren, u. a. kalziumabhängig stimuliert. Allerdings scheinen dabei vor allem die intrazellulären Kalziumspeicher von Bedeutung zu sein, was gegen eine direkte Abhängigkeit von Trpv4 spricht. Anhand der vorliegenden Experimente kann keine Aussage über den Aktivitätszustand unter NLSS getroffen werden. Einerseits ist das Expressionsmaximum nach 48 Stunden als Indiz für strömungsabhängige MEF2C-Transkription zu deuten, jedoch spricht die massiv gesteigerte Transkriptionalität unter RuR gegen Trpv4 als das hier verantwortliche mechanosensible Element der Endothelzellen.

Die Adhäsionsmoleküle werden in der Literatur im Zusammenhang mit strömungsbedingten zellulären Prozessen kontrovers diskutiert.^{1, 2, 25, 123} In dem vorliegenden Projekt zeigen ICAM-1 und VCAM-1 ein ähnliches Transkriptionsverhalten. Das entspricht dem Ergebnis von Sucosky et al.¹⁵⁰, nach deren Untersuchungen turbulenter Fluss an Aortenklappen eine verstärkte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 zur Folge hat. Die Experimente von Liyama et al.⁷⁴ konnten nur für VCAM-1 eine gesteigerte Expression in von NLSS betroffenen arteriellen Arealen zeigen. ICAM-1 dagegen wird unter laminarer Strömung (10 dyn/cm² im Experiment) exprimiert. Die vorliegenden Resultate unterstützen die These, dass die

Adhäsionsmoleküle strömungsabhängig transkribiert werden. Insbesondere nach Stentimplantation könnte dies wesentliche Folgen für inflammatorische Prozesse nach sich ziehen. Damit kommt ICAM-1 und VCAM-1 möglicherweise eine wichtige Bedeutung als Bindeglieder zwischen Strömungsprofil und der Entzündungsreaktion zu, die letztendlich die ISR verursacht.

4.2.2 Genexpression statisch kultivierter PAEC

Sehr interessant ist der gefundene Unterschied zwischen früher (3 Stunden) und später (18 Stunden) Transkriptionalität unter statischen Bedingungen. Alle Gene (außer c-fos) wiesen nach 18 Stunden eine niedrigere Expression auf (s. Tab. 3.2). Allerdings kann an dieser Stelle, aufgrund der geringen Gruppengrößen, nur von Tendenzen gesprochen werden. Dennoch könnte dieses Ergebnis als wichtiger Hinweis interpretiert werden, dass Endothelzellen in Kultur schon minimale Bewegungen des Mediums registrieren und entsprechend ihre Expression anpassen. Damit könnte sich jegliches transport- oder prozessbedingte Schwenken manipulativ auf die Experimente auswirken. In der vorliegenden Arbeit ließe sich damit auch die hohe Standardabweichung vor allem der statischen Kontrolle erklären. Ob dies auch die unter NLSS kultivierten Zellen betrifft, ist spekulativ. Um diesen Prozessfehler in Zukunft zu minimieren, müssten Transportwege weitgehend vermieden bzw. Ruhephasen vor den eigentlichen Versuchen eingeräumt werden.

4.2.3 Genexpression unter Ruthenium Rot

Unter Behandlung mit Ruthenium Rot (RuR) erscheint auffällig, dass bereits in der statischen Kontrolle große Expressionsunterschiede im Vergleich zur unbehandelten Gruppe bestehen. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze:

1. RuR könnte zu unspezifisch wirken. Dadurch, dass möglicherweise andere Mechanismen unbeabsichtigt beeinflusst werden, wären die unterschiedlichen Transkriptionsraten desselben Gens unter statischen Bedingungen nicht als Folge der Inhibition von Trpv4 zu werten.
2. Trpv4 könnte eine grundlegende Offenwahrscheinlichkeit bei 37°C aufweisen, die durch RuR inhibiert wird. Diese These wird durch die Untersuchung von Watanabe et al. ¹⁶¹ unterstützt, die eine temperaturabhängige Öffnung von Trpv4 zeigen konnten.
3. Angesichts der Tatsache, dass bei einigen Genen (CREB1, CREB2, MEF2C, Calcineurin und Trpv4) die statische Grundexpression unter RuR erhöht ist, wäre die

Annahme einer inhibitionsbedingten Expressionssteigerung im Sinne eines *Rebound*phänomens eine mögliche spekulative Erklärung. Voraussetzung dafür wäre allerdings, dass RuR auch unter statischen Bedingungen die Zelle beeinflusst, wie in Punkt 2 beschrieben.

4. Für den Fall, dass, wie unter Kapitel 4.2.2 diskutiert, bereits die leichten Bewegungen des Kulturmediums bei den Vorbereitungen die Genexpression beeinflussen könnten, stellt sich auch hier die Frage, ob das Ergebnis als Zusammenspiel dieser mechanosensiblen Zellreaktionen und der Wirkung von RuR zu interpretieren ist.

Für einige der untersuchten Gene findet sich unter RuR eine reduzierte Transkription in der RuR-Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kultur. Dazu zählen NFATc1, c-jun, ICAM-1 und VCAM-1. Allerdings erfüllt nur c-jun den in diesem Zusammenhang zu erwartenden Expressionsverlauf mit signifikantem Maximum in der unbehandelten Gruppe und überwiegender Downregulation unter RuR. Dies bestärkt die These einer Trpv4- und Kalziumstromabhängigkeit.

Trpv4 selbst, c-fos und MEF2C zeigen unter NLSS jedoch eine Steigerung unter RuR gegenüber der unbehandelten Kultur, was zumindest für Trpv4 paradox erscheint. Für die bereits angedeutete Erklärung durch ein *Rebound*phänomen gibt es in der aktuellen Literatur keinen Anhalt und ist rein spekulativ.

Die Expression der Gene CREB1 und CREB2 gleicht sich erst nach 48-stündiger Kultur an, während Calcineurin keinen signifikanten Transkriptionsunterschied aufweist. Damit kann die funktionelle Abhängigkeit von Trpv4 und Kalzium durch das vorliegende Experiment für diese Gene nicht belegt werden.

Da es sich bei den vorliegenden Daten nicht um die Aktivität des Genproduktes handelt, sondern um die mRNA-Konzentration, ist die Abweichung der Grundexpression unter statischen Bedingungen, sowie ein RuR-bedingter Transkriptionsanstieg nicht als Beweis funktioneller Unabhängigkeit der einzelnen Faktoren von Trpv4-induzierten Signalkaskaden zu interpretieren. Weitere Untersuchungen insbesondere der Genprodukte könnten darüber Aufschluss geben. Sicher scheint jedoch, dass alle untersuchten Gene NLSS-abhängig transkribiert werden. Welche Transkriptionsfaktoren im Einzelnen dafür verantwortlich sind, bleibt ungeklärt. Für NFATc1, c-jun und die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 kann angenommen werden, dass *in vitro* unter NLSS die Expression Trpv4-abhängig erfolgt.

4.3 Ergebnisse des Großtiermodells

Durch Implantation unbeschichteter Stents wurde die Genexpression durch Quantifizierung der mRNA-Konzentration von 10 Genen innerhalb einer Woche untersucht und die ISR nach 6 Wochen histomorphometrisch ausgewertet. Die immunhistologische Analyse wurde zur Darstellung der Genprodukte von Trpv4 selbst und der nach Aktivierung translozierenden Proteine NFATc1 und CREB-1 angewandt.

4.3.1 Genexpression

Mittels quantitativer Real-Time-PCR wurde die Expression WSS-abhängiger Gene untersucht. Es wurden die Zeitpunkte 1, 3 und 7 Tage nach Stentimplantation gewählt. Damit wird der Versuch der Hypothese gerecht, dass insbesondere akute Änderungen der Strömung und NLSS entscheidend sind für die Regulation derjenigen Gene, die für die Pathologie der ISR verantwortlich scheinen.^{2, 133} Mit zunehmender Ausbildung der Neointima glättet sich das Oberflächenprofil der Gefäßwand und wirkt laminarisierend auf den Blutfluss mit entsprechender Auswirkung auf die Genexpression (s. Kap. 1.4).

Zu den Genen, die sich in den vorliegenden Untersuchungen durch eine frühe Expression nach Stent-implantation auszeichnen, gehören Trpv4, Calcineurin, c-fos, CREB2 und ICAM-1. Diese zeigen ihr signifikantes Expressionsmaximum innerhalb der ersten drei Tage nach Intervention. Danach fällt die Transkription wieder ab. Zu den Genen mit später (nach sieben Tagen) Regulation gehört NFATc1. Keine signifikante Änderung der Expression nach Stentimplantation zeigen CREB1, VCAM-1 und MEF2C. Eine Reduktion der Expression nach Stentimplantation liegt bei c-jun vor.

Die Expression von Trpv4 zeigt ihr Maximum am dritten postinterventionellen Tag. Am siebten Tag sinkt die Transkriptionsrate wieder ab. Mit dem Einstrom von Kalzium ist die Aktivierung von Calcineurin und NFATc1 verbunden. Das Expressionsmaximum von Calcineurin liegt am ersten Tag nach Stentimplantation. Am dritten Tag ist die Expression zwar noch gesteigert, fällt jedoch bis zum siebten Tag auf Kontrollniveau ab. NFATc1 dagegen zeigt eine zunehmende Transkriptionsrate mit dem Höhepunkt nach einer Woche. Man kann also davon ausgehen, dass innerhalb des gestenteten Arealis Trpv4 eine höhere Offenwahrscheinlichkeit zeigt als in Kontrollkoronararterien.

Die WSS-abhängige Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 konnte bisher für laminare Strömung als auch für NLSS gezeigt werden^{1, 25, 74, 123, 150} (s. Kap. 1.5.3). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Hypothese, dass ICAM-1

zu den relevanten Parametern nach Stentimplantation gehört. Nach dem Maximum am ersten Tag bleibt die Expression auch innerhalb über drei und sieben Tagen gesteigert, allerdings mit sinkender Tendenz. Als wichtiges Element inflammatorischer Prozesse liegt seine Bedeutung womöglich gerade in der frühen postinterventionellen Gefäßantwort.

VCAM-1 zeigt einen Expressionsanstieg, welcher über sieben Tage konstant, jedoch nicht signifikant, über dem Niveau der Kontrolle liegt. Einer klinischen Studie zufolge, in der die Konzentration zirkulierender Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und VCAM-1) im Plasma gestenteter Patienten bis sechs Monate postinterventionell verfolgt wurde, existierten stark erhöhte Werte von VCAM-1 in den Seren derer, die eine ISR entwickelten. Dagegen zeigte ICAM-1 keine signifikante Konzentrationsänderung.⁶ Es konnte gezeigt werden, dass auch VCAM-1 zu den relevanten Faktoren gerechnet werden muss, auch wenn in der vorliegenden Arbeit die Expression keine Signifikanz erreicht. Es ist nicht auszuschließen, dass die Transkription innerhalb weniger Stunden nach Stentimplantation oder erst zu späteren Zeitpunkten messbar ansteigt. Durch das vorliegende Großtiermodell kann jedoch nicht geklärt werden, ob die Regulation der Adhäsionsmoleküle auf einem Trpv4-abhängigen Mechanismus beruht oder ob andere mechanosensitiven Elemente verantwortlich sind.

Die Transkriptionsfaktoren c-jun und c-fos, als regulierende Vertreter von Proliferation und Differenzierung, gehören zu den WSS-regulierten Genen. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass c-jun und c-fos sowohl unter LSS als auch unter NLSS, sowie im Rahmen interventioneller Eingriffe unterschiedlich exprimiert werden.^{25, 94, 95, 125, 177} Das Stentmodell der vorliegenden Arbeit ergab für c-jun eine geringere Expression postinterventionell, verglichen mit der Kontrolle. Nach drei und sieben Tagen fand sich ein Anstieg. Allerdings weisen die Arbeiten von Malek et al. und Chien et al.^{23, 106} daraufhin, dass die entscheidende Expression nur innerhalb 30 Minuten nach Stimulation messbar ist. Damit liegen die vorliegenden Untersuchungen womöglich außerhalb des Zeitfensters, in dem c-jun den transkriptionellen Gipfel entwickelt.

Die Regulation von c-fos wird kontrovers publiziert. Demnach soll geringe WSS (4 dyn/cm²) die Expression fördern, andere Experimente fanden dagegen keine Transkription infolge laminarer WSS.^{55, 118} Die vorliegenden Resultate sprechen für die Beteiligung an postinterventionellen Signalwegen, da c-fos ein signifikantes Maximum bereits nach einem Tag zeigte. Danach fiel die Transkriptionsrate wieder ab.

CREB1 zeigt im vorliegenden Stentmodell keine signifikante Änderung seiner Transkriptionsrate. Allerdings wird die Kalzium-gesteuerte Aktivierung über die Ca²⁺ / Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMKs) als wichtiger Mechanismus diskutiert.¹⁴⁴ Daraus folgt, dass, obwohl sich an der Expression nichts ändert, die Aktivität des Proteins sehr wohl gesteigert sein kann.

CREB2 hingegen weist ein signifikantes Maximum einen Tag nach Stentimplantation auf. An späteren Zeitpunkten liegt die Expression auf Kontrollniveau. Die positive Regulation infolge Ballonangioplastie wurde bereits beschrieben¹⁰⁵ und kann nun durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen ergänzt werden. Inwiefern WSS molekularbiologisch eine Rolle dabei spielt, ist gegenwärtig nicht bekannt.

Eine Änderung der Expression von MEF2C konnte in dem Stentmodell der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Maiti et al.¹⁰³ argumentieren VEGF als Induktor der Expression von MEF2C. Da Calcineurin und CaMKII die VEGF-Aktivität inhibieren, wäre eine Trpv4-abhängige Depression der Transkription zu erwarten. Da die Transkriptionsrate nichts über den Aktivitätsgrad aussagt, ist es jedoch nicht möglich die WSS-abhängige Regulation von MEF2C komplett auszuschließen. Untersuchungen des arteriellen Kollateralwachstums anhand eines Schweinemodells zeigten eine Beteiligung von MEF2C in Abhängigkeit von laminarer WSS.¹⁵⁴ Andere Studien bestätigen diese Ergebnisse.^{70, 98, 103} Möglicherweise ist MEF2C Teil des komplizierten Vermögens des Endothels *in vivo* zwischen den verschiedenen Strömungsqualitäten zu unterscheiden und wird unter NLSS weniger stark exprimiert.

4.3.2 Immunfluoreszenz

Trpv4 ist der molekularbiologische Kern dieser Arbeit. Daher ist es wichtig, die Expression des Proteins zu lokalisieren. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit geht davon aus, dass Trpv4 ein mechanosensibles Element insbesondere des vaskulären Endothels darstellt. Der vorliegende endotheliale Nachweis von Trpv4 nach Stentimplantation untermauert diese Hypothese. Darüber hinaus finden sich fluoreszierende Zellkerne in der Media an den Tagen 3 und 7. Dazu stehen in der Literatur bislang keine vergleichbaren Ergebnisse zur Verfügung. Die markierten Zellkerne in der Endothelschicht am Tag 3 zeigen eine endotheluntypische kugelige Gestalt und sind möglicherweise angelagerte Leukozyten im Rahmen der üblichen Inflammation nach Stentimplantation. Bislang ist wenig bekannt über die leukozytäre

Expression von Trpv4, doch gelang es zumindest Spinsanti et al. ¹⁴⁷, mittels Real-Time-PCR die mRNA von Trpv4 in Leukozyten zu zeigen.

NFATc1 ändert durch Dephosphorylierung seine zytoplasmatische Konformität in die kerngängige um. ¹⁰ Die immunhistochemische Färbung beider Isoformen diente dem Nachweis einer NFAT-Aktivierung mit entsprechender Änderung des Fluoreszenzmusters nach Stentimplantation. Die Markierung der phosphorylierten Form mit pNFATc1-AK sollte ausschließlich zu zytoplasmatischer Fluoreszenz führen, während der NFATc1-AK zusätzlich den Kern färbt. Die vorliegenden Analysen entsprechen dem nur teilweise. Während die Kontrolle sowie der erste postinterventionelle Tag ein hohes Maß an Fluoreszenz, sowohl des Endothels als auch der Media nach pNFATc1-Färbung, zeigen, nimmt bis zum siebten Tag die Intensivität in der Media ab. Das Endothel dagegen behält die Fluoreszenz. Die Markierung des dephosphorylierten NFATc1 betrifft Endothel und Media, wobei auch hier vor allem das Zytoplasma fluoresziert. Die Kerne jedoch sind weitgehend frei. Möglicherweise ist der nukleäre Transfer zu gering oder zu einem späteren Zeitpunkt zu erwarten. Nichtsdestotrotz belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die NFATc1-Aktivierung nach Stentimplantation.

CREB-1 gehört wie NFATc1 zu den kerngängigen Transkriptionsfaktoren. Dabei erfolgt die Translokation nach Phosphorylierung. ^{20, 144} Gegenüber der Kontrolle erscheinen die Tage 1 und 3 nach Stentimplantation signalreicher. Während der CREB-1-AK in der Media ausschließlich die Kerne markiert, färbt sich im Endothel dagegen auch das Zytoplasma. Die Studien von Klemm et al. ⁸³ diskutieren CREB als wichtige Determinante für die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen. In deren immunhistochemischen Nachweisen dominierten ebenfalls die nukleären Signale. Allerdings kommen Klemm et al. zu dem Schluss, dass CREB in glatten Muskelzellen zu den antiproliferativen Faktoren gehört, die auf Stress mit herunterregulierter Expression reagieren. Andererseits belegen Boo et al. ¹⁴ in Endothelzellen die gesteigerte Phosphorylierung von CREB in Abhängigkeit der PKA unter Schubspannung.

4.3.3 Die Instent-Restenose in Abhängigkeit von Trpv4

Die Instent-Restenose ist ein pathologischer Prozess, der durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Wie die Arbeiten von LaDisa et al. und anderen Forschungsgruppen zeigen (s. Kap. 1.4), spielt die Blutströmung eine besondere Rolle in der Lokalisation stenosierender Plaques. Die Identifizierung des mechanosensitiven

Kanals Trpv4 und dessen Aktivierbarkeit durch 4 α PDD eröffnet eine Möglichkeit in diese Mechanismen direkt einzugreifen, um eine Stenosierung der implantierten Stents zu manipulieren.

Die Wahl des Zeitpunktes mit 6 Wochen nach Stentimplantation ergab sich aus folgenden Gründen:

1. Die Ausbildung der Neointima sollte bereits ausreichend vorangeschritten sein.

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, verläuft die Entwicklung der ISR innerhalb von Monaten. In der frühen Phase, welche von Tagen bis Wochen reicht, spielt vor allem die Inflammation die Hauptrolle, während in der späten Phase innerhalb der folgenden Wochen und Monate die intimale Hyperplasie und die Migration der glatten Muskelzellen dominieren.⁸¹ Bei dem gewählten Zeitpunkt von sechs Wochen überschneiden sich diese Phasen. Letztendlich entscheidend ist jedoch der Erfolg gemessen an der Reduktion der ISR durch Inhibition des Trpv4-Kanals. Die Behandlung mit Ruthenium Rot wurde durch die schlechte Löslichkeit einer ausreichend hohen Dosis in Ethanol für eine systemische Wirkung limitiert.

2. Die Größe der Schweine musste aus praktischen Gründen zu bewältigen bleiben.

Nach sechs Wochen wiegen die mittlerweile 14 Wochen alten Schweine in der Regel um die 45 kg. Weitere Größen- und Gewichtszunahme würde ein zu großes Unfallrisiko für Tier und Mensch mit sich bringen.

In der mit 4 α PDD behandelten Gruppe zeigte sich eine um 20% signifikant gesteigerte Restenosefläche im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe. Bei etwa gleichem Ausgangslumen resultierte nach sechs Wochen ein auf ca. 45 % reduziertes Residualvolumen in der 4 α PDD-Gruppe, während in der Kontrollgruppe eine Verengung auf ca. 55 % gemessen wurde. Dabei sind sowohl die Neointima als auch die Media in beiden Gruppen im Verhältnis 75 % (Intima) zu 25 % (Media) beteiligt. In der 4 α PDD-Gruppe ist die Media um ca. 28 %, die Intima um ca. 23 % stärker als in der Kontrollgruppe. Das deckt sich mit der Hypothese, dass NLSS zu einer verstärkten Proliferation und Migration glatter Muskelzellen führt (s. Kap. 1.4).

Der Grad der Inflammation und Verletzung sind in beiden Gruppen vergleichbar und lassen den Schluss zu, dass der entscheidende Unterschied tatsächlich durch die Agonisierung des mechanosensitiven Trpv4-Kanals bewirkt wurde. Daraus folgt, dass die Inhibition des Kanals womöglich zu einer klinisch relevanten Reduktion der ISR führen könnte. Damit stände neben der Inhibition der Thrombozytenaggregation und

der Inflammation ein weiterer Ansatz zur Verfügung, den Erfolg der Stentimplantation langfristig zu garantieren.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dem vorliegenden Projekt konnte der Zusammenhang zwischen Genexpression und nichtlaminarer Strömung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Insbesondere für die Gene NFATc1, c-jun, ICAM-1 und VCAM-1 kommt *in vitro* eine Trpv-4-abhängige Transkription in Betracht, während für die Expression der übrigen untersuchten Gene vorrangig andere molekularbiologische Mechanismen diskutiert werden müssen. *In vivo* dagegen konnte für Trpv4, NFATc1, Calcineurin, c-fos, CREB2 und ICAM-1 eine signifikant gesteigerte Expression nach Stentimplantation nachgewiesen werden. Die chemische Trpv4-Aktivierung nach Stentimplantation bewirkt eine Steigerung der Fläche der Instent-Restenose um 20 %.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit *in vivo* wurde einerseits der gesamte Stent durch die Applikation von 4 α PDD einer Trpv4-Aktivierung ausgesetzt und andererseits die Genexpression *in toto* erfasst. Die immunhistochemische Untersuchung umfasste lediglich einzelne Abschnitte einer gestenteten Koronararterie. Dadurch konnte es nicht gelingen, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem maschenstrukturbedingten Schubspannungsprofil und vaskulärer Trpv4-Expression herzustellen. Aus den computergestützten Analysen des Strömungsprofils innerhalb von Stents (s. Kap. 1.4.2) geht jedoch hervor, dass je nach Maschenstruktur starke Schwankungen der Schubspannungsgradienten bereits auf Strutebene existieren. Daher wäre die immunhistochemische Darstellung ausgewählter Genprodukte, z. B. der Proteine der in den vorliegenden Untersuchungen gesteigert transkribierten Gene, einer vollständigen Koronararterie nach Stentimplantation ein mögliches Verfahren die strutabhängigen lokalen Veränderungen der Proteinsynthese abzubilden. Zusätzlich könnte die Anwendung weiterer Methoden, insbesondere eines separaten Western Blots von zytoplasmatischer und nukleärer Fraktion, über Trpv4-abhängige Signalwege nach Stentimplantation Aufschluss geben.

Die beschriebenen Ergebnisse eröffnen einen vielversprechenden Ansatz zur Erforschung vaskulärer Pathologien aufgrund von nichtlaminaren Strömungen wie der Instent-Restenose. Aufgrund der geringen Gruppengrößen sind die Resultate allerdings als Tendenz zu werten, auf deren Basis weitere Studien entwickelt werden können.

5 Zusammenfassung

“Trpv4-abhängige Regulation der endothelialen Genexpression in einem nichtlaminaren Strömungsmodell sowie der neointimalen Proliferation nach Stentimplantation“

In dem vorliegenden Projekt wurde die Expression der Gene Trpv4, NFATc1, Calcineurin, MEF2c, c-jun, c-fos, CREB1, CREB2, ICAM-1 und VCAM-1 in Abhängigkeit von nichtlaminarer Strömung untersucht. Diese steht im Gegensatz zur laminaren Strömung und wird im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen des Gefäßsystems, wie der Instent-Restenose oder Arteriosklerose, diskutiert.

Die Erzeugung nichtlaminarer Schubspannung *in vitro* erfolgte durch Einsatz eines Strömungsmodells, in welchem porcine Aortenendothelzellen für 3, 18 und 48 Stunden zyklischen Bewegungen des Kulturmediums ausgesetzt wurden. Um einen Zusammenhang zwischen Trpv4-Aktivierung und der Expression genannter Gene zu ermitteln, wurde das Experiment unter Trpv4-Inhibition mittels Ruthenium Rot wiederholt. *In vivo* wurden unbeschichtete Stents in porcine Koronararterien implantiert. Die Genexpression wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Außerdem erfolgte im Bereich der gestenteten Koronararterien eine immunhistochemische Markierung der Proteine Trpv4, NFATc1 und pNFATc1 sowie CREB1. Des Weiteren wurde in einem porcinen Großtierprojekt die koronare Instent-Restenose nach Gabe von 4 α PDD, einem Trpv4-Aktivator, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt.

Die endotheliale Expression aller untersuchten Gene zeigte sich durch die erzeugte nichtlaminare Strömung *in vitro* beeinflussbar. Allerdings ließ sich die Verbindung zum Trpv4-Kanal aufgrund der bereits unter statischen Bedingungen festgestellten Expressionsunterschiede nicht mit Sicherheit nachweisen. Die Gentranskription von NFATc1, ICAM-1, VCAM-1 und c-jun war unter Einsatz von Ruthenium Rot vermindert. Bei Trpv4 und MEF2c war im Vergleich zur behandelten Gruppe die Expression in der unbehandelten Gruppe dagegen reduziert. Die übrigen Gene (c-fos, calcineurin, CREB1 und CREB2) wiesen ein unregelmäßiges Expressionsmuster auf.

In der Analyse der Genexpression in gestenteten Koronararterien konnte für Trpv4, NFATc1, Calcineurin, CREB2, c-fos und ICAM-1 im Vergleich zur ungestenteten Kontrollkoronararterie eine erhöhte Transkription ermittelt werden, im Gegensatz zu MEF2C und CREB1, die keine Veränderung der Expression aufwiesen sowie zu c-jun, das sogar eine vorübergehende Downregulation zeigte.

In der histomorphometrischen Analyse gestenteter Koronararterien zeigte sich nach Behandlung mit 4 α PDD eine Steigerung der In-stent-Restenose von 20 % im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Ergebnis legt nahe, dass neben inflammatorischen Prozessen auch eine Trpv4-Aktivierung an der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen im Rahmen eines neointimalen Wachstums beteiligt sein könnte.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann man schlussfolgern, dass nichtlaminare Strömung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Einfluss auf die endotheliale Gentranskription ausübt. Im Vergleich mit anderen Publikationen wurde die These, dass nichtlaminare und laminare Strömungen unterschiedliche biologische Folgen haben und insbesondere erstere für klinisch relevante pathologische Prozesse verantwortlich sind, bestärkt. Das Transkriptionsprofil von NFATc1, c-jun, ICAM-1 und VCAM-1 deutet auf einen Trpv4-bedingten Kalziumeinstrom *in vitro* hin.

Aufgrund der Tatsache, dass Trpv4 verstärkend im Rahmen der Neointimaproliferation wirkt, ist eine Behandlung nach Stentimplantation mit chemischen Inhibitoren von Trpv4 als eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung der In-stent-Restenose denkbar.

Summary

“Trpv4-dependent regulation of endothelial gene expression in a non-laminar flow model as well as of the neointimal proliferation after stent implantation.”

This project investigated the expression of the genes Trpv4, NFATc1, calcineurin, MEF2C, c-jun, c-fos, CREB1, CREB2, ICAM-1 and VCAM-1, depending on a non-laminar flow. Non-laminar flow is in contrast to laminar flow, and is discussed to be related to pathological processes of the vasculature, such as atherosclerosis and in-stent restenosis.

Non-laminar shear stress *in vitro* was successfully established by a flow model of porcine aortic endothelial cells, being exposed to cyclical movements of media for 3, 18 and 48 hours. To confirm a relationship between Trpv4-activation and the expression of its downstream targets (listed above), the experiment was repeated under Trpv4-inhibition by ruthenium red. *In vivo* bare metal stents were implanted in porcine coronary arteries. Gene expression was analyzed by quantitative real-time PCR. Additionally, immunohistochemical analysis including staining for the proteins Trpv4, NFATc1, pNFATc1 and CREB1 was done in the region of stented coronary arteries.

Furthermore, in a porcine model of stenting, the coronary in-stent restenosis was determined after application of 4 α PDD, a Trpv4-activator, in comparison to the untreated control.

The endothelial gene expression was shown to be influenced by non-laminar flow *in vitro*. However, a relation to the Trpv4 channel could not be verified definitely, due to differences in expression ascertained under static conditions. The gene transcription of NFATc1, ICAM-1, VCAM-1 and c-jun was reduced with the use of ruthenium red. In contrast, compared the expression of Trpv4 and MEF2c was reduced in the control group compared with the treated group. The remaining genes (CREB1, CREB2, calcineurin, c-fos) showed an irregular pattern of expression.

In stented coronary arteries Trpv4, NFATc1, calcineurin, CREB2, c-fos and ICAM-1 showed an increased expression compared to the unstented controls. In contrast, for MEF2C and CREB1 no difference in expression could be demonstrated. C-jun showed a transient downregulation.

In the histomorphometric analysis of stented coronary arteries a 20% rise of in-stent restosis was shown after treatment with 4 α PDD in comparison to the untreated control.

These results suggest that a Trpv4-activation is involved in the proliferation and migration of smooth muscle cells regarding the neointimal growth after stenting. Based on the results of this study it can be conclude that non-laminar flow has an influence on the endothelial gene transcription of both *in vitro* and *in vivo*.

The thesis, that non-laminar and laminar flow have different biological effects and especially non-laminar flow is responsible for clinically relevant pathological processes, could be reinforced. *In vitro* the gene transcription profile of NFAT, c-jun, ICAM-1 and VCAM-1 points to a Trpv4-dependent calcium-signalling in presence of non-laminar flow. The treatment with chemical Trpv4 -inhibitors after coronary stent implantation might be a valuable option to reduce the rate of instent restenosis.

6 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| A. | Arterie, <i>lat.</i> arteria |
| Abb. | Abbildung |
| AP1 | <i>engl.</i> : activator protein one |
| ATF | <i>engl.</i> : activating transcription factor |
| BMK1 | <i>engl.</i> : big MAPK 1 |
| BMS | unbeschichteter Stent, <i>engl.</i> : bare metal stent |
| CaM | Calmodulin |
| CaMKII | Kalzium-Calmodulin-abh. Kinase Typ II |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| CBP | CREB-bindendes Protein |
| CREB | <i>engl.</i> : cAMP response element-binding |
| DES | beschichteter Stent, <i>engl.</i> : drug eluting stent |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA / DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| EC | Endothelzelle, <i>engl.</i> : endothelial cell |
| ECM | extrazelluläre Matrix, <i>engl.</i> : extracellular matrix |
| FCS | <i>engl.</i> : fetal calf (or bovine) serum |
| ICAM-1 | <i>engl.</i> : intercellular adhesion molecule one |
| ISR | Instent-Restenose, <i>engl.</i> : in-stent restenosis |
| Kap. | Kapitel |
| LAD | Ast der linken Koronararterie (RIVA), <i>engl.</i> : left anterior descending |
| LAST | <i>engl.</i> : late angiographic stent thrombosis |
| LEE | <i>lat.</i> : lamina elastica externa |
| LEI | <i>lat.</i> : lamina elastica interna |
| M | molar |
| MAPK | <i>engl.</i> : mitogen-activated protein kinase |
| MEF2C | <i>engl.</i> : myocyte-specific enhancer factor 2C |
| NFAT | <i>engl.</i> : nuclear factor of activated T-cells |
| NLSS | nichtlaminare Schubspannung, <i>engl.</i> : non-laminar shear stress |
| NO | Stickstoffmonoxid, <i>engl.</i> : nitric oxide |

| | |
|-----------|---|
| PAEC | porcine Aortenendothelzellen, <i>engl.:</i> porcine aorta endothelial cells |
| PBS | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PKA / PKC | Proteinkinase A bzw. C |
| PTCA | perkutane transluminale koronare Angioplastie, <i>engl.:</i> percutaneous coronary intervention (PCI) |
| RCA | rechte Koronararterie, <i>engl.:</i> right coronary artery |
| RCX | Ast der linken Koronararterie, <i>lat.:</i> ramus circumflexus |
| RIVA | Ast der linken Koronararteriem (LAD), <i>lat.:</i> ramus interventricularis anterior |
| rpm | Umdrehungen pro Minute, <i>engl.:</i> rounds per minute |
| RS | Restenose, <i>engl.:</i> restenosis |
| SMC | glatte Muskelzelle, <i>engl.:</i> smooth muscle cell |
| s. u. | siehe unten |
| Tab. | Tabelle |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TRP | <i>engl.:</i> transient receptor potential |
| Trpv4 | <i>engl.:</i> transient receptor potential channel, type vanilloid, member 4 |
| VCAM-1 | <i>engl.:</i> vascular cell adhesion protein one |
| VSMC | glatte Gefäßmuskelzelle, <i>engl.:</i> vascular smooth muscle cell |
| WSS | Wandschubspannung, <i>engl.:</i> wall shear stress |
| z. B. | zum Beispiel |

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der vaskulären Anatomie | 2 |
| Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der hämorrhologischen Faktoren | 5 |
| Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines laminaren (I) und turbulenten (II) Flussprofils | 5 |
| Abbildung 1.4: Zeitliche Abfolge der wichtigsten Prozesse der Restenose | 12 |
| Abbildung 1.5: Wandschubspannungsprofil innerhalb eines Stents | 17 |
| Abbildung 1.6: Wandschubspannungsprofil unterschiedlicher Stenttypen | 17 |
| Abbildung 1.7: Computergestützte Simulation des Oberflächen-profils nach Stentimplantation | 18 |
| Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Struktur von Trpv4 | 24 |
| Abbildung 1.9 Qualitäten der Schubspannung in Blutgefäßen: | 26 |
| Abbildung 1.10: Hypothese kalziumabhängiger Signalwege in Endothelzellen durch Wandschubspannung | 32 |
| Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Strömungsmodells | 36 |
| Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines Genie-Ballonkatheters | 39 |
| Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Genie-Ballonkatheters | 40 |
| Abbildung 2.4: Verfahren der Immunfluoreszenz | 50 |
| Abbildung 2.5: Verletzungs- und Entzündungsindex | 53 |
| Abbildung 2.6: Histomorphometrische Analyse gestenteter Koronararterien | 54 |
| Abbildung 3.1: Immunfluoreszenzfärbung von Trpv4 | 68 |
| Abbildung 3.2: Immunfluoreszenzfärbung von pNFATc1 | 69 |
| Abbildung 3.3: Immunfluoreszenzfärbung von NFATc1 | 70 |
| Abbildung 3.4: Immunfluoreszenzfärbung von CREB-1 | 71 |
| Abbildung 3.5: Immunfluoreszenzfärbung einer Strutnische | 72 |
| | |
| Tabelle 2.1: Versuchsplan des Großtiermodells | 37 |
| Tabelle 2.2: Standardpipettierprotokoll Teil 1 der Reversen Transkription | 43 |
| Tabelle 2.3: Standardpipettierprotokoll Teil 2 der Reversen Transkription | 43 |
| Tabelle 2.4: Standardpipettierprotokoll für 25 µl qRT-PCR-Ansatz | 46 |
| Tabelle 2.5: Färbeprotokoll für Trpv4, NFATc1, CREB1, BS-1 und αSMA | 48 |
| Tabelle 2.6: Einbettung von gestenteten Koronararterien in Methacrylat | 51 |
| Tabelle 3.1: Genexpression statisch und unter Strömung kultivierter PAEC | 59 |
| Tabelle 3.2: Genexpression statisch kultivierter PAEC | 62 |
| Tabelle 3.3: Genexpression nach Stentimplantation | 66 |
| Tabelle 3.4: Histomorphologische Ergebnisse | 75 |
| Tabelle 9.1: Operationszubehör - Medikamente und Chemikalien | 108 |
| Tabelle 9.2: Operationszubehör – Geräte | 109 |
| Tabelle 9.3: Operationszubehör – Verbrauchsmaterialien | 109 |
| Tabelle 9.4: Laborzubehör – Geräte | 110 |
| Tabelle 9.5: Laborzubehör - Chemikalien und Reagenzien | 111 |

| | |
|---|-----|
| Tabelle 9.6: Laborzubehör – Verbrauchsmaterialien | 112 |
| Tabelle 9.7: Medien und Zusätze für die Zellkultur | 112 |
| Tabelle 9.8: Antikörper - Primärantikörper für Immunfluoreszenz | 113 |
| Tabelle 9.9: Antikörper - Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz | 113 |
| Tabelle 9.10: Antikörper - flouorchrommarkiertes Detektionssystem für biotinylierte Sekundärantikörper | 113 |
| Tabelle 9.11: Primer-Oligonukleotide für RT-PCR | 114 |
| Tabelle 9.12: EDV-Programme | 115 |

8 Literaturverzeichnis

1. Ando J, Tsuboi H, Korenaga R, Takada Y, Toyama-Sorimachi N, Miyasaka M, Kamiya A (1994) Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *The American journal of physiology* 267: C679-687
2. Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A (1998) Shear stress and the endothelium. *Kidney international* 67: S100-108
3. Balossino R, Gervaso F, Migliavacca F, Dubini G (2008) Effects of different stent designs on local hemodynamics in stented arteries. *Journal of biomechanics* 41: 1053-1061
4. Barakat AI, Leaver EV, Pappone PA, Davies PF (1999) A flow-activated chloride-selective membrane current in vascular endothelial cells. *Circulation research* 85: 820-828
5. Barlow CA, Shukla A, Mossman BT, Lounsbury KM (2006) Oxidant-mediated cAMP response element binding protein activation: calcium regulation and role in apoptosis of lung epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 34: 7-14
6. Bayata S, Arikan E, Yesil M, Postaci N, Tas A, Koseoglu M (2010) An important role for VCAM-1, but not for ICAM-1 in restenosis following coronary stent implantation. *Anadolu Kardiyol Derg* 10: 405-409
7. Bennett MR (2003) In-stent stenosis: pathology and implications for the development of drug eluting stents. *Heart (British Cardiac Society)* 89: 218-224
8. Bergh N, Ekman M, Ulfhammer E, Andersson M, Karlsson L, Jern S (2005) A new biomechanical perfusion system for ex vivo study of small biological intact vessels. *Annals of biomedical engineering* 33: 1808-1818
9. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature* 395: 645-648
10. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews* 1: 11-21
11. Berry JL, Santamarina A, Moore JE, Jr., Roychowdhury S, Routh WD (2000) Experimental and computational flow evaluation of coronary stents. *Annals of biomedical engineering* 28: 386-398
12. Bhullar IS, Li YS, Miao H, Zandi E, Kim M, Shyy JY, Chien S (1998) Fluid shear stress activation of I κ B kinase is integrin-dependent. *The Journal of biological chemistry* 273: 30544-30549
13. Blais JD, Filipenko V, Bi M, Harding HP, Ron D, Koumenis C, Wouters BG, Bell JC (2004) Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Molecular and cellular biology* 24: 7469-7482
14. Boo YC (2006) Shear stress stimulates phosphorylation of protein kinase A substrate proteins including endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Experimental & molecular medicine* 38: 63-71

15. Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM (2002) Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiological genomics* 9: 27-41
16. Bult H (2000) Restenosis: a challenge for pharmacology. *Trends in pharmacological sciences* 21: 274-279
17. Burpee J, Beach B, Griffin J (2010) Flexible Stenting Solutions, <http://www.flexiblestent.com/>.
18. Carlier SG, van Damme LC, Blommerde CP, Wentzel JJ, van Langehove G, Verheye S, Kockx MM, Knaapen MW, Cheng C, Gijssen F, Duncker DJ, Stergiopoulos N, Slager CJ, Serruys PW, Krams R (2003) Augmentation of wall shear stress inhibits neointimal hyperplasia after stent implantation: inhibition through reduction of inflammation? *Circulation* 107: 2741-2746
19. Carter AJ, Wei W, Gibson L, Collingwood R, Tio F, Dooley J, Kopia GA (2005) Segmental vessel wall shear stress and neointimal formation after sirolimus-eluting stent implantation: physiological insights in a porcine coronary model. *Cardiovasc Revasc Med* 6: 58-64
20. Chawla S, Hardingham GE, Quinn DR, Bading H (1998) CBP: a signal-regulated transcriptional coactivator controlled by nuclear calcium and CaM kinase IV. *Science* (New York, NY 281: 1505-1509
21. Chawla S, Bading H (2001) CREB/CBP and SRE-interacting transcriptional regulators are fast on-off switches: duration of calcium transients specifies the magnitude of transcriptional responses. *Journal of neurochemistry* 79: 849-858
22. Chen JP (2007) Late angiographic stent thrombosis (LAST): the cloud behind the drug-eluting stent silver lining? *The Journal of invasive cardiology* 19: 395-400
23. Chien S, Li S, Shyy YJ (1998) Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension* 31: 162-169
24. Chiu YJ, Kusano K, Thomas TN, Fujiwara K (2004) Endothelial cell-cell adhesion and mechanosignal transduction. *Endothelium* 11: 59-73
25. Cinamon G, Grabovsky V, Winter E, Franitza S, Feigelson S, Shamri R, Dwir O, Alon R (2001) Novel chemokine functions in lymphocyte migration through vascular endothelium under shear flow. *Journal of leukocyte biology* 69: 860-866
26. Cotran RS KV, Robbins SL (eds) (2004) Hemodynamic disorders, Thromboembolic Disease, and Shock. "Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease" 7th Ed: S.124-135
27. Cotran RS KV, Robbins SL (eds) (2004) Blood Vessels
28. Crabtree GR (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96: 611-614
29. Crabtree GR, Olson EN (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl: S67-79
30. Cunningham KS, Gotlieb AI (2005) The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85: 9-23

31. Damann N, Voets T, Nilius B (2008) TRPs in our senses. *Curr Biol* 18: R880-889
32. Dardik A, Chen L, Frattini J, Asada H, Aziz F, Kudo FA, Sumpio BE (2005) Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells. *J Vasc Surg* 41: 869-880
33. Delany NS, Hurle M, Facer P, Alnadaf T, Plumpton C, Kinghorn I, See CG, Costigan M, Anand P, Woolf CJ, Crowther D, Sanseau P, Tate SN (2001) Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiological genomics* 4: 165-174
34. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392: 933-936
35. Dora KA (2010) Coordination of vasomotor responses by the endothelium. *Circ J* 74: 226-232
36. Duza T, Sarelius IH (2004) Localized transient increases in endothelial cell Ca²⁺ in arterioles in situ: implications for coordination of vascular function. *American journal of physiology* 286: H2322-2331
37. DynamicMedical (2006) Local Drug Delivery Balloon.
38. EngineeringSkills (2009) <http://engineeringskills.wdfiles.com/local-files/concepts/turbulent-laminar-profile-pipe>. Math/Science Concepts. Wikidot.com
39. EntrezGene MEF2C myocyte enhancer factor 2C [Homo sapiens]
40. EntrezGene CREB1 cAMP responsive element binding protein 1 [Homo sapiens]
41. EntrezGene TRPV4 transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4 [Homo sapiens]
42. EntrezGene JUN jun proto-oncogene [Homo sapiens].
43. EntrezGene VCAM1 vascular cell adhesion molecule 1 [Homo sapiens].
44. EntrezGene ATF4 activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) [Homo sapiens]
45. EntrezGene ICAM1 intercellular adhesion molecule 1 [Homo sapiens]
46. Erbel R, Haude M, Hopp HW, Franzen D, Rupprecht HJ, Heublein B, Fischer K, de Jaegere P, Serruys P, Rutsch W, Probst P (1998) Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. Restenosis Stent Study Group. *The New England journal of medicine* 339: 1672-1678
47. Faik I, Mongrain R, Leask RL, Rodes-Cabau J, Larose E, Bertrand O (2007) Time-dependent 3D simulations of the hemodynamics in a stented coronary artery. *Biomedical materials (Bristol, England)* 2: S28-37
48. Falcone JC, Kuo L, Meininger GA (1993) Endothelial cell calcium increases during flow-induced dilation in isolated arterioles. *The American journal of physiology* 264: H653-659

49. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, Virmani R (1999) Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 99: 44-52
50. Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R (2003) Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation* 108: 1701-1706
51. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, Detre K, Veltri L, Ricci D, Nobuyoshi M, et al. (1994) A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *The New England journal of medicine* 331: 496-501
52. Fontaine AB, Spigos DG, Eaton G, Das Passos S, Christoforidis G, Khabiri H, Jung S (1994) Stent-induced intimal hyperplasia: are there fundamental differences between flexible and rigid stent designs? *J Vasc Interv Radiol* 5: 739-744
53. Frydrychowicz A, Harloff A, Schlensak C (2007) Flow-Sensitive in-vivo 4D MR Imaging at 3T for the Analysis of Aortic Hemodynamics and Derived Vessel Wall Parameters. *Thieme eJournals Fortschr Röntgenstr* 2007; 179: 463-472 DOI: 10.1055/s-2007-962941 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
54. Fujiwara K, Masuda M, Osawa M, Kano Y, Katoh K (2001) Is PECAM-1 a mechanoresponsive molecule? *Cell structure and function* 26: 11-17
55. Gan L, Doroudi R, Hagg U, Johansson A, Selin-Sjogren L, Jern S (2000) Differential immediate-early gene responses to shear stress and intraluminal pressure in intact human conduit vessels. *FEBS letters* 477: 89-94
56. Garasic JM, Edelman ER, Squire JC, Seifert P, Williams MS, Rogers C (2000) Stent and artery geometry determine intimal thickening independent of arterial injury. *Circulation* 101: 812-818
57. Garcia-Cardena G, Comander J, Anderson KR, Blackman BR, Gimbrone MA, Jr. (2001) Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4478-4485
58. Goicolea Ruigomez JM (2005) [Biomechanical factors: influence on cardiovascular function]. *Revista espanola de cardiologia* 58: 121-125
59. Goldman J, Zhong L, Liu SQ (2007) Negative regulation of vascular smooth muscle cell migration by blood shear stress. *American journal of physiology* 292: H928-938
60. Greenberg ME, Thompson MA, Sheng M (1992) Calcium regulation of immediate early gene transcription. *Journal of physiology, Paris* 86: 99-108
61. Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM (2000) Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *Journal of the American College of Cardiology* 35: 157-163
62. Hagenacker T, Ledwig D, Busselberg D (2008) Feedback mechanisms in the regulation of intracellular calcium ([Ca²⁺]_i) in the peripheral nociceptive system: role of TRPV-1 and pain related receptors. *Cell calcium* 43: 215-227
63. Hamm C (2000) *Edelstahl für das Herz: Stents*.

64. Hartmannsgruber V, Heyken WT, Kacik M, Kaistha A, Grgic I, Harteneck C, Liedtke W, Hoyer J, Kohler R (2007) Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression. *PLoS ONE* 2: e827
65. Hausleiter J, Kastrati A, Mehilli J, Schuhlen H, Pache J, Dotzer F, Sattelberger U, Dirschinger J, Schomig A (2003) Impact of lesion complexity on the capacity of a trial to detect differences in stent performance: results from the ISAR-STEREO trial. *American heart journal* 146: 882-886
66. Helmke BP (2005) Molecular control of cytoskeletal mechanics by hemodynamic forces. *Physiology (Bethesda, Md)* 20: 43-53
67. Helmlinger G, Geiger RV, Schreck S, Nerem RM (1991) Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology. *Journal of biomechanical engineering* 113: 123-131
68. Herbst H, Hübner J-H (2000) *Pathologie-Online*.
69. Herdeg C, Gohring-Frischholz K, Geisler T, May A, Haase KK, Gawaz M (2007) GENIE catheter for liquid local drug delivery. *EuroIntervention* 3: 286-288
70. Hosking BM, Wang SC, Chen SL, Penning S, Koopman P, Muscat GE (2001) SOX18 directly interacts with MEF2C in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 287: 493-500
71. Hoyer J, Kohler R, Distler A (1998) Mechanosensitive Ca²⁺ oscillations and STOC activation in endothelial cells. *Faseb J* 12: 359-366
72. Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580
73. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, Ge L, Sangiorgi GM, Stankovic G, Airolidi F, Chieffo A, Montorfano M, Carlino M, Michev I, Corvaja N, Briguori C, Gerckens U, Grube E, Colombo A (2005) Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *Jama* 293: 2126-2130
74. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circulation research* 85: 199-207
75. Ishida T, Takahashi M, Corson MA, Berk BC (1997) Fluid shear stress-mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses? *Annals of the New York Academy of Sciences* 811: 12-23; discussion 23-14
76. Jo H, Sipos K, Go YM, Law R, Rong J, McDonald JM (1997) Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi₂- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 272: 1395-1401
77. Kahl CR, Means AR (2003) Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocrine reviews* 24: 719-736
78. Kastrati A, Dirschinger J, Boekstegers P, Elezi S, Schuhlen H, Pache J, Steinbeck G, Schmitt C, Ulm K, Neumann FJ, Schomig A (2000) Influence of stent design on 1-year

- outcome after coronary stent placement: a randomized comparison of five stent types in 1,147 unselected patients. *Catheter Cardiovasc Interv* 50: 290-297
79. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Dotzer F, Schuhlen H, Neumann FJ, Fleckenstein M, Pfafferott C, Seyfarth M, Schomig A (2001) Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO) trial. *Circulation* 103: 2816-2821
 80. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Pache J, Ulm K, Schuhlen H, Seyfarth M, Schmitt C, Blasini R, Neumann FJ, Schomig A (2001) Restenosis after coronary placement of various stent types. *The American journal of cardiology* 87: 34-39
 81. Kibos A, Campeanu A, Tintoiu I (2007) Pathophysiology of coronary artery in-stent restenosis. *Acute cardiac care* 9: 111-119
 82. Kilberg MS, Pan YX, Chen H, Leung-Pineda V (2005) Nutritional control of gene expression: how mammalian cells respond to amino acid limitation. *Annual review of nutrition* 25: 59-85
 83. Klemm DJ, Watson PA, Frid MG, Dempsey EC, Schaack J, Colton LA, Nesterova A, Stenmark KR, Reusch JE (2001) cAMP response element-binding protein content is a molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration. *The Journal of biological chemistry* 276: 46132-46141
 84. Köhler R, Heyken WT, Heinau P, Schubert R, Si H, Kacik M, Busch C, Grgic I, Maier T, Hoyer J (2006) Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26: 1495-1502
 85. Kohn EC, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, Liotta LA (1995) Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 1307-1311
 86. Konta T, Bett JH (2003) Patterns of coronary artery movement and the development of coronary atherosclerosis. *Circ J* 67: 846-850
 87. Koutouzis M, Papalois A, Kyrzopoulos S, Dafnomili P, Kyriakides ZS (2008) Restenosis is not associated with stent length in a pig model of coronary stent implantation. *Cardiology journal* 15: 458-462
 88. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S (1985) Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)* 5: 293-302
 89. Kwan HY, Huang Y, Yao X (2007) TRP channels in endothelial function and dysfunction. *Biochimica et biophysica acta* 1772: 907-914
 90. LaDisa JF, Jr., Guler I, Olson LE, Hettrick DA, Kersten JR, Wartier DC, Pagel PS (2003) Three-dimensional computational fluid dynamics modeling of alterations in coronary wall shear stress produced by stent implantation. *Annals of biomedical engineering* 31: 972-980
 91. LaDisa JF, Jr., Olson LE, Guler I, Hettrick DA, Kersten JR, Wartier DC, Pagel PS (2005) Circumferential vascular deformation after stent implantation alters wall shear stress evaluated with time-dependent 3D computational fluid dynamics models. *J Appl Physiol* 98: 947-957

92. LaDisa JF, Jr., Olson LE, Molthen RC, Hettrick DA, Pratt PF, Hardel MD, Kersten JR, Wartier DC, Pagel PS (2005) Alterations in wall shear stress predict sites of neointimal hyperplasia after stent implantation in rabbit iliac arteries. *American journal of physiology* 288: H2465-2475
93. LaDisa JF, Jr., Olson LE, Douglas HA, Wartier DC, Kersten JR, Pagel PS (2006) Alterations in regional vascular geometry produced by theoretical stent implantation influence distributions of wall shear stress: analysis of a curved coronary artery using 3D computational fluid dynamics modeling. *Biomedical engineering online* 5: 40
94. Lan Q, Mercurius KO, Davies PF (1994) Stimulation of transcription factors NF kappa B and AP1 in endothelial cells subjected to shear stress. *Biochemical and biophysical research communications* 201: 950-956
95. Li YS, Shyy JY, Li S, Lee J, Su B, Karin M, Chien S (1996) The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression. *Molecular and cellular biology* 16: 5947-5954
96. Liao D, Lin PH, Yao Q, Chen C (2008) Vascular smooth cell proliferation in perfusion culture of porcine carotid arteries. *Biochemical and biophysical research communications* 372: 668-673
97. Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103: 525-535
98. Lin Q, Lu J, Yanagisawa H, Webb R, Lyons GE, Richardson JA, Olson EN (1998) Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development (Cambridge, England)* 125: 4565-4574
99. Lipowsky HH, Kovalcheck S, Zweifach BW (1978) The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circulation research* 43: 738-749
100. Liu SQ, Goldman J (2001) Role of blood shear stress in the regulation of vascular smooth muscle cell migration. *IEEE transactions on bio-medical engineering* 48: 474-483
101. Lounsbury KM, Hu Q, Ziegelstein RC (2000) Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free radical biology & medicine* 28: 1362-1369
102. Luo S, Baumeister P, Yang S, Abcouwer SF, Lee AS (2003) Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *The Journal of biological chemistry* 278: 37375-37385
103. Maiti D, Xu Z, Duh EJ (2008) Vascular endothelial growth factor induces MEF2C and MEF2-dependent activity in endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 49: 3640-3648
104. Malabanan KP, Khachigian LM (2010) Activation transcription factor-4 and the acute vascular response to injury. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 88: 545-552
105. Malabanan KP, Kanellakis P, Bobik A, Khachigian LM (2008) Activation transcription factor-4 induced by fibroblast growth factor-2 regulates vascular endothelial growth factor-A transcription in vascular smooth muscle cells and mediates intimal thickening in rat arteries following balloon injury. *Circulation research* 103: 378-387

106. Malek AM, Izumo S (1995) Control of endothelial cell gene expression by flow. *Journal of biomechanics* 28: 1515-1528
107. Malek AM, Izumo S (1996) Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *Journal of cell science* 109 (Pt 4): 713-726
108. Malek AM, Alper SL, Izumo S (1999) Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama* 282: 2035-2042
109. Marlin SD, Springer TA (1987) Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51: 813-819
110. Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews* 2: 599-609
111. McCormick SM, Eskin SG, McIntire LV, Teng CL, Lu CM, Russell CG, Chittur KK (2001) DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 8955-8960
112. Mehran R, Dangas G, Abizaid AS, Mintz GS, Lansky AJ, Satler LF, Pichard AD, Kent KM, Stone GW, Leon MB (1999) Angiographic patterns of in-stent restenosis: classification and implications for long-term outcome. *Circulation* 100: 1872-1878
113. Minke B (2010) The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily. *Journal of neurogenetics* 24: 216-233
114. Mishra SK, Hoon MA (2010) Ablation of TrpV1 neurons reveals their selective role in thermal pain sensation. *Molecular and cellular neurosciences* 43: 157-163
115. Montell C (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005: re3
116. Moore J, Jr., Berry JL (2002) Fluid and solid mechanical implications of vascular stenting. *Annals of biomedical engineering* 30: 498-508
117. Moore JE, Jr., Xu C, Glagov S, Zarins CK, Ku DN (1994) Fluid wall shear stress measurements in a model of the human abdominal aorta: oscillatory behavior and relationship to atherosclerosis. *Atherosclerosis* 110: 225-240
118. Morawietz H, Wagner AH, Hecker M, Goettsch W (2008) Endothelin receptor B-mediated induction of c-jun and AP-1 in response to shear stress in human endothelial cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 86: 499-504
119. Morita T, Kurihara H, Maemura K, Yoshizumi M, Nagai R, Yazaki Y (1994) Role of Ca²⁺ and protein kinase C in shear stress-induced actin depolymerization and endothelin 1 gene expression. *Circulation research* 75: 630-636
120. Mott RE, Helmke BP (2007) Mapping the dynamics of shear stress-induced structural changes in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C1616-1626
121. Muller JM, Chilian WM, Davis MJ (1997) Integrin signaling transduces shear stress--dependent vasodilation of coronary arterioles. *Circulation research* 80: 320-326
122. Munaron L (2006) Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 1: 105-119

123. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. (1994) Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 94: 885-891
124. Nagel T, Resnick N, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. (1999) Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19: 1825-1834
125. Nigro P, Abe JI, Berk B (2011) Flow shear stress and atherosclerosis: a matter of site specificity. *Antioxidants & redox signaling*
126. Nilius B, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2004) TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C195-205
127. Olson EN, Perry M, Schulz RA (1995) Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Developmental biology* 172: 2-14
128. Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Schühlen H, Dotzer F, Hausleiter J, Fleckenstein M, Neumann FJ, Sattelberger U, Schmitt C, Müller M, Dirschinger J, Schomig A (2003) Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STERO-2) trial. *Journal of the American College of Cardiology* 41: 1283-1288
129. Peng X, Recchia FA, Byrne BJ, Wittstein IS, Ziegelstein RC, Kass DA (2000) In vitro system to study realistic pulsatile flow and stretch signaling in cultured vascular cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C797-805
130. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45
131. Prevarskaya N, Skryma R, Bidaux G, Flourakis M, Shuba Y (2007) Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell death and differentiation* 14: 1295-1304
132. Pschyrembel (2002) *Klinisches Wörterbuch* 259. Auflage, Berlin, New York
133. Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LC, Wofovitz E (2003) Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Progress in biophysics and molecular biology* 81: 177-199
134. Riessen R, Wight TN, Pastore C, Henley C, Isner JM (1996) Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* 93: 1141-1147
135. Rogers C, Edelman ER (1995) Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation* 91: 2995-3001
136. Rogers C, Welt FG, Karnovsky MJ, Edelman ER (1996) Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits. Coupled inhibitory effects of heparin. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16: 1312-1318
137. Sakamoto N, Ohashi T, Sato M (2006) Effect of fluid shear stress on migration of vascular smooth muscle cells in cocultured model. *Annals of biomedical engineering* 34: 408-415
138. Sanmartin M, Goicolea J, Garcia C, Garcia J, Crespo A, Rodriguez J, Goicolea JM (2006) [Influence of shear stress on in-stent restenosis: in vivo study using 3D

- reconstruction and computational fluid dynamics]. *Revista espanola de cardiologia* 59: 20-27
139. Schmidt R. F. TG, Witzleb E. (1990) *Physiologie des Menschen*, Kapitel 20 "Funktionen des Gefäßsystems", 24.Auflage edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
 140. Schummer W, Seiferle (1984) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band III, 2. Auflage. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
 141. Schwartz RS, Huber KC, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vlietstra RE, Holmes DR (1992) Restenosis and the proportional neointimal response to coronary artery injury: results in a porcine model. *Journal of the American College of Cardiology* 19: 267-274
 142. Seo T, Schachter LG, Barakat AI (2005) Computational study of fluid mechanical disturbance induced by endovascular stents. *Annals of biomedical engineering* 33: 444-456
 143. Shay-Salit A, Shushy M, Wolfovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, Resnick N (2002) VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9462-9467
 144. Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annual review of biochemistry* 68: 821-861
 145. Shore P, Sharrocks AD (1995) The MADS-box family of transcription factors. *European journal of biochemistry / FEBS* 229: 1-13
 146. Shyy JY, Chien S (2002) Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circulation research* 91: 769-775
 147. Spinsanti G, Zannolli R, Panti C, Ceccarelli I, Marsili L, Bachiocco V, Frati F, Aloisi AM (2008) Quantitative Real-Time PCR detection of TRPV1-4 gene expression in human leukocytes from healthy and hyposensitive subjects. *Molecular pain* 4: 51
 148. Sprague EA, Luo J, Palmaz JC (1997) Human aortic endothelial cell migration onto stent surfaces under static and flow conditions. *J Vasc Interv Radiol* 8: 83-92
 149. Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nature cell biology* 2: 695-702
 150. Sucusky P, Balachandran K, Elhammali A, Jo H, Yoganathan AP (2009) Altered shear stress stimulates upregulation of endothelial VCAM-1 and ICAM-1 in a BMP-4- and TGF-beta1-dependent pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29: 254-260
 151. Surowiec SM, Conklin BS, Li JS, Lin PH, Weiss VJ, Lumsden AB, Chen C (2000) A new perfusion culture system used to study human vein. *The Journal of surgical research* 88: 34-41
 152. Tominaga R, Harasaki H, Sutton C, Emoto H, Kambic H, Hollman J (1993) Effects of stent design and serum cholesterol level on the restenosis rate in atherosclerotic rabbits. *American heart journal* 126: 1049-1058

153. Touchard AG, Schwartz RS (2006) Preclinical restenosis models: challenges and successes. *Toxicologic pathology* 34: 11-18
154. Troidl C, Nef H, Voss S, Schilp A, Kostin S, Troidl K, Szardien S, Rolf A, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Hamm CW, Elsasser A, Mollmann H (2010) Calcium-dependent signalling is essential during collateral growth in the pig hind limb-ischemia model. *Journal of molecular and cellular cardiology* 49: 142-151
155. Troidl C, Troidl K, Schierling W, Cai WJ, Nef H, Mollmann H, Kostin S, Hammer L, Elsasser A, Schmitz-Rixen T, Schaper W (2008) Trpv4 induces collateral vessel growth during regeneration of the arterial circulation. *Journal of cellular and molecular medicine*
156. Voets T, Prenen J, Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Wissenbach U, Bodding M, Droogmans G, Nilius B (2002) Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *The Journal of biological chemistry* 277: 33704-33710
157. Vriens J, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Nilius B (2007) Determinants of 4 alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4. *The Journal of biological chemistry* 282: 12796-12803
158. Wang HQ, Huang LX, Qu MJ, Yan ZQ, Liu B, Shen BR, Jiang ZL (2006) Shear stress protects against endothelial regulation of vascular smooth muscle cell migration in a coculture system. *Endothelium* 13: 171-180
159. Wasserman SM, Topper JN (2004) Adaptation of the endothelium to fluid flow: in vitro analyses of gene expression and in vivo implications. *Vascular medicine (London, England)* 9: 35-45
160. Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B (2002) Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *The Journal of biological chemistry* 277: 13569-13577
161. Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B (2002) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277: 47044-47051
162. Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H (2008) TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacology & therapeutics* 118: 337-351
163. Weintraub WS (2007) The pathophysiology and burden of restenosis. *The American journal of cardiology* 100: 3K-9K
164. Welsch U (2003) *Lehrbuch Histologie, Sobotta, 1. Auflage.* Urban & Fischer Verlag München Jena
165. Wentzel JJ, Krams R, Schuurbiens JC, Oomen JA, Kloet J, van Der Giessen WJ, Serruys PW, Slager CJ (2001) Relationship between neointimal thickness and shear stress after Wallstent implantation in human coronary arteries. *Circulation* 103: 1740-1745
166. Werner FC (1997) *Über die Turbulenz in gerührten Newtonschen und nicht-Newtonschen Fluiden.* Herbert Utz Verlag Wissenschaft, München
167. Wissenbach U, Bodding M, Freichel M, Flockerzi V (2000) Trp12, a novel Trp related protein from kidney. *FEBS letters* 485: 127-134

168. Wohrle J (2007) [Stent thrombosis in the era of drug-eluting stents]. *Herz* 32: 411-418
169. Wootton DM, Ku DN (1999) Fluid mechanics of vascular systems, diseases, and thrombosis. *Annual review of biomedical engineering* 1: 299-329
170. Xu F, Satoh E, Iijima T (2003) Protein kinase C-mediated Ca²⁺ entry in HEK 293 cells transiently expressing human TRPV4. *British journal of pharmacology* 140: 413-421
171. Yan C, Takahashi M, Okuda M, Lee JD, Berk BC (1999) Fluid shear stress stimulates big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) activity in endothelial cells. Dependence on tyrosine kinases and intracellular calcium. *The Journal of biological chemistry* 274: 143-150
172. Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW (2005) ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood* 106: 584-592
173. Yao X, Garland CJ (2005) Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels. *Circulation research* 97: 853-863
174. Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S (1983) Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circulation research* 53: 502-514
175. Zhang DX, Mendoza SA, Bubolz AH, Mizuno A, Ge ZD, Li R, Wartier DC, Suzuki M, Gutterman DD (2009) Transient receptor potential vanilloid type 4-deficient mice exhibit impaired endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in vitro and in vivo. *Hypertension* 53: 532-538
176. Ziegler T, Bouzourene K, Harrison VJ, Brunner HR, Hayoz D (1998) Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 18: 686-692
177. Zou Y, Hu Y, Metzler B, Xu Q (1998) Signal transduction in arteriosclerosis: mechanical stress-activated MAP kinases in vascular smooth muscle cells (review). *International journal of molecular medicine* 1: 827-834

9 Anhang

9.1 Operationszubehör

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

Tabelle 9.1: Operationszubehör - Medikamente und Chemikalien

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| Autoklav V-65 | Systec, Wettenberg |
| C-Bogen (Siremobil Compact) | Siemens, München |
| Kapnograph mit Pulsoximeter (Capnox) | Medlab GmbH, Karlsruhe |
| Monitoring-System (Siemens Sirecust 1281) | Siemens, München |
| Oxylog 3000 | Dräger Medical GmbH, Lübeck |
| Perfusor („GENIE“ Syringe Pump) | Ken Scientific Corp., Connecticut, USA |

Tabelle 9.2: Operationszubehör - Geräte

| Material | Hersteller |
|--|-------------------------------------|
| 3-Wege-Hahn (Discofix®) | B.Braun AG, Melsungen |
| 5F- und 7F-Schleuse | Cordis Corporation, Miami, USA |
| 7F-Swan-Ganz-Thermodilutionskatheter | Edwards Lifesciences, Irvine, USA |
| Arterieller Katheter (Arterial Line Kit) | Argon Medical Devices, Texas, USA |
| bare metal Stent Yukon®Choice4 (Ø 3,5 mm) | Translumina, Hechingen |
| Ballonkatheter Cathy n°4 (Ø 3,5 mm) | Translumina, Hechingen |
| Ballonkatheter Genie™ Local Drug Delivery | Acrostat Corp., Winterthur, Schweiz |
| Führungsdraht | Smiths Medical GmbH, Kirchseeon |
| Hautdesinfizienz (Cutasept® G) | Bode Chemie, Hamburg |
| HME-Beatmungsfilter (Medisize® Hygrovent S) | Medisize, Hillegom, NL |
| Katheter 5 F | Cordis Corporation, Miami, USA |
| Nahtmaterial (Prolene 2-0, 4-0, 7-0; Vinyl 2-0) | Ethicon GmbH, Norderstedt |

Tabelle 9.3: Operationszubehör - Verbrauchsmaterialien

9.2 Laborzubehör

| Gerät | Hersteller |
|---|--|
| 7500 Real Time PCR System | Applied Biosystems, Foster City, CA, USA |
| CCD imager (Appendix D ChemiDoc XRS) | Bio-Rad, München |
| Digitalkamera Leica DFC 300 FX | Leica Microsystems GmbH, Bensheim |
| Gefriermikrotom Kryostat CM 3050 S | Leica Microsystems GmbH, Bensheim |
| Inkubator Hera Cell 150 | Thermo scientific |
| Konfokales Laser Scanning-Mikroskop TCS SP | Leica Microsystems GmbH, Bensheim |
| Kugel-Schwingmühle (Mixer Mill) | Retsch, Haan |
| Lichtmikroskop mit Fluoreszenzvorrichtung DM-RB | Leica Microsystems GmbH, Bensheim |
| Magnetrührer IKAMAG®RH | IKA-Labortechnik, Staufen |
| NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer | PEQLAB, Erlangen |
| pH-Meter inoLab pH 720 | WTW GmbH, Weilheim |
| Sicherheitswerkbank Lamin Air | Heraeus GmbH, Hanau |
| Sterilbank, Microflow | Nunc, Wiesbaden |
| Tischzentrifuge | Eppendorf, Hamburg |
| Waage | Sartorius, Göttingen |
| Wärmeschrank UM 500 | Memmert GmbH, Schwabach |
| Wasserbad | IKA-Labortechnik, Staufen |
| Wippschüttler PMR-30 | Grant Instruments, Cambridgeshire |
| Zentrifuge Rotanta / RPC | Hettich GmbH, Tuttlingen |
| Zentrifuge Sorvall®RC-5B | Kendro, Hamburg |

Tabelle 9.4: Laborzubehör - Geräte

| Chemikalien und Reagenzien | Hersteller |
|--|------------------------------------|
| Aceton | Merck, Darmstadt |
| FCS / DMEM | c. c. pro GmbH, Neustadt |
| Einbettmedium Technovit 7100 (500 ml Flüssigkeit, 5x 1 g Härter I, 40 ml Härter II) | Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim |
| Eindeckmedium (Mowiol 4-88®) | Roth, Karlsruhe |
| Eosin 2 % | Waldeck GmbH, Münster |
| Ethanol >99,8 %, DAB, reinst Ethylalkohol | Roth, Karlsruhe |
| Hämalaun nach Mayer | Waldeck GmbH, Münster |
| HCl | Merck, Darmstadt |
| IQ SYBR Green Supermix | BioRad, München |
| NaCl | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydroxid-Plätzchen | Merck, Darmstadt |
| Paraformaldehyd | Merck, Darmstadt |
| RNeasy minikit® (bestehend aus RLT-, RW1-, RLP-Puffer und Spin-Säulen) | Qiagen GmbH, Hilden |
| Superscript II Reverse Transcriptase (bestehend aus SuperScriptII RT, 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl ₂) und 0.1 M DTT) | Invitrogen, Groningen, Niederlande |
| Tissue Tec | OTC Compound, Miles Inc, USA |
| Toluidinblau | Roth, Karlsruhe |
| Turbo DNasefree® (bestehend aus TURBO DNase Puffer, TURBO DNase und DNase Inaktivierungsreagenz) | Ambion, Austin, USA |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München |

Tabelle 9.5: Laborzubehör - Chemikalien und Reagenzien

| Verbrauchsmaterialien | Hersteller |
|---|---|
| 12- / 48-Well Kultur-Platten | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Cellstar |
| 96-Well PCR-Platten | Biorad, München |
| Abschlussfolie | Parafilm M, American National Can™, Menasha, WI, USA |
| Aluminiumhalterungen | eigene Herstellung |
| Cryo.s | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Einmalpipetten Cellstar (5, 10, 25, 50 ml) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, |
| Objekträger, Deckgläser | Menzel GmbH, Braunschweig |
| Optical Sealing Tape für PCR-Platten | Biorad, München |
| Pasteurpipetten | Carl Roth, Karlsruhe |
| Petrischalen | BD Biosciences, Heidelberg |
| Pipettenspitzen | Eppendorf, Hamburg |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml | Eppendorf, Hamburg |
| ZK 12-Well Platten | BD Biosciences, Heidelberg |
| Zellkulturflaschen Cellstar 75 cm ² , 250 ml | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| Zellkulturschalen Cellstar 100 x 20 mm | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, |
| Zellschaber Cell scraper | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

Tabelle 9.6: Laborzubehör – Verbrauchsmaterialien

| Medium | Konzentration |
|---|---------------|
| DMEM, ohne Glutamin mit 4,5g/L Glukose | |
| + Penicillin / Streptomycin 10.000 E/10 mg/ml | 1% |
| + L-Glutamin 200 mM (100fach) | 1% |
| + Foetales Kälberserum (FCS) | 10% |

Tabelle 9.7: Medien und Zusätze für die Zellkultur

9.3 Antikörper

| Primärantikörper | Klon | Wirt | Hersteller | Konzentration |
|------------------------|----------|---------------------------|--|---------------|
| Trpv4 | Q9ERZ8 | Kaninchen | Alomone Labs | 1 : 100 |
| NFATc1 | K-18 | Kaninchen | Santa Cruz | 1 : 50 |
| pNFAT | pNFAT c1 | Kaninchen | Santa Cruz | 1 : 50 |
| CREB1 | 48H2 | Kaninchen | Sigma | 1 : 400 |
| BS1-TRITC | - | Bandeiraea simplifolia | Sigma | 1 : 100 |
| α SM-Actin-Cy3 | 1A4 | Maus | Sigma | 1 : 300 |
| α SM-Actin-FITC | 1A4 | Maus | Sigma | 1 : 100 |
| DAPI | - | - | Invitrogen, Groningen, Niederlande | 1 : 1000 |
| DRAQ5 | - | - | Biostatus limited | 1 : 1000 |

Tabelle 9.8: Antikörper - Primärantikörper für Immunfluoreszenz

| verwendete Sekundärantikörper | Hersteller | Konzentration |
|--------------------------------------|------------|---------------|
| Biotin-SP-conjugated Anti-Rabbit IgG | Dianova | 1:100 |
| cy3-conjugated Anti-Rabbit IgG | Chemicon | 1:300 |
| cy3-conjugated Anti-Mouse IgG | Chemicon | 1:300 |

Tabelle 9.9: Antikörper - Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

| Name | Emissionsfarbe | Hersteller | Konzentration |
|-----------------------------|----------------|------------|---------------|
| cy2-conjugated Streptavidin | grün | Rockland | 1:100 |
| cy3-conjugated Streptavidin | rot | Rockland | 1:300 |

Tabelle 9.10: Antikörper - fluorochrommarkiertes Detektionssystem für biotinylierte Sekundärantikörper

9.4 Verwendete Primer-Oligonukleotide

| Primer | | Sequenz | annealing-Temp. |
|-------------|-----------|-------------------------------|-----------------|
| Trpv4 | sense | 5'- ACGAGATGCTGGCCGTGGAA -3' | 65°C |
| | antisense | 5'- AGGCTGGTAGTAACGGTGA -3' | |
| NFATc1 | sense | 5'- GAATTCCTTGGTGGTTCGAGA -3' | 58-60°C |
| | antisense | 5'- TGCTGGTACTGGCTCCTCTT -3' | |
| Calcineurin | sense | 5'- GAATCCAACGTGCAAGAGGT -3' | 58-60°C |
| | antisense | 5'- CGTTCACGGTAACGAACCTT -3' | |
| c-jun | sense | 5'- CCCAAGATCCTGAAGCAGAG -3' | 58-60°C |
| | antisense | 5'- GATGTGCCCGTTACTGGACT -3' | |
| c-fos | sense | 5'- AGAATCCGAAGGGAAAGGAA -3' | 58-60°C |
| | antisense | 5'- CTTCTCCTTCAGCAGGTTGG -3' | |
| CREB1 | sense | 5'- TTCAAGCTGCCTCTGGAGAT -3' | 60°C |
| | antisense | 5'- GTGCTGCTTCCCTGTTCTTC -3' | |
| ICAM-1 | sense | 5'- AGCTGTGGTGACACTGAACG -3' | 60°C |
| | antisense | 5'- CACCTGGGTCTGGTTCTTGT -3' | |
| VCAM-1 | sense | 5'- ATCCAAGCTGCTCCAAAAGA -3' | 60°C |
| | antisense | 5'- GGCCCTGTGGATGGTATATG -3' | |
| CREB2 | sense | 5'- CCGCAGATAGTGAACCCAAT -3' | 60°C |
| | antisense | 5'- TCCGAGATTTCCACTTCACC -3' | |
| MEF2C | sense | 5'- GATGAAGAAGGCTTATGAGC -3' | 60°C |
| | antisense | 5'- TCTCATGCGGCTCGTTGTAC -3' | |

Tabelle 9.11: Primer-Oligonukleotide für RT-PCR

9.5 EDV-Programme

| Bezeichnung | Hersteller |
|----------------------|---|
| Textverarbeitung | Microsoft Office, Word 2007® |
| Literaturverwaltung | EndNote® Windows Version X |
| Tabellenkalkulation | Microsoft Office, Excel 2007® |
| Bildbearbeitung | Microsoft Office, PowerPoint 2007® Leica IM 500 Basis Image J, Version 1.35j |
| RT-Software | 7500Software v2.0.3, Applied Biosystems |
| Imager-Software | QuantityOne, Version 4.6.5, BioRad Laboratories GmbH, München |
| Primer-Erstellung | FastPCR 5.4 Professional (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.htm) |
| Blast-Programm | http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi |
| Restriktionsprogramm | NEB-CUTTER V 2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php) WEB-Cutter 2.0 (http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html) |
| Statistik | GraphPadPrism Version 4 |

Tabelle 9.12: EDV-Programme

9.6 Herstellung von Puffern und Lösungen

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 397,4 g NaCl, 10 g KCl, 10 g H₂PO₄ sowie 88,75 g Na₂HPO₄·H₂O mit Aqua dest. auf ein Volumen von 5 l aufgefüllt. Für die Gebrauchslösung wurden 500 ml des Stocks 10fach mit Aqua dest. (ad 5 l) verdünnt und anschließend vorsichtig mit Hilfe einmolarer HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Mowiol 4-88

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

4%ige Formaldehydlösung

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

Aktivierte Basislösung

In 100ml Grundlösung Technovit 7100 wird 1g Härter in einem Becherglas mit Hilfe eines Magnetrührers gelöst.

10 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Den Herren Prof. Dr. med. H. Nef und Prof. Dr. med. H. Möllmann danke ich für die geduldige, herzliche und tatkräftige Bemühung um den Fortgang dieser Arbeit. Insbesondere danke ich Herrn Dr. phil. nat. Chr. Troidl für die Betreuung in labortechnischen Fragen. Herzlicher Dank gebührt auch Frau Dr. med. vet. S. Voß für deren Leitung des Großtiermodells sowie für die Leitung und Unterstützung der immunhistochemischen und histomorphometrischen Untersuchungen.

Ganz besonderer Dank gilt dem Team der experimentellen Kardiologie Bad Nauheim

Moni, Sigrun, Anette und Anett

sowie den Doktoranden

Anna, Melanie, Matthias, Max, Christoph und Franzi

für die einzigartige Arbeitsatmosphäre und bereitwillige Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Brigitte Matzke für deren stete Bemühungen um das Gelingen der immunhistochemischen Untersuchungen.

Allerherzlichsten Dank an meine Eltern für das Ermöglichen des Studiums und an Sara und Friederike, meine treuesten Mitstreiterinnen ab dem ersten Semester.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Matthias und meiner Schwester Saskia, die sich eine Gefrierschritte redlich verdient hat, für die linguistische Beratung.