

**Einfluß von Rapamycin auf die Akkumulation
glattmuskulärer Progenitorzellen in der Neointima**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des

Fachbereichs Medizin

der

Justus-Liebig-Universität

Giessen

Vorgelegt von

Hannes Brunsch

aus

Stuttgart

Giessen 2008

Aus der Medizinischen Klinik I
Abteilung für Kardiologie / Angiologie des
Universitätsklinikums Gießen
Gf. Direktor: Prof. Dr. Harald Tillmanns

Gutachter:
Prof. Dr. Tillmanns

Gutachter:
Prof. Dr. Kracht

Tag der Disputation:
25. Februar 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Grundlagen der Atherosklerose	6
1.2	Remodeling	9
1.3	Ballonangioplastie	9
1.4	Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen	10
1.5	Rapamycin	11
1.6	Zelluläre Wirkung von Rapamycin	12
1.7	Molekularer Wirkmechanismus von Rapamycin	13
1.8	Rapamycin-regulierte Zellzyklusproteine	16
1.9	Rapamycin: Vom Labor zum Krankenbett	17
2	Fragestellung	19
3	Material und Methoden.....	20
3.1	Geräte	20
3.2	Chemikalien	20
3.3	Medikamente	21
3.4	Chirurgische Instrumente und Operationsmaterialien	21
3.5	Antikörper	22
3.6	Knochenmark Transplantations-Modell	24
3.7	Knochenmarkstransplantation	26
3.8	Operation der Maus	26
3.9	Vorbereitung der Operation	26
3.10	Narkose	26
3.11	Operation	27
3.12	Applikation von Rapamycin	31
3.13	Entnahme der A. femoralis	31
3.14	Anfertigung der histologischen Schnitte	31
3.15	Computer assistierte Morphometrie	32
3.16	Fluoreszenz-Immunhistochemie	32
3.17	Bewertung der Immunhistochemie	33
3.18	Durchflusszytometrische Quantifizierung zirkulierender endothelialer Progenitorzellen	33
3.19	Isolation und Charakterisierung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus der Milz.	34
3.20	Bestimmung der Migrationsfähigkeit von EPC	34
3.21	Adhäsion von CD34+ Zellen an humane koronare Endothelzellen	35
3.22	Statistik	36

4	Ergebnisse.....	37
4.1	Rapamycin verhindert die Neointima Bildung	37
4.2	Rapamycin reduziert die Akkumulation von Zellen aus dem Knochenmark in der Neointima	39
4.3	Rapamycin reduziert die Akkumulation von Monozyten/Makrophagen in neointimalen Läsionen	39
4.4	Rapamycin reduziert die Zahl der aus dem Knochenmark stammenden glatten Gefäßmuskelzellen in der Neointima	42
4.5	Rapamycin beeinträchtigt die Re-Endothelialisierung nach arterieller Verletzung	46
4.6	Rapamycin verhindert die Expression von Adhäsionsmolekülen nach Gefäßverletzungen	49
4.7	Die endotheliale Adhäsion von vaskulären Progenitorzellen ist von der ICAM Expression abhängig	50
4.8	Effekt der Behandlung mit Rapamycin auf endotheliale Progenitorzellen	53
5	Diskussion.....	56
5.1	Bisheriges Verständnis über die Abstammung neointimaler Zellen	56
5.2	Neue Erkenntnisse über die Herkunft glatter Gefäßmuskelzellen in Gefäßläsionen.	57
5.3	Zusammensetzung des neointimalen Gewebes in unterschiedlichen Gefäßläsionen	58
5.4	Therapeutische Strategien in Bezug auf zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen	59
5.5	Rolle von Adhäsionsmolekülen beim Homing vaskulärer Progenitorzellen im Neointimagewebe	60
5.6	Rolle endothelialer Progenitorzellen bei der Re-Endothelialisierung und Neointimabildung	62
5.7	Potentielle Auswirkungen von Rapamycin auf die Neoangiogenese und Gewebsreparation nach Myokardinfarkt	63
5.8	Ausblick	65
6	Zusammenfassung.....	66
7	Literaturverzeichnis	68
8	Publikationen.....	84
8.1	Veröffentlichungen	84
8.2	Abstracts	85
9	Lebenslauf.....	86
10	Abkürzungsverzeichnis	88

1 Einleitung

Herzkreislauferkrankungen, die auf vaskuloproliferative Erkrankungen zurückzuführen sind, stellen heutzutage immer noch die Haupt-Todesursache in der westlichen Welt dar. Dies zeigten die Ergebnisse der „MONItoring Trends and Determinants in CARdiovascular Disease“ (MONICA) Studie der Weltgesundheitsorganisation (WHO).¹ Die gegenwärtigen präventiven oder therapeutischen Strategien konzentrieren sich dabei auf eine Reduktion der Risikofaktoren (wie z.B. der Hypercholesterinämie, des Bluthochdruckes oder des Diabetes mellitus) oder eine therapeutische Wiederherstellung des Blutflusses mittels Angioplastie oder chirurgischer Revaskularisation (Bypass-Operation).

Die invasiven Maßnahmen zur Revaskularisierung sind jedoch durch einen hohen Prozentsatz von Wiederverschlüssen der betroffenen Gefäße limitiert.

Bei 30%-50% der Patienten, die eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) erhalten haben, kommt es bereits in den ersten Monaten nach dem Eingriff zur Restenose der dilatierten Gefäße.^{2, 3} Die in jüngerer Zeit entwickelten Gefäßprothesen (Stents) verhindern zwar das unmittelbare Wiederzusammenziehen des Gefäßes nach Angioplastie (elastisches Recoil), sie verstärken jedoch die Zellvermehrung (Proliferation) intimaler Zellen und sind immer noch mit einer inakzeptabel hohen Zahl an Restenosen (~30%) behaftet.⁴ Von den Patienten, die ein Gefäß dilatiert bekommen haben, kommt es bei 20% zur Restenose und sie benötigen letztlich eine Bypassoperation. Auch hier kommt es jedoch jährlich in 10-30% der Fälle zu einem Transplantatversagen aufgrund einer Stenosierung der verpflanzten Gefäße.⁵ Auffällig ist, dass hauptsächlich die venösen Bypässe von dieser Stenosierung betroffen sind, während die arteriellen Transplantate ein deutlich längeres Überleben zeigen. Hierfür werden zum Großteil die veränderten Druckverhältnisse verantwortlich gemacht, da die Venen nach Verpflanzung in den arteriellen Kreislauf etwa dem zehnfachen an Gefäßdehnung und Druckbelastung ausgesetzt sind. Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

1.1 Grundlagen der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung, deren Entstehung in der Reaktion des Gefäßes auf einen ständigen Reiz begründet liegt. Als Risikofaktoren für ihre Entstehung kennen wir den Diabetes, den Bluthochdruck, Hyperlipidämie und den Tabakkonsum. Diese führen zur Dysfunktion oder zur Schädigung des Endothels, zur Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung, zur chronischen Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Leukozyten und zur Aktivierung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Multiple Wachstumsfaktoren und Zytokine werden von den geschädigten Endothelzellen, Entzündungszellen, Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen freigesetzt und vermitteln die Chemoattraktion, Migration, Proliferation, Apoptose und Matrix-Modulation der Zellen.⁶

Das Konzept der Pathophysiologie der Atherosklerose und restenotischer Prozesse hat sich in den letzten Jahren grundlegend verändert und die neuen Erkenntnisse bieten uns neue Perspektiven für präventive und therapeutische Strategien.

Neuere Studien haben die vorrangige Bedeutung inflammatorischer Prozesse bei der Entstehung der Atherosklerose, von frühen Läsionen bei Jugendlichen, über die vulnerable Plaque, bis hin zu thrombotischen Komplikationen, aufzeigen können.^{7, 8} Leukozyten adhärieren, wandern entlang eines chemotaktischen Gradienten in das Gewebe ein und akkumulieren in den entstehenden atherosklerotischen Läsionen. Zusammen mit den Zellen der Gefäßwand sezernieren sie Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) und die Synthese extrazellulärer Matrixproteine induzieren.

Zusätzlich zur Inflammation stellt die Proliferation einen Schlüsselprozess sowohl bei der Entstehung der Atherosklerose als auch restenotischer Prozesse dar.^{6, 9-11} Man geht von der Vorstellung aus, dass eine fokale Akkumulation glatter Gefäßmuskelzellen in der Intima, welche sich beim Menschen bereits im Kindesalter entwickelt und im Alter verdickt, der Entstehung einer atherosklerotischen Läsion vorausgeht.^{10, 12} Über die Herkunft dieser Zellen gibt es unterschiedliche Theorien.

Der Gedanke liegt nahe, dass die Zellen der entstehenden Neointima aus residenten glatten Gefäßmuskelzellen der Intima hervorgehen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch eine Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media über die Lamina elastica interna hinweg oder sogar aus der Adventitia über die Media in die entstehende Neointima stattfindet.¹³ Weiterhin konnte gezeigt werden, dass embryonale Endothelzellen die Fähigkeit besitzen, zu mesenchymalen Zellen zu transdifferenzieren und „smooth muscle cell actin“ zu exprimieren, was eine Herkunft der neointimalen glatten Gefäßmuskelzellen von Endothelzellen denkbar erscheinen lässt.¹⁴ In Tiermodellen der Hyperlipidämie-induzierten Atherosklerose, der Restenose nach Angioplastie und der Transplantatvaskulopathie konnte kürzlich gezeigt werden, dass neointimale glatte Gefäßmuskelzellen ihren Ursprung evtl. sogar in aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen oder anderen zirkulierenden Zellpools haben könnten.¹⁵⁻¹⁸ Ob Knochenmarkzellen auch beim Menschen an der Entstehung neointimalen Gewebes beteiligt sind, ist bisher unklar. Kürzlich konnten jedoch zirkulierende Glattmuskelzell-Progenitorzellen in humanem peripheren Blut identifiziert werden.¹⁹

Ungeachtet ihres Ursprungs sind diese Zellen maßgeblich an der Entwicklung der intimalen Hyperplasie und der Entstehung der fibrösen Deckkappe der atherosklerotischen Läsionen beteiligt. Die Beschaffenheit dieser intimalen Hyperplasie ist jedoch in den verschiedenen Stadien der Atherosklerose sehr unterschiedlich. In früheren, fettreichen Läsionen ist die fibröse Kappe dünn und es zeigt sich eine erhöhte Apoptoserate der glatten Gefäßmuskelzellen vor allem an den „Schultern“, d.h. an den seitlichen Begrenzungen der atherosklerotischen Plaques.²⁰ Des Weiteren hemmt das lokale inflammatorische Milieu die Kollagensynthese, induziert die Expression von Kollagenasen und hemmt die Expression proteolytischer Inhibitoren. Dies dünnt die fibröse Deckplatte noch weiter aus und kann letztendlich zur Ruptur der Plaque, zur Freisetzung des thrombogenen Materials und zum thrombotischen Lumenverschluss des Gefäßes führen.^{8,10}

In weiter fortgeschrittenen Läsionen formen Fibroblasten zusammen mit glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulären Kalzifikationen eine stabile, fibrokalzifizierte Läsion (Abb.1).

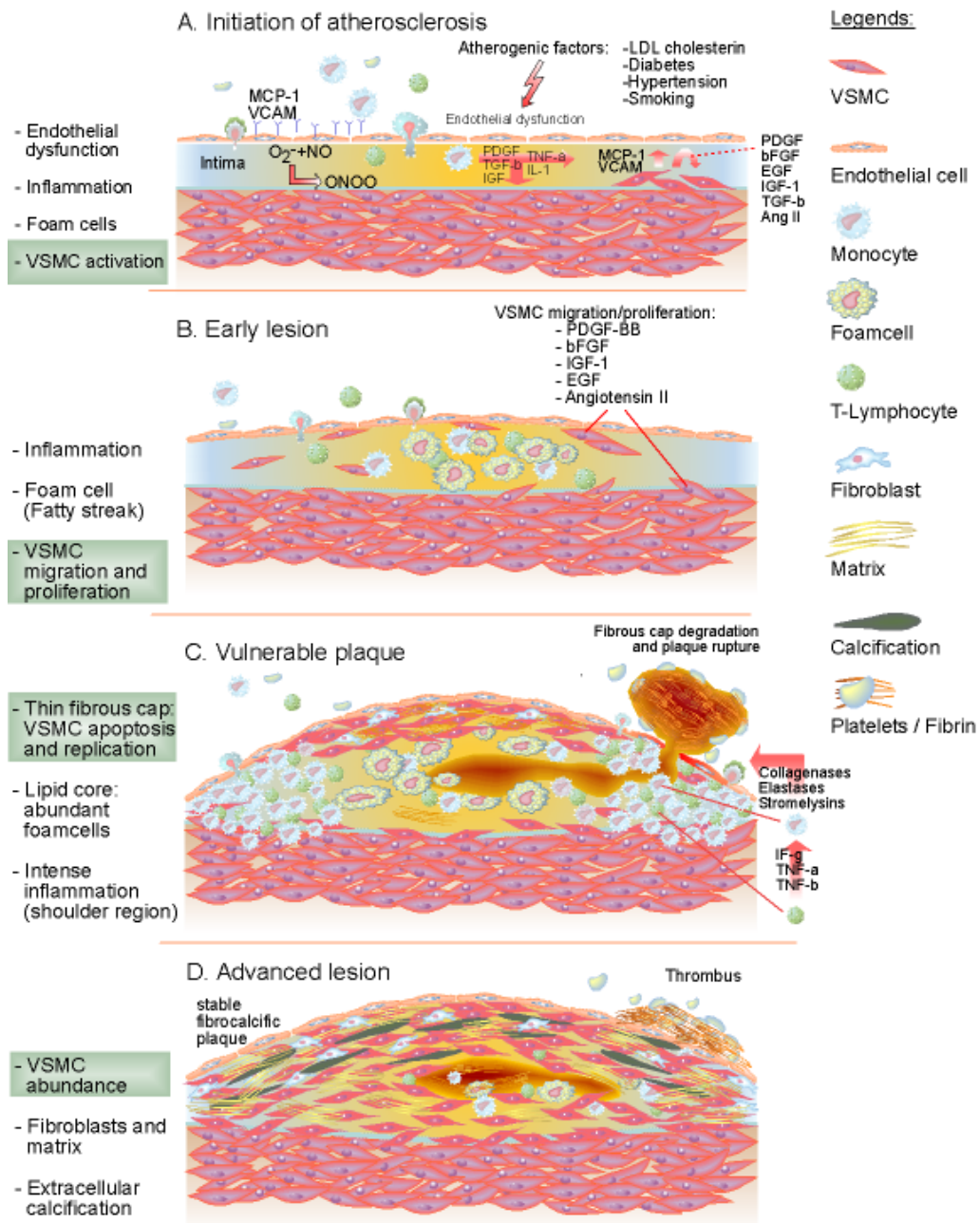


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Entstehung atherosklerotischer Läsionen. (Abb. übernommen aus Dzau V, Braun-Dullaeus RC, Sedding D; NatMed 2002)

1.2 Remodeling

Gefäße besitzen bis zu einem gewissen Grad die Fähigkeit ihre Struktur den geänderten Verhältnissen anzupassen. So kann der Durchmesser des Gefäßlumens bei gleichzeitiger Vergrößerung der Gefäßwand trotz der Akkumulation von atherosklerotischem oder neointimalem Gewebe zunächst unverändert bleiben.²¹ Mit Progression der Atherosklerose hängt der Durchmesser des Gefäßlumens ab von der Balance zwischen Faktoren, die eine Vergrößerung des Lumens (positives Remodeling) bewirken, und Faktoren, die, getriggert durch die entzündliche Gefäßantwort, eine zunehmende Neointima-Bildung und Stenosierung des Gefäßes (negatives Remodeling) bewirken.²² Hauptverantwortlich für die neointimale Stenosierung der Gefäße ist eine Aktivierung und ein Wiedereintritt glatter Gefäßmuskelzellen in den Zellzyklus mit nachfolgend resultierender Proliferation.

1.3 Ballonangioplastie

Die Ballonangioplastie stellt den heutigen Standard zur Behandlung stenosierender atherosklerotischer Läsionen dar. Bei der Angioplastie wird mit Hilfe eines Ballonkatheters ein verengter Gefäßabschnitt durch die Applikation eines intraluminalen Druckes von bis zu 15 Bar dilatiert. Das akute Gefäßtrauma führt zu einer Entzündungsreaktion²³ mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z.B.: Interleukine, TNF, MCP-1) und Wachstumsfaktoren (z.B.: PDGF, bFGF). Diese induzieren die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen sowie chronische Umbauprozesse in der Gefäßwand (negatives Remodeling), die zu einer Hyperplasie der Intima führen.

Die Faktoren, die zur Restenosierung des dilatierten Gefäßes beitragen sind im Wesentlichen das unmittelbare elastische Zusammenziehen des Gefäßes nach Angioplastie (Recoil), ein negatives vaskuläres Remodelling und die durch Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen bedingte Intimahyperplasie.^{24, 25}

Das unmittelbare elastische Recoil des Gefäßes kann durch den Einsatz von Stents verhindert werden. Allerdings können Stents aufgrund des chronischen Reizes die Entzündungsreaktion in der Gefäßwand sowie die Proliferation der

intimalen und medialen glatten Gefäßmuskelzellen verstärken.⁴ Auch wenn durch den Gebrauch von Stents die Restenoserate gesenkt werden konnte, so ergab sich aus der weiterhin inakzeptabel hohen Rate an Restenosierungen die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Strategien zur Prävention vaskuloproliferativer Prozesse.

1.4 Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen

Eine Vielzahl von Ansätzen wurde bisher untersucht um die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu hemmen. Zahlreiche pharmakologische Inhibitoren wie Thrombozytenaggregationshemmer, Antikoagulantien, ACE-Hemmer oder weitere zytotoxische Agentien brachten jedoch nicht den erhofften Erfolg. Das Versagen der erfolgversprechenden Therapieansätze in klinischen Studien mag an den Unterschieden der Spezies oder an einer falschen Dosierung der untersuchten Substanzen gelegen haben. Es zeigte sich darin jedoch auch eindrücklich, dass die multifaktoriellen und redundanten Prozesse, die zur Entstehung der Atherosklerose oder Restenose führten, durch die Hemmung einzelner mitogener Faktoren nur unzulänglich zu beeinflussen sind. Der Fokus des Interesses bei der Entwicklung antiproliferativer Strategien hat sich daher in letzter Zeit auf den Zellzyklus als gemeinsame Endstrecke der multiplen proliferativen Stimuli gerichtet. Strategien zur Beeinflussung des Zellzyklus beinhalten die Strahlentherapie, pharmakologische Substanzen und gentherapeutische Ansätze.

Durch moderne strahlentherapeutische Ansätze konnte die Restenoserate deutlich beeinflusst werden.²⁶⁻²⁸ Unvorhersehbare Nebenwirkungen, wie eine späte In-Stent Thrombose oder die Ausbildung proximaler oder distaler Stenosen (candy wrapper effect), zeigen jedoch die Notwendigkeit zur Weiterentwicklung dieser Therapieansätze.

Gentherapeutische Ansätze reichen von „antisense“-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN), über Transkriptionsfaktor-„decoy“-Konstrukte, bis hin zur Überexprimierung proliferationshemmender Gene, um einen zytostatischen Effekt in den Zellen zu erzielen. In den ersten kürzlich veröffentlichten Gentherapiestudien zur Reduktion der Restenose konnte gezeigt werden, dass

„decoy“-ODN gegen das Zellzyklusprotein E2F die Neointimabildung in peripheren und koronaren Bypässen signifikant verringern kann.^{5,29}

Neben einer großen Anzahl vielversprechender Substanzen wie Paclitaxel (Taxol)³⁰, Flavopiridol³¹ oder CVT-313³² ist das Makrolid-Antibiotikum Rapamycin eine der derzeit vielversprechendsten Substanzen. In der kürzlich vorgestellten „RAVEL“-Studie konnte durch mit Sirolimus beschichtete Stents ein Jahr nach Implantation eine Restenoserate von 0% im Gegensatz zu 26% in der Patientengruppe mit unbeschichteten Stents erzielt werden.³³ Bis zu vier Jahre nach Implantation konnte keine weitere Zunahme der Restenose beobachtet werden und bei Patienten, die mit einem Sirolimus beschichteten Stent behandelt wurden, zeigte sich eine signifikant geringere Zahl von kardiovaskulären Ereignissen.³⁴

Die Zellzyklushemmung, ob auf strahlentherapeutischer, pharmakologischer oder genterapeutischer Ebene, stellt somit den bislang effektivsten und erfolgversprechendsten Ansatz zur Verhinderung multifaktoriell bedingter vaskuloproliferativer Erkrankungen und insbesondere der Restenose dar.

1.5 Rapamycin

Rapamycin ist ein Makrolid Antibiotikum und ein natürliches Fermentationsprodukt von *Streptomyces Hygroscopicus*, ein Streptomycet, welcher in den 70er Jahren von einer kanadischen Expedition auf den Osterinseln (Rapa Nui) aus einer Erdprobe isoliert wurde.^{35, 36} Rapamycin ist ein potentes Antimykotikum, hat aber in einer Vielzahl von Studien eine ebenso potente Aktivität als Tumorsuppressor und Immunsuppressivum gezeigt. Diese immunsuppressive Wirkung machte Rapamycin als Antibiotikum unbrauchbar. Die potente immunsuppressive Aktivität in fast allen Organtransplantationstiermodellen unterstützte klinische Versuche und richtete das Interesse der Rapamycinforschung auf dessen Wirkung auf Zellen des Immunsystems. In den vergangenen Jahren hat das Medikament die drei Phasen der Zulassung durchschritten und bekam im September 1999 in den USA, in Kombination mit Cyclosporin A und Steroiden, die Zulassung zur Verhinderung der Abstoßungsreaktion bei Nierentransplantationen. Im November 1999 wurde Rapamycin auch von der „European Medical

Evaluation Agency“ (EMA) zugelassen, als eine Alternative zu Calcineurin Antagonisten bei Langzeit-Immunsuppressiver-Therapie.

Da das Interesse aber zunächst auf die immunsuppressive Wirkung von Rapamycin gerichtet war, wurden die anfänglichen in vitro Hinweise für die potenziell gewünschten Eigenschaften von Rapamycin auf vaskuloproliferative Erkrankungen zunächst vernachlässigt.³⁷⁻⁴⁰

1.6 Zelluläre Wirkung von Rapamycin

Es wurden verschiedene Mechanismen in verschiedenen Zellen beschrieben, wie Rapamycin protektive Effekte auf die proliferative Antwort von Gefäßverletzungen (immun oder mechanisch) haben kann.

Als erstes wurde die Blockierung der Proliferation von T Lymphozyten durch Rapamycin beschrieben, welche durch Ca²⁺-abhängige oder -unabhängige Wege stimuliert wurden.³⁶ Weiterhin inhibiert Rapamycin die IL-2-abhängige und -unabhängige Proliferation von humanen B-Lymphozyten und verhindert deren Differenzierung in Plasmazellen. Dadurch verringert sich die IgM, IgG und IgA Produktion.⁴⁰ Man nimmt an, dass die Effekte auf die Antikörperproduktion die potenten immunregulatorischen Effekte noch unterstützen.

Die Aktivität von Rapamycin ist jedoch nicht auf Zellen des Immunsystems beschränkt. Es konnte gezeigt werden, dass Rapamycin die Proliferation von non-lymphoiden Tumorzellen, Hepatozyten und Fibroblasten ändert.^{39, 41, 42} Es wurde ebenfalls berichtet, dass Rapamycin die proliferative Antwort von glatten Gefäßmuskelzellen blockiert, nachdem sie mechanisch oder immunvermittelt verletzt wurden, z.B. durch Ballonangioplastie oder Allorejektion.⁴³ In einem Primaten-Modell wurde gezeigt, dass Rapamycin die intimale Gefäßverletzung in Aortaallografts stabilisieren und umkehren kann.⁴⁴ Weitere Studien begannen sich mehr auf die molekularen Wirkungen von Rapamycin auf VSMCs, die Regulierung des Zell-Zyklus, die Prävention der Proliferation und die neointimale Entwicklung zu konzentrieren.

1.7 Molekularer Wirkmechanismus von Rapamycin

Die erste Indikation einer Bindung des Rapamycins an einen intrazellulären Rezeptor ergab sich aus der Beobachtung, dass es die immunsuppressive Aktivität von FK-506 antagonisiert (Abb. 2).⁴⁰ Es wurde ein Protein mit einer geringen Molekularmasse (12kDa), genannt „FK-Binding-Protein“ (FKBP)⁴⁵,⁴⁶, gefunden, das sowohl FK-506 als auch Rapamycin mit äquivalenten Affinitäten bindet.⁴⁷ Die Erkenntnis, dass FK-506, sowie non-immunsuppressive FK-506 oder Rapamycin Analoga, kompetitiv agieren und die Aktivität von Rapamycin hemmen, zeigte, dass eine Interaktion von Rapamycin mit FKBP notwendig ist, um die pharmakologische Aktivität des Rapamycins zu vermitteln. Es wird angenommen, dass sobald FKBP mit Rapamycin oder FK-506 einen Komplex gebildet hat, eine neue Funktion erworben wird, welche zur Inhibierung von verschiedenen Signaltransduktionswegen führt.⁴⁷ Obwohl FK-506 und Rapamycin mit FKBP interagieren, unterscheiden sich die beiden Stoffe am meisten in den Gebieten, die zur neuen molekularen Oberfläche des FKBP-Drug-Komplexes beitragen. Das könnte eine mögliche Erklärung sein, warum der FKBP-FK-506-Komplex selektiv die Calcineurin-Funktion⁴⁵ hemmt, wohingegen der FKBP-Rapamycin-Komplex verschiedene biochemische Prozesse in Zytokin vermittelter Signaltransduktion beeinflusst.

Durch Affinitätschromatographie oder GST-FKBP-Fusionsproteine wurde in Säugetierzellen ein großes Protein (2549 Aminosäuren; MW: 289 kDa) identifiziert, das durch den FKBP-Rapamycin-Komplex, aber nicht durch Komplexe von FKBP bzw. non-immunsuppressive Analoga gebunden wurde.^{48, 49} Dieses Protein wurde „Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)“ genannt (andere Bezeichnungen sind: FRAP, RAFT1, SEP oder RAPT1). Funktionelle Beweise, dass mTOR eine entscheidende Rolle im Mechanismus von Rapamycin spielt, wurden dadurch gestärkt, dass Rapamycin-resistente YAK-Zell-Mutanten ein mTOR-Protein exprimierten, welches durch den FKBP-Rapamycin-Komplex nicht mehr erkannt wurde.⁵⁰ Zur Zeit ist die genaue biochemische Funktion von mTOR noch unbekannt. Seine Sequenz-Homologie mit den katalytischen Domänen von mehreren Phosphatidyl-Inositide-Kinasen suggeriert, dass mTOR eine Kinase Aktivität haben könnte.

Mehrere Studien zeigen, dass mTOR eine Protein- sowie eine Lipid-Phosphatase Aktivität hat, welche es wahrscheinlich machen, dass mTOR ein Regulator einer Phosphorylierungs-Kaskade ist, die direkt oder indirekt die enzymatische Aktivität von p70S6k und G1-Cdks beeinflusst.^{51, 52} die PI-3 Kinase selber reguliert p70S6k^{53, 54} und der PI-3-Kinase Inhibitor Wortmannin hemmt p70S6k.⁵⁵ Rapamycin jedoch hemmt nicht die PI-3-Kinase, was dafür spricht, dass die PI-3 Kinase upstream von mTOR interveniert, oder die p70S6 Kinase über einen getrennten Signaltransduktionsweg, unabhängig von mTOR, reguliert.⁵⁶

Der biochemische Prozess, dessen Beeinflussung zunächst durch Rapamycin nachgewiesen wurde, ist die phosphorylierungsabhängige Aktivierung der 70kDa-S6-Proteinkinase (p70S6k). Dieses Enzym ist beteiligt an der Modulation der Phosphorylierung des ribosomalen 40D-Protein-S6, welches seinerseits eine Rolle bei der Initiierung der Translation in der Proteinsynthese spielt.^{57, 58}

Rapamycins indirekte Hemmung der S6-Phosphorylierung führt zu einer Unterdrückung der Translation von mRNAs, welche eine Polypyrimidinsequenz am 5'-Terminus besitzen. Diese Polypyrimidinsequenz, die den Translationsbeginn reguliert, ist in allen mRNAs enthalten, welche ribosomale Proteine oder Elongationsfaktoren kodieren. Es wurde festgestellt, dass Rapamycin die Synthese dieser Proteine selektiv hemmt.⁵⁹ Weiterhin hemmt Rapamycin die eIF-4E-Funktion durch Hemmung der Phosphorylierung des eIF-4E-Bindingproteins (PHAS-1), das durch Wachstumsfaktoren in den vaskulären glatten Muskelzellen induziert wird.⁶⁰ Somit scheint die Inhibition der Synthese oder der Funktion der ribosomalen Proteine und Elongationsfaktoren, welche generell benötigt werden um die Proteinsyntheserate bei der Vorbereitung auf die Zellteilung zu beschleunigen, der Hauptmechanismus der antiproliferativen Wirkung von Rapamycin zu sein. Zusätzlich blockiert Rapamycin die p-70S6k-vermittelte Aktivierung von CREMt,⁶¹ ein Mitglied der CREB/AFT-Familie von Transkriptionsfaktoren. Somit greift es die cAMP-induzierte späte Gentranskription an. Die CREB/AFT-vermittelte Transkription von PCNA wird ebenfalls inhibiert. PCNA ist ein obligater Processing-Faktor für die DNA-Polymerase-q, um in

die S-Phase einzutreten. Dieser Effekt könnte einen weiteren distalen Schritt in der antiproliferativen Wirkung des Rapamycins darstellen.^{62, 63}

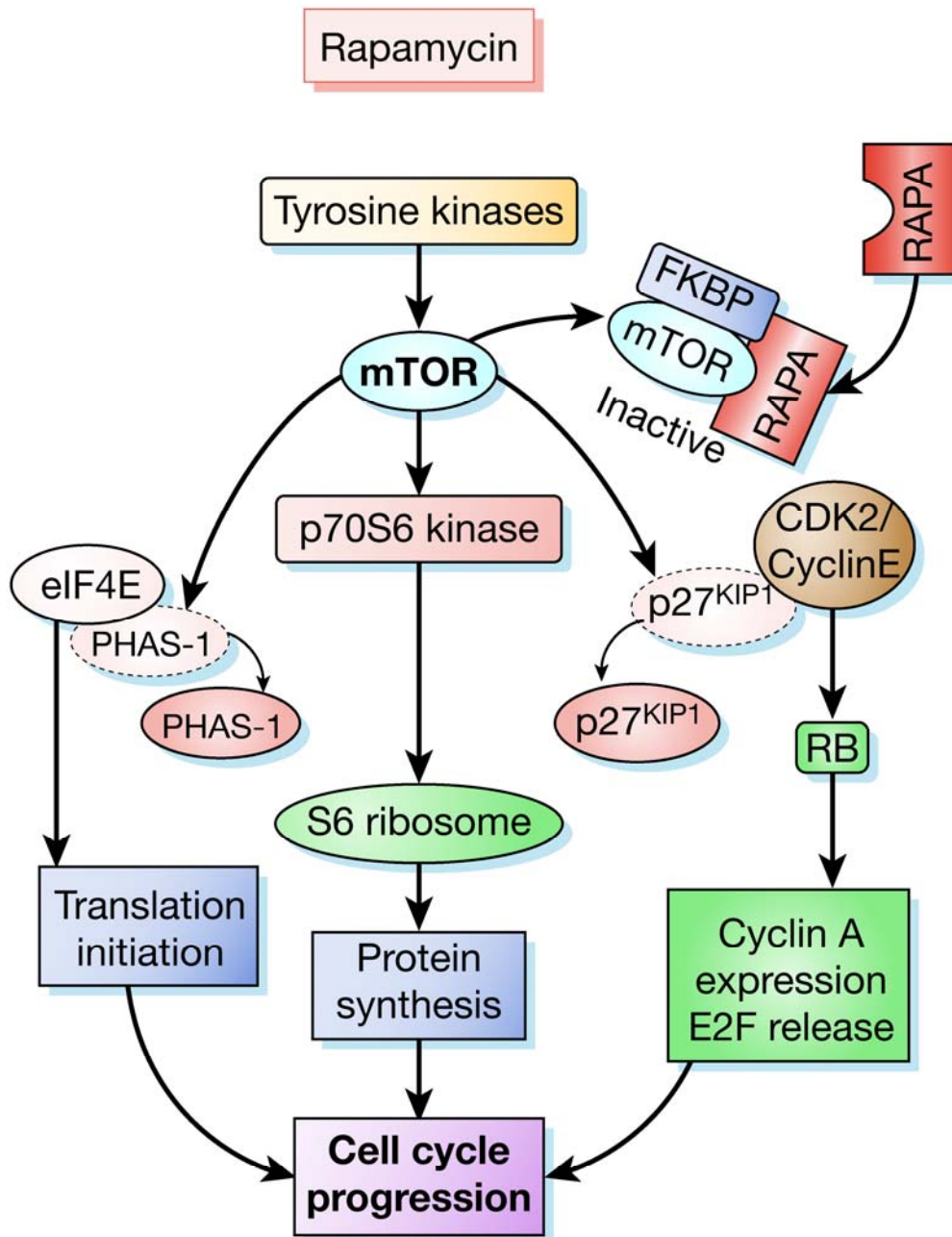


Abbildung 2: Darstellung der Wirkweise von Rapamycin und der von ihm regulierten Proteine. (Dzau, Braun-Dullaes, Sedding; NatMed 2002)

1.8 Rapamycin-regulierte Zellzyklusproteine

Wie beschrieben, ist die antiproliferative Wirkung von Rapamycin durch die Intervention in den Zellzyklus der mittleren bis späten G1-Phase charakterisiert.⁶⁴⁻⁶⁶ Es scheint somit, dass Rapamycin, direkt oder indirekt, einen Effekt auf den biochemischen Prozess hat, welcher den frühen Verlauf des Zellzyklus bestimmt. In Übereinstimmung mit der Wirkung von Rapamycin auf die G1-Phase,^{64, 66} wurde festgestellt, dass Rapamycin die Aktivierung des Cdk2/Zyklusin-E-Komplexes verhindert.⁶⁶ Bei Leukozyten- und Skelettmuskel-ähnlichen Zelllinien scheint die Störung der Cdk2-Aktivität, in Zellen welche mit Rapamycin behandelt wurden, durch eine Inhibition der mitogen-induzierten Herunterregulation des Cdk-Inhibitors, p27^{Kip1}, zu entstehen.⁶⁷⁻⁶⁹ Allerdings wird dieser Mechanismus für VSMC noch kontrovers diskutiert.⁷⁰ Bei VSMC wurde beschrieben, dass Rapamycin posttranskriptionell mit der Expression von den meisten Proteinen in der G1-Phase interveniert, da Rapamycin die Hochregulierung von Zyklusin B1, Zyklusin C1, Zyklusin E, Zyklusin-abhängige Kinase 1, Zyklusin-abhängige Kinase 2, PCS und dem p21^{Kip1} Protein in vitro und in vivo blockiert.⁷⁰ Die Hauptwirkung von Rapamycin ist demnach die Inhibition des Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase, indem es die hierfür verantwortlichen Signaltransduktionswege inhibiert. Zusätzlich scheint Rapamycin noch mehr günstige Wirkungen auf Gefäßzellen zu haben. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Rapamycin z.B. die Migration von VSMC, die Hypertrophie als Reaktion auf Angiotensin II⁷¹ und eine durch Tumornekrosefaktor- α (TNF α)-induzierte Expression von Adhäsions-Molekülen, ICAM-1 und VCAM-1, inhibiert.⁷² Der Schlüssel zur erfolgreichen klinischen Verwendung von Rapamycin ist die einzigartige Wirkung bei der Vorbeugung von Transplantationsvaskulopathien, bei venösen Bypass Transplantationsvaskulopathien und bei der In-Stent Restenose.

1.9 Rapamycin: Vom Labor zum Krankenbett

Es wurde sehr früh erkannt, dass sich die antiproliferative Wirkung von Rapamycin nicht ausschließlich auf Zellen des Immunsystems beschränkt, sondern auch die Zellen der Gefäßwand betrifft. Anfängliche Studien zeigten, dass Rapamycin die Transplantationsvaskulopathie in den Herzen von Ratten inhibiert.⁴³ Dieses Ergebnis wurde später bestätigt.⁷³⁻⁷⁵ Weitere Experimente demonstrierten die potente inhibitorische Wirkung des Rapamycins auf die Neointima Bildung nach Ballon-induzierter vaskulärer Verletzung in Ratten und Meerschweinchen.^{40, 46, 76, 77} In Folge weitergehender Untersuchungen über die Wirkweise von Rapamycin konnte gezeigt werden, dass die systemische Gabe von Rapamycin die intimale Hyperplasie, in einem Modell der In-Stent Restenose an Schweinen, bis zu 52% inhibiert.⁷⁸ Im Gegensatz zu den unterschiedlichen mitogenen Signaltransduktionswegen sind die molekularen Abläufe des Zellzyklus in allen Zelltypen gleich. Somit können die molekularen Abläufe des Zellzyklus in VSMC durch systemische Gabe eines Zellzyklus-Inhibitors wie Rapamycin nicht gezielt erreicht werden. Die systemische Gabe, wie bei Transplantationspatienten, kann tatsächlich Nebeneffekte, wie Hyperlipidämie, Myelosuppression, Durchfall, milde Stomatitis, Polyarthralgie und Kopfschmerzen zur Folge haben. Folglich wird die klinische Spezifität, von auf den Zellzyklus zielenden Medikamenten wie Rapamycin, durch die Fähigkeit der Applikation dieser Therapien in einer räumlich begrenzten Art bestimmt.

Um die Nebeneffekte der systemischen Gabe zu verringern, die lokale Konzentration des Stoffes zu erhöhen und die pharmakologische Wirkung mit der des vaskulären Stentings zu kombinieren, wurden große Anstrengungen unternommen. Das Medikament musste zu einem biokompatiblen Polymer verarbeitet werden. Mit solch einem Polymer wurden Stents beschichtet, welche Rapamycin während der kritischen Phase der Entwicklung einer In-Stent Restenose freigeben. Erste Studien mit diesen Rapamycin beschichteten Stents zeigten eine Reduktion intimaler Proliferation von 51% verglichen mit den Kontrollen.⁷⁹ Weitere vielversprechende Experimente mit Kaninchen und Hunden führten zum Entwurf der ersten klinischen Studien, bei denen die Wirkung von Rapamycin beschichteten Stents untersucht wurde. Die RAVEL

Studie (randomisierte Doppel-Blind-Studie mit dem Sirolimus-Eluting BX Velocity Balloon-Expandable Stent bei der Behandlung von Patienten mit De Novo Koronarläsion), bei der 238 Patienten, entweder einen regulären oder einen mit Rapamycin beschichteten Stent (Europa und Latein-Amerika) in einer Doppel-Blind-Studie erhielten, zeigte sich 210 Tage nach Behandlung keine (0%) Restenose bei Patienten mit Rapamycin beschichteten Stents verglichen mit 26% bei Patienten mit Placebobehandlung ($P = <0.001$).⁸⁰ Bei der Prävention von akzelerierten Arteriopathien oder bei intimaler Hyperplasie durch chronische vaskuläre Transplantationsläsionen in transplantierten Herzen, werden laufende klinische Tests die Wirkung von Rapamycin nachweisen müssen.

2 Fragestellung

Neben glatten Gefäßmuskelzellen, die sich aus der verletzten Media des Gefäßes rekrutieren, scheinen zirkulierende Progenitorzellen entscheidend an der Neointimaentstehung nach Ballonangioplastie beteiligt zu sein. Die Hemmung der Akkumulation von zirkulierenden glattmuskulären Progenitorzellen am Ort der Neointimaentstehung könnte somit die intimale Hyperplasie nach Ballonangioplastie nachhaltig beeinflussen. In klinischen Studien zeigte sich kürzlich, dass das Makrolid Antibiotikum Rapamycin trotz einer relativ schwachen Hemmung der lokalen Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen sehr effektiv die Neointimaentwicklung hemmen kann. Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen in wie weit Rapamycin die lokale Akkumulation und Differenzierung glattmuskulärer Progenitorzellen während der Neointimaentwicklung beeinflusst und ob dieser Effekt evtl. ausschlaggebend für den potenten klinischen Effekt von Rapamycin sein könnte. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten neben dem erweiterten Verständnis über die Wirkweise des in klinischer Anwendung befindlichen Rapamycins auch neue Einblicke in die Bedeutung und die Mechanismen der Akkumulation zirkulierender vaskulärer Progenitorzellen im Neointimagewebe vermitteln.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte

Adobe Photoshop 7.0 LE	ADOBE SYSTEMS INC., San Jose, USA
Zeiss KS300 3.0	ZEISS, Jena
PC Pentium 600	UNI-COMP, Giessen
Pipetten	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Pipettenspitzen	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Reaktionsgefäße 0,65/1,5/2 ml	EPPENDORF, Hamburg
Mikroskop S4 E	LEICA, Mannheim
Mikroskop DM RB	LEICA, Mannheim
Mikroskop TCS SP (Laser scanning)	LEICA, Mannheim
Kryostat CM 1900	LEICA, Mannheim

3.2 Chemikalien

Aqua ad iniectionabilia	BAXTER Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Dulbecco's Phospat Buffered Saline (1x)	PAA LABORATORIES GmbH Pasding, Österreich
Antibody Diluent Reagent Solution	ZYMED San Francisco, USA
10 % Non-Immune Goat Serum TissuTek®	ZYMED San Francisco, USA
4',6-Diamidino-2-phenylindole, 2HCl (DAPI)	LINARIS, Wertheim
Vectashield® Mounting Medium	VECTOR LABORATORIES INC. Burlingham, CA 94010

3.3 Medikamente

Xylocain® 2 %	ASTRA ZENECA GmbH, Wedel
Ketamin Incesa 50 mg/ml	INCRESA Arzneimittel GmbH, Freiburg
Rompun® 2 %	BAYER Vital GmbH, Leverkusen
Atropinsulfat-Lösung 0,5 mg/ml	FRESENIUS KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg
Isofluran-Baxter	BAXTER Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Lysostypt®	BRAUN/AESCU LAP AG & Co. KG, Tuttlingen

3.4 Chirurgische Instrumente und Operationsmaterialien

1 Schere Typ BC 61 R	AESCU LAP AG & Co. KG, Tuttlingen
1 Schere Typ BC 60 R	AESCU LAP AG & Co. KG, Tuttlingen
1 Schere nach Vannas Typ OC 498 R	AESCU LAP AG & Co. KG, Tuttlingen
2 kleine Pinzetten Typ OC 21 R	AESCU LAP AG & Co. KG, Tuttlingen
1 Pinzette Typ 12-505-10	MARTIN Medizin Technik, Tuttlingen
1 gerader Führungsdraht (20 cm lang, 0,5 mm dick)	COOK Deutschland GmbH, Mönchengladbach
Fäden Ethilon 6-0 (Nadel P-3)	JOHNSON & JOHNSON Intl, St-Stevens-Woluwe, Belgien
Spritzen Injekt F 1 ml	B. BRAUN, Melsungen
Spritzen Injekt 5 ml	B. BRAUN, Melsungen
Injektionsnadeln BD Microlance™3	BECTON, DICKINSON and Company, Drogheda, Co. Louth, Irland
Klebeband, Eimer mit Deckel, Tupfer, Desinfektionsmittel	

3.5 Antikörper

Primär Antikörper	Wirt	Isotyp	Konzentration	verw. Konz	Lager-temperatur	Bezug
α -SMA Cy3- Conjugate	Mouse	IgG2a	1,1 mg/ml	1:500	-20° C	Sigma
vWF	Rabbit	IgG	5,7 mg/ml	1:200	-20° C	DAKO
MoMa	Rat	IgG2b	0,5 mg/ml	1:200	-20° C	Serotec
VCAM-1	Rat	IgG1	1 mg/ml	1:100	-20°C	Serotec
ICAM-1	Rat	IgG2a	0,1 mg/ml	1:200	-20°C	Chemicon
ICAM-1	Mouse	IgG1	1 mg/ml	1:200	-20°C	Chemicon
VEGF- R2-PE	Rat	IgG2a	0,1 mg/ 100 μ l	1:50	4°C	Pharmingen
Sca-1- FITC	Mouse	IgG2a	0,5 mg/ml	1:50	+4°C	Pharmingen

Sekundär Antikörper	Wirt	Isotyp	Konzentration	verw. Konz	Lager- temperatur	Bezug
Alexa Fluor 488	Goat	IgG	1 mg/ml	1:200	-20° C	Molecular Probes
Alexa Fluor 546	Goat	IgG	1 mg/ml	1:200	-20° C	Molecular Probes
Alexa Fluor 594	Goat	IgG	1 mg/ml	1:200	-20° C	Molecular Probes
Alexa Fluor 680	Goat	IgG	1 mg/ml	1:200	-20° C	Molecular Probes

3.6 Knochenmark Transplanatations-Modell

Die acht Wochen alten Empfänger-Mäuse (C57/BL6) wurden mit einer tödlichen Dosis von 11 Gy (1100 rad) bestrahlt. Als Spender dienten GFP-positive transgene Mäuse (C57/BL6 Hintergrund), welche ubiquitär das „green fluorescent protein“ (GFP) exprimieren und uns freundlicherweise von Dr. R. Voswinckel, Abt. für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Gießen und Marburg zur Verfügung gestellt wurden. Nach der Bestrahlung wurden den Empfänger-Mäusen unfractionierte Knochenmarkszellen (3×10^6) von den GFP-positiven Mäusen in die Schwanzvene injiziert. Sechs Wochen nach der Knochenmarkstransplantation wurde die oben genannte Angioplastie durchgeführt (Schematische Darstellung in Abb. 3).

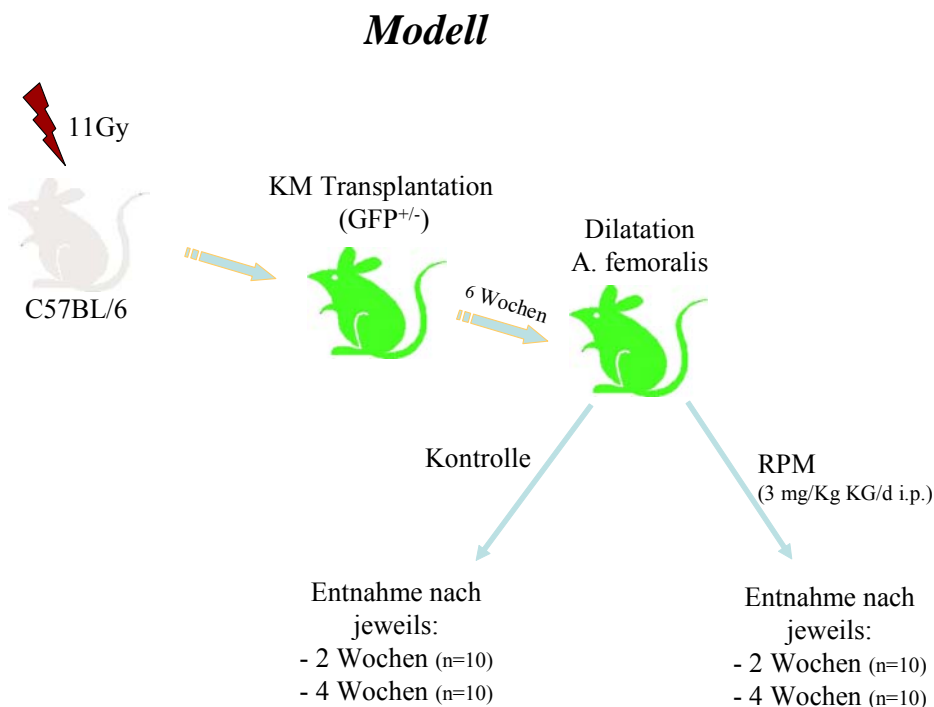
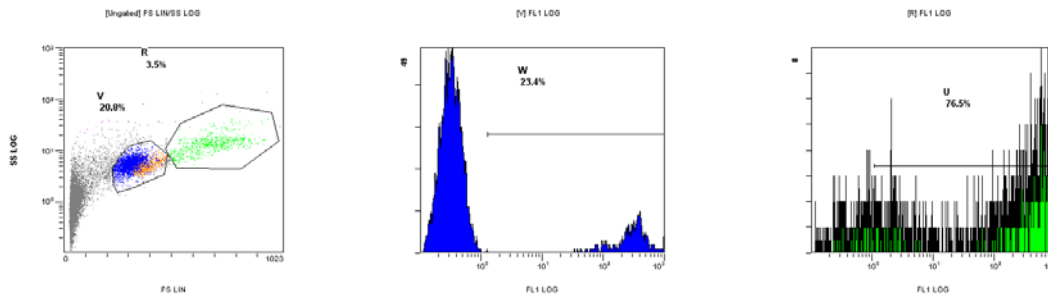


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Versuchsabfolge

Nach vier und nach sechs Wochen wurde die Rekonstitution der peripher zirkulierenden Zellen durch GFP-exprimierende Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert. Nach vier Wochen waren erst < 25% positiv, jedoch nach sechs Wochen lag die Repopulationsrate bei >75% (Abb.4).

4 Wochen



6 Wochen

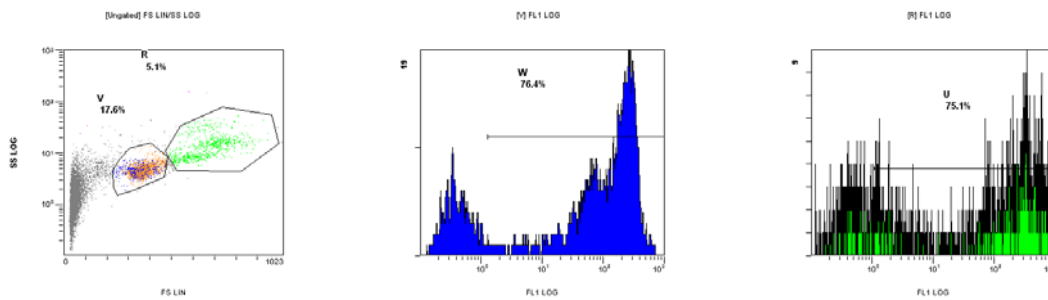


Abbildung 4: Durchflusszytometrische Darstellung der Rekonstitution von peripher zirkulierenden Zellen durch (GFP-positive) Zellen des transplantierten Knochenmarkes 4 Wochen (obere Zeile) und 6 Wochen (untere Zeile) nach Knochenmarkstransplantation.

3.7 Knochenmarkstransplantation

Die Spendermäuse wurden getötet und ihnen wurden Femur und Tibia aseptisch entnommen. Die Knochenmarkshöhlen wurden mit Hilfe einer 25-gauge Nadel und einer Spritze mit Kalzium und Magnesium freier „Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)“ gespült. Die Einzelzellsuspensionen wurden durch wiederholtes Pipettieren präpariert und anschliessend durch ein Nylon-Sieb (40 µm Porengröße) gefiltert. Die Zellen wurden zweimal in HBSS gewaschen und im Hämozytometer (Neubauerkammer) gezählt. Acht Wochen alte Mäuse wurden mit der tödlichen Gesamtkörperdosis von 11 Gy bestrahlt. Sie bekamen 3×10^6 Knochenmarkszellen in 0,1 ml RPMI 1640 über die Schwanzvene injiziert. Nach sechs Wochen wurde die Rekonstitution des peripheren Blutbildes in den transplantierten Mäusen verifiziert und den Mäusen die Femoralarterie dilatiert.

3.8 Operation der Maus

Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche erfolgten nach entsprechender Genehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen (GI 20/10 Nr. 40/2002 vom 27.2.2003).

3.9 Vorbereitung der Operation

Der Operationsplatz unter dem Mikroskop (Leica S4 E) wurde mit Papier abgeklebt, die Instrumente, die Tupfer und die Fäden für die Ligaturen wurden zurechtgelegt.

3.10 Narkose

Es wurden jeweils 2,5 µg Xylazin (Rompun®), 3 mg Ketamin (Ketanest®) und 5 µg Atropin® subcutan im Bereich der Hinterläufe intramuskulär injiziert. Die Maus wurde mittels Klebestreifen auf dem Rücken im Sichtfeld unter dem Mikroskop fixiert. Die Fixierung erfolgte an den Beinen und eine zusätzliche Fixierung erfolgte am Schwanz des Tieres.

3.11 Operation

Mit einer kleinen gebogenen Schere wurde das Fell am linken Hinterlauf im Operationsgebiet vorsichtig entfernt. Danach erfolgte die Desinfektion des Eingriffsgebietes. Die Haut wurde am distalen Ende des Hinterbeins lateral des Gefäßes mit einer kleinen spitzen Schere eingeschnitten und vorsichtig nach proximal etwa einen Zentimeter eröffnet. Jetzt erfolgte die Präparation des Gefäß-Nerven-Stranges mittels der beiden kleinen Pinzetten. Anschließend wurden die einzelnen Leitungsbahnen durch stumpfes Auftrennen der Faszien freigelegt. Dabei wurde von distal nach proximal präpariert. Zunächst wurde bis zum Abgang der A. femoralis profunda präpariert, anschließend erfolgte die Präparation proximal der A. femoralis profunda bis zur A. iliaca externa. Danach wurden die Leitungsbahnen an der A. femoralis profunda aufgetrennt. Arterie, Vene und Nerv waren jetzt dargestellt, der N. Femoralis wurde vorsichtig nach lateral abpräpariert, um eine intraoperative Schädigung zu vermeiden. Nun mussten die Ligaturen angebracht werden. Die erste Ligatur wurde um die A. femoralis profunda gelegt. Dabei wurde zunächst der Faden von lateral, distal des Abgangs der A. femoralis profunda, unter der A. femoralis hindurchgeführt, anschließend wurde der Faden von medial nach lateral, proximal des Abgangs der A. femoralis profunda, unter der A. femoralis zurückgeführt und mit einem Klebestreifen lateral des linken Hinterbeins fixiert. Bei dieser und den folgenden Ligaturen musste darauf geachtet werden, dass die Durchblutung nicht unterbrochen wird. Die Ligaturen wurden zunächst nur locker fixiert, um eine unnötige Ischämie zu vermeiden. Die distale A. Femoralis superficialis wurde als zweites ligiert. Dabei wurde der Faden von medial nach lateral unter der Arterie hindurchgeführt und wieder nach medial über die Arterie verlagert. Die Ligatur wurde durch einen Klebestreifen lateral des rechten Hinterbeins fixiert. Als letztes erfolgte die Ligatur der A. iliaca. Hierbei wurde eine möglichst proximale Ligatur angestrebt, um auch eine Unterbindung möglicher Anastomosen zu gewährleisten. Die Ligatur wurde zunächst von lateral unter der A. iliaca durchgezogen und schließlich lateral des rechten Thorax ebenfalls durch einen Klebestreifen fixiert. Um den Blutfluß zu unterbinden, wurden die Ligaturen von distal nach proximal angezogen, erst Ligatur I, dann Ligatur II

und schließlich Ligatur III. Nachdem nun der Blutfluss unterbunden war, wurde die A. femoralis profunda eingeschnitten. Hierzu wurden die kleine Schere nach Vannas und die gebogene Injektionsnadel benötigt. Zunächst wurde die A. femoralis profunda oberflächlich mit der Schere eingeschnitten. War der Einschnitt erfolgt, konnte die kleine gebogene Injektionsnadel in die Inzision eingeführt werden, um das Einbringen des Dilatationsdrahtes in die Arterie zu erleichtern. Dabei wurde die gebogene Spitze der Nadel in die Arterie eingesetzt und quer zur Verlaufsrichtung der A. femoralis profunda gezogen, um ein möglichst großes Lumen zu erzielen.

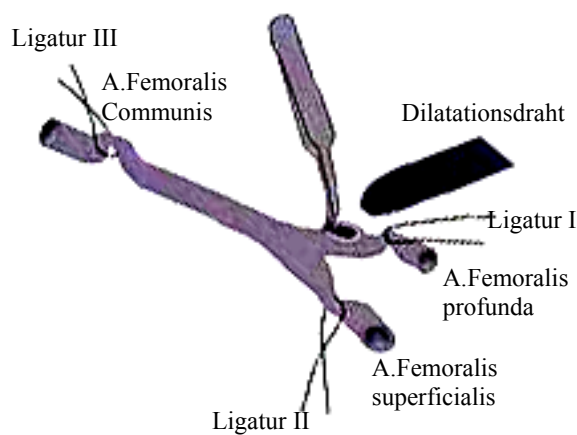


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Operationstechnik.

(Zeichnung modifiziert nach Sata et al.)

Nun wurde mit der gummierten Pinzette der Dilatationsdraht vorsichtig in die Arterie vorgeschoben. Der Draht verblieb für eine Minute in der Arterie und wurde dann mit Hilfe der gummierten Pinzette vorsichtig zurückgezogen. Vor der Entfernung des Drahtes aus der A. femoralis profunda wurde die Ligatur I für den darauffolgenden Schritt vorbereitet. Nach Entfernung des Drahtes wurde mit dieser Ligatur I die A. femoralis profunda proximal der Einführungsstelle, durch doppelten chirurgischen Knoten ligiert. Die anderen Ligaturen wurden entfernt.

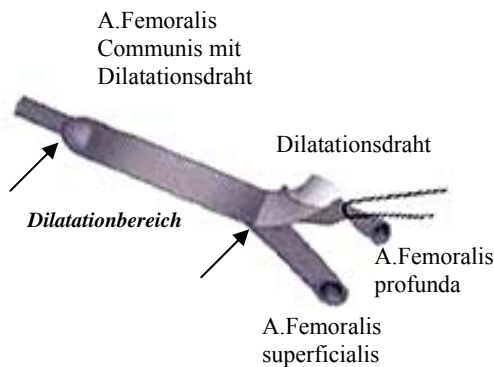


Abbildung 6: Schema während der Dilatation

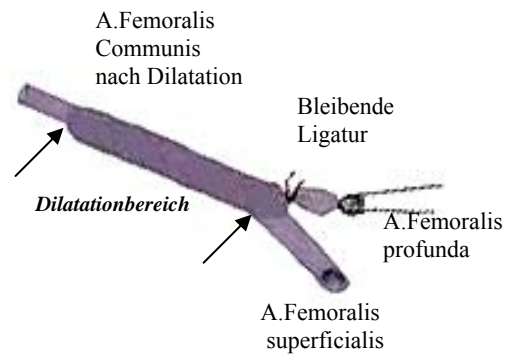


Abbildung 7: Schema nach der Dilatation

Anschließend wurden die Leitungsbahnen wieder repositioniert und sich von der suffizienten Reperfusion der Arterie überzeugt. Danach erfolgte die Naht mittels 6-0 Prolene® Faden in Einzelknopfnah. Während der gesamten Operation wurde das Operationsgebiet mittels Xylocain® feucht gehalten. Eventuell auftretende Blutungen wurden mit Lysostipt® gestillt. Nach erfolgreicher Operation wurde die Fixation gelöst und die Maus im Käfig unter eine Rotlichtlampe gestellt um den intraoperativen Wärmeverlust auszugleichen. Die folgenden intraoperativen Bilder sollen die eben beschriebene Vorgehensweise verdeutlichen.

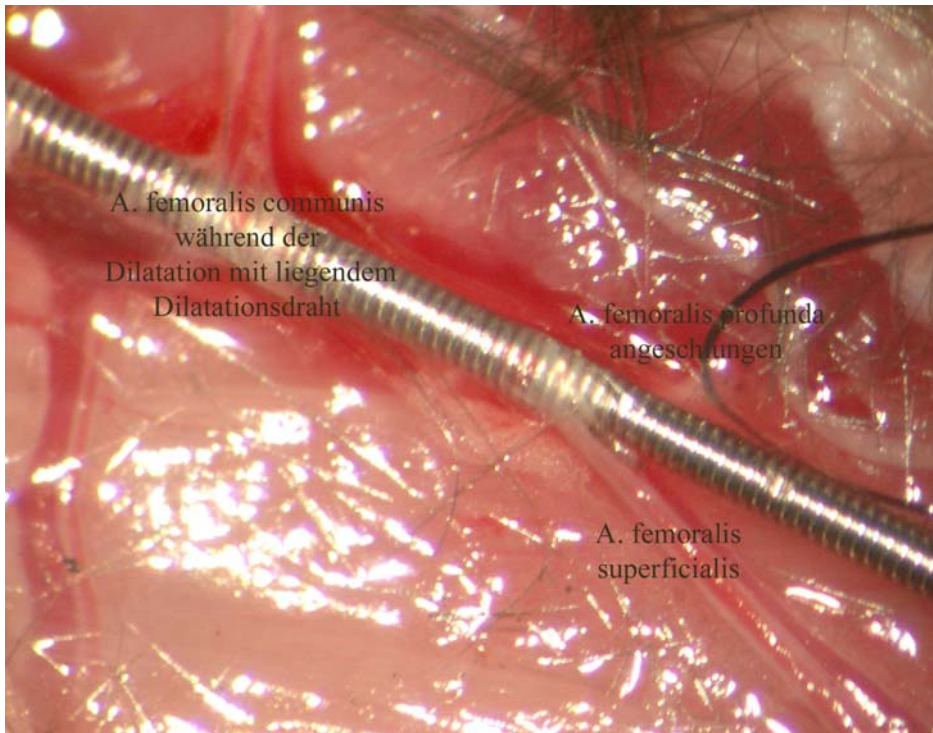


Abbildung 8: Operationssitus während der Operation

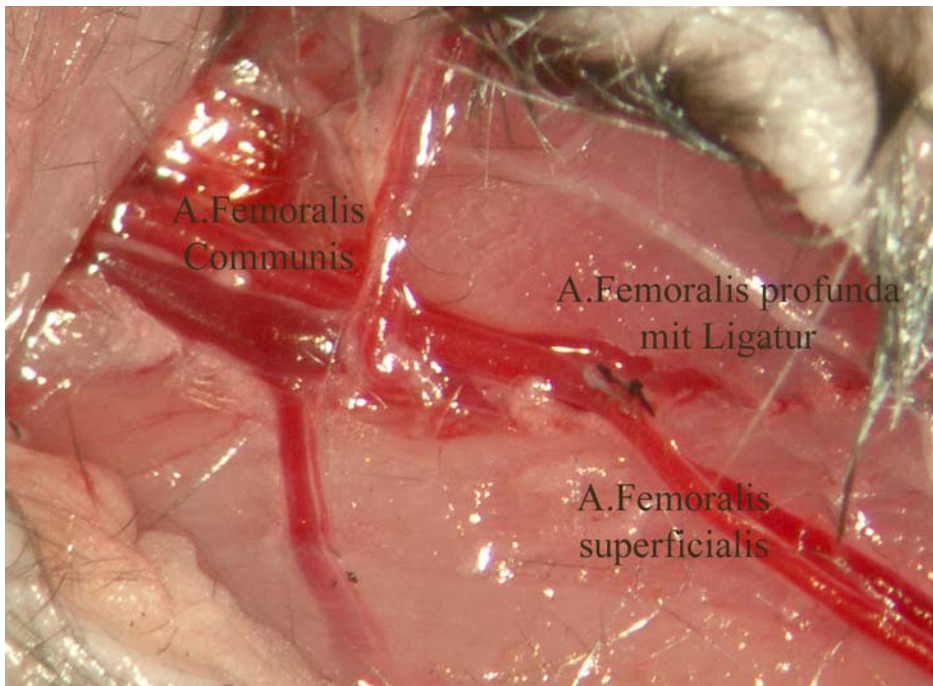


Abbildung 9: Operationssitus nach abgeschlossener Operation mit Ligatur der A. femoralis profunda

3.12 Applikation von Rapamycin

Den operierten Mäusen wurde intraperitoneal 3 mg/kg/d Rapamycin verabreicht. Die Dosis basiert auf Literatur, in welcher Rapamycin als Immunsuppressivum in Mäusen benutzt wurde.^{81, 82} Eine Dosis von 2 mg/kg/d bei Mäusen entspricht etwa der von 0,17 mg/kg/d bei Menschen, wenn die Umrechnung anhand der Körperoberfläche stattfindet.⁸³ Diese Dosis ist mit der in humanen Studien vergleichbar.⁸⁴

3.13 Entnahme der A. femoralis

Die Maus wurde mittels einer Überdosis Isofluran getötet. Nach Eintritt des Todes wurden die Mäuse durch linksventrikuläre Infusion von in PBS gelöstem und auf physiologische pH 7,4 gepuffertem 2 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Nach Eröffnung der alten Nahtstelle wurde der dilatierte Teil der A.femoralis entnommen. Zur Orientierung diente die Ligatur der A.femoralis profunda. Nach erfolgreicher Entnahme wurde das entnommene Stück in einer Petrischale mit PBS gelegt um Blutreste zu entfernen und so eine Reinigung des Arterienlumens zu erzielen. Es folgte eine weitere Fixierung in 2 %-igem Paraformaldehyd für 30 min. Im Anschluss wurde die Arterie in einem mit Tissue Tek® gefüllten Eppendorfgefäß eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte in einem Gefrierschrank bei -80° C.

3.14 Anfertigung der histologischen Schnitte

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurde der Kryostat LEICA CM 1900 verwendet. Das Schneiden erfolgte bei einer Temperatur von -24° C. Die Arterie wurde aus dem Eppendorfgefäß entfernt und auf einen eingespannten Stempel aufgebracht. Die Schichtdicke der Schnitte betrug 6 µm. Auf jeden Objektträger wurden drei Schnitte aufgetragen um bei den später folgenden immunhistochemischen Färbungen sowohl positive als auch negative Kontrollen auf einem Objektträger durchführen zu können. Anschließend erfolgte die Lagerung der Objektträger bei -20° C.

3.15 Computer assistierte Morphometrie

Es wurde eine histomorphometrische Evaluation zur Beurteilung der arteriellen Antwort auf die Gefäßverletzung durchgeführt. Die Arterien wurden 2 und 4 Wochen nach Verletzung vermessen. Nach einer Standard H&E Färbung wurden die Schnitte unter einem Leica Mikroskop untersucht. Für die Computer assistierte morphometrische Planimetrie wurde das Programm ZEISS KS300 3.0 benutzt. Es wurde die Fläche der Media (begrenzt durch die Lamina elastica externa und die Lamina elastica interna), die Fläche der Neointima (begrenzt durch die Lamina elastica interna und das Gefäßlumen), als auch die Fläche des Gefäßlumens ermittelt. Hieraus wurde das Neointima/Media Verhältnis (I/M Ratio) und die luminale Stenose des Gefäßes repräsentiert durch $(\text{Neointima/Lumen}) \times 100 \%$ berechnet. Aus jeder entnommenen Arterie wurden drei Schnitte jeweils vom Anfang, der Mitte und dem Ende der dilatierten Strecke angefertigt und hieraus die Mittelwerte für die jeweilige Arterie errechnet. Gefäße, bei denen während der morphometrischen Auswertung eine dilatationsbedingte Ruptur der Lamina elastica interna festgestellt wurde, wurden von den weiteren Analysen ausgenommen.

3.16 Fluoreszenz-Immunhistochemie

Zunächst wurden die Schnitte für 10 Minuten in einem Acetonbad fixiert und anschließend für 10 Minuten in PBS rehydriert. Der Schnitt wurde mit einem Fettstift in einem ausreichenden Abstand umfahren, um ein Verlaufen der aufzutragenden Agenzien zu verhindern. Nun wurden alle Schnitte mit dem 10 %-igen non-immune Goat-Serum für 10 Minuten geblockt. Das Serum wurde nur durch leichtes Klopfen entfernt und nicht abgespült. Die Primärantikörper wurden in der oben angegebenen Verdünnung aufgetragen und für 45 Minuten auf den Schnitten belassen. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils zwei Minuten in PBS gespült. Die Sekundärantikörper wurden aufgetragen und ebenfalls für 45 Minuten auf den Schnitten belassen. Im Anschluss wurde der Spülvorgang wie zuvor wiederholt. Da sich auf jedem Objektträger jeweils drei Schnitte der zu untersuchenden Arterie befanden, lief mit jeder Immunhistochemie gleich eine Kontrollfärbung ohne einen

spezifischen Primärantikörper als Negativkontrolle mit, um das Ausmass einer unspezifischen Färbung durch den Sekundärantikörper zu beurteilen. Alternativ hierzu wurden die Schnitte im ersten Schritt mit einem unspezifischen Primärantikörper inkubiert. Während der Fluoreszenz-Immunhistochemie wurden die Schnitte möglichst vor Lichteinflüssen geschützt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Vectashield®, Vector Laboratories, Kalifornien, USA, welchem zuvor DAPI hinzugefügt wurde (1µl DAPI auf 1 ml Vectashield®), eingedeckelt. Um die Schnitte möglichst luftdicht zu verschließen, wurden die Deckgläser mit klarem Nagellack umrandet.

3.17 Bewertung der Immunhistochemie

Die immunhistochemisch behandelten Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop der Firma LEICA (DM RB) und einem Laser-Scanning-Mikroskop der Firma LEICA (TCS SP) ausgewertet.

3.18 Durchflusszytometrische Quantifizierung zirkulierender endothelialer Progenitorzellen

Nach 1, 14 und 28 Tagen wurde Blut aus den Kontroll- bzw. Rapamycin-behandelten Mäusen gewonnen. Nach Lyse der Erythrozyten (Erylyse, BD Biosciences) erfolgte die Fc-Blockade (Fc-Block, Pharmingen). Die lebende Zellpopulation wurde auf die gleichzeitige Expression des Stammzellmarkers Sca-1 (Sca-1-FITC, Klon E13-161.7, Pharmingen) und den endothelialen Marker „vascular endothelial growthfactor receptor-2“ (VEGFR-2, Klon A3, Santa Cruz – konjugiert mit einem entsprechenden Phycoerythrin (PE)-markierten Sekundärantikörper, Sigma) hin untersucht.

Isotyp-identische Antikörper (BD Biosciences) dienten hierbei als Kontrolle.

Ein- und zweifarben-zytometrische Analysen der Zellen wurden mit einem Durchflusszytometer (FACS-Calibur, BD Biosciences) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels „Cellquest“ Software (BD Biosciences).

3.19 Isolation und Charakterisierung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) aus der Milz.

Die Milzen wurden aus C57Bl6 Mäusen explantiert und mechanisch zerkleinert. Die mononukleären Zellen wurden durch Zentrifugation mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten (Lympholite-M, Cedarlane, UDA) isoliert. Die mononukleären Zellen aus der Milz (4×10^6) wurden auf 24-well Kulturschalen ausgesät, die zuvor mit Fibronectin (Sigma) beschichtet wurden. Die Zellen wurden in 0,5 ml „endothelial basal medium“ (Cell Systems) kultiviert, welches mit 1 µg/ml Hydrocortison, 3 µg/ml bovine brain extract, 30 µg/ml Gentamycin, 50 µg/ml Amphotericin B, 10 µg/ml humanem vascular endothelial growth factor und 20% fetal calf serum (FCS) supplementiert wurde. Nach 7 Tagen in der Zellkultur wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert und in neue 24-well Kulturschalen resuspendiert.

Die adhärennten Zellen wurden dann zur Charakterisierung endothelialer Zellen mit 2,4 µg/ml 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorat-markiertem acetyliertem Low-Density Lipoprotein (DiI-Ac-LDL, Cell-Systems) als auch mit FITC-markiertem Lectin (UEA-1, 1 µg/ml, Sigma) für 1 Stunde inkubiert.

3 Gesichtsfelder/Kulturschale wurden ausgezählt und Zellen, die sowohl DiI-Ac-LDL aufnahmen als auch eine Lectin-Bindung zeigten, wurden als endotheliale Progenitorzellen (EPC) deklariert und quantifiziert.

3.20 Bestimmung der Migrationsfähigkeit von EPC

Die Migrationsfähigkeit der aus der Milz isolierten EPC wurde mit Hilfe von 12-well-Transwell-Platten der Firma Corning Inc. mit einer Porengröße von 8 µm untersucht. Vor Versuchsbeginn wurde die Unterseite der Membranen mit Fibronectin (Sigma) beschichtet.

In die obere Kammer wurden 200 µl Zellsuspension (5×10^4 Zellen) gegeben. Die untere Kammer der Transwell-Platten wurde mit 600 µl EC Medium gefüllt. Als Migrationsreiz wurden 50 ng/ml VEGF in die untere Kammer gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der Platten für 12 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurde die Zellsuspension abgezogen und die Membran

1x mit PBS gewaschen. Auf der Oberfläche verbliebene Zellen konnten mit Hilfe eines Baumwolltupfers vollständig entfernt werden. Die an der Unterseite adhären, migrierten Zellen wurden 2 Minuten in 70 % Methanol fixiert und anschließend mit DAPI gefärbt.

Die Anzahl der Zellen wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung in jeweils 3 randomisierten Feldern pro Kulturschale ausgezählt.

3.21 Adhäsion von CD34+ Zellen an humane koronare Endothelzellen

Humane koronare Endothelzellen (HCAEC) wurden von der Firma Cell Systems® (Cell Systems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen) bezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Endothelial Cell Growth Medium (Firma Cell Systems®). Es wurden ausschließlich Zellen der Passagen 2- 4 verwendet.

Humane CD34+ Zellen (G-CSF mobilisiert) wurden von der Firma Cambrex (Verviers, Belgien) bezogen und in HPGM-Medium (Cambrex) kultiviert.

Konfluente HCAEC wurden über 24 h mit TNF- α stimuliert. CD34+ Zellen wurden mit Cell Tracker green-CMFD (Molecular Probes) gefärbt und $2,5 \times 10^3$ Zellen wurden in 100 μ l Adhäsionspuffer (150 mM NaCl, 20 mM Hepes, 2 mM MgCl₂, 0,05 % BSA, pH 7,4) in 96-well Kulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden daraufhin über 30 min mit blockenden Antikörpern bzw. Kontrollantikörpern einmal mit und einmal ohne Rapamycin inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Adhäsionspuffer wurde die Anzahl der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung in 3 randomisierten Feldern pro Kulturschale ausgezählt.

3.22 Statistik

Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte +/- der mittleren Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA mit Hilfe der „SigmaStat“ Software, Systat, Richmond, Kalifornien, USA. Die Post-hoc Analysen wurden nach der Methode von Holm-Sidak durchgeführt. Alle Experimente wurden jeweils mindestens 3x unabhängig voneinander durchgeführt. Ein *P*-Wert <0,05 wurde als signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen interpretiert.

4 Ergebnisse

4.1 Rapamycin verhindert die Neointima Bildung

Um den Effekt von Rapamycin auf die Neointima Bildung zu bewerten, wurden die Arterien von C57/BL6 Mäusen dilatiert und die Neointima Bildung nach 14 und 28 Tagen quantifiziert. Hierbei wurden Mäuse untersucht die mit Rapamycin (3 mg/kg/d i.p.) behandelt wurden und Mäuse die keine Behandlung nach Dilatation erhielten. Nach zwei Wochen war die Neointima Bildung nur marginal und somit nicht signifikant unterschiedlich zwischen Rapamycin behandelten versus den Kontrollgruppen (I/M-Ratio: $0,16 \pm 0,20$ vs. $0,20 \pm 0,18$, $n=10$ $P<0,05$; Abb. 10). Vier Wochen nach Dilatation fand sich jedoch eine signifikante Reduktion der Neointima Bildung in der mit Rapamycin behandelten Gruppe verglichen mit den Kontrollgruppen (I/M-Ratio: $0,1 \pm 0,15$ vs. $1,01 \pm 0,27$, $n = 10$, $P<0,05$; Abb. 10).

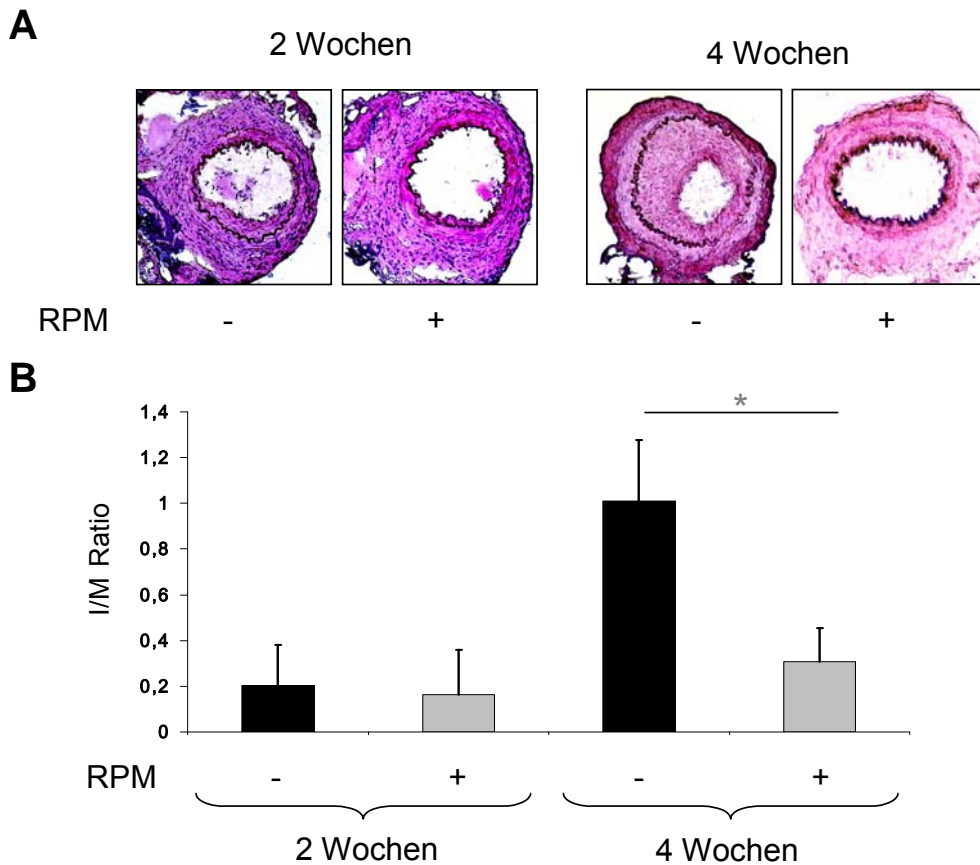


Abbildung 10: Rapamycin verhindert die Neointimabildung in der Arteria Femoralis der Maus. Gezeigt werden:

A: Repräsentative Schnitte von Femoralarterien der Maus ($n = 10/\text{Gruppe}$) 14 und 28 Tage nach Verletzung durch einen Draht, behandelt mit Rapamycin (3mg/kg/d) und ohne Behandlung.

B: Morphometrische Quantifizierung der verletzten Arterien von C57BL/6 Mäusen: Kontrollarterien (schwarze Balken) und mit Rapamycin behandelte Arterien (graue Balken). Die Fläche der Media wurde durch Subtraktion der umkreisten Fläche an der Lamina elastica interna von der umkreisten Fläche an der Lamina elastica externa errechnet. Die Fläche der Neointima wurde durch Subtraktion der umkreisten Fläche am Lumen von der umkreisten Fläche an der Lamina elastica interna errechnet. Das Neointima/Media-Verhältnis (I/M-Ratio) wurde durch Dividieren der neointimalen Fläche durch die mediale Fläche errechnet ($n = 10, P < 0,05$).

4.2 Rapamycin reduziert die Akkumulation von Zellen aus dem Knochenmark in der Neointima

Um den Beitrag zirkulierender, aus dem Knochenmark stammender Zellen an der neointimalen Läsion zu bewerten, wurde das Knochenmark von „Green Fluorescent Protein“ (GFP) transgenen Mäusen in Hintergrund-identische C57/BL6 Mäuse transplantiert. Acht Wochen nach der Transplantation wurden die Mäuse an der linken Femoral Arterie dilatiert und anschließend mit Rapamycin (3 mg/kg/d i.p.) bzw. der Trägersubstanz alleine behandelt. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Reduktion der relativen Zahl an GFP positiven Zellen in der neointimalen Läsion, verglichen mit den Kontrollgruppen. ($8,9 \pm 4,2$ vs. $31 \pm 26,5$ % nach 14 Tagen und $6,7 \pm 6,5$ % vs. $41,1 \pm 16,5$ % nach 28 Tagen, $n=10$, $P<0,05$; Abb. 11A). Diese Ergebnisse zeigen, dass Rapamycin die Adhäsion und Akkumulation von zirkulierenden Knochenmarkszellen in der neointimalen Läsion signifikant reduziert.

4.3 Rapamycin reduziert die Akkumulation von Monozyten/Makrophagen in neointimalen Läsionen

Um die Population der (GFP positiven) Knochenmarkszellen in der neointimalen Läsion weiter zu charakterisieren, wurden die GFP positiven Zellen in den Gewebeschnitten auf die Ko-Expression von MOMA-2, einem Marker für Monozyten/Makrophagen, mittels Laser Scanning Mikroskopie analysiert. Es wurden in der Neointima und der Media MOMA-2 positive Zellen gefunden. Interessanterweise wurden in Abschnitten, in denen die Media stärker verletzt war, mehr MOMA-2 positive Zellen gefunden. Vier Wochen nach Dilatation wurde in der mit Rapamycin behandelten Gruppe eine signifikante Reduktion der MOMA-2 positiven Zellen, verglichen mit den Kontrollgruppen, gefunden ($1,6 \pm 2,2$ vs. $11,6 \pm 5,3$ in der Neointima und $2,3 \pm 3,1$ vs. $11,4 \pm 4,6$ % in der Media, $n=10$, $P<0,05$; Abb. 11B). Die Ergebnisse belegen, dass Rapamycin die Rekrutierung von Monozyten nach Gefäßverletzung signifikant reduziert.

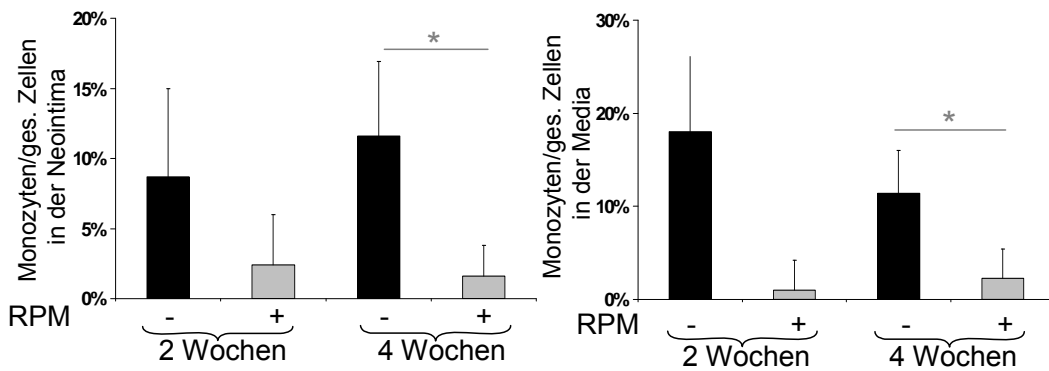
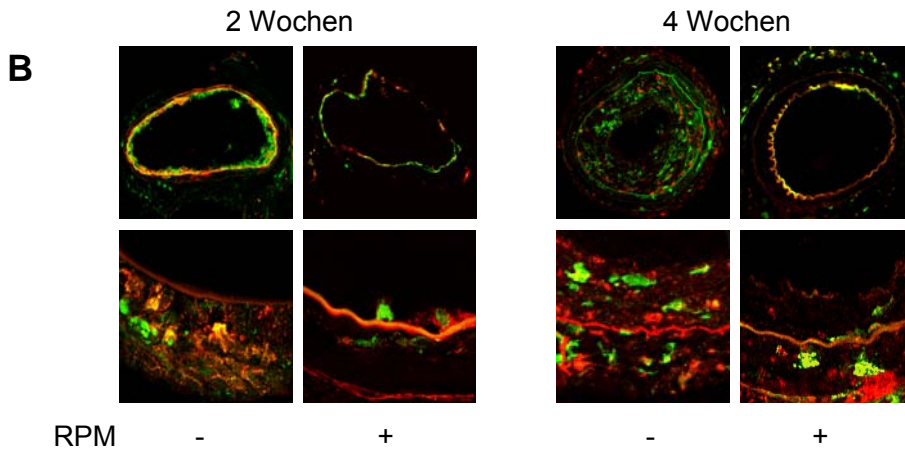
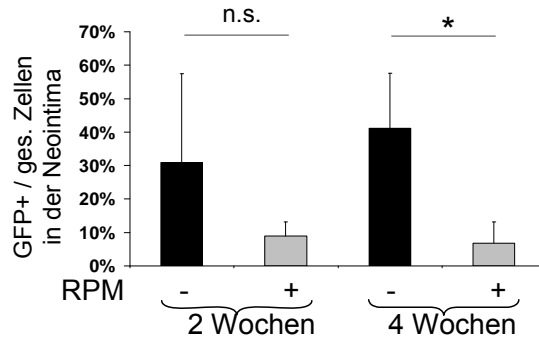
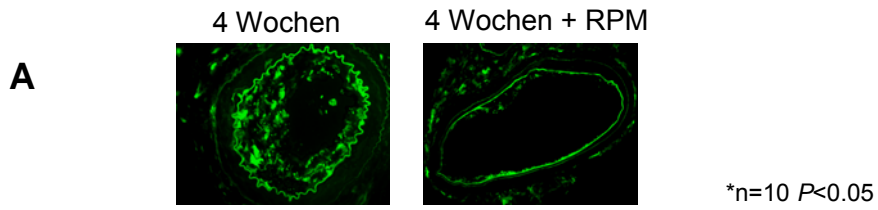


Abbildung 11: Rapamycin reduziert die Akkumulation von Zellen aus dem Knochenmark in der Neointima.

A: Schnitte der Arteria Femoralis der Maus, 2 und 4 Wochen nach Dilatation, einmal mit Rapamycin behandelt, einmal ohne Behandlung, wurden mit DAPI (blau) gefärbt um die Zellkerne zu lokalisieren. Zellen der Neointima und der Media, welche beide Marker, GFP (grün) und DAPI (blau), exprimieren, wurden in das jeweilige Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt und daraus die relative Zahl der GFP positiven (aus dem Knochenmark stammenden) Zellen in der Neointima und der Media errechnet ($n = 10, P < 0,01$).

B: Schnitte der Arteria Femoralis der Maus, 2 und 4 Wochen nach Dilatation, einmal mit Rapamycin behandelt, einmal ohne Behandlung, wurden mit MOMA-2 (rot) gefärbt um Monozyten/Makrophagen zu lokalisieren. Zellen der Neointima und der Media, welche beide Marker - MOMA-2 (rot) und GFP (grün) – exprimieren, wurden ins Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt und daraus die relative Zahl der Monozyten/Makrophagen in der Neointima und der Media errechnet ($n = 10, P < 0,01$).

Der obere Kasten zeigt einen Überblick von gefärbten Gefäßen, der untere dagegen einige repräsentative Ausschnitte.

4.4 Rapamycin reduziert die Zahl der aus dem Knochenmark stammenden glatten Gefäßmuskelzellen in der Neointima

Zur Bestimmung der aus dem Knochenmark stammenden glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC), welche an der Neointima Bildung beteiligt sind, wurden die Gefäßschnitte mit einem Antikörper gegen α -smooth muscle actin (α -SMA) gefärbt. Es wurde angenommen, dass Zellen, welche für GFP und α -SMA positiv sind, VSMC's mit Knochenmarksursprung darstellen. Zwei und vier Wochen nach der arteriellen Verletzung wurde eine signifikante Anzahl an GFP und α -SMA positiven Zellen in der Neointima und der Media gefunden (Abb. 12). Die doppelt (GFP und α -SMA) positiven Zellen wurden, wie auch bei den vorangegangenen immunhistochemischen Färbungen, mittels Laser Scanning Mikroskopie quantifiziert um Artefakte und falsch positive Ergebnisse, bedingt durch eine Überlagerung der Zellen, auszuschließen (Abb. 13A). In den Arterien der mit Rapamycin behandelten Tiere wurde eine signifikante Reduktion der VSMC's mit Knochenmarksursprung in der Neointima und der Media beobachtet ($6,7 \pm 6,5$ % vs. $41,1 \pm 16,5$ % in der Neointima und $18,4 \pm 17,7$ % vs. $46,1 \pm 8,0$ % in der Media, $n = 10$, $P < 0,05$; Abb. 13B).

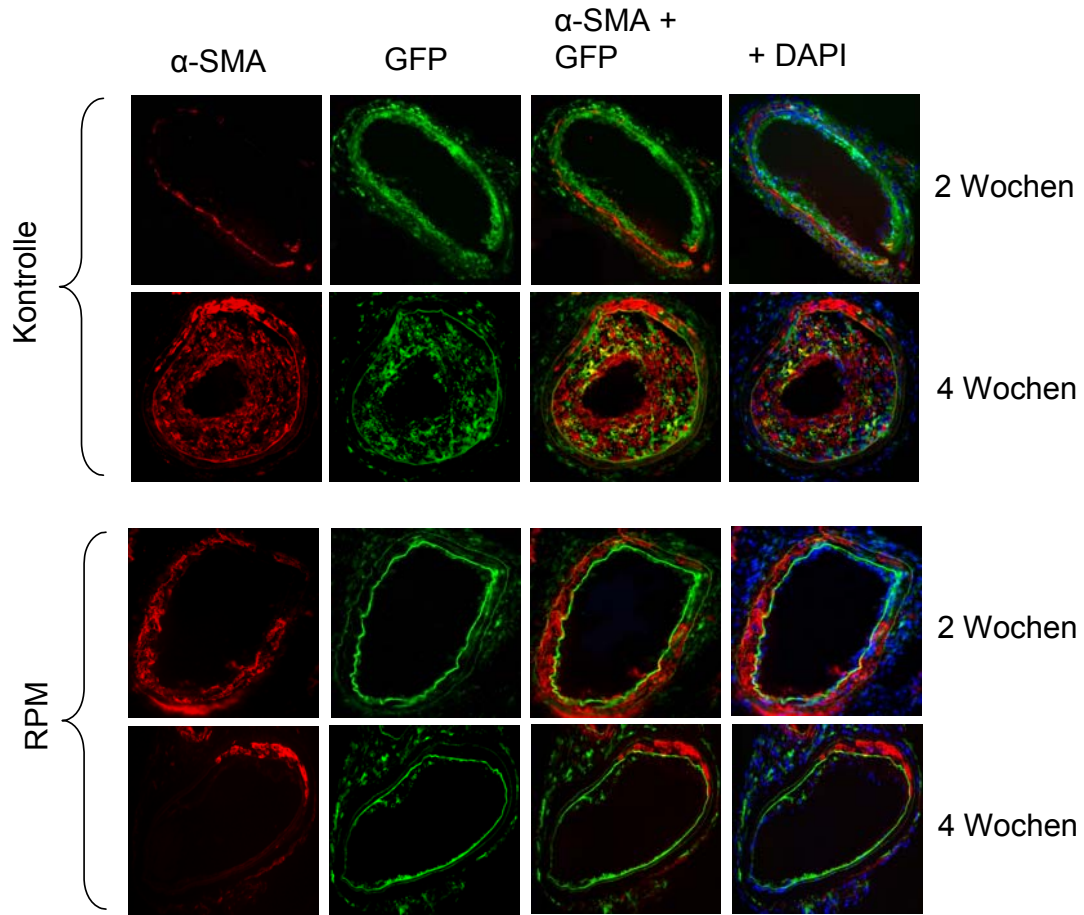


Abbildung 12: Rapamycin reduziert die Akkumulation von aus dem Knochenmark stammenden VSMC in der Neointima. Schnitte der Arteria Femoralis der Maus, 2 und 4 Wochen nach Dilatation, einmal mit Rapamycin behandelt, einmal ohne Behandlung, wurden mit α -SMA (rot) gefärbt um VSMC zu identifizieren und mit DAPI (blau) um Nuklei zu lokalisieren. Zellen der Neointima und der Media, welche beide Marker exprimieren, α -SMA (rot) und GFP (grün), zeigen aus dem Knochenmark stammende VSMC. Gezeigt sind repräsentative Schnitte von den jeweiligen Gefäßen nach 2 und 4 Wochen, ohne Behandlung (Kontrolle, obere zwei Reihen) und mit Rapamycin behandelte (RPM, untere zwei Reihen).

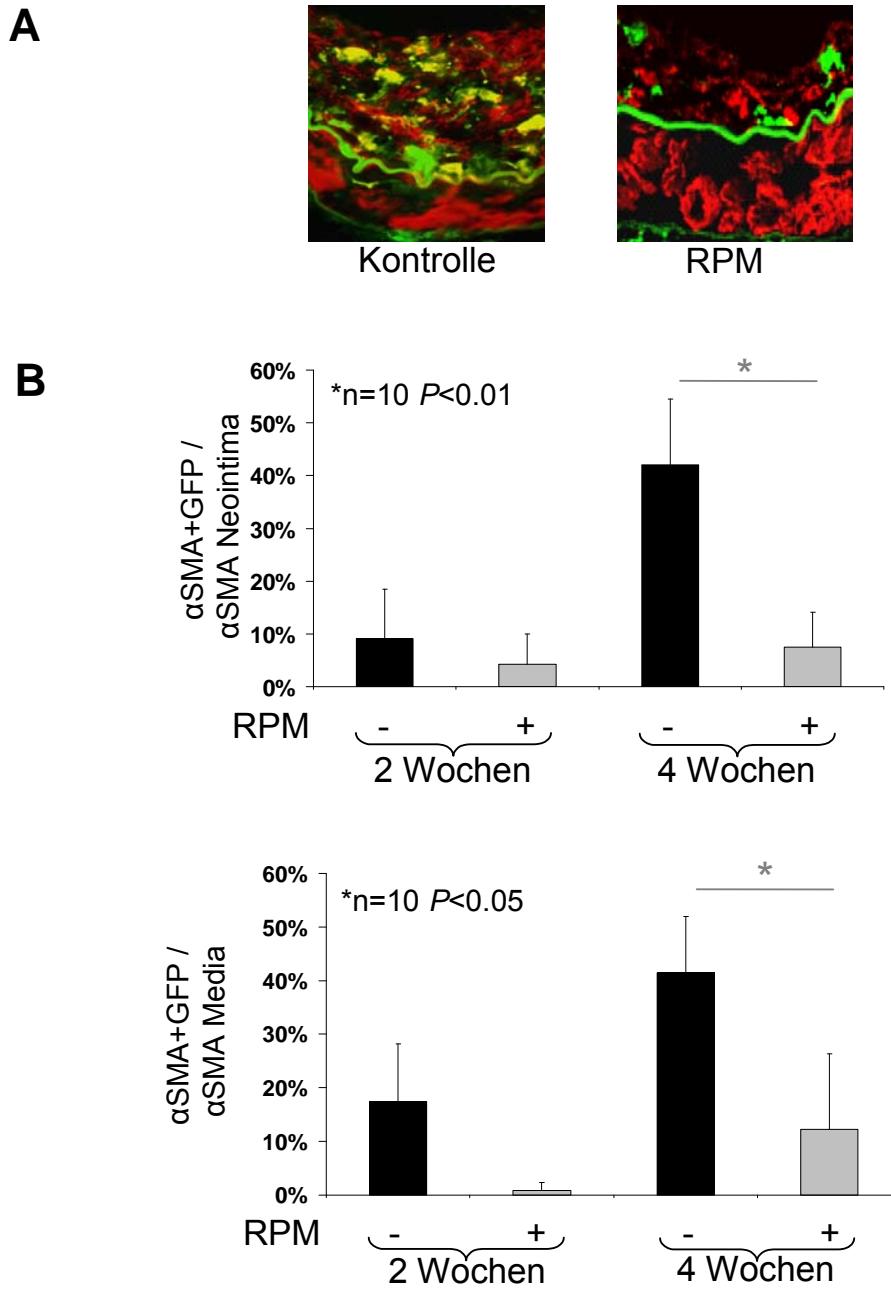


Abbildung 13: Rapamycin reduziert die Zahl der aus dem Knochenmark stammenden VSMC in der Neointima. Schnitte der Arteria Femoralis der Maus, 2 und 4 Wochen nach Dilatation, einmal mit Rapamycin behandelt, einmal ohne Behandlung, wurden gegen α -SMA (rot) gefärbt um VSMC zu identifizieren und mit DAPI (blau) um Nuklei zu lokalisieren.

A: Zellen der Neointima und der Media, welche beide Marker exprimieren, α -SMA (rot) und GFP (grün), zeigen aus dem Knochenmark stammende VSMC. Gezeigt werden repräsentative Photographien des Laser-Scanning-Mikroskops von Tieren, welche nicht behandelt (Kontrolle) oder mit Rapamycin (RPM) behandelt wurden, jeweils 4 Wochen nach Dilatation.

B: Zellen der Neointima und der Media, welche beide Marker exprimieren, α -SMA (rot) und GFP (grün), wurden mit der Gesamtzahl an α -SMA positiven Zellen verglichen und die relative Zahl der aus dem Knochenmark stammenden VSMC in der Neointima und der Media quantifiziert (n = 10, $P < 0,01$).

4.5 Rapamycin beeinträchtigt die Re-Endothelialisierung nach arterieller Verletzung

Da bekannt ist, dass der inhibitorische Effekt von Rapamycin auf den Zellzyklus nicht Zelltyp spezifisch ist, untersuchten wir die Wirkung auf die endotheliale Regeneration und die Re-Endothelialisierung nach Gefäßverletzung unter dem Einfluss von Rapamycin. Die Re-Endothelialisierung von denudierten Gefäßen wurde mittels Durchlicht-Mikroskopie nach Evans-Blue Färbung quantifiziert. In den Gefäßen der unbehandelten Tiere war der Großteil der denudierten Oberfläche nach zwei Wochen re-endothelialisiert (Abb. 14A). Im Gegensatz dazu zeigte sich in der mit Rapamycin behandelten Gruppe zwei Wochen nach Denudierung eine signifikante Beeinträchtigung der Re-Endothelialisierung ($54,6 \pm 10,0$ vs. $78,6 \pm 5,5$ %, $n = 4$, $P < 0,05$; Abb. 14B). Vier Wochen nach Gefäßverletzung waren sowohl die Kontrollgruppen, als auch die mit Rapamycin behandelten Gruppen vollständig re-endothelialisiert (Rapamycin: $96,5 \pm 1,8$ %, Kontrolle: $97,6 \pm 1,2$ %, $n = 4$, $P = \text{n.s.}$; Abb. 14B).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Rapamycin die Adhäsion und Differenzierung von aus dem Knochenmark stammenden (GFP positiven) Zellen zu Endothelzellen beeinflusst.

Hierfür wurde mittels immunhistochemischer Färbung gegen den von-Willebrand-Faktor (vWF) die Zahl der Endothelzellen ermittelt, die ebenfalls den Marker GFP exprimierten. Zwei Wochen nach Dilatation zeigte sich hier eine signifikante Reduktion der aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen, die an der Re-Endothelialisierung beteiligt sind. (Rapamycin: $13,5 \pm 1,2$ %, Kontrolle: $4,8 \pm 1,8$ %, $n = 6$, $P < 0,05$; Abb. 14C).

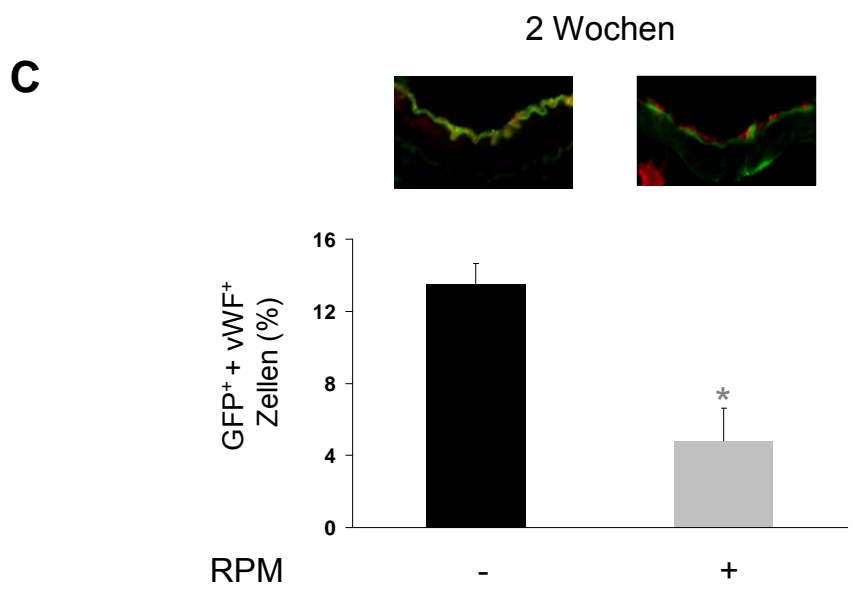
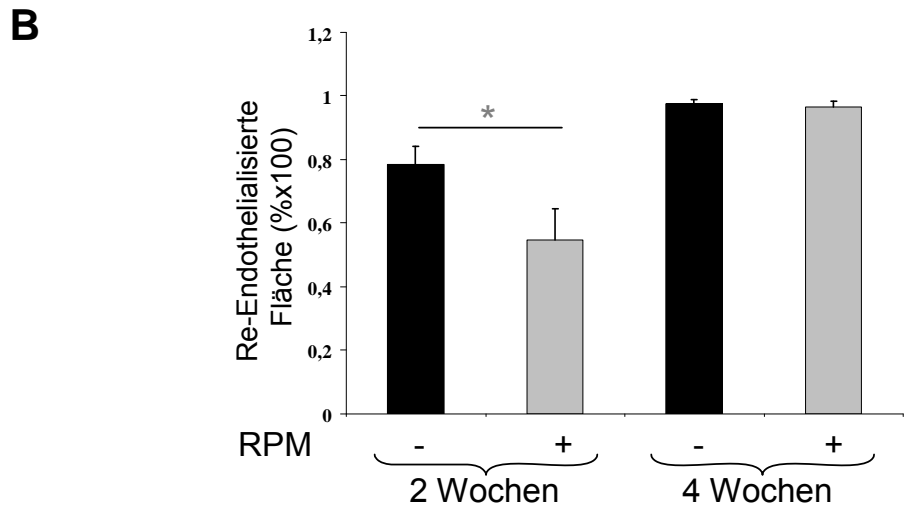


Abbildung 14: Rapamycin beeinträchtigt die Re-Endothelialisierung nach Gefäßverletzungen.

A: Beispiele von Femoralarterien, entnommen 1 (links), 14 (Mitte) und 28 (rechts) Tage nach Dilatation und Denudation durch einen Draht, jeweils mit Trägersubstanz bzw. Rapamycin (RPM) behandelt. Die Evans Blue Färbung zeigt die Segmente, welche noch nicht mit funktionell intaktem Endothel überzogen sind. Nach 14 Tagen zeigen die mit Rapamycin behandelten Arterien signifikant kleinere Gebiete, welche sich neu mit Endothel überzogen haben (weiße Gebiete).

B: Quantifizierung von re-endothelialisierten Gebieten mittels Evans Blue Färbung von ganzen Femoralarterien, 2 und 4 Wochen nach Verletzung (n=4, $P<0,05$).

C: Repräsentative Schnitte von Femoralarterien nach immunhistochemischer Färbung gegen den vWF, 2 Wochen nach Denudation. Quantifizierung der aus dem Knochenmark stammenden Zellen, welche an der Re-Endothelialisierung beteiligt sind. Prozentuale Darstellung von doppelt (GFP und vWF) positiven Zellen.

Schwarze Balken: Tiere ohne Behandlung.

Graue Balken: Mit Rapamycin behandelte Tiere.

4.6 Rapamycin verhindert die Expression von Adhäsionsmolekülen nach Gefäßverletzungen

Die Rekrutierung von zirkulierenden mononukleären Zellen an die Stellen der Gefäßverletzung ist abhängig von der Integrin-vermittelten Adhäsion an das „Intercellular Adhesion Molecule“ (ICAM-1) und das „Vascular Adhesion Molecule“ (VCAM-1). Deshalb wurde untersucht ob Rapamycin eine Auswirkung auf die Expression von diesen zellulären Adhäsionsmolekülen in Vivo hat. Die Behandlung mit Rapamycin resultierte, zwei Wochen nach Gefäßverletzung, in einer signifikanten Reduktion der Expression von ICAM-1 und VCAM-1 (ICAM-1: $0,8 \pm 0,3$ vs. $2,3 \pm 0,4$, VCAM-1: $1,2 \pm 0,2$ vs. $2,8 \pm 0,3$, $n = 6$, $P < 0,01$; Abb. 15A + B). Dieser Effekt könnte dazu beitragen, dass es zu einer Abnahme der Akkumulation von Monozyten/Makrophagen in neointimalem Gewebe kommt.

4.7 Die endotheliale Adhäsion von vaskulären Progenitorzellen ist von der ICAM Expression abhängig

Nachdem eine Vielzahl an Studien die Rolle von ICAM-1 und VCAM-1 bei der Adhäsion von Monozyten an der Gefäßwand beschrieben haben, bleibt immer noch unklar, ob ICAM-1 und VCAM-1 auch an der Rekrutierung von vaskulären Progenitorzellen an die Stelle der Gefäßverletzung beteiligt sind. Um dieser Frage nachzugehen wurde der Effekt von Rapamycin auf die Adhäsion von CD34+ Zellen auf Endothelzellen untersucht. Es wurde die Adhäsion von CD34+ Zellen an TNF- α stimulierten Endothelzellen (HCAEC) mit und ohne Zugabe von Rapamycin bzw. von neutralisierenden Antikörpern gegen ICAM-1 und VCAM-1 untersucht. Rapamycin senkte dosisabhängig die Adhäsion von CD34+ Zellen an stimulierten Endothelzellen (RPM 20 nM: 13 ± 8 , RPM 1 nM: 36 ± 12 , Kontrolle: 78 ± 16 Zellen / Gesichtsfeld, $n = 4$, $P < 0,01$; Abb. 15C). Weiter zeigte sich, dass durch vorherige Inkubation der Endothelzellen mit neutralisierenden Antikörpern gegen ICAM-1 (30 $\mu\text{g/ml}$) und VCAM-1 (30 $\mu\text{g/ml}$) nur die gegen ICAM-1 gerichteten Antikörper in der Lage waren die Adhäsion von CD34+ Zellen signifikant zu senken (ICAM: 29 ± 6 , VCAM: 57 ± 18 , Kontroll-IgG: 83 ± 13 Zellen / Gesichtsfeld, $n = 4$, $P < 0,05$; Abb. 15C). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Adhäsion von vaskulären Progenitorzellen (CD34+ Zellen) an Endothelzellen von der ICAM-1 Expression abhängig ist und dass Rapamycin durch die Unterdrückung der ICAM-1 Expression nach einer Gefäßverletzung die Rekrutierung von vaskulären Progenitorzellen an die Stelle der Schädigung reduzieren könnte.

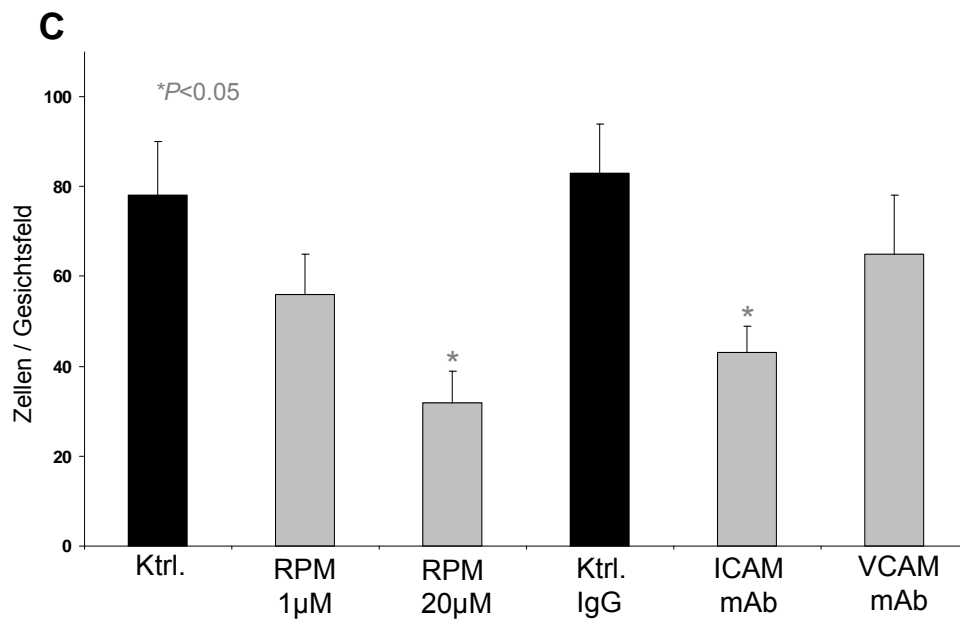
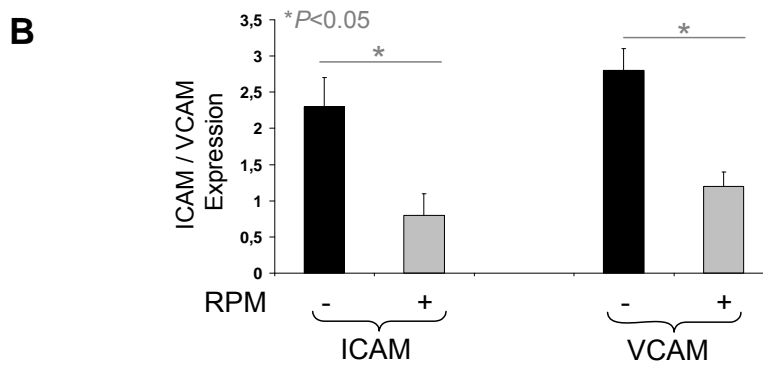
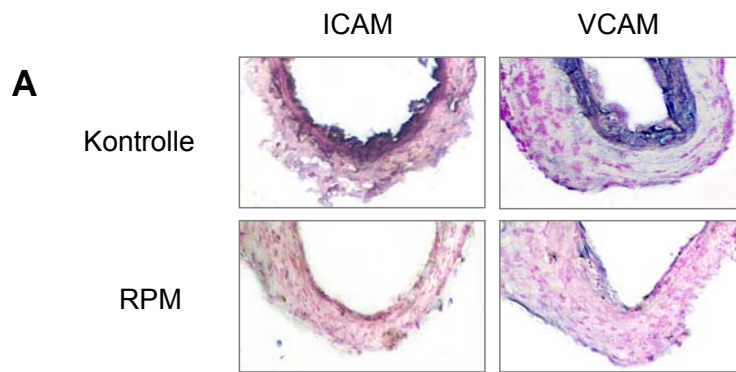


Abbildung 15. Rapamycin reduziert die Adhäsion von vaskulären Progenitorzellen durch Hemmung der ICAM-1 Expression.

A: Schnitte der Arteria Femoralis der Maus, 2 und 4 Wochen nach Dilatation, ohne Behandlung (Kontrolle, oberes Feld) und mit Rapamycin behandelt (RPM, unteres Feld), wurden immunhistochemisch auf die Expression von ICAM-1 oder VCAM-1 hin untersucht.

B: Quantifizierung der ICAM-1 und VCAM-1 Expression in der Femoralarterie der Maus, 2 und 4 Wochen nach Dilatation, ohne und mit Rapamycin behandelt ($n = 6$, $P < 0,01$).

C: Quantifizierung der Adhäsion von CD34+ Zellen an humane koronare Endothelzellen ($n = 4$, $P < 0,05$).

4.8 Effekt der Behandlung mit Rapamycin auf endotheliale Progenitorzellen

Die oben gezeigten Daten belegen, dass Rapamycin die Adhäsion von vaskulären Progenitorzellen an die Stelle der Gefäßverletzung beeinträchtigt. Da die Akkumulation von aus dem Knochenmark stammenden Zellen im neointimalen Gewebe jedoch auch von der Gesamtmenge der zirkulierenden Progenitorzellen abhängig ist, haben wir den Effekt von Rapamycin auf die Gesamtzahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen untersucht. Die Mäuse wurden mit Rapamycin behandelt (3 mg/kg/d). Sowohl vor Behandlung als auch nach 14 und 28 Tagen wurde mittels Durchflusszytometrie die relative Anzahl von Sca-1 und Vaskular-Endothelial-Growth-Faktor-Receptor-2 (VEGF-R2) exprimierenden Zellen quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der EPC's im peripheren Blut in der Rapamycin behandelten Gruppe (nach 14 Tagen $23,6 \pm 5$ % Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe, nach 28 Tagen $27,8 \pm 16,7$ % Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe; $n = 4$, $P < 0,05$; Abb. 16B). Eine weitere Quelle zirkulierender endothelialer Progenitorzellen in der Maus ist die Milz, die in der Maus neben dem Knochenmark ein weiteres hämatopoetisches Organ darstellt.⁸⁵ Den Versuchstieren wurde daher die Milz 1, 14 und 28 Tage nach dem Beginn der Rapamycin Behandlung entnommen und die daraus gewonnenen mononukleären Zellen mit einer Dichte von 4×10^6 Zellen pro 10 cm^2 Kulturschale ausgesät. Nach 7 Tagen in vitro Kultur wurden die Zellen mittels DiI-Ac-LDL und Lectin, zwei Endothelzell-spezifischen Markern gefärbt. Anschliessend wurden die DiI-Ac-LDL und Lectin-positiven endothelialen Zellen, wie in Abbildung 16A gezeigt, quantifiziert. Rapamycin reduzierte signifikant die Zahl der endothelialen Zellen, nach 14 Tagen ($31,7 \pm 8,6$ vs. $82,3 \pm 11,2$ % in der Kontrollgruppe) und nach 28 Tagen ($28,8 \pm 7,1$ vs. $73,7 \pm 8,5$ % in der Kontrollgruppe, $n=6$, $P < 0,01$; Abb. 16A). Die migratorische Kapazität endothelialer Progenitorzellen spielt bei der Regeneration von Gefäßschädigungen eine entscheidende Rolle. Daher wurde in einem weiteren Versuchsansatz der Einfluss von Rapamycin auf die Migration von EPC's untersucht. Rapamycin führte dabei dosisabhängig zu einer signifikanten Reduktion der EPC Migration ($17,1 \pm 3,7$ vs. $32,3 \pm 2,5$ % in der Kontrollgruppe, $n=3$, $P < 0,05$; Abb. 16C).

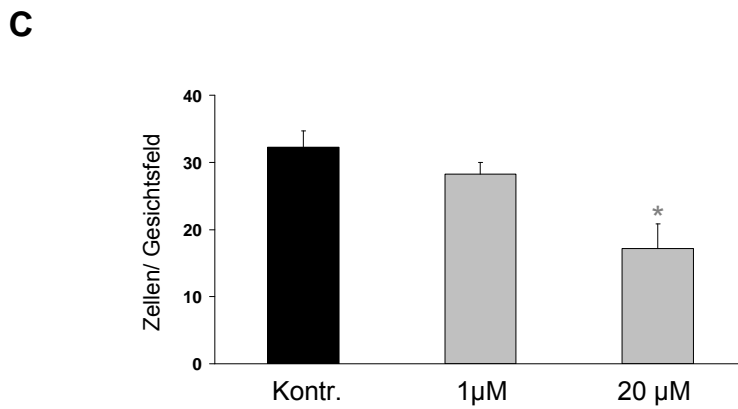
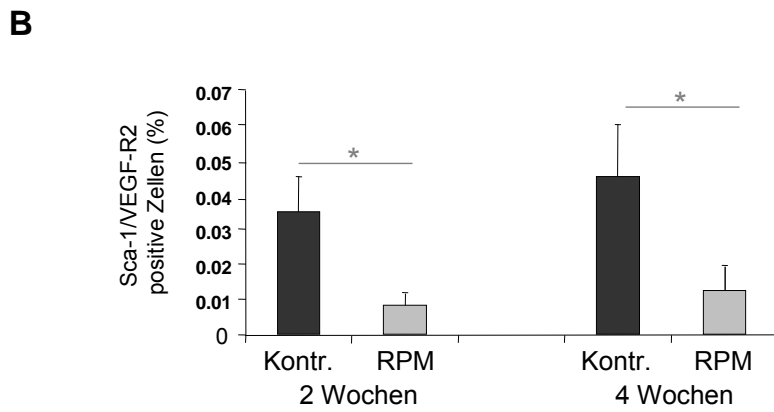
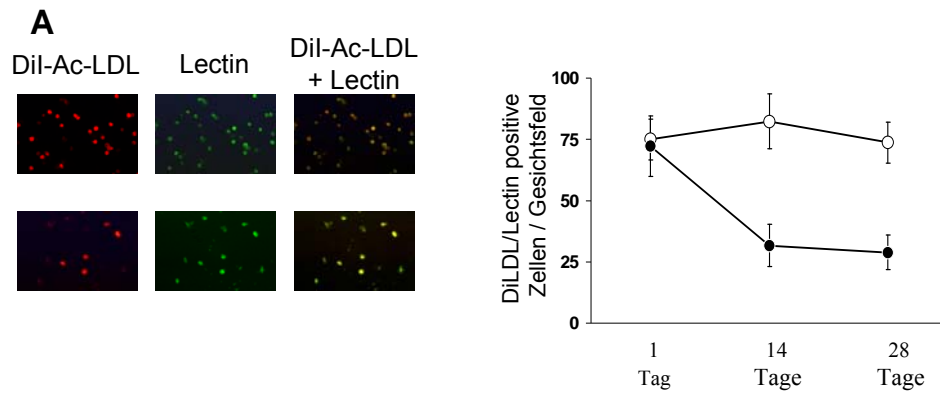


Abbildung 16: Der Einfluß von Rapamycin auf EPCs.

A: Mononukleäre Zellen aus Milz-Homogenaten wurden unter EPC spezifischen Konditionen für 7 Tage in Kultur gebracht, ohne Rapamycin (oben) und mit Rapamycin (unten). Die Anzahl der EPC's wurde nach Färbung gegen DiLDL und Lectin quantifiziert ($n = 6, P < 0,05$).

B: Nach 0, 14 und 28 Tagen wurden Sca-1/VEGFR2-positive Zellen aus Mäusen mittels FACS-Analyse quantifiziert. Die Proben wurden aus peripherem Blut gewonnen. Die statistische Analyse zeigt 2 und 4 Wochen nach Dilatation einen Abfall der zirkulierenden EPCs im peripheren Blut von Rapamycin behandelten Mäusen ($n = 4, P < 0,05$).

C: Mononukleäre Zellen aus Milz-Homogenaten wurden unter EPC spezifischen Konditionen für 7 Tage in Kultur gebracht. Die Untersuchung der Zellmigration erfolgte in einem modifizierten „Boyden chamber“ - Assay. ($n = 3, P < 0,05$).

5 Diskussion

5.1 Bisheriges Verständnis über die Abstammung neointimaler Zellen

Man geht derzeit von der Vorstellung aus, dass sich atherosklerotische Veränderungen aus einer übermäßigen, entzündlich-proliferativen Antwort auf verschiedene Formen der Verletzung von Endothel und glatten Gefäßmuskelzellen der Arterienwand ergeben.^{6, 7, 9, 86-89} Durch Verletzungen des Endothels kommt es zur Rekrutierung von Entzündungszellen, die eine Vielzahl von Zytokinen - wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor- α , Interleukin-1 und Interferon - sezernieren. Diese lösen eine Dedifferenzierung der medialen SMCs aus, welche unter physiologischen Bedingungen den Gefäßtonus und den Blutfluss regulieren.^{7, 88} Dedifferenzierte VSMC migrieren in den subendothelialen Raum, proliferieren dort und sezernieren extrazelluläre Matrixproteine und Wachstumsfaktoren.⁸⁷ Bis vor kurzem ging man so von der Annahme aus, dass sich alle neointimalen VSMC aus medialen VSMC rekrutieren.⁸⁹ Unter dieser Vorstellung wurden zahlreiche pharmakologische sowie gentherapeutische Verfahren erarbeitet um die Dedifferenzierung, Migration und Proliferation von medialen VSMC zu verhindern.⁹⁰⁻¹⁰¹ Es gibt jedoch mehrere Phänomene, die durch diese Hypothese nicht erklärt werden können:

Erstens haben sehr wenige Studien dokumentiert, dass VSMC von der Media über die Lamina elastica interna in die subendotheliale Schicht migrieren.^{7, 88} Andererseits haben viele Studien gezeigt, dass sich Blutzellen von luminal an die verletzte Arterie haften und dass dieser Vorgang der Entstehung einer Neointima vorausgeht.^{102, 103}

Zweitens ist beobachtet worden, dass es auch zur Entwicklung einer Neointima kommen kann nachdem die Zellen der Media fast vollständig eliminiert wurden.¹⁰³ In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass neointimale Zellen eine Woche nach Gefäßverletzung keine VSMC-Marker exprimierten und morhologisch eher an hämatopoetische- als an Gefäßmuskelzellen erinnerten.

Drittens haben viele Studien berichtet, dass eine neointimale Hyperplasie verhindert werden kann, indem Chemokine oder Adhensionsmoleküle blockiert werden,^{104, 105} welche eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Blutzellen spielen, aber keine Wirkung auf die Migration und Proliferation von VSMC haben.¹⁰⁵

Viertens unterscheiden sich neointimale VSMC von medialen VSMC maßgeblich im Hinblick auf ihren Phenotyp und ihr Genexpressionsmuster.^{7, 106, 107} Neointimale VSMC exprimieren mehrere hämatopoetische Marker, einschließlich des FK506-Binding-Proteins-12, Interferon-Regulations-Faktor und proinflammatorischer Proteine,^{106, 107} was darauf hindeutet, dass diese neointimalen Zellen ihren Ursprung eher in zirkulierenden hämatogenen Zellen als in glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media haben könnten.

5.2 Neue Erkenntnisse über die Herkunft glatter Gefäßmuskelzellen in Gefäßläsionen.

Zusätzlich zu der herkömmlichen Annahme, dass beschädigte Gewebe durch individuelle parenchymale Zellen repariert werden, mehren sich die Hinweise, dass es somatische Stammzellen gibt, welche aus der Zirkulation zu den unterschiedlichen Organen rekrutiert werden, dort in unterschiedliche Linien differenzieren und so an der Organ-Reparatur und Regeneration teilnehmen.¹⁰⁸⁻¹¹³ Es wurde beispielsweise berichtet, dass Flk-1 positive, aus embryonalen Stammzellen stammende Zellen, als Gefäß-Progenitor-Zellen agieren können und sowohl bei Föten als auch bei Erwachsenen zur Neovaskularisierung beitragen.^{114, 115} Das Knochenmark könnte daher eine zusätzliche Quelle von Gefäßzellen sein, die bei der Post-Angioplastie-Restenose, der transplantationsassoziierten Arteriosklerose und der Hyperlipidämie-induzierten Atherosklerose zur Gefäßreparatur und zum pathologischen Remodeling beitragen.

Um die Beteiligung von aus dem Knochenmark stammenden Zellen an der Neointimaentwicklung im Tiermodell zu untersuchen, bedienten wir uns eines Tiermodells, bei dem wir vor einer Gefäßverletzung das Knochenmark der Versuchsmäuse durch mit einem Markergen (GFP) versehene Knochenmarkszellen ersetzen. In Übereinstimmung mit den oben

beschriebenen Studien konnten wir in diesem Tiermodell eine Beteiligung von zirkulierenden, aus dem Knochenmark stammenden Zellen bei der Neointimaentstehung nachweisen. Auch wenn eine Übertragung dieser Ergebnisse in die humane Situation immer unter Vorbehalt diskutiert werden sollte, liefern diese Ergebnisse doch hinreichende Evidenz für eine mögliche Beteiligung zirkulierender Progenitorzellen bei der Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen.

5.3 Zusammensetzung des neointimalen Gewebes in unterschiedlichen Gefäßläsionen

Zahlreiche Berichte haben gezeigt, dass neointimale Zellen sehr heterogen sind und unterschiedliche Ursprünge zu haben scheinen.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Kürzlich wurde berichtet, dass sich die Zellbestandteile je nach Art der Gefäßverletzung deutlich unterscheiden.¹¹⁷ Auch die Rekrutierung von aus dem Knochenmark stammenden Progenitorzellen in das neointimale Gewebe scheint dabei stark von der jeweiligen Gewebsverletzung abhängig zu sein.¹¹⁹ Kürzlich untersuchten Sata et al. drei verschiedene Arten von mechanischen Verletzungen in Mäusen, deren Knochenmark durch das von GFP- oder LacZ überexprimierenden Mäusen ersetzt worden war. Nach endovaskulärer Verletzung der A. femoralis durch einen Draht wurde eine bedeutende Zahl der neointimalen und medialen Zellen gefunden, welche aus dem Knochenmark stammen. Im Gegensatz dazu wurden bei leichteren Gefäßalterationen durch eine perivaskuläre Manschette kaum aus dem Knochenmark stammende Zellen entdeckt. Auch nach bloßer Ligatur der Karotisarterie konnten nur wenige aus dem Knochenmark stammende Zellen in der Neointima entdeckt werden. Diese Ergebnisse belegen auf tierexperimenteller Basis, dass die Art der Gefäßverletzung entscheidend für die Rekrutierung von aus dem Knochenmark stammenden Zellen und für das vaskuläre Remodeling zu sein scheint.

Auch beim Menschen wird angenommen, dass aus dem Knochenmark stammende Zellen immer dann wesentlich zur Läsionsbildung beitragen, wenn Arterien schweren Verletzungen, wie bei einer Angioplastie von

fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen, ausgesetzt werden.¹¹⁷ Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen weisen ein höheres Vorkommen an Elastica Rupturen und Verletzungen am Übergang zwischen Intima und Media auf,¹²⁰ wobei diese Veränderungen mit fokalen Intraplaque-Mikrohämorrhagien assoziiert sind.¹²¹ Während einer Angioplastie wird das Endothel vollständig denudiert und die atherosklerotischen Läsionen mit hohem Druck so stark gedehnt, dass oft ein Riss in der luminalen Oberfläche entsteht.¹²² Man geht davon aus, dass die Rekrutierung zirkulierender Zellen hier von besonderer Bedeutung ist. Eine Beteiligung zirkulierender Progenitorzellen wurde jedoch kürzlich auch bei der Entwicklung der Transplantationsvaskulopathie und in instabilen, rupturierten atherosklerotischen Plaques nachgewiesen.^{15, 117, 119, 123-125} Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen, ergab eine Analyse von Knochenmarks-Transplantierten verschiedenen Geschlechts, dass aus dem Spender-Knochenmark stammende VSMC in allen Schichten der atherosklerotischen Gefäßwand nachzuweisen waren.¹²⁶ Interessant ist jedoch auch hier die Beobachtung, dass es zu einer besonders ausgeprägten Rekrutierung von aus dem Knochenmark stammenden VSMC in verletzte Segmente, weniger jedoch in gesunde Gefäßabschnitte kommt.

Im Hinblick auf die Komplexität der neointimalen Läsionen beim Menschen, können diese Gefäßverletzungsmodelle in der Maus die genaue Pathogenese nur näherungsweise repräsentieren. Bei der Entscheidung für ein geeignetes Tiermodell für die in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen wählten wir daher ein Modell bei dem die A. femoralis dilatiert wird, da hier die Vorgänge bei der Dilatation von humanen koronaren Arterien am besten widergespiegelt werden.

5.4 Therapeutische Strategien in Bezug auf zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen

In der Vergangenheit ist es auch mit den potentesten antimigratorischen oder antiproliferativen Strategien nicht gelungen eine effektive Therapie zur Verhinderung stenosierender Gefäßerkrankungen zu etablieren.¹²⁷ Unsere Ergebnisse sowie die Berichte anderer Arbeitsgruppen belegen, dass aus dem Knochenmark stammende glattmuskuläre Progenitorzellen massgeblich an der

Neointimabildung beteiligt sind.¹¹⁹ Übereinstimmend hiermit ist eine vorherige Beobachtung, dass eine transiente Myelosuppression die Hyperplasie von glatten Gefäßmuskelzellen in ballondilatierten Koronararterien verhindert.¹²⁸ Eine ähnliche Wirkung konnte auch durch die Hemmung von Chemokinen (MCP-1)¹⁰⁵ oder Adhäsionsmolekülen (P-selectin)¹⁰⁴ erreicht werden, welche eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung und beim Homing von vaskulären Progenitorzellen spielen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der klinische Einsatz von Rapamycin effektiv die Entstehung einer neointimalen Hyperplasie nach Ballondilatation verhindern kann.^{33, 129} Trotz der zunehmenden klinischen Begeisterung, ist bisher jedoch wenig über die Mechanismen bekannt durch die Rapamycin die neointimale Hyperplasie verhindert. Rapamycin ist ein immunsuppressives Medikament, das in den klinisch eingesetzten Dosierungen eine relativ schwache Wirkung auf die Proliferation medialer VSMC hat.¹⁰⁷ Es stellt sich daher die Frage, ob der klinische Effekt des Rapamycins evtl. auch in einer hemmenden Wirkung auf die Akkumulation zirkulierender vaskulärer Progenitorzellen begründet liegen kann. Unsere Ergebnisse zeigen nun, dass Rapamycin die Adhäsion von CD34+ Zellen in vitro hemmt. Darüber hinaus reduziert Rapamycin effektiv die Akkumulation von aus dem Knochenmark stammenden Zellen in der Neointima. Unsere Ergebnisse belegen damit erstmals, dass die antiadhäsive Wirkung zusätzlich oder sogar ausschlaggebend für den potenten klinischen Effekt des Rapamycins bei der Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen verantwortlich sein könnte.

5.5 Rolle von Adhäsionsmolekülen beim Homing vaskulärer Progenitorzellen im Neointimagewebe

Im Weiteren stellt sich die Frage, über welche Mechanismen Rapamycin seinen antiadhäsiven Effekt entfaltet. Bisher gibt es jedoch weder über den Pool aus dem sich glattmuskuläre Progenitorzellen rekrutieren noch über die Mechanismen über die sie am verletzten Gefäß adhärieren ausreichende Untersuchungen. Jüngere Studien konnten zeigen, dass zirkulierende Progenitorzellen ein ähnliches Integrinmuster wie Monozyten aufweisen und insbesondere die Expression von beta-2-Integrinen eine wichtige Rolle beim Homing dieser Zellen spielen.¹³⁰

Es ist daher denkbar, dass sich Monozyten und vaskuläre Progenitorzellen beim Homing in verletzte Gefäßabschnitte ähnlicher Mechanismen bedienen. Bei der Adhäsion und Rekrutierung mononukleärer Zellen spielt die beta-2-Integrin-vermittelte Adhäsion an den „intercellular adhesion molecule“ Rezeptor (ICAM-1) eine maßgebliche Rolle. Eine Beteiligung des beta-2-Integrin/ICAM-1-Systems beim Homing vaskulärer Progenitorzellen scheint somit wahrscheinlich.

Kürzlich konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Rapamycin *in vitro* zellzyklusabhängig die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 hemmt.⁷² Es stellt sich daher die Frage, ob ICAM-1 oder VCAM-1 auch in das Homing von Progenitorzellen involviert sind, was den hemmenden Effekt von Rapamycin auf die Adhäsion zirkulierender Zellen erklären könnte. Wie unsere Daten belegen, ist Rapamycin in der von uns verwendeten Dosierung in der Lage die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 *in vivo* nach Gefäßverletzung zu hemmen. Darüber hinaus konnte unter Verwendung eines blockierenden Antikörpers gegen ICAM-1, nicht jedoch mit einem Antikörper gegen VCAM-1, die Adhäsion von CD34+ Zellen an aktiviertes Endothel verhindert werden. Die ICAM-1-vermittelte Adhäsion scheint somit maßgeblich die Rekrutierung von Progenitorzellen zu beeinflussen und liefert einen Mechanismus wie Rapamycin der Akkumulation von zirkulierenden glattmuskulären Progenitorzellen entgegenwirkt. Bei der Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen scheinen neben ICAM-1 aber auch weitere Adhäsionsmoleküle eine Rolle zu spielen. So konnten Nührenberg *et al.* kürzlich zeigen, dass Rapamycin auch die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 reduziert und so eventuell Einfluss auf das Homing vaskulärer Progenitorzellen nimmt.¹³¹ Analog zu den gut untersuchten Adhäsionsmechanismen bei der Rekrutierung leukozytärer Zellen während des Entzündungsgeschehens scheint daher ein Zusammenspiel mehrerer Adhäsionsmolekül-Systeme auch bei der Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen wahrscheinlich, und Rapamycin scheint über mehr als nur ein Rezeptorsystem die Zelladhäsion zu beeinflussen.

5.6 Rolle endothelialer Progenitorzellen bei der Re-Endothelialisierung und Neointimabildung

Neben der Differenzierung zirkulierender Zellen in glatte Gefäßmuskelzellen spielt auch die Adhäsion, Migration und Proliferation endothelialer Progenitorzellen (EPC) eine Rolle für das Ausmaß der Neointimaentstehung. Endotheliale Progenitorzellen können zur beschleunigten Re-Endothelialisierung verletzter Gefäße beitragen und über diesen und weitere Mechanismen (z.B. gesteigerte NO Produktion) die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und die Neointimabildung reduzieren.⁸⁵ Strategien die die Zahl zirkulierender EPCs erhöhen oder auch eine therapeutische Gabe von EPCs scheinen somit auch potentiell geeignet zu sein einer Neointimaentstehung entgegenzuwirken.¹³² Aus diesem Grunde sollte in der vorliegenden Arbeit auch untersucht werden wie sich eine systemische Applikation von Rapamycin auf die Anzahl, Adhäsion und Funktion zirkulierender EPCs auswirkt.

Unsere Daten zeigen auch eine verringerte Anzahl von EPC in der Milz, die in der Maus neben dem Knochenmark als hämatopoietisches Organ fungiert. Dies könnte entweder in einer verringerten Neusynthese von Progenitorzellen oder aber in einer verringerten Rekrutierung zirkulierender Zellen in die Milz als „Progenitorzell-Speicher“ begründet liegen. Für eine verringerte Neusynthese und Freisetzung spricht die Beobachtung, dass unter systemischer Gabe von Rapamycin weniger zirkulierende EPC ($Sca^+/VEGF-R^+$) Zellen zu beobachten waren. Dabei bleibt die Frage offen, ob Rapamycin spezifisch die Freisetzung von EPC beeinflusst oder dieser Effekt eher über eine eventuell myelosuppressive Eigenschaft des Rapamycins zu erklären ist.¹²⁸ Die reduzierte Zahl zirkulierender EPC resultierte auch in einer verringerten Akkumulation von EPC nach Denudation der A. femoralis. In Übereinstimmung mit vorherigen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen ist diese verringerte Rekrutierung von EPC vermutlich auch für die von uns beobachtete verzögerte Re-Endothelialisierung verantwortlich. Entgegen den positiven Effekten auf die Akkumulation zirkulierender glattmuskulärer Progenitorzellen in der Neointima könnte die verzögerte Re-Endothelialisierung unter systemischer Rapamycingabe die Gefäßheilung und Proliferation von VSMC negativ beeinflussen und zu einem erhöhten Risiko

von thrombotischen Ereignissen in den verletzten Gefäßen führen. In der Tat wurde kürzlich über Fälle von fulminanten in-Stent Thrombosen berichtet die von den Untersuchern auf eine unzureichende Re-Endothelialisierung der Rapamycin beschichteten Stents zurückgeführt wurde.¹³³ EPC spielen aber auch ausserhalb des dilatierten Gefäßes eine wichtige Rolle für die Homöostase des Gefäßsystems und eine reduzierte Zahl zirkulierender EPC geht mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einher.¹³⁴ Es ist also zu vermuten, dass eine systemische Therapie mit Rapamycin, wie sie kürzlich als Alternative zu Rapamycin beschichteten Stents zur Verhinderung der Restenose untersucht wurde,¹³⁵ mit erheblichen Nachteilen für das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen einhergehen könnte. Eventuell würde eine Kombination aus einem Rapamycin beschichteten Stent und die zusätzliche Infusion von EPC in das dilatierte Gefäß, wie sie derzeit in klinischen Studien untersucht wird,^{136, 137} eine ideale Kombination darstellen, um einerseits die Akkumulation von glattmuskulären Progenitorzellen effektiv zu hemmen und andererseits dem negativen Einfluss auf die Re-Endothelialisierung durch eine lokale Applikation von EPC zu begegnen.

5.7 Potentielle Auswirkungen von Rapamycin auf die Neoangiogenese und Gewebsreparation nach Myokardinfarkt

Zur Zeit wird in mehreren groß angelegten Studien der positive Effekt einer Therapie mit EPC nach Myokardinfarkt untersucht.^{136, 137}

Die re-injizierten EPC sollen die Neoangiogenese und somit die effiziente Versorgung von unterversorgtem (hibernating) Myokard nach Infarkt verbessern und so zu einer Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion führen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass EPC auch direkt in Kardiomyozyten differenzieren können.¹³⁸ Dieser Mechanismus könnte ggf. zusätzlich zur verbesserten Myokardfunktion nach Stammzelltherapie beitragen. Kürzlich wurden auch residente kardiale Progenitorzellen identifiziert, die in der Lage sind sich nach Gewebstraumata - wie einem Myokardinfarkt - zu teilen und so verloren gegangenes Myokard zu regenerieren.¹³⁹ Rekrutierte oder therapeutisch applizierte Zellen könnten auch hier über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren sowohl das Überleben als

auch die Proliferation dieser residenten Vorläuferzellen stimulieren und somit indirekt zur Organregeneration beitragen.¹⁴⁰

Durch eine Reduktion der zirkulierenden und adhärierenden Vorläuferzellen und durch die Hemmung der Proliferation residenter myokardialer Stammzellen könnte Rapamycin die Regeneration von ischämischem Myokard beeinträchtigen. Auch unter diesem Gesichtspunkt scheint daher eine systemische Therapie mit Rapamycin zur Prävention einer neointimalen Hyperplasie nach Koronarangioplastie problematisch.

Die hier vorgestellten Daten belegen jedoch, dass Rapamycin eine hemmende Wirkung auf die Akkumulation glattmuskulärer Progenitorzellen in Neointimagewebe hat und dass dieser positive Effekt - im Gegensatz zu eventuellen unerwünschten Effekten auf zirkulierende EPC - in der klinischen Anwendung zur Hemmung der Restenose zu überwiegen scheint. Die Daten lassen jedoch auch vermuten, dass eine systemische Applikation von Rapamycin mit unerwünschten Effekten einhergehen könnte und somit die lokale Applikation über beschichtete Stents den im Moment sichersten und effektivsten Weg zur Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen darstellt.

5.8 Ausblick

Weitere Studien sind erforderlich, um zirkulierende vaskuläre Progenitorzellen, insbesondere glattmuskuläre Progenitorzellen, zu identifizieren und zu charakterisieren. Es ist beobachtet worden, dass von Knochenmark abgeleitete Zellen für VSMC- und EC-Marker negativ waren, wenn sie eine Woche nach Gefäßverletzung am Lumen der Arterie akkumulieren.¹⁵ Es ist also wahrscheinlich, dass plastische, unreife Zellen zu den verletzten Gefäßen rekrutiert werden und dort unter dem Einfluss von mechanischen und humoralen Stimuli differenzieren. Übereinstimmend hiermit wird berichtet, dass zirkulierende Progenitorzellen in vitro das Potential haben, abhängig von der Zusammensetzung des Kulturmediums und von den Kulturbedingungen, entweder in ECs oder in SMC's zu differenzieren.^{19, 123, 126, 141} Ausgehend von diesen Ergebnissen bleibt es weiterhin ungeklärt, ob es sich bei endothelialen und glattmuskulären Progenitorzellen wirklich um unterschiedliche zirkulierende Zellpopulationen handelt, oder ob sich diese zirkulierenden vaskulären Progenitorzellen sowohl in Endothel- als auch in glatte Gefäßmuskelzellen differenzieren können. Weitere Experimente müssen die molekularen Mechanismen aufzeigen, durch welche die Progenitorzellen an der Stelle der Läsion akkumulieren und dort entweder in endotheliale- oder glattmuskuläre Zellen differenzieren. Erst durch ein genaues Verständnis dieser Vorgänge wird es möglich sein gezielt die Akkumulation und Differenzierung von aus dem Blut stammenden Endothelzellen oder glatten Gefäßmuskelzellen nach Gefäßverletzung zu beeinflussen und so therapeutisch in die Entwicklung vaskuloproliferativer Erkrankungen einzugreifen.

6 Zusammenfassung

Der mTOR-Inhibitor Rapamycin ist die derzeit wohl vielversprechendste Substanz im klinischen Einsatz zur Hemmung der Restenose nach Ballonangioplastie.

Mechanistisch konnten vorausgegangene Arbeiten zeigen, dass Rapamycin effektiv die Proliferation und Migration ortsständiger glatter Gefäßmuskelzellen hemmt.

Jüngere Untersuchungen zeigen jedoch, dass sich die zellulären Bestandteile der entstehenden Neointima nicht nur aus den ortsständigen glatten Gefäßmuskelzellen der Media, sondern zur Hälfte auch aus zirkulierenden Zellen aus dem Blutstrom rekrutieren.

Bisher war jedoch nicht bekannt, ob Rapamycin auch einen Einfluss auf die Adhäsion, Akkumulation und Differenzierung zirkulierender Progenitorzellen hat und so über eine verminderte Akkumulation dieser Zellen zur Hemmung der Neointimabildung beiträgt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen nun, dass Rapamycin effektiv die Akkumulation zirkulierender Zellen im entstehenden Neointimagewebe nach Gefäßverletzung hemmt. Dies betrifft sowohl die Akkumulation von inflammatorischen Zellen (Monozyten) als auch von Progenitorzellen die im Verlauf der Neointimaentstehung zu glatten Gefäßmuskelzellen oder Endothelzellen differenzieren. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass dem Homing von Monozyten und Progenitorzellen teilweise redundante Mechanismen zugrunde liegen, da die Adhäsion von CD34+ Progenitorzellen wie auch von Monozyten von dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 abhängig zu sein scheint. Interessanterweise hemmt Rapamycin die ICAM-1 Expression, was eine mechanistische Erklärung für die verringerte Akkumulation von zirkulierenden Zellen darstellen könnte. Neben einer verringerten Adhäsion führt Rapamycin jedoch auch zu einer Reduktion der Zahl zirkulierender endothelialer Progenitorzellen (EPC) und einer verminderten migratorischen Kapazität von EPCs. Da die Re-Endothelialisierung nach Ballonangioplastie zum Großteil von der Rekrutierung zirkulierender endothelialer Progenitorzellen abhängt, liefern die vorgelegten Ergebnisse auch erstmals

eine rationale Erklärung für die klinisch beobachtete verlangsamte Re-Endothelialisierung und dadurch erhöhte Thrombosierungsgefahr nach Implantation von Rapamycin-freisetzenden Stents.

Die Ergebnisse zeigen somit eine ambivalente Rolle des Rapamycins auf, welches einerseits über eine verringerte Akkumulation von zirkulierenden Zellen zur Hemmung der Neointimaentstehung beiträgt, andererseits durch eine verzögerte Re-Endothelialisierung die Gefahr von In-Stent Thrombosen erhöht. Wie die jüngsten klinischen Studien belegen, scheinen jedoch unter einer gleichzeitigen effektiven und langfristigen Antikoagulation mit Thrombozytenaggregations-Hemmern die positiven Effekte (Hemmung der Restenose) zu überwiegen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse belegen somit erstmals den Effekt der in der klinischen Anwendung befindlichen Substanz Rapamycin auf die Funktion und Akkumulation vaskulärer Progenitorzellen nach Gefäßverletzung im Rahmen einer Angioplastie. Die Ergebnisse tragen grundlegend zum Verständnis der bisherigen klinischen Beobachtungen nach Implantation von Rapamycin-freisetzenden Stents bei und können helfen zukünftig effektivere und sicherere therapeutische Strategien zur Hemmung vaskuloproliferativer Erkrankungen zu entwickeln.

7 Literaturverzeichnis

1. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999;353:1547-1557.
2. Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:616-623.
3. Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, Geuskens R, de Feyter PJ, van den Brand M, Reiber JH, ten Katen HJ, van Es GA, Hugenholtz PG. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation*. 1988;77:361-371.
4. Kuntz RE, Baim DS. Prevention of coronary restenosis: the evolving evidence base for radiation therapy. *Circulation*. 2000;101:2130-2133.
5. Mangi AA, Dzau VJ. Gene therapy for human bypass grafts. *Ann Med*. 2001;33:153-155.
6. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791-804.
7. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419-420.
8. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.
9. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973;180:1332-1339.
10. Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2000;2:422-429.

11. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med.* 2002;8:1249-1256.
12. Velican C, Velican D. Coronary arteries in children up to the age of ten years II. Intimal thickening and its role in atherosclerotic involvement. *Med Interne.* 1976;14:17-24.
13. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L, Wilcox JN. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996;93:2178-2187.
14. DeRuiter MC, Poelmann RE, VanMunsteren JC, Mironov V, Markwald RR, Gittenberger-de Groot AC. Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circ Res.* 1997;80:444-451.
15. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med.* 2002;8:403-409.
16. Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1411-1422.
17. Campbell JH, Han CL, Campbell GR. Neointimal formation by circulating bone marrow cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:18-24; discussion 24-15.
18. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, Mitchell RN. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth- muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med.* 2001;7:738-741.
19. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation.* 2002;106:1199-1204.

20. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation*. 1994;90:2126-2146.
21. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987;316:1371-1375.
22. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. 1994;330:1431-1438.
23. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1769-1776.
24. Faxon DP, Sanborn TA, Weber VJ, Haudenschild C, Gottsman SB, McGovern WA, Ryan TJ. Restenosis following transluminal angioplasty in experimental atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1984;4:189-195.
25. Faxon DP, Weber VJ, Haudenschild C, Gottsman SB, McGovern WA, Ryan TJ. Acute effects of transluminal angioplasty in three experimental models of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1982;2:125-133.
26. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, Popma JJ, Mintz GS, Russo RJ, Schatz RA, Guarneri EM, Steuterman S, Morris NB, Leon MB, Tripuraneni P. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med*. 1997;336:1697-1703.
27. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;339:1665-1671.
28. Costa MA, Sabat M, van der Giessen WJ, Kay IP, Cervinka P, Ligthart JM, Serrano P, Coen VL, Levendag PC, Serruys PW. Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy. *Circulation*. 1999;100:789-792.
29. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, Orav EJ, Ehsan A, Dell'Acqua G, Dzau VJ. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet*. 1999;354:1493-1498.

30. Liistro F, Stankovic G, Di Mario C, Takagi T, Chieffo A, Moshiri S, Montorfano M, Carlino M, Briguori C, Pagnotta P, Albiero R, Corvaja N, Colombo A. First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation*. 2002;105:1883-1886.
31. Ruef J, Meshel AS, Hu Z, Horaist C, Ballinger CA, Thompson LJ, Subbarao VD, Dumont JA, Patterson C. Flavopiridol inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation In vivo after carotid injury in the rat. *Circulation*. 1999;100:659-665.
32. Brooks EE, Gray NS, Joly A, Kerwar SS, Lum R, Mackman RL, Norman TC, Rosete J, Rowe M, Schow SR, Schultz PG, Wang X, Wick MM, Shiffman D. CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J Biol Chem*. 1997;272:29207-29211.
33. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002;346:1773-1780.
34. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, Feres F, Seixas AC, Tanajura LF, Mattos LA, Falotico R, Jaeger J, Popma JJ, Serruys PW, Sousa AG. Four-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up of patients treated with sirolimus-eluting stents. *Circulation*. 2005;111:2326-2329.
35. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28:721-726.
36. Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975;28:727-732.
37. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, Marks AR. Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest*. 1996;98:2277-2283.

38. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995;76:412-417.
39. Morris RE, Cao W, Huang X, Gregory CR, Billingham ME, Rowan R, Shorthouse RA. Rapamycin (Sirolimus) inhibits vascular smooth muscle DNA synthesis in vitro and suppresses narrowing in arterial allografts and in balloon-injured carotid arteries: evidence that rapamycin antagonizes growth factor action on immune and nonimmune cells. *Transplant Proc.* 1995;27:430-431.
40. Gregory CR, Huie P, Shorthouse R, Wang J, Rowan R, Billingham ME, Morris RE. Treatment with rapamycin blocks arterial intimal thickening following mechanical and alloimmune injury. *Transplant Proc.* 1993;25:120-121.
41. Dumont FJ, Melino MR, Staruch MJ, Koprak SL, Fischer PA, Sigal NH. The immunosuppressive macrolides FK-506 and rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells. *J Immunol.* 1990;144:1418-1424.
42. Eng CP, Sehgal SN, Vezina C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo).* 1984;37:1231-1237.
43. Gregory CR, Huie P, Billingham ME, Morris RE. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured vessels. *Transplantation.* 1993;55:1409-1418.
44. Nair RV, Huang X, Shorthouse R, Adams B, Brazelton T, Braun-Dullaeus R, Morris RE. Antiproliferative effect of rapamycin on growth factor-stimulated human adult lung fibroblasts in vitro may explain its superior efficacy for prevention and treatment of allograft obliterative airway disease in vivo. *Transplant Proc.* 1997;29:614-615.
45. Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL. A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature.* 1989;341:758-760.
46. Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature.* 1989;341:755-757.

47. Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, Schreiber SL. Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:9231-9235.
48. Chen Y, Chen H, Rhoad AE, Warner L, Caggiano TJ, Failli A, Zhang H, Hsiao CL, Nakanishi K, Molnar-Kimber KL. A putative sirolimus (rapamycin) effector protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;203:1-7.
49. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994;369:756-758.
50. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, Wiederrecht G, Abraham RT. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1995;270:815-822.
51. Sabatini DM, Pierchala BA, Barrow RK, Schell MJ, Snyder SH. The rapamycin and FKBP12 target (RAFT) displays phosphatidylinositol 4-kinase activity. *J Biol Chem*. 1995;270:20875-20878.
52. Zheng XF, Florentino D, Chen J, Crabtree GR, Schreiber SL. TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell*. 1995;82:121-130.
53. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol*. 1994;14:4902-4911.
54. Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J. PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 1994;370:71-75.
55. Monfar M, Lemon KP, Grammer TC, Cheatham L, Chung J, Vlahos CJ, Blenis J. Activation of pp70/85 S6 kinases in interleukin-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP. *Mol Cell Biol*. 1995;15:326-337.

56. Kanazawa T, Keeler ML, Varticovski L. Serine-rich region of the IL-2 receptor beta-chain is required for activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell Immunol.* 1994;156:378-388.
57. Kozma SC, Thomas G. p70s6k/p85s6k: mechanism of activation and role in mitogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1994;5:255-260.
58. Erikson RL. Structure, expression, and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem.* 1991;266:6007-6010.
59. Terada N, Patel HR, Takase K, Kohno K, Nairn AC, Gelfand EW. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:11477-11481.
60. Graves LM, Bornfeldt KE, Argast GM, Krebs EG, Kong X, Lin TA, Lawrence JC, Jr. cAMP- and rapamycin-sensitive regulation of the association of eukaryotic initiation factor 4E and the translational regulator PHAS-I in aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7222-7226.
61. de Groot RP, Ballou LM, Sassone-Corsi P. Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression. *Cell.* 1994;79:81-91.
62. Feuerstein N, Huang D, Hinrichs SH, Orten DJ, Aiyar N, Prystowsky MB. Regulation of cAMP-responsive enhancer binding proteins during cell cycle progression in T lymphocytes stimulated by IL-2. *J Immunol.* 1995;154:68-79.
63. Feuerstein N, Huang D, Prystowsky MB. Rapamycin selectively blocks interleukin-2-induced proliferating cell nuclear antigen gene expression in T lymphocyte. Evidence for inhibition of CREB/ATF binding activities. *J Biol Chem.* 1995;270:9454-9458.
64. Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Franklin RA, Domenico J, Gelfand EW. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol.* 1993;154:7-15.
65. Cao W, Mohacsi P, Shorthouse R, Pratt R, Morris RE. Effects of rapamycin on growth factor-stimulated vascular smooth muscle cell

- DNA synthesis. Inhibition of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor action and antagonism of rapamycin by FK506. *Transplantation*. 1995;59:390-395.
66. Morice WG, Brunn GJ, Wiederrecht G, Siekierka JJ, Abraham RT. Rapamycin-induced inhibition of p34cdc2 kinase activation is associated with G1/S-phase growth arrest in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 1993;268:3734-3738.
67. Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature*. 1994;372:570-573.
68. Luo Y, Marx SO, Kiyokawa H, Koff A, Massague J, Marks AR. Rapamycin resistance tied to defective regulation of p27Kip1. *Mol Cell Biol*. 1996;16:6744-6751.
69. Sun J, Marx SO, Chen HJ, Poon M, Marks AR, Rabbani LE. Role for p27(Kip1) in Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation*. 2001;103:2967-2972.
70. Braun-Dullaes RC, Mann MJ, Seay U, Zhang L, von Der Leyen HE, Morris RE, Dzau VJ. Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1152-1158.
71. Giasson E, Meloche S. Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1995;270:5225-5231.
72. Braun-Dullaes RC, Mann MJ, Sedding DG, Sherwood SW, von der Leyen HE, Dzau VJ. Cell cycle-dependent regulation of smooth muscle cell activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:845-850.
73. Schmid C, Heemann U, Azuma H, Tilney NL. Rapamycin inhibits transplant vasculopathy in long-surviving rat heart allografts. *Transplantation*. 1995;60:729-733.
74. Schmidbauer G, Hancock WW, Wasowska B, Badger AM, Kupiec-Weglinski JW. Abrogation by rapamycin of accelerated rejection in sensitized rats by inhibition of alloantibody responses and selective

- suppression of intragraft mononuclear and endothelial cell activation, cytokine production, and cell adhesion. *Transplantation*. 1994;57:933-941.
75. Poston RS, Billingham M, Hoyt EG, Pollard J, Shorthouse R, Morris RE, Robbins RC. Rapamycin reverses chronic graft vascular disease in a novel cardiac allograft model. *Circulation*. 1999;100:67-74.
76. Gregory CR, Pratt RE, Huie P, Shorthouse R, Dzau VJ, Billingham ME, Morris RE. Effects of treatment with cyclosporine, FK 506, rapamycin, mycophenolic acid, or deoxyspergualin on vascular muscle proliferation in vitro and in vivo. *Transplant Proc*. 1993;25:770-771.
77. Burke SE, Lubbers NL, Chen YW, Hsieh GC, Mollison KW, Luly JR, Wegner CD. Neointimal formation after balloon-induced vascular injury in Yucatan minipigs is reduced by oral rapamycin. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;33:829-835.
78. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999;99:2164-2170.
79. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, Klugherz BD, Papandreou G, Narayan P, Leon MB, Yeung AC, Tio F, Tsao PS, Falotico R, Carter AJ. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation*. 2001;104:1188-1193.
80. Fajadet J PM, Hayashi EB, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Bode C, Sousa JE, Morice MC, Serruys PW. 210-day follow-up of the RAVEL study: a randomized study with the sirolimus-eluting Bx velocity balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo native coronary artery lesions. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:20A.
81. Blazar BR, Taylor PA, Snover DC, Sehgal SN, Vallera DA. Murine recipients of fully mismatched donor marrow are protected from lethal graft-versus-host disease by the in vivo administration of rapamycin but develop an autoimmune-like syndrome. *J Immunol*. 1993;151:5726-5741.

82. Chen H, Qi S, Xu D, Wu J, Daloz P. The immunosuppressive effect of rapamycin on mouse small bowel transplantation. *Transplantation*. 1996;61:523-526.
83. Chodera A, Feller K. Some aspects of pharmacokinetic and biotransformation differences in humans and mammal animals. *Int J Clin Pharmacol Biopharm*. 1978;16:357-360.
84. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. *Kidney Int*. 2001;59:3-16.
85. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res*. 2003;93:e17-24.
86. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295:369-377.
87. Ross R. Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol*. 1993;143:987-1002.
88. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
89. Ross R. Genetically modified mice as models of transplant atherosclerosis. *Nat Med*. 1996;2:527-528.
90. Chang MW, Barr E, Seltzer J, Jiang YQ, Nabel GJ, Nabel EG, Parmacek MS, Leiden JM. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science*. 1995;267:518-522.
91. Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*. 1995;96:2260-2268.
92. Chen D, Krasinski K, Sylvester A, Chen J, Nisen PD, Andres V. Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J Clin Invest*. 1997;99:2334-2341.

93. Clausell N, Molossi S, Sett S, Rabinovitch M. In vivo blockade of tumor necrosis factor-alpha in cholesterol-fed rabbits after cardiac transplant inhibits acute coronary artery neointimal formation. *Circulation*. 1994;89:2768-2779.
94. George SJ, Johnson JL, Angelini GD, Newby AC, Baker AH. Adenovirus-mediated gene transfer of the human TIMP-1 gene inhibits smooth muscle cell migration and neointimal formation in human saphenous vein. *Hum Gene Ther*. 1998;9:867-877.
95. George SJ, Angelini GD, Capogrossi MC, Baker AH. Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis. *Gene Ther*. 2001;8:668-676.
96. Izawa A, Suzuki J, Takahashi W, Amano J, Isobe M. Tranilast inhibits cardiac allograft vasculopathy in association with p21(Waf1/Cip1) expression on neointimal cells in murine cardiac transplantation model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1172-1178.
97. Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ, Nabel EG. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science*. 1994;265:781-784.
98. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med*. 1998;4:222-227.
99. Rebsamen MC, Sun J, Norman AW, Liao JK. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 induces vascular smooth muscle cell migration via activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Circ Res*. 2002;91:17-24.
100. Yang ZY, Simari RD, Perkins ND, San H, Gordon D, Nabel GJ, Nabel EG. Role of the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferation in response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:7905-7910.
101. Smith RC, Wills KN, Antelman D, Perlman H, Truong LN, Krasinski K, Walsh K. Adenoviral constructs encoding phosphorylation-competent full-length and truncated forms of the human retinoblastoma protein inhibit myocyte proliferation and neointima formation. *Circulation*. 1997;96:1899-1905.

102. Feldman LJ, Mazighi M, Scheuble A, Deux JF, De Benedetti E, Badier-Commander C, Brambilla E, Henin D, Steg PG, Jacob MP. Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *Circulation*. 2001;103:3117-3122.
103. Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K, Omata M, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:2097-2104.
104. Hayashi S, Watanabe N, Nakazawa K, Suzuki J, Tsushima K, Tamatani T, Sakamoto S, Isobe M. Roles of P-selectin in inflammation, neointimal formation, and vascular remodeling in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. 2000;102:1710-1717.
105. Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, Shioi T, Ono K, Harada A, Matsushima K, Sasayama S. Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemoattractant and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res*. 1999;84:306-314.
106. Zohlhofer D, Richter T, Neumann F, Nuhrenberg T, Wessely R, Brandl R, Murr A, Klein CA, Baeuerle PA. Transcriptome analysis reveals a role of interferon-gamma in human neointima formation. *Mol Cell*. 2001;7:1059-1069.
107. Zohlhofer D, Klein CA, Richter T, Brandl R, Murr A, Nuhrenberg T, Schomig A, Baeuerle PA, Neumann FJ. Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation. *Circulation*. 2001;103:1396-1402.
108. Korbling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med*. 2002;346:738-746.

109. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.
110. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med.* 2003;9:702-712.
111. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10344-10349.
112. McKay R. Stem cells--hype and hope. *Nature.* 2000;406:361-364.
113. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-967.
114. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, Yamahara K, Hirai H, Kobayashi T, Ogawa M, Nishikawa S, Nakao K. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood.* 2003;101:2675-2678.
115. Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature.* 2000;408:92-96.
116. Zalewski A, Shi Y, Johnson AG. Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circ Res.* 2002;91:652-655.
117. Tanaka K, Sata M, Hirata Y, Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res.* 2003;93:783-790.
118. Li S, Fan YS, Chow LH, Van Den Diepstraten C, van Der Veer E, Sims SM, Pickering JG. Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery. *Circ Res.* 2001;89:517-525.

119. Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:249-253.
120. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, O'Connor WN. Intimomedial interface damage and adventitial inflammation is increased beneath disrupted atherosclerosis in the aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation.* 2002;105:2504-2511.
121. Kockx MM, Cromheeke KM, Knaapen MW, Bosmans JM, De Meyer GR, Herman AG, Bult H. Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:440-446.
122. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation.* 1998;98:224-233.
123. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE, Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med.* 2001;7:1035-1040.
124. Sata M, Tanaka K, Ishizaka N, Hirata Y, Nagai R. Absence of p53 leads to accelerated neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1548-1552.
125. Sata M, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, Hirata Y, Nagai R. Acute and chronic smooth muscle cell apoptosis after mechanical vascular injury can occur independently of the Fas-death pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1733-1737.
126. Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, Wang S, Simper D, Miller DV, Russell SJ, Litzow MR, Edwards WD. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:4754-4759.
127. Walsh K, Perlman H. Molecular strategies to inhibit restenosis: modulation of the vascular myocyte phenotype. *Semin Interv Cardiol.* 1996;1:173-179.

128. Miller AM, McPhaden AR, Wadsworth RM, Wainwright CL. Inhibition by leukocyte depletion of neointima formation after balloon angioplasty in a rabbit model of restenosis. *Cardiovasc Res.* 2001;49:838-850.
129. Fattori R, Piva T. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet.* 2003;361:247-249.
130. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med.* 2005;201:63-72.
131. Nuhrenberg TG, Voisard R, Fahlisch F, Rudelius M, Braun J, Gschwend J, Kountides M, Herter T, Baur R, Hombach V, Baeuerle PA, Zohlhofer D. Rapamycin attenuates vascular wall inflammation and progenitor cell promoters after angioplasty. *Faseb J.* 2005;19:246-248.
132. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 2004;109:220-226.
133. Kotani J, Awata M, Nanto S, Uematsu M, Oshima F, Minamiguchi H, Mintz GS, Nagata S. Incomplete neointimal coverage of sirolimus-eluting stents: angioscopic findings. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:2108-2111.
134. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation.* 2005;111:2981-2987.
135. Hausleiter J, Kastrati A, Mehilli J, Vogeser M, Zohlhofer D, Schuhlen H, Goos C, Pache J, Dotzer F, Pogatsa-Murray G, Dirschinger J, Heemann U, Schomig A. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral sirolimus for restenosis prevention in patients with in-stent restenosis: the Oral Sirolimus to Inhibit Recurrent In-stent Stenosis (OSIRIS) trial. *Circulation.* 2004;110:790-795.
136. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher

- AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1690-1699.
137. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-148.
138. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation.* 2003;107:1024-1032.
139. Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De Angelis A, Hosoda T, Bearzi C, Boni A, Bolli R, Kajstura J, Anversa P, Leri A. From the Cover: Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:9226-9231.
140. Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39:733-742.
141. Simper D, Wang S, Deb A, Holmes D, McGregor C, Frantz R, Kushwaha SS, Caplice NM. Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. *Circulation.* 2003;108:143-149.

8 Publikationen

8.1 Veröffentlichungen

Rapamycin Prevents Accumulation of Bone Marrow-Derived Vascular Progenitor Cells Within the Neointima.

Sedding DG, **Brunsch H**, Hess D, Voswinckel R, Braun-Dullaeus RC (eingereicht)

Endothelial Progenitor Cells Transdifferentiate into Smooth Muscle Cells and Contribute to Neointima Formation.

Sedding DG, Hess D, **Brunsch H**, Tillmanns H, Preissner KT, Braun-Dullaeus RC (Manuskript in Vorbereitung)

The G534E polymorphism of the gene encoding the factor VII-activating protease is associated with cardiovascular risk due to increased neointima formation.

Sedding D, Daniel JM, Muhl L, Hersemeyer K, **Brunsch H**, Kemkes-Matthes B, Braun-Dullaeus RC, Tillmanns H, Weimer T, Preissner KT, Kanse SM. J Exp Med. 2006 Dec 25;203(13):2801-7. Epub 2006 Dec 4.

8.2 Abstracts

Rapamycin Prevents Accumulation of Bone Marrow-Derived Vascular Progenitor Cells Within the Neointima.

Sedding DG, **Brunsch H**, Hess D, Voswinckel R, Braun-Dullaeus RC
AHA Scientific Sessions, New Orleans, 7.-11. Nov 2004

Factor VII Activating Protease (FSAP) Sequesters Growth Factors and Inhibits Neointima Formation in Vivo

Sedding DG, **Brunsch H**, Braun-Dullaeus, Preissner KT, Kanse S
AHA Scientific Sessions, New Orleans, 7.-11. Nov 2004

Rapamycin Prevents Accumulation of Bone Marrow-Derived Vascular Smooth Muscle Cells Within the Neointima.

Sedding DG, **Brunsch H**, Hess D, Voswinckel R, Braun-Dullaeus RC
ESC, Munich, September 2004

Rapamycin Hemmt die Akkumulation Glattmuskulärer Progenitorzellen im Neointimagewebe

Brunsch H, Sedding DG, Hess D, Voswinckel R, Braun-Dullaeus RC
DGK Frühjahrstagung, Mannheim, April 2004

9 Lebenslauf

Daten zur Person

Name Hannes Brunsch
Geburtsdatum/ Ort 07.01.1975/ Stuttgart
Familienstand verheiratet
Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulbildung

1981-1983 Waldorfschule Uhlandshöhe, Stuttgart
1983-1984 Alex Anderson School, San Jose, Kalifornien, USA
1984-1991 Waldorfschule Uhlandshöhe, Stuttgart
1991 Schüleraustausch in Dunedin, Neuseeland bei einer Gastfamilie
1991-1994 Waldorfschule Uhlandshöhe, Stuttgart
1994 Abitur

Zivildienst

1994-1995 Ausbildung zum Rettungssanitäter und Erste-Hilfe-Ausbilder,
Tätig im Rettungsdienst in Stuttgart, Frankfurt und auf Amrum.

Berufsausbildung

- 1995 - 1996 WS95/96 – SS96 Studium der technischen Biologie an der Universität Stuttgart
- 1996 WS96/97 Studium der Biologie an der Universität Tübingen
- 1997 - 2004 WS97/98 – SS04 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
- 2000 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
- 2001 erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(1. Staatsexamen)
- 2003 zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(2. Staatsexamen)
- 2003 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Gießen
(Fachbereiche: Anästhesie, Innere Medizin,
Chirurgie)
- 2004 dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(3. Staatsexamen)

Beruflicher Werdegang

- 1997 Tätigkeit als Übersetzer für die Firma Cap Gemini in Birmingham/England
- 2005 Angestellt als Assistenzarzt im Fachbereich Anästhesie und Intensivmedizin am Karl-Olga-Krankenhaus, Stuttgart

10 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of differentiation
Cdk	Cyclin dependent kinase
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fötale Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
ICAM- 1	Intercellular adhesions molecule
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Met	Methionin
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
n	Anzahl
N.	Nervus
nm	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
P	Wahrscheinlichkeit
PTCA	perkutane transluminale Koronarangiographie
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VCAM- 1	Vascular cell adhesions molecule
VSMC	Vascular smooth muscle cells

Erklärung:

„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 oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Rapamycin Prevents Accumulation of Bone Marrow-Derived Vascular Smooth Muscle Cells in the Neointima.

Background: Bone marrow-derived progenitor cells may contribute to the pathogenesis of vascular proliferative diseases and rapamycin (RPM) has been identified as one of the most promising novel agents for prevention of coronary artery in-stent restenosis. We therefore evaluated the role of RPM on accumulation of bone marrow-derived vascular smooth muscle cells (VSMC), inflammatory cells and neointima formation in a mouse model of femoral artery injury.

Methods and Results: Following lethal irradiation (11Gy), bone marrow of "green fluorescent protein" (GFP) transgenic mice was transplanted into background-identical C57/BL6 mice. 6 weeks after bone marrow transplantation left femoral artery dilatation was performed. RPM treatment (3mg/kg/day i.p.) resulted in a significant reduction in neointimal thickening at 28 days compared to saline injected controls (intima/media ratio: 0.31 ± 0.15 vs. 1.01 ± 0.27 , $P < 0.01$). RPM significantly reduced the recruitment of circulating, bone marrow-derived (GFP positive) cells to the neointima in comparison to saline-controls (7.4 ± 7.4 vs $26.2 \pm 13.4\%$ of neointimal cells, $n=6$, $P=0.01$) as quantified by laser scanning microscopy. The relative number of bone marrow-derived VSMC (GFP pos. cells expressing α -smooth muscle actin) within the neointima and media was significantly reduced in the RPM group (7.9 ± 8.0 vs. 30.9 ± 14.4 , $P < 0.01$). As well, RPM significantly prevented neointimal accumulation of monocytes/macrophages (1.6 ± 2.2 vs. $11.6 \pm 5.3\%$, $P < 0.01$). RPM also prevented the expression of the adhesion molecules ICAM and VCAM 14 days after injury. In further in vitro studies, ICAM but not VCAM blocking antibodies significantly prevented adhesion of CD34+ cells to TNF α stimulated HUVECs ($55 \pm 8\%$ vs. $83 \pm 17\%$ of control; $P < 0.05$).

Conclusion: Our findings establish a novel mechanism by which RPM affects neointima formation. Beside attenuating the local inflammatory response, RPM prevents the accumulation and differentiation of putative progenitor cells into VSMC, either known to significantly contribute to the development of vascular proliferative diseases.