

Die Rolle des „Actin-binding Rho activating protein“ (Abra) während der Arteriogenese

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

vorgelegt von Dipl.-Ing. (FH) Kerstin Troidl, geb. Uhl
aus Gießen

Gießen 2007

Aus dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung
W.G. Kerckhoff Institut, Abteilung Experimentelle Angiologie,
Bad Nauheim

Direktor:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Braun

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper

2. Gutachter: PD Dr. A. Langheinrich

Tag der Disputation: 05.02.2008

für Ludwig und Paul

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten 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.

Zusammenfassung

Natürliches Wachstum von Kollateralarterien (Arteriogenese), die einen arteriellen Verschluss umgehen, ist entscheidend für die Gewebeerhaltung. Bedauerlicherweise bleibt es in Patienten meist unvollständig. Mit der Aufklärung der grundlegenden Mechanismen der Arteriogenese wird das Ziel verfolgt, dieses Wachstum pharmakologisch zu stimulieren, damit die präformierten Kollateralanastomosen schneller zu funktionstüchtigen Arterien umstrukturiert werden. Kürzlich konnte im Kaninchenmodell gezeigt werden, dass prinzipiell eine vollständige Wiederherstellung der vaskulären Funktion durch die Aufrechterhaltung des initialen Stimulus, der Schubspannung, erreicht werden kann. Das hierfür verwendete Modell – die chirurgische Anlage eines arteriovenösen Shunts zwischen dem distalen Ende der ligierten Femoralarterie und der benachbarten Vene – wurde im Rahmen dieser Arbeit auf die Ratte adaptiert. Ziel dieser Arbeit war es, durch die Entschlüsselung des Expressionsmusters von schubspannungsinduzierten, wachsenden Kollateralarterien, neue Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, welche die Arteriogenese stimulieren.

Dabei wurde das bis zu 16-fach hochregulierte Gen, welches für das „Actin-binding Rho activating protein“ (Abra) kodiert, identifiziert. Der mRNA Expressionsverlauf korreliert mit der Einwirkung der Schubspannung. Entgegen der Literaturmeinung, in der dieses Gen als spezifisch für gestreiften Muskel beschrieben wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl Abra Transkripte mittels *in situ* Hybridisierung als auch das Protein immunhistochemisch in der Gefäßwand lokalisiert.

Um die funktionelle Bedeutung von Abra in der Arteriogenese zu zeigen, wurden rekombinante Adenoviren generiert. Dies waren zum einen Abra überexprimierende Viren und zum anderen solche Viren, die den „knock down“ von Abra über siRNA vermittelten. Es stellte sich heraus, dass die lokale Überexpression *in vivo* durch intra-kollateralen adenoviralem Gentransfer von Abra im einfachen Ligaturmodell die kollaterale Konduktanz um mehr als 60% gegenüber der natürlichen Reaktion verbessert und so die Arteriogenese stimuliert. Die gleichzeitige Schubspannungsstimulation der Arteriogenese mit AV-Shunt und die siRNA-vermittelte Herunterregulierung von Abra verschlechterte dagegen das Kollateralwachstum. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Abra Überexpression in kultivierten glatten Muskelzellen deren Proliferationsaktivität steigert. Mit Abra wurde ein potentieller Mediator der Schubspannung identifiziert, der diesen genbasiert – oder in Zukunft pharmakologisch aktiviert – teilweise ersetzen kann.

Summary

Development of a collateral circulation (arteriogenesis) bypassing an arterial occlusion is important for tissue repair but remains functionally defective in human patients. We have previously shown that chronically elevated fluid shear stress (FSS) by arterio-venous anastomosis (AV-Shunt) in a rabbit hind limb model markedly triggers collateral growth and completely normalized blood flow. The transduction of the mechanical stimulus into a vascular growth response remains unclear.

The aim of this study was a gene profiling approach in order to identify the molecular mechanism of collateral growth. The adaptation of the AV-Shunt model to rats allowed the use of whole genome Microarrays. Here we report 16-fold increased transcription of the stress mediating “actin-binding Rho activating protein” (Abra) during FSS-induced arteriogenesis. In contrast to previously identified restriction of endogenous Abra to cardiac and skeletal muscle it could be demonstrated that Abra is also expressed in blood vessels. mRNA and Protein expression was localized in smooth muscle cells (SMCs) as well as in endothelial cells (ECs). To address the functional implications of Abra to arteriogenesis *in vivo*, its expression was locally modulated by adenoviral gene transfer. Forced over-expression of Abra improved bypass-flow by more than 60 % vs. no treatment after femoral artery ligation. This beneficial effect of elevated FSS could be abolished by a simultaneous siRNA mediated knock-down of Abra. In cultivated cells Abra over-expression stimulated SMC proliferation. These findings suggest that increased FSS leads to increased Abra expression, which triggers collateral growth.

Abra is not structurally related to any of the known angiogenic growth factors but turned out to be necessary and sufficient to improve arteriogenesis and thus giving rise to new therapeutic strategies for the treatment of peripheral and cardiovascular disease.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Wachstum von Blutgefäßen.....	2
1.1.1	Vaskulogenese.....	2
1.1.2	Angiogenese	3
1.1.3	Arteriogenese.....	4
1.1.3.1	Historischer Überblick Kollateralarterien.....	4
1.1.3.2	Morphologie von Kollateralarterien	5
1.1.3.3	Zeitverlauf der Arteriogenese.....	6
1.2	Hämodynamische Kräfte der Blutströmung.....	8
1.3	Schubspannungssensoren und Mechanotransduktion.....	10
1.4	Schubspannung als Trigger der Arteriogenese.....	11
2	Aufgabenstellung.....	13
3	Material und Methoden.....	14
3.1	Material	14
3.1.1	Geräte.....	14
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
3.1.3	Medien und Supplemente für Zellkultur.....	15
3.1.4	Chemikalien, Reagenzien.....	15
3.1.5	Zelllinien	17
3.1.6	Enzyme	17
3.1.7	Antikörper	17
3.1.8	Bakterien	18
3.1.9	Oligonukleotide	18
3.1.10	Plasmide	19
3.1.11	Kits.....	19
3.2	Methoden.....	20
3.2.1	Tiermodelle.....	20
3.2.1.1	Shuntmodell	20
3.2.1.2	Virentransfer	21
3.2.1.3	Kombination von adenoviraler Transfektion mit Shunt.....	21
3.2.1.4	Quantifizierung des kollateralen Flusses im Kaninchen.....	22
3.2.1.5	Angiographische Auswertung.....	23
3.2.2	Probengewinnung.....	23
3.2.3	β -Gaktosidase Reportergennachweis.....	24
3.2.4	Zellkultur	24
3.2.4.1	Kultivierung und Passagieren von Zelllinien.....	24
3.2.4.2	Einfrieren, Lagerung.....	25
3.2.4.3	Bestimmung der Zellzahl	25
3.2.4.4	Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Metafectene.....	25
3.2.4.5	Transduktion von eukaryotischen Zellen mit Adenoviren	25
3.2.4.6	MTT-Assay.....	26
3.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	26
3.2.5.1	RNA-Isolierung aus Gewebe und cDNA Synthese.....	26

3.2.5.2	RNA-Isolierung aus Zellkulturen.....	26
3.2.5.3	Chip-Analyse.....	27
3.2.5.4	Quantitative real-time PCR.....	27
3.2.5.5	siRNA gestützter „knock down“.....	30
3.2.5.6	Klonierung von DNA Fragmenten.....	30
3.2.5.7	Klonierung mit dem Gateway System.....	31
3.2.5.8	Generierung von Adenoviren.....	31
3.2.5.9	<i>In situ</i> Hybridisierung.....	33
3.2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	35
3.2.6.1	Proteinextraktion aus Zellen.....	35
3.2.6.2	SDS-Gelelektrophorese.....	35
3.2.6.3	Western Blot.....	36
3.2.6.4	Generierung eines Abra Antikörpers.....	36
3.2.7	Immunhistochemie.....	37
3.2.7.1	Färbung.....	38
3.2.7.2	Mikroskopie.....	39
3.2.8	Statistik.....	39
4	Ergebnisse.....	40
4.1	AV-Shunt bei der Ratte.....	41
4.2	Microarray Expressionsanalyse und Pathway Analyse.....	42
4.3	Validierung verschiedener Zielgene mit quantitativer real-time PCR.....	46
4.4	Abra Expression im Kaninchenmodell.....	50
4.4.1	Klonierung des Kaninchengens von Abra.....	50
4.5	Charakterisierung der Abra mRNA Expression.....	54
4.6	Lokalisation von Abra in Gefäßen.....	55
4.6.1	<i>In situ</i> Hybridisierung.....	55
4.6.2	Analyse der Abra Expression auf Proteinebene.....	56
4.6.2.1	Spezifität des Antikörpers.....	56
4.6.2.2	Abra Proteinexpression in Kollateralen.....	57
4.7	Abra Überexpression und „knock down“.....	59
4.7.1	Klonierung der Adenoviralen Konstrukte.....	59
4.7.2	Abra Überexpression in Zellen.....	62
4.7.3	Lokaler Adenoviraler Gentransfer <i>in vivo</i>	63
4.7.3.1	Gentransfer von Ad_LacZ.....	64
4.7.3.2	Lokaler adenoviraler Gentransfer von Ad_Abra im Kaninchen.....	66
4.7.4	Funktionalität der siRNA Sequenzen.....	67
4.7.5	Lokaler adenoviraler Gentransfer von Ad_siRNA_Abra.....	68
5	Diskussion.....	69
5.1	Differentiell exprimierte Gene in schubspannungs-induzierter Arteriogenese... 70	
5.1.1	Auswahl und Eignung des AV-Shuntmodells in der Ratte.....	71
5.1.2	Microarray und quantitative RT-PCR.....	73
5.2	Abra (Actin-binding Rho activating protein) in der Literatur.....	75
5.2.1	Abra wird in wachsenden Blutgefäßen verstärkt exprimiert.....	77
5.3	Abra ist ein Mitogen für glatte Muskelzellen.....	78
5.4	Abra stimuliert die Arteriogenese.....	79
5.4.1	Intrakollateraler Gentransfer.....	79
5.4.2	Einfluss der Abra Expression auf die Arteriogenese.....	80

5.4.3	Mögliche Rolle von Abra in der Arteriogenese.....	81
6	Literatur	85
7	Abkürzungsverzeichnis	91
8	Danke.....	94
9	Lebenslauf	95

1 Einleitung

Arterienverschlüsse als eine Komplikation der Arteriosklerose gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Früher auf die Industrieländer beschränkt, hält auch hier die Globalisierung Einzug: Menschen in Schwellenländern sowie der Dritten Welt Staaten leiden gleichermaßen an den Folgen arterieller Schädigung und Gefäßverschlüssen in Form von ischämischen Herzerkrankungen und akutem Myokardinfarkt, Schlaganfall und zerebrovaskulärer Insuffizienz, sowie peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten. In Deutschland belasten vaskuläre und kardiovaskuläre Erkrankungen das Gesundheitssystem mit 35,4 Mrd. € jährlich und stellen somit 15,8 % der Gesamtgesundheitskosten dar (Offizielle Quelle: statistisches Bundesamt, 2006).

Okklusive Gefäßerkrankungen führen in der Peripherie nach dem erstmaligen Auftreten glücklicherweise selten zum Tode, aber die Progression atherosklerotischer Wandläsionen der Herzkranzgefäße haben eine Minderperfusion des Myokards zur Folge und führen zu Angina Pectoris Beschwerden der Patienten. Es besteht das Risiko der Ruptur eines solchen atherosklerotischen Plaques und der akute thrombotische Verschluss des Gefäßes führt oft zum Tod durch Myokardinfarkt.

Lebensgefährlichen arteriellen Verschlusskrankheiten, die Herz und Hirn betreffen, kann vorgebeugt werden und sie können zum Teil therapiert werden. Herzchirurgie (vor allem: Bypass-Chirurgie) und kathetergestützte Revaskularisierung (perkutane transluminale Koronarangioplastie) von Arterien sind zwar effektiv, aber extrem teuer und damit für viele Patienten außerhalb der westlichen Industrieländer unzugänglich. Darüber hinaus beinhalten speziell „Stent“-basierte Therapien das Risiko der Restenose (8-12%). Eine kurative pharmakologische Behandlungsoption wird daher immer noch angestrebt.

Zufällige Beobachtungen bei der Sektion von Verstorbenen, die nie über Herzbeschwerden geklagt hatten und bei denen es auch histologisch keine Zeichen für einen Herzinfarkt gab aber dennoch schwere Veränderungen an ihren Herzkranzgefäßen hatten, illustrierten die erstaunliche Regenerationsfähigkeit des arteriellen Gefäßsystems: kleine präexistente arterioläre Verbindungen (sogenannte Kollateralen) waren zu 25 mal größeren Arterien herangewachsen und hatten das Hindernis der verschlossenen Arterie einfach umgangen.

Die Existenz solcher kleiner arteriolärer Verbindungen im menschlichen Herzen war schon lange bekannt und gut dokumentiert.

Mit der Anwendung der Koronarangiographie am Patienten finden Kliniker manchmal Patienten, die trotz hochgradiger Gefäßstenosen nur minimale Beschwerden haben und auch einen kompletten Gefäßverschluss ohne Infarkt überleben. Diese Patienten wiesen Umgehungskreisläufe auf, die verschlossene Gefäße in der Versorgung des Herzmuskels ersetzen. Solche Gefäße werden als Kollateralgefäße und aufgrund der Parallelen zur chirurgischen Bypassoperation auch „natürliche Bypässe“ genannt.

Dass dieser natürliche Mechanismus nicht öfter genutzt wird, liegt an der Tatsache, dass arteriosklerotische Gefäßveränderungen durch das Auftreten von Thrombosen häufig kompliziert werden. Diese verschließen das Gefäß akut und lassen für den Prozess der Arteriogenese nicht den notwendigen Zeitraum für die Zellteilung. Das Wachstum kann mit dem Krankheitsverlauf nicht mithalten. Darüber hinaus sind die Umgehungskreisläufe nur imstande etwa 40% der Kapazität der verschlossenen Arterie zu ersetzen. Die Arteriogeneseforschung hat mit der Aufklärung der grundlegenden Mechanismen dieses Prozesses das Ziel, letztendlich das Wachstum dieser Umgehungskreisläufe pharmakologisch zu stimulieren, um sie schnell zu voll funktionstüchtigen Arterien zu machen.

1.1 Wachstum von Blutgefäßen

Die notwendige Versorgung von lebendem Gewebe mit Sauerstoff erfolgt über das Blut, welches über Blutgefäße in alle Bereiche des menschlichen Körpers geleitet wird.

Im Organismus verläuft die Entwicklung von Blutgefäßen über mehrere Mechanismen, die als Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese bezeichnet und im Folgenden genauer dargestellt werden.

1.1.1 Vaskulogenese

Das kardiovaskuläre System ist das erste Organ, das sich im Verlaufe der Embryonalentwicklung ausbildet. Bis zur Entwicklung von Herz und Gefäßen wird der Embryo durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Blutgefäße entstehen zunächst durch Vaskulogenese, die die Entwicklung eines primären embryonalen Netzwerkes aus sich *in situ* differenzierenden Angioblasten beschreibt ¹.

Vaskulogenese wurde zunächst als Gefäßwachstum beschrieben, das auf das Embryonalstadium beschränkt ist. In späteren Studien konnte jedoch nachgewiesen werden, dass dieser Typ von Gefäßwachstum auch postnatal vorkommt ². Endotheliale

Progenitorzellen zirkulieren und greifen möglicherweise in das Gefäßwachstum ein ³. Dieser Zelltyp bietet einen Ansatzpunkt für die Entwicklung einer Therapie, die eine Neovaskularisierung zum Ziel hat.

1.1.2 Angiogenese

Angiogenese, die Sprossung von Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen, ist ein Prozess, der sowohl im Embryonalstadium als auch im adulten Organismus z.B. während der Wundheilung ⁴ und des Wachstums von Tumoren abläuft ⁵. Während der Angiogenese können neue Gefäße entweder durch Aussprossung von Endothelzellen, durch die Bildung von transendothelialen Zellbrücken oder durch die Unterteilung eines Gefäßes aufgrund einwandernder periendothelialer Zellen („intussusception“) gebildet werden. Der Hauptstimulus für die Angiogenese ist die Unterversorgung eines Gewebes mit Sauerstoff (Hypoxie). Sie verursacht die Induktion des „hypoxia-inducible-factor-1“ (HIF-1). HIF-1 ist der einzige bekannte in Säugern vorkommende Faktor, der allein aufgrund physiologisch relevanter Grade von Hypoxie vermehrt exprimiert wird. Im Anschluss an den Anstieg von HIF-1 erfolgt der erste morphologisch erkennbare Schritt der Angiogenese, die Gefäßdilatation. Sie wird durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt, das u. a. eine vermehrte Transkription des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) induziert ⁶. VEGF ist ein sezerniertes Mitogen mit angiogenen Eigenschaften und hoher Spezifität für Endothelzellen. VEGF trägt u. a. zum Anstieg der vaskulären Permeabilität aufgrund einer Verminderung der Zell-Adhäsionsmoleküle, wie z. B. des „platelet endothelial cell adhesion molecule-1“ (PECAM-1) und des „vascular endothelial cadherin“ (VE-cadherin) bei und löst Veränderungen in der Zellmembranstruktur durch Induktion verschiedener Kinasen aus. Hierauf folgt die Extravasation von Plasma-Proteinen, die für die auswandernden Endothelzellen eine positive Umgebung schaffen.

Weiterhin ist der Abbau der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran notwendig, damit die sich teilenden Endothelzellen migrieren können. Für die Degradationsprozesse sind Proteasen verantwortlich, vor allem die Matrix-Metallo-Proteasen (MMP). Hier sind vor allem MMP-2, -3 und -9 am Sprossen von Gefäßen beteiligt ⁷.

1.1.3 Arteriogenese

Im Gegensatz zur Vaskulo- und Angiogenese ist die Arteriogenese die Weiterentwicklung schon existierender, also präformierter Gefäße durch Zellproliferation und Umstrukturierung (Remodelling). Arteriogenese findet im adulten Organismus statt, wenn eine Hauptarterie (z.B. Koronar- oder Femoralarterie) akut oder chronisch stenosiert ist und der Blutfluss durch natürliche Umgehungskreisläufe wiederhergestellt wird.

Die Mechanismen der Arteriogenese, die zunächst für das koronare Gefäßsystem des Herzens beschrieben wurden, gelten auch in der Gefäßperipherie und im Gehirn ^{8,9}. Untersuchungen an Mäusen ¹⁰, Ratten ¹¹, Kaninchen ¹² und Schweinen ^{13,14} zeigten, dass der Mechanismus der Arteriogenese speziesübergreifend ist.

1.1.3.1 Historischer Überblick Kollateralarterien

Die Existenz kollateralarterieller Verbindungen zwischen zwei unterschiedlichen Gefäßterritorien wurde erstmals im 17. Jahrhundert von Lower beschrieben.

Schließlich legten Longland in der Peripherie und Fulton im Bereich der Koronarzirkulation zweifelsfrei dar, dass arterielle Stromgebiete durch Kollateralen miteinander in Verbindung stehen ¹⁶. Letzterer konnte post mortem zeigen, dass sich unabhängig von einer bestehenden okklusiven Gefäßerkrankung zahlreiche Kollateralarterien im Herzen befinden.

Dass sich Kollateralarterien nach Verschluss eines Gefäßes nicht nur durch Vasodilatation im Durchmesser vergrößern, sondern aktiv proliferieren, konnte erstmals von Schaper Anfang der 70er Jahre demonstriert werden ¹⁷. Er war es auch, der den Begriff *Arteriogenese* für das aktive Größenwachstum von präexistenten kollateralen Arteriolen in Abgrenzung zum Begriff der Angiogenese einführte ¹⁸ (Tabelle 1).

	Angiogenese	Arteriogenese
Definition	Sprossung von neuen Kapillaren aus bestehenden Gefäßen	Wachstum von präexistierenden Arteriolen zu Kollateralarterien
Sauerstoffstatus	Hypoxie	Normoxie
Trigger	Ischämie	Schubspannung
Maximale Blutflusssteigerung	1,5- bis 1,7-fach	10- bis 20-fach
Fähigkeit zur Kompensation einer okkludierten Arterie	nein	ja

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Angiogenese und Arteriogenese, modifiziert nach Schaper und Scholz ¹⁵

1.1.3.2 Morphologie von Kollateralarterien

Präexistierende Kollateralgefäße sind ihrer Morphologie nach Arteriolen. Sie weisen einen Durchmesser von ca. 40 µm auf und ihr Endothel ist von 1-2 Schichten glatter Muskelzellen umgeben. Diese präexistierenden Kollateralarterien sind Teil eines arkadenartigen Gefäßnetzwerkes im Perfusionsgebiet ¹⁹. Sie kommen vor allem in Skelettmuskulatur vor, wo jeweils das proximale und distale Ende des Muskels an versorgende Arterien angeschlossen ist. Die prä-existierenden Kollateralarterien verbinden beide Gefäßäste im mittleren Teil des Muskels. Innerhalb dieser Arteriolen ist der Blutfluss nicht unidirektional sondern oszillierend. Da diese kleinen Gefäße unter physiologischen Bedingungen nicht essentiell sind, ist wahrscheinlich ein embryonaler Entwicklungsprozess für ihre Existenz verantwortlich. Hierbei blieb die terminale Differenzierung des primären Gefäßnetzwerkes zu Endarterien unvollständig.

Im Verlauf der Arteriogenese entwickeln sich aus den präformierten Arteriolen größere Arterien (Abb. 1). Auf der Seite des Lumens wird eine Arterie von einer Schicht Endothelzellen begrenzt, an die sich die interne elastische Lamina anschließt, die aus elastischen Fasern besteht. Endothel und interne elastische Lamina werden zusammen als Intima bezeichnet. Die sich anschließende Media besteht aus mehreren Schichten glatter

Muskelzellen und ist von einer internen und externen elastischen Lamina begrenzt. Die Dicke der Media hängt von der Lage der Arterie im Gefäßsystem ab. Sie umfasst mehrere Schichten glatter Muskelzellen, wenn sie einem höheren Druck standhalten muss. Die äußerste Schicht einer Arterie, die Adventitia, ist von der externen elastischen Lamina auf der inneren Seite begrenzt. Die Adventitia enthält große Mengen an Bindegewebe (meist Kollagenfasern), außerdem Kapillaren, Venolen, Nervenfasern, aber auch glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten.

Im Verlauf des Wachstums nehmen die Kollateralgefäße eine typische korkenzieherartige Struktur an, die wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass nicht nur eine Zunahme des Durchmessers stattfindet, sondern auch eine Längenzunahme²⁰.

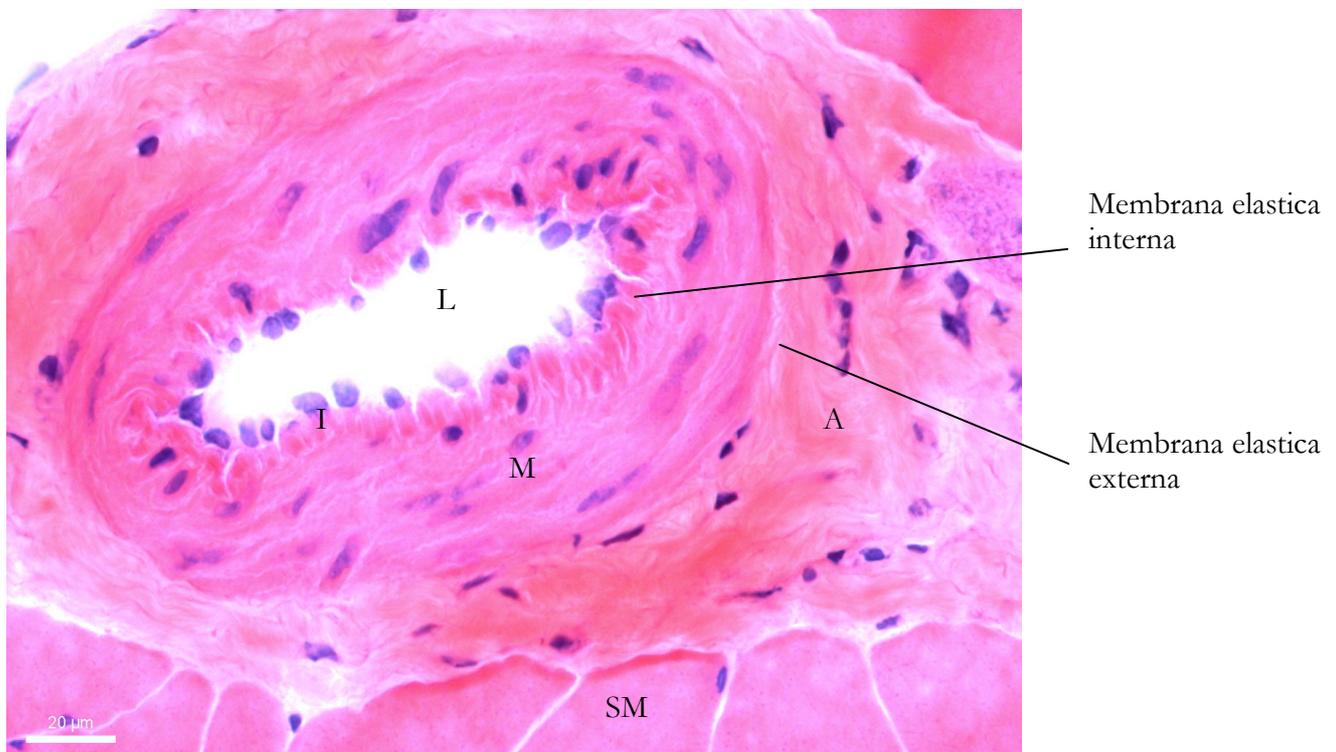


Abbildung 1: Aufbau einer kleinen Arterie. Querschnitt durch eine wachsende Kollateralarterie aus dem Adduktormuskel einer Ratte (HE-Färbung). L: Lumen; I: Tunica intima (Endothel); M: Tunica media (glatte Muskelzellen); A: Tunica adventitia; SM: Skelettmuskel

1.1.3.3 Zeitverlauf der Arteriogenese

Im Falle der akuten oder chronischen Okklusion einer größeren Arterie kommt es zu einem steilen Druckgradienten entlang der Arteriolen, die den Verschluss überbrücken.

Der unter physiologischen Bedingungen nur minimale Blutfluss in den Kollateralanastomosen steigt um ein Vielfaches und führt zu einer Änderung physikalischer Kräfte, die auf die Gefäßwand wirken. Neben Blutdruck-basierten Kräften ist dies vor allem die Schubspannung, welche die Endothelzellen der Gefäßwand beeinflusst und als initialer Auslöser der Arteriogenese identifiziert wurde²². Die normalerweise in der A. femoralis vorherrschende Schubspannung beträgt $4,8 \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$. Die Schubspannung, die nach Okklusion dieses Gefäßes in den überbrückenden Anastomosen vorherrscht, beträgt ca. $889 \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$ ²³.

Elektronenmikroskopisch sichtbares Zeichen des schubspannungsaktivierten Endothels ist ein ödemartiges Anschwellen der Endothelzellen, was vermutlich durch die Öffnung von Ionenkanälen ausgelöst wird²⁴. Das aktivierte Endothel bildet vermehrt MCP-1²⁵, außerdem erfolgt eine Induktion der Adhäsionsmoleküle. Dies führt zu einer Anlockung von Monozyten aus dem Blut, die mit der Gefäßwand interagieren, an diese adhären und transmigrieren²⁶. Gleichzeitig werden die Monozyten aktiviert²⁷, welche daraufhin u.a. MCP-1 produzieren und weitere Monozyten anlocken. Plättchen haften ebenfalls an das aktivierte Endothel an und setzen verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. Interleukin-4 und „platelet-derived growth factor“ PDGF) frei, die das Endothel zu weiterer Expression von Adhäsionsmolekülen anregen.

Außerdem verstärkt das Endothel die Produktion des „granulocyte-makrophage-colony-stimulating factor“ (GM-CSF), was die Überlebenszeit der Monozyten verlängert. Sie sind so in der Lage, große Mengen an weiteren Wachstumsfaktoren (z.B. fibroblast-growth factor-2“ (FGF-2)) zu bilden, welche die Umstrukturierung des Gefäßes beeinflussen²³.

Im Anschluss an die Adhäsion und Invasion der Monozyten und Plättchen vollziehen sich bald die ersten Mitosen der Endothel- und glatten Muskelzellen. Dieser Vorgang beginnt in den präformierten Kollateralgefäßen etwa 24 Stunden nach akuter Okklusion im Tiermodell¹⁹.

Monozyten dringen anfangs vor allem in die Intima ein, sind später jedoch vermehrt in der Adventitia zu finden, wo sie eine entzündliche Umgebung schaffen. Diese Entzündungsreaktion hat die Auflösung der Basalmembran des Gefäßes zur Folge. Außerdem wird im umgebende Gewebe Raum für das sich neu entwickelnde Gefäß geschaffen²³, das seinen Durchmesser bis zu 20-fach erhöhen kann.

Damit aus präformierten Kollateralen ein Kollateralgefäß entstehen kann, muss die alte Gefäßstruktur in weiten Teilen abgebaut und ersetzt werden. Hierbei werden zwei Phasen unterschieden: Proliferation und Umstrukturierung.

Im Zuge der Arteriogenese erfolgen Migrationen und Proliferationen der Endothelzellen, und es finden Mitosen der glatten Muskelzellen statt. Die glatten Gefäßmuskelzellen wandern aus, um eine neue Neointima zu formen. Die sich anordnenden glatten Muskelzellen sind sowohl longitudinal, als auch zirkulär gerichtet und bestehen aus dedifferenzierten Muskelzellen, die viele ihrer Differenzierungsmarker inklusive der meisten Aktin-Filamente verloren haben. Sie stellen somit den Synthese-Typ glatter Muskelzellen im Vergleich zum physiologisch anzutreffenden kontraktiven Typ dar.

Bestimmte Muskelzellen, die sich als Synthesetyp der glatten Muskelzellen beschreiben lassen, produzieren extrazelluläre Matrix, Kollagen, Elastin und letztendlich die neue Lamina elastica interna²³.

Nach dem Verschluss eines Gefäßes stoppt die Adaptation der Kollateralen vor dem Erreichen der optimalen Anpassung an die neuen Blutflussgegebenheiten²⁸⁻³⁰. Für die therapeutische Arteriogenese ist es aber von großer Bedeutung, die Periode des Wachstums zu verlängern bzw. wieder aufzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass Gefäßwachstum zum einen durch die Stimulation von Monozyten³¹, zum anderen aber auch durch die Aktivierung von Endothelzellen³² verbessert werden kann.

1.2 Hämodynamische Kräfte der Blutströmung

Die Blutgefäßwand ist durch das strömende Blut ständig physikalischen Kräften ausgesetzt, die wichtige physiologische und pathologische Reaktionen der Gefäßwand regulieren. Veränderungen im Blutfluss – und damit geänderte hämodynamische Kräfte – beeinflussen die Tonusregulation, die Entwicklung der Blutgefäßstruktur während der Embryogenese und den chronischen Umbau und die Generierung adulter Blutgefäße. Dabei wirkt die innere Oberfläche der Gefäße, die Endothelzellschicht, aufgrund ihrer Position zwischen strömendem Blut und der Gefäßwand als Schlüsselglied, das biochemische und biomechanische Stimuli registriert und verarbeitet und die Adaptionsvorgänge in Gang setzt. Für die Vermittlung ist vor allem die Veränderung der endothelialen Genexpression durch Einwirkung der Blutströmung relevant.

Kurzfristig führt die Anpassung der Blutgefäße an Änderungen der Schubspannung über die Tonusregulation zur schnellen Umverteilung des Blutvolumenstroms. In dieser Phase

spielt die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen, die im Endothel selbst gebildet werden, eine wichtige Rolle. Es sind dies Prostaglandine (z. B. Prostaglandin), freie Radikale (NO), Superoxidanionen (O_2^-), Endothelin-1, „endothelial driven hyperpolarisation factor“ (EDHF)³³. Sie regulieren den Vasotonus und setzen die Thrombozytenaggregation im gut perfundierten Gefäß herab.

Daneben ist eine langfristige Bedarfsanpassung, d.h. ein Umbau des Blutgefäßnetzwerks erforderlich. Dazu gehören die Neubildung von Blutgefäßen (Vaskulogenese, Angiogenese), der Untergang nicht mehr benötigter Gefäße (Pruning) sowie der strukturelle Umbau von Blutgefäßen mit Zunahme des Durchmessers und der Wanddicke (Arteriogenese).

Es ist lange bekannt, dass die Blutströmung die Arteriengröße determiniert und damit die Form der Funktion angepasst wird³⁴⁻³⁸. Die Arteriengröße hängt nicht nur während der Embryonalentwicklung von der Strömungsgeschwindigkeit ab, auch adulte Arterien antworten mit Strukturveränderungen auf sich ändernde Durchblutung. Das Lumen wird kontrolliert durch eine sofortige physiologische Anpassung des vaskulären Tonus durch die Veränderung des Flusses und eine verspätete anatomische Anpassung, die auftritt, wenn die Veränderung des Flusses anhält.

Zu den von der Blutströmung erzeugten Kräften, die auf das Endothel wirken, gehören druckbedingte Kräfte (zirkumferentiell, radial und longitudinal) sowie die Schubspannung. Der Anstieg der axialen Flussgeschwindigkeit von der Gefäßwand zur Lumenmitte ist als Scherrate definiert. In Abhängigkeit von der Blutviskosität η bestimmt die Scherrate dv/dr die laminar auf das Endothel wirkende Schubspannung als $\tau = dv/dr * \eta$, definiert als Kraft pro Fläche mit der Einheit dyn/cm^2 . Die Schubspannung ist die Kraft, die das strömende Blut auf luminaler Seite auf die Endothelschicht ausübt. Die Schubspannung ist proportional zum Blutfluss (Q) und der Blutviskosität und steht in umgekehrter Beziehung zur 3. Potenz des Radius des Gefäßes. Im Vergleich zum zirkumferentiellen Dehnungsstress des Gefäßes mit $10^6 - 10^7 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ ist die Schubspannung mit physiologischen um $20 - 30 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ eine relativ schwache Kraft. Es wird angenommen, dass die schwächere Kraft die stärkere amplifiziert.³⁹

1.3 Schubspannungssensoren und Mechanotransduktion

Das Endothel ist die Signaltransduktions-Schnittstelle für hämodynamische Kräfte. Diese Kräfte determinieren Form, Organisation des Zytoskeletts und Funktion der Endothelzellen, die auf physiologische und pathologische Bedingungen reagieren.

Schubspannung induziert in den Endothelzellen etliche Signalkaskaden die von Tzima⁴⁰ zusammengefasst wurden: Öffnung von K^+ und Ca^{++} Kanälen⁴¹⁻⁴³, Aktivierung von G Proteinen⁴⁴, Produktion von NO⁴⁵, Tyrosin Phosphorylierung von Proteinen wie Shc, c-src und „focal adhesion kinase“ (FAK)^{46,47}, Aktivierung von mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK)⁴⁸, protein kinase C (PKC)⁴⁹ und C-Jun-N-terminaler Kinase (JNK)⁴⁷, Freisetzung von reaktiven Oxidantien (ROS)⁵⁰ sowie die Aktivierung von Transkriptionsregulatoren wie c-fos, c-jun, c-myc und NF- κ B⁵¹.

Zur verspäteten Antwort gehören die erhöhte Expression von Genen, die für interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (ICAM-1), „nitric oxid synthetase“ (NOS), „platelet-derived growth factor“ (PDGF), „tissue factor“, „transforming growth factor“ (TGF- β) und „monocyte chemoattractant protein“ (MCP-1) kodieren⁵¹⁻⁵⁵. Eine Herabregulierung der Expression des Vasokonstriktors Endothelin 1 (Et-1) wird beschrieben^{56,57}. Das Kennzeichen der endothelialen Antwort auf Schubspannung ist die Neuordnung der Mikrofilamente und Mikrotubuli^{58,59} und deren Elongation entlang der Flussrichtung. Außerdem ist ein wichtiger Aspekt der endothelialen Hämodynamiksschnittstelle, der auch in der Arteriogenese von Bedeutung ist⁶⁰, die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut.

Trotz der zahlreichen Untersuchungen bleibt der zelluläre Mechanismus der sensorischen Komponenten unklar. Auch der Prozess, durch den hämodynamische Stimuli in biochemische Signalkaskaden übersetzt werden und der als Mechanotransduktion bezeichnet wird⁶¹ ist nicht geklärt. Ein Modell schlägt vor, dass Schubspannung von der apikalen Oberfläche über das Zytoskelett auf Befestigungspunkte, die der Zelle erlauben der Zugkraft zu widerstehen, übermittelt werden. Diese Befestigungspunkte erfahren so Zugspannung und könnten als „Mechanotransducer“ (Umwandler) dienen. Dieses Konzept wurde für fokale und interzelluläre Adhäsionen vorgeschlagen. Hier werden vier mögliche Kandidaten als Mechanotransducer diskutiert: Integrin-Matrix Interaktionen, spezialisierte Membranmikrodomänen, Ionenkanäle und G Proteine.

Tzima et al. beschreiben einen mechanosensorischen Komplex der die Endothelzellantwort auf Schubspannung vermittelt {Tzima, 2005 #441}: PECAM-1, das direkt die mechanische

Kraft weiterleitet, VE-cadherin, das als Adapter fungiert und VEGFR2, der die Phosphatidylinositol-3-OH Kinase aktiviert. Zusammen reichen diese Komponenten *in vitro* aus, um eine Zellantwort auf Strömung zu gewähren.

Außerdem werden in der Literatur eine „zentralisierte“ und eine „dezentralisierte“ Form der Mechanotransduktion unterschieden. Bei der zentralisierten Form übernehmen Membranproteine die Funktion, den mechanischen Stimulus (z. B. Schubspannung) in ein biochemisches oder elektrophysiologisches Signal zu verwandeln. Beispiele sind Ionenkanäle⁴¹, G-Proteine und Mitogen-aktivierte Proteinkinasen⁶². Bei der dezentralisierten Form der Mechanotransduktion übernimmt das Zytoskelett die Aufgabe der Signaltransmission an intrazelluläre Strukturen. Extrazelluläre Adhäsionsmoleküle wie Cadherine, Selektine, Integrine und „cell-adhesion-molecules“ (CAMs) halten die Grundspannung innerhalb des Zytoskeletts. Wenn diese sich durch die Einwirkung von Schubspannung ändert, werden die mit dem Zytoskelett assoziierten Strukturen (Membranproteine, Zell-Zell-Verbindungen, Focal Adhesions und der Zellkern) aktiviert und an die Signalverarbeitung angeschlossen (Tensegrity-Modell)^{63,64}.

1.4 Schubspannung als Trigger der Arteriogenese

Inzwischen ist die Schubspannung als Hauptstimulus der Arteriogenese unumstritten, obwohl die Mechanismen noch wenig verstanden sind^{23,65}. Ein Durchbruch gelang der Gruppe um Schaper durch eine Modifikation des klassischen Ischämie-modells der Peripherie^{22,66}. Distal der Ligatur der A. femoralis wurde eine Seit-zu-Seit Anastomose von Arterie und benachbarter Vene hergestellt (AV-Shunt). Auf diese Weise wurde ein großer permanenter Druckgradient kreiert, der den Großteil des kollateralen Flusses in die Vene drainiert und einen kleineren Anteil in die periphere Zirkulation. Das resultierte in einem drastischen Anstieg der Geschwindigkeit der Kollateraldurchblutung, welche eine Erhöhung der Schubspannung zur Folge hatte (Abb. 2A).

Diese chirurgische Behandlung verursacht im Schweine- und Kaninchenhinterlauf eine starke arteriogene Antwort (Abb. 2B).

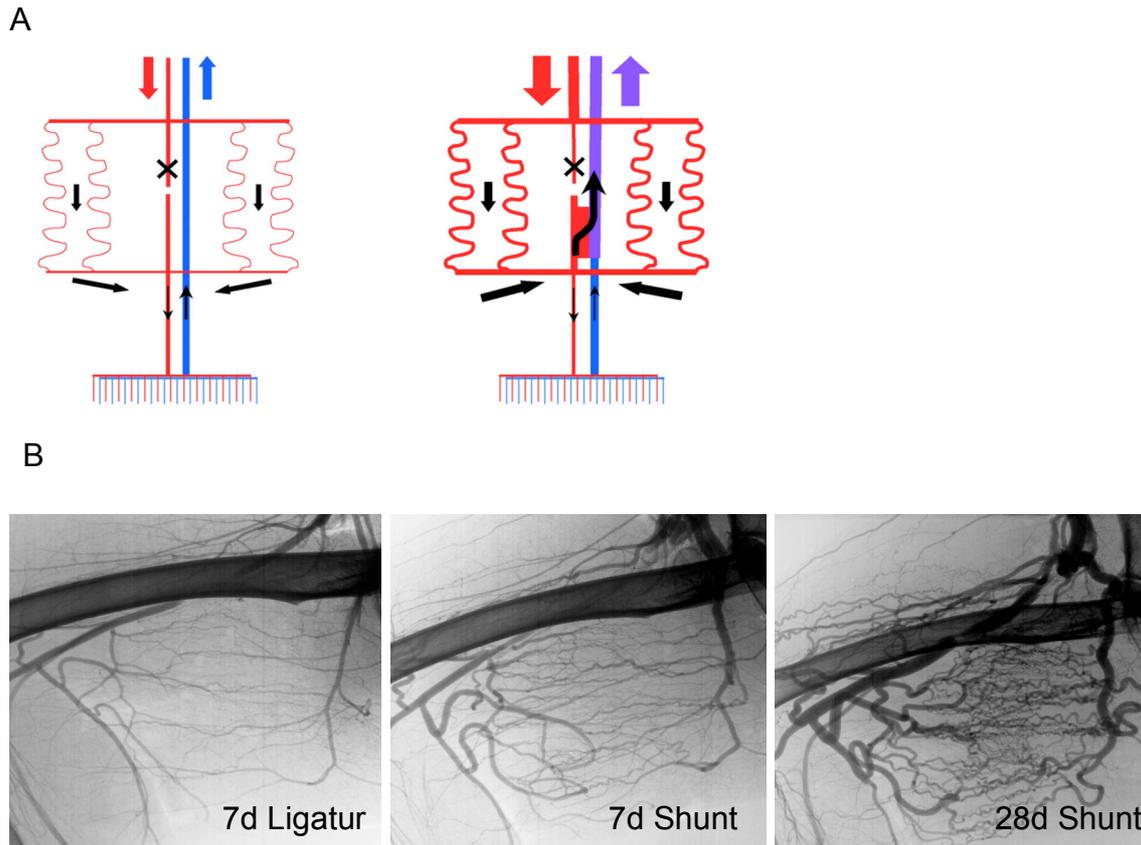


Abbildung 2: Arterio-venöser Shunt. A Schema der hämodynamischen Situation nach Ligatur und Ligatur + Shunt aus Pipp et al.²². B Post mortem Angiographien des Kaninchenhinterbeins aus Eitenmuller et al.⁶⁶

Die wichtigste neue Erkenntnis aus dieser Studie ist, dass die durch den Shunt stark erhöhte Schubspannung die anatomischen Restriktionen von Kollateralgefäßen überwindet und letztendlich zu einer kompletten Normalisierung und sogar Überkompensation der maximalen Konduktanz führt. Chronisch erhöhte Schubspannung, herbeigeführt durch einen chirurgisch hergestellten Shunt zwischen dem distalen Ende der verschlossenen Femoralarterie und der benachbarten Vene, führt zu einem erheblich verlängerten Wachstumsprozess der Kollateralarterien. Mit diesem Tiermodell war es erstmals möglich die volle maximale Konduktanz einer verschlossenen Hauptarterie wieder herzustellen und sogar zu übertreffen. Die große Spannweite des Adaptionspotentials war bewiesen; die molekularen Mechanismen galt es noch aufzuklären.

2 Aufgabenstellung

Der vollständige strukturelle und funktionelle Ersatz einer verschlossenen Hauptarterie durch Arteriogenese ist möglich und konnte mit dem chirurgischen Modell des Arteriovenösen Shunts zur permanenten Erhöhung und Aufrechterhaltung des Stimulus gezeigt werden.

Aufgabe dieser Arbeit war es Kandidatengene bzw. Signalwege zu finden, die für die starke Stimulation des Kollateralwachstums durch erhöhte Schubspannung verantwortlich sind. Es sollte zunächst das Genexpressionsmuster während der schubspannungsinduzierten Arteriogenese untersucht werden. Hierfür war aus dem extrem stimulierten Gewebe wachsender Kollateralen RNA für Microarray-Analysen zu gewinnen. Das Expressionsmuster sollte Aufschluss über Induktion und Regulation der Arteriogenese geben und die Identifikation neuer potentiell arteriogener Faktoren ermöglichen.

Weiterhin war die differentielle Expression einiger der identifizierten Gene mit unabhängigen Techniken zu bestätigen. Ein Gen, dessen Expressionsverlauf mit der Aufrechterhaltung des physikalischen Stimulus korreliert, sollte genauer charakterisiert und bezüglich seiner Funktion untersucht werden. Dazu gehörte auch, das korrespondierende Protein im Gewebe zu lokalisieren.

Das Ziel dieser Arbeit war schließlich, die Genexpression *in vivo* zu modulieren und damit die Schubspannung zu ersetzen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Sofern nicht anders angegeben, befinden sich die Firmensitze in Deutschland.

Autoklav, Varioklav Typ 500	H-P Labortechnik, München
Bakterienschüttler, Certomat HK	B. Braun Biotech
Balteau-Apparat	Machlett Laboratories
Blutflussmessgerät T206	Transonics Sytems, Ithaca, USA
Brutschrank (Zellen), Hera cell	Kendro, Hamburg
Druckwandler	Ohmeda, Erlangen
Filmentwicklungsmaschine Optimax	Beetz, Langen
Fluoreszenzmikroskop DM-RB	Leica, Wetzlar
Gefriermikrotom Kryostat CM 3000	Leica, Wetzlar
Hybridisierungsöfen	Heraeus, Hanau
Imaging System, Gene Genius	Syngene, Cambridge, UK
Konfokales Mikroskop TCS SP	Leica, Wetzlar
Kühlzentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Mac-Lab MKIII	ADI-Instruments, Castle Hill, Australien
Mixer Mill	Retsch, Haan
NanoDrop	peqLab, Erlangen
pH-Meter	WTW, inoLab, Weilheim
Röntgenfilmkassetten	Amersham Biosciences, USA
Schüttler Heidolph PROMAX 1020	VWR, Darmstadt
Sterilbank (Zellen), Microflow	Nunc, Wiesbaden
Sterilbank, Bakterien	Ceag Schirp, Selm-Bork
Thermocycler, iCycler	Biorad, München
Thermocycler, MJ Research	Biozym, Hess. Oldendorf
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall-Sonifizierer	Branson, Dietzenbach
UV-Transilluminator	Syngene, Cambridge, UK
VersaDoc	BioRad, München
Vertikale Elektrophorese/Nassblotkammer	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Videosystem DC 200	Leica, Wetzlar
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	IKA-Labortechnik, Staufen
Zentrifuge Sorvall RC5B	Kendro, Hamburg
Zentrifuge, Multifuge	Heraeus, Hanau

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

96Well PCR Platten	Biorad, München
Kryo-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kulturröhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Nitrozellulosemembran	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Objektträger, Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Optical Sealing Tape für PCR-Platten	Biorad, München
PAA-Gele für Western Blot	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Petrischalen	BD Biosciences, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Strukturix Agfa	Röntgen Bender, Muttentz
Whole Rat Genome Oligo Microarray 44K	Agilent, Böblingen
ZK 10 cm Platten	BD Biosciences, Heidelberg
ZK 24-Well Platten	BD Biosciences, Heidelberg
ZK 6-Well Platten	BD Biosciences, Heidelberg

3.1.3 Medien und Supplemente für Zellkultur

DMEM	c.c. pro, Oberdorla
FKS	c.c. pro, Oberdorla
Penicillin G	c.c. pro, Oberdorla
Streptavidinsulphat	c.c. pro, Oberdorla
L-Glutamin	c.c. pro, Oberdorla
Na-Pyruvat	c.c. pro, Oberdorla
NE- Aminosäuren	c.c. pro, Oberdorla
Schafserum	c.c. pro, Oberdorla

3.1.4 Chemikalien, Reagenzien

Adenosin	Sigma-Aldrich, München
Agarose Seakem GTG	Biozym, Hess. Oldendorf
BCIP	Roche, Mannheim
BSA	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Sigma-Aldrich, München
Cyanogenbromid-aktivierte Sepharose 4B	Amersham,
DAPI Kernfarbstoff, Molecular Probes	Invitrogen, Groningen, Niederlande
DEPC	Roth, Karlsruhe
DIG-dUTP	Roche, Mannheim
dNTPs	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Roth, Karlsruhe
DRAQ5 Kernfarbstoff	Alexis, San Diego, USA
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin 2%	Chroma, Münster
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, München
Femto Reagenz, Pierce	Perbio, Bonn

Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämalaun	Chroma, Münster
Hefe RNA	Roche, Mannheim
Heparin	Sigma-Aldrich, München
IPTG	Promega, Mannheim
IQ SYBR Green Supermix	BioRad, München
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	Braun, Melsungen
$K_3Fe(CN)_6$	Sigma-Aldrich, München
$K_4Fe(CN)_6$	Sigma-Aldrich, München
KCl	Roth, Karlsruhe
Ketaminhydrochlorid	Medistar GmbH, Holzwickede
Levamisol (Tetramisol-Hydrochlorid)	Sigma-Aldrich, München
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt
Milchpulver	BioRad, München
NaCl	Sigma-Aldrich, München
NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich, München
NaN_3	Sigma-Aldrich, München
NBT	Roche, Mannheim
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PEG 6000	Sigma-Aldrich, München
Phalloidin	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Promega, Mannheim
Random nonamer	NEB, Frankfurt a. M.
Red Alert 10x Western Blot Stain, Novagen	Merck, Darmstadt
Rindergelatine	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Triethanolamin (TEA)	Roth, Karlsruhe
Trinatriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Promega, Mannheim
Xylazinhydrochlorid	Medistar GmbH, Holzwickede
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.5 Zelllinien

Cos-1	Fibroblasten (CV-1) aus Nieren der grünen Meerkatze, ATCC CCL 70 ⁶⁷	DMEM, 10 % FKS, Penicillin G (10 U/ml), Streptavidin-Sulphat (10 µg/ml) und 2 mM L-Glutamin, 10 mM Natrium-Pyruvat
PAEC	Porcine aortic endothelial cells, Endotheliale Zelllinie aus der Aorta vom Schwein ⁶⁸	D-MEM, 10% FKS, 0.1 mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren, 2mM L-Glutamin, Penicillin G (10 U/ml), Streptavidin-Sulphat (10 µg/ml)
PSMC	Porcine smooth muscle cells, glatte Gefäßmuskelzellen isoliert aus der medial Zellschicht der thorakalen Aorta von Schweinen	D-MEM, 10% FKS, 0.1 mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren, 2mM L-Glutamin, Penicillin G (10 U/ml), Streptavidin-Sulphat (10 µg/ml)
293A	Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit humaner adenoviraler Typ5 DNA. ⁶⁹	D-MEM, 10% FKS, 0.1 mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren, 2mM L-Glutamin, Penicillin G (10 U/ml), Streptavidin-Sulphat (10 µg/ml)

3.1.6 Enzyme

PfuUltra Hotstart DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Turbo DNA-free DNase	Ambion, Austin, USA
Restriktionsenzyme	Promega, Mannheim
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Groningen, Niederlande
RNase OUT	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Platinum Taq Polymerase	Invitrogen, Groningen, Niederlande
IQ SYBR Green Supermix	BioRad, München
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Invitrogen, Groningen, Niederlande

3.1.7 Antikörper

Anti-Abra, Polyklonal Huhn	gerichtet gegen Peptide, die den AS 1-15 und 273-287 entsprechen	1:200 (IHC) 1:1000 (WB)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Anti- α -SM Cy3	Aktin-	1:300 (IHC)	Sigma-Aldrich, München
Anti-DIG-AP		1:2000 (ISH)	Roche, Mannheim
Anti-Hexon	Gerichtet gegen adenovirales Hexon-Protein	1:1000	BioCat, Heidelberg
Goat Anti-Chicken IgY-HRP (WB)		1:10000	Abcam, Cambridge, UK
Goat Anti-Chicken- Alexa488 (IHC)		1:200	Invitrogen, Groningen, NL

3.1.8 Bakterien

E.coli TOP10: F⁻ mcrAΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC)_{o80}lacZΔM15 ΔlacX74, recA1, araD139, Δ(ara-Leu)7697, galU, galK, rpsL (Str^R) endA1 nupG

3.1.9 Oligonukleotide

448	gga cag gat tga cag att gat ag	18S (Kaninchen)
449	ctc gtt cgt tat cgg aat taa c	18S (Kaninchen)
508	act gaa ctg gct cag cgt gtg c	18S (Ratte)
509	caa cgc aag ctt atg acc cgc a	18S (Ratte)
517	tgc tgc cag gat taa acg ccc ct	Abra qRT-PCR (Ratte)
518	tgt gac tgt atg tgt tca tcg g	Abra qRT-PCR (Ratte)
521	aca ttc cct ctt tag cca gtg c	Abra 5' UTR
522	taa cat tcc aga gca gtt tgc c	Abra 3' UTR
529	att gag ttt ctg gga ctg ga	Abra Sequenzierung (Kaninchen)
530	caa aag gaa aga ggt gac c	Abra Sequenzierung (Kaninchen)
531	cct cgg ggc ttt gtc cat ct	Abra Sequenzierung (Kaninchen)
532	ctt gcc ctg tca agc taa ca	Abra Sequenzierung (Kaninchen)
533	ggt gac caa gac aat tgt ga	Abra Sequenzierung (Kaninchen)
536	tta agc tta gca tgg ctg ctg gag aaa ctg t	Abra (Ratte) Klonierung in pcDNA3
537	ggc tcg agt tac tca agg aga gta atc aca aca t	Abra (Ratte) Klonierung in pcDNA3
545	cacc gta cat ctt gct cag gcc tct ctt gat atc cg gaga ggc ctg agc aag atg ta	siRNA Abra3 for_pENTR
546	aaaa tac atc ttg ctg agg cct ctg cgg ata tca aga gag gcc tga gca aga tgt ac	siRNA Abra3 rev_pENTR
547	cacc gta gtt cac atc tcc tcc tct ctt gat atc cgg aga gga gga gat gtg aac tat ttt ttc caa a	siRNA Abra10 for_pENTR
548	aaaa tag ttc aca tct cct cct ctg cgg ata tca aga gag gag gag atg tga act ac	siRNA Abra10 rev_pENTR
551	tcc cgc atg aag agc cag gag tc	Opn qRT-PCR (Ratte)
552	tgc tgt cct gat cag agg gca cg	Opn qRT-PCR (Ratte)
553	tct gca gga cct aag ccg tgg ct	Carp qRT-PCR (Ratte)
554	tga cgt ggc ctt cac ctg ggc ac	Carp qRT-PCR (Ratte)
557	act acc gca agc aca cgg gtc ac	Klf qRT-PCR (Ratte)
558	tgt cgc ttc atg tgc aga gcc ag	Klf qRT-PCR (Ratte)
559	acg act cac tat agg gag acc	Virentranskript CMV/ Abra
560	tcc agg agc cat gct gga tcc	Virentranskript CMV/ Abra
571	acg gtg gac tac ctg agg ctg g	Trpv4 qRT-PCR (Ratte)
572	tgg aag gag cca tcg acg aag	Trpv4 qRT-PCR (Ratte)
586	act gct gac cag gaa ggc tcc	Tmsb4 qRT-PCR (Ratte)
587	tcc ctg tct gct agc cag gcc a	Tmsb4 qRT-PCR (Ratte)
602	aca tga gcg acc tca gcc aca gg	Abra qRT-PCR (Kaninchen)
603	tca gct cag aca cca ggt tgg c	Abra qRT-PCR (Kaninchen)

3.1.10 Plasmide

Plasmide ohne Firmenangabe wurden selbst hergestellt.

pSilencer 2.1-U6 neo	Ambion, Austin, USA	
pSilencer_nonsense_siRNA1	Ambion, Austin, USA	Kontrolle aus dem Kit
pSilencer_nonsense_siRNA2	Ambion, Austin, USA	Kontrolle aus dem Kit
pSilencer_Abra_siRNA1	Spezifischer knock down von Abra	
pSilencer_Abra_siRNA2		
pSilencer_Abra_siRNA3		
pSilencer_Abra_siRNA4		
pSilencer_Abra_siRNA7		
pSilencer_Abra_siRNA8		
pSilencer_Abra_siRNA10		
pcDNA3	Invitrogen, Groningen	
pCR 2.1-TOPO	Invitrogen, Groningen	
pAd/CMV/V5-DEST Gateway	Invitrogen, Groningen	
pAd/PL-DEST Gateway	Invitrogen, Groningen	
pENTR A1 Gateway	Invitrogen, Groningen	
pENTR/U6 Gateway	Invitrogen, Groningen	
pAd/CMV/Abra	Adenovirale Überexpression von Abra	
pAd/CMV/LacZ	Invitrogen, Groningen	Kontrolle aus dem Kit
pAd/U6/siRNA3_Abra	Adenoviraler knock down von Abra	
pAd/U6/siRNA10_Abra		
pAd/U6/siRNA_LacZ	Invitrogen, Groningen	Kontrolle aus dem Kit
pCR 2.1-TOPO_Abra (rabbit)	Sequenzierung des Kaninchen Abra-Transkriptes	
pcDNA3_Abra (rat)	Expression in eukaryotischen Zellen, Herstellung der DIG-markierten RNA-Sonde	

3.1.11 Kits

Amino Allyl MessageAmp aRNA Kit	Ambion, Austin, USA
BLOCK-iT TM U6 RNAi Entry Vector Kit	Invitrogen, Groningen, NL
DIG-RNA Labeling Kit (SP6/ T7)	Roche, Mannheim
MTT Assay, ATCC	LGC Promochem, Wesel
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QiaShredder	Qiagen, Hilden
QuickTiter TM Adenovirus Titer Immunoassay Kit	BioCat, Münster
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Vivapure [®] AdenoPACK TM 100, Vivascience	Sartorius, Göttingen
Zero Blunt [®] TOPO [®] PCR Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, NL

3.2 Methoden

3.2.1 Tiermodelle

Die in dieser Arbeit dokumentierten Tierexperimente wurden durch das bioethische Komitee des Veterinärdezernats des Regierungspräsidiums Darmstadt genehmigt. Alle Tiere wurden unter tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998, zuletzt geändert durch Art. 153 V v. 25.11.2003, ordnungsgemäß behandelt und versorgt. Die Leitsätze der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde / Society of Laboratory Animal Science) wurden berücksichtigt.

Ratten und Kaninchen wurden durch intramuskuläre Injektion mit einer Kombination aus Ketamin (40 mg/kg Körpergewicht (KGW)) und Xylazin (4 mg/kg KGW) anästhesiert. Erhaltungsdosen wurden als 5-10% der Initialdosis intravenös injiziert. Es wurde das *in vivo* Modell der regionalen Ischämie in der Hintergliedmaße⁶⁶ durch Ligatur der Femoralarterie in Ratten und Kaninchen verwendet.

Die Tierexperimente fanden in Zusammenarbeit mit Dr. Inka Eitenmüller, Bad Nauheim statt.

3.2.1.1 Shuntmodell

Um das Kollateralgewebe zu gewinnen, wurde bei anästhesierten Sprague Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 350 g das Ligaturmodell durch das Anlegen eines arterio-venösen Shunts erweitert. Die Ligatur der Femoralarterie wurde durchgeführt, um die Arteriogenese durch den Verschluss des Hauptleitungsgefäßes (A. femoralis) innerhalb der präformierten Kollateralarterien zu induzieren. Distal der Ligatur der A. femoralis wurde eine Seit-zu-Seit Anastomose von Arterie und benachbarter Vene hergestellt (Abb. 3A). Nach einem Versuchszeitraum von zunächst 5 Tagen für die Microarrayexperimente, später zusätzlich nach drei, sieben und zehn Tagen, wurden die Hintergliedmaßen der Tiere angiographisch untersucht und die wachsenden Kollateralen entnommen, d.h. aus dem umgebenen Muskel herauspräpariert.

3.2.1.2 Virentransfer

Die funktionelle Bedeutung von Abra für das Wachstum von Kollateralen wurde in Kaninchen mittels einer lokalen Überexpression bei einfacher Ligatur ohne Anlage des AV-Shunts untersucht. Hierfür wurde ein intra-kollateraler Virentransfer durchgeführt⁷⁰ (Abb. 3B). Es wurden beidseits die Aa. femoralis freigelegt und auf der linken Seite ligiert. In die rechte A. femoralis wurde ein Katheter nach proximal bis kurz unterhalb der Aufzweigung der A. iliaca externa eingeführt. Nach dem Abklemmen der A. iliaca externa auf Höhe des Leistenspaltes wurde über den Katheter zuerst das Gefäßsystem des Beines mit 5 ml körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung gespült, um das Blut zu entfernen. Da die A. iliaca externa nach proximal unterbunden war, wurden die Aa. circumflexa lateralis, profunda femoris, sowie die präformierten Kollateralgefäße gespült. Um den retrograden Blutrückfluss zu minimieren, bzw. um den Abfluss des Puffers (Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, PBS) zu verhindern, wurden vor Infusion der Viruslösung die V. femoralis und die V. profunda femoris mittels Gefäßklemmen abgeklemmt. Anschließend wurden $2,87 \times 10^{10}$ PFU der Virenlösung in 2,5 ml PBS infundiert und 30 min inkubiert. Der eingeführte Schlauch wurde entfernt und das Gefäß verschlossen.

3.2.1.3 Kombination von adenoviraler Transfektion mit Shunt

Um gleichzeitig die Erhöhung der Schubspannung mittels Shunt und die Transduktion von siRNA-tragenden Adenoviren durchzuführen, wurden beide Operationstechniken miteinander verknüpft. Hierfür wurde nacheinander zuerst der Virentransfer durchgeführt und anschließend der AV-Shunt angelegt.

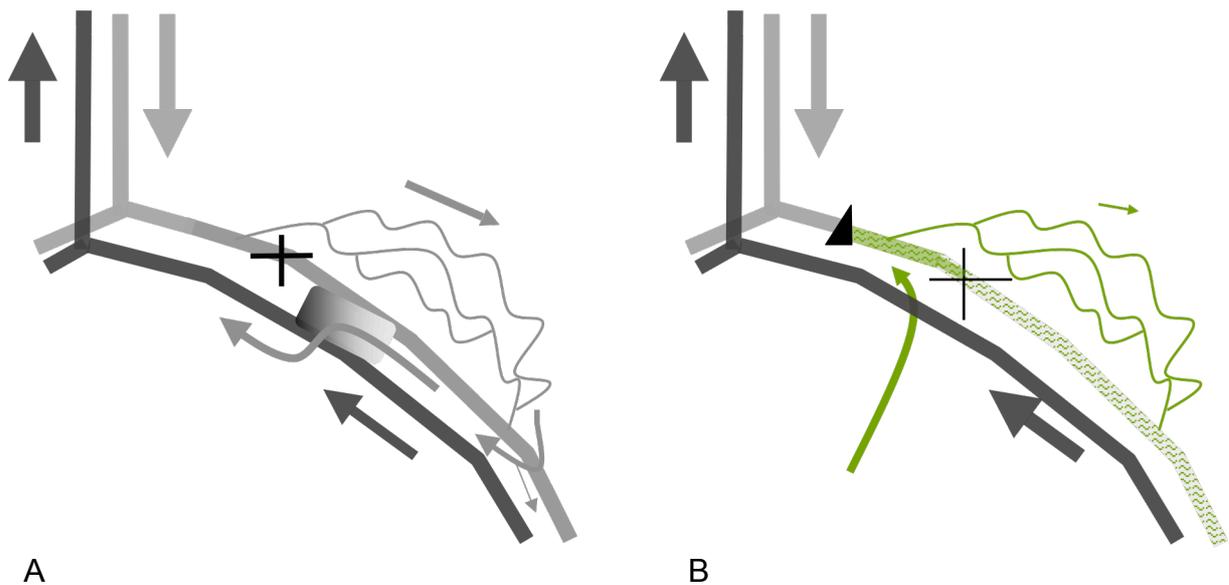


Abbildung 3: Schema der Operationstechniken. Sowohl bei Kaninchen als auch bei Ratten wurde initial eine Ligatur der Femoralarterie durchgeführt. **A:** Im AV-Shunt wurde distal der Ligatur eine Seit-zu-seit Anastomose der Femoralarterie mit der benachbarten Vene durchgeführt. **B:** Beim intrakollateralen Gentransfer erfolgte zunächst ein temporärer Verschluss der A.iliaca. Anschließend wurde die Viruslösung oberhalb der Ligatur infundiert und innerhalb der präformierten Kollateralgefäße für 30 Minuten inkubiert bis der temporäre Verschluss wieder geöffnet wurde.

3.2.1.4 Quantifizierung des kollateralen Flusses im Kaninchen

Die hämodynamischen Auswertungen sollten Aufschluss über die Kapazität des Kollateralgefäßsystems geben. Hierzu wurde die maximale kollaterale Konduktanz bestimmt. Es wurden perivaskuläre Blutflussmessungen in den dem Kollateralgebiet vorgeschalteten Aa. iliaca extt. durchgeführt. Da die Durchblutung der Gliedmaßen in entscheidendem Maß vom zentralen Blutdruck abhängt, wurde dieser unilateral in der rechten A. carotis invasiv mittels eines Druckwandlers gemessen. Methodengleich wurden die peripheren Blutdruckwerte bilateral in den Aa. saphenae ermittelt.

Durch die erfassten Blutdruck- und Blutfluss-Werte konnte die Kapazität des Kollateralgefäßsystems *in vivo* durch die Berechnung der maximalen kollateralen Konduktanz quantifiziert werden. Da die Messung der maximalen kollateralen Konduktanz nur unter maximaler Vasodilatation möglich ist, wurde Adenosin in die Aorta infundiert. Die maximale kollaterale Konduktanz wurde für das jeweilige Bein aus den gemessenen Blutdrücken und Blutflüssen errechnet und in ml/min/100 mm Hg angegeben.

3.2.1.5 Angiographische Auswertung

Zur morphologischen Beurteilung und Quantifizierung des Kollateralwachstums wurden post mortem Angiographien erstellt und ausgewertet⁶⁶. Die narkotisierten Tiere wurden nach Heparinisierung (2.500 I.E.) durch eine intravenöse Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital getötet. Die abdominale Aorta wurde daraufhin kanüliert und das zuvor auf 38°C erwärmte Kontrastmittel nach Eröffnen der großen Bauchvene bei 80 mmHg luftblasenfrei über die Aorta in die Hintergliedmaßen infundiert. Zur Vermeidung der vorzeitigen Aushärtung des Kontrastmittels und um einer auskühlungsbedingten Vasokonstriktion entgegenzuwirken, wurden die Tiere in ein Wasserbad von 38°C gelegt. Sobald eine Füllung der Beinarterien bis zum Knöchel erreicht war, konnten die Tiere zum Aushärten des Kontrastmittels für eine Stunde auf Eis gelegt werden. Danach wurden die Hintergliedmaßen enthäutet und in einem eigens zu diesem Zweck gebauten Fixationskasten eingespannt und zur Erzielung optimaler Kontraste vollständig mit Wasser bedeckt. Ein unter den Kasten geschobener Röntgenfilm (Strukturix, Fa. Agfa) wurde im Balteau-Röntgengerät bei 30 kV Spannung und 13 mA für 105 sec belichtet.

Zur Quantifizierung der sichtbaren Kollateralarterien wurden die Angiogramme auf einem Röntgenfilmbetrachter ausgewertet. Dabei wurden nur Kollateralen mit zweifelsfrei sichtbarer Stamm-, Mittel- und Wiedereintrittszone ausgezählt. Gefäße ohne sichtbare proximale oder distale Verbindung zum arteriellen Gefäßsystem wurden nicht mitgezählt.

3.2.2 Probengewinnung

Zur Isolation der Kollateralen, bzw. der Kontrollen (präformierte, ruhende Gefäße), wurden diese aus dem M. quadriceps präpariert. Dazu wurde der Muskel zuerst vom Knochen gelöst und anschließend die Gefäße frei präpariert. Entnommen wurde nur die „Midzone“ der Kollateralen¹⁶, da dieser Bereich der Ort der Umgestaltung der Kollateralen war. Das isolierte Gewebe für die RNA Gewinnung wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Gewebeproben für die immunhistologischen Untersuchungen wurden in Tissue-tec Einbettungsmedium eingebettet und in Methylbutan, das in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde, eingefroren. Für die *in situ* Hybridisierung wurde das Gewebe nach folgendem Protokoll in Paraffin eingebettet und 15 µm dicke Schnitte angefertigt:

1	4% PFA	Ü. N.	+4° C
2	25% Ethanol	1h	RT
3	50% Ethanol	1h	RT
4	75% Ethanol	1h	RT
5	96% Ethanol	1h	RT
6	99% Ethanol	1h	RT
7	99% Ethanol	Ü. N.	-20° C
8	Ethanol/ Xylol (1:1)	2x 1h	RT
9	Xylol	2x 1h	RT
10	Xylol/ flüssiges Paraffin	1h	+65° C
11	Xylol/ flüssiges Paraffin	Ü. N.	RT
12		1-2h	+65° C
13	Flüssiges Paraffin	2x 1h	+65° C
14	Transfer in Plastikkuvetten, einbetten		RT

3.2.3 β -Gaktosidase Reportergennachweis

Der Nachweis der Expression des bakteriellen Reportergens β -Galaktosidase in Virus-transfizierten Kollateralen erfolgte durch Inkubation des gesamten Muskels mit dem Substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-thiogalaktosid). Das Gewebe wurde vor der Entnahme mit 4% PFA perfusionsfixiert und 3 h bei 37°C in X-Gal Lösung (0,2% X-gal in Dimethylformamid; 1 mM MgCl₂; 150 mM NaCl; 3,3 mM K₄Fe(CN)₆ x 3 H₂O; 3,3 mM K₃Fe(CN)₆; 10 mM NaH₂PO₄) gefärbt. Danach wurde die Färbelösung durch PBS ersetzt und die Gewebestücke wurden fotografiert und anschließend cryokonserviert. Anschließend konnten noch Gefrierschnitte angefertigt werden, um die Eindringtiefe des viralen Genprodukts in die Gefäßwand zu dokumentieren.

3.2.4 Zellkultur

Die Kultivierung von Cos-1, PAEC, PSMC und A293 Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂-Atmosphäre. Die Handhabung der Zellen und Kulturmedien erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank (Nunc).

3.2.4.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

Zellen wurden bei 90% Konfluenz mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst (5 min, 37°C) und in Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium (10% FKS) wurde das Trypsin inaktiviert. Nach dem

Abzentrifugieren (1.200 rpm, 5 min, 37°C) wurden die Zellen in Wachstumsmedium aufgenommen und je nach Verwendungszweck in unterschiedlichen Dichten ausplattiert.

3.2.4.2 Einfrieren, Lagerung

Subkonfluente Zellen wurden trypsiniert und abzentrifugiert und in 2 x 2 ml Einfriermedium aufgenommen und sukzessive eingefroren (30 min Eis, 1h -20°C, ü. N. - 80°C, Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff). Zum Wiederanzüchten der Zellen wurden diese im Wasserbad (37° C) schnell aufgetaut und sofort in vorbereitetes Medium überführt und auf einer Petrischale ausplattiert. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Für die Experimente zur Bestimmung des Virustiters und der Proliferationsaktivität war die genaue Zellzahl zu Beginn entscheidend. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 verdünnt und zwischen Deckglas und Objektträger einer Neubauer Zählkammer gebracht. Der Mittelwert (MW) der Auszählung von vier Quadraten mit der Kantenlänge von 0,1 mm wurde in folgende Formel zur Berechnung der Zellzahl eingesetzt:

$$\text{MW} \times 10^5 = \text{Zellen/ ml Medium}$$

3.2.4.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Metafectene

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80-90% in die Schalen einer 6-Well Platte kultiviert. Pro Transfektionsansatz wurden 10 µl Metafectene (Biontex) und 5 µg DNA in 100 µl serumfreies Medium aufgenommen, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, dann wurden 900 µl Medium (ohne FKS, ohne Antibiotika) zugegeben und das Metafectene/DNA Gemisch tropfenweise zugeführt. Nach 4h Inkubation wurde pro Schale 1 ml Wachstumsmedium mit doppelter Konzentration von FKS und Antibiotika zugegeben. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel und nach 24 h wurden die Zellen für weitere Analysen geerntet.

3.2.4.5 Transduktion von eukaryotischen Zellen mit Adenoviren

Die Zellen wurden auf 6-Well Zellkulturschalen (Ø 3,2 cm) ausplattiert und bei einer augenscheinlichen Konfluenz von 60 % mit rekombinanten Adenoviren (1×10^6

PFU/Schale) transduziert. Nach 4h Inkubation im CO₂-Inkubator bei 37°C wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

3.2.4.6 MTT-Assay

Der MTT-Assay (ATCC) ist eine indirekte Methode zur Bestimmung der Zellzahl. Er beruht auf der Umsetzung des Farbstoffes MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen⁷¹. Das resultierende, in Wasser unlösliche Formazan kann dann im Photometer gemessen werden und ist ein Maß für die proliferative Aktivität der Zellen. Der Assay wurde mit porcinen ECs und SMCs nach dem Herstellerprotokoll in 6-Well Schalen durchgeführt.

3.2.5 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden, die in dieser Arbeit nicht genauer erklärt werden, erfolgten nach üblicher Laborpraxis^{73,74}. Kommerziell erhältliche Kits wurden nach den Angaben der Hersteller verwendet.

3.2.5.1 RNA-Isolierung aus Gewebe und cDNA Synthese

Gesamt-RNA wurde aus Kollateralgefäßen nach 3d, 5d, 7d, 10d und 14d postoperativ und aus verschiedenen Organen der Ratte isoliert. Das Gewebe wurde mit der Mixer Mill homogenisiert, Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Micro bzw. Mini Kit (Qiagen) isoliert und anschließend DNase (Turbo DNasefree, Ambion) behandelt. Die Inaktivierung der DNase erfolgte hierbei mit einem Inaktivierungsreagenz. So konnte eine erneute Fällung mit Verlusten vermieden werden. Anschließend wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung (NanoDrop) und Qualitätskontrolle der RNA durchgeführt. Eine Ausbeute von mindestens 30 ng/ µl und ein Quotient OD_{260/280} von mindestens 1,8 waren Voraussetzung für den Einschluss in die Studie. 300 ng Gesamt-RNA wurde revers transkribiert. Dies erfolgte im Volumen von 20 µl mit 200 ng „random“ Nonameren, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs, 1x Reaktionspuffer, 40 U RNaseOUT und 200 U SuperscriptII nach dem SuperscriptII Protokoll von Invitrogen.

3.2.5.2 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Zellen aus einer Schale (Ø 3,2 cm) wurden 1x mit PBS gewaschen und mit 350 µl Puffer RLT (RNeasy Kit, Qiagen) geerntet. Nach einer QiaShredder Behandlung zum

Zellaufschluss wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert und anschließend DNase behandelt (s. 3.2.4.1). Da die Ausbeute insgesamt höher als im Gewebe lag, wurden für die reverse Transkription 1 µg Gesamt RNA eingesetzt.

3.2.5.3 Chip-Analyse

Pro Ratte wurden zwei RNA Proben aus Kollateralgewebe isoliert (jeweils eine Sham-operierte Kontrollprobe aus präformierten, ruhenden Kollateralen und eine aus den Kollateralen 5d nach AV-Shunt). Nach einem zusätzlichen DNase Verdau wurden die RNA Proben in zwei Zyklen linear amplifiziert und danach mit Cy3 und Cy5 Fluorochromen markiert (Amino Allyl MessageAmp aRNA Kit, Ambion). Jedes Probenpaar aus AV-Shunt- und Kontrollkollateralen eines Tieres (je 1 µg cRNA) wurde in Duplikaten nach der „Dye swap“ Methode (Hybridisierung 1: Kontrolle Cy3- und AV-Shunt Cy5-markiert, Hybridisierung 2: AV-Shunt Cy3- und Kontrolle Cy5-markiert) markiert und für 16 h bei 40° C (25 % deionisiertes Formamid, 20 mg Hefe tRNA; Hybridisierungspuffer, Amersham) hybridisiert. Es wurden Microarrays (Whole Rat Genome Oligo Microarray 44K, Agilent), die über 41.000 Rattengene und -transkripte repräsentieren, verwendet. Die Bildanalyse wurde mit dem Agilent-II Scanner und mit der ArrayVision 8.0 Software durchgeführt. Hintergrund-subtrahierte Intensitäten wurden für Nicht-linearität Loess-normalisiert (Limma package) und in die Rosetta Resolver Datenbank und Analyse Software (Version 5.0, Rosetta Biosoftware) importiert. Zur statistischen Analyse wurde ein t-Test durchgeführt und der p-Wert wurde mit der Benjamini-Hochberg Korrektur berechnet. Die Microarray Intensitäten wurden als signifikant bezeichnet, wenn die absolute Intensität größer als 50 war und $p < 0.01$. Ausreichend annotierte Gene wurde mit bioinformatischer Software (Mappfinder 2.0, Pathway Architect, GSEA, KEGG) analysiert.

Diese Experimente fanden in Zusammenarbeit mit Dr. Oskar Volger, Amsterdam statt.

3.2.5.4 Quantitative real-time PCR

Die quantitative PCR wurde im iCycler (Biorad) durchgeführt. 300 ng Gesamt RNA aus Kollateralen 1d, 3d, 5d, 7d und 14d nach Shunt und Ligatur der Femoralarterie bzw. nach

sham Operation wurde zum DNA Verdau mit dem Turbo DNFree Kit (Ambion) behandelt.

Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe des Programms FastPCR (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm>) Es wurde neben der Transkriptspezifität darauf geachtet, dass die Größe des PCR Produkts zwischen 50 und 150 bp lag und dass es eine Exongrenze überspannte.

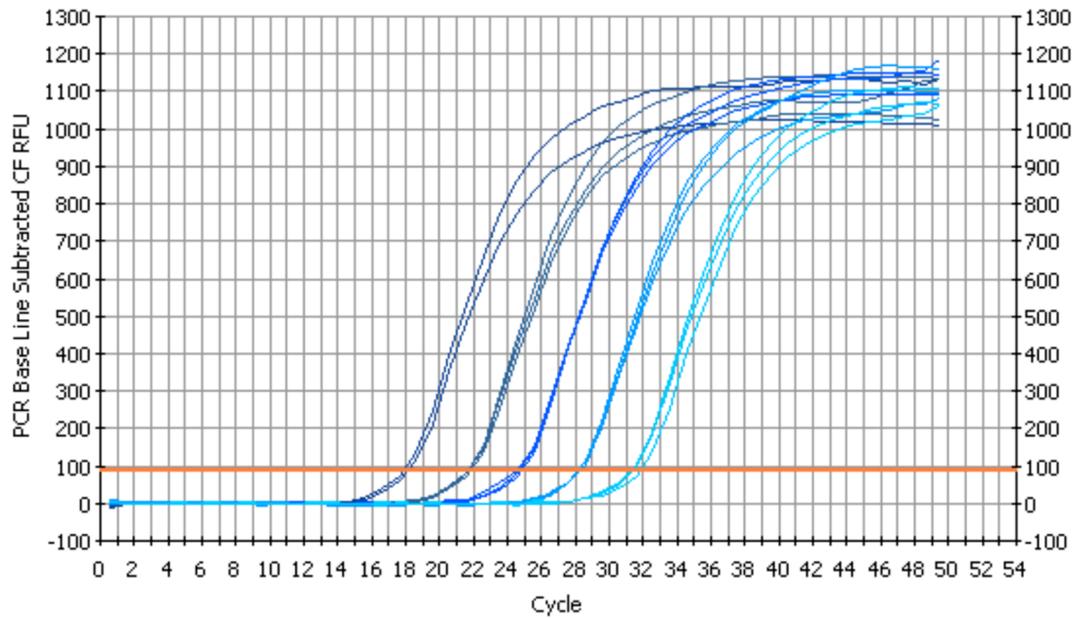
Nach einem Vorversuch zur Verifizierung der Produktgröße mit einer Endpunkt-PCR mit anschließender analytischen Agarose-Gelelektrophorese wurde jede genspezifische PCR zu Beginn optimiert und die PCR-Effizienz über fünf Verdünnungsstufen der Ausgangstranskriptmengen bestimmt (Abb. 4). Mit dieser Methode konnte der dynamische Bereich der PCR ermittelt werden, in dem die Schwellenwerte akkurate und reproduzierbare Ergebnisse lieferten und daher Aufschluss über die tatsächlichen Transkriptmengen in einer Probe gaben. Die Expression der untersuchten Gene wurde auf 18S rRNA normiert. Pro Zeitpunkt wurden Proben aus drei individuellen Ratten analysiert. Für jeweils drei Replikate jeder Probe wurde der mittlere C_t -Wert berechnet. Schließlich wurde für jede Probe die Transkriptmenge relativ zur Kontrollprobe (präformierte Sham-Kollateralen) nach folgender Gleichung berechnet und als Fold change bezeichnet ⁷⁵:

$$\text{Fold change} = \text{Effizienz}^{(\text{Kontrolle } C_t - \text{unknown } C_t)}$$

Die Amplifikation wurde im Reaktionsansatz (je 100 nM Primer, 1x IQ SYBR Green Supermix und 1 μ l cDNA (1:20)) nach genspezifischen Thermoprofilen durchgeführt.

Um festzustellen, ob nur ein spezifisches Produkt entstanden ist, wurde nach dem Lauf eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt.

PCR Amp/Cycle Graph for FAM-490

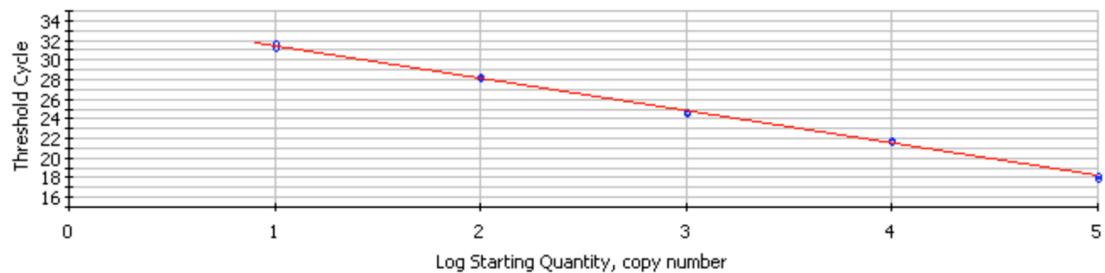


A

Standard Curve Graph for FAM-490

Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,317 Intercept: 34,767 $Y = -3,317 X + 34,767$
 PCR Efficiency: 100,2 %

□ Unknowns
 ● Standards



B

Abbildung 4: Quantitative Real Time PCR. A Profil der Amplifikation eines Zielgens über fünf Verdünnungsstufen und mit je drei Replikaten. **B** Lineare Regression der gemessenen Schwellenwerte pro Verdünnungsstufe. Ableitung der Steigung der Geraden („slope“) sowie der Übereinstimmung der Replikate („correlation coefficient“)

3.2.5.5 siRNA gestützter „knock down“

RNA Interferenz ist der Mechanismus, bei dem doppelsträngige RNA (dsRNA) spezifisch die Expression des Gens unterdrückt, welches die komplementäre Sequenz enthält ⁷⁶. Für den spezifischen „knock down“ der Abra mRNA wurden 10 siRNA Sequenzen in sense und antisense Richtung mit dem Programm siRNA-Finder von Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) ausgewählt.

Die synthetisierten Oligonukleotide wurden zunächst in den pSilencer siRNA Expression Vector nach dem Protokoll aus dem Handbuch kloniert. Je 2 µg des sense siRNA Oligonukleotids und des antisense siRNA Oligonukleotids wurden in 50 µl 1x DNA Annealing solution für 3 min bei 90° C denaturiert und anschließend 1h bei 37° C inkubiert. Nach diesem Annealing-Schritt konnten die siRNA template Oligonukleotide direkt in den pSilencer Vector ligiert werden, da ihre Sequenzen so ausgewählt waren dass sie als Doppelstrang die entsprechenden überhängenden Enden der *BamHI* bzw. *HindIII* Restriktion hatten. 8 ng siRNA Insert wurden mit 1 µl pSilencer Vector in T4 DNA Ligase Puffer und 5U T4 DNA Ligase ü. N. bei 16°C ligiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend in *E.coli* Top 10 transformiert. Die Plasmid DNA von positiven Klonen wurde isoliert und zur Identifikation des siRNA Template Inserts sequenziert.

Zur Quantifizierung der Effizienz des „knock downs“ wurden Cos-1 Zellen mit diesen siRNA Konstrukten und dem Expressionsplasmid pcDNA3_Abra co-transfiziert. Die RNA aus den Zellen wurde nach 24 h isoliert und eine quantitative real-time PCR durchgeführt.

3.2.5.6 Klonierung von DNA Fragmenten

Alle Klonierungen (Restriktion und Elution von DNA-Fragmenten, Ligation, Transformation in Bakterien) wurden gemäß Standard-Techniken durchgeführt ⁷³. Zur Erstellung des Abra-Expressionsplasmids pcDNA3_Abra(rat) wurde der kodierende Bereich der Ratten Abra-cDNA mit den Primern 536 und 537 mittels Pfu DNA-Polymerase amplifiziert, das PCR Produkt aufgereinigt (PCR purification kit, Qiagen) und mit *XhoI* und *HindIII* restringiert. Das geschnittene Fragment wurde in den ebenfalls *XhoI* und *HindIII* geschnittenen Vektor pcDNA3 ligiert und in den *E. coli* Stamm TOP 10

transformiert. Zur Identifizierung von Plasmiden, in die Abra cDNA inseriert war, wurden Plasmid-DNA Mini-Präparationen durchgeführt und sequenziert.

3.2.5.7 Klonierung mit dem Gateway System

Die Gateway Technologie (Invitrogen) beruht auf spezifischen Rekombinationsfähigkeiten des Bakteriophagen Lambda. Sie ermöglicht die relativ schnelle Umklonierung einer DNA Sequenz in verschiedene Expressionsvektor-Systeme. Für diese Arbeit wurden solche für die Herstellung von Adenoviren und für die Produktion des rekombinanten Abra Proteins in *E. coli* benutzt. Es wurde zunächst ein so genannter „ENTRY Vektor“ mit der kodierenden Sequenz von Abra hergestellt, um diesen dann über homologe Rekombination in verschiedene „DESTINATION Vektoren“ zu überführen.

3.2.5.8 Generierung von Adenoviren

Rekombinante Adenoviren können sowohl in der Forschung als auch therapeutisch zur Einführung genetischen Materials in Empfängerzellen verwendet werden. Ad_Abra, Ad_LacZ sowie Ad_siRNA_LacZ und Ad_siRNA_Abra wurden zur Infektion von Zellen sowie *in vivo* (intra-kollateraler Gentransfer) eingesetzt. Sie bleiben nach der Infektion der Zelle epichromosomal, d.h. sie integrieren nicht in das Genom der Empfängerzelle und ermöglichen somit eine transiente Expression des Transgens für 2-3 Wochen. Die kodierende Sequenz des Abra Gens (Spenderorganismus: Ratte) wurde in den viralen Vektor pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen) eingebracht. Zum „knock down“ wurden zwei verschiedene funktionale siRNA-Sequenzen in den promotorlosen Vektor pAd/PL-DEST (Invitrogen) kloniert. Beide Vektoren enthalten humane Adenovirus Typ 5 Sequenzen für die Verpackung und Produktion von Adenoviren. Die komplette E1 Region ist deletiert. Durch eine Transfektion dieser rekombinanten Vektoren in die humane Zelllinie 293A wird die E1 Deletion komplementiert und eine virale Replikation kann stattfinden. Folgende adenovirale Konstrukte wurden hergestellt:

pAd/CMV/Abra	Ad_Abra
pAd/CMV/LacZ (Kontrolle aus dem Kit)	Ad_LacZ
pAd/U6/siRNA3_Abra	Ad_siRNA3_Abra
pAd/U6/siRNA10_Abra	Ad_siRNA10_Abra
pAd/U6/siRNA_LacZ (Kontrolle aus dem Kit)	Ad_siRNA_LacZ

3.2.5.8.1 Adenovirusklonierung

Für die Herstellung des rekombinanten Virus Ad_Abra wurde RNA aus wachsenden Kollateralgefäßen der Ratte isoliert und revers transkribiert. Es folgte die Amplifikation der cDNA mit den genspezifischen Primern 541 und 542 vom Start Codon bis zum Stop Codon. Über die in den PCR-Primern enthaltenen Schnittstellen (*HindIII*, *XhoI*) wurde das Fragment in pENTR A1 kloniert. Hierbei erhielt man pENTR_Abra, der dann über homologe Rekombination mit pAd/CMV/V5-DEST in das Rekombinationsplasmid pAd_Abra überführt wurde. Zur Herstellung der Ad_siRNA_Abra Konstrukte wurde der BLOCK-iT U6 RNAi Entry Vector Kit verwendet: Zwei funktionale siRNA Sequenzen (3 und 10) wurden ausgewählt. Wie im Handbuch beschrieben, wurden jeweils komplementäre DNA Oligonukleotide (545, 546 und 547, 548) mit 4 Nukleotiden Überhang zur direktionalen Klonierung synthetisiert. Nach der Hybridisierung wurden die doppelsträngigen Oligonukleotide in pENTR/U6 kloniert. Die so entstandenen Entry Klone pENTR/U6/siRNA3_Abra und pENTR/U6/siRNA10_Abra wurden über homologe Rekombination mit pAd/PL-DEST zu pAd/U6/siRNA3_Abra und pAd/U6/siRNA10_Abra. Zur Virusherstellung folgte in allen adenoviralen Plasmiden eine *PacI*-Restriktion, die zur Exposition der rechten und linken viralen inversen terminalen Repetitionen (ITRs) führte. Hierbei wurden auch die bakteriellen Sequenzen (pucOri und Ampizillin-Resistenz) entfernt. Die geschnittenen Plasmide wurden in 293A Zellen, die stabil die viralen E1a und E1b Gene exprimieren, einmalig mit Metafectene (s. 3.2.3.4) transfiziert. Das nach 10 - 13 Tagen geerntete Virenrohlysat diente dann zur Amplifikation der Viren.

3.2.5.8.2 Adenovirusproduktion und -reinigung

Die Amplifikation der Adenoviren erfolgte durch Infektion der 293A Zellen mit 500 µl Virenrohlysat. Sobald die meisten Zellen zytopathische Effekte zeigten, sich abrundeten und ablösten, wurden sie geerntet, 15 min bei 3500 rpm zentrifugiert und anschließend in 10 ml Medium resuspendiert. Der Überstand wurde ebenfalls aufbewahrt, da er auch Virus enthält. Der Zellaufschluss erfolgte durch 3 Einfrier-/Auftauzyklen (15 min -80°C, 30 min 25°C). Anschließend wurde der Debris 5 min bei 3500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem restlichen Medium kombiniert und 60 ml wurden für die anschließende Reinigung über eine Ionenaustauschermembran, die adenovirale Partikel bindet (Vivapure AdenoPACK 100, Vivascience), verwendet. Über eine Ultrafiltration erfolgte schließlich

noch eine Konzentration und Umpufferung in PBS. Die gereinigte Viruslösung wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.5.8.3 Titerbestimmung

Der QuickTiter Adenovirus Titer Immunoassay Kit verwendet einen Antikörper gegen adenovirale Hexonproteine um infizierte Zellen über Immunzytochemie Färbung zu visualisieren. 293A Zellen wurden in eine 24-Well Platte ausgesät. Nach einer Stunde wurden diese mit einer seriellen Verdünnung des Adenovirus infiziert und für 48 h inkubiert. Es folgte eine Immunfärbung und positive Zellen wurden ausgezählt und der Virustiter in PFU/ ml berechnet. Die gereinigte Lösung der in Abwesenheit der Zelllinie replikationsdefekten Viren wurde dann zur Transduktion von Zellen und zur intravaskulären Injektion in Ratten und Kaninchen verwendet.

3.2.5.9 *In situ* Hybridisierung

Zur zellulären Lokalisation von Abra wurde eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt. Hierfür wurde eine DIG markierte Abra RNA-Sonde mit *in vitro* Transkription hergestellt, und anschließend wurden Paraffinschnitte von Adduktormuskeln Shunt-behandelter und Ligatur-behandelter Ratten hybridisiert.

3.2.5.9.1 Herstellung der DIG-markierten Sonde

Das vorhandene Expressionskonstrukt pcDNA3_Abra(rat) konnte für die Herstellung der Sonde benutzt werden. Da der pcDNA3 Vektor auf beiden Seiten der Multiple Cloning Site zwei verschiedene Phagen Transkriptionspromotoren (SP6 und T7) in gegensätzlicher Orientierung enthält, war es möglich, selektiv sense und anti-sense Sonden *in vitro* zu transkribieren.

Jeweils 40 μg pcDNA3_Abra(rat) wurden mit *HindIII* bzw. *XhoI* linearisiert. Nach einer Reinigung (Qiaquick Purification Kit, Qiagen) wurden nach dem Protokoll des DIG RNA Labeling Kits (SP6/T7) von Roche 1 μg linearisiertes Plasmid in 1x Transkriptionspuffer, 1 mM ATP, 1 mM CTP, 1 mM GTP, 0.65 mM UTP, 0.35 mM DIG-11-UTP, 20 U RNase Inhibitor und 40 U SP6 RNA Polymerase (*HindIII*-Fragment) bzw. T7 RNA Polymerase (*XhoI*-Fragment) *in vitro* transkribiert.

3.2.5.9.2 Protokoll der *in situ* Hybridisierung von Paraffinschnitten

1	Xylol	2x 3'	RT
2	100% Ethanol	2x 3'	RT
3	95% Ethanol	3'	RT
4	70% Ethanol	3'	RT
5	50% Ethanol	3'	RT
6	4% PFA	15'	RT
7	PBS	5'	RT
8	Proteinase K	10 - 15'	RT
9	Glycin	10'	RT
10	PBS	5'	RT
11	PFA	15'	RT
12	Essigsäureanhydrid in TEA	10'	RT
13	PBS	2x 5'	RT
14	Prähybridisierungspuffer	15'	65°
15	Sonde (50 -150µl/Objektträger)	ü. N.	65°
16	mit Lösung 1 (vorgewärmt auf 65°) Deckgläser abspülen	kurz	65°
17	Lösung 1	15'	65°
18	Lösung 1	30'	65°
19	Lösung 3	15'	65°
20	Lösung 3	30'	65°
21	TBST + Levamisol	3 x 10'	RT
22	5% Schafserum in TBST	30'	RT
23	Anti-DIG-AP in TBST (150 µl/ Objektträger)	ü. N.	+4°
24	mit TBST Deckgläser abspülen	kurz	RT
25	TBST + Levamisol	2x 30'	RT
26	NTMT	3x 10'	RT
27	NBT/BCIP in NTMT	ü. N.	RT
28	STOP: 4% PFA	ü. N.	+4°
29	PBS	15 min	RT
30	eindeckeln oder Eosin-Färbung		

Für die *in situ* Hybridisierung wurden folgende Lösungen benötigt:

10x PBS: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 14,7 mM KH₂PO₄, pH 7.4

4% PFA: 4% PFA in PBS

Essigsäureanhydrid in TEA: 125 mM TEA, 25 mM Essigsäureanhydrid in DEPC H₂O

Proteinase K: 1 µg/ml in PBS

Glycin: 2 mg/ ml PBS

Prähybridisierungspuffer: 50% Formamid, 5x SSC pH 4.5, 50 µg/ ml Hefe RNA, 1% SDS, 50 µg/ ml Heparin

20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na₃citrat, pH 4.5

Lösung 1: 50%Formamid, 5x SSC, 1% SDS

Lösung 3: 50 % Formamid, 2x SSC

10 x TBS: 2 M NaCl, 25 mM KCl, 250 mM Tris, pH 7.5

TBST+ Levamisol: 1x TBS, 1% Tween 20, 2 mM Levamisol (Tetramisol-Hydrochlorid)

NTMT: 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris pH 9.5, 0,1% Tween 20, 2 mM Levamisol

NBT/ BCIP in NTMT: 4,5 µl/ ml NBT, 3,5 µl/ ml BCIP

Vorbehandlung des Antikörpers:

6 mg pulverisiertes Mausgewebe/ ml TBST für 30 min bei 70° inkubieren, Eis

+ 10 µl Schafserum (inaktiv)

+ 2 µl Anti-DIG Antikörper

1h bei +4° schütteln, 10 min bei 4° mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren

Überstand auf 4 ml mit TBST (1% Schafserum) auffüllen.

3.2.6 Proteinbiochemische Methoden

3.2.6.1 Proteinextraktion aus Zellen

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden die Zellen einer Schale (Ø 3,2 cm) einer 6-Well Platte einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Zellysepuffer abgeschabt und 5 x 30 sec bei 40% Leistung und 50% Schalltakt mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach 1 min kochen des Homogenisats und anschließender Zentrifugation (1 min bei 12000 g) wurde der Überstand abgenommen und bei -20° C gelagert.

3.2.6.2 SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden auf denaturierenden SDS-PAGE Gelen (Invitrogen) entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt. Alle Arbeitsschritte wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese und dem Blotten der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen wurden diese mit RedAlert (Novagen) gefärbt, um die Uniformität der einzelnen Spuren zu überprüfen.

3.2.6.3 Western Blot

Zur Identifizierung und Quantifizierung immobilisierter, spezifischer Antigene wurden Western Blot Analysen mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern durchgeführt.

Nach 1 h Blocking der Membran in 5% Milchpulver in TBST folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in Blocking Lösung bei 4° C ü. N. Es folgten 6 x 7 min Waschen in TBST und Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in 5% Milchpulver in TBST für 1h bei RT. Nach erneutem mehrmaligen waschen mit TBST erfolgte die Detektion mit dem Femto Reagenz (Pierce). Hierfür wurde die Detektionslösung auf die Membran aufgetragen und 5 min bei RT inkubiert. Die Chemoluminszenzdetektion erfolgte im VersaDoc (BioRad).

3.2.6.4 Generierung eines Abra Antikörpers

Da kommerziell kein Antikörper, der gegen das Protein Abra gerichtet ist, erhältlich war, musste ein Antikörper hergestellt werden. Als Antigen wurden zwei Peptide aus der bekannten Proteinsequenz aus Ratte (Acc: Q8K4K7) ausgewählt: Aminosäuren (AS) 1 - 15: MAP GET VRE AGP AKS C - CONH₂ und AS 273 - 287: CHK GDE GYG RPK EGS K - CONH₂. Über das zusätzliche Cystein wurden diese Peptide an KLH (Keyhole Limpet Hämocyanin) gekoppelt.

3.2.6.4.1 Immunisierung von Hühnern

Die Herstellung des Antikörpers wurde von einem kommerziellen Anbieter (Eurogentec, Belgien) in Hühnern durchgeführt. Bei dem eingesetzten Immunisierungsprotokoll wurden zwei Hühner mit beiden Peptiden immunisiert. Ein Huhn legte keine Eier! Die Eier des anderen Tieres wurden gesammelt und die Eidotter wurden kombiniert. Anschließend wurden die polyklonalen Immunglobuline isoliert.

3.2.6.4.2 Antikörperreinigung

Die Isolierung polyklonaler Immunglobuline aus Hühnereiern erfolgte in einer Zwei-Schritt Prozedur nach einem modifizierten Protokoll ⁷⁷. 10 ml Eigelb wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Natrium Phosphat Puffer (0,1 M; pH 7.6) auf 25 ml aufgefüllt und gemischt. Anschließend wurde 20 ml Chloroform zugegeben und sofort geschüttelt bis sich eine halb feste Phase gebildet hat. Nach einer Zentrifugation bei 1200 g für 30 min

wurde der Überstand in ein Corexröhrchen dekantiert und PEG 6000 wurde in einer Endkonzentration von 12% (w/v) zugegeben. Nach einer Zentrifugation bei 15700 g für 10 min wurde das Pellet in 2 ml Natrium Phosphat Puffer resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

Im zweiten Schritt wurden die Immunglobuline affinitätsgereinigt. Zur Herstellung einer Affinitätschromatographiesäule wurden 0,5 g Cyanogenbromid aktivierte Sepharose 4B (Amersham) nach dem Herstellerprotokoll in 20 ml 1 mM HCl aufgeschwollen und mit 12 mg Peptid in 2,5 ml Kopplungspuffer (0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃, pH 8.3) 1 h auf einem Rollinkubator inkubiert. Die Peptid/Kopplungspuffer/Sepharose Lösung wurde in eine Säule überführt und mit 15 ml Kopplungspuffer gewaschen. Die Säule wurde mit 3 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) gespült und für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Säule fünfmal mit 3 ml Acetatpuffer (0,5 M NaCl, 0,1 M Ammoniumacetat, pH 4.0) und 3 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) gespült. Zum Schutz vor Bakterien- oder Pilzbefall wurde die Säule dreimal mit 1 ml 0,05% NaN₃ in PBS gespült und bei +4°C gelagert.

Die Chromatographie wurde bei 4°C durchgeführt. Die vorbereitete Säule wurde mit 50 ml PBS von NaN₃ befreit. 8 ml des Eilysates wurden mit PBS auf 50 ml Volumen gebracht und anschließend auf die Säule gegeben. Nach erneutem Spülen mit 50 ml PBS wurden die gebundenen Antikörper mit 8,5 ml Elutionspuffer aus der Säule gelöst und in 2 ml Aliquots in 15 ml Falcon Zentrifugenröhrchen, in die 0,8 ml Tris/HCl (zur pH-Wert Neutralisation) vorgelegt war, aufgefangen. Der Antikörperlösung wurden 0,1 mg/ml BSA als Trägersubstanz hinzu gegeben, sie wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Säule wurde mit 3 ml Tris/HCl neutralisiert, mit 10 ml PBS gespült und in 0,05% NaN₃ PBS gelagert.

3.2.7 Immunhistochemie

Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Gewebe mit Tissue-Tec (OTC Compound, Miles Inc, USA) in flüssigem Stickstoff konserviert und bei -80°C aufbewahrt. Für die Anfertigung von 8 µm dicken Gefrierschnitten wurde das Gewebe aufgeblickt und mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (Kryostat CM 3000, Leica) geschnitten und auf Glasobjektträger aufgenommen.

3.2.7.1 Färbung

Zur vorläufigen Beurteilung der Gewebeerhaltung und -beschaffenheit wurden vor der Immunhistochemie von allen Gewebeproben zunächst Hämalaun-Eosin-(HE) Färbungen angefertigt:

1	Hämalaun nach Mayer (Chroma)	10 min
2	Bläuen in fließendem Leitungswasser	5 min
3	Aqua dest.	eintauchen
4	Eosin 2% (Chroma)	6 min
5	95% Ethanol	2x eintauchen
6	100% Ethanol	2x 30 sec
7	Xylol	5 min
8	Eindecken mit Entellan (Merck)	

Mit Hilfe spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper können die korrespondierenden Antigene im Gewebe identifiziert und lokalisiert werden. Es wurde sowohl die direkte Methode mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern als auch die indirekte Methode, bei der ein unmarkierter primärer Antikörper spezifisch gegen das Antigen bindet und dann mit Hilfe eines konjugierten sekundären Antikörpers nachgewiesen wird, verwendet:

1	Fixierung	4% PFA	10 min	RT
2	Trocknen			RT
3	Waschen	PBS	3 x 3 min	RT
4	Inkubation	Primärantikörper	ü. N.	4°
5	Waschen	PBS	3 x 3 min	RT
6	Inkubation	Sekundärantikörper	1 - 2 h	RT
7	Waschen	PBS	3 x 3 min	RT
8	Inkubation	2. Primärantikörper oder Phalloidin	1 h	RT
9	Waschen	PBS	3 x 3 min	RT
10	Inkubation	Kernfarbstoff	15 - 30 min	RT
11	Waschen	PBS	3 x 3 min	RT
12	Eindecken	Mowiol		

3.2.7.2 Mikroskopie

Zur Untersuchung hinsichtlich Schnittrichtung, Erhaltung und Beschaffenheit wurden die Gewebeproben nach Schnell- und Übersichtsfärbungen lichtmikroskopisch unter Durchlicht im DM-RB Mikroskop (Leica) betrachtet.

Immunhistochemisch markierte Strukturen wurden mit Hilfe desselben Mikroskops unter Verwendung einer 100 W Quecksilberdampfampe (Osram) visualisiert. Sollten verschiedene Ebenen eines Präparates für hochauflösende Bilder untersucht werden, wurde die konfokale Lasermikroskopie (TCS SP, Leica) verwendet. Hierbei erfolgen die Anregung mit Laserlicht und das Fokussieren des emittierten Lichts nur aus der Focusebene unter Abschirmung des Streulichts aus anderen Schichten. So wurde die Darstellung der dreidimensionalen Ausdehnung der Strukturen durch alle Ebenen ohne Beeinträchtigung von Schärfe und Kontrast ermöglicht.

3.2.8 Statistik

Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM (Standard error of mean). Die Zellproliferation sowie die quantitative RT-PCR wurden mit dem Student t-Test verglichen. Die statistische Auswertung der maximalen kollateralen Konduktanzen erfolgte mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA). Ein Ergebnis mit der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ galt als signifikant.

4 Ergebnisse

Arteriogenese, das Wachstum von Kollateralarterien, kann durch den Verschluss der Femoralarterie in Ratten und Kaninchen induziert werden. Die spontan ablaufenden arteriogenen Prozesse ersetzen aber nur 40% der Konduktanz der verschlossenen Arterie.

Eine vollständige Wiederherstellung der vaskulären Funktion im Kaninchenmodell konnte erstmals durch das Anlegen einer arterio-venösen Fistel distal der Ligatur zwischen Femoralarterie und benachbarter Vene erreicht werden. Auf diese Weise wurde ein großer permanenter Druckgradient kreiert, der den Großteil des kollateralen Flusses in die Vene drainiert und einen kleineren Anteil in die periphere Zirkulation. Das resultierte in einem drastischen Anstieg der Geschwindigkeit des kollateralen Flusses, welche eine Erhöhung der Schubspannung zur Folge hatte. Dies führte zu einer permanenten Stimulation der Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen und somit zu aktivem Gefäßwachstum.

Es sollte Aufschluss über die molekularen Mechanismen gewonnen werden, die diesen physikalischen Stimulus der Schubspannung in ein Wachstumssignal transduzieren. Ein Gen, welches hoch in der Hierarchie der Signalketten angesiedelt ist und durch Gentherapie oder durch synthetische „small molecules“ aktiviert werden kann, um damit die Arteriogenese gezielt zu stimulieren, würde eine pharmakologische Behandlungsmöglichkeit okklusiver Gefäßerkrankungen eröffnen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Wissenslücken, die zwischen der mikroskopisch sichtbaren Aktivierung des Endothels durch Schubspannung und dem hämodynamischen Effekt (Wachstum von Arteriolen und Transformation von regulativen Arteriolen in konduktive Arterien) existieren, geschlossen werden.

Die Adaption des chirurgischen Modells des arterio-venösen Shunts von zunächst Schweinen und Kaninchen auf Ratten ermöglichte, das Expressionsprofil wachsender Kollateralgefäße während maximaler Stimulation in einem Organismus zu ermitteln, dessen Genom vollständig bekannt ist. Dazu wurden Kollateralgefäße aus Shunt-behandelten Ratten ohne das umgebende Gewebe herauspräpariert, RNA isoliert und mit Hilfe von Microarrays untersucht. Zum Vergleich dienten präformierte Kollateralen. Biologisch interessante Zielgene aus der Liste der differentiell exprimierten Gene wurden mit einer unabhängigen Technik validiert. Das „Actin-binding Rho activating protein“ (Abra), dessen

Expressionsverlauf mit der Einwirkung der Schubspannung korreliert, wurde genauer charakterisiert und in der Gefäßwand lokalisiert. Schließlich wurde die Expression dieses Gens in Zellkultur und *in vivo* moduliert, um seine Beteiligung an der Arteriogenese zu bewerten.

4.1 AV-Shunt bei der Ratte

Zu Beginn der Arbeit war das Modell des AV-Shunts zwischen der Femoralarterie und der benachbarten Vene in Schweinen und Kaninchen etabliert. Um molekularbiologische Untersuchungen auf Microarrays durchzuführen, die es ermöglichen einen Gesamtüberblick des Genexpressionsmusters zu erhalten, musste der chirurgische Eingriff auf ein Tiermodell adaptiert werden, dessen Genom vollständig bekannt ist und für das solche Gesamtgenom-Chips zur Verfügung stehen.

Zur Feststellung, ob die Anlage des AV-Shunts im Rattenmodell ebenfalls eine stimulierende Wirkung auf die Arteriogenese hat, wurden post mortem Angiogramme 7 und 14 Tage nach Operation ausgewertet. Im Vergleich zur einfachen Ligatur zeigte sich eine Steigerung in Anzahl und Durchmesser der sichtbaren Kollateralen (Abb. 5). Diese Kollateralgefäße konnten aus dem M. quadriceps herauspräpariert werden und es gelang aus dem Kollateralgewebe eines Rattenbeines 300-500 ng Gesamt RNA zu isolieren.

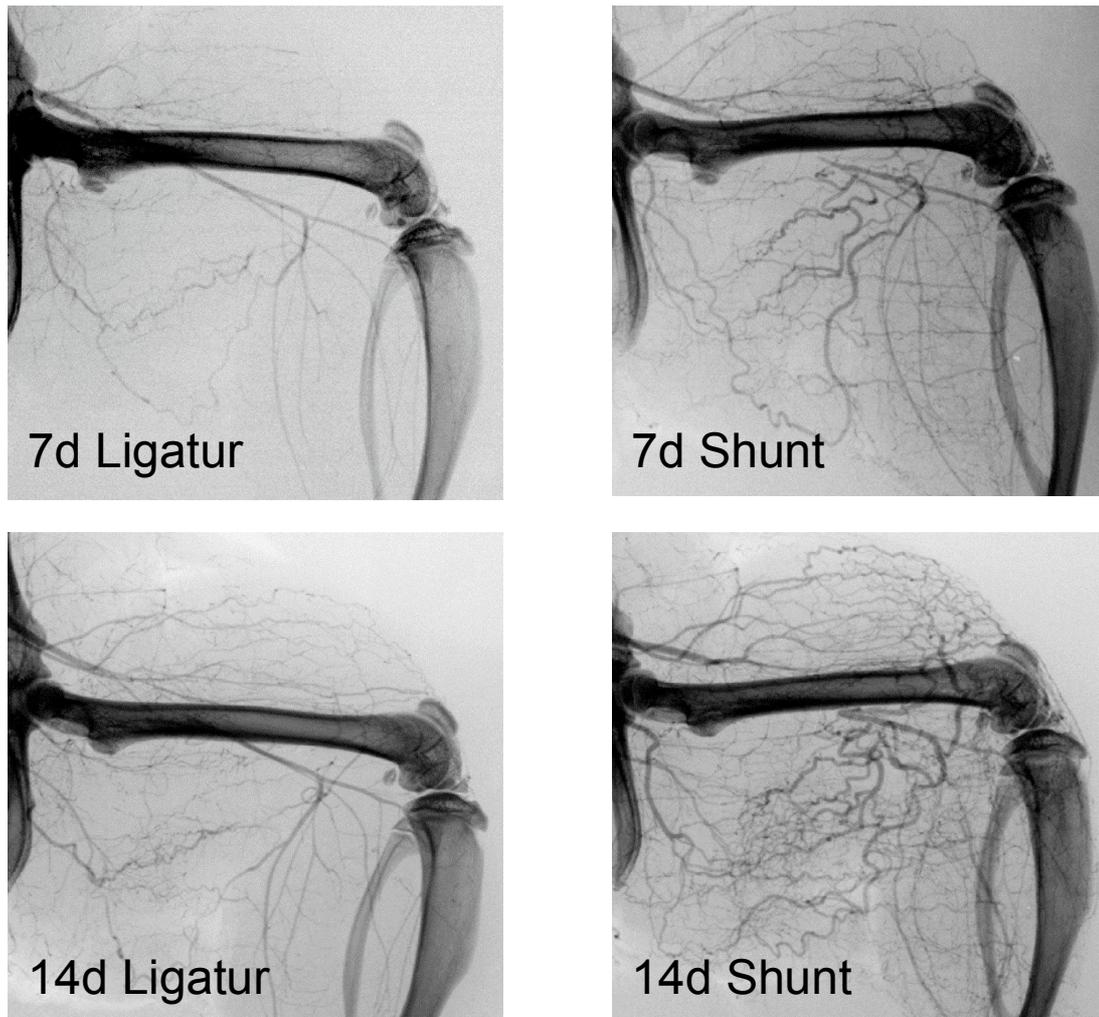


Abbildung 5: Post mortem Angiographien des Gefäßsystems im Rattenhinterlauf. Vergleichende Darstellungen der Kollateralegebiete nach einfacher Ligatur und nach Ligatur und Shunt 7d und 14d nach der Behandlung. Die Anlage des AV-Shunts steigert die Größe und Anzahl der sichtbaren Kollateralen im Vergleich zur einfachen Ligatur.

4.2 Microarray Expressionsanalyse und Pathway Analyse

Das Ziel der Microarrayanalyse war es Kandidatengene bzw. Signalwege zu finden, die für die starke Stimulation des Kollateralwachstums durch erhöhte Schubspannung verantwortlich sein könnten. Daher wurde eine genomweite Analyse des Expressionsprofils durchgeführt, indem von drei individuellen Ratten die Expressionsmuster zwischen AV-Shunt- und Sham operiertem Kontrollkollateralgewebe verglichen wurden.

RNA aus Kollateralgefäßen 5d nach Shunt Behandlung und RNA aus Gefäßen der sham operierten Seite wurde isoliert und zur Hybridisierung von Microarrays (Whole Rat Genome Oligo Microarray 44K, Agilent) verwendet. 3820 statistisch signifikante ($p < 0,05$)

Gene wurden detektiert. Davon waren bei einem Schwellenwert von $\geq +2$ bzw. ≤ -2 927 Gene hoch- und 624 herunterreguliert. Eine Cluster Analyse zeigte eine gute Korrelation in den Expressionsprofilen zwischen den drei individuellen Ratten (Abb. 6).

In dieser Liste befinden sich Zielgene, deren Beteiligung am Wachstum von Kollateralen bekannt ist. Cofilin (2,8-fach \uparrow , $p=0,08$), Osteopontin (7,5-fach \uparrow , $p=0,017$), Vimentin (3,6-fach \uparrow , $p=0,00692$), Connexin 39 (3,5-fach \uparrow , $p=0,00035$), Fibronectin (4,8-fach \uparrow , $p=0,00274$), RhoA (2,0-fach \uparrow , $p=0,01088$), Thymosin β 4 (Tmsb4) (2,4-fach \uparrow , $p=0,00328$). Andere bekannte Arteriogenesegene wurden nicht oder nur leicht verändert vorgefunden: RGS5, caldesmon, endothelial cell adhesion molecule (Esam 1,6-fach \uparrow , $p=0,0278$, Fibulin 1,4-fach \uparrow , $p=0,0185$), Tenascin (1,8-fach \downarrow , $p=0,04817$).

Auffällig war vor allem, dass keine signifikanten Änderungen des Expressionsniveaus der bekannten vaskulären Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren detektiert wurden.

Weiterhin wurde mit dem endothelialen Transkriptionsfaktor „Krüppel-like-factor“ Klf2 (5,7-fach up, $p=0,00048$) ein Gen vorgefunden, das bisher nicht mit Arteriogenese aber mit der murinen Vaskulogenese und vor allem mit einer spezifischen Flussregulation *in vitro* in Zusammenhang gebracht wurde⁷⁸.

Zur Identifikation neuer Gene und Signalwege, die Schubspannung und arteriogene Antwort verbinden, wurde die biologische Signifikanz mit Hilfe der Analyse funktioneller Gruppen von Genen bestimmt. Dazu wurde die Teilmenge der 1551 differentiell exprimierten Gene in die KEGG Pathway Datenbank importiert (<http://www.genome.jp/kegg/>). Es zeigte sich eine Anreicherung der differentiell exprimierten Gene in den Signalwegen der Regulation des Aktinzytoskeletts und des Kalziumhaushalts (Abb. 7).

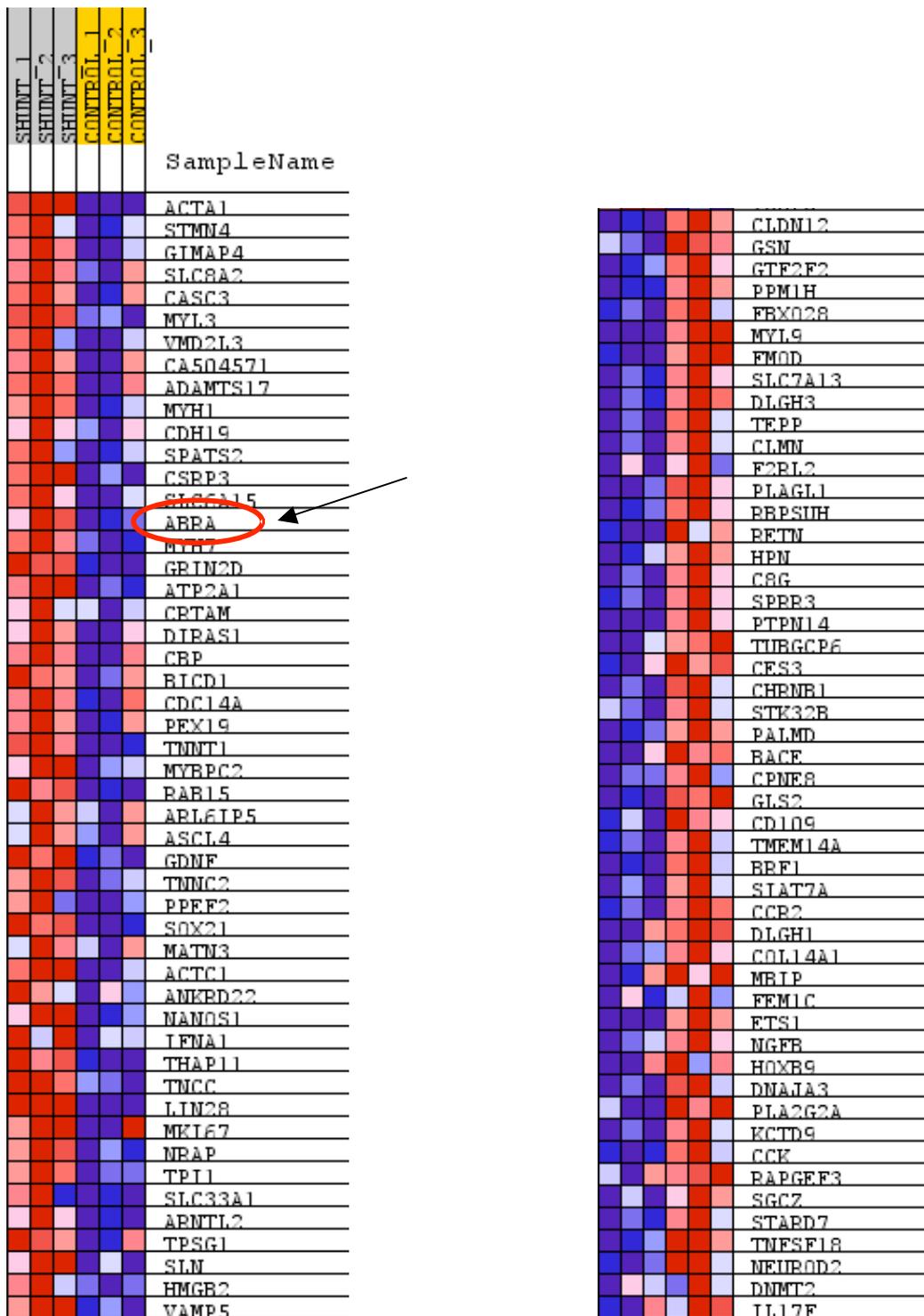


Abbildung 6: Heat map der 100 Gene, die am stärksten differentiell exprimiert werden. Graphische Darstellung der Expression der A am stärksten hoch- und B am stärksten herunterregulierten Gene. Die ersten drei Spalten zeigen die Ergebnisse der Shunt-Kollateralen, die anderen Spalten zeigen die Kontroll-Kollateralen. Rot: hohe Expression, blau niedrige Expression. Der Pfeil markiert Abra.

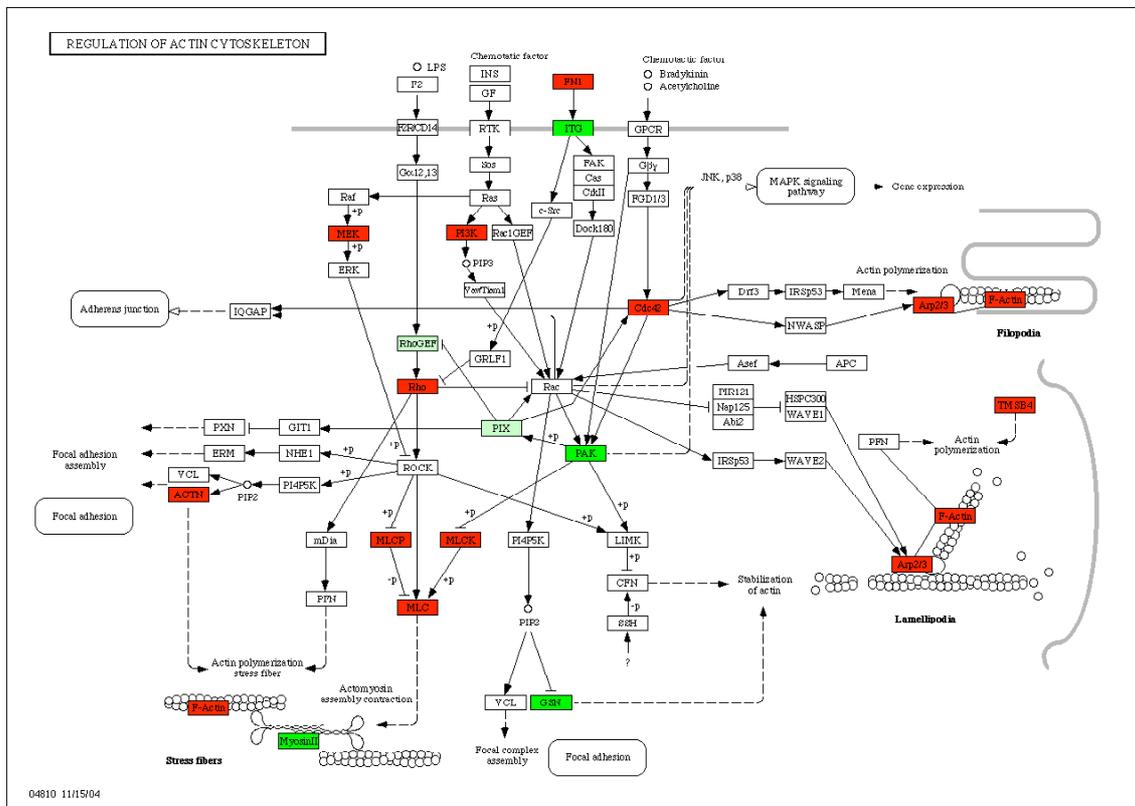
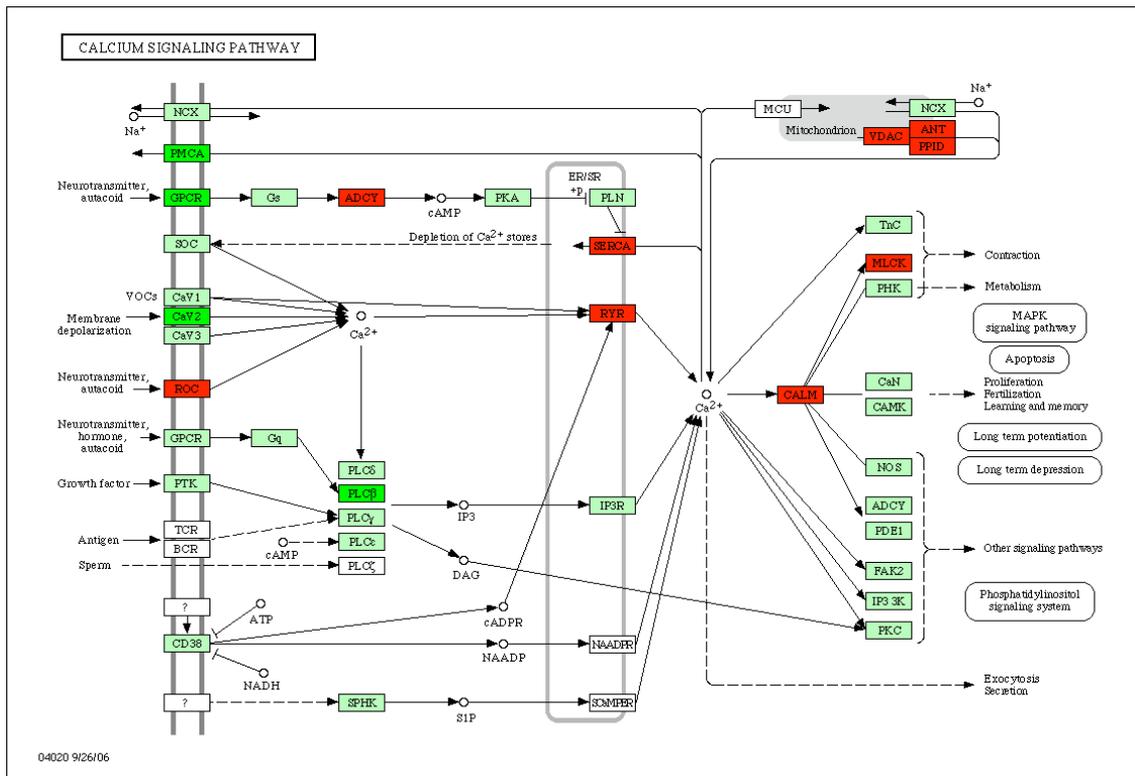


Abbildung 7 (vorherige Seite) : Schemata der Signalwege des Kalziumhaushalts und der Regulation des Aktinzytoskeletts in der Ratte. Die Genliste wurde in KEGG importiert. Rot markiert sind Gene, die während des schubspannungs-stimulierten Wachstumsprozesses hochreguliert sind, grün markiert sind die herunterregulierten Gene.

4.3 Validierung verschiedener Zielgene mit quantitativer real-time PCR

Zur Validierung der Daten aus der Microarrayanalyse wurden einige ausgewählte Gene mit einer unabhängigen Technik validiert. Die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) erlaubt die Quantifizierung sehr geringer Mengen RNA. 300 ng RNA aus Kollateralarterien zu verschiedenen experimentellen Zeitpunkten (1d, 3d, 5d, 7d und 14d) nach der Anlage des AV-Shunts wurden revers transkribiert und mit genspezifischen Primern amplifiziert. Die Gene, die für „cardiac ankyrin repeat Protein“ (Carp), Osteopontin (Opn) und Thymosin β 4 (Tmsb4) kodieren, wurden repräsentativ für bekannte Arteriogenesegene gewählt, das gleiche galt für „Krueppel-like-factor“ (Klf2) als Vertreter der Schubspannungsvermittlung. (Abb. 8 und 9)

Da das Ziel der Analyse die Identifikation neuer Gene war, wurde nach biologischer Signifikanz ein weiteres stark hoch reguliertes Gen ausgewählt, das zuvor weder mit Arteriogenese noch mit Mechanotransduktion in Zusammenhang gebracht wurde. Es kodiert für das „Actin-binding Rho activating protein“ (Abra). Außerdem wurde mit Trpv4 ein hoch regulierter Kalziumkanal untersucht, der für die Änderung des Kalziumhaushalts verantwortlich sein könnte. (Abb. 10)

Für alle Gene, die mit qRT-PCR analysiert wurden, konnte die differentielle Expression nach Shunt-Anlage im Vergleich zur Sham Kontrolle bestätigt werden. Der Verlauf der Abra Expression erschien besonders interessant. Es zeigte sich ein Abfall nach einfacher Ligatur nach einem Expressionspeak am Tag 3, genauso wie sich die Schubspannung unter physiologischen Bedingungen verhält, wenn der Gefäßdurchmesser steigt. Unter anhaltend erhöhter Schubspannung im Shuntmodell wird die Abra Expression aufrechterhalten und es war noch eine 10-fache Hochregulierung nach 14 Tagen zu beobachten (Abb. 10).

Da es eine Korrelation zwischen der Abra Expression und der Schubspannung zu geben scheint, wurde dieses Gen in weiteren Experimenten genauer charakterisiert.

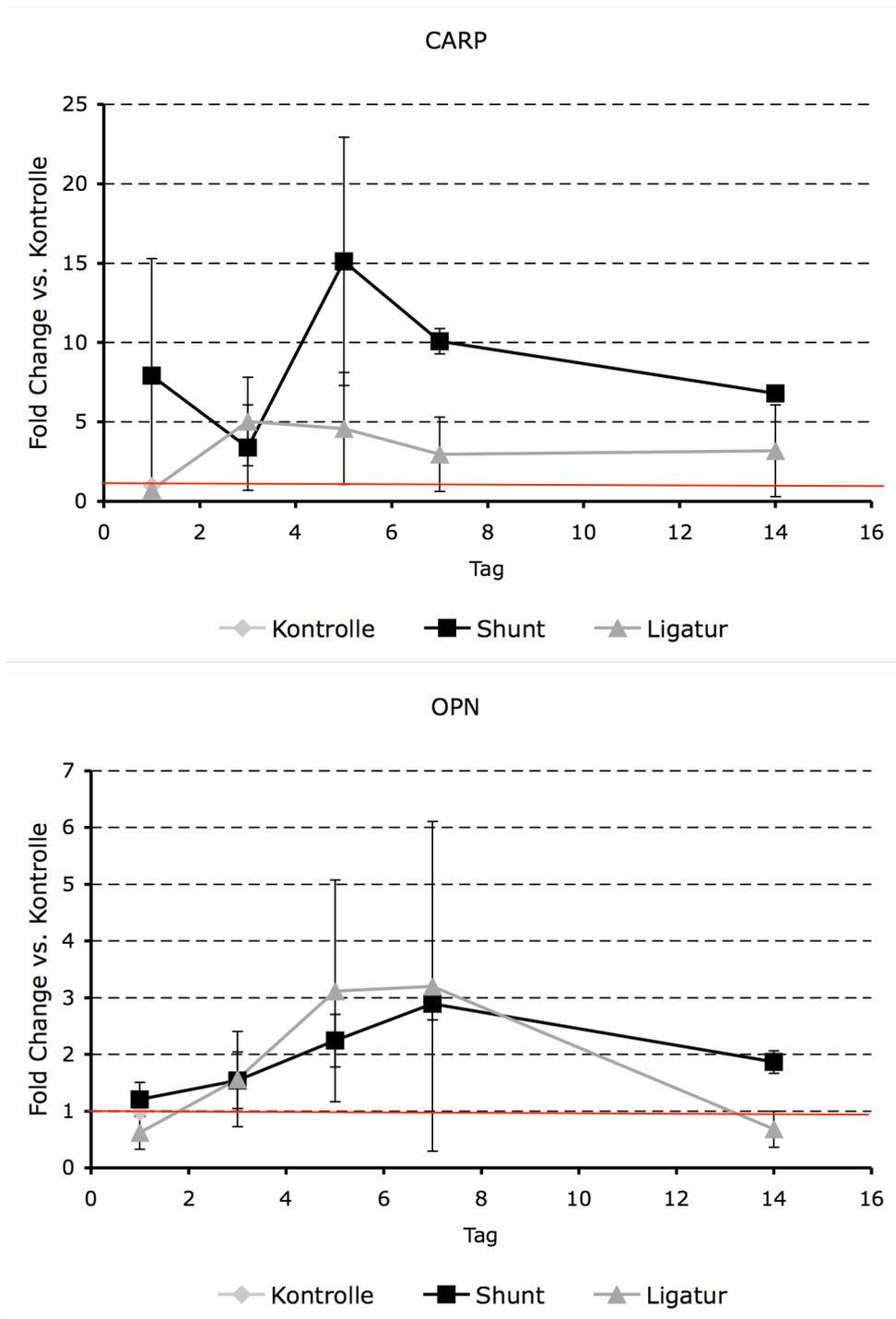


Abbildung 8: qRT-PCR von *Carp* und *Opn*. Zeitverlauf der mRNA Expression in den Kollateralen nach Shuntbehandlung und einfacher Ligatur im Vergleich zu präformierten Kollateralen (rote Linie). Die relative Anzahl der Transkripte wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM

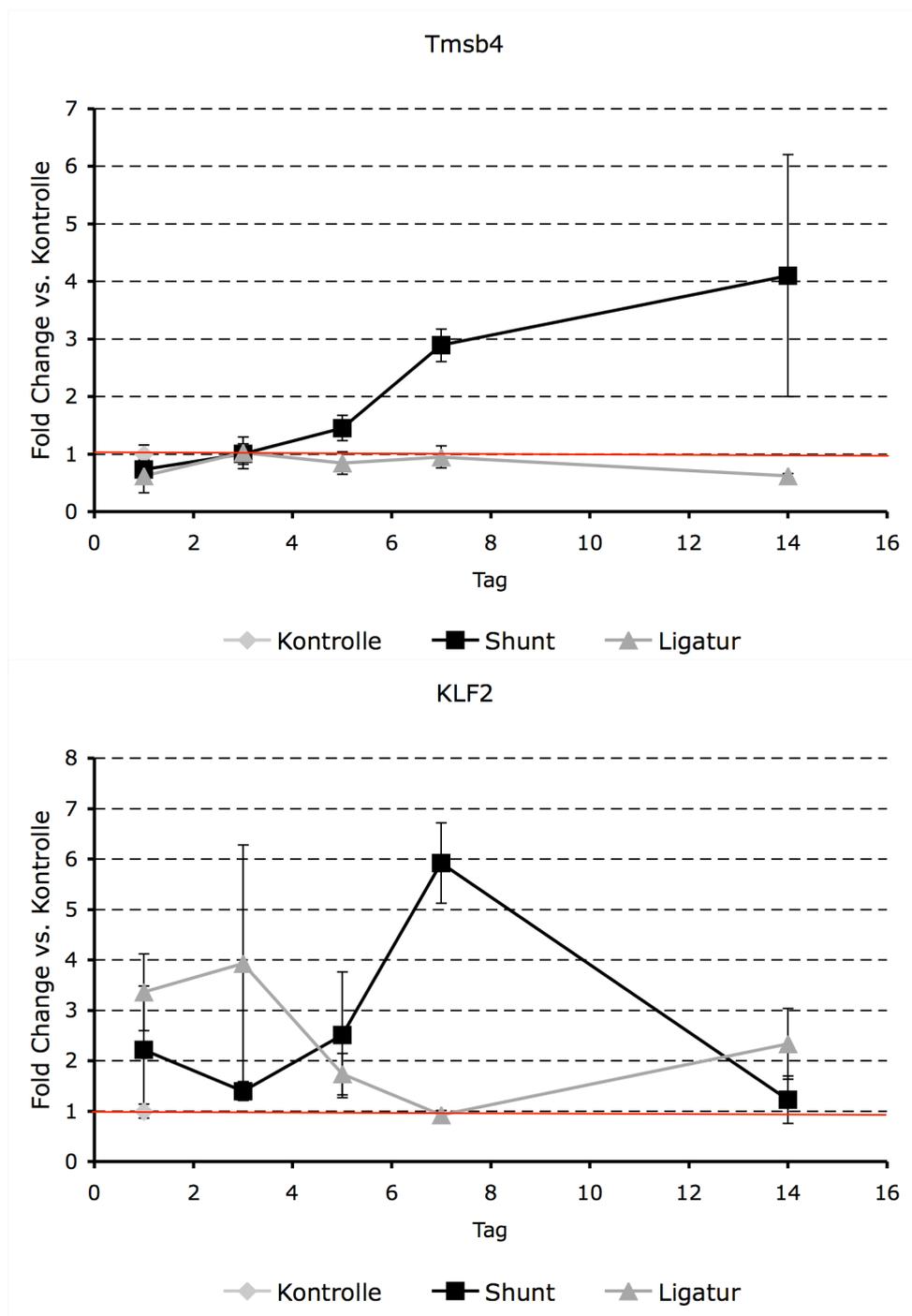


Abbildung 9: qRT-PCR von *Tmsb4* und *Klf2*. Zeitverlauf der mRNA Expression in den Kollateralen nach Shuntbehandlung und einfacher Ligatur im Vergleich zu präformierten Kollateralen (rote Linie). Die relative Anzahl der Transkripte wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

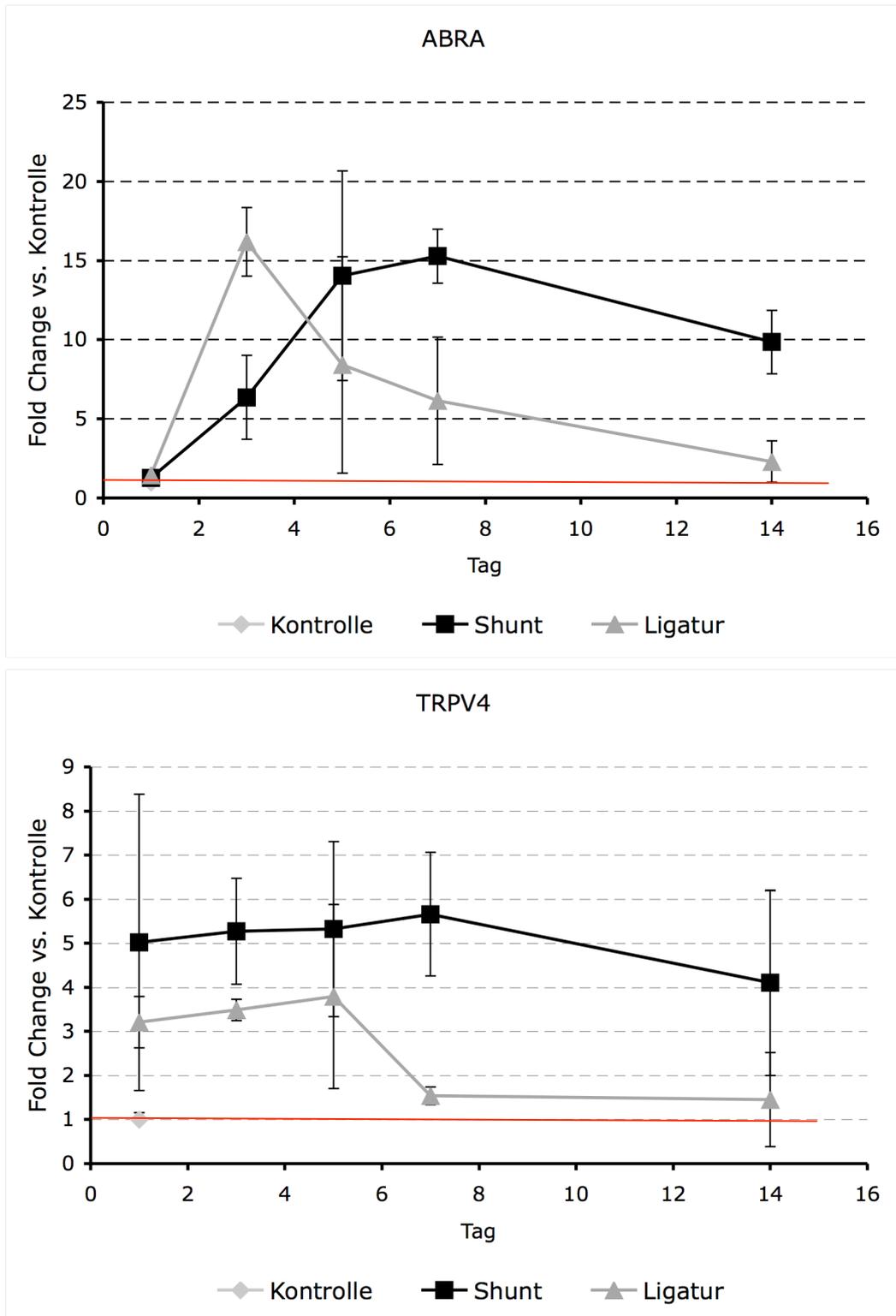


Abbildung 10: qRT-PCR von *Abra* und *Trpv4*. Zeitverlauf der mRNA Expression in den Kollateralen nach Shuntbehandlung und einfacher Ligatur im Vergleich zu präformierten Kollateralen (rote Linie). Die relative Anzahl der Transkripte wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.4 Abra Expression im Kaninchenmodell

Eine Korrelation der Abra Expression mit Stärke und Einwirkungsdauer der Schubspannung konnte im AV-Shuntmodell der Ratte gezeigt werden. Zur Überprüfung, ob dieses Gen speziesübergreifend während der Arteriogenese hoch reguliert ist, wurden Untersuchungen im Kaninchen durchgeführt.

4.4.1 Klonierung des Kaninchengens von Abra

Obwohl die Sequenz des Abra-Gens in vielen Spezies bereits bekannt ist, war die Kaninchensequenz noch nicht publiziert. Daher musste zunächst das Abra Kaninchengens kloniert und sequenziert werden. cDNA aus Kaninchen Kollateralen wurde mit Primern 521 und 522 aus konservierten Regionen der 5' bzw. 3'UTR amplifiziert und das ca. 1,3 kb große Produkt in pCR2.1TOPO kloniert und sequenziert. Mit dieser Vorgehensweise konnte zwar nicht das Gesamt-Transkript identifiziert werden, jedoch mit Hilfe von Sequenzvergleichsstudien und der Identifikation offener Leserahmen wurde ausreichend Information zur Auswahl von Primern für die qRT-PCR und zur Klonierung eines Expressionsplamids erhalten. Aus den Sequenzen wurde eine 1237 bp lange cDNA abgeleitet, die einen offenen Leserahmen von 373 Aminosäuren enthält (Abb. 12). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen des Abra-Proteins einschließlich der neuen Kaninchensequenz bestätigt die Konservierung des Proteins (Abb. 13).

Mit dieser Information konnte auch bei Kaninchen RNA aus shunt-behandelten Kollateralen (n=3), aus Kollateralen nach einfacher Ligatur und aus ruhenden sham-operierten Kontrollen isoliert und mit qRT-PCR analysiert werden. In den Shuntkollateralen zeigte sich eine verstärkte Abra Expression im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 11). Eine speziesübergreifende erhöhte Abra Expression in schubspannungs-stimulierten, wachsenden Kollateralen war somit nachgewiesen.

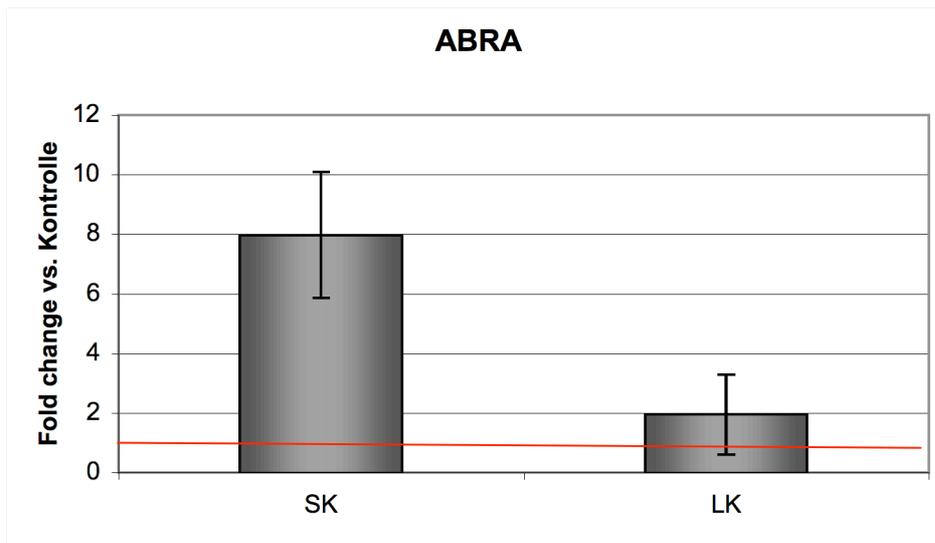


Abbildung 11: qRT-PCR Analyse der Abra mRNA Expression in Kaninchenkollateralen. RNA aus Kollateralen von Kaninchen 7d nach Shunt (SK) bzw. einfacher Ligatur (LK) wurde isoliert, revers transkribiert und die relative Abra Expression im Vergleich zur Sham-Kontrolle (rote Linie) wurde mit qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm S.e.m..

```

5' ATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTATGGCTCCGGGAGAGAAGGAAAGGGAGG 80
  °
  2
  °
  5' AGGGGCCAGCCAAAAGCGCCCTCCGGAAGGTGCGCAYTGCCACTCTGGTTATCAACCTGGCCCGAGGCTGGCAGCAGTGG 160
  °
  2 E G P A K S A L R K V R X A T L V I N L A R G W Q Q W
  °
  5' GCAAACGAGAACAGCACAAGGCAAGCCAGGAACCGGCAGGCTGGCTTCCTGGAGGGACCCAGGACCAATCCCAAGCTCC 240
  °
  2 A N E N S T R Q A Q E P A G W L P G G T Q D Q S Q A P
  °
  5' TAAACCAGTGACTTGTCCACTTTCCTAAGTYTCCTTCCCTAAAGCCAGAGGACATGGAGATGRACAAAGCCCCGAGG 320
  °
  2 K P V T C P T F P K X P S L K P E G H G D X Q S P E
  °
  5' AAGCCACCGAGATCTCCAYATCAAAAAGGAAAGAGGTGACCAAGACAATTGTGAGCAAGGCGTATGAGAGAGGAGGGGAC 400
  °
  2 E A T E I S H I K R K E V T K T I V S K A Y E R G G D
  °
  5' ATGAGCGACCTCAGCCACAGGTATGAGAAAGACAGCAGCAGCCTGAGCCCGACCATCCAGAGAACGACATTGACAGAAT 480
  °
  2 M S D L S H R Y E K D S S T P E P D H P E N D I D R I
  °
  5' CCTCCACAGCCATGACTCCCGACTCGGAGGAGAAAATGTGCCAACCTGGTGTCTGAGCTGACCAAAGGCTGGAAAAGAGA 560
  °
  2 L H S H D S P T R R R K C A N L V S E L T K G W K E
  °
  5' TGGAAAAGGAGGTGCCCATGTGGAAGAGCGACAGTGTAGACACGGAGGACAGTGGCTATGGAGGGGAGACCCAGGAGAGG 640
  °
  2 M E K E V P M W K S D S V D T E D S G Y G G E T E E R
  °
  5' CCCGAGGATGGAGCACAGGTGGCTGCTGCCAGGATCAAACGTCCCTTGGCCCTCTCAAGCTAACAGATTTACAGAGAATCT 720
  °
  2 P E D G A Q V A A A R I K R P L P S Q A N R F T E N L
  °
  5' CAACTGCAAAGCCCAACGGAAATATAGCCAAGTGGGTGACTTGAAGGGGAGATGGCAACACTGGGCTGATGAACACATCC 800
  °
  2 N C K A Q R K Y S Q V G D L K G R W Q Q W A D E H I
  °
  5' AGTCCCAGAAACTCAATCCTTTCAGTGAGGAATTTGATTATCAGCTGGCCATGTCCACCCGCCTGCACAAAGGAGATGAG 880
  °
  2 Q S Q K L N P F S E E F D Y Q L A M S T R L H K G D E
  °
  5' GGCTATGGCCGTCCGAAGGAGGGAAGCAAAC TGCTGAGAGGGCCAAGCGAGCTGAAGAGCACATCTACAGGAAAATTAT 960
  °
  2 G Y G R P K E G S K T A E R A K R A E E H I Y R E I M
  °
  5' GGACATGTGCTTCATCATCCGCACAATGGCTCGCCACAGACGAGACGGCAAGATCCAGGTGACTTTTGGAGAACTCTTTG 1040
  °
  2 D M C F I I R T M A R H R R D G K I Q V T F G E L F
  °
  5' ACAGATACGTTTCGTATTTTCAGATAAAGTGGTGGGCATTCATGCGTGCCAGGAAACATGGACTGGTAGACTTCGAGGGA 1120
  °
  2 D R Y V R I S D K V V G I L M R A R K H G L V D F E G
  °
  5' GAGATGCTGTGGCAAGGCCGAGACGACCATGTTGTGATTACTCTACTTGAGTAGAAGGGCGAATTCAGCACACTGGCGG 1200
  °
  2 E M L W Q G R D D H V V I T L L E .
  °
  5' CCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGA
  °
  2
  °
  2
  °

```

Abbildung 12: cDNA und abgeleitete Aminosäuresequenz von Abra (Kaninchen). Start- und Stopkodon sind rot markiert.

4.5 Charakterisierung der Abra mRNA Expression

Bislang war Abra als muskelspezifisches Gen beschrieben worden, dessen Expression auf gestreiften Muskel beschränkt ist. Der Befund einer Expression in isolierten Gefäßen, die aus Endothelzellen und glatten Muskelzellen bestehen, widersprach der bekannten Literatur.

Zur Untersuchung der endogenen mRNA Expression von Abra in verschiedenen Organen einer unbehandelten Ratte wurden Endpunkt PCR Analysen durchgeführt (Abb. 14). Wie zuvor publiziert, wurde Abra mRNA in Herz und Skelettmuskel (M. quadriceps) gefunden. Außerdem konnte die Abra mRNA Expression in Kollateralen – sowohl in präformierten als auch in Kollateralen nach einfacher Ligatur – bestätigt werden. Zum Ausschluss, dass die Abra Transkripte einer Skelettmuskelkontamination entstammen, wurden auch Blutgefäße, die nicht von Skelettmuskel umgeben sind, untersucht. Eine basale mRNA Expression von Abra in Aorta und Aa. Iliacae bestätigt, dass Abra auch in Blutgefäßen exprimiert wird.

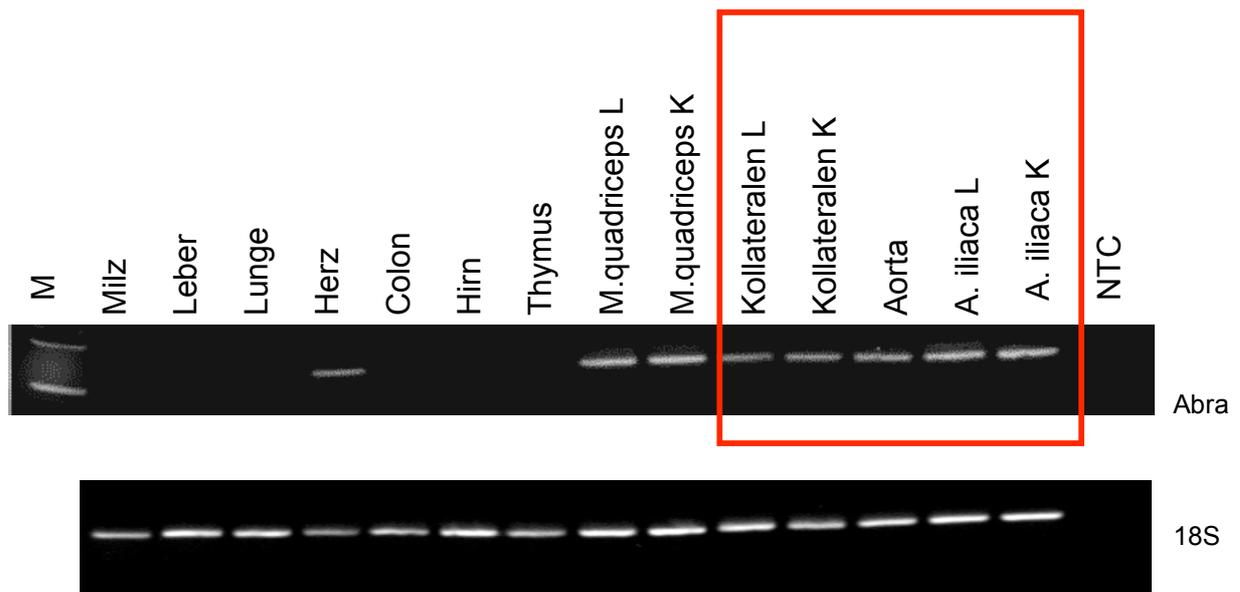


Abbildung 14: Abra wird in Gefäßen exprimiert. Qualitative Analyse der Abra mRNA Expression in verschiedenen Geweben der Ratte mit Endpunkt PCR. RNA aus verschiedenen Organen einer Ratte wurde isoliert, revers transkribiert und mit Abra spezifischen Primern amplifiziert. Neben der bereits beschriebenen mRNA Expression in Herz- und Skelettmuskel wurde eine Abra mRNA Expression in Blutgefäßen gefunden (roter Kasten). M: Längenmarker L: Ligaturseite, K: Kontrollseite (sham), NTC: No template control (Negativkontrolle)

4.6 Lokalisation von Abra in Gefäßen

Nachdem die mRNA Expression von Abra in Blutgefäßen nachgewiesen war, erfolgte die zelluläre Lokalisation in der Gefäßwand mit *in situ* Hybridisierung. Hierfür wurde Gewebe des Adduktormuskels einer Ratte 7d nach Shunt-Behandlung auf der einen Seite und einfacher Ligatur auf der anderen Seite entnommen. Für die *in situ* Hybridisierung wurde eine Hälfte des Muskels in Paraffin eingebettet und für spätere immunhistochemische Untersuchungen die andere Hälfte kryokonserviert.

4.6.1 *In situ* Hybridisierung

Für die *in situ* Hybridisierung wurde eine DIG-markierte Abra RNA-Sonde mit *in vitro* Transkription hergestellt. Mit dieser wurden anschließend 12 µm dicke Paraffinschnitte von Adduktormuskeln hybridisiert (Abb. 15). Es konnte eine mRNA Expression in den Zellkernen des Endothels und der Media der Gefäße gezeigt werden. Das Signal in den Shunt-behandelten Gefäßen war stärker als im angrenzenden Skelettmuskelgewebe.

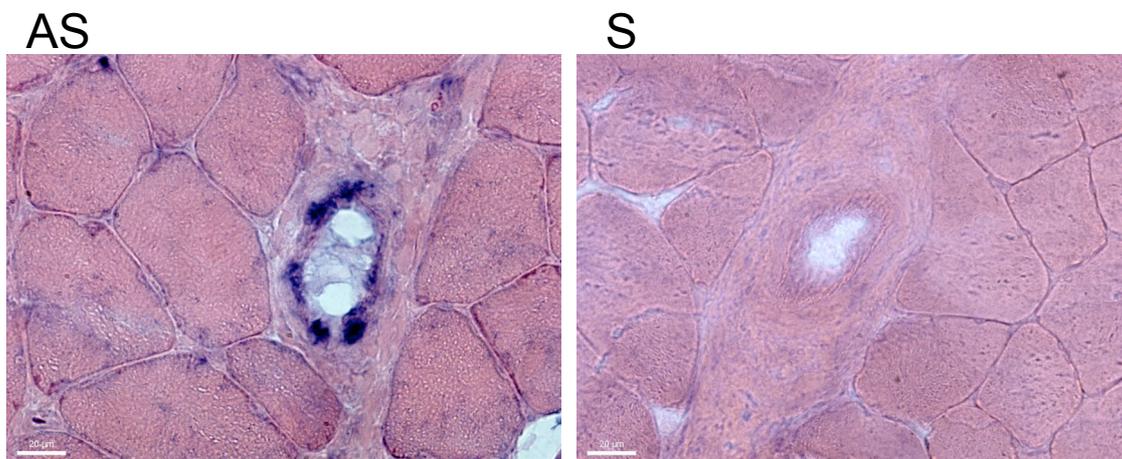


Abbildung 15: Lokalisation der Abra mRNA Transkripte in der Gefäßwand von Kollateralen mit *in situ* Hybridisierung. Paraffinschnitte der Adduktormuskeln einer Shunt-behandelten Ratte wurden mit einer DIG-markierten Abra Sonden hybridisiert. Positive Zellkerne wurden mit einem AP-gekoppelten Anti-DIG Antikörper und NBT/BCIP visualisiert (blaue Färbung). Im Schnitt AS wurde eine Abra-Antisense Sonde verwendet; S bezeichnet einen Schnitt, welcher zur Kontrolle mit einer Abra-Sense Sonde hybridisiert wurde.

4.6.2 Analyse der Abra Expression auf Proteinebene

Mit Hilfe der bisher durchgeführten Experimente konnte eine Lokalisation von Abra mRNA in Kollateralgefäßen und ein Anstieg der Abra Transkriptmenge nach Shunt-Behandlung demonstriert werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Erhöhung auch auf Proteinebene widerspiegelt. Da kommerziell kein Antikörper gegen das Abra Protein erhältlich war, musste dieser zunächst hergestellt und bezüglich seiner Spezifität getestet werden. Anschließend wurde die Proteinmenge in Kollateralgewebe zum experimentellen Zeitpunkt 7d nach Shunt bzw. einfacher Ligatur untersucht und es erfolgte die Lokalisation mit Hilfe von Immunhistochemie.

4.6.2.1 Spezifität des Antikörpers

Die Firma Eurogentec wurde damit beauftragt, zwei Peptide bestehend aus jeweils 15 Aminosäuren (AS) der Abra Proteinsequenz der Ratte zu synthetisieren und zur Immunisierung von Hühnern zu verwenden. Die polyklonalen Immunglobuline aus deren Eiern sind affinitätschromatographisch aufgereinigt worden.

Zunächst wurde die Spezifität des Antikörpers im Western Blot und in der Immunhistochemie überprüft (Abb. 16). Der Immunoblot zeigte in pcDNA3_Abra transfizierten Cos-1 Zellen, die im Wildtyp kein Abra exprimieren, ein Protein der erwarteten Größe.

In der Immunhistochemie wurde die Spezifität des Antikörpers durch Präimmunadsorption bestätigt. Das Fluoreszenzsignal konnte nach Zugabe des Peptids, welches für die Herstellung benutzt worden war, vollständig eliminiert werden.

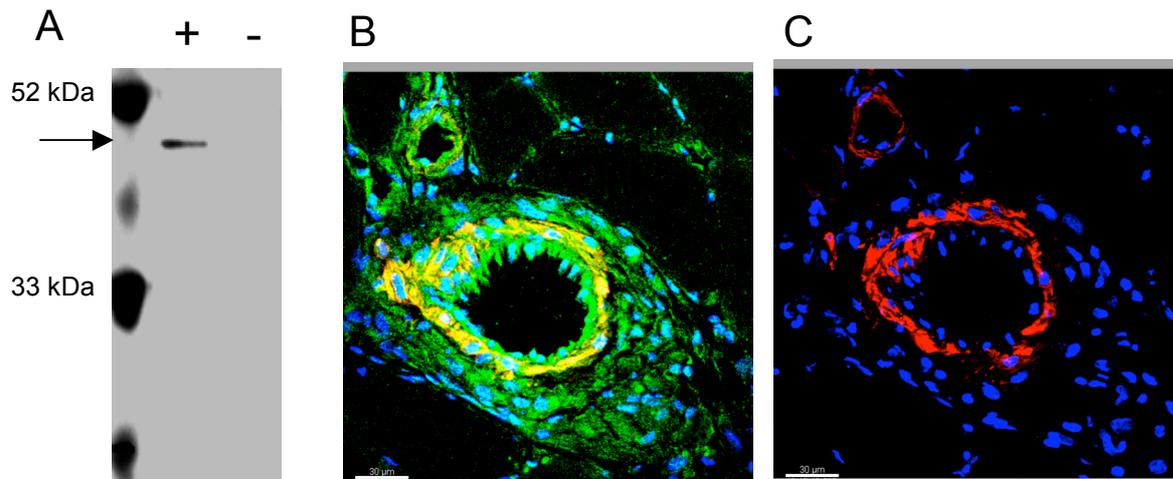


Abbildung 16: Spezifitätsprüfung des Abra Antikörpers. **A** Western Blot Analyse der Abra Expression in transfizierten Cos-1 Zellen. Proteinlysate aus Cos-1 Zellen mit pcDNA3_Abra transfiziert (+) und Wildtyp (-) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit dem polyklonalen Abra Antikörper inkubiert. Der Pfeil markiert ein Protein der erwarteten Größe (45 kDa), das in überexprimierenden Zellen spezifisch detektiert wurde. **B+C** Serielle Kryoschnitte (Maßstab 30 µm) des Quadricepsmuskels einer Ratte wurden zum Test des Antikörpers immungefärbt. **B** Doppelfärbung eines Kollateralgefäßes der Ratte mit Anti-Abra (grün) und Anti- α -SM-Aktin (rot). Die Überlagerung erscheint in gelb. **C** Mit der Zugabe des synthetischen Abra Peptids konnte das grüne Abra-Signal vollständig eliminiert werden.

4.6.2.2 Abra Proteinexpression in Kollateralen

Da die Spezifität des Anti-Abra Antikörpers gewährleistet war, konnte er zur immunologischen Detektion von Abra in wachsenden Kollateralen verwendet werden. Hierzu wurden Gefrierschnitte von Quadricepsmuskeln einer Ratte 7d nach Shuntbehandlung auf der einen Seite und nach einfacher Ligatur auf der anderen Seite angefertigt. Zur Lokalisation des Abra Proteins in Gefäßen wurden die Schnitte mit Anti-Abra und Anti- α -SM-Aktin fluoreszenzgefärbt (Abb. 17). Abra konnte sowohl im Endothel als auch in der Media der Gefäße dargestellt werden. Eine leichte Färbung war auch in der Adventitia zu sehen. Das Signal in den Shunt-behandelten Gefäßen war stärker als in den Gefäßen nach einfacher Ligatur und im angrenzenden Skelettmuskelgewebe. Dieser Befund entsprach den Ergebnissen aus der *in situ* Hybridisierung. Ferner gab es eine Färbung von Zellkernen und Zytoplasma.

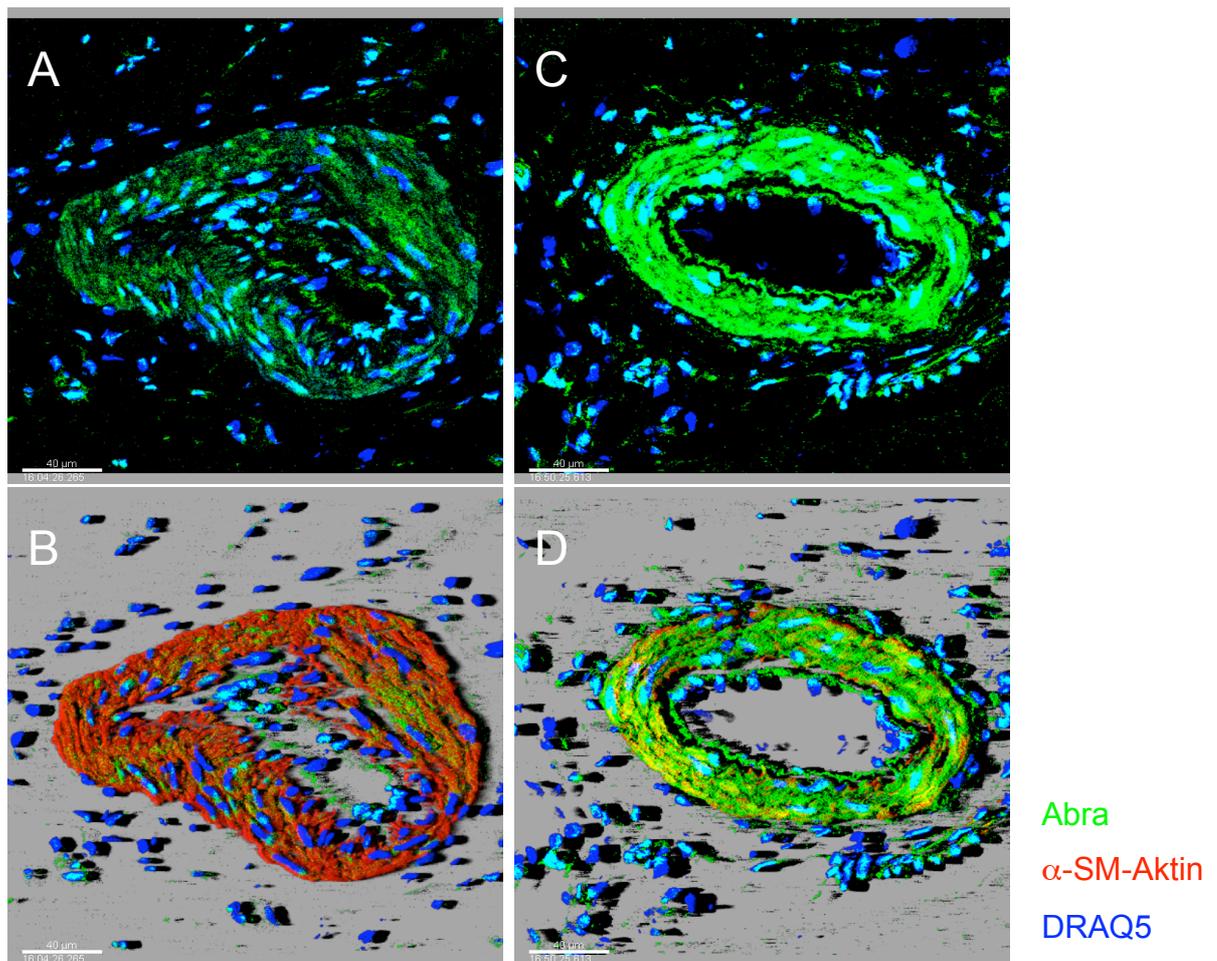


Abbildung 17: Lokalisation des Abra Proteins in der Gefäßwand mit Immunfärbung. Kryoschnitte der Adduktormuskeln einer Shunt- bzw. Ligatur-behandelten Ratte (7d) wurden mit Anti-Abra (grün) und Anti- α -SM-Aktin (rot) angefärbt (Maßstab 40 μ m). Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DRAQ5 (blau). **A+B** Ligatur; **C+D** Shunt. Abra konnte sowohl im Endothel als auch in der Media der Gefäße dargestellt werden.

4.7 Abra Überexpression und „knock down“

Die bislang geschilderten Befunde zeigten, dass Abra nicht nur im gestreiften Muskel exprimiert wird. Es existiert eine basale Expression in Blutgefäßen und eine starke Hochregulierung in wachsenden Kollateralen.

Im weiteren Verlauf wurde mit funktionalen Experimenten untersucht, ob die erhöhte Abra Expression Folge oder Ursache des verstärkten Kollateralwachstums war. Hierfür sollte die Expression moduliert werden. Zur effizienten, transienten Überexpression von Abra in Zellkultur und *in vivo* wurden rekombinante Adenoviren hergestellt. Mit diesen Versuchen sollte einerseits die Wirkung auf verschiedene Gefäßzelltypen geprüft und andererseits der Einfluss auf die Arteriogenese im Tier untersucht werden. Hierzu wurde die Viruslösung intra-kollateral injiziert.

Außerdem sollte mit einer spezifischen Inhibierung der Abra Expression mittels siRNA-vermitteltem „knock down“ geprüft werden, ob die Arteriogenese gehemmt ist.

4.7.1 Klonierung der Adenoviralen Konstrukte

Für die Klonierung der adenoviralen Konstrukte wurde das ViraPower Adenoviral Expression System verwendet. Die kodierende Sequenz des Abra Gens (Spenderorganismus: Ratte) wurde in den viralen Vektor pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen), in dem das Zielgen vom humanen Cytomegalovirus (CMV) Promotor gesteuert wird, eingebracht (Abb. 18).

Zur Herstellung der „knock down“ Konstrukte wurden zwei verschiedene zuvor getestete, funktionale siRNA-Sequenzen zunächst in pENTR/U6 kloniert. Dieser enthält eine U6 RNAi Expressionskassette und kann über homologe Rekombination in den promotorlosen, adenoviralen Vektor pAd/PL-DEST (Invitrogen) eingebracht werden. Die Strategie ist in Abb. 19 dargestellt. Die Konstrukte pAd/CMV/LacZ und die LacZ Kontroll-Oligos zum „knock down“ von LacZ waren im Kit enthalten.

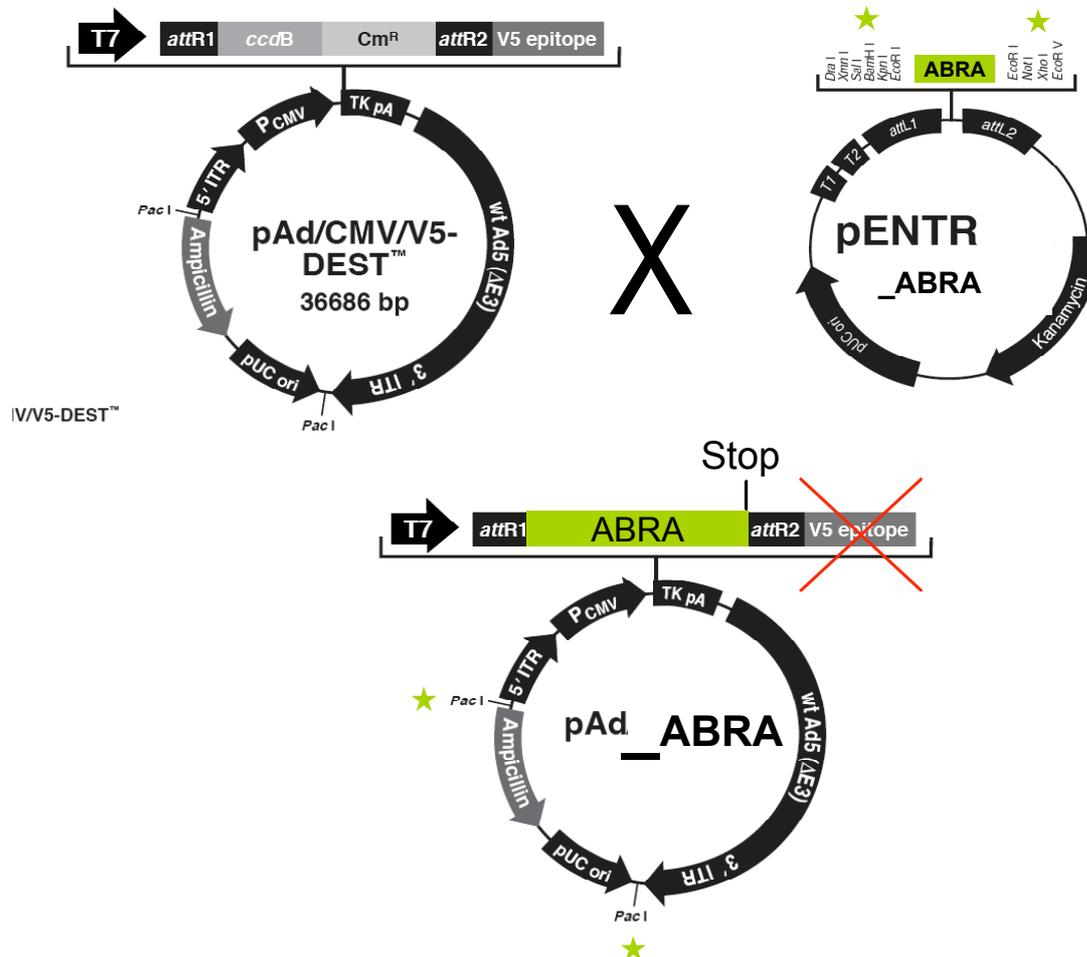


Abbildung 18: Strategie der Virusklonierung von Ad_{Abra}. Die kodierende Sequenz des Abra-Gens einschließlich des Stopkodons wurde über die Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I in pENTR kloniert. Über Homologe Rekombination (X) wurde Abra in pAd/CMV/DEST überführt. Durch den Einschluss des Stop-Codons wurde die Translation des V5 Epitops verhindert. Anschließend wurden mit einer *Pac*I Restriktion die bakteriellen Sequenzen aus dem adenoviralen Plasmid entfernt und das lineare Konstrukt in A293 Zellen zur Virusherstellung transfiziert.

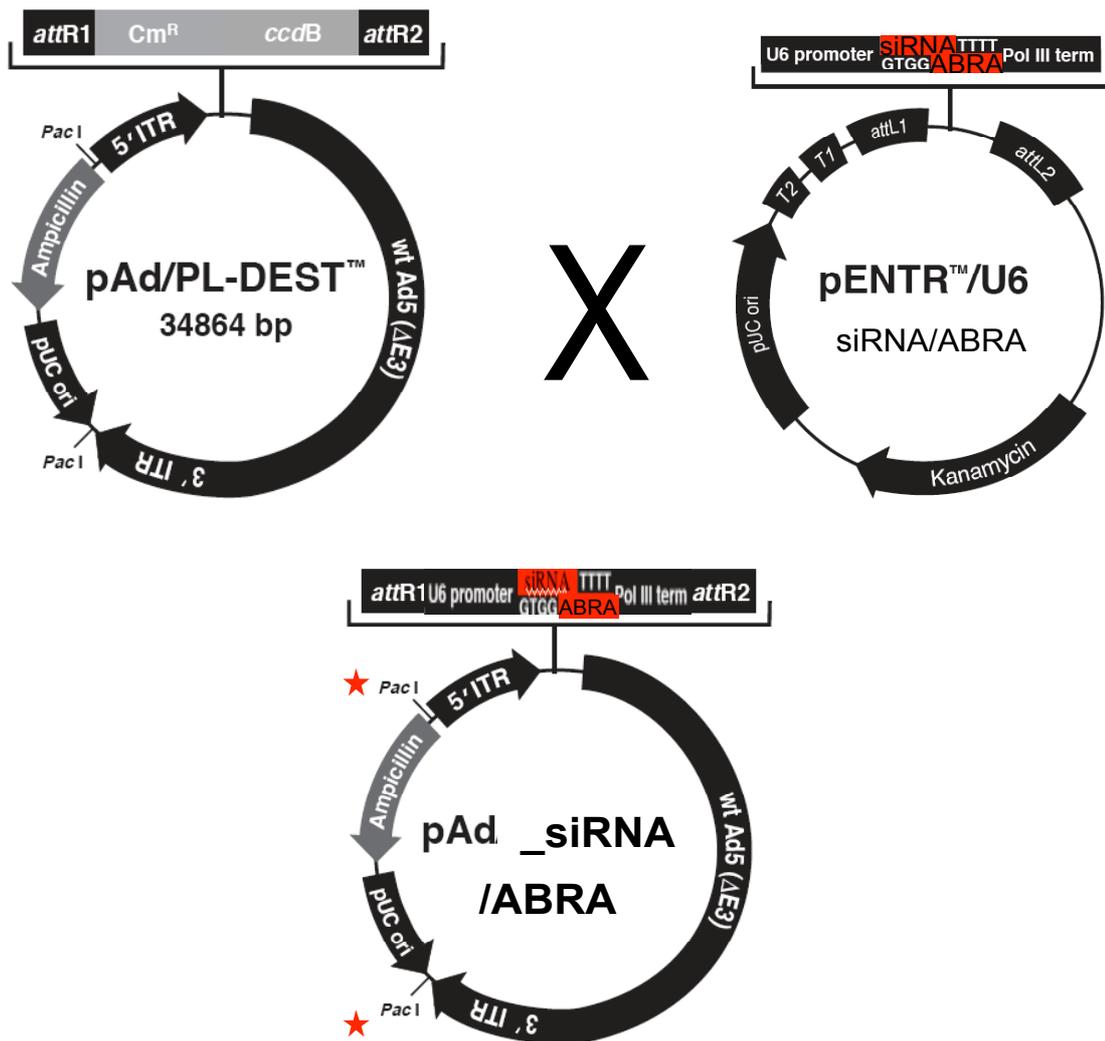


Abbildung 19: Strategie der Virusklonierung von Ad_{siRNA}_{Abra}. Hybridisierte Oligonukleotide mit den erforderlichen überhängenden Enden (CACC und AAAA) wurden in pENTR/U6 kloniert. Über Homologe Rekombination (X) wurde siRNA_{Abra} in pAd/PL-DEST überführt. Anschließend wurden mit einer *PacI* Restriktion die bakteriellen Sequenzen aus dem adenoviralen Plasmid entfernt und das lineare Konstrukt in A293 Zellen zur Virusherstellung transfiziert.

4.7.2 Abra Überexpression in Zellen

Die Wirkung der Abra Überexpression auf verschiedene Zellen der Gefäßwand wurde zunächst in Zellkultur in porcinen SMCs und ECs untersucht. Die Zellen einer 6-Well Platte wurden mit 1×10^6 pfu von Ad_Abra bzw. Ad_LacZ transduziert. An den drei folgenden Versuchstagen wurde die Proliferationsaktivität mit dem MTT Assay (ATCC) und durch direkte Zellzählung bestimmt (Abb. 20). In Zellkultur führte eine Überexpression von Abra am Tag 2 zu 47,5% Steigerung ($p < 0,05$; $n=8$) und am Tag 3 zu 90% Steigerung ($p < 0,01$) der Proliferation in glatten Muskelzellen. In Endothelzellen hatte die Abra Überexpression keine Auswirkung auf die Proliferationsaktivität. Dieses Ergebnis wurde in SMCs der Ratte durch direkte Zellzahlbestimmung bestätigt (92% Steigerung).

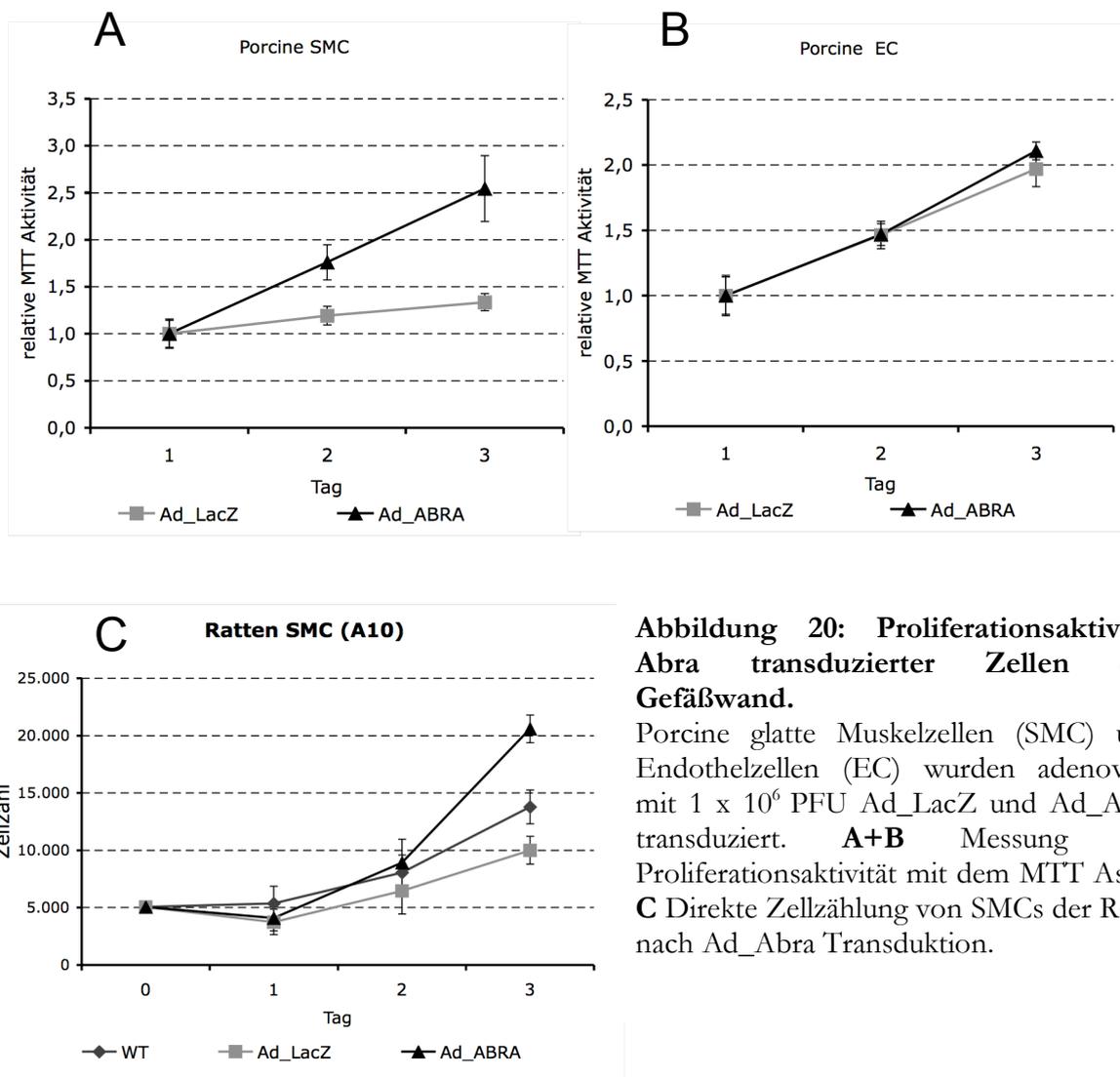


Abbildung 20: Proliferationsaktivität Abra transduzierter Zellen der Gefäßwand.

Porcine glatte Muskelzellen (SMC) und Endothelzellen (EC) wurden adenoviral mit 1×10^6 PFU Ad_LacZ und Ad_Abra transduziert. **A+B** Messung der Proliferationsaktivität mit dem MTT Assay **C** Direkte Zellzählung von SMCs der Ratte nach Ad_Abra Transduktion.

4.7.3 Lokaler Adenoviraler Gentransfer *in vivo*

Mit dem adenoviralen Gentransfer *in vivo* sollten Auswirkungen der Modulation der Abra Expression auf die Arteriogenese untersucht werden.

Zunächst wurde die lokale Eingrenzung viraler Genprodukte nach intra-kollateralem Gentransfer überprüft. Mit einer transgenspezifischen PCR konnte die Verteilung viraler Transkripte in verschiedenen Organen der Ratte 7d nach dem Gentransfer untersucht werden (Abb. 21). Die Experimente mit dem adenoviralen LacZ Konstrukt dienten einerseits als Kontrollgruppe, um einen inflammatorischen Effekt der Adenoviren auszuschließen und andererseits konnte mittels X-Gal Färbung der Adduktormuskeln die Eindringtiefe viraler Genprodukte beobachtet werden.

Die funktionelle Bedeutung von Abra für das Wachstum von Kollateralen wurde sowohl bei Ratten als auch bei Kaninchen mittels einer lokalen Überexpression bei einfacher Ligatur ohne Shunt untersucht. Beim intra-kollateralen Gentransfer von Ad_Abra im Kaninchen konnte mit einer bereits etablierten Methode hämodynamischer Messungen der Einfluss auf das Kollateralwachstum quantifiziert werden. Zusätzlich konnte der Einfluss auf die Arteriogenese durch den intra-kollateralen Gentransfer in der Ratte eine weitere Spezies zumindest angiographisch ausgewertet werden.

Da die adenoviralen siRNA Konstrukte spezifisch für die Abra-Sequenz der Ratte ausgewählt waren, wurden diese auch nur in Ratten getestet.

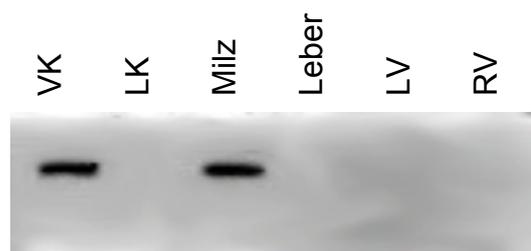


Abbildung 21: Nachweis der Virentranskripte. Endpunkt PCR zum Nachweis des Virustranskripts in verschiedenen Organen einer Ratte. 7d nach adenoviralem, intra-kollateralem Gentransfer wurden aus den Organen RNA isoliert, revers transkribiert und eine transkriptspezifische PCR durchgeführt. Es wurde Virustranskript in den Kollateralen der virus-behandelten Seite und in der Milz detektiert. VK: Kollateralen der Virusseite, LK: Kollateralen der Ligaturseite, LV: linker Ventrikel, RV: rechter Ventrikel.

Aus verschiedenen Organen einer Ratte nach einseitigem intra-kollateralen Gentransfer von Ad_Abra wurde RNA isoliert und mit transgenspezifischen Primern auf Virenskripte untersucht. Virenskripte wurden in den Kollateralen der virusbehandelten Seite gefunden nicht aber auf der Kontrollseite. Außerdem wurde eine Anreicherung überschüssigen Virus in der Milz beobachtet. Es wurde von jeder virusbehandelten Ratte bei Versuchsende Gewebe entnommen und überprüft, ob der Virenskripten lokal begrenzt war.

4.7.3.1 Gentransfer von Ad_LacZ

Mit dem lokalen adenoviralen Gentransfer von Ad_LacZ wurde die lokale Begrenzung und die Eindringtiefe viralen Genprodukts in die Gefäßwand untersucht. Hierzu wurde im Kaninchen nach Ligatur der Femoralarterie die Viruslösung ($2,87 \times 10^{10}$ PFU in 2,5 ml PBS) intra-kollateral infundiert und 30 min inkubiert. Eine Woche nach dem Gentransfer wurden die maximale kollaterale Konduktanz bestimmt und zusätzlich Angiographien angefertigt. In einer anderen Versuchsgruppe wurde eine Woche nach dem Gentransfer eine Perfusionfixierung mit 4% PFA durchgeführt und Adduktormuskeln sowie die Mm. gastrocnemii der Ligaturseite und der Virenseite entnommen. Die Muskelproben wurden zunächst im Ganzen X-Gal gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Muskeln kryokonserviert und 20 µm Schnitte wurden histologisch beurteilt.

Nach 6h X-Gal Färbung war der Bereich um die Gefäße im Adduktormuskel der virusbehandelten Seite blau gefärbt, während keine Blaufärbung im Adduktormuskel der Ligaturseite zu sehen war. Die Mm. gastrocnemii zeigten beidseits keine Blaufärbung. Hiermit wurde die lokale Virusbegrenzung bestätigt. Im Schnitt war eine Färbung der Gefäßwand bis in die Media zu erkennen. (Abb. 22)

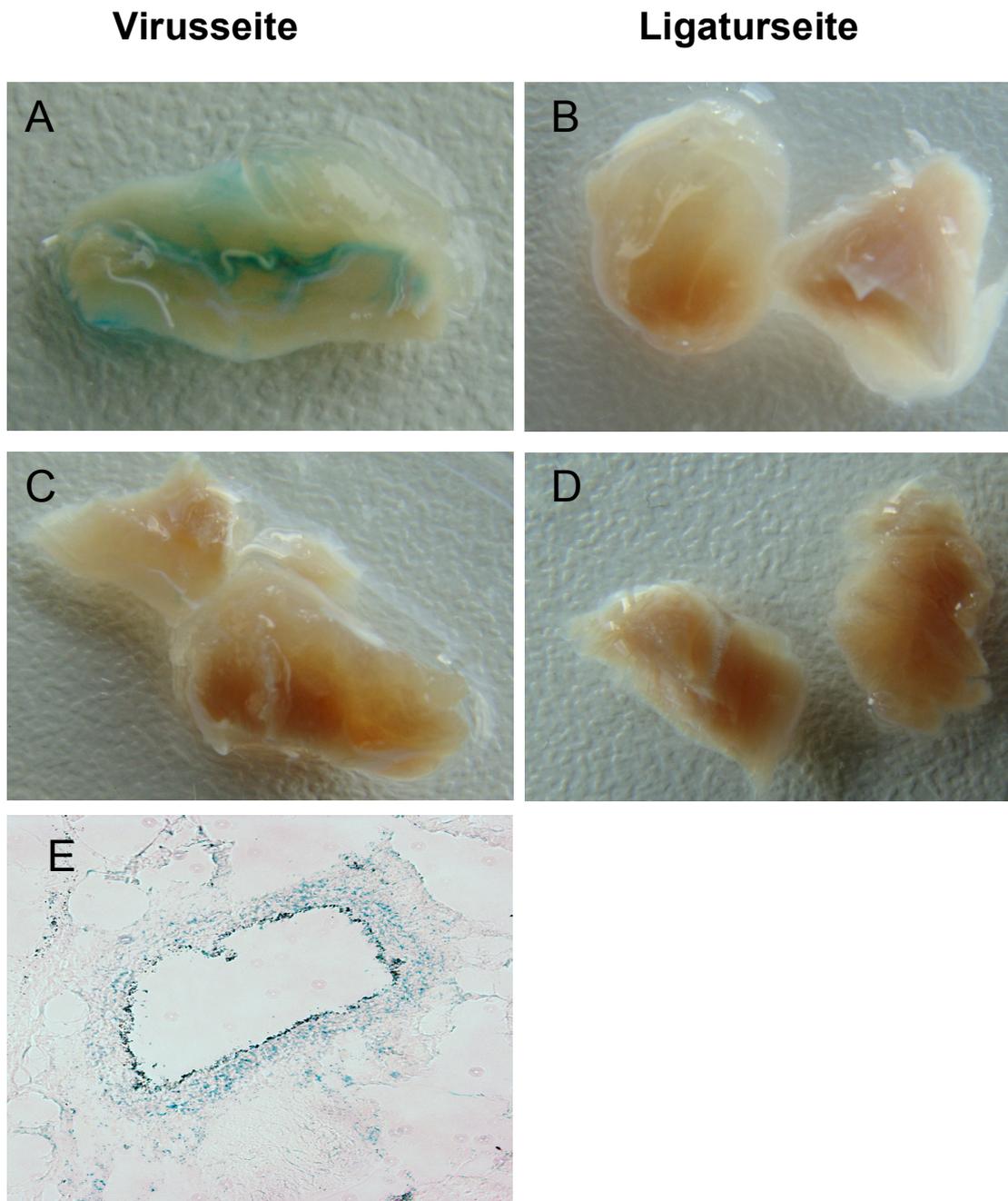
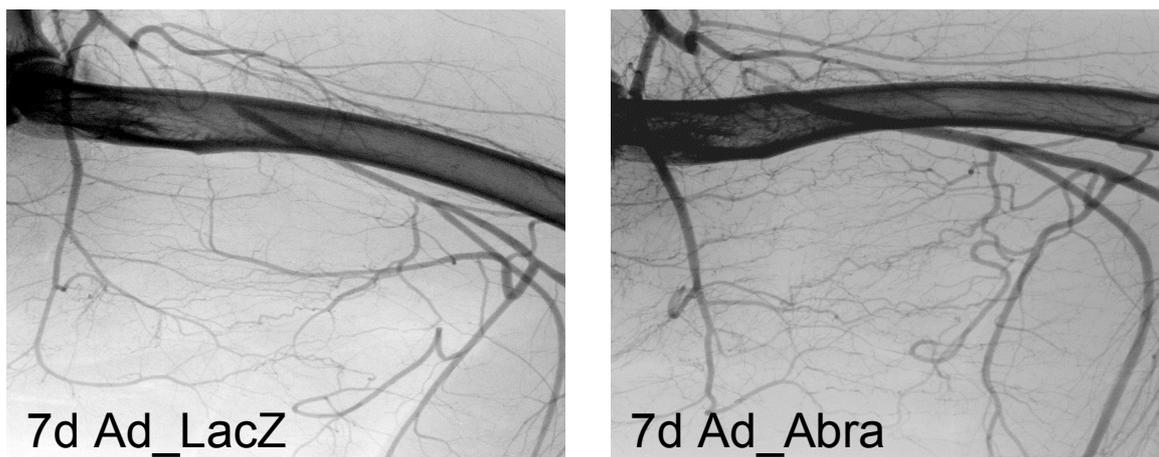


Abbildung 22: Nachweis des viralen Genprodukts mit X-Gal Färbung. Muskeln der Virusseite sowie der unbehandelten Seite mit einfacher Ligatur einer Ratte 7d nach adenoviralem Gentransfer mit Ad_LacZ wurden entnommen und im Ganzen X-Gal gefärbt. **A+B** Adduktormuskeln **C+D** Mm. gastrocnemii. Blaufärbung wurde nur auf der Virusseite um die transduzierten Gefäße gezeigt. Auf der unbehandelten Seite und im Unterschenkel gibt es kein virales Genprodukt. **E** Zum Nachweis viraler Genprodukte in der Gefäßwand wurde der X-Gal gefärbte Adduktormuskel der Virusseite nachträglich geschnitten. Die Blaufärbung in der Gefäßwand zeigt die Eindringtiefe des Adenovirus.

4.7.3.2 Lokaler adenoviraler Gentransfer von Ad_Abra im Kaninchen

Mit dem lokalen adenoviralen Gentransfer wurde die Auswirkung von Abra Überexpression auf die Arteriogenese untersucht. Hierzu wurde im Kaninchen nach Ligatur der Femoralarterie die Viruslösung ($2,87 \times 10^{10}$ PFU in 2,5 ml PBS) intra-kollateral infundiert und 30 min inkubiert. Eine Woche nach dem Gentransfer wurden die maximale kollaterale Konduktanz bestimmt und zusätzlich Angiographien angefertigt. Der intra-kollaterale Gentransfer von Ad_Abra im einfachen Ligaturmodell des Kaninchens steigerte die Anzahl und Größe der sichtbaren Kollateralarterien und die maximale kollaterale Konduktanz auf 237 ± 9 ml/min/100mmHg (Kontrolle Ad_LacZ: 144 ± 10 ml/min/100mmHg), d.h. um mehr als 60% gegenüber der physiologischen Antwort (Abb. 23).

A



B

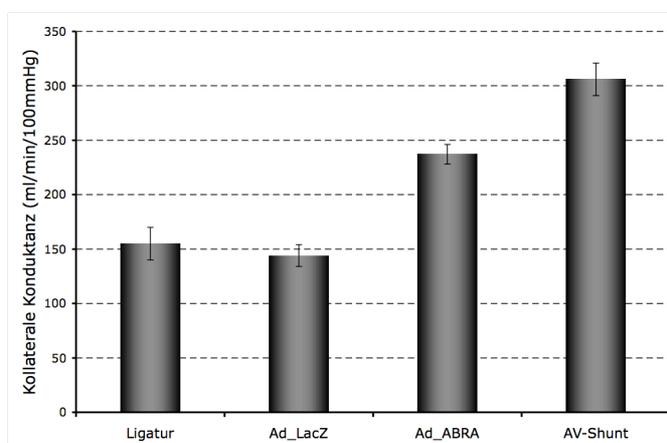


Abbildung 23: Abra Überexpression verbessert das Kollateralwachstum. **A** Angiogramme des Hinterlaufs von Kaninchen 7d nach adenoviralem Gentransfer von Ad_LacZ und Ad_Abra. Die Überexpression von Abra führt zu einer Steigerung der Anzahl und Größe der Kollateralen im Vergleich zu einem Kontrollvirus (LacZ). **B** Maximale kollaterale Konduktanzen der Hintergliedmaßen im Kaninchen 7d nach Ligatur der A. femoralis und verschiedenen Behandlungen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

4.7.4 Funktionalität der siRNA Sequenzen

Mit dem siRNA Target finder (Ambion) Programm wurden zehn verschiedene Sequenzabschnitte aus der Abra mRNA der Ratte ausgewählt, die die Tuschl Kriterien erfüllen {Meister, 2004 #552}, und in pSilencerNeo (Ambion) kloniert. Die Funktionalität wurde getestet indem Cos-1 Zellen mit diesen Vektoren transfiziert wurden. Da es in diesem Zelltyp keine endogene Abra Expression gibt, wurden die Zellen mit pcDNA3_Abra und den einzelnen siRNA_Abra Plasmiden co-transfiziert. Zur Kontrolle dienten nonsense siRNAs. Zwei der siRNA Konstrukte (Abra_siRNA3 und 10) führten zu einem „knock down“ der Expression von mehr als 90% (Abb. 24). Es wurden siRNA-tragende Adenoviren mit den Sequenzen siRNA_Abra3 und siRNA_Abra10 hergestellt.

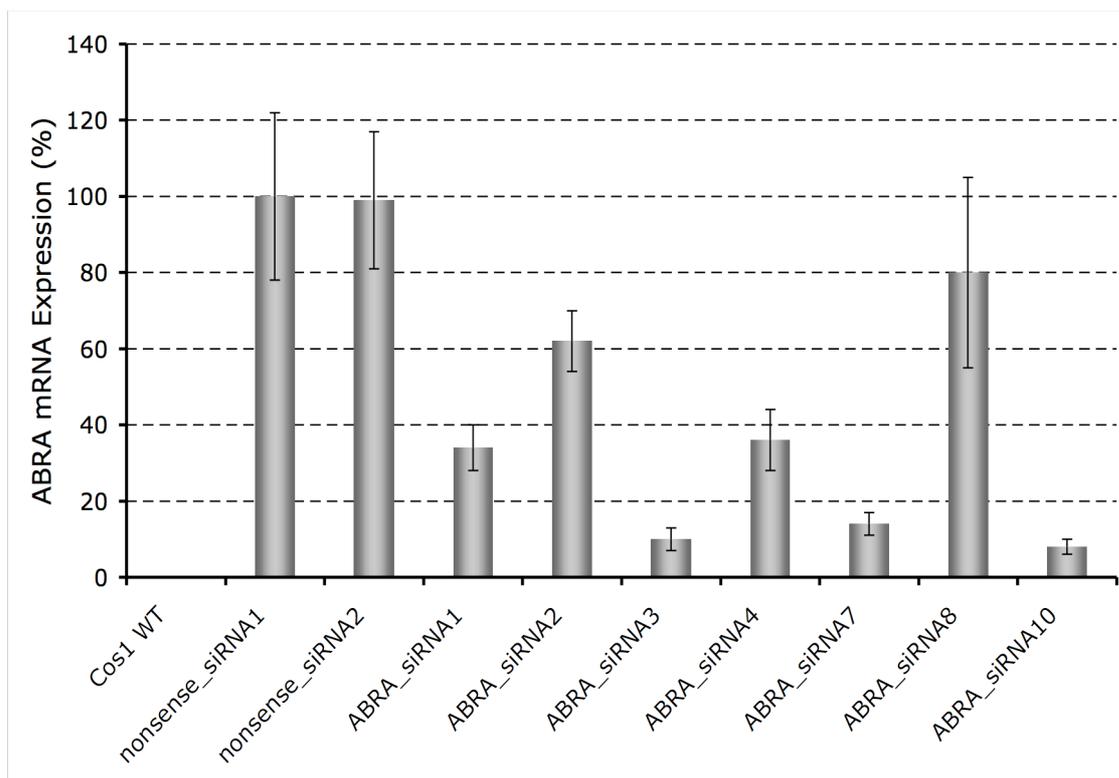


Abbildung 24: Funktionalitätstest der siRNA Sequenzen. Co-Transfektion von pcDNA3_Abra und Abra_siRNA in Cos-1 Zellen und anschließende Bestimmung der Abra mRNA Expression mit qRT-PCR. In diesem Zelltyp gibt es keine endogene Abra Expression (WT). Mit pcDNA3 und nonsense_siRNA1 und nonsense_siRNA2 co-transfizierte Zellen dienten als Kontrollen und wurden als 100% gesetzt. Mit den Abra_siRNA Konstrukten 3 und 10 wurde ein mehr als 90%-iger Knock down von Abra erreicht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

4.7.5 Lokaler adenoviraler Gentransfer von Ad_siRNA_Abra

Mit Ad_siRNA3_Abra und Ad_siRNA10_Abra standen zwei rattenspezifische adenovirale siRNA-Konstrukte zur Verfügung, die in Zellkultur einen mehr als 90%-igen „knock down“ von Abra bewirkten. Um die Auswirkung von fehlendem Abra trotz Schubspannungsstimulierung zu testen, wurde in einem Experiment die Shunt-Behandlung mit dem Gentransfer der siRNA-Konstrukte kombiniert. Die angiographische Auswertung in Abbildung 25 zeigt 7 Tage nach Shunt bzw. Shunt und Transfer der siRNA Konstrukte, dass aus dem „knock down“ von Abra eine Inhibierung der Arteriogenese resultiert.

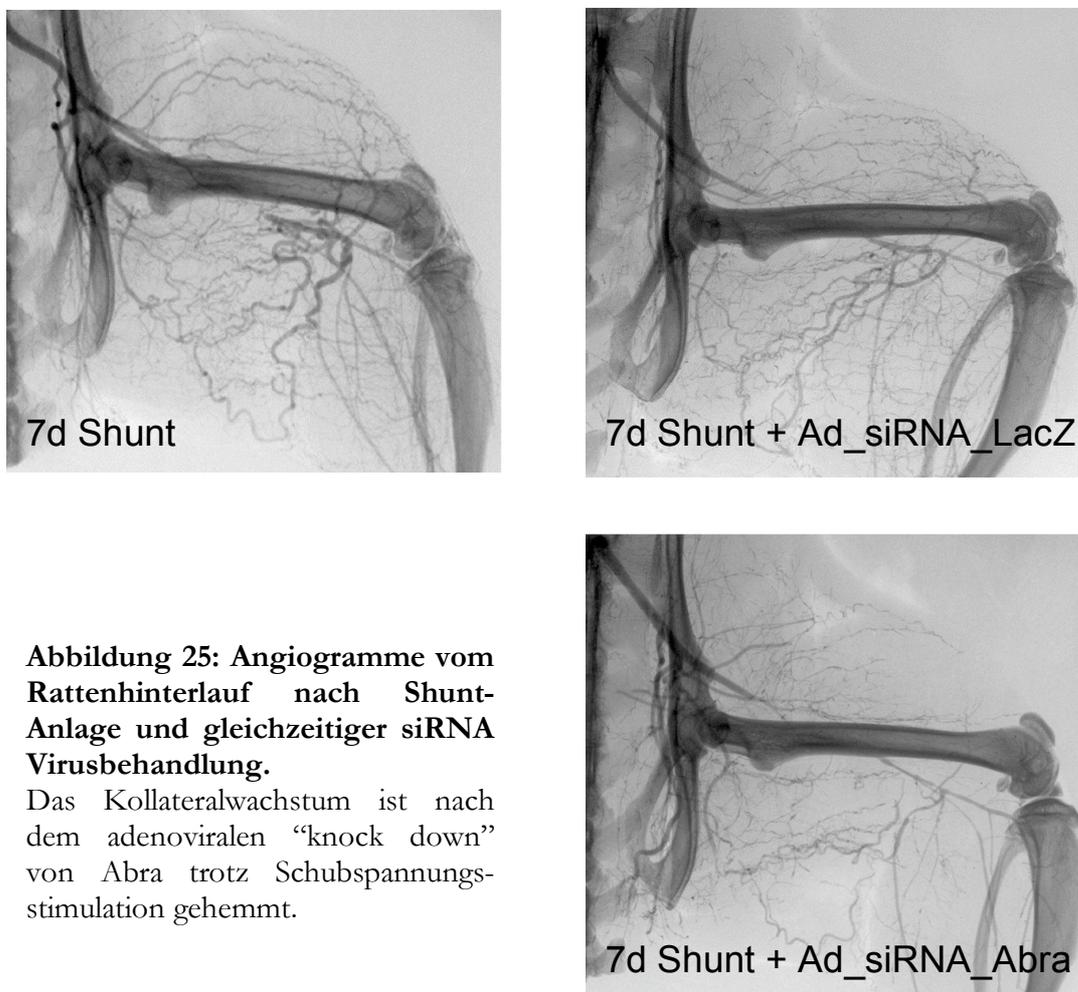


Abbildung 25: Angiogramme vom Rattenhinterlauf nach Shunt-Anlage und gleichzeitiger siRNA Virusbehandlung.

Das Kollateralwachstum ist nach dem adenoviralen „knock down“ von Abra trotz Schubspannungsstimulation gehemmt.

5 Diskussion

Mit der Aufklärung der grundlegenden Mechanismen der Arteriogenese wird das Ziel verfolgt, nach einem Arterienverschluss das Wachstum der Kollateralkreisläufe pharmakologisch zu stimulieren, um sie schneller zu funktionstüchtigen Arterien zu machen. Die Wiederherstellung der maximalen Konduktanz durch spontanes Wachstum in Tieren nach arterieller Okklusion bleibt mit 35% in der caninen Koronarzirkulation⁷⁹ und 40% im Kaninchenhinterlauf⁸⁰ unvollständig, obwohl der normale Ruheblutfluss schnell erreicht wird. In zahlreichen Studien war versucht worden, diesen Defekt mit der Applikation von Wachstumsfaktoren auszugleichen^{80,81}. Doch selbst hohe Dosen von FGF-2 steigerten die maximale Konduktanz nur von 40% auf 50%⁸². Eine Erklärung für den begrenzten Nutzen von Wachstumsfaktoren könnten anatomische Restriktionen sein, die Kollateralgefäße daran hindern trotz Stimulation mit einer funktionellen Verbesserung zu antworten, wenn sie ihr Limit erreicht haben. Das konnten Eitenmüller et al. mit den arterio-venösen Shunt Experimenten in Kaninchen widerlegen⁶⁶. Die unvollständige natürliche Wiederherstellung der maximalen Konduktanz wird durch eine vorzeitige Normalisierung der Schubspannung verursacht. Sie konnten zeigen, dass die Selbstinhibierung durch den initialen Anstieg des Kollateraldurchmessers, der eigentlich die Schubspannung mit der dritten Potenz des Radius reduziert, durch eine Verstärkung der Schubspannung auf anderem Wege (hier die Anlage des AV-Shunts) umgangen werden kann. Kollateralgefäße sind in der Lage, vier Wochen nach Anlage eines AV-Shunts distal der Ligatur der Femoralarterie vergleichsweise zweimal soviel Blut zu leiten wie die unverschlossene Femoralarterie.

Diese Beobachtung war der Ausgangspunkt dieser Arbeit. Chronisch erhöhte Schubspannung, wie sie durch die chirurgische Herstellung eines AV-Shunt zwischen dem distalen Ende der ligierten Femoralarterie und der benachbarten Vene verursacht wird, führt zu einer permanenten Stimulation der Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen und einem extrem verlängerten und intensivierten Wachstumsprozess von Kollateralarterien. Mit diesem Modell war einerseits der Beweis erbracht worden, dass die vollständige Wiederherstellung der maximalen Konduktanz prinzipiell möglich ist und andererseits die Aufrechterhaltung des physikalischen Stimulus allein ausreicht, um sämtliche Wachstumsfaktorbehandlungen in ihrer Wirkung zu übertreffen⁶⁶.

Zwar ist die therapeutische Anwendung dieses Eingriffs ausgeschlossen, da ein AV-Shunt beim Patienten die periphere Ischämie verstärken würde, aber er eröffnet ein großes Potential für molekularbiologische Untersuchungen. Microarrays, auf denen das gesamte Genom eines Organismus untersucht werden kann, ermöglichen den umfassenden Vergleich des Expressionsmusters ruhender präformierter Kollateralen mit dem stark wachsender Kollateralen. Diese molekularbiologische Technik in Kombination mit einem chirurgischen Modell, bei dem der Auslöser des Wachstums, die Schubspannung, anhaltend erhöht ist, gab Aufschluss über die molekularen Mechanismen der Arteriogenese. Es wurde auf Basis des Expressionsmusters ein neues Gen identifiziert, das diesen physikalischen Stimulus der Schubspannung in ein Wachstumssignal transduzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das in wachsenden Kollateralen bis zu 16-fach hochregulierte Gen, welches für das „Actin-binding Rho activating protein“ (Abra) kodiert, identifiziert und charakterisiert. Sein Expressionsverlauf wurde auf mRNA Ebene quantifiziert und korreliert mit der Einwirkung der Schubspannung. Abra mRNA sowie das Genprodukt wurden in der Gefäßwand wachsender Kollateralgefäße lokalisiert. Die Überexpression von Abra in Zellkultur führte zur Proliferation glatter Muskelzellen. Um die funktionelle Bedeutung von Abra in der Arteriogenese zu zeigen, wurden rekombinante Adenoviren hergestellt, mit denen ein intra-kollateraler Gentransfer *in vivo* durchgeführt wurde. Es stellte sich heraus, dass mit Abra ein potentieller Mediator der Schubspannung identifiziert wurde, dessen Überexpression die Arteriogenese stimuliert und die Schubspannung teilweise ersetzen kann.

5.1 Differentiell exprimierte Gene in schubspannungs-induzierter Arteriogenese

Arteriogenese wird durch Schubspannung induziert und durch Wachstumsfaktoren und Zytokine, die von Monozyten bereitgestellt werden, vorangetrieben.

Bereits beschriebene arteriogene Signalwege der Zell-Zell-Interaktionen basieren hauptsächlich auf den aus dem Knochenmark stammenden Monozyten^{12,26}. Durch den Kollateralfluss aktivierte Endothelzellen exprimieren MCP-1⁸³ und Adhäsionsmoleküle^{84,85} und rekrutieren auf diese Weise die Monozyten⁸⁶. Sie adherieren und infiltrieren die Gefäßwand und leiten mit der Zerstörung der Media unter Verwendung von Proteasen und TNF- α den Umgestaltungsprozess ein. Zusätzlich trägt die inflammatorische Umgebung zur Wachstumsfaktorproduktion bei^{27,87}.

Ansatzpunkt für die Aufklärung der molekularen Mechanismen der Umsetzung des physikalischen Stimulus in diese strukturelle und funktionelle Konsequenz war die Untersuchung des Genexpressionsmusters in den wachsenden Gefäßen. Prinzipiell verläuft dieser als Mechanotransduktion bezeichnete Prozess über die Aktivierung von sekundären Botenstoffen und Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression regulieren (Abb. 26). Hat man ein Profil der differentiell exprimierten Gene erstellt, erlauben Signalweganalysen auch Rückschlüsse auf Zwischenschritte.

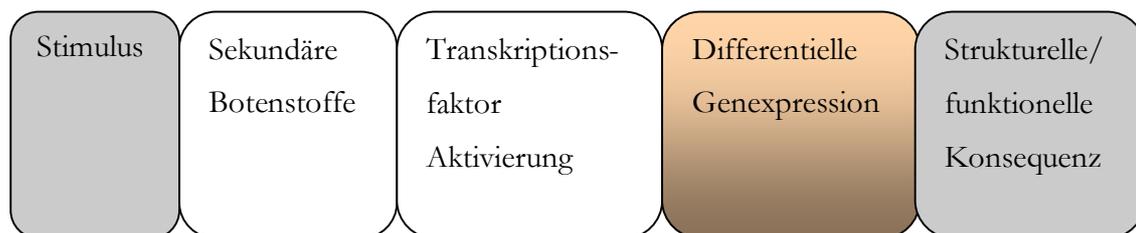


Abbildung 26: Schema der Mechanotransduktion

5.1.1 Auswahl und Eignung des AV-Shuntmodells in der Ratte

Da zur Aufklärung des Expressionsprofils die Verwendung von Microarrays angestrebt wurde, auf denen das gesamte Transkriptom eines Organismus untersucht werden kann, war das erste Kriterium bei der Auswahl des Tiermodells, eine Spezies zu wählen, deren Genom bekannt ist und für die solche Arrays existieren. Einerseits ist die Femoralarterienligatur am Kaninchenhinterlauf zwar das am weitesten verbreitete und bestuntersuchte Arteriogenesemodell für die Beschreibung des Zeitverlaufs, morphologischer Veränderungen und histologischer Untersuchungen von Kollateralarterien, andererseits ist aber das Kaninchengenom weitestgehend unbekannt. So mussten in früheren Studien zur Identifikation differentiell exprimierter Gene, Techniken eingesetzt werden, mit denen man auch unbekannte regulierte Gene detektiert und anschließend sequenziert. Inzwischen sind Gesamtgenom-Microarrays von verschiedenen Spezies verfügbar. Neben dem Kaninchenmodell sind Modelle weiterer Spezies zur Arteriogeneseforschung in der peripheren Zirkulation etabliert: Maus¹⁰, Ratte¹¹ und Schwein²².

Als Großtiermodell eignet sich das Schwein zwar zur Übertragung von Ergebnissen auf den Menschen, aber da sein Genom noch nicht vollständig bekannt ist, ist es für molekularbiologische Analysen ungeeignet. Der große Vorteil der Maus als Modellorganismus liegt in der Verfügbarkeit der kompletten genomischen Sequenz und einer großen Anzahl genetisch veränderter Mutantenstämme. Außerdem ist zur Quantifizierung der arteriogenen Antwort die Laser-Doppler-Flussmessung etabliert. Die chirurgische Anlage der Seit-zu-Seit Anastomose zwischen der Femoralarterie und der benachbarten Vene ist aber technisch noch nicht möglich.

Da in der Zwischenzeit das Rattengenom komplett sequenziert war ⁸⁸ und die Herstellung des AV-Shunts gelang, war das Rattenmodell am besten geeignet. Prinzipiell ist auch eine Quantifizierung des kollateralen Flusses z. B. mit Doppler-Sonden möglich. Daher wurde entschieden, für die Untersuchung der Genexpression auf Microarrays, Gewebe aus Shunt-behandelten Ratten zu verwenden und anschließende funktionelle Studien wegen der etablierten hämodynamischen Auswertung wieder in Kaninchen durchzuführen.

Bei der Planung der Experimente wurde weiterhin darauf geachtet, dass das zu untersuchende Gewebematerial möglichst alle sensorischen, transmittierenden und transduzierenden Elemente enthält. In vorangegangenen Microarraystudien der Arteriogenese untersuchten Lee et al. den Zeitverlauf der Genexpression von Mäusen nach Ligatur der Femoralarterie ⁸⁹. Sie isolierten dafür RNA aus den Adduktormuskeln, die die wachsenden Kollateralen umgeben. Die Gewebeprobe enthielt auf diese Weise natürlich einen weit größeren Anteil Skelettmuskel- als Kollateralgewebe. Es ist daher unwahrscheinlich, dass sie in ihren Experimenten die Expressionsunterschiede im stimulierten Endothel detektierten und damit die auslösenden Faktoren der Arteriogenese identifizieren konnten. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2006 befasste sich mit der Untersuchung des Expressionmusters von zirkulierenden Monozyten aus Patienten mit koronarer Herzkrankheit und unterschiedlichem Ausmaß an Kollateralisierung mit dem Ziel einer Identifikation genetischer Determinanten für ausgeprägtes Kollateralwachstum ⁹⁰.

In der vorliegenden Arbeit ermöglichte die Untersuchung von Gesamt-RNA aus isolierten Kollateralen, Aufschlüsse darüber zu gewinnen, wie die Schubspannung, die auf das Endothel wirkt, die Genexpression in der Gefäßwand beeinflusst.

Mit der Adaption des AV-Shuntmodells auf die Ratte gelang zum einen der Beweis, dass auch in dieser Spezies die permanente erhöhte Schubspannung zu einem enormen Kollateralgefäßwachstum führt und zum anderen ermöglichte es die Untersuchung auf

Gesamtgenom Microarrays. Der experimentelle Zeitpunkt fünf Tage nach Anlage des AV-Shunts wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die Schubspannung auf der Shunt-behandelten Seite stark erhöht ist, während sie bei einfacher Ligatur schon wieder durch den Durchmesserzuwachs abgefallen ist. Die proliferative Aktivität ist nach einfacher Ligatur zu diesem Zeitpunkt schon am abklingen. Es kann also die Wirkung von erhöhter Schubspannung in reiner Form untersucht werden. Ein weiterer Vorteil des Shuntmodells ergibt sich aus der Vergrößerung des Zeitfensters der Frühphase der Arteriogenese, in der eine Stress-induzierte Deformation der Endothelzellen und Veränderungen in der Zugspannung und der Anordnung des Zytoskeletts stattfinden.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es aus sorgfältig vom umgebenen Muskel herauspräparierten Kollateralarterien ausreichend Gesamt RNA zu isolieren, um damit sowohl Microarrayanalysen als auch quantitative PCR durchzuführen.

5.1.2 Microarray und quantitative RT-PCR

Das Ziel der Microarrayanalyse war es Kandidatengene bzw. Signalwege zu finden, die für die starke Stimulation des Kollateralwachstums durch erhöhte Schubspannung verantwortlich sein könnten. Daher wurden in einer genomweiten Analyse die Expressionsprofile von drei individuellen Ratten aus Kollateralgewebe fünf Tage nach AV-Shunt- sowie nach Sham Operation verglichen. 3820 statistisch signifikante ($p < 0,05$) exprimierte Gene wurden detektiert. Davon waren 927 mindestens 2-fach hoch-reguliert und 624 mindestens 2-fach herunterreguliert.

In dieser Liste befinden sich mit z. B. Cofilin ⁹¹, Osteopontin, Vimentin ⁹² und Fibronectin ⁹² solche Gene, deren Beteiligung am Wachstum von Kollateralen bekannt ist. Auch Thymosin β 4, für das erst kürzlich ein Einfluss auf alle drei Formen der Neovaskularisierung beschrieben wurde ⁹³, war ebenfalls hoch-reguliert. Auffällig war dagegen, dass die bekannten vaskulären Wachstumsfaktoren nicht hochreguliert waren. Untersuchungen der Genexpression in Kollateralen des Kaninchens nach Ligatur der Femoralarterie von Deindl et al. zeigten ebenfalls keine erhöhte Wachstumsfaktor-expression, nur eine frühe erhöhte Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren in Kollateralgewebe ⁹⁴. Die Autoren schließen daraus, dass auf der Gefäßseite die Wachstumsfaktorrezeptoren hochreguliert sind und deren Liganden parakrin von Monozyten geliefert werden. Die im Blut zirkulierenden Monozyten wurden in der

vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Offensichtlich wird auch die Expression der Rezeptoren für die Wachstumsfaktoren im Shuntmodell nicht aufrechterhalten (das wurde mit einer unabhängigen Methode bestätigt; hier nicht gezeigt).

Es wurden weiterhin hoch-regulierte Gene gefunden, die in *in vivo* Experimenten mit Schubspannung in Zusammenhang gebracht wurden. Darunter befand sich z. B. der Transkriptionsfaktor Klf2⁷⁸, dessen differentielle Expression detektiert wurde, obwohl er nur im Endothel exprimiert wird. Auch die Expression des ebenfalls endothelialen mechanosensitiven Ca²⁺-Kanals Trpv4 konnte detektiert und nach 5 Tagen Shunt erhöht gefunden werden. Dagegen konnte keines der von Tzima et al. dem mechanosensorischen Komplex zugehörigen Gene wieder gefunden werden⁹⁵. Weder PECAM-1, VE-Cadherin noch VEGFR2 sind in den schubspannungsstimulierten Kollateralen verstärkt exprimiert. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass diese Gene *in vitro* gefunden wurden und somit nicht die komplexe Situation gesamter wachsender Gefäße dargestellt wird. Dafür spricht auch, dass in einer Microarraystudie der Genexpressionprofile von co-kultivierten ECs und SMCs nach Schubspannungs-Stimulation zwar generell ähnliche Antworten bezüglich der Genexpression von Monokulturen und co-kultivierten ECs gefunden wurden, aber einige Gene reagierten auf Schubspannung genau entgegengesetzt in den zwei unterschiedlichen Kulturtypen. ICAM-1 ist in Monokultur nach Schubspannungsstimulation hochreguliert und in co-Kultur herunterreguliert. EC-SMC-Interaktionen beeinflussen demnach die EC Antwort auf Schubspannung⁹⁶. Hinzu kommt die Besonderheit der *in vivo* Situation in Kollateralgefäßen, dass zwischen der EC Schicht und der SMC Schicht die interne elastische Lamina (IEL) liegt und direkte Zell-zu-Zell Kontakte verhindert. Die Frage, ob bei der Signalübertragung die IEL erst verdaut werden muss oder ein leicht diffusibles Molekül der Transmitter sein könnte ist noch ungeklärt. Um die Mechanismen der Arteriogenese aufzuklären, sind daher *in vitro* Studien nicht ausreichend.

Für alle mit qRT-PCR validierten Gene konnte die auf dem Microarray detektierte signifikant unterschiedliche Expression bestätigt werden. Der Vergleich der in dieser Arbeit gezeigten differentiell exprimierten Gene mit zuvor publizierten Daten bestätigt außerdem, dass die verwendete Methode geeignet ist, die unterschiedlich regulierten Gene in wachsenden Kollateralen zu identifizieren und ein Expressionsprofil zu erstellen.

Die Auswertung der Signalwege, in die die gefundenen Gene involviert sind, deutet darauf hin, dass in der Regulation des Aktinzytoskeletts und des Kalziumhaushalts auffällig viele

Gene differentiell exprimiert sind. Hieraus wurde geschlossen, dass zum einen Kalzium als sekundärer Botenstoff in Frage kommt und ein Gen, welches früh in der Signalkette des Umbaus des Aktinzytoskeletts steht, eine wichtige Bedeutung hat.

Abgesehen von einer Reihe von Genen, die für Strukturproteine kodieren, war das am stärksten hoch regulierte Gen ein Aktin bindender Rho Aktivator (Abra). Der Zeitverlauf seiner Expression korrelierte mit der Höhe und Einwirkungsdauer der Schubspannung. Aus diesem Grund und wegen der biologischen Signifikanz, die sich aus der Literatur ergab, wurde auf dieses Gen fokussiert.

5.2 Abra (Actin-binding Rho activating protein) in der Literatur

Die cDNA von Abra (auch Stars oder ms1) wurde von zwei unabhängigen Gruppen erstmals 2002 kloniert. Arai et al. identifizierten mit differentieller cDNA Durchmusterung ein neues unbekanntes Gen, das im frühen embryonalen Herz exprimiert wird. Da sie es ausschließlich in Herz- und Skelettmuskel fanden, bezeichneten sie es als „striated muscle activator of Rho-dependent signalling“ (Stars)⁹⁷. Subzellulär lokalisieren sie Abra in der I-Bande des Sarkomers und in geringerem Ausmaß in der sarkomerischen Struktur zwischen den Z-Scheiben. Sie finden *in silico* keine erkennbaren Proteinmotive, können aber mittels Deletionsmutanten experimentell zwei separate Regionen identifizieren, die Aktin binden. Indem Abra das Aktinzytoskelett stabilisiert, stimuliert es die transkriptionale Aktivität des serum response factors (SRF) und damit die Expression muskelspezifischer Gene. Sie bezeichnen Abra als Vermittler zwischen zytoskelettalen Signalen, die über den Rho Signalweg die SRF abhängige Transkription aktivieren.

Im gleichen Jahr haben Mahadeva et al. auf der Suche nach regulatorischen Genen, die in die Signalübertragung, die zur linksventrikulären Hypertrophie (LVH) führt, involviert sind, eine neue cDNA identifiziert⁹⁸. Da diese für ein Gen kodiert, das bei Ratten nach Applikation von Drucküberlastung durch „Aortic banding“ im linken Ventrikel (LV) stark erhöht exprimiert wird, nannten sie es ms1 (myocyte stress 1). Offizielles Symbol ist inzwischen ABRA für das humane und Abra für das murine Homolog. Das abgeleitete Protein besteht aus 317 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 45 kDa. Auch Mahadeva et al. finden es hauptsächlich im gestreiften Muskel und beschreiben einen progressiven Anstieg im linken Ventrikel vom Embryo zum adulten Organismus. Der Zeitverlauf der mRNA Expression im LV nach Aortenbanding zeigte eine ausgeprägte frühe Hochregulierung (3-fach) noch lange bevor ein Anstieg an LV Masse detektiert

werden kann. Die Persistenz der Abra Expression im LV im adulten Organismus schließt aus, dass es zu der Gruppe fetaler Gene gehört, die während der LVH re-exprimiert werden. Vielmehr spekulieren die Autoren, dass eine erhöhte Abra Expression selbst der Auslöser für das hypertrophische Wachstum sein könnte. Bei der bioinformatischen Suche nach putativen funktionellen Domänen finden sie neben nukleären Lokalisationsstellen und Phosphorylierungsmotiven eine „internal ribosome entry site“ (IRES) in der 3'UTR. Diese könnte wichtig sein, wenn unter Bedingungen zellulären Stresses eine cap-unabhängige Translation erforderlich ist. Solche IRES wurden in verschiedenen Genen gefunden, die in Zellwachstum involviert sind (VEGF, c-myc)^{99,100}.

Abra wurde bislang aus verschiedenen Tierarten isoliert. Der Homologievergleich in Tabelle 2 belegt eine hohe Konservierung des Gens während der Evolution und lässt auf identische Funktionen des Proteins in den verschiedenen Tierarten schließen.

Spezies	Homologie zur humanen Sequenz
Macaca mulatta (XP_1088098)	96%
Pan troglodydes (XP_528210)	98%
Canis familiaris (XP_539120)	84%
Mus musculus (NP_780665)	79%
Rattus norvegicus (NP_787038)	77%
Bos taurus (XP_586763)	81%
Oryctolagus cuniculus (eigene Sequenzdaten)	83%

Tabelle 2: Aminosäure-Sequenzidentität des Abra Proteins verschiedener Spezies zum menschlichen Protein (Acc.: NP_631905).

5.2.1 Abra wird in wachsenden Blutgefäßen verstärkt exprimiert

Neben der in der Literatur beschriebenen exklusiven Expression von Abra in Herz- und Skelettmuskel wurde im Verlauf dieser Arbeit eine basale mRNA Expression in Blutgefäßen und darüber hinaus eine verstärkte Expression in wachsenden Kollateralgefäßen gezeigt. Die Untersuchungen von Gefäßen, die nicht von Skelettmuskel umgeben sind, wurden zum Ausschluss von Skelettmuskelkontaminationen durchgeführt. Eine extreme Hochregulierung von Abra in wachsenden Kollateralen in der Ratte (16-fach) und im Kaninchen (8-fach) wurde 7d nach Shunt-Behandlung im Vergleich zur einfachen Ligatur gefunden.

Da bei der Entnahme des Gewebes (ganze Kollateralarterien wurden aus dem Skelettmuskel herauspräpariert) nicht zwischen den vermeintlichen Sensoren, den Endothelzellen, und den proliferierenden SMCs unterschieden werden konnte, musste die Lokalisation in späteren Experimenten erfolgen. Zur histologischen, differenzierten Lokalisation von Abra auf mRNA und Proteinebene wurden *in situ* Hybridisierungen und immunhistochemische Färbungen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Abra durchgeführt. Abra mRNA wurde sowohl im Endothel als auch in SMCs der Gefäße aus Shunt-behandelten Ratten gefunden. Das korrespondierende Protein konnte ebenfalls sowohl im Endothel als auch in der Media der Gefäße dargestellt werden. Eine leichte Färbung war auch in der Adventitia zu sehen. Das Signal in den Shunt-behandelten Gefäßen war stärker als in den Gefäßen nach einfacher Ligatur und im angrenzenden Skelettmuskelgewebe. Dieser Befund entsprach den Ergebnissen aus der *in situ* Hybridisierung. Ferner konnte eine Färbung von Zellkernen und Zytoplasma gezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Widerspruch zu früheren Publikationen, da sie sowohl auf mRNA Ebene als auch für das Protein eine Lokalisation von Abra in Gefäßen zeigen. Obwohl alle Publikationen ausschließlich von Abra Expression in gestreiften Muskeln berichten, deuten speziell die Experimente von Arai et al. mit den SRF-induzierbaren SM22- und α -SM-Aktin-Promotoren auf eine Rolle in glatten Muskelzellen hin. Im Reporterassay können sie in Abra transfizierten Cos-1-Zellen eine 40 mal stärkere Aktivierung des SM22-Promotors zeigen und erwähnen auch eine leichte (4-5-fache) Aktivierung des α -SM-Aktin Promotors⁹⁷. SM22 wird während der Embryogenese

noch in glatten, skelettalen und kardialen Muskelzellen exprimiert, ist im adulten Organismus aber ein SMC Marker ¹⁰¹. Es wird wie die meisten SMC-spezifischen Gene über den SRF reguliert. Dieser bindet an ein oder mehrere CARG-box-Elemente in den regulatorischen Sequenzen der SMC-Gene und koordiniert so die Expression verschiedener kontraktiler und zytoskelettaler Gene. Dieses Programm der Differenzierung von SMCs wird sowohl während der vaskulären Entwicklung als auch im arteriellen Umbauprozess moduliert. Majesky gibt einen Überblick über die SRF Coaktivatoren ¹⁰². Die Gentranskription in glatten Muskelzellen hängt von einem hoch-konservierten cis-regulatorischen Element ab, der CarG Box [CC(A/T)₆GG]. An diese Sequenz bindet Serum response factor (SRF), ein evolutionär konserviertes MADS Domänen Protein, das für die Spezifikation glatter, kardialer und skelettaler Muskeln aus dem frühen Mesoderm benötigt wird. SRF ist ein multifunktionales Protein, das nicht nur DNA bindet, sondern auch Bindestellen für Interaktionen mit einer großen Zahl von Kofaktoren bietet. Die meisten, aber nicht alle SMC-Marker Gene, die bis heute untersucht wurden, erfordern SRF Interaktionen mit CarG-Elementen. Aber diese Interaktionen alleine sind nicht ausreichend um die Diversität aller SMC Subtypen, die man in der Vaskulatur findet, zu erklären.

Nach der Identifikation der neuen Lokalisation von Abra in Zellen der Gefäßwand, erfolgte die Untersuchung einer neuen Funktion.

5.3 Abra ist ein Mitogen für glatte Muskelzellen

Ein entscheidender Prozess während der Arteriogenese ist die Proliferation von SMCs. Sowohl in kultivierten porcinen Endothelzellen aus der Aorta (PAEC) als auch in porcinen glatten Muskelzellen (PSMC) wurde die Auswirkung von Abra Überexpression untersucht. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion mit Abra subkonfluent, befanden sich also im proliferativen Phänotyp, was der Situation in der wachsenden Kollaterale entspricht. Die Abra Transfektion steigerte die Proliferation von porcinen glatten Muskelzellen. Die Untersuchung einer weiteren SMC-Zelllinie aus Ratten (A10) mit anschließender direkter Zellzahlbestimmung bestätigte dieses Ergebnis. Auf ECs hat eine Abra-Überexpression keine mitogene Wirkung.

5.4 Abra stimuliert die Arteriogenese

Zur Beantwortung der Frage, ob Abra eine aktive regulative Rolle während des Wachstums von Kollateralen hat oder die erhöhte Expression eine Folge des Umbauprozesses ist, wurde die Genexpression *in vivo* moduliert.

Eine Möglichkeit der funktionellen Untersuchung sind *in vivo* Experimente in Knock out Tieren. Für CD4^(-/-) Mäuse¹⁰³, MCP-1 Rezeptor (CCR2)^(-/-) Mäuse¹⁰⁴ und für „Notch ligand Delta-like 1“ (Dll1)^(-/-) Mäuse¹⁰⁵ wurde eine beeinträchtigte Arteriogenese nach Ligatur der Femoralarterie gezeigt. Für solche Untersuchungen sind uns freundlicherweise Abra^(-/-) Mäuse von E. Olson (Dallas, USA) zur Verfügung gestellt worden, die allerdings zurzeit noch zurück gekreuzt werden.

Für eine schnelle Prüfung der Funktion von Abra eignet sich der lokale, transiente Gentransfer mit Adenoviren. Er wurde sowohl zur Abra Überexpression als auch zum siRNA-vermittelten Knock-down eingesetzt.

5.4.1 Intrakollateraler Gentransfer

Der transiente intra-kollaterale Gentransfer mit rekombinanten Adenoviren (Ad_Abra), die Abra unter der Kontrolle eines CMV Promotors exprimieren, erlaubt die effiziente Modulation der Genexpression und ist zudem auf einen bestimmten Gefäßabschnitt beschränkt¹⁰⁶. Im Rahmen dieser Arbeit wurden virale Transkripte in den Kollateralen der virus-behandelten Seite, nicht aber in denen der Kontrollseite detektiert. Einzig in der Milz konnten ebenfalls Virentranskripte nachgewiesen werden. Das lässt sich mit der Technik des intra-vasalen Gentransfers erklären. Nach der Inkubationszeit der Virenlösung wurde der temporäre Verschluss oberhalb der Abgänge der in das Kollateralgebiet übergehenden Gefäße wieder geöffnet und der Blutzufluss konnte die noch nicht in die Gefäßwand eingedrungenen Viren aus der Hintergliedmaße spülen. Die Milz als größtes lymphatisches Organ konnte so ebenfalls transduziert werden.

Die Lokalisation des viralen Genprodukts erfolgte mit einem Reporter-gen. Hier konnte der Befund der lokalen Restriktion des Gentransfers durch die X-Gal Färbung der Quadricepsmuskeln bestätigt werden. Nur auf der LacZ-Virus-behandelten Seite waren die Blutgefäße und das umgebende Muskelgewebe blau gefärbt.

Mit einer nachträglichen Paraffineinbettung und anschließender Untersuchung der Schnitte konnte die Eindringtiefe des Genprodukts in die Gefäßwand demonstriert werden. Nicht

nur die Endothelzellen zeigten eine Blaufärbung; auch die glatten Muskelzellen wurden erreicht.

Aufgrund der spezifischen Transduktion der Kollateralgefäße ist diese Methode des intra-kollateralen Gentransfers zum relativ schnellen Test eines Moleküls auf seine Arteriogenität gut geeignet.

5.4.2 Einfluss der Abra Expression auf die Arteriogenese

Die durch Ad_Abra vermittelte Überexpression im Kaninchenhinterlauf führte nach 7 Tagen zu einer Steigerung des Kollateralwachstums. Bei beidseitiger Ligatur und einseitigem Gentransfer konnte die kollaterale Konduktanz auf der Ad_Abra-behandelten Seite um 67% gesteigert werden. Diese Steigerung wurde sowohl intra-individuell beobachtet, was eine systemische Stimulation ausschließt, als auch im Vergleich zu Kontrolltieren, die mit dem Kontrollvirus Ad_LacZ behandelt wurden.

Mit einer durchschnittlichen maximalen kollateralen Konduktanz von 237 ± 9 ml/min/100mmHg wurden mit dem Ad_Abra Gentransfer zwar nicht die hämodynamischen Werte der AV-Shunt Behandlung (306 ± 15 ml/min/100mmHg) erreicht, aber sie lagen im Bereich des bis dahin besten arteriogenen Faktors MCP-1. Eine lokale Infusion von MCP-1 lieferte nach 7 Tagen eine Steigerung der maximalen kollateralen Konduktanz auf 220 ± 11 ml/min/100mmHg^{80,107,13}. Erstmals wurde ein Gen identifiziert, das nicht zu der Gruppe der Wachstumsfaktoren gehört, und mit dessen Überexpression eine Verbesserung der Arteriogenese erreicht werden kann. Die Shunt-Wirkung konnte teilweise simuliert werden.

Es schloss sich die Frage an, ob die Arteriogenese ohne Abra gehemmt ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte Adenoviren hergestellt werden, die siRNA-vermittelten „knock down“ von Abra bewirken. Die Effizienz wurde in Cos-1-Zellen verifiziert und lag bei mehr als 90% Reduzierung der mRNA im Vergleich zu siRNA_LacZ Kontrollen.

Mit dem intra-kollateralen Gentransfer rattenspezifischer siRNA_Abra Viren im Kombination mit der Erhöhung der Schubspannung durch die Anlage des AV-Shunts wurde geprüft, ob ein „knock down“ von Abra die Arteriogenese hemmt. Die Auswertung der Angiogramme zeigt eine deutliche Hemmung des Kollateralwachstums. Z. Zt. wird an einer Quantifizierung der Kollateraldurchblutung in der Ratte gearbeitet.

In den funktionellen Experimenten konnte eine Steigerung der Proliferationsaktivität durch Abra in glatten Muskelzellen gezeigt werden. *In vivo* konnte ebenfalls das Wachstum der Kollateralen durch Abra Überexpression gesteigert werden. Mit dem „knock down“ endogenem Abras in der schubspannungs-induzierten Arteriogenese konnte schließlich gezeigt werden, dass Abra Voraussetzung für die Arteriogenese ist.

5.4.3 Mögliche Rolle von Abra in der Arteriogenese

Die vorliegenden und früheren Ergebnisse lassen auf eine stress-induzierte Deformation von Endothelzellen und die damit einhergehenden Veränderungen der zytoskelettalen Spannung und Organisation schließen. Dadurch werden Signale ausgesendet, die wiederum zu einer Vielzahl von Antworten führen und gemeinsam agieren.

Abra ist dramatisch hochreguliert während des hypertrophischen Wachstums des Herzens⁹⁸ und – wie in dieser Arbeit demonstriert wurde – in wachsenden Kollateralarterien. Die Integrität des Zytoskeletts ist in beiden Prozessen beeinflusst und hat damit Auswirkungen auf die Genexpression und das Wachstum von Muskelzellen. Abra könnte ein potentieller Vermittler zwischen der Myozytenstruktur und dem Programm für die Muskelgenexpression sein. Die Spekulation, dass Abra aufgrund seiner Lokalisation in der Z-Scheibe des Sarkomers in der Mechanotransduktion in gestreiftem Muskel eine Rolle spielen könnte¹⁰⁸, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit untermauert und auf glatte Muskelzellen erweitert. Im Fall der schubspannungs-induzierten Arteriogenese könnte Abra also als ein Vermittler der Schubspannung (oder in glatten Muskelzellen der Wandspannung) in ein Wachstumssignal sein.

Es konnte gezeigt werden, dass eine adenovirale Überexpression von Abra die Arteriogenese stimuliert. Ein Modell, das erklärt, wie einerseits die Abra Expression durch Schubspannung induziert wird und wie das Protein dann möglicherweise in das Wachstum von Kollateralarterien eingreift, ist in Abb. 27 dargestellt.

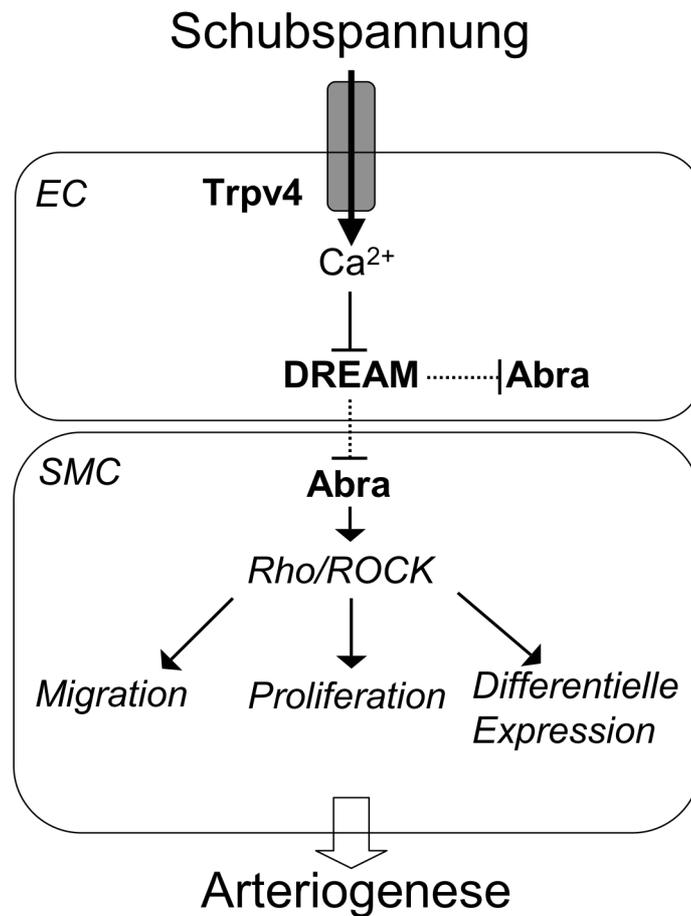


Abbildung 27: Schema der möglichen Mechanotransduktion der Schubspannung in der Arteriogenese. die schubspannungs-induzierte Öffnung von Trpv4 führt – möglicherweise über die Calcium-vermittelte Translokation des transkriptionalen Repressors DREAM – zu erhöhter Abra Expression. Abra initiiert dann über den Rho/ROCK Signalweg die Migration von Monozyten, Proliferation von glatten Muskelzellen und zur differentiellen Expression einer Reihe weiterer Gene.

Das Wachstum von Kollateralarterien kann durch den Verschluss der Femoralarterie in der Ratte induziert werden. Als Folge erhöht sich die Schubspannung in den Kollateralgefäßen und verursacht u. a. die Reorganisation des Zytoskeletts, ein Prozess der von Rho-GTPasen vermittelt wird.¹⁰⁹ Unsere Kooperationspartner in Amsterdam haben den Abra Promotor mit der Genomatix Software untersucht und viele potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen gefunden. Um die Liste einzugrenzen haben sie in ihrer Analyse genomische Sequenzen aus sieben Spezies (darunter auch Huhn und Opossum) eingeschlossen und nur konservierte Sequenzen berücksichtigt. Sie identifizierten zwei nahe beieinander liegende, potentielle regulatorische Einheiten direkt stromaufwärts vom Transkriptionsstart. Die erste enthält eine TATA Box und „myocyte enhancer factor-2“ (MEF2) Bindestelle und die zweite enthält eine TATA Box und „activating transcription factor 4“ (ATF4 oder CREB2) Bindestelle. Eine MEF2 gesteuerte Transkription erscheint sinnvoll, da MEFs in vielen muskelspezifischen regulatorischen Prozessen involviert^{110,111} und außerdem Ca^{2+} -abhängig sind¹¹². Im Abra Promotor der Ratte fällt außerdem eine „DNA replication-related element“ (DRE)-Sequenz auf, an die der Ca^{2+} -abhängige Repressor „DRE-antagonist modulator“ (DREAM) bindet. Nach Ca^{2+} Einstrom in den Nukleus transloziert DREAM ins Zytoplasma¹¹³ und eine Transkription von Abra könnte stattfinden. Alle Hinweise aus den Promotoranalysen müssen noch biochemisch verifiziert werden, deuten aber bereits auf einen Zusammenhang von Ca^{2+} -Einstrom und Abra-Expression hin. Möglicherweise bewirkt die Schubspannung in den Kollateralen eine Öffnung des mechanosensitiven Ca^{2+} -Kanals Trpv4 in den Endothelzellen¹¹⁴. Der Zeitverlauf der Expression dieses Kanals korreliert in Shunt-Kollateralen mit der Einwirkung der Schubspannung. (Abb. 10)

Um den Arteriogenese Signalweg von Abra weiter aufzuschlüsseln, ist eine „Yeast two hybrid“ Studie zur Identifikation von potentiellen Bindungspartnern von Abra durchgeführt worden. Hierfür ist eine cDNA Bibliothek aus Shunt-behandelten Kollateralen durchmustert worden. Neben dem bekannten Bindungspartner Aktin sind Gene gefunden worden, die bereits im Zusammenhang mit Gefäßwachstum beschrieben wurden. Darunter ist mit Thymosin β 4 (Tmsb4) ein Kandidat der – falls die Bindung an Abra bestätigt werden kann – eine Einordnung von Abra in bestehende arteriogene Signalwege zulässt.

Die zeitliche Reihenfolge der Expression von Trpv4 und Abra sowie den bekannten Genen, die für Carp, Klf2 und Tmsb4 kodieren, weisen auf eine kausale Abhängigkeit hin (Abb. 28).

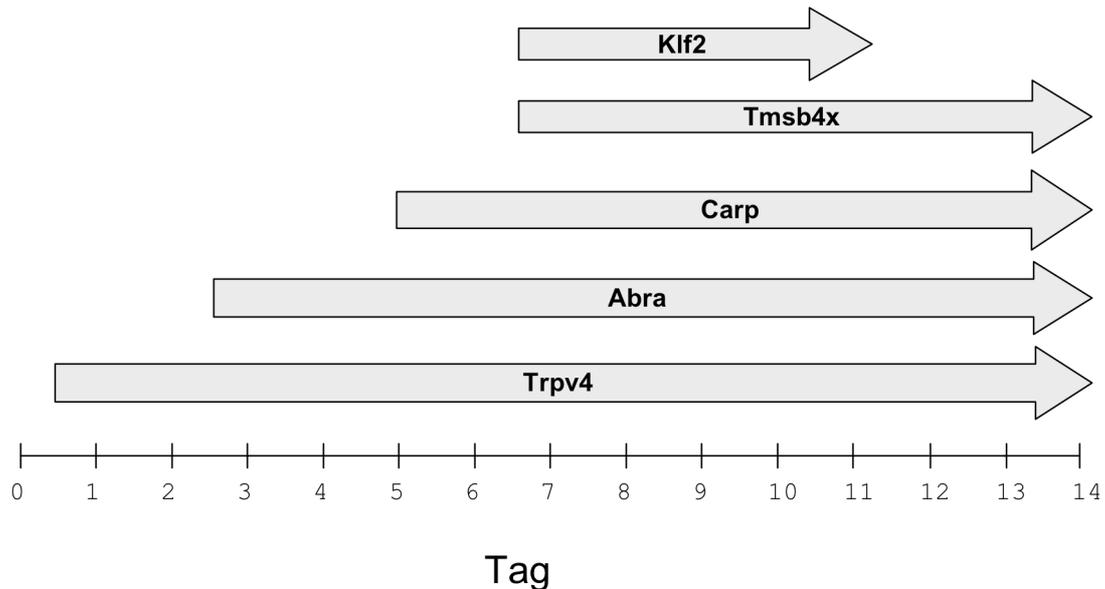


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf des Auftretens ausgewählter Transkripte nach Ligatur und AV-Shunt. Trpv4 und Abra führen die Kaskade der Genexpression an.

In dieser Arbeit wurde mit Abra ein Gen identifiziert, welches in frühem Stadium der Arteriogenese erhöht exprimiert wird und dessen Expression unter Schubspannungsstimulation aufrechterhalten wird. Mit der Modulation von Abra wurde dem Protein eine neue Funktion zugewiesen. Es stimuliert die Proliferation von SMC und ist an der Initiation der Arteriogenese beteiligt, was es zum geeigneten Kandidaten für Therapien macht, die das Gefäßwachstum zum Ziel haben.

6 Literatur

1. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674 (1997).
2. Ribatti, D., Vacca, A., Nico, B., Roncali, L. & Dammacco, F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev* **100**, 157-163 (2001).
3. Rafii, S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* **105**, 17-19 (2000).
4. Jang, Y.C., Arumugam, S., Gibran, N.S. & Isik, F.F. Role of alpha(v) integrins and angiogenesis during wound repair. *Wound Repair Regen* **7**, 375-380 (1999).
5. Folkman, J. The vascularization of tumors. *Sci Am* **234**, 58-64, 70-53 (1976).
6. Kimura, H., *et al.* Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* **95**, 189-197 (2000).
7. Kim, I., *et al.* Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res* **86**, 24-29 (2000).
8. Busch, H.J., Buschmann, I.R., Mies, G., Bode, C. & Hossmann, K.A. Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 621-628 (2003).
9. Buschmann, I.R., Busch, H.J., Mies, G. & Hossmann, K.A. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* **108**, 610-615 (2003).
10. Scholz, D., *et al.* Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 775-787 (2002).
11. Herzog, S., Sager, H., Khmelevski, E., Deylig, A. & Ito, W.D. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H2012-2020 (2002).
12. Arras, M., *et al.* Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* **101**, 40-50 (1998).
13. Voskuil, M., *et al.* Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H1422-1428 (2003).
14. Buschmann, I.R., *et al.* Invasive and non-invasive evaluation of spontaneous arteriogenesis in a novel porcine model for peripheral arterial obstructive disease. *Atherosclerosis* **167**, 33-43 (2003).
15. Schaper, W. & Scholz, D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1143-1151 (2003).
16. Longland, C.J. Collateral circulation in the limb. *Postgrad Med J* **29**, 456-458 (1953).
17. Schaper, W., De Brabander, M. & Lewi, P. DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circ Res* **28**, 671-679 (1971).
18. Schaper, W., Piek, J.J., Munoz-Chapuli, R., Wolf, C. & Ito, W. Collateral circulation of the heart. in *Angiogenesis and Cardiovascular Disease* (eds. Ware, J.A. & Simons, M.) 159-189 (Oxford University Press, New York, NY, Oxford, 1999).
19. Scholz, D., *et al.* Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* **436**, 257-270 (2000).

20. Helisch, A. & Schaper, W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* **10**, 83-97 (2003).
21. Schaper Wolfgang , S.J. *Arteriogenesis*, (Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2004).
22. Pipp, F., *et al.* Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1664-1668 (2004).
23. Buschmann, I. & Schaper, W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci* **14**, 121-125 (1999).
24. Ziegelhoeffer, T., *et al.* Inhibition of collateral artery growth by mibefradil: possible role of volume-regulated chloride channels. *Endothelium* **10**, 237-246 (2003).
25. Shyy, Y.J., Hsieh, H.J., Usami, S. & Chien, S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4678-4682 (1994).
26. Schaper, J., Konig, R., Franz, D. & Schaper, W. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **370**, 193-205 (1976).
27. Polverini, P.J., Cotran, P.S., Gimbrone, M.A., Jr. & Unanue, E.R. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* **269**, 804-806 (1977).
28. Kamiya, A. & Togawa, T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* **239**, H14-21 (1980).
29. Unthank, J.L., Fath, S.W., Burkhardt, H.M., Miller, S.C. & Dalsing, M.C. Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat. *Circ Res* **79**, 1015-1023 (1996).
30. Zarins, C.K., Zatina, M.A., Giddens, D.P., Ku, D.N. & Glagov, S. Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis. *J Vasc Surg* **5**, 413-420 (1987).
31. Heil, M., *et al.* Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology* **283**, H2411-2419 (2002).
32. Schaper, W. & Ito, W.D. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* **79**, 911-919 (1996).
33. Busse, R., *et al.* EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 374-380 (2002).
34. Rodbard, S. Vascular caliber. *Cardiology* **60**, 4-49 (1975).
35. Langille, B.L. Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix. *J Cardiovasc Pharmacol* **21 Suppl 1**, S11-17 (1993).
36. Holtz, J., Forstermann, U., Pohl, U., Giesler, M. & Bassenge, E. Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* **6**, 1161-1169 (1984).
37. Tronc, F., *et al.* Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 1256-1262 (1996).
38. Ben Driss, A., Benessiano, J., Poitevin, P., Levy, B.I. & Michel, J.B. Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol* **272**, H851-858 (1997).
39. Schaper, W., *et al.* Physical Forces and their Translation into Molecular Mechanisms. in *Arteriogenesis* (ed. Schaper, W.S., J.) (Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2004).

40. Tzima, E. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circ Res* **98**, 176-185 (2006).
41. Olesen, S.P., Clapham, D.E. & Davies, P.F. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature* **331**, 168-170 (1988).
42. Naruse, K. & Sokabe, M. Involvement of stretch-activated ion channels in Ca²⁺ mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am J Physiol* **264**, C1037-1044 (1993).
43. Yoshikawa, N., *et al.* Shear-stress causes polarized change in cytoplasmic calcium concentration in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Cell Calcium* **22**, 189-194 (1997).
44. Gudi, S., Nolan, J.P. & Frangos, J.A. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 2515-2519 (1998).
45. Busse, R. & Fleming, I. Regulation of NO synthesis in endothelial cells. *Kidney Blood Press Res* **21**, 264-266 (1998).
46. Li, S., *et al.* Fluid shear stress activation of focal adhesion kinase. Linking to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **272**, 30455-30462 (1997).
47. Li, Y.S., *et al.* The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression. *Mol Cell Biol* **16**, 5947-5954 (1996).
48. Tseng, H., Peterson, T.E. & Berk, B.C. Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ Res* **77**, 869-878 (1995).
49. Traub, O. & Berk, B.C. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 677-685 (1998).
50. Hsieh, H.J., *et al.* Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. *J Cell Physiol* **175**, 156-162 (1998).
51. Khachigian, L.M., Resnick, N., Gimbrone, M.A., Jr. & Collins, T. Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress. *J Clin Invest* **96**, 1169-1175 (1995).
52. Ohno, M., Cooke, J.P., Dzau, V.J. & Gibbons, G.H. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest* **95**, 1363-1369 (1995).
53. Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W.J., Dewey, C.F., Jr. & Gimbrone, M.A., Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **94**, 885-891 (1994).
54. Sampath, R., Kukielka, G.L., Smith, C.W., Eskin, S.G. & McIntire, L.V. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann Biomed Eng* **23**, 247-256 (1995).
55. Resnick, N., *et al.* Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 7908 (1993).
56. Malek, A. & Izumo, S. Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* **263**, C389-396 (1992).
57. Malek, A.M., Greene, A.L. & Izumo, S. Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and

- cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5999-6003 (1993).
58. Girard, P.R. & Nerem, R.M. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. *J Cell Physiol* **163**, 179-193 (1995).
 59. Malek, A.M. & Izumo, S. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci* **109 (Pt 4)**, 713-726 (1996).
 60. Heil, M., *et al.* Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H2411-2419 (2002).
 61. Davies, P.F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* **75**, 519-560 (1995).
 62. Takahashi, M. & Berk, B.C. Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells. Essential role for a herbimycin-sensitive kinase. *J Clin Invest* **98**, 2623-2631 (1996).
 63. Ingber, D.E., *et al.* Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. *Int Rev Cytol* **150**, 173-224 (1994).
 64. Tzima, E., *et al.* Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *Embo J* **21**, 6791-6800 (2002).
 65. Resnick, N., *et al.* Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* **81**, 177-199 (2003).
 66. Eitenmuller, I., *et al.* The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res* **99**, 656-662 (2006).
 67. Gluzman, Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182 (1981).
 68. Chesterman, C.N., Ager, A. & Gordon, J.L. Regulation of prostaglandin production and ectoenzyme activities in cultured aortic endothelial cells. *J Cell Physiol* **116**, 45-50 (1983).
 69. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* **36**, 59-74 (1977).
 70. Eitenmuller, I. Justus-Liebig-Universität Gießen (2005).
 71. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55-63 (1983).
 72. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods* **89**, 271-277 (1986).
 73. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).
 74. Ausubel, F.M., *et al.* *Current protocols in molecular biology*, (Wiley Interscience, New York, 2000).
 75. Vandesompele, J., *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034 (2002).
 76. Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-349 (2004).

77. Polson, A., von Wechmar, M.B. & van Regenmortel, M.H. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunological communications* **9**, 475-493 (1980).
78. Dekker, R.J., *et al.* Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *Am J Pathol* **167**, 609-618 (2005).
79. Lazarous, D.F., *et al.* Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation* **94**, 1074-1082 (1996).
80. Ito, W.D., *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* **80**, 829-837 (1997).
81. Buschmann, I.R., *et al.* GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis* **159**, 343-356 (2001).
82. Unger, E.F. Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res* **49**, 497-506 (2001).
83. Shyy, Y.J., Li, Y.S. & Kolattukudy, P.E. Activation of MCP-1 gene expression is mediated through multiple signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **192**, 693-699 (1993).
84. Walpola, P.L., Gotlieb, A.I., Cybulsky, M.I. & Langille, B.L. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 2-10 (1995).
85. Morigi, M., *et al.* Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Blood* **85**, 1696-1703 (1995).
86. Hofer, I.E., *et al.* Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms. *Circ Res* **94**, 1179-1185 (2004).
87. van Royen, N., *et al.* Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J* **16**, 432-434 (2002).
88. Gibbs, R.A., *et al.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**, 493-521 (2004).
89. Lee, C.W., *et al.* Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice: insights into the genomic program for collateral vessel development. *J Am Coll Cardiol* **43**, 474-482 (2004).
90. Chittenden, T.W., *et al.* Transcriptional profiling in coronary artery disease: indications for novel markers of coronary collateralization. *Circulation* **114**, 1811-1820 (2006).
91. Boengler, K., *et al.* Identification of differentially expressed genes like cofilin2 in growing collateral arteries. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 751-756 (2003).
92. Cai, W.J., *et al.* Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H31-40 (2003).
93. Smart, N., *et al.* Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* **445**, 177-182 (2007).
94. Deindl, E., *et al.* Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res* **92**, 561-568 (2003).
95. Tzima, E., *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**, 426-431 (2005).
96. Heydarkhan-Hagvall, S., *et al.* DNA microarray study on gene expression profiles in co-cultured endothelial and smooth muscle cells in response to 4- and 24-h shear stress. *Mol Cell Biochem* **281**, 1-15 (2006).

97. Arai, A., Spencer, J.A. & Olson, E.N. STARS, a striated muscle activator of Rho signaling and serum response factor-dependent transcription. *J Biol Chem* **277**, 24453-24459 (2002).
98. Mahadeva, H., Brooks, G., Lodwick, D., Chong, N.W. & Samani, N.J. ms1, a novel stress-responsive, muscle-specific gene that is up-regulated in the early stages of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *FEBS Lett* **521**, 100-104 (2002).
99. Stoneley, M., *et al.* Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res* **28**, 687-694 (2000).
100. Stein, I., *et al.* Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol* **18**, 3112-3119 (1998).
101. Li, L., Miano, J.M., Cserjesi, P. & Olson, E.N. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ Res* **78**, 188-195 (1996).
102. Majesky, M.W. Decisions, decisions...SRF coactivators and smooth muscle myogenesis. *Circ Res* **92**, 824-826 (2003).
103. Stabile, E., *et al.* Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* **108**, 205-210 (2003).
104. Heil, M., *et al.* Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* **94**, 671-677 (2004).
105. Limbourg, A., *et al.* Notch ligand Delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis. *Circ Res* **100**, 363-371 (2007).
106. Eitenmueller, I. Justus-Liebig-Universität Gießen (2005).
107. Hoefler, I.E., van Royen, N., Buschmann, I.R., Piek, J.J. & Schaper, W. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res* **49**, 609-617 (2001).
108. Chien, K.R. & Olson, E.N. Converging pathways and principles in heart development and disease: CV@CSH. *Cell* **110**, 153-162 (2002).
109. Galbraith, C.G., Skalak, R. & Chien, S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**, 317-330 (1998).
110. Gossett, L.A., Kelvin, D.J., Sternberg, E.A. & Olson, E.N. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* **9**, 5022-5033 (1989).
111. Black, B.L. & Olson, E.N. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 167-196 (1998).
112. McKinsey, T.A., Zhang, C.L. & Olson, E.N. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends in biochemical sciences* **27**, 40-47 (2002).
113. Carrion, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B. & Naranjo, J.R. DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* **398**, 80-84 (1999).
114. Liedtke, W., Tobin, D.M., Bargmann, C.I. & Friedman, J.M. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100 Suppl 2**, 14531-14536 (2003).

7 Abkürzungsverzeichnis

α -SM	„ α -smooth muscle“
A., Aa.	arteria, arteriae
Abb.	Abbildung
Abra	„Actin-binding Rho activating protein“
AP	Alkalische phosphatase
AS	Aminosäure
AV-Shunt	Arterio-venöser Shunt
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
carp	„cardiac ankyrin repeat protein“
C_t	„Threshold cycle“
Cy5	Indodicarbocyaninphosphoramidit
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenyl-indol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	„Dulbeccos´ s Modified Eagle Medium“
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
E.coli	Escherichia coli
EC	Endothelzellen
EDHF	„Endothelial-derived hyperpolarizing factor“
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
Et-1	Endothelin-1
FAK	„focal adhesion kinase“
FGF	„fibroblast growth factor“
FGFR1	„fibroblast growth factor receptor 1“
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gravitationskonstante
GM-CSF	„granulocyte macrophage colony stimulating factor“
h	Stunde
HE	Hämalaun Eosin
HIF-1 α	„hypoxia inducible factor 1 α “
HRP	„horseradish peroxidase“
ICAM-1	„intercellular adhesion molecule 1“
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid
JAK	Janus-Kinase

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
Klf	„Krüppel-like factor“
LB	Luria-Bertani-Medium
M, mM	Molar, millimolar
M.	musculus
MCP-1	„monocyte chemoattractant protein 1“
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minute
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	„messenger RNA“
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	„molecular weight“
NFκB	„nuclear factor kappa B“
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	„NO-synthase“
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
Opn	Osteopontin
PAEC	„porcine aortic endothelial cells“, Schweineaorten-Endothelzellen
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PDGF	„platelet derived growth factor“
PECAM	„platelet/endothelial cell adhesion molecule“
PFA	Paraformaldehyd
PFU	„plaque forming units“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	„reactive oxygen species“
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	„standard error of mean“
siRNA	„small interfering“ RNA
SMC	„smooth muscle cells“, glatte Muskelzellen
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
Tab.	Tabelle
TGF-β1	„transforming growth factor β 1“
TNF-α	„tumor necrosis factor α“
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
VCAM-1	„vascular cell adhesion molecule 1“

VE-Cadherin	„vascular endothelial cadherin“
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
VEGFR2	„vascular endothelial growth factor receptor 2“
WB	Western Blot
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β -D-galaktosid

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Abteilung Experimentelle Angiologie, in Bad Nauheim angefertigt. Herrn Prof. Thomas Braun danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut und die Gelegenheit meine Experimente in seinen Abteilungsseminaren zu präsentieren.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schaper, danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Anregung zu dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Inka Eitenmüller für die Unterstützung bei den Tierexperimenten und Prof. Wei-Jun Cai für die Zusammenarbeit in der Immunhistochemie.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt allen meinen Sprudelhof-KollegInnen für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Besonders danken möchte ich Dr. Yvonne Mücke, Brigitte Matzke, Dr. Wilma Schierling, Uta Eule, Hendrik Weller, Ina Hofmann und Linda Hammer für die vielen anregenden Gespräche, Hilfen bei der täglichen Laborarbeit und auch für nette gemeinsame Stunden außerhalb des Labors.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie: Meinen Eltern Gabriele und Volker Uhl für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Ludwig und Paul für die Selbstverständlichkeit, mit der sie akzeptiert haben, dass sie „Ganztagskinder“ sind. Christian, Dir danke ich am allermeisten für konkurrenzlose Teamarbeit in Wissenschaft und Familie.

9 Lebenslauf

Name: Kerstin Troidl, geb. Uhl
Geburtsdatum/-ort: 25.01.1971 in Gießen
Familienstand: Verheiratet, zwei Kinder

Ausbildung

1990 Abitur an der Herderschule Gießen, Note: 1,8
09.90 - 02.91 Technisches Praktikum bei der Berkenhoff GmbH, Heuchelheim
03.91 - 07.95 Studium: Technisches Gesundheitswesen, Fachhochschule Gießen-
Friedberg, Dipl.- Ing. (FH), Fachrichtung Biotechnologie
Diplomarbeit am Institut für Rechtsmedizin, JLU Gießen
04.94 - 07.94 Fachpraktikum bei der Finnzymes AG, Espoo Finnland

Berufstätigkeit

10.95 - 06.03 Max-Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung,
Bad Nauheim – Analyse der genetischen Ursachen der
Hypertrophischen Kardiomyopathie
01.02 - 12.02 Berufsbegleitendes Aufbaustudium „Bioinformatik“ an der
Akademie für Weiterbildung der Universitäten Heidelberg und
Mannheim
seit 06.04 Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
– Molekulare Mechanismen der Arteriogenese

Stipendien

01.02 – 12.02 Klaus Tschira Stiftung gGmbH
01.06 – 10.06 Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
seit 01.07 Kerckhoff-Stiftung

Publikationen

Troidl K, Eitenmueller I, Cai WJ, Mücke, Y, Piotrowska I, Volger O, Horrevoets AJG, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Troidl C: *Trpv4 and Abra: Two novel factors determine the growth of collateral arteries (arteriogenesis).*

Circulation Research. Eingereicht.

Eitenmueller I, Volger O, Kluge A, **Troidl K**, Barancik M, Cai WJ, Heil M, Pipp F, Fischer S, Horrevoets, AJG, Schmitz-Rixen T, Schaper W: *The Range of Adaptation by Collateral Vessels after Femoral Artery Occlusion*

Circulation Research (2006) 99: 656-662

Troidl K, Troidl C: *Stammzellen – Anwendungen und Argumente; Minimal Invasive Chirurgie* (2003) 12: 105-108

Chakarova C, Wehnert MS, **Uhl K**, Sakthivel S, Vosberg HP, van der Ven PF, Fürst DO: *Genomic structure and fine mapping of the two human filamin gene paralogues FLNB and FLNC and comparative analysis of the filamin gene family;*

Human Genetics (2000) 107(6):597-611

Moolman JA, Reith S, **Uhl K**, Bailey S, Gautel M, Jeschke B, Fischer C, Ochs J, McKenna W, Klues H, Vosberg HP: *A newly created Splice donor site in exon 25 of the MyBP-C gene is responsible for inherited Hypertrophic Cardiomyopathy with incomplete disease penetrance;*

Circulation (2000) 101:1396-1402

Jeschke B, **Uhl K**, Weist B, Schröder D, Meitinger T, Döhlemann C, Vosberg HP: *A high risk phenotype of hypertrophic cardiomyopathy associated with a compound genotype of two mutated β -myosin heavy chain genes;*

Human Genetics (1998) 102:299-304

Präsentationen

Troidl K, Troidl C, Eitenmüller I, Mücke Y, Möllmann H, Weller H, Nef HM, Schmitz-Rixen T, Schaper W: *Die Rolle des Rho/ Rock Signalwegs in schubspannungs-induziertem Kollateralwachstum*. Clin Res Cardiol 96 (2007): Suppl 1, P489

Troidl K, Troidl C, Eitenmueller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W: *Intra-collateral adenoviral gene transfer of actin-binding Rho activating protein (ABRA) improves collateral conductance*. Eur Heart J (2006) 27 (abstract suppl) 453

Uhl K, Mohacsi P, Vosberg HP:

Ausschluss des kardialen Filamingens auf Chromosom 7 als Ursache einer familiären Form der HCM und eines WPW-Syndroms;

Z Kardiologie 89, Suppl 5 (2000): 264, abstract 1107

Uhl K, Jeschke B, Sakthivel S and Vosberg HP:

Homo sapiens gamma-filamin (FLNC) gene, complete cds;

01-MAY-2000 GenBank submission: ACCESSION: AF252549

Uhl K, Annaheim C, Vosberg HP, Mohacsi P:

Clinical and genetic analysis of inherited HCM associated with WPW;

Cell Cardiol 29 (1997): A46, abstract Th25

Uhl K, Annaheim C, Vosberg HP, Mohacsi P:

Klinische und genetische Analyse erblicher HCM mit WPW-Syndrom;

Z Kardiologie 86, Suppl 2 (1997): 157, abstract 641