

Aus dem Max-Planck Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim

Die Beteiligung des „small leucine-rich“ Proteoglykans Osteoglycin an der Arteriogenese

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
des Naturwissenschaftlichen Fachbereiches der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt im Juli 2004 von
Diplom-Biologe Andreas Kampmann
aus Bielefeld

D26

Dekan:

1. Gutachter

2. Gutachter

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Jürgen Mayer

Prof. Dr. Rainer Renkawitz

Prof. Dr. Wolfgang Schaper

24. August 2004

Zusammenfassung

Der menschliche Organismus ist auf einen ständigen und ungehinderten Fluss des Bluts angewiesen. Wird dieser unterbrochen, kommt es zu ernstesten Erkrankungen wie z. B. Schlaganfällen, Infarkten oder einem Absterben des Gewebes durch Sauerstoffunterversorgung. Diese Erkrankungen des kardiovaskulären Systems gehören zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. Unter günstigen Umständen, d. h. einer langsamen Entwicklung einer Stenose, ist der Körper aber durchaus in der Lage, diese zu kompensieren. Dabei kommt es zu einer Umgestaltung von präexistenten, arteriolären Verbindungen, die in einem positiven „Remodelling“ zu Kollateralarterien reifen. Diese Kollateralen können dann die Aufgabe der verschlossenen Arterie übernehmen. In dieser Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, welche Gene während des Wachstums von Kollateralarterien (Arteriogenese) eine differentielle Expression zeigen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Entwicklung von Kollateralen durch operativen Verschluss der Arteria femoralis induziert (Tiermodell: *Oryctolagus cuniculus*). Aus Kollateralen, die drei Tage, bzw. drei Wochen nach Verschluss der Femoralarterie isoliert wurden, wurde RNA gewonnen und aus dieser durch „Differential Display Polymerase Chain Reaction“ Gene mit differentieller Expression identifiziert. Bei dieser Suche wurde das Gen für das Protein „Osteoglycin“ als an der Arteriogenese beteiligt gefunden. Dieses Protein gehört zur Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane, einer Gruppe von Proteinen, die durch das Auftreten von Sequenzwiederholungen, die reich an Leucin sind, charakterisiert ist. In wachsenden Kollateralen wurde die mRNA für Osteoglycin deutlich vermindert exprimiert. Als Ort der Genexpression wurden die glatten Muskelzellen der Gefäßwand identifiziert, Endothelzellen zeigten keine Expression. Osteoglycin war neben den Blutgefäßen auch noch in weiteren Organen, wie z. B. der Lunge, dem Herz und dem Uterus nachweisbar. Das entsprechende Protein war ebenfalls in den Kollateralen lokalisiert, sowohl in ruhenden als auch in wachsenden und, nach Verschluss der Femoralarterie deutlich vermindert exprimiert. Der Nachweis der verringerten Expression konnte im Western-Blot und auch direkt im Gewebeschnitt mit immunhistochemischen Methoden geführt werden. Die Stimulation von glatten Muskelzellen, die aus der Aorta von *O. cuniculus* isoliert wurden, mit den Wachstumsfaktoren FGF-2 und TGF- β 1, führte ebenfalls zu einer verminderten Expression von Osteoglycin. Eine Beteiligung dieser Faktoren an der Arteriogenese ist aus anderen Untersuchungen bekannt. Untersuchungen an Tieren (*Mus musculus*) denen das Gen für Osteoglycin fehlt zeigten, dass diese ein deutlich schnelleres Kollateralwachstum aufweisen.

Ähnlich den anderen Mitgliedern der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane ist auch Osteoglycin an der Regulation der Biosynthese der Kollagenfasern in der extrazellulären Matrix beteiligt. Hauptaufgabe des Proteins Osteoglycin ist demnach die Regulation der Biosynthese der Kollagenfaser und damit ist es letztendlich ein wichtiger Faktor für die Stabilität der Blutgefäße. Es beeinflusst die mechanischen Eigenschaften der Blutgefäße und damit auch den Ablauf des Kollateralwachstums. Aber Osteoglycin kann auch regulierend auf die Proliferation von glatten Muskelzellen wirken, indem es Bestandteil des Substrats ist, auf und in dem die Zellen liegen, aber auch durch die Beeinflussung der Aktivität von Wachstumsfaktoren.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
1 Einleitung	6
1.1 Angiogenese	6
1.2 Arteriogenese	8
1.2.1 Molekulare Grundlagen des Wachstums von Kollateralen	9
1.2.1.1 Zeitlicher Ablauf der Arteriogenese	9
1.2.1.2 Regulation unabhängig von Hypoxie	9
1.2.1.3 Wandschubspannung als Modulator	9
1.2.1.4 Stimulierende und regulierende Faktoren	12
1.2.1.5 Morphologische Veränderungen	15
1.3 Methoden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen	17
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Tiermodell, Gewinnung des Untersuchungsmaterials	19
2.1.2 Enzyme, Chemikalien, verwendete Kits und Verbrauchsmaterial	20
2.1.3 Oligonukleotide, Bakterienstämme, Plasmide und Antikörper	21
2.1.4 Medien	23
2.1.4.1 <i>E. coli</i> Medien	23
2.1.4.2 Zusätze zu den Medien	23
2.1.5 Puffer und Lösungen	23
2.1.5.1 Elektrophoreselösungen und -puffer	23
2.1.5.2 DNA Puffer und Lösungen	24
2.1.5.3 RNA Puffer und Lösungen	25
2.1.5.4 Lösungen und Puffer für die Hybridisierung	25
2.1.5.5 Protein Puffer und Lösungen	25
2.1.5.6 Lösungen und Puffer für die Zellkultur	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Isolierung, Reinigung und Darstellung von DNA	26
2.2.1.1 Isolation von Plasmid-DNA	26
2.2.1.2 Reinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion	27
2.2.1.3 Konzentrierung von DNA durch Ethanol-Fällung	27
2.2.1.4 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	27
2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.2.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA	28

2.2.3	Isolierung, Reinigung und Darstellung von RNA	28
2.2.3.1	Isolierung von RNA	28
2.2.3.2	RNA-Isolation aus Zell-Kulturen	29
2.2.3.3	DNase-Behandlung von RNA	29
2.2.3.4	Formaldehyd Agarose-Gelelektrophorese	30
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
2.2.5	Identifizierung differentiell exprimierter Gene: DDRT-PCR	30
2.2.6	Erster Nachweis einer differentiellen Expression: Slot-Blot	33
2.2.7	Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen durch Hybridisierung	34
2.2.7.1	Northern Blot	34
2.2.7.2	Markierung von DNA-Sonden	34
2.2.7.3	Markierung von Oligonukleotiden	34
2.2.7.4	Northern Hybridisierung	35
2.2.7.5	Auswertung der Hybridisierungen	35
2.2.8	<i>In situ</i> Hybridisierung	35
2.2.9	5'-RACE-PCR	35
2.2.10	Isolierung, Reinigung und Darstellung von Proteinen	36
2.2.10.1	Isolierung von Proteinen	36
2.2.10.2	Deglykosylierung von Proteinen	36
2.2.10.3	Auftrennung von Proteinen, PAGE	36
2.2.10.4	Generierung eines Osteoglycin-Antikörpers	37
2.2.10.5	Nachweis von Proteinen durch Western Blot	37
2.2.10.6	Immunhistochemische Lokalisation von Osteoglycin im Gewebe	38
2.2.11	Zellkultur	38
2.2.11.1	Gewinnung von Primärkulturen	38
2.2.11.2	Passagieren von Zellen	39
2.2.11.3	Charakterisierung von Zellen	39
2.2.11.4	Lagerung von Zellen	40
2.2.11.5	MTT-Assay	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Isolierung von differentiell exprimierten Klonen mit Hilfe der DDRT-PCR	41
3.2	Überprüfung der differentiellen Expression	44
3.3	Analyse des Klons AK74F3	47
3.3.1	Differentielle Osteoglycin-Expression während der Embryogenese	50
3.3.2	Lokalisation der Osteoglycin mRNA im untersuchten Gewebe	52
3.4	Die differentielle Expression des Proteins Osteoglycin	53
3.4.1	Immunologische Lokalisation	56
3.4.2	Osteoglycin ist ein Glykoprotein	56
3.5	Untersuchungen an kultivierten glatten Muskelzellen	60
3.5.1	Welche Hinweise zur Regulation gibt es?	60
3.5.2	Hat die Inhibierung von Osteoglycin einen Einfluss auf die Zellen?	63
3.5.3	Ohne Osteoglycin verläuft die Arteriogenese schneller	68

4	Diskussion	70
4.1	Nur zwei Klone zeigten signifikante Unterschiede in der Expression	71
4.2	Der Klon AK74b2/F3 ist ein Proteoglykan	72
4.3	Verteilung und Expression der Osteoglycin mRNA	74
4.4	Verteilung und Expression des Proteins Osteoglycin	76
4.5	Osteoglycin ist ein Marker für differenzierte glatte Muskelzellen	78
4.6	Welche Faktoren beeinflussen die Expression von Osteoglycin?	79
4.7	Ein Vergleich mit anderen „small leucine-rich“ Proteoglykanen	85
4.8	Osteoglycin reguliert die Bildung von Kollagenfasern	86
4.9	Beeinflusst Osteoglycin die Wirkung von Wachstumsfaktoren?	87
4.10	Osteoglycin und wachsende Kollateralen: Aktion oder Reaktion?	89
4.11	Untersuchungen an Osteoglycin ^{-/-} Tieren	89
4.12	Ausblick	91
5	Anhang	93
5.1	Nukleotidsequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Klone	93
5.2	Aminosäure-Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Klone	95
5.3	Aufstellung der mittels DDRT-PCR isolierten Klone	95
5.4	Abkürzungsverzeichnis	101

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Angiogenese	7
1.2	Schematische Darstellung einer Kollateralen	10
1.3	Angiographie Kontrolle und drei Wochen nach Okklusion	11
1.4	Beispiel eines Differential Display Gels	17
3.1	Hybridisierung mit den Klonen Ak35b1 und AK115b	43
3.2	Expressionswerte der verschiedenen DDRT-PCR-Klone	44
3.3	Hybridisierung mit dem Klon AK19a1	45
3.4	Hybridisierung mit dem Klon AK74b2	46
3.5	Hybridisierung mit dem Klon AK74F3	46
3.6	Sekundärstruktur des Proteins Osteoglycin	48
3.7	Hybridisierung mit dem Klon AK74F3, 7 Tage Okklusion	49
3.8	Organblot hybridisiert mit dem Klon AK74F3	50
3.9	Hybridisierung MTE mit dem Klon AK74F3	51
3.10	Osteoglycin-Expression in der Mausembryogenese	52
3.11	In Situ Hybridisierung mit dem Klon AK74F3	53
3.12	Western-Blot mit dem Antikörper AK460	54
3.13	Western-Blot mit dem Antikörper AK460, 4 Wochen	55
3.14	Lokalisation des Proteins Osteoglycin	57
3.15	Western-Blot, deglykosyliert	58
3.16	Western-Blot Osteoglycin, Anzahl der Seitenketten	59
3.17	Charakterisierung von Zellen	61
3.18	Northern-Blot, stimulierte Zellen	62
3.19	Aufnahme der antisense Oligonukleotide	64
3.20	Auswirkung der antisense Oligonukleotide	66
3.21	Wachstumsassay, antisense Oligonukleotide	67
3.22	Analyse der Osteoglycin ^{-/-} Tiere	69

1 Einleitung

Ein ständiger und ausreichender Blutfluss ist eine absolute Notwendigkeit, um eine normale Funktion der Organe sicher zustellen. Werden aktuelle Statistiken zur Todesursache betrachtet, stellt man fest, dass zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt Erkrankungen des kardiovaskulären Systems gehören (WHO 1999). Hierbei handelt es meistens um Erkrankungen, die durch den Verschluss eines größeren oder eines peripheren Gefäßes hervorgerufen werden. Ursache hierfür ist z. B. ein Verschluss aufgrund von Atherosklerose. Allerdings ist nicht jeder Verschluss eines Blutgefäßes notwendigerweise mit einer klinische Symptomatik verbunden. Ist die Geschwindigkeit, mit der sich der Verschluss entwickelt langsam genug, gelingt es dem Körper unter günstigen Umständen das verschlossene Gefäß zu kompensieren. Das hierbei auftretende Wachstum von Blutgefäßen im adulten Organismus lässt sich in zwei verschiedene Typen unterteilen: Angiogenese und Arteriogenese. Die Entstehung des Gefäßsystems während der Ontogenese ausgehend von Angioblasten wird als Vaskulogenese bezeichnet. Da diese Arbeit die Untersuchung von Wachstumsprozessen des Gefäßsystems im adulten Organismus zum Ziel hat, werden im weiteren nur die Abläufe bei der Angiogenese und der Arteriogenese betrachtet.

1.1 Angiogenese

Angiogenese ist definiert als die Bildung von neuen Kapillaren ausgehend von schon bestehenden (siehe Abbildung 1.1) (Risau 1997). Angiogenese ist ein wichtiger Prozess, der u. a. bei der Wundheilung, der Schwangerschaft und der embryonalen Entwicklung auftritt. Diese physiologische Form der Angiogenese ist in ihrem Ablauf genau reguliert. Im Gegensatz dazu ist die pathologische Form der Angiogenese mit Geschehnissen wie dem Wachstum eines Tumors oder der diabetischen Retinopathie verbunden. Der hauptsächliche Auslöser hierbei ist die Hypoxie eines Bereiches im Gewebe. Hauptakteure während der Angiogenese sind die verschiedenen VEGF-Formen¹. In einem Gebiet das eine Sauerstoffunterversorgung aufweist, wird die Bildung von VEGF durch HIF-1 α induziert. HIF-1 α selber wird durch eine Hypoxie des Gewebes aufreguliert. Der VEGF Anstieg führt zu einer erhöhten Permeabilität der angrenzenden Kapillaren, hervorgerufen durch Veränderungen in der Struktur der Zellmembran und einer geänderten Verteilung von Adhensionsmolekülen (Wahlberg 2003). Ermöglicht wird so das Ausströmen von Proteinen des Blutplasmas in die unmittelbare Umgebung der Kapillare und damit die Anlage eines provisorischen Gerüsts für die wandernden Endothelzellen. Die entstehende Permeabilität bedarf aber einer genauen Kontrolle, um negative Auswirkungen wie z. B. die Bildung von Ödemen zu verhindern. Ein natürlicher Regulator der Permeabilität ist Ang1, ein Faktor der bestehende Gefäße festigt ohne deren Morphologie zu verändern. Der Faktor Ang2 hat eine entgegengesetzte Wirkung, indem er zu einer Destabilisierung der Gefäße führt. Zusammen mit weiteren Faktoren und Proteinen wie z. B. Plasminogen Aktivator oder MMPs kommt es zu einem Abbau der die Zellen umgebenden Matrix und einem Freisetzen von Wachstumsfaktoren.

¹Ein Aufstellung der verwendeten Abkürzungen und die entsprechende Erklärung ist im Anhang ab Seite 100 zu finden.

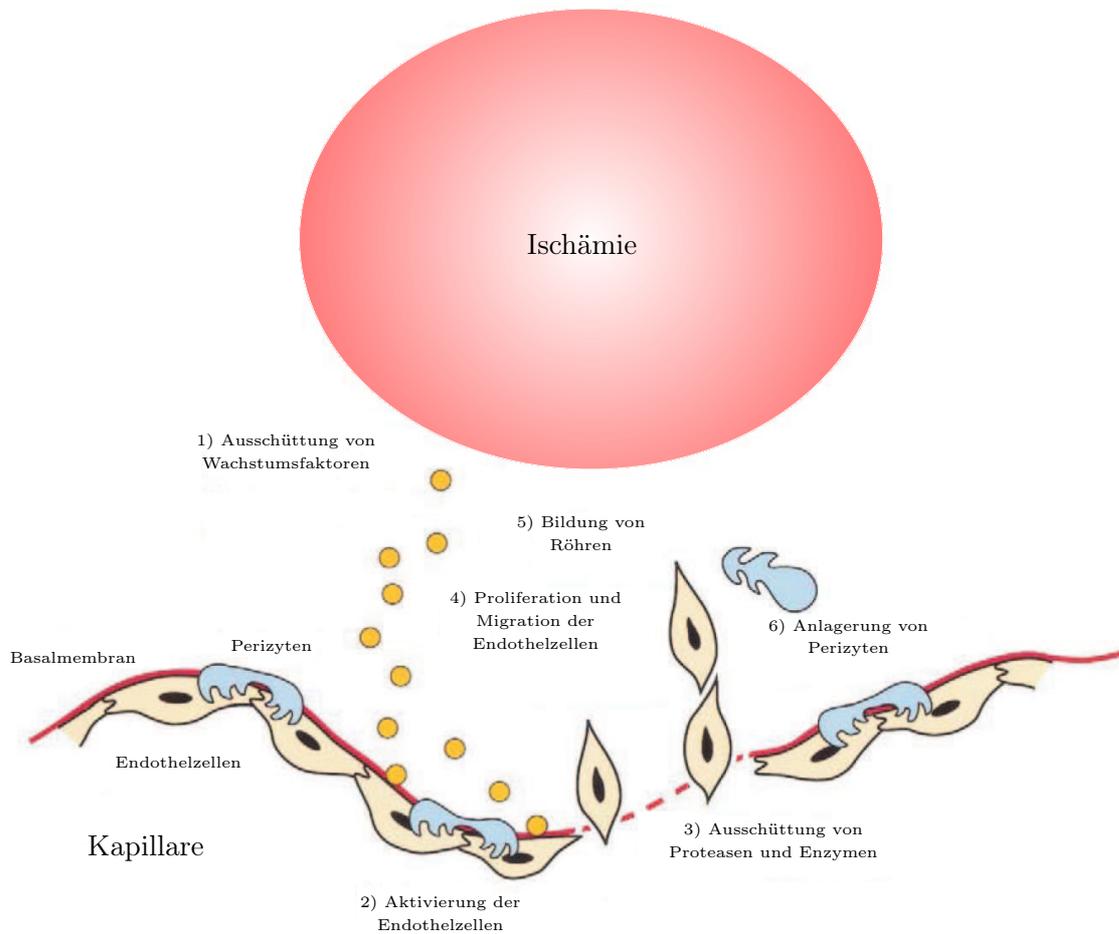


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Angiogenese. Ausgehend von einer bereits bestehenden Kapillare wird ein ischämischer Bereich im Gewebe durch neu sprossende Kapillaren versorgt. Der auslösende Reiz sind verschiedene Wachstumsfaktoren, die von den Zellen im ischämischen Areal ausgeschüttet werden. Diese Faktoren aktivieren die Endothelzellen angrenzender Kapillaren. Nach einer Auflockerung der extrazellulären Matrix beginnen die Endothelzellen zu proliferieren und migrieren. Die wandernden Endothelzellen können sich im weiteren zu neuen Kapillaren zusammenlagern (nach Wahlberg (2003), verändert).

ren. Hierdurch wird die Migration und Proliferation der Endothelzellen ermöglicht (Carmeliet 2000). Die wandernden Endothelzellen lagern sich unter dem Einfluss von verschiedenen Faktoren (VEGF-Isoformen, Angiopoetin, Integrine) zu Strängen zusammen, die anschließend ein Lumen ausbilden. Die so neu gebildeten Kapillaren werden durch verstärkte Produktion der extrazellulären Matrix und die Anlagerung von Perizyten stabilisiert, ein Prozess, der unter der Kontrolle von Wachstumsfaktoren wie TGF- β und PDGF steht.

1.2 Arteriogenese

Der Begriff Arteriogenese (Schaper u. a. 1999) beschreibt das Wachstum von präexistenten, arteriolen Anastomosen, ein Prozess, der sich in mehreren Punkten von der Angiogenese unterscheidet. Im Gegensatz zur Angiogenese, kommt es bei der Arteriogenese zum Wachstum von schon vorhandenen Arteriolen. Die Existenz von arteriolen Anastomosen, die verschiedene Arterien verbinden, ist eine morphologische Gegebenheit, die schon sehr früh erkannt wurde. Bereits 1669 veröffentlichte Richard Lower hierzu erste Beobachtungen am Gefäßsystem des Herzens. Das Vorhandensein dieser Verbindungen zwischen verschiedenen Arterien wurde im weiteren von verschiedenen Autoren für unterschiedliche Areale des gesamten Gefäßsystems gezeigt und die Wandlungsfähigkeit dieser Verbindungen mit experimentellen Befunden veranschaulicht. Eine Übersicht über die historische Entwicklung der Forschung ist bei Helisch und Schaper (2003) zu finden. Diese präexistenten Verbindungen, die als Kollateralarterien, bzw. Kollateralen bezeichnet werden, haben das Potential, ihren Durchmesser in einem aktiven Wachstumsprozess dramatisch zu vergrößern (Schaper u. a. 1999). Diese Zunahme des Durchmessers kann eine größere Arterie nach deren Verschluss kompensieren und somit einen natürlichen Bypass um eine Okklusionsstelle bilden. Allerdings ist der Grad, in dem diese Kollateralen vorliegen, von Spezies zu Spezies verschieden und innerhalb einer Art auch vom untersuchten Organ abhängig. So zeigen Untersuchungen an *Cavia porcellus*, das dieses den Verschluss der linken Koronararterie ohne Anzeichen eines Infarkts toleriert, da die Kollateralen so weit ausgebildet sind, das sie den Verschluss vollständig kompensieren. In anderen Arten wird der Verschluss einer Koronararterie in unterschiedlichen Maße toleriert. Ein Maß hierfür ist die verbleibende myokardiale Perfusion nach Verschluss der Koronararterie. Für *Canis familiaris* wurde diese von Maxwell u. a. (1987) mit 15,9% der Perfusion vor Verschluss bestimmt. Bei *Rattus norvegicus* ergab sich ein Wert von 6,1%, beim Kaninchen ein Wert von 2%, mit nur 0,6% des Ausgangswertes war die verbleibende Perfusion beim Schwein am geringsten. Die restliche Perfusion hat auch direkte Auswirkungen auf die Geschwindigkeit mit der sich ein Infarkt entwickelt und welche Größe dieser erreichen kann (Schaper u. a. 1999). Morphologische Untersuchungen der Koronargefäße zeigen, dass das Kaninchen und das Schwein anatomische Endarterien ohne arteriolen Verbindungen haben, wohingegen im Herz von *C. familiaris* ein Netzwerk von präexistenten Kollateralen nachweisbar ist (Schaper 1984). Dies ist die morphologische Grundlage der physiologischen Daten. Neben diesen Untersuchungen zur Entwicklung von Kollateralen am Herz, wurden auch die Auswirkungen des Verschlusses peripherer Gefäße, insbesondere der A. femoralis analysiert. Untersuchungen an *O. cuniculus* (Longland 1953; Ito u. a. 1997b; Arras u. a. 1998), an *C. familiaris* (Conrad u. a. 1971) und *R. norvegicus* (Yang u. a. 1996; Herzog u. a. 2002) zeigten, dass der Verlauf des Kollateralwachstums in der peripheren Zirkulation vergleichbar zum Verlauf im Herz ist.

1.2.1 Molekulare Grundlagen des Wachstums von Kollateralen

1.2.1.1 Zeitlicher Ablauf der Arteriogenese

Die Entwicklung von Kollateralen lässt sich in vier Abschnitte einteilen. Eine initiale Phase, die sofort nach Einsetzen der Okklusion beginnt und durch die Aktivierung des Endothels gekennzeichnet ist. Später ist in dieser Anfangsphase die Induktion von Adhensionsmolekülen und die Anlagerung von Monozyten nachweisbar. Die zweite Phase ist durch eine erhöhte Proliferation der Zellen gekennzeichnet. Daran schließt sich eine Wachstumsphase an, in der die größte Zunahme des Durchmessers zu beobachten ist und die durch eine verstärkte synthetische Aktivität der Zellen gekennzeichnet ist. Während der abschließenden, vierten Phase kommt es zur Reifung des wachsenden Gefäß mit der Ausprägung der typischen Merkmale einer funktionalen Arterie. Das Wachstum von Kollateralen ist ein komplexer Vorgang, der unter Beteiligung aller Zelltypen, die in den Kollateralen vorkommen (hauptsächlich Endothelzellen und glatte Muskelzellen), des umgebenden Gewebes, zirkulierenden Zellen und weiteren Faktoren abläuft. Es handelt sich um einen aktiven Wachstumsprozess, der durch die Mitose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen gekennzeichnet ist (Schaper u. a. 1971). Lange Zeit waren die Untersuchungen zum Wachstum von Kollateralen reine morphologische Arbeiten, die die Entwicklung der Kollateralen mit Hilfe von Angiogrammen (Longland 1953) oder Korrosionspräparaten (Conrad u. a. 1971) verfolgten. Erste detaillierte Studien zu den molekularen Vorgängen während der Arteriogenese begannen in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts.

1.2.1.2 Regulation unabhängig von Hypoxie

Die erste Phase des Kollateralwachstums besteht in der Aktivierung des Endothels der Kollateralen und beginnt kurz nach dem Verschluss einer größeren Arterie. Im Gegensatz zur Angiogenese ist eine Regulation der molekularen Vorgänge durch Hypoxie, also einer Sauerstoff-Unterversorgung des umgebenden Gewebes, nicht vorhanden. Da die Kollaterale ständig von sauerstoffhaltigem Blut durchflossen wird, ist dies auch schwer vorstellbar. Darüberhinaus ist, insbesondere bei Betrachtung der Modelle mit Okklusion der Femoralarterie, festzustellen, dass die Gebiete in denen Kollateralen wachsen und jenen mit Sprossung von Kapillaren räumlich deutlich von einander getrennt sind. Beim Kaninchenmodell mit Okklusion der Femoralarterie findet das Wachstum von Kollateralen im Bereich der Okklusionsstelle statt, also im Oberschenkel, Kapillaren wachsen dagegen ausschließlich im Unterschenkel (Ito u. a. 1997a). In den entsprechenden Muskeln im Oberschenkel wurde in der genannten Studie keine Abnahme der Perfusion in Ruhe festgestellt. In anderen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Energiehaushalt im Oberschenkel unverändert ist. Es wurden keine Änderungen im Gehalt an Lactat, Kreatinphosphat, Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat und Adenosinmonophosphat gefunden. Das durch Hypoxie regulierte Protein HIF-1 α wurde ebenfalls nicht verstärkt gebildet (Deindl u. a. 2001a). Das Gewicht der Muskeln war nach Okklusion der Femoralarterie unverändert zum Gewicht der Muskeln in Kontrolltieren ohne Okklusion.

1.2.1.3 Wandschubspannung als Modulator

Als hauptsächlicher Stimulus des Kollateralwachstums wird eine mechanische Komponente angenommen. Vor dem Verschluss einer größeren Arterie ist kein Blutfluss durch die präexistente

Kollaterale zu beobachten. Durch den Verschluss der Arterie fällt der Blutdruck in den distalen Arealen stark ab; dies führt zu einer Änderung des Druckgradienten entlang der Kollateralen. Als Resultat dieses Gradienten kommt es zum Aufbau eines gerichteten Flusses und der gesamte Blutstrom wird durch die präexistenten Kollateralen geleitet, wie in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt ist. Die dadurch erhöhte Fließgeschwindigkeit des Bluts in den Kollateralen

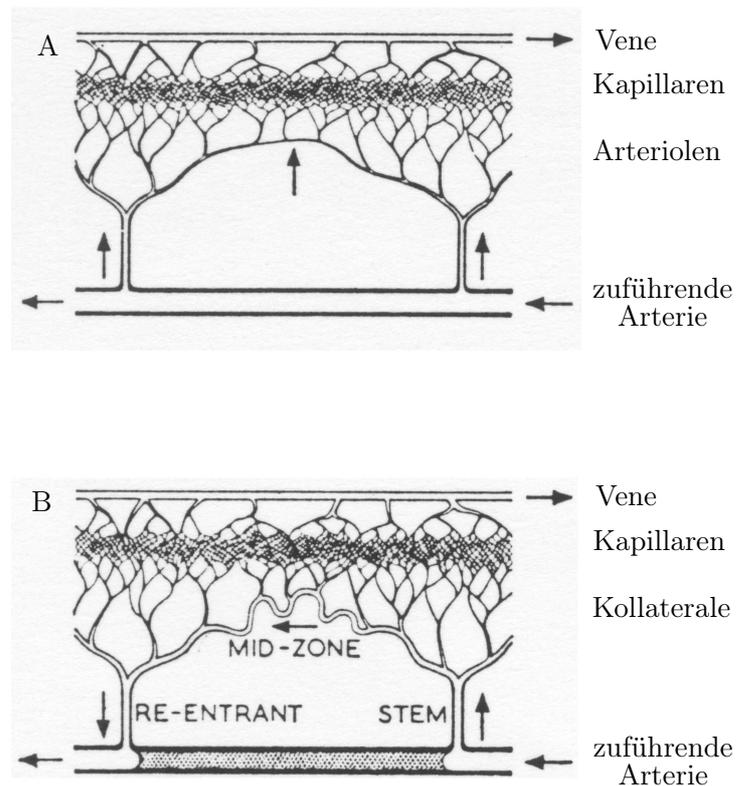


Abb. 1.2: Schematische Darstellung einer Kollateralen. Vor der Entwicklung einer hämodynamisch relevanten Stenose ist der Verlauf des Blutflusses direkt von der Arterie zur Vene, es ist daher kein Fluss entlang der präexistenten Kollaterale nachweisbar (A). Nach Okklusion der Arterie ändert sich diese Situation dramatisch (B): der gesamte Blutfluss läuft nun durch die Kollaterale, die als Antwort darauf einem Umgestaltungsprozess unterworfen wird. Dabei kommt es zu einer Umkehrung des Flusses im Bereich des Endteiles der wachsenden Kollateralen. Am Ende dieses Umbaus kann die Kollaterale die Arterie nahezu vollständig kompensieren. Dargestellt ist außerdem die Einteilung der Kollaterale in einen Anfangsteil (Stem), einen Endteil (Re-Entrant) und einen Mittelteil (Mid-Zone). Die Mid-Zone ist der Bereich des stärksten Wachstums, daher bildet sich in diesem Bereich auch die typische gewundene, an einen Korkenzieher erinnernde Form aus, die als visuelles Erkennungsmerkmal für Kollateralen dienen kann. (Nach Longland (1953), verändert)

führt zu einer erhöhten Wandschubspannung. Dieser mechanische Reiz ist der hauptsächliche Auslöser der anschließend ablaufenden Umgestaltungsprozesse, die zu einer Veränderung und Umgestaltung des betroffenen Gefäßes von innen nach außen führen. Das Ergebnis ist ein nahezu vollständiger Ersatz der verschlossenen Arterie, der sich morphologisch in einer deutlichen Vergrößerung der Kollateralen zeigt (Abbildung 1.3).

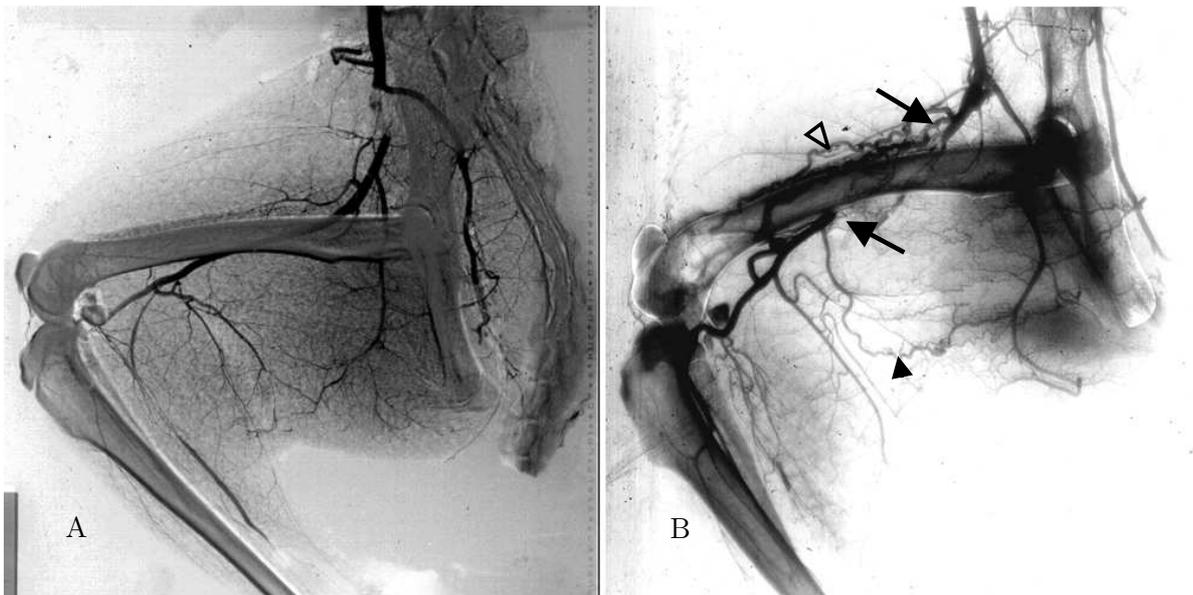


Abb. 1.3: Angiogramm Kontrolle und drei Wochen nach Okklusion. Das abgebildete Angiogramm zeigt Aufnahmen von Hinterbeinen von *O. cuniculus*. In der Kontrolle (A) ist die normale Lage der Blutgefäße zu sehen, die Femoralarterie leitet den größten Teil des Blutflusses. Es sind keine Kollateralen zu erkennen. Drei Wochen nach Okklusion der Femoralarterie (B) ist ein völlig anderes Bild zu beobachten. Durch die Okklusion der Femoralarterie (der proximale und distale Stumpf der A. femoralis sind durch Pfeile markiert) wird der Blutfluss verstärkt durch die Kollateralen geleitet. Durch die so entstehende Vergrößerung der Wandschubspannung beginnt ein Umgestaltungsprozess, der zu einer Vergrößerung der Kollateralen führt. Dies resultiert in einer Kompensation der verschlossenen Arterie. Die Kollateralen sind eindeutig durch ihr Erscheinungsbild erkennbar: aufgrund der Zunahme im Durchmesser und der Länge erschienen sie in kornenzieherartigen Windungen. Neben der direkten Überbrückung der Okklusion der Femoralarterie (offener Pfeil) kommt es auch zu Verbindungen zwischen der A. femoralis und der A. poplitea (geschlossener Pfeil), diese Kollateralen haben allerdings einen geringeren Durchmesser. Diese Beobachtung ist durch die Unterschiede im Blutfluss und in der resultierenden Wandschubspannung zu erklären.

1.2.1.4 Stimulierende und regulierende Faktoren

Die chronische Erhöhung der Wandschubspannung führt zu einer morphologisch sichtbaren Aktivierung des Endothels: die Zellen schwellen an. Als mögliche Ursache kommt hier ein verändertes Öffnungsverhalten von Chloridkanälen der Zellen (Nilius u. a. 1996) in Betracht. Unterstützung findet diese Hypothese durch die Beobachtung, dass Inhibitoren dieser Kanäle zu einer Verhinderung des Wachstums von Kollateralen führen (Ziegelhoeffer u. a. 2002). Die genaue Natur des Mechanosensors, der die erhöhte Wandschubspannung detektiert, ist nicht bekannt. An kultivierten Endothelzellen kann beobachtet werden, dass es unter dem Einfluss der erhöhten Wandschubspannung zu einer vorübergehenden Phosphorylierung von Proteinen kommt. Es handelt sich dabei um Proteine, die an den Kontakten zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix beteiligt sind („focal adhesion contacts“) und Proteinen, die an den Zell-Zellkontakten beteiligt sind (Scholz u. a. 2000). Diese Proteine können als Sensoren für den mechanischen Reiz dienen, da sie durch die Deformation der Zellen direkt beeinflusst werden. Die Stimulation der Endothelzellen führt zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. „*egr-1*“, dessen verstärkte Expression während der ersten 12 Stunden nach Beginn des Wachstums der Kollateralen nachgewiesen werden konnte (Deindl u. a. 2001b). Eine weitere Folge der Aktivierung der Endothelzellen ist die erhöhte Expression der Adhensionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 (Scholz u. a. 2000), die auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen werden konnte. MCP-1 ist ein weiterer Faktor für den eine Regulation durch erhöhte Wandschubspannung gezeigt wurde (Shyy u. a. 1995). Diese Einflüsse und Veränderungen führen dazu, dass das Endothel eine vergrößerte, raue Oberfläche zeigt, an die sich Monozyten anlagern. Dies konnte sowohl in wachsenden koronaren Kollateralen (Tiermodell: *C. familiaris* (Schaper u. a. 1976)), als auch in wachsenden Kollateralen nach Verschluss der Femoralarterie in verschiedenen Tiermodellen (*O. cuniculus* (Arras u. a. 1998), *M. musculus* (Scholz u. a. 2001)) nachgewiesen werden. Die angelagerten Monozyten wandern anschließend in die Kollaterale ein und setzen im Gewebe verschiedene Faktoren frei, die die Proliferation der glatten Muskelzellen stimulieren und andere Umgestaltungsprozesse anregen. Die in das Gefäß eingewanderten Monozyten enthalten hauptsächlich FGF-2 und TNF- α (Arras u. a. 1998), diese beiden Faktoren sind außer in den Monozyten in keiner anderen Zelle oder Struktur der wachsenden Kollateralen nachweisbar. Die entscheidende Rolle dieser beiden Faktoren für das Wachstum von Kollateralen konnte in mehreren Studien dargelegt werden. Die Infusion von FGF-2 führt zu einer deutlichen Steigerung der Kollateralentwicklung, gemessen durch eine Steigerung des Blutflusses nach Gabe von FGF-2 (Unger u. a. 1994; Yang u. a. 1996; Lazarous u. a. 1995). Allerdings war dieser Effekt nicht beliebig verlängerbar, nach einer Zeit von circa zwei Wochen kommt es zu keiner weiteren Steigerung des Blutflusses (Yang u. a. 1996). Erklärbar ist dies dadurch, dass zu diesem Zeitpunkt die normale Entwicklung der Kollateralen abgeschlossen war und eine weitere Gabe von FGF-2 ohne Erfolg blieb. Eine direkte Erhöhung der Expression von FGF-2 während des Wachstums von Kollateralen war nicht nachweisbar. Der stimulierende Einfluss von FGF-2 muss damit erklärt werden, dass der hochaffine Rezeptor FGFR-1 in einem engen Zeitfenster während der anfänglichen Schritte des Kollateralwachstums in seiner Expression erhöht war (Deindl u. a. 2003). Dies ist auch eine weitere Erklärung, warum längere Behandlung mit FGF-2 keine Verbesserung des kollateralen Blutflusses ergibt. Im natürlichen, nicht experimentell beeinflusstem Geschehen sind die Monozyten die Quelle für FGF-2. Diese liefern den Wachstumsfaktor direkt an den Wirkungsort (glatte Muskelzellen), während die Zellen den entsprechenden Rezeptor verstärkt

exprimieren.

Eine weitere Hinweis auf die tragende Rolle, welche die Monozyten im Rahmen des Kollateralwachstums spielen, ist die Tatsache, dass dieses durch die Gabe von MCP-1 deutlich gesteigert werden kann. MCP-1 fungiert als „Lockmittel“ für zirkulierende Monozyten, was dazu führt, dass die Anzahl der Monozyten die sich an das aktivierte Endothel anlagern, deutlich erhöht wird. In einer experimentellen Studie führte die Gabe von MCP-1 zu einer Erhöhung der Konduktanz² der Kollateralen. Die Gabe von MCP-1 über einen Zeitraum von sieben Tagen verdreifachte den Fluss verglichen mit der nicht stimulierten Kontrolle, auch die Anzahl der Kollateralen war erhöht (Ito u. a. 1997b). Genau wie für FGF-2 besteht auch für MCP-1 ein enges Zeitfenster, in dem der Faktor wirkt. Setzt die Behandlung mit MCP-1 erst drei Wochen nach Verschluss der Femoralarterie ein, kommt es zu keiner Verbesserung des Konduktanz verglichen mit der Kontrolle (Hoefler u. a. 2001). Durch die Gabe von MCP-1 kann also der maximal erreichbare Blutfluss durch die Kollateralen nicht erhöht werden, jedoch wird dieser wesentlich früher erreicht, da die Vorgänge insgesamt schneller ablaufen. Zusätzliche Unterstützung erhält die Hypothese, dass Monozyten eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Kollateralen haben, durch die Beobachtung, dass der Faktor GM-CSF ebenfalls die Arteriogenese anregt. Dieser Faktor erhöht die Überlebenswahrscheinlichkeit von Monozyten, die aus dem Blut in die Gefäßwand eingewandert sind, indem die Rate der Apoptose gesenkt wird. Im Modell der Okklusion der Femoralarterie (*O. cuniculus*) führte die Gabe von GM-CSF über eine Woche hinweg zu einer Erhöhung der Konduktanz, dieser Effekt war mit dem für MCP-1 beobachteten vergleichbar. Wurden beiden Faktoren in Kombination gegeben, verstärkten sich ihre Effekte, so dass nach sieben Tagen Behandlung die Konduktanz ungefähr auf die Hälfte des Wertes vor Okklusion angestiegen war (Buschmann u. a. 2001). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Faktoren war bei dieser Kombinationstherapie auch zu einem späteren Zeitpunkt noch ein Effekt zu erzielen. Wurde die Behandlung mit MCP-1 und GM-CSF drei Wochen nach Verschluss der Femoralarterie durchgeführt (Behandlungsdauer: sieben Tage), so stieg der Blutfluss durch die Kollateralen auf circa 80% des Wertes ohne Okklusion. Wurde keine Behandlung durchgeführt oder beide Faktoren einzeln gegeben, war nach vier Wochen nur circa 50% der ursprünglichen Konduktanz erreicht.

Wurde die Anlagerung der Monozyten an das aktivierte Endothel verhindert, trat der entgegengesetzte Effekt ein: eine verminderte Arteriogenese. Experimentell konnte dies mit Antikörpern, die gegen ICAM-1 gerichtet waren und die Bindung von Monozyten an das Molekül verhinderten, erzielt werden. Da sich die Monozyten nicht mehr an das Endothel anlagern konnten, wurde der positive Effekt einer MCP-1 Behandlung vollständig verhindert (Buschmann u. a. 1999). Ein entsprechender Effekt wurde bei gentechnisch veränderten Mäusen, deren Gen für den „CC-Chemokine-Rezeptor-2“ inaktiv war (*CCR2^{-/-}*) beobachtet. CCR2 ist der hauptsächliche Rezeptor der Monozyten für MCP-1. Ist dieser Rezeptor nicht mehr vorhanden, können Monozyten nicht mehr auf MCP-1 reagieren. Dies resultiert in einer deutlichen Reduktion des Kollateralwachstums (Heil u. a. 2002a).

Nicht nur die Rate, mit der die Anlagerung der Monozyten an das aktivierte Endothel erfolgt und deren anschließende Apoptoserate im Gewebe, sondern auch die Anzahl zirkulierender

²Die Konduktanz eines Gefäßsystems ist eine experimentell bestimmbare Größe, die eine Aussage über die Blutmenge die maximal fließen kann zulässt. Angegeben wird die Menge an Blut, die bei einem gegebenen Druck pro Zeiteinheit durch das Gefäßsystem strömt. Gemessen wird im allgemeinen bei maximaler Vasodilatation und verschiedenen Drücken.

Monozyten hat einen Einfluss auf die Entwicklung von Kollateralen. Wurde die Anzahl der zirkulierenden Monozyten experimentell durch Gabe von 5-Fluorouracil reduziert, sank die Geschwindigkeit der Arteriogenese (Tiermodell: *M. musculus*). Dieser Effekt war nicht auf die pharmakologische Behandlung zurückzuführen, da nach der Transplantation von Monozyten ein normaler Verlauf der Arteriogenese eintrat (Heil u. a. 2002b). Umgekehrt führte eine Erhöhung der Monozytenkonzentration im Blut der untersuchten Tiere (Tiermodelle: *M. musculus* und *O. cuniculus*) zu einer deutlichen Verstärkung des Kollateralwachstums und damit zu einer schnelleren Verbesserung des Blutflusses nach Ligation der Femoralarterie.

Ebenfalls von Monozyten wird der Faktor TNF- α bereitgestellt, der auch in Monozyten in wachsenden Kollateralen nachgewiesen werden konnte (Arras u. a. 1998). Von Mackay u. a. (1993) und Neumann u. a. (1996) wurde gezeigt, dass Gabe von TNF- α zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen führt. Dies kann durch eine erhöhte Anzahl an Monozyten, die sich an das Endothel anlagern, zu einer positiven Rückkopplung führen. In einem Modell der Arteriogenese (Okklusion der Femoralarterie, *M. musculus*) konnte gezeigt werden, dass TNF- α auf das Wachstum von Kollateralen wirkt. In Tieren, deren Gen für TNF- α ausgeschaltet worden war (TNF- $\alpha^{-/-}$), war nach sieben Tagen Kollateralwachstum eine deutlich geringere Konduktanz, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit intaktem Gen für TNF- α , feststellbar. Der hieran beteiligte Rezeptor ist der TNF- α -Rezeptor p55. Tiere, denen dieser Rezeptor fehlte (p55 $^{-/-}$) zeigten ebenfalls eine geringere Konduktanz, die mit der der TNF- $\alpha^{-/-}$ -Tiere vergleichbar war (Hoefer u. a. 2002).

Der Faktor TGF- β 1 hat, wie von van Royen u. a. (2002) nachgewiesen wurde, ebenfalls regulative Funktionen beim Wachstum von Kollateralarterien. Die aktive Form (Homodimer, 25 kDa) dieses Faktors wurde in erhöhter Konzentration assoziiert mit wachsenden Kollateralen gefunden. Wurden Versuchstiere (Kaninchen) mit TGF- β 1 in Form einer direkten lokalen Infusion in den kollateralen Blutfluss für sieben Tage behandelt, kam es zu einer deutlichen Vermehrung der Kollateralen. Die Konduktanz der Kollateralen war ebenfalls verbessert. Durch die Behandlung von Monozyten mit TGF- β 1 wurde der Rezeptor MAC-1, der für die Adhäsion an das Endothel notwendig ist, stärker exprimiert. Die Autoren schlagen daher als Wirkmechanismus von TGF- β 1 vor, dass die Anlagerung von Monozyten und deren Einwanderung in das Gewebe der wachsenden Kollateralen verstärkt wird. Ein weiterer Effekt ist die stärkere Stimulation der Wachstumsfaktoren-Produktion der Monozyten.

In zwei kürzlich veröffentlichten Studien finden sich Hinweise auf eine Beteiligung von PlGF an der Arteriogenese. Dieser Faktor ist homolog zum VEGF und wirkt selektiv auf den VEGF-Rezeptor 1, der einzige Rezeptor für VEGF auf Monozyten. Werden Versuchstiere nach Ligation der Femoralarterie mit PlGF behandelt kommt es nach einer Behandlungsdauer von sieben Tage zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl an Kollateralen und damit der kollateralen Konduktanz im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe (Pipp u. a. 2003). Auch dieser Effekt war an die Monozyten gebunden. Durch PlGF wurde die Zahl der Monozyten im Bereich der wachsenden Kollateralen deutlich erhöht. Eine Reduktion der Monozyten im Blut führte zu einer kompletten Inhibition des Effekts von PlGF auf die Arteriogenese. Bei gentechnisch veränderten Mäusen, denen das Gen für PlGF fehlte (PlGF $^{-/-}$) war das Wachstum von Kollateralen nicht inhibiert, aber im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamt (Scholz u. a. 2003). In diesem Zusammenhang wurde auch beschrieben, dass VEGF auch einen Einfluss auf das Kollateralwachstum hat. Dieser Effekt war aber nicht so ausgeprägt wie der durch PlGF hervorgerufene. Auch bei diesem Faktor war weniger ein direkter Effekt auf die Arteriogenese

anzunehmen, als viel mehr ein indirekter Einfluss durch die Stimulation von Monozyten (Pipp u. a. 2003). Eine Veränderung der Menge an VEGF mRNA und Protein war im Verlauf der Arteriogenese in wachsenden Kollateralen nicht nachweisbar (Deindl u. a. 2001a). Nur in den umgebenden Muskelbereichen war eine Verminderung der VEGF mRNA nachweisbar, die aber auf die Wundheilung nach der Operation zum Verschluss der A. femoralis zurückzuführen war.

1.2.1.5 Morphologische Veränderungen

Die morphologisch sichtbaren Veränderungen, die zu Beginn des Wachstums der Kollateralen stattfinden, tragen die Anzeichen einer entzündlichen Reaktion des Gewebes. Neben der oben schon beschriebenen Aktivierung der Endothelzellen und der Einwanderung von Monozyten kommt es zu einer Akkumulation von T-Lymphozyten um das wachsende Gefäß (Schaper u. a. 1976). Diese Entzündung im wachsenden Gefäß schafft die notwendigen Voraussetzungen für die einsetzende Umgestaltung. Wird die natürliche Regulation des entzündlichen Prozesses beeinflusst, kommt es auch zu Veränderungen im Ablauf der Arteriogenese. Wird das Gen für Interleukin-10, das Entzündungen entgegen wirkt, in *M. musculus* ausgeschaltet (IL-10^{-/-}), kommt es zur vermehrten Bildung von Kollateralen nach Verschluss der Femoralarterie. Hierfür wurden zwei mögliche Wirkweisen vorgeschlagen. In den IL-10^{-/-} Tieren wurde ein erhöhter VEGF Gehalt im Gewebe mit wachsenden Kollateralen festgestellt (Silvestre u. a. 2000). Unter Berücksichtigung des oben Gesagten zum Einfluss von VEGF während der Arteriogenese, handelt es hierbei um einen indirekten Effekt, der im natürlichen Ablauf nicht vorkommt. In diesen gentechnisch veränderten Mäusen kam es aber auch zu einer starken Erhöhung der inaktiven und aktiven Form der MMP 2 und 9 (Silvestre u. a. 2001). Eine Beteiligung dieser MMP's an der Arteriogenese kann auch mit histologische Methoden gezeigt werden (Cai u. a. 2000). In wachsenden Kollateralen waren diese beiden Enzyme erhöht exprimiert. MMPs sind am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt und spielen damit eine wichtige Rolle während des Umbaus der Kollateralen vom kleinen zum großen Gefäß. Dieser Umbauprozess schafft den Platz, der für die Zunahme des Durchmessers und auch für die Zunahme der Gewebemasse nötig ist. Der teilweise Abbau der extrazellulären Matrix lockert die Verbindungen der glatten Muskelzellen untereinander auf und ermöglicht eine passive Dilatation des Gefäßes. Gleichzeitig wird die Membrana elastica interna teilweise abgebaut und einzelne glatte Muskelzellen zeigen Anzeichen von Apoptose. Die Abnahme an Zellen durch Apoptose wird aber durch eine zeitgleich einsetzende verstärkte Proliferation der glatten Muskelzellen mehr als ausgeglichen (Wolf u. a. 1998). Die Balance zwischen Proliferation und Apoptose dient als natürliches Kontrollinstrument, um eine unnötige Verdickung der Gefäßwand und ein dadurch hervorgerufenen Verschluss des Gefäßes zu verhindern. Die erhöhte Rate der Proliferation und die Auflockerung der Struktur ermöglicht es einzelnen glatten Muskelzellen in Richtung des Endothels zu wandern. Deutlich sichtbar wird dies durch die Bildung einer Neointima. Die Bildung der Neointima beginnt bei *O. cuniculus* drei Tage nach der Okklusion der Femoralarterie (Scholz u. a. 2000). Anfänglich ist diese Veränderung nur an der Präsenz einer dünnen Schicht glatter Muskelzellen im Bereich zwischen der Membrana elastica interna und dem Endothel zu erkennen. In den späteren Phasen der Entwicklung einer Kollaterale besteht die Neointima aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen. Die glatten Muskelzellen in diesem Bereich sind nicht zirkular angeordnet wie die Muskelzellen in der Tunica media, sondern zeigen eine helikale Ausrichtung und sind in elastischem Material eingebettet. Insgesamt erscheinen die einzelnen Schichten der wachsenden

Kollaterale im Vergleich zum ruhenden Gefäß als weniger organisiert. Teilweise kommt es zu einer übermäßigen Neointima-Bildung, die zu einem Verschluss der Kollaterale führt (Schaper und Ito 1996). Dieser Verschluss einer Kollaterale ist in den Änderung im Blutfluss aufgrund des Kollateralwachstums begründet. Da der hauptsächliche Auslöser der Arteriogenese die Änderung in der Wandschubspannung ist, haben größere Gefäße mit einem größeren Blutfluss einen „Vorteil“ gegenüber kleineren Blutgefäßen. Das stärkere Wachstum größerer Gefäße zum Nachteil kleinerer ist eine sinnvolle Adaption, da so wenige, große Kollateralen entstehen, die eine große Menge an Blut bei vergleichsweise geringem Widerstand transportieren können. Hier zeigt sich auch eine Parallele der Arteriogenese zur Arteriosklerose: bei der Bildung von arteriosklerotischen Plaques kommt es ebenfalls zur Bildung einer Neointima, diese führt allerdings zu einem Verschluss des Gefäßes. Im Rahmen der Arteriogenese ist die Neointima-Bildung genauer reguliert und wichtiger Bestandteil in der Bildung einer funktionellen Kollaterale.

Neben diesen Veränderungen in der Struktur der wachsenden Kollaterale wird auch das Muster der Proteinexpression verändert. Deutlich wird dies an den Änderungen im Phänotyp der glatten Muskelzellen. Nach Beginn des Wachstums der Kollateralen vollziehen diese Zellen eine Wandlung vom „kontraktilen“ Phänotyp zum „synthetischen“ oder „proliferativen“ Phänotyp. Diese Wandlung zeigt sich in einer Reduktion des Gehaltes an „ α -smooth muscle actin“, Vinculin und Calponin. Desmin fehlt vollständig. Der Gehalt an Vimentin ist stark erhöht (Wolf u. a. 1998). Die Reduktion im Gehalt an „ α -smooth muscle actin“ ist charakteristisch für glatte Muskelzellen vom „synthetischen“ Phänotyp (Herman 1993). Eine ähnliche Reduktion wird auch bei der Bildung einer Neointima nach Verletzung eines Blutgefäßes gefunden (Orlandi u. a. 1994). Ein weitere Beweis für die Änderung des Phänotyps sind das Verschwinden von Desmin und die Zunahme an Vimentin, eine Umkehr der Verhältnisse in adulten glatten Muskelzellen und eine Rekapitulation der embryonale Situation (Giuriato u. a. 1993). Die Fähigkeit der Zellen zu Proliferieren und auch zu Migrieren spiegelt sich in der Abwesenheit von Calponin wieder. In glatten Muskelzellen ist Calponin abundant im kontraktilen Apparat und dem Zytoskelett zu finden, es wirkt hemmend auf das Wachstum, die Proliferation und die Migration kultivierter Zellen (Takahashi u. a. 1993). In die gleiche Richtung kann der reduzierte Gehalt an Vinculin gedeutet werden. Dieses Protein ist an der Vermittlung des Kontakts der Zellen mit der extrazellulären Matrix beteiligt, genauer gesagt ist es eines der verbindenden Proteine zwischen den Aktinfilamenten und den Integrinen (Burridge und Feramisco 1980). Die gelockerte Verbindung der glatten Muskelzellen mit der Matrix erleichtert die Migration der modifizierten Zellen und damit die Bildung der Neointima.

Auch die Tunica adventitia zeigt Veränderung während der Arteriogenese; es kommt zu einem Umbau, der durch die Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten gekennzeichnet ist. In ruhenden Gefäßen sind in der Adventitia nur wenige Fibroblasten zu finden, die nicht proliferieren (Cai u. a. 2003). Gleichzeitig ist der Anteil an elastischen Fasern in der Adventitia wachsender Kollateralen im Vergleich zu ruhenden Gefäßen deutlich reduziert. Die wachsenden Kollaterale beeinflusst auch ihre unmittelbare Umgebung, um den nötigen Platz für das expandierende Gefäß zu schaffen, kommt es zu einem Abbau des umgebenden Gewebes. Auffällig ist hierbei eine verstärkte Ablagerung von Fibronectin, die zu einer Umhüllung benachbarter Zellen führt und damit zu einem hypoxischen Milieu führt, das die angrenzenden Zellen schädigt. Der damit verbundene Abbau des angrenzenden Gewebes schafft den Raum, der von der wachsenden und damit im Durchmesser zunehmenden Kollaterale gebraucht wird.

1.3 Methoden zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen

Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Möglichkeiten differentiell exprimierte Gene zu identifizieren: erstens Methoden, die zur Voraussetzung haben, dass die Sequenzen der zu untersuchenden Gene wenigstens in Teilen bekannt sind und zweitens solche, die keinerlei Informationen über die Sequenzen benötigen. Zur ersten Kategorie gehören die „Northern Hybridisierung“ und die quantitative PCR. Diese Methoden erlauben es, die Unterschiede in der Genexpression quantitativ zu verfolgen, sind allerdings auf schon bekannte Gene beschränkt. Durch Einsatz dieser beiden Methoden ist eine umfassende Analyse der differentiellen Genexpression in einem experimentellen Kontext nicht möglich. Soll eine umfassende Analyse der Genexpression erfolgen, ist es notwendig Methoden zu verwenden, die keine Informationen über die zu untersuchenden Gene benötigen. Zu nennen sind hier neben der „Suppression Subtractive Hybridization“ (SSH) (Diatchenko u. a. 1996) auch die „Serial Analysis of Genexpression“ (SAGE) (Velculescu u. a. 1995; Virlon u. a. 1999) und die in dieser Arbeit verwendete „Differential Display Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction“ oder in der Kurzform: DDRT-PCR (Liang und Pardee 1992). Gemeinsam ist diesen Methoden, dass sie einen Vergleich der RNA-Menge, die von allen aktiven Genen in einem Zelltyp oder Gewebe vorliegen, ermöglichen. Als Ergebnis werden einzelne Gene, bzw. Klone isoliert, die eine mögliche differentielle Regulation aufweisen.

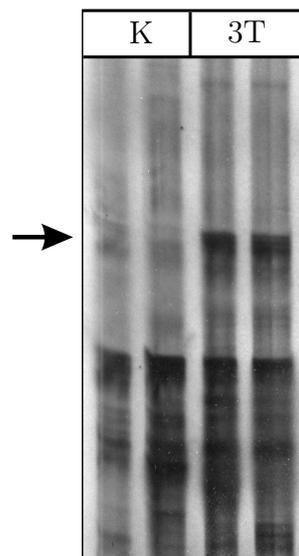


Abb. 1.4: Beispiel eines Differential Display Gels, gezeigt ist der Klon AK81b1 (Pfeil), die stärkere Bande des PCR-Produktes ausgehend von RNA nach 3 Tagen Occlusion der Arteria femoralis deutet auf eine verstärkte Expression des Gens während der Arteriogenese hin. Alle PCR-Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt und getrennt auf dem Sequenziergel aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden, die auf eine differentielle Expression hindeuteten, also einen deutlichen Unterschied in der Menge des PCR-Produktes von Kontrolle und Experiment bei beiden Duplikaten zeigten aus dem Gel isoliert. Hieran schloss sich die Klonierung und Sequenzierung der Klone an. (K = Kontrolle, 3T = 3 Tage Okklusion)

Bei der DDRT-PCR wird als erster Schritt nach der Isolation der RNA aus dem zu untersuchenden Gewebe eine reverse Transskription durchgeführt. Verwendet werden hierfür so

genannte „geankerte“ OligodT-Primer, die den Startpunkt der reversen Transskription auf den Übergang von der eigentlichen mRNA zum Polyadenosin-Schwanz festlegen. Damit wird sichergestellt, dass eine möglichst grosser Bereich der mRNA erfasst wird. Die so entstandene cDNA wird anschließend in einer PCR amplifiziert. Als Primer werden der schon in der reversen Transskription eingesetzte OligodT-Primer zusammen mit einem kurzen Primer, der eine zufällige Sequenz besitzt, eingesetzt. Da gleichzeitig die Reaktionsbedingungen unspezifisch gewählt sind, wird mit einer Primer-Kombination eine Vielzahl von cDNA-Fragmenten amplifiziert. Sichtbar gemacht werden die amplifizierten Fragmente anschließend durch Auftrennung auf einem Polyacrylamid-Gel (siehe Abbildung 1.4). Hierbei werden korrespondierende Proben, also Amplifikationen von cDNA, die aus RNA gewonnen wurde, welche aus Kontrollgefäßen oder wachsenden Kollateralen isoliert wurde, nebeneinander auf ein Gel aufgetragen. Die Auswertung kann dann durch direkten Vergleich der Intensität der Banden durchgeführt werden. Ein deutlicher Unterschied in der Intensität der Banden, idealerweise ein Verschwinden, bzw. Auftreten von Banden, deutet auf einen möglicherweise differentiell exprimiertes Gen hin. Die so lokalisierten Fragmente werden im weiteren aus dem Gel isoliert und erneut amplifiziert, um genügend Material für eine Klonierung zu Verfügung zu haben. An die Klonierung schließt sich die Identifizierung der Klone durch Sequenzierung und die Bestätigung der differentiellen Expression durch „Northern Hybridisierung“ an.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die weitere Aufklärung der molekularen Grundlagen der Arteriogenese. Dazu sollen Gene identifiziert werden, die nach dem Verschluss der A. femoralis bei *O. cucuniculus*, differentiell exprimiert werden. Um auch eine Isolierung von unbekannt Genen zu ermöglichen, wird die DDRT-PCR eingesetzt. Nach der Isolation möglicher differentiell exprimierter Gene, sollen einzelne in ihrer Expression bestätigt werden und anschließend näher charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiermodell, Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Als Tiermodell wurde *Oryctolagus cuniculus* verwendet. Die Tiere wurden durch intramuskulärer Injektion von Ketamin Hydrochlorid (40-80 mg/kg Körpergewicht) und Xylazine (8-9 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Die Narkose wurde, wenn nötig, durch intravenöse Gabe von ca. 10 bis 20% der anfänglichen Dosis fortgeführt (Ito u. a. 1997b). Unter sterilen Bedingungen wurde die Arteria femoralis freigelegt und durch zwei Ligaturen, die ca. 1,5 cm voneinander entfernt lagen, verschlossen. Die Wunde wurde anschließend verschlossen und die Tiere in einem großen Käfig, mit freiem Zugang zu Wasser und Futter, gehalten. Wie in der Abbildung 1.3 zu sehen, entwickelten sich durch den Verschluss der A. Femoralis Kollateralen. Diese verliefen hauptsächlich von der Arteria profunda femoralis und der Arteria circumflexa femoris lateralis zur Arteria saphena parva, bzw. zur Arteria genuales.

Nach einem Beobachtungszeitraum von entweder drei Tagen oder drei Wochen, für spätere Untersuchungen zusätzlich sieben Tage, wurden die wachsenden Kollateralen entnommen. Hierzu wurden die Tiere durch eine Überdosis des verwendeten Narkosemittels getötet. Die Aorta wurde freigelegt und kanuliert, die Gefäße wurden anschließend durch Infusions eines Kontrastmittels (300 ml H₂O, 90 g Gelatine, 200 g BaSO₄) sichtbar gemacht. Während des Infusionsvorgangs wurde das Tier und alle Lösungen auf 37°C temperiert, um ein vorzeitiges Aushärten des Kontrastmittels zu verhindern. Dies wurde nach vollständiger Füllung aller Kollateralen durch eine 60 minütige Abkühlung im Eisbad erreicht (Hoefler u. a. 2001).

Zur Isolation der Kollateralen, bzw. der Kontrollen (ruhende Gefäße mit vergleichbarer Größe), wurden diese aus dem M. quadriceps präpariert. Dazu wurde der Muskel zuerst vom Knochen gelöst und anschließend die Gefäße frei präpariert. Entnommen wurde nur die „Midzone“ der Kollateralen (Longland 1953), da dieser Bereich der Ort der Umgestaltung der Kollateralen war. Das isolierte Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Gewebeproben für die histologischen Untersuchungen wurden in Tissue-teck Einbettungsmedium eingebettet und in Methylbutan, das in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, eingefroren.

Zur Überprüfung der funktionellen Bedeutung von Osteoglycin für das Wachstum von Kollateralen, dienten Exemplare der Art *Mus musculus*, deren Osteoglycin-Gen inaktiviert worden war (Osteoglycin^{-/-}, Tasheva u. a. (2002)). Die Operation zur Okklusion der Femoralarterie entsprach dem oben geschilderten Vorgehen bei *O. cuniculus*. Die Messung des Wachstums der Kollateralen erfolgte indirekt mit einem „Laser Doppler Perfusion Imager“, wie bei Heil u. a. (2002b) beschrieben.

2.1.2 Enzyme, Chemikalien, verwendete Kits und Verbrauchsmaterial

Tab. 2.1: Aufstellung der verwendeten Enzyme, Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien. Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden bei der Firma Roth, Karlsruhe bezogen.

Hersteller	Bezeichnung
Amersham Biosciences	AutoRead Sequencing Kit, ALF DNA Analysis System, ALF Manager, Nylon Membran Hybond-N+, Redivue deoxycytidine 5'-[$\alpha^{32}\text{P}$] triphosphate, Redivue adenosine 5'-[$\gamma^{32}\text{P}$] triphosphate, ECL Western blotting detection reagents, ECL Blocking Agent, Hyperfilm ECL, Rediprime II random prime labelling system, Kodak X-Omat AR, Storm 860 Phospho-Imager, ImageQuant, Storage Phosphor Screens
Böhringer	rekombinantes humanes MCP-1
Cell Concepts	Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-basic (FGF2), Recombinant Human GM-CSF, Recombinant Human IL-6, Recombinant Human IL10, Recombinant Human Oncostatin M, Recombinant Human PDGF-AB, Recombinant Human TGF- β 1
CellSystems	Collagenase Typ 2, Elastase
Clontech	SMARTTRACE cDNA Amplification Kit, Human Multiple Tissue Expression (MTE) Array
GenHunter Corporation	RNAimage™ Kit 1 und 2
GIBCO	Fungizone® Antimykotika, Penicillin-Streptomycin-Lösung, Trypsin/EDTA (1 x)
Greiner	Petrischalen 90 mm und 145 mm, Gewebekulturschalen 90 mm und 145 mm, Reaktionsgefäße 1,5 ml, Pipettenspitzen, Zellschaber
Invitrogen	T4 Kinase, T4 DNA-Ligase, Restriktionsenzyme, NuPAGE® Novex® 10% Bis Tris Gel, NuPAGE® LDS Sample Buffer(4x), NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer, NuPAGE® MES SDS Running Buffer, NuPAGE® Transfer Buffer, MultiMark® Multi-Colored Standard
Merck	2-Methylbutan
New England Biolabs	PNGase F, 10x Denaturing Buffer, 10x G7 Buffer, 10% NP-40
PAA	Fibronektin, HBSS, Medium 199 (Earle's Salze, mit L-Glutamin)
Peqlab	peqGOLD RNAPure™
Perkin Elmer	Amplitaq® DNA Polymerase, 10x PCR Buffer II, 25 mM MgCl ₂
Promega	RQ1 RNase-Free DNase, Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System, T7 RNA Polymerase, T3 RNA Polymerase, RNA Markers (0,28 - 6,58 kb), RNAsin
Qiagen	QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, Taq PCR Master Mix
Sakura Finetek	Tissue-teck
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Cruz Marker Molecular Weight Standard
Seegene® Inc.	Mouse Embryo Full Stage Blot
SIGMA	DAPI, Dimethylsulfoxid (DMSO), Skim Milk Powder, MTT, FBS (Fetal Bovine Serum)
Stratagene	pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit, QuikHyb® Hybridization Solution

2.1.3 Oligonukleotide, Bakterienstämme, Plasmide und Antikörper

Tab. 2.2: Verzeichnis der verwendeten Oligonukleotide, die mit einem Stern markierten Oligonukleotide waren für die automatische Sequenzierung am 5'-Ende mit Fluorescein markiert. Bezugsquelle war die Firma MWG Biotech AG.

Name	Sequenz	Referenz
74GSP	GCG TTC AGT CAC AGA GAA ATG AGG C	diese Arbeit
74NGSP	ATG CAC ACA AAA TTA TAA GAA AGC	diese Arbeit
74F3F1*	ACC TGA GTT CCT ACT AAA ATG	diese Arbeit
74F3F2*	TGG ATG GAA AAA ATA TTG AGG	diese Arbeit
74F3F3*	AAG AAG GCT TGA TTT TAC GGG	diese Arbeit
74F3F4*	TGT ACT TGG ACC ACA ATG CCC	diese Arbeit
74F3F5*	GAA GAA ATA CGG CTG GAG GGC	diese Arbeit
74F3F6*	AAT ACT AAC TTT GTA CTT TAC	diese Arbeit
74F3F7*	GAA CTT TGT TTT CTT CCT ATC	diese Arbeit
74F3R2*	TTT GAC AAA TGG GGT GAA TAA	diese Arbeit
74F3R3*	TGT TTT CAT TCA TCA AGG GTG	diese Arbeit
74F3R5*	CTT TAC TTG GGT TTG GCT TGC	diese Arbeit
74F3R6*	GAT AGG AAG AAA ACA AAG TTC	diese Arbeit
74F3R7*	TTT GAA CTT GGT GAT TGG AGC	diese Arbeit
74F3R8*	GTG AAT TAC ACG CAA ACT TTC	diese Arbeit
74F3R9*	CCC GTA AAA TCA AGC CTT CTT	diese Arbeit
74F3R10*	TCG GGC ATA GAG ATA GGC TGA	diese Arbeit
74F3R11*	AAA TGA TCT GCT GCA TAG TCG	diese Arbeit
74F3FL	TCT GCG GTC TAC ACT TCT CCT	diese Arbeit
anti-1	GCA GAG TCT TCA TTT TAG GAA	diese Arbeit
anti-2	ACA GGA GCA GGA GAA GTG TAG ACC	diese Arbeit
anti1rev	AAG GAT GAT TTT ACT TCT GAG ACG	diese Arbeit
anti2rev	CCA GAT GTG AAG AGG ACG AGG	diese Arbeit
scramble	AGA CAA GGT TAG TTT GCA TAG TTC	diese Arbeit
18Sfwd	GGG ACA AGT GGC GTT CAG	diese Arbeit
18Srev	GAC ATC TAA GGG CAT CAC AGA	diese Arbeit
18Smrev	CGG AAC TAC GAC GGT ATC TG	(Deindl 2001)
19GSP	AGC TCT TCC ATA ATG AAA CAC TGC	diese Arbeit
19NGSP	TCC AAA TTA CAT TTT ATA GCC	diese Arbeit

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Bakterienstämme

Stamm/Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>E.coli</i> Xl1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , <i>subE44</i> , <i>lac</i> , (F' <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , ZΔM15, TN10, [<i>tec^r</i>]), <i>thi</i>	(Bullock u. a. 1987)
pCR Script SK+	<i>lacZα</i> . Amp ^r , Klonier- und Sequenzierungsvektor	Stratagene

2 Material und Methoden

Tab. 2.4: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper. Die Antikörper aus der Maus waren monoklonal (mk), der Antikörper aus der Ziege war polyklonal (pk).

Antigen	Wirt	Klon	Verdünnung	Hersteller
human fibroblast surface protein	Maus (mk)	Clone 1B10	1:10	SIGMA
anti-myosin (smooth)	Maus (mk)	Clone HSM-V	1:200	SIGMA
anti- α -smooth muscle actin	Maus (mk)	Clone 1A4	1:200	SIGMA
anti-human von Willebrand factor	Maus (mk)	Clone F8/86	1:5	DAKO
anti-mouse IgG + IgM Cy3-conjugated	Ziege (pk)		1:300	Jackson Immuno Research
anti-rat IgG HRP-conjugate	Ziege (pk)		1:5000	Santa Cruz Bio- technology, Inc.

2.1.4 Medien

2.1.4.1 *E. coli* Medien

LB-Medium (Luria-Bertani Broth)

10,0 g/l	Trypton
5,0 g/l	Hefeextrakt
5,0 g/l	NaCl
1,0 g/l	Glucose
	<i>pH</i> 7,4

SOC-Medium

20,0 g/l	Trypton
5,0 g/l	Hefeextrakt
0,5 g/l	NaCl
2,0 mM	Glucose
1,0 mM	MgCl ₂
1,0 mM	MgSO ₄

2.1.4.2 Zusätze zu den Medien

20,0 g/l	Agar
50,0 mg/l	Ampicilin
50,0 mg/l	Kanamycin
25,0 µg/l	IPTG
40,0 µg/l	X-Gal

2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit *Millipore*-Wasser angesetzt. Puffer und Lösungen die gebrauchsfertig in verwendeten Kits enthalten waren, sind nicht aufgeführt.

2.1.5.1 Elektrophoreselösungen und -puffer

BPB/Glycerin-Lösung

50,0 %(<i>v/v</i>)	Glycerin in TAE-Puffer
2,0 mg/ml	Bromphenolblau

Ethidiumbromid Lösung

10,0 mg/ml	Ethidiumbromid (für DNA Gele)
1,0 mg/ml	Ethidiumbromid (für RNA Gele)

10 x MOPS-Puffer

0,20 M	MOPS [3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid]
0,05 M	Natrium-Acetat
0,01 M	EDTA
	bei 4°C lagern

RNA-Probenpuffer

0,75 ml	deionisiertes Formamid
0,15 ml	10x MOPS
0,24 ml	Formaldehyd (37%)
0,10 ml	H ₂ O
0,10 ml	Glycerol
0,08 ml	10% Bromphenolblau
	in Aliquots bei -20°C lagern

TAE Elektrophoresepuffer

40,0 mM	Tris-Base
10,0 mM	Natrium-Acetat
1,0 mM	EDTA
	pH 7,8

TBE Elektrophoresepuffer

89,0 mM	Tris-Base
89,0 mM	Borsäure
2,0 mM	EDTA

2.1.5.2 DNA Puffer und Lösungen

Lysis-Lösung

0,2 N	NaOH
1,0 %	SDS

STE Puffer

10,0 mM	Tris-Base
10,0 mM	NaCl
1,0 mM	EDTA
	pH 8,0

TE Puffer

10,0 mM	Tris-Base
1,0 mM	EDTA
	pH 7,5

2.1.5.3 RNA Puffer und Lösungen

Guanidiniumpuffer

4,0 M	Guanidiniumthiocyanat
25,0 mM	Natriumcitrat
0,5 %	N-Lauryl-Sarcosylsarcosin
0,1 M	β -Mercaptoethanol
	pH 7,0

2.1.5.4 Lösungen und Puffer für die Hybridisierung

Hybridisierungspuffer

50,0 %	Formamid (deionisiert)
10,0 %	Dextransulfat
1,0 M	NaCl
1,0 %	Natriumdodecylsulfat
0,5 mg/ml	DNA geschert

Waschlösung I

2,0 x	SSC
0,1 %	SDS

Waschlösung II

1,0 x	SSC
0,1 %	SDS

Waschlösung III

0,1 x	SSC
0,1 %	SDS

2.1.5.5 Protein Puffer und Lösungen

Extraktionspuffer

0,10 M	Tris-HCl, pH 8,0
0,01 M	EDTA
0,04 M	DTT
10,00 %	SDS

Ponceau S Färbelösung

0,5%	Tris-Base
3,0%	Trifluoressigsäure

TBS-T

20,0 mM	Tris-Base
137,0 mM	NaCl
0,1%	Tween 20
	pH 7,0

2.1.5.6 Lösungen und Puffer für die Zellkultur

10 x PBS

80,0 g	NaCl
20,0 g	KCl
11,5 g	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O
2,0 g	KH ₂ PO ₄

MTT-Stammlösung

5,0 mg/ml MTT in PBS

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung, Reinigung und Darstellung von DNA

2.2.1.1 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA zum Einsatz in Sequenzierungen wurde mit dem Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System (Promega) nach Angaben des Herstellers isoliert. Für größere Mengen an Plasmid-DNA, wie sie z. B. für die Herstellung von Sonden für die Hybridisierung nötig sind, wurden nach folgendem Protokoll Maxipreps durchgeführt:

- 200ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie animpfen, über Nacht bei 37°C, 250 rpm schütteln
- Kultur 10 min bei 4000 x g zentrifugieren
- Pellet in 5,3 ml STEL-Puffer (1 x STE-Puffer mit 2 mg/ml Lysozym) resuspendieren, 10 min bei RT inkubieren
- 10,8 ml Lysis-Lösung zugeben und mischen, 10 min bei 0°C inkubieren
- 6,8 ml 3 M Kalium-Acetat zugeben und mischen, 30 min bei 0°C inkubieren
- Lösung 15 min bei 14000 x g zentrifugieren
- Überstand in ein neues Gefäß überführen, 23 ml Isopropanol zugeben und mischen
- 10 min bei 10000 x g zentrifugieren
- Pellet in 1,4 ml 1 x SET-Puffer resuspendieren und in ein neues Gefäß überführen
- 1 min bei 14000 x g zentrifugieren, klaren Überstand in ein neues Gefäß überführen
- 10 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) zugeben, 1 h 37°C

- Lösung auf zwei Gefäße verteilen, 500 μ l Phenol-Chloroform (1:1) zugeben, mischen und 1 min bei 14000 x g zentrifugieren, obere Phase in eine neues Gefäß geben und Extraktion wiederholen
- 70 μ l 3 M Natrium-acetat (pH 5,2) und 750 μ l Isopropanol zur wässrigen Phase geben und 5 min bei 14000 x g zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellets mit 500 μ l 70% Ethanol waschen
- Pellets in insgesamt 200 μ l H₂O lösen
- Konzentration der DNA-Lösung im Photometer bestimmen (siehe 2.2.4)

2.2.1.2 Reinigung von DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit Proteinen verunreinigte DNA-Präparationen bzw. DNA-Lösungen, die noch Enzyme (z.B. Restriktionsenzyme) enthalten, können durch Phenolextraktion und anschließende Ethanol-Fällung gereinigt werden

- DNA-Lösung mit gleichem Volumen Phenol-Chloroform (1:1) versetzen, 1 min schütteln
- 3 min bei 13000 x g zentrifugieren, mit der wässrigen Phase wird das Verfahren gegebenenfalls wiederholt
- Ethanol-Fällung (siehe 2.2.1.3)

2.2.1.3 Konzentrierung von DNA durch Ethanol-Fällung

Durch Ethanol-Fällung wird das Volumen einer DNA-Lösung eingengt und die DNA von Salzen gereinigt.

- zur DNA-Lösung 2 Volumen 98% (v/v) Ethanol zugeben und mischen
- 20 min bei -70°C oder 1 h bei RT inkubieren und 10 min bei 13000 x g zentrifugieren
- 2 x wiederholen: 0,5 ml 70% (v/v) Ethanol zugeben, 5 min bei RT inkubieren, 5 min bei 13000 x g zentrifugieren, Überstand quantitativ entfernen
- Pellet trocknen und im gewünschten Volumen 1 x TE oder H₂O resuspendieren

2.2.1.4 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungssequenzen in diskrete Fragmente spalten können. Optimale Reaktionsbedingungen sind den entsprechenden Herstellerangaben zu entnehmen. Es wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen Invitrogen und Promega in empfohlener Konzentration eingesetzt.

- Ein typischer Spaltungsansatz von Plasmid-DNA wurde wie folgt hergestellt:

1,0 μ g	Plasmid-DNA
2,0 μ l	10x Spaltungspuffer
0,5 μ l	Enzym (5 U/ μ l)
12,5 μ l	H ₂ O
- 1-2 h bei 37°C (oder nach Herstellerangabe) inkubieren
- Inaktivierung durch Inkubation bei 65°C (oder nach Herstellerangabe) für 10 min

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in 0,8-2,5% (w/v) TAE-Agarosegelen, die 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid enthielten aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden mit ca. 50% (v/v) BPB/Glycerin-Lösung versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei 80-120 V für 10-30 min. Visualisiert wurde die DNA nach dem Gellauf auf einem UV-Transilluminator, Fotografien der Gele dienten zur Dokumentation.

2.2.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 2.2.1.4) wurden die verschieden lange Fragmente in einem präparativem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.1.5). Die zu isolierenden Fragmente wurden mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde der AutoRead Sequencing Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die anschließende Auftrennung der Fragmente wurde auf einem ALF (Amersham) durchgeführt. Die aufgenommenen Rohdaten wurden mit dem ALF Manager Ver. V prozessiert und korrekturgelesen.

2.2.3 Isolierung, Reinigung und Darstellung von RNA

2.2.3.1 Isolierung von RNA

RNA wurde nach der „Acid - Guanidiniumthiocyanat - Phenol/Chloroform“ Methode (Chomczynski und Sacchi 1987) isoliert. Eingesetzt wurde die Methode für frische und eingefrorene Gewebeproben. Das nachfolgende Protokoll geht von einer Menge von circa 400 mg Gewebe aus.

- eingefrorene Gewebeprobe im Mörser unter flüssigem Stickstoff zerkleinern, frische Proben mit einem Skalpell oder einer Schere zerteilen
- in 4 ml Guanidiniumpuffer (siehe 2.1.5) aufnehmen und im Ultraturrax zerkleinern, Gefäß dabei auf Eis stellen, alle weiteren Schritte werden ebenfalls auf Eis durchgeführt
- 0,4 ml Na-Acetat, 0,8 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) und 4 ml Phenol zugeben
- mischen, 45 sec vortexen, 15 min auf Eis stehen lassen
- für 40 min bei 8000 x g, 4°C zentrifugieren
- die obere, wässrige Phase abnehmen und in ein neues Gefäß überführen
- mit 4 ml Isopropanol versetzen, sorgfältig mischen und für mindestens 1 h bei -20°C lagern
- gefällte RNA durch zentrifugieren bei 10000 x g, 4°C für 30 min pelletieren
- Pellet mit 70% Ethanol waschen, dabei für 5 min bei 10000 x g, 4°C zentrifugieren
- Pellet leicht antrocknen lassen, danach in 0,8 ml Guanidiniumpuffer aufnehmen und in ein neues Gefäß überführen

- RNA-Lösung mit 0,8 ml Isopropanol mischen und für mindestens 1 h bei -20°C lagern
- gefällte RNA durch zentrifugieren bei 14000 x g, 4°C für 20 min pelletieren
- Pellet zweimal mit 70% Ethanol waschen, dabei für 10 min bei 14000 x g, 4°C zentrifugieren
- Pellet trocknen und in 0,1 ml H₂O lösen

Die so isolierte RNA wurde anschließend im Photometer (siehe 2.2.4) quantifiziert und auf einem denaturierenden Agarosegel (siehe 2.2.3.4) überprüft. Bei dieser Überprüfung wurde die Qualität anhand der beiden Banden der 18S und 28S rRNA beurteilt. RNA einer hohen Qualität zeigte zwei scharf abgegrenzte Banden, deren Intensität ungefähr im Verhältnis 1:2 stand. Nach Zugabe von 0,25 ml Ethanol zur RNA-Lösung wurde diese bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 RNA-Isolation aus Zell-Kulturen

Die Isolation von RNA aus kultivierten Zellen wurde mit einem einphasischen Guanidiniumisothiocyanat - Phenol Reagenz (peqGOLD RNAPure) durchgeführt. Da nur adhärente Zellkulturen verwendet wurden, konnte das Waschen und Lysieren der Zellen direkt in der Kulturschale durchgeführt werden.

- Zellen dreimal mit circa 10 ml HBSS waschen, Reste des Waschpuffers quantitativ entfernen
- Zellen durch Zugabe von peqGOLD RNAPure lysieren, für eine 90 mm Schale wurden 1 ml, für eine 145 mm Schale wurden 1,5 ml verwendet.
- Zellen durch Schaben mit einem Zellschaber von der Kulturschale lösen
- Zellen durch mehrmaliges pipettieren vollständig lysieren
- Lösung in ein Reaktionsgefäß überführen, 5 min bei RT stehen lassen
- Zugabe von 0,2 Vol Chloroform, 15 sec vortexen
- 3 bis 10 min bei RT inkubieren
- zur Trennung der Phasen bei 12000 x g für 5 min zentrifugieren
- wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- wässrige Phase mit 0,5 Vol Isopropanol versetzen, 5 min RT
- RNA durch Zentrifugation bei 12000 x g, 4°C für 5 min pelletieren
- Pellet zweimal mit 1 ml 70% Ethanol waschen
- Pellet trocknen und in H₂O lösen

Die Überprüfung und Qualitätskontrolle der RNA erfolgte wie bei der RNA-Isolation aus Gewebeproben beschrieben (siehe 2.2.3.1). Die RNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 DNase-Behandlung von RNA

In der isolierten RNA waren noch Spuren von DNA enthalten. Diese könnten zu unerwünschten Nebenprodukten in der reversen Transkription und anschließenden PCR führen. Daher wurde die RNA mit DNase behandelt:

- Reaktionsansatz:
 - 50,0 μg Total RNA
 - 10,0 μl RNAsin (RNase Inhibitor)
 - 1,0 μl DNase I (10 U/ μl)
 - 5,0 μl 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3
 - 5,0 μl 0,5 M KCl
 - 5,0 μl 1,5 mM MgCl₂
 - H₂O auf 50,0 μl
- 30 min bei 37°C inkubieren
- Phenol/Chloroform Extraktion (siehe 2.2.1.2) und Ethanol-Fällung (siehe 2.2.1.3) RNA in 20 μl H₂O lösen, lagern bei -80°C

2.2.3.4 Formaldehyd Agarose-Gelelektrophorese

Die Formaldehyd Agarose-Gelelektrophorese erlaubt eine Auftrennung von RNA Molekülen nach ihrer Größe. Da RNA im Gegensatz zu DNA einen hohen Grad an Sekundärstrukturen aufweist, ist es nötig RNA unter denaturierenden Bedingungen aufzutrennen. Dies wird durch Verwendung des denaturierenden RNA-Probenpuffer (siehe 2.1.5.1) und die Zugabe von Formaldehyd zur Gellösung erreicht.

Gellösung

1,0%	Agarose
1,0x	Mops
0,66 mM	Formaldehyd

Vorbereitung der Proben und Elektrophorese:

- RNA-Lösung in der Speedvac eintrocknen
- RNA Pellet in 14,5 μl RNA-Probenpuffer aufnehmen
- 0,5 μl Ethidiumbromid-Lösung (0,1 mg/ml) zugeben
- Denaturieren der RNA bei 65°C für 10 min, anschließend 5 min auf Eis abkühlen
- Proben auf das Gel auftragen, Elektrophorese bei 100 V, Laufpuffer: 1 x MOPS

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer unbekannt DNA- bzw. RNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt, es wurden folgende Umrechnungsfaktoren zugrundegelegt:

doppelsträngige DNA:	0,05 mg/ml entsprechen einer O.D. ₂₆₀ von 1
RNA:	0,04 mg/ml entsprechen einer O.D. ₂₆₀ von 1
Oligonucleotide:	0,02 mg/ml entsprechen einer O.D. ₂₆₀ von 1

2.2.5 Identifizierung differentiell exprimierter Gene: DDRT-PCR

Zur Identifizierung von Genen, die während des Wachstums von Kollateralen differentiell exprimiert wurden, wurde in dieser Arbeit die „Differential Display Reverse Transcription Polymerase

Chain Reaction“ oder in der Kurzform: DDRT-PCR (Liang und Pardee 1992) verwendet. Die angegebenen Puffer, Primer und Enzyme wurden, mit Ausnahme der *Taq* DNA Polymerase, den RNImage™ Kits 1 und 2 entnommen.

Reverse Transkription

- Reaktionsansatz:
 - 2,0 μ l RNA (DNA-frei 0,1 g/ μ l)
 - 2,0 μ l downstream Primer (2 μ M)
 - 4,0 μ l RT-Puffer
 - 1,6 μ l dNTPs (250 μ M)
 - 9,4 μ l H₂O
- mischen, 5 min bei 65°C denaturieren
- 1 μ l MMLV RTase (100 U/ μ l)
- 1 h bei 37°C inkubieren, inaktivieren des Enzyms bei 75°C, 5 min
- lagern bei -20°C

PCR

Die PCR-Reaktion wurde in einem GeneAmp 9600 Thermocycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt

- Reaktionsansatz:
 - 2,0 μ l RT-Mix
 - 2,0 μ l PCR-Puffer
 - 0,6 μ l 25 mM MgCl₂
 - 1,6 μ l dNTPs (25 μ M)
 - 5,0 μ l Redivue deoxyadenosine 5'-[α^{35} S] triphosphate
 - 2,0 μ l downstream Primer (2 μ M)
 - 2,0 μ l upstream Primer (2 μ M)
 - 0,2 μ l *Taq* DNA Polymerase
 - 8,0 μ l H₂O
- PCR-Programm:
 - 94°C, 2 min
 - 42 Zyklen:
 - 94°C, 30 sec
 - 40°C, 1 min
 - 72°C, 1 min
 - 72°C, 5 min

Gellauf und Elution der Banden

Die Auftrennung der amplifizierten Fragmente erfolgte auf einem denaturierendem Polyacrylamid Gel mit einer Länge von 66 cm und einer Stärke von 0,2 mm.

- Gel-Mix:
 - 12,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, 40%)
 - 8,0 ml 10x TBE
 - 60,0 ml H₂O
- mischen, filtern und entgasen
- 45 μ l TEMED und 700 μ l APS (10%) zufügen und in vorbereitete Gel-Kassette gießen
- Laufbedingungen: 60 W, 55°C, Vorlauf 30 min, Hauptlauf circa 3,5 h
- nach dem Lauf wurde das Gel aus der Kassette genommen, auf ein entsprechend großes Filterpapier übertragen und über Nacht bei 50°C getrocknet
- das getrocknete Gel wurde anschließend für drei Tage auf einen Film (Kodak X-Omat) exponiert, differentiell exprimierte Genfragmente konnten auf dem Film durch Unterschiede im Bandenmuster erkannt werden (siehe Abbildung 1.4)

Reamplifikation einzelner Banden

Nach der Auftrennung der PCR-Produkte und der Identifikation der differentiell exprimierten Banden, wurden diese aus dem Gel ausgeschnitten und reamplifiziert.

- zur Lokalisation der differentiell exprimierten Banden wurde der Film auf das getrocknete Gel gelegt, die entsprechenden Banden markiert und ausgeschnitten
- das ausgeschnittene Gelstück wurde in ein Gefäß überführt und mit 100 μ l H₂O überschichtet, Inkubation für 10 min bei RT, danach 15 min 100°C
- 2 min bei 14000 x g zentrifugieren und Überstand in ein neues Gefäß überführen
- Fällung der DNA nach Zugabe von 10 μ l 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2), 2,5 μ l Glycogen (20mg/ml), 400 μ l Ethanol für 30 min bei -80°C
- 10 min bei 14000 x g, 4°C zentrifugieren
- Pellet mit 250 μ l Ethanol (85%) waschen
- Pellet luftrocknen und in 10 μ l H₂O lösen

Die eluierte DNA wurde anschließend mit einer PCR reamplifiziert, um eine Klonierung der Fragmente zu ermöglichen.

- Reaktionsansatz:
 - 4,0 μ l eluierte cDNA
 - 4,0 μ l downstream Primer (2 μ M)
 - 4,0 μ l upstream Primer (2 μ M)
 - 20,0 μ l Taq PCR Master Mix
 - 8,0 μ l H₂O

- PCR-Programm:

94°C, 2 min

42 Zyklen:

94°C, 30 sec
40°C, 1 min
72°C, 1 min
72°C, 5 min

- Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,8% Agarosegel überprüft, Reaktionen ohne Produkt wurden 1:100 verdünnt und erneut reamplifiziert.

Klonierung

Erfolgreich reamplifizierte Genfragmente wurden mit dem „pCR-Script™ Amp SK(+) Cloning Kit“ nach Angaben des Herstellers kloniert. Die Überprüfung, ob die Klone ein Insert enthielten, wurde mit einem Schnelltest durchgeführt:

- Klone in 3 ml LB mit Ampicilin animpfen, über Nacht bei 37°C mit 250 rpm schütteln
- 100 µl der Kultur mit 10 µl BPB/Glycerin-Lösung und 50 µl Phenol/Chloroform (1:1) mischen
- 10 sec vortexen, für 3 min bei 14000 x g zentrifugieren
- 25 µl der oberen Phase auf ein 0,8% Agarosegel auftragen und auftrennen, Plasmide mit einem Insert laufen langsamer als solche ohne Insert und können so identifiziert werden

2.2.6 Erster Nachweis einer differentiellen Expression: Slot-Blot

Die Anzahl der Klone, die mit DDRT-PCR isoliert wurden, war mit 191 zu groß, um eine vollständige Überprüfung der differentiellen Expression zu ermöglichen. Daher sollte mit einem einfach durchzuführenden Verfahren (Slot-Blot auch „reverser Northern“ genannt), eine erste Auswahl getroffen werden. Im Zusammenhang mit der DDRT-PCR verwendeten mehrere Autoren (Mou u. a. 1994; Wadhwa u. a. 1996; Zhang u. a. 1996; Hung u. a. 1999) dieses Verfahren bereits, um die Anzahl falsch positiver Klone zu reduzieren.

Amplifikation der Klone

- Amplifikation der einzelnen Klone, Ansatz und Reaktionsbedingungen entsprachen denen bei der DDRT-PCR
- Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (nach den Vorgaben des Herstellers), Elution mit 30,0 µl H₂O

Vorbereiten der Membranen, Blotten der PCR-Produkte

- Zugabe von 10 µl 2 N NaOH zu den PCR-Produkten
- Denaturierung 5 min bei 100°C
- Neutralisation mit 10 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,2
- mit H₂O auf 300 µl auffüllen
- Membran in 6 x SSC anfeuchten und in die Slot-Blot Apparatur (Schleicher und Schüll) legen
- Membran mit 300 µl 6 x SSC äquilibrieren

- jeweils 100 μl denaturiertes PCR- Produkt auftragen und durchsaugen
- Membran mit 300 μl 6 x SSC waschen

Von jeder Membran wurden drei Duplikate angefertigt, um die gleichzeitige Hybridisierung mit verschiedenen Sonden, ausgehend von den drei experimentellen Zeitpunkten (Kontrolle, drei Tage nach Okklusion und drei Wochen nach Okklusion), zu ermöglichen.

Markierung der Sonden

Als Sonden für die Hybridisierung wurde radioaktiv markierte cDNA verwendet. Diese wurde durch reverse Transkription der RNA hergestellt. Die Reaktionsbedingungen und der Ansatz entsprachen denen bei der DDRT-PCR, allerdings wurde 4 μg RNA verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 3 μl Redivue deoxycytidine 5'-[$\alpha^{32}\text{P}$] triphosphate zur radioaktiven Markierung. Die anschließende Hybridisierung und Auswertung erfolgte wie im nächsten Abschnitt beschrieben.

2.2.7 Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen durch Hybridisierung

2.2.7.1 Northern Blot

Für den Northern Blot wurde RNA (15 μg pro Spur) durch Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.2.3.4) und das Gel durch ein Photo dokumentiert. Der Transfer der RNA auf eine Nylon-Membran erfolgte durch einen Kapillar-Blot. Als Transferpuffer wurde SSC verwendet (Konzentration: 1 x). Der Blotvorgang dauerte 16 bis 18 Stunden; nach Abschluss wurden die Banden der 18S und der 28S rRNA auf der Membran markiert, um eine Abschätzung der Größe der Signale in den späteren Hybridisierungen zu ermöglichen.

2.2.7.2 Markierung von DNA-Sonden

DNA-Sonden für die Hybridisierung wurden mit dem Rediprime II random prime labelling system nach den Vorgaben des Herstellers radioaktiv markiert.

2.2.7.3 Markierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide, die als Sonden für die Hybridisierung verwendet werden sollten, wurden am 5'-Ende radioaktiv markiert.

- Reaktionsansatz:

1,0 μl	Oligonukleotid (10 pmol/ μl)
5,0 μl	10xT4 PNK Buffer
37,0 μl	H ₂ O

auf Eis mischen
- 2,0 μl T4 Polynukleotidkinase zugeben und mischen
- 5,0 μl Redivue adenosine 5'-[$\gamma^{32}\text{P}$] triphosphate zufügen
- 37°C für 30 min, anschließend wurde das Enzym inaktiviert (100°C, 5 min).

2.2.7.4 Northern Hybridisierung

Northern Hybridisierungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Membran mit fixierter RNA in Hybridisierungsröhre geben, 10 ml Hybridisierungspuffer (siehe 2.1.5.4) zufügen, bei Hybridisierungen mit Oligonukleotiden wurde als Hybridisierungspuffer „Quickhyb“ verwendet
- Prähybridisierung 1-2 h bei 42°C, für Oligonukleotide 15 min
- Zugabe der radioaktiv markierten Sonde zur Hybridisierungslösung (circa 1×10^7 cpm)
- Hybridisierung 16-18 h bei 42°C, für Oligonukleotide 1-2 h
- nach der Hybridisierung wurden die Blots für jeweils 2 x 15 min in den Waschlösungen I bis III (siehe 2.1.5.4) gewaschen, der Waschvorgang wurde mit einem Handmonitor überwacht und bei circa 100-250 ips abgebrochen
- nach dem Waschen wurden die Blots in Folie eingewickelt und auf „Phosphor-Screens“ exponiert
- zur Dokumentation wurden die Blots nach der Auswertung mit dem Phospho-Imager auf Kodak X-Omat AR Filme exponiert (16-72 h, abhängig von der Stärke der Signale)
- nach der Auswertung konnten die Sonden wieder von den Blots entfernt werden. Dazu wurden die Blots in 0,1% SDS bei 60 bis 75°C gewaschen. Die Waschlösung wurde alle 30 min gewechselt, bis keine Aktivität mehr messbar war

2.2.7.5 Auswertung der Hybridisierungen

Nach dem Abschluss der Hybridisierung wurden die Blots für maximal 18 h auf Phosphor Screens exponiert und mit dem Storm 860 Phospho-Imager gescannt. Die erhaltenen Scans wurden mit der Software ImageQuant ausgewertet. Zur Normalisierung der erhaltenen Werte wurden die Blots abschließend mit einer Sonde, die gegen die 18S rRNA (Deindl 2001) gerichtet war, hybridisiert.

2.2.8 *In situ* Hybridisierung

Mit der *in Situ* Hybridisierung wurde die Lokalisation der Osteoglycin mRNA im Gewebe untersucht. Es wurde eine nicht radioaktive Methode verwendet, wie von Fernandez u. a. (2003) beschrieben. Die verwendeten Gewebeschnitte umfassten den gesamte M. adductor, ohne vorherige Präparation der Kollateralen. Die untersuchten Zeitpunkte waren drei und sieben Tagen nach Okklusion der A. femoralis. Die Kontrollen stammten aus Tieren ohne Okklusion der Femoralarterie.

2.2.9 5'-RACE-PCR

Der SMART™ RACE cDNA Amplification Kit der Firma Clontech wurde zur Isolation unbekannter Bereiche klonierter cDNA-Fragmente nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

2.2.10 Isolierung, Reinigung und Darstellung von Proteinen

2.2.10.1 Isolierung von Proteinen

Für alle Untersuchungen in dieser Arbeit an Proteinen wurden Gesamt-Proteinextrakte verwendet. Diese wurden aus den isolierten Kollateralen, bzw. den Kontrollgefäßen nach folgendem Protokoll isoliert:

- Gewebeproben in Extraktionspuffer (siehe 2.1.5.5) aufnehmen, Endkonzentration 100 mg/ml
- Gewebe 5 x 30 sec bei 40% Leistung, 50% Schalltakt mit Ultraschall aufschließen (Bandelin Sonoplus GM70, Sonde S70)
- Homogenisat 1 min kochen
- Reste des Gewebes durch Zentrifugation bei 12000 x g, 1 min pelletieren
- Überstand quantitativ abnehmen, lagern bei -20°C

2.2.10.2 Deglykosylierung von Proteinen

Mit dem Enzym „Peptid:N-Glycosidase F“ (PNGaseF) können Proteoglykane in den Proteinkernen und die Glykosaminoglykan-Seitenketten zerlegt werden. Das verwendete Enzym ist spezifisch für so genannte „N-linked“ Glykosaminoglykane. Bei diesen ist die Seitenkette über die zweite Aminogruppe eines Asparaginrests an den Proteinkernen gebunden. Das nachfolgende Protokoll entspricht den Vorgaben des Herstellers des verwendeten Enzyms. Eingesetzt wurden je Ansatz 50 µg des Proteinextraktes. Die verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit dem Enzym geliefert. Zur Kontrolle wurde je ein Ansatz ohne Enzym, bei ansonsten gleicher Behandlung durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl.

- denaturieren der Proteine in „Denaturing buffer“, Gesamtvolumen 12 µl, bei 100°C, 10 min
- je 2 µl „10x G7 Buffer“ und „10% NP-40“ zugeben
- 2 µl (1000 U) PNGaseF zugeben, 37°C, 2 h
- deglykosylierte Proteine bei -20°C lagern

2.2.10.3 Auftrennung von Proteinen, PAGE

Genau wie Nukleinsäuren können auch Proteinen nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierzu wird die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verwendet. In dieser Arbeit wurden vorgefertigte Gele (NUPAGE, Invitrogen) eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese und dem Blotten der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen, wurden diese mit Ponceau S gefärbt, um die Uniformität der einzelnen Spuren zu überprüfen.

- Blot in einer flachen Schale mit wenig Ponceau S Färbelösung für 2-3 min überschichten
- mit H₂O entfärben bis die Banden deutlich sichtbar sind
- gefärbten Blot zur Dokumentation einscannen

2.2.10.4 Generierung eines Osteoglycin-Antikörpers

Kommerziell war kein Antikörper erhältlich, der gegen das Protein Osteoglycin aus *O. cuniculus* gerichtet ist. Daher musste ein Antikörper gegen dieses Protein hergestellt werden. Als Antigen wurden zwei Proteine aus der abgeleiteten Proteinsequenz ausgewählt, um die aufwändige Herstellung eines rekombinanten Proteins zu Immunisierung zu vermeiden. Die Herstellung des Antikörpers wurde von einem kommerziellen Anbieter (Eurogentec, Belgien) durchgeführt. Bei dem eingesetzten Immunisierungsprotokoll wurden zwei Ratten mit zwei unterschiedlichen Peptiden immunisiert. Das am Ende des Protokolls gewonnene Serum der beiden Tiere wurde kombiniert und anschließend über eine Affinitäts-Reinigung aufbereitet. Erhalten wurden so zwei Antikörper, die unterschiedliche Bereiche im Protein erkannten. Das erste Peptid umfasste die Aminosäuren Nummer 19 bis Nummer 34¹, der entsprechende Antikörper erhielt die Bezeichnung „459“. Das zweite Peptid umfasste die Aminosäuren Nummer 79 bis Nummer 84 aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz, der zugehörige Antikörper erhielt die Bezeichnung „460“.

2.2.10.5 Nachweis von Proteinen durch Western Blot

Proteine können durch eine immunologische Reaktion nachgewiesen werden. Eingesetzt wird hierbei im allgemeinen ein zweistufiger Prozess. Der erste Antikörper ist spezifisch für das zu untersuchende Protein, der zweite Antikörper ist mit einem Enzym gekoppelt und ermöglicht die Visualisierung der gesuchten Bande mittels einer Farbreaktion oder Chemi-Lumineszenz. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Detektion der Banden die Chemi-Lumineszenz (ECL Western Detection Reagents, Amersham) verwendet. Der sekundäre Antikörper war mit einer Peroxidase gekoppelt (goat anti-rat IgG HRP conjugate, Santa Cruz) und ermöglichte so die Umsetzung des Substrates. Die Detektion der entstehenden Signale erfolgte mit einem entsprechend sensitivem Film (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences). Die Wasch- und Inkubationsschritte wurden in 50 ml Gefäßen durchgeführt.

- Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 5% Milchpulver in 5 ml TBS-T, 3-4h bei RT
- Waschen mit 10 ml TBS-T, 2 x 10 min bei RT
- Inkubation mit dem ersten Antikörper (459 oder 460, siehe 2.2.10.4) 1:200 in 5 ml TBS-T verdünnt, 16-18h bei 4°C
- Waschen mit 10 ml TBS-T, 2 x 10 min RT
- Inkubation mit dem zweiten Antikörper (goat anti-rat IgG HRP conjugate) 1:5000 in 5 ml TBS-T verdünnt, 1h bei RT
- Waschen mit 5 ml TBS-T, 2 x 5 min und 2x 10 min RT
- Blot aus dem Gefäß nehmen und abtropfen lassen
- Detektion mit 1,5 ml ECL Detektionslösung, Blot 1 min in der Lösung inkubieren, abtropfen lassen und exponieren

¹Bei diesem Peptid wurde die C-terminale Aminosäure Tyrosin gegen Cystein ausgetauscht, um die Kopplung an das Trägermolekül zu ermöglichen.

2.2.10.6 Immunhistochemische Lokalisation von Osteoglycin im Gewebe

Die immunologische Detektion von Osteoglycin im Gewebeschnitt wurde wie von Fernandez u. a. (2003) beschrieben durchgeführt. Verwendet wurden Gewebeschnitte, nach drei und sieben Tagen Okklusion der A. femoralis, bzw. aus Kontrolltieren ohne Okklusion der Femoralarterie. Eine vorherige Präparation der Kollateralen wurde nicht durchgeführt, um die Gefäße im umgebenden Gewebe (M. quadriceps) zu untersuchen.

2.2.11 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich glatte Muskelzellen verwendet, die aus der Aorta von *O. cuniculus* isoliert wurden. Die einzelnen Isolate wurden mit Hilfe von immunologischen Färbungen charakterisiert, um sicher zu stellen, dass keine Kontaminationen durch andere Zellen vorhanden waren. Weiterhin wurden auch Endothelzellen gewonnen, um eine positive Kontrolle für die zur Charakterisierung verwendeten Antikörper zu Verfügung zu haben. Eine beispielhafter Darstellung der Ergebnisse dieser Charakterisierung findet sich in der Abbildung 3.17. Als Medium wurde für alle Zellen Medium 199 verwendet (Wechsel des Mediums nach jeweils drei bis vier Tagen). Zugewetzt wurden dem Medium als Antibiotika bzw. Antimykotika 100 IU/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin und 1 mg/ml Amphotericin B. Weiterhin enthielt das Medium während der normalen Kultur der Zellen 20% FBS. Medium für Stimulations-Versuche war serumfrei. Kultiviert wurden die Zellen bei 37°C, in einer kontrollierten Atmosphäre mit 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

2.2.11.1 Gewinnung von Primärkulturen

Zur Gewinnung der Primärkulturen (glatte Muskelzellen und Endothelzellen) wurde die Aorta von *O. cuniculus* entnommen und die Zellen durch den Verdau des Gewebes mit Elastase und Collagenase gewonnen.

Gewinnung von glatten Muskelzellen

- Aorta aufschneiden und in HBSS waschen
- Endothelzellen abtöten durch Waschen in 70% Ethanol, 30 sec
- Aorta in HBSS waschen und abgetötet Endothelzellen abschaben
- Vorverdau bei 37°C, mit 0,05% Collagenase, 0,025% Elastase in HBSS, 20 min
- Überstand abnehmen, verwerfen
- zweiter Verdau mit 0,05% Collagenase, 0,025% Elastase in HBSS, 3 h, 37°C
- Überstand abnehmen für 10 min bei 1200 rpm zentrifugieren
- Zellpellet in Medium 199 (20% FBS) aufnehmen und aussäen
- Zellen bis zur Konfluenz wachsen lassen, danach normal weiter kultivieren

Gewinnung von Endothelzellen

- Aorta in HBSS waschen
- ein Ende der Aorta mit einer kleinen Arterienklemme verschließen

- mit 0,05% Collagenase füllen, Verdau für 50 min bei 37°C
- verdaute Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen spülen
- Aorta dreimal mit circa 1 ml 0,05% Collagenase spülen
- Aorta dreimal mit circa 1 ml FBS spülen
- 5 min, 1200 rpm zentrifugieren
- Zellpellet in Medium 199 (20% FBS) aufnehmen und aussäen, Schalen vorher mit Fibro-nektin beschichten
- Zellen bis zur Konfluenz wachsen lassen, danach normal weiter kultivieren

2.2.11.2 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin von den Kulturschalen abgelöst und in ein entsprechendes Volumen frisches Medium (abhängig von der Größe des verwendeten Kulturgefäß) überführt. Die glatten Muskelzellen wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:4 gesplittet.

- Zellen 2 x mit HBSS waschen
- Zellen mit 1 x Trypsin/EDTA überschichten
- Inkubation bei 37°C bis sich die Zellen abgelöst haben
- Zellsuspension in ein Zentrifugengefäß überführen und 7 min bei 1200 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellpellet in frischem Medium 199 (20% FBS) resuspendieren und aussäen

2.2.11.3 Charakterisierung von Zellen

Die verwendeten Primärkulturen von glatten Muskelzellen wurden mit immunologischen Methoden auf Verunreinigungen mit anderen Zelltypen überprüft. Verwendet wurden hierzu verschiedene Antikörper die gegen Proteine, die für einzelne Zelltypen charakteristisch sind, gerichtet waren. Zur Identifikation von glatten Muskelzellen wurden Antikörper, die gegen das „ α -smooth muscle actin“ und das „smooth muscle myosin heavy chain“ gerichtet waren, verwendet. Endothelzellen wurden mit einem Antikörper gegen das Protein „von Willebrand Faktor“ nachgewiesen, Fibroblasten mit einem Antikörper gegen das „human fibroblast surface protein“. Der zweite Antikörper war mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cy3 markiert, die immunologische Färbung konnte daher in einem Fluoreszenz-Mikroskop nachgewiesen werden. Zur Orientierung wurden die Zellkerne mit dem Farbstoff DAPI angefärbt. Für die Färbungen wurden die Zellen in Schalen mit sechs Vertiefungen auf Deckgläsern angezogen, alle Wasch- und Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur in den Schalen durchgeführt.

- Zellen 2 x mit 3 ml HBSS waschen
- Zellen zur Fixierung 10 min mit 1 ml Paraformaldehyd-Lösung (4%) überschichten
- Zellen 2 x mit 3 ml HBSS waschen, beim zweiten Waschen 5 min inkubieren
- Zellen 10 min mit 2 ml 0,2% Triton-X100 in 1 x PBS permeabilisieren
- dreimal 5 min mit 3 ml HBSS waschen

- Waschpuffer vollständig absaugen, Zellen für 1 h mit 100 μ l des primären Antikörpers (in 1 x PBS, 5% FBS) inkubieren
- dreimal 5 min mit 3 ml HBSS waschen
- Waschpuffer vollständig absaugen, Zellen für 45 min mit 100 μ l des sekundären Antikörpers (in 1 x PBS, 5% FBS) inkubieren, dabei vor Licht schützen
- dreimal 5 min mit 3 ml HBSS waschen
- Waschpuffer vollständig absaugen, Zellen für 20 min mit 100 μ l DAPI (1 x PBS) inkubieren, dabei vor Licht schützen
- dreimal 5 min mit 3 ml HBSS waschen
- mit Fluoromount G eindeckeln und mit Nagellack abdichten

2.2.11.4 Lagerung von Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigen Stickstoff. Aufgenommen wurden die Zellen in FBS mit 20% DMSO

- Zellen 2 x mit HBSS waschen
- Zellen mit 1 x Trypsin/EDTA (Gibco) überschichten
- Inkubation bei 37°C bis sich die Zellen abgelöst haben
- Zellsuspension in ein Zentrifugengefäß überführen und 7 min bei 1200 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Zellpellet in 800 μ l FBS resuspendieren, 200 μ l DMSO zufügen
- Zellsuspension bei -80°C einfrieren und anschließend in flüssigem Stickstoff lagern

2.2.11.5 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist eine indirekte Methode zur Bestimmung der Zellzahl, er beruht auf der Umsetzung des Farbstoffes MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen (Mosmann 1983; Denizot und Lang 1986). Das resultierende, in Wasser unlösliche Formazan kann dann im Photometer gemessen werden und gibt ein Maß für die Menge und Aktivität der Zellen. Der Assay wurde nach folgendem Protokoll in Schalen mit sechs Vertiefungen durchgeführt:

- Zellen 2 x mit 3 ml HBSS waschen
- Zellen mit 2 ml Medium 199 (ohne Phenolrot, ohne FBS, 1 mg/ml MTT) überschichten
- Inkubation bei 37°C für 3 h
- Überstand abnehmen
- 4 ml Isopropanol zu den Zellen geben, blauen Farbstoff auswaschen
- bei 560 nm im Photometer messen, Referenzmessung bei 690 nm

3 Ergebnisse

Die morphologischen und histologischen Vorgänge, die dem Wachstum von Kollateralarterien zugrunde liegen, sind in den vergangenen Jahren vielfältig untersucht worden (Ito u. a. 1997b; Scholz u. a. 2000). Die molekularen Grundlagen der Arteriogenese sind hingegen noch weitgehend unerforscht. Ansätze zur Aufklärung der Zusammenhänge, die die Arteriogenese regulieren, betreffen im allgemeinen die Analyse von Faktoren, welche bereits im Zusammenhang mit der Angiogenese isoliert wurden (Deindl u. a. 2001a). Die Zielsetzung dieser Arbeit war hingegen, differentiell exprimierte Gene zu isolieren, deren Beteiligung an der Arteriogenese noch nicht bekannt war.

Hierfür ist es nötig, eine Methode zur Analyse der Expression von Genen zu wählen, die keine Informationen über die Sequenz der zu untersuchenden Gene benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der DDRT-PCR verwendet. Die hierzu benötigte RNA wurde aus wachsenden Kollateralen gewonnen. Die Präparation der Kollateralen aus dem umgebenden Gewebe kann beim Kaninchen, aufgrund der Größe, mit geringem Aufwand durchgeführt werden. Die Kollateralen haben bereits drei Tage nach Okklusion der Arteria femoralis deutlich an Größe gewonnen und können anhand bestimmter Kriterien von ruhenden Gefäßen unterschieden werden. Zur Unterscheidung wurde das Erscheinungsbild und die Aufteilung in „Stem“, „Midzone“ und „Reentrant“ wie sie von Longland (1953) für Kollateralen vorgeschlagen wurde, verwendet. Insbesondere drei Wochen nach Verschluss der Femoralarterie ist die korkenzieherartige Windung der wachsenden Kollateralen ein sicheres Erkennungszeichen; siehe hierzu auch die Abbildung 1.3. Als Vergleich für die Untersuchungen wurden ruhende Gefäße aus Tieren ohne Verschluss der Femoralarterie, deren Größe mit der der Kollateralen vergleichbar war, isoliert. Die Isolation der RNA aus den Kollateralen und den Kontrollgefäßen erfolgte nach einer Standardmethode (siehe Seite 28).

3.1 Isolierung von differentiell exprimierten Klonen mit Hilfe der DDRT-PCR

Für die DDRT-PCR wurden 48 verschiedenen Primerkombinationen, jeweils aus einem „geankertem“ OligodT-Primer und einem Primer mit einer zufälligen Sequenz bestehend (siehe Tabelle 2.2), verwendet. Es konnten 191 Genfragmente isoliert werden, die eine mögliche differentielle Expression zeigten, also deutliche Unterschiede in der Intensität der zugehörigen PCR-Produkte. Eine Aufstellung sämtlicher isolierter Genfragmente mit Angaben zu den Ergebnissen der Homologievergleiche und der Art der Expressionsänderung findet sich im Anhang auf Seiten 95–100. Die Anzahl der Klone, die zu den beiden untersuchten Zeitpunkten drei Tage und drei Wochen nach Okklusion der Femoralarterie isoliert wurden, war annähernd gleich (91 zu 100 Klone). Unter Berücksichtigung der Art der Expressionsänderung fiel aber auf, dass deutlich mehr Klone eine Abnahme der Expression zeigten. Nach drei Tagen Okklusion wurden 60 Klone vermindert exprimiert, nach drei Wochen Okklusion waren es 77 Klone mit verminderter Expression. Anhand der gefundenen Homologien konnten die Klone zu Gruppen zusammengefasst werden (Tabelle 3.1). Die Unterscheidung, ob ein Klon einer bestimmten Gruppe zugehörig

war, wurde anhand des Grades der Homologie getroffen. Ab einer Homologie von 75% wurde die Identität der Genfragmente als bestätigt angesehen. Die Mehrzahl der Klone zeigte Homologien zu bekannten Genen.

Tab. 3.1: Einteilung der isolierten Klone in Homologiegruppen

Homologiegruppe	Anzahl
Klone mit Homologie (>75%) zu bekannten Genen	95
Klone ohne signifikante Homologie(<75%) zu bekannten Genen	70
mitochondriale Gene	19
ribosomale Gene	7
Gesamtzahl der isolierten Klone	191

Nach der Isolation der möglichen differentiell exprimierten Klone mit Hilfe der DDRT-PCR war der nächste Schritt die Bestätigung der differentiellen Expression. Da aufgrund der Anzahl der isolierten Klone eine direkte Bestätigung mit quantitativen Methoden nicht möglich war, wurde eine erste Überprüfung der Klone im Slot-Blot Verfahren durchgeführt. Hierzu wurden die Klone in einer PCR amplifiziert, die gereinigten Produkte auf Membranen fixiert und anschließend hybridisiert. Um einen Überblick zu erhalten, wurden alle isolierten Klone in dieser Weise überprüft. Die weiteren Untersuchungen beschränkten sich auf die Klone, die keine oder nur geringe Homologie zu bekannten Genen zeigten und in ihrer differentiellen Expression im Slot-Blot Verfahren bestätigt werden konnten. Von den 70 Klone die theoretisch zu überprüfen waren, wurden sieben für die „Northern Hybridisierung“ ausgewählt: AK19a1, AK66a2; AK74b2, AK81b1, AK86b2 und AK105b2. Diese Klone waren unbekannt, zeigten also keine Homologie zu bekannten Genen, bzw. nur Homologien zu größeren Genfragmenten aus verschiedenen Sequenzierprojekten. Als eine Überprüfung des Konzeptes wurden auch zwei Genfragmente, die Homologien zu bekannten Genen aufwiesen, in ihrem Expressionsmuster untersucht. Im einzelnen handelte es hierbei um die Klone AK35b1 (Homologie zu „ γ -smooth muscle actin“¹, *Homo sapiens*, Acc. No. X16940) und AK115b (Homologie zu „ α -smooth muscle actin“, *O. cuniculus*, Acc. No X60732). Eine verminderte Expression dieser Gene ist ein Marker für proliferierende Gefäßmuskelzellen und während der Arteriogenese beschrieben (Cai u. a. 2000). Der Klon AK35b1 zeigte drei Tage nach Okklusion noch keine Abnahme der mRNA Menge, der Klon AK115b war zu diesem Zeitpunkt schon in seiner Expression verringert (70% des Kontrollwertes). Drei Wochen nach Verschluss der Femoralarterie war bei beiden Genen eine deutliche Reduktion auf 50%, bzw. 35% der basalen Expression zu verzeichnen, wie in der Abbildung 3.1² dargestellt.

Diese und alle weiteren „Northern Blots“ wurden auf die Expression der 18SrRNA normalisiert, um zufällige Unterschiede, die sich aus einem eventuellem ungleichmäßigem Auftrag der Probe ergaben, zu korrigieren. Die 18S rRNA wurde gewählt, da hierbei eine differentielle Ex-

¹In dieser Arbeit wird bei der Benennung von Genen und Proteinen die Bezeichnung verwendet, die auch in der englischsprachigen Literatur verwendet wird. Die Erläuterungen zu den verwendeten Abkürzungen sind im Anhang 5.3 auf Seite 100 zu finden.

²Alle in dieser Arbeit in Abbildungen und Graphen dargestellte Versuchsergebnisse sind repräsentative Beispiele aus den Versuchsserien. Alle Versuche wurden zur Absicherung der Ergebnisse in mindestens drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt.

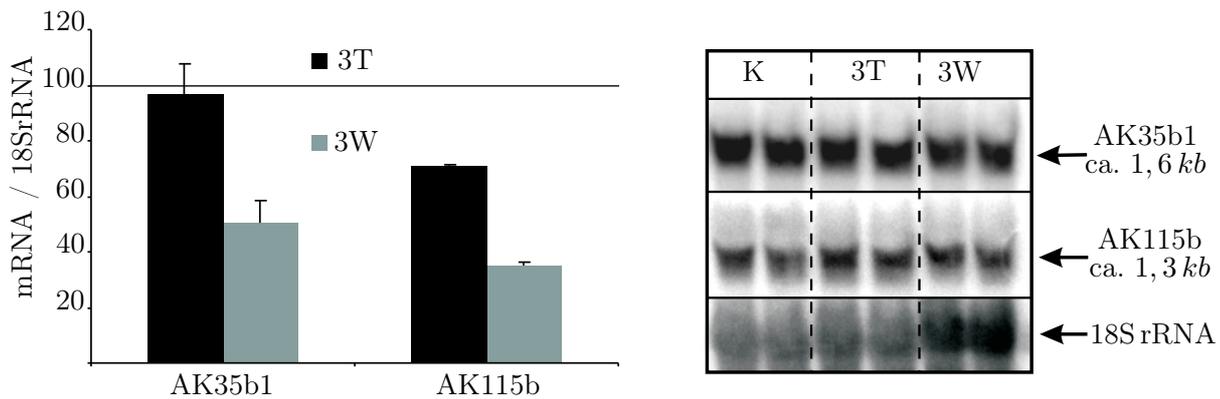


Abb. 3.1: Hybridisierung mit den Klonen AK35b1 und AK115b. Die mittels DDRT-PCR isolierten Klone Ak35b1 (Homologie zu „ γ -smooth muscle actin“, *H. sapiens*, Acc. No. X16940) und AK115b (Homologie zu „ α -smooth muscle actin“, *O. cuniculus*, Acc. No X60732) dienten als Bestätigung des experimentellen Ansatzes. Die Expression von „ γ -smooth muscle actin“ (AK35b1) war nach dreiwöchigem Wachstum der Kollateralen auf 50% des Kontrollwertes gefallen. Der Klon AK115b war bereits nach drei Tagen in seiner Expression reduziert (70% des Kontrollwertes), drei Wochen nach Verschluss der Femoralarterie betrug die Expression nur 35% des Kontrollwertes. Wie bei Cai u. a. (2000) beschrieben, ist das „ α -smooth muscle actin“ in wachsenden Kollateralen deutlich reduziert. Dies zeigte, dass mit der Methode der DDRT-PCR Gene isoliert werden können, die während der Arteriogenese differentiell exprimiert werden. Zur Normalisierung der Werte diente die Rehybridisierung mit einer Sonde gegen die 18S rRNA (unten). Da nur die Durchführbarkeit des experimentellen Ansatzes gezeigt werden sollte, wurde lediglich eine Hybridisierung mit diesen Sonden vorgenommen. Eine Überprüfung auf statistische Signifikanz konnte daher nicht erfolgen. Die Expression des jeweiligen Genes in Kontrollgefäßen wurde auf 100% gesetzt. (K = Kontrolle, 3T = 3 Tage nach Okklusion, 3W = 3 Wochen nach Okklusion).

pression nach Okklusion der Femoralarterie nahezu ausgeschlossen ist. Die besondere Eignung der 18S rRNA als Gen zur Normalisierung wurde bereits mehrfach publiziert (Tsuji u. a. 2002; Deindl u. a. 2002). Die beiden Gene verhielten sich in ihrer Expression wie angenommen. Dies kann als Bestätigung des experimentellen Ansatzes gewertet werden. Außerdem unterstreicht dieser Befund, dass mit Hilfe der DDRT-PCR Gene isoliert werden können, die während der Arteriogenese differentiell exprimiert sind.

3.2 Überprüfung der differentiellen Expression

Die sieben DDRT-PCR Fragmente, die für eine weitere Überprüfung ausgewählt worden waren, wurden als Sonden für „Northern Hybridisierungen“ eingesetzt. Jedes Fragment wurde in drei verschiedenen Hybridisierungen überprüft. Die Ergebnisse wurden wiederum auf die 18SrRNA normalisiert und gemittelt. Angegeben sind diese und alle weiteren Ergebnisse aus Hybridisierungen als Prozent der Kontrolle, die auf den Wert von 100% festgesetzt wurde. Die Ergebnisse

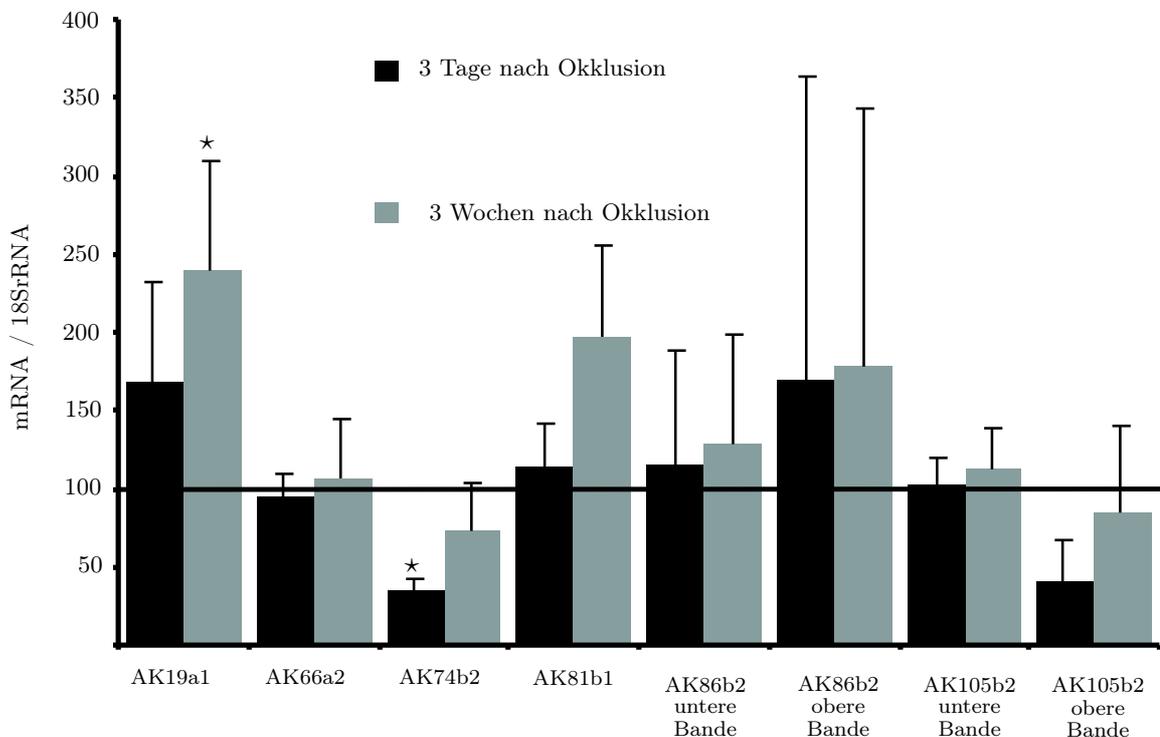


Abb. 3.2: Zusammenstellung der verschiedenen DDRT-PCR-Klone und ihrer Expression im Vergleich zur Kontrolle. Alle Werte sind als Prozent der Kontrolle angegeben und auf die 18SrRNA normalisiert. Die Expression des jeweiligen Klones in den Kontrollgefäßen wurde auf 100% gesetzt. Bei den Klonen, die in der Hybridisierung mit zwei verschiedenen mRNA-Molekülen hybridisierten, wurden die entsprechenden Banden getrennt ausgewertet. Bei zwei Klonen wurde ein signifikanter Unterschied der Expression im Vergleich zur Kontrolle gefunden ($\star p < 0,05$). Die Klone Ak19a1 und AK74b2 wurden daher für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

sind in der Abbildung 3.2 dargestellt. Die Klone AK86b2 und AK105b2 zeigten in der Hybridisierung jeweils zwei Banden, die getrennt ausgewertet wurden. Eine statistische Auswertung

der ermittelten Werte ergab nur bei zwei Werten einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle: die Expression des Klon AK19a1 (Abbildung 3.3) war drei Wochen nach Okklusion der A. femoralis, die Expression von Klon AK74b2 (Abbildung 3.4) war drei Tage nach Okklusion

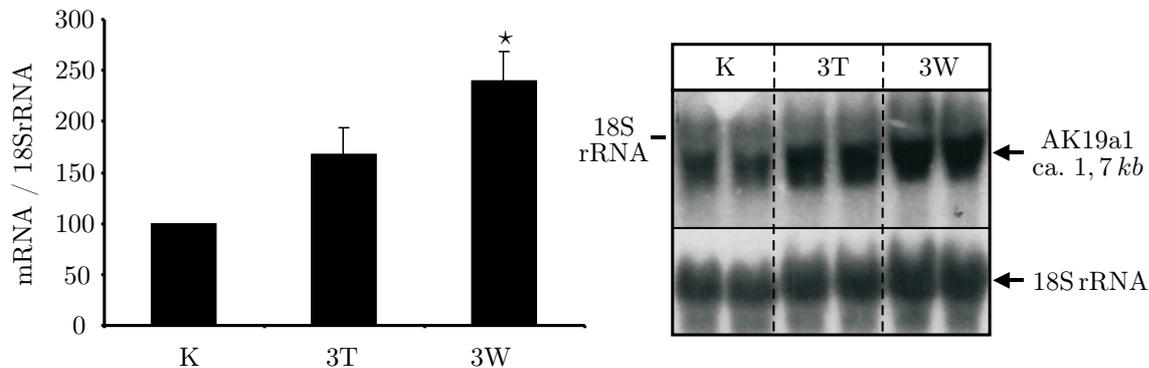


Abb. 3.3: Hybridisierung mit dem Klon AK19a1. Dieser Klon hybridisierte mit einer mRNA von ca. 1,7 kb. Nach den verwendeten Kriterien hatte diese mRNA keine Homologie zu bekannten Genen. Das zugehörige Gen zeigte eine deutlich differentielle Expression während des Wachstums von Kollateralen. Drei Tage nach Beginn des Kollateralwachstums stieg die Expression auf 168% des Kontrollwertes an, nach drei Wochen war eine nochmalige Steigerung auf 240% erfolgt ($\star p < 0,05$). Zur Normalisierung der Werte diente die Rehybridisierung mit einer Sonde gegen die 18S rRNA (unten). Die Position der 18S rRNA ist zur Orientierung markiert. (K = Kontrolle, 3T = 3 Tage nach Okklusion, 3W = 3 Wochen nach Okklusion).

der Femoralarterie signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (jeweils $p < 0,05$). Bei allen anderen Klonen war keine statistische Signifikanz nachweisbar. Die gemittelten Expressionswerte betragen für den Klon AK19a1 168% der Kontrolle nach drei Tagen Okklusion der Femoralarterie, nach drei Wochen Okklusion stieg der Wert nochmals auf 240%. Der Klon AK74b2 zeigte ebenfalls eine deutliche differentielle Expression. Nach drei Tagen Okklusion der A. femoralis sank die Expression dieses Gens auf 35% des Kontrollwertes. Drei Wochen nach Verschluss der Femoralarterie betrug der Wert der Expression 73% des Kontrollwertes. Wie oben bereits erwähnt, handelt es sich bei diesen beiden Klonen um solche, die keine Homologie zu bekannten Genen aufweisen. Für die weitere Charakterisierung dieser Klone war es damit wichtig, mehr Informationen über die Sequenzen zu gewinnen, um so eine bessere Identifizierung zu ermöglichen. Da die beiden Klone mit der DDRT-PCR isoliert wurden, lagen die bekannten Sequenzabschnitte im 3'-Bereich der zugehörigen Gene. Zur Identifizierung der „upstream“ gelegenen Abschnitte wurde eine 5'-RACE PCR durchgeführt (siehe Seite 35). Die hierfür nötigen genspezifischen Primer (74GSP und 74NGSP, siehe Tabelle 2.2) wurden nach den Vorgaben des Herstellers des verwendeten Kits anhand der bekannten Sequenzen entwickelt. Für den Klon AK74b2 war es möglich mit dem Klon AK74F3 eine cDNA von circa 2,5 kb zu isolieren, die in der Hybridisierung mit der selben mRNA wie der Klon AK74b2 hybridisierte und auch eine entsprechende Änderung der Expression nach Verschluss der Femoralarterie zeigte. Für den Klon AK9a1 war es mit der gewählten Methode nicht möglich, die vollständige cDNA zu isolieren, daher beschränkte sich die weitere Arbeit auf den Klon AK74b2/74F3.

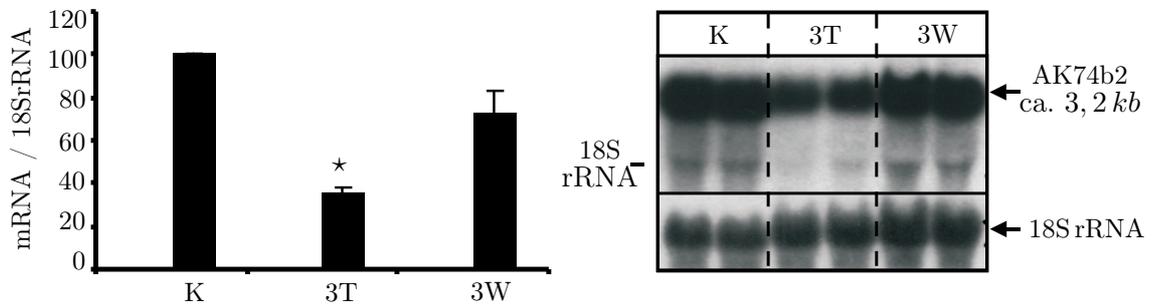


Abb. 3.4: Hybridisierung mit dem Klon AK74b2. Der Klon AK74b2 hybridisierte in der Northern Hybridisierung mit einer mRNA von ca. 3,2 kb. Dieser DDRT-PCR Klon hatte eine Länge von 286 bp und zeigte keine Homologien zu bekannten Genen. Nach drei Tagen Okklusion war die Expression der mRNA auf 35% ($\star p < 0,05$) des Kontrollwertes abgesunken, nach drei Wochen betrug die Expression 73% im Vergleich zur Kontrolle. Zur Normalisierung der Werte diente die Rehybridisierung mit einer Sonde gegen die 18S rRNA (unten). Die Position der 18S rRNA ist zur Orientierung markiert. (K = Kontrolle, 3T = 3 Tage nach Okklusion, 3W = 3 Wochen nach Okklusion)

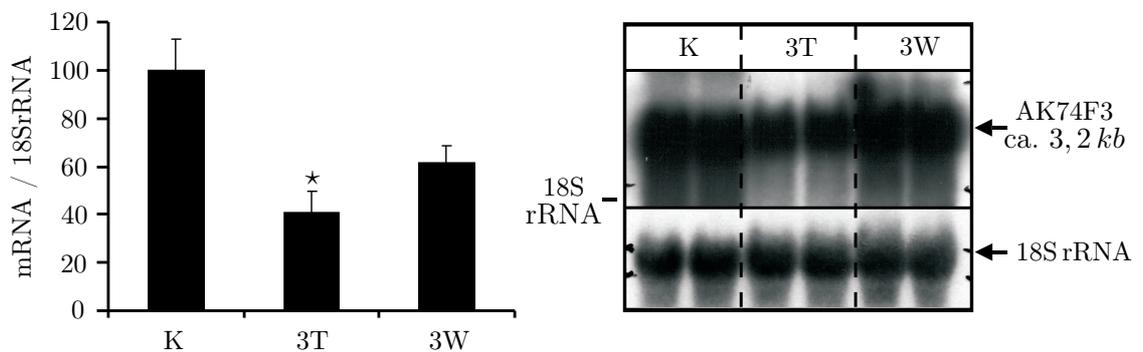


Abb. 3.5: Hybridisierung mit dem Klon AK74F3. Der Klon AK74F3 wurde durch eine 5'-RACE PCR, ausgehend von der Sequenz des Klones AK74b2, isoliert. Die dabei erhaltene cDNA hatte eine Länge von ca. 2,5 kb und beinhaltete einen Bereich von 896 bp, der für ein Protein von 298 Aminosäuren kodierte. Ein Homologievergleich zeigte mit 87% eine hohe Homologie zum Gen Osteoglycin aus dem Rind (Genbank Acc. No. M37974). Das von der cDNA kodierte Protein war zu 77% homolog zum entsprechenden bovinen Protein (Genbank Acc. No. NP_776371). Der Klon AK74F3 (Osteoglycin) hybridisierte mit der gleichen mRNA wie der ursprüngliche DDRT-PCR Klon Ak74b2. Auch die Änderungen in der Expression entsprachen den vorher beobachteten. Nach drei Tagen Okklusion der Femoralarterie war die Expression auf 40% des Kontrollwertes abgesunken ($\star p < 0,05$), nach drei Wochen waren es 61%. Zur Normalisierung der Werte diente die Rehybridisierung mit einer Sonde gegen die 18S rRNA (unten). Die Position der 18S rRNA ist zur Orientierung markiert. (K = Kontrolle, 3T = 3 Tage nach Okklusion, 3W = 3 Wochen nach Okklusion)

3.3 Analyse des Klons AK74F3

Der Klon AK74F3 wurde unter Einsatz der in der Tabelle 2.2 angegebenen Primer 74F3F1 bis 74F3R11 sequenziert. Ein Homologievergleich mit der ermittelten Sequenz des Klons AK743 ergab eine hohe Homologie zum „osteoinductive factor“ aus *Bos taurus* (87%, Genbank Acc. No. M37974). Dieses Gen wurde zuerst von Bentz u. a. (1989) isoliert. Die Namensgebung erfolgte, da diesem Faktor anfänglich eine Wirkung auf das Wachstum von Knochen zugeschrieben wurde. Weitere Untersuchungen zeigten aber, dass dieser Effekt auf das Wachstum von Knochen durch eine Verunreinigung des isolierten Proteins mit den Proteinen „bone morphogenetic protein 1“ und „bone morphogenetic protein 2“ (Bentz u. a. 1991) hervorgerufen wurde. In dem zitierten Artikel wurde daher das Protein und das entsprechende Gen in „Osteoglycin“ umbenannt. Neben der Osteoglycin mRNA-Sequenz aus *Bos taurus* und nun *O. cuniculus*, sind weiterhin noch die Sequenzen aus *M. musculus*, *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis* und *Coturnix japonica* bekannt. Die mRNA- und Protein-Sequenzen sind untereinander in hohem Grad homolog. Wie aus Tabelle 3.2 ersichtlich, ist bei den Mammalia der Grad der Homologie am höchsten, von diesen sind *X. laevis* und *G. gallus* deutlich abgegrenzt und auch untereinander haben diese beiden Spezies eine geringere Homologie.

Tab. 3.2: Vergleich der Osteoglycin-Sequenzen aus verschiedenen Spezies. Die Homologie ist auf Ebene der RNA und der Proteine (Werte in Klammern) in Prozent angegeben.

	<i>O. cuniculus</i>	<i>X. laevis</i>	<i>M. musculus</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>B. taurus</i>	<i>C. japonica</i>
<i>G. gallus</i>	65,18 (64,02)	67,39 (59,32)	71,70 (59,33)	74,62 (64,21)	70,15 (59,33)	70,54 (62,88)	92,60 (96,93)
<i>O. cuniculus</i>		66,75 (59,86)	77,66 (82,55)	69,58 (87,58)	77,77 (82,55)	76,84 (86,57)	70,95 (64,90)
<i>X. laevis</i>			69,42 (58,70)	69,69 (58,52)	69,94 (60,13)	69,06 (58,19)	66,95 (59,86)
<i>M. musculus</i>				84,78 (84,89)	90,28 (94,63)	76,00 (85,90)	71,92 (60,87)
<i>H. sapiens</i>					86,80 (85,23)	76,77 (92,28)	65,35 (65,77)
<i>R. norvegicus</i>						85,15 (84,89)	67,82 (60,87)
<i>B. taurus</i>							70,16 (64,09)

Die isolierte Osteoglycin cDNA enthielt einen Bereich von 896 bp, der für ein Protein von 298 Aminosäuren kodierte. Dieses Protein hatte eine Homologie von jeweils 87% zum humanen (Acc. No. NP148935 (Madison u. a. 1990)) und bovines (Acc. No. AAB70264 (Funderburgh u. a. 1997)) Osteoglycin. Das theoretische Molekulargewicht betrug 33920 Da. Die Aminosäuresequenz des Proteins Osteoglycin beginnt mit einem Signalpeptid, das die ersten 19 Aminosäuren umfasst. Das Molekulargewicht ohne dieses Signalpeptid beträgt 31740 Da. An drei Positionen findet sich die Konsensussequenz für eine N-Glykosylierung: Aminosäure 214, 245 und 258. Dies entspricht auch den Angaben in der Literatur, die für humanes und bovines Osteoglycin

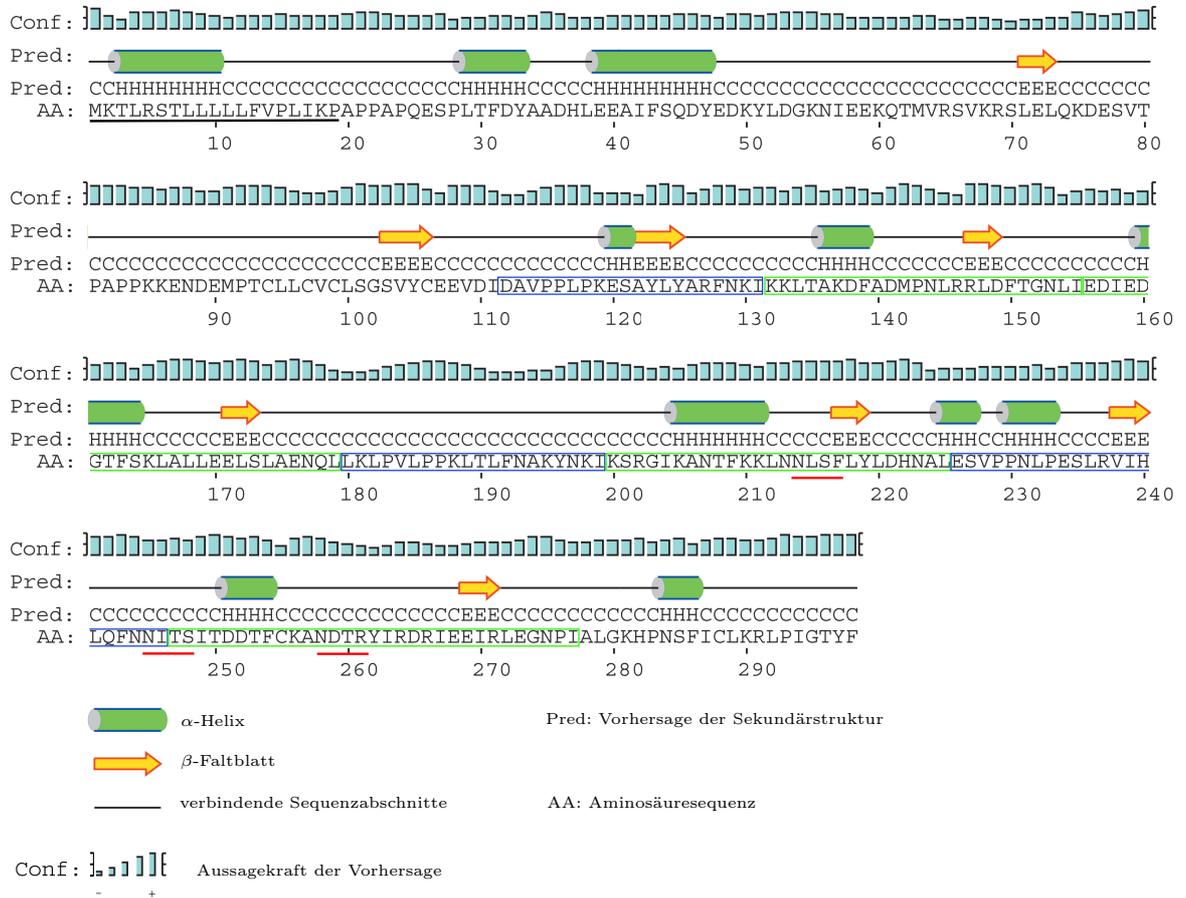


Abb. 3.6: Sekundärstruktur des Proteins Osteoglycin, ermittelt mit dem Programm „PSI-RED“ (McGuffin u. a. 2000). Die isolierte Osteoglycin cDNA enthielt einen Bereich von 896 bp, der für ein Protein von 298 Aminosäuren kodierte. Die Sequenz begann mit einem Signalpeptid, das die ersten 19 Aminosäuren umfasste. Ebenfalls markiert sind Abschnitte, deren Sekundärstruktur war die Konsensussequenz für eine N-Glykosylierung zu finden (rot unterstrichen). Osteoglycin gehört zur Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane. Diese Familie von Proteinen ist gekennzeichnet durch eine Domäne in der mehrere Wiederholungen einer leucinreichen Sequenz auftreten (so genannter „leucine rich repeat; LRR“). In der Aminosäuresequenz waren sieben dieser Wiederholungen zu finden. Bei den LRRs wird zwischen einer kurzen Variante mit circa 21 Aminosäuren (Typ „S“, blau markiert) und einer längeren mit circa 26 Aminosäuren (Typ „T“, grün markiert) unterschieden (siehe hierzu Matsushima u. a. (2000)). Für Osteoglycin war die Abfolge der Motive: *STTSTST*. Der letzte Repeat (Typ „T“, der die Aminosäuren 247 bis 277 umfasste, wich insofern von dieser Regel ab, als dass er eine Insertion von sieben Aminosäuren beinhaltete. Bei strenger Auslegung der Definition der LRR enthielt Osteoglycin also nur sechs Wiederholungen.

zwei bis drei N-Glykosylierungen angeben (Iozzo 1997). Osteoglycin ist damit ein Glykoprotein, das zur Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane gehört. Diese Familie von Proteinen ist gekennzeichnet durch eine Domain in der mehrere Wiederholungen einer leucinreichen Sequenz auftreten (so genannter „leucine rich repeat; LRR“) (Iozzo 1997). Eine genauere Darstellung der Sekundärstruktur, basierend auf der für Osteoglycin aus *O. cuniculus* ermittelten Sequenz ist in der Abbildung 3.6 zu finden.

Die Mitglieder der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane sind untereinander in unterschiedlichem Grad homolog. Osteoglycin gehört zusammen mit den Proteinen Epiphykan und Opticin zur Klasse III der „small leucine-rich“ Proteoglykane. Zu diesen zeigt es eine Homologie von 40%, während es mit den anderen Protein aus anderen Klassen nur zwischen 17 und 24% homolog ist. Epiphykan und Osteoglycin unterscheiden sich weiterhin dadurch von den anderen Mitgliedern der Proteinfamilie, dass sie nur sieben anstatt zwölf LRRs aufweisen. Alle Mitglieder dieser Familie zeigen sekundäre Modifikationen in Form von Glykosylierungen. Beim Osteoglycin handelt es sich bei diesen Modifikationen um Keratansulfat. Keratansulfat ist ein Polymer aus sich wiederholenden N-acetyllactosamin Einheiten, die aus N-acetyl-D-Glucosamin und D-Galactose bestehen.

Wie oben bereits erwähnt, zeigte der Klon AK74F3, also die klonierte Osteoglycin cDNA in der Hybridisierung Expressionsunterschiede, die denen des ursprünglichen DDRT-PCR Klones AK74b2 entsprachen. Nach der ersten Bestätigung wurden die Untersuchungen zum Expressionsprofil ausgeweitet und auch die Expression sieben Tage nach Verschluss der A. femoralis überprüft. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass auch nach sieben Tagen Wachstum der Kollateralen eine geringere Expression der Osteoglycin mRNA zu beobachten war. Wie in Abbildung 3.7 gezeigt, wurde ein Wert von 43% im Vergleich zur Kontrolle gefunden ($p < 0,05$).

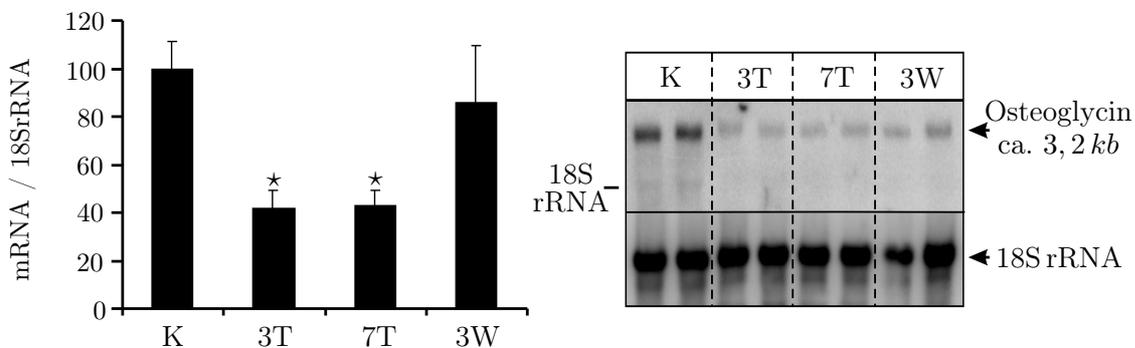


Abb. 3.7: Hybridisierung mit dem Klon AK74F3, 7 Tage Okklusion. Um den Verlauf der Expression der Osteoglycin mRNA nach Verschluss der Femoralarterie genauer zu charakterisieren, wurde auch ein Zeitraum von sieben Tagen nach Okklusion untersucht. Zu diesem Zeitpunkt ist Osteoglycin ebenfalls deutlich in seiner Expression reduziert, es wurde ein Wert von 43% der Kontrolle gefunden ($p < 0,05$). Zur Normalisierung der Werte diente die Rehybridisierung mit einer Sonde gegen die 18S rRNA (unten). Die Position der 18S rRNA ist zur Orientierung markiert. (K = Kontrolle, 3T = 3 Tage nach Okklusion, 7T = 7 Tage nach Okklusion 3W = 3 Wochen nach Okklusion)

Nach dieser Bestätigung der differentiellen Expression des Klons AK74F3 stellte sich die Frage nach der Expression von Osteoglycin in den verschiedenen Organen und Geweben. Hierzu wurde ein RNA-Blot angefertigt, der RNA von unterschiedlichen Organen aus dem Kaninchen beinhaltet. Ein deutliches Signal für Osteoglycin zeigte sich in der anschließenden Northern

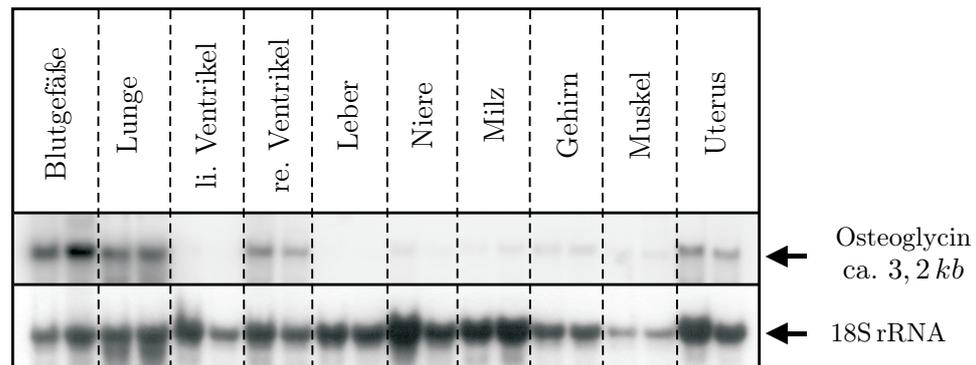


Abb. 3.8: Organblot, hybridisiert mit dem Klon AK74F3. Neben der Expressionsänderung während der Arteriogenese, wurde ebenfalls untersucht welche Expressionshöhe Osteoglycin in verschiedenen Organen und Geweben zeigte. Hierzu wurde ein RNA-Blot angefertigt, der RNA von unterschiedlichen Organen aus *O. cuniculus* beinhaltet. Ein deutliches Signal für Osteoglycin zeigte sich in der anschließenden Northern Hybridisierung für die Blutgefäße, die Lunge, den rechten Ventrikel des Herzens und den Uterus. Beim Uterus ist zu beachten, dass dieser aus einem trächtigen Tier entnommen wurde. In den anderen untersuchten Organen waren nur schwache Signale zu beobachten. Daher wurde geschlossen, dass Osteoglycin hauptsächlich in reich durchbluteten Organen exprimiert wurde. Dies stärkte die Vermutung, das Osteoglycin vornehmlich mit Blutgefäßen assoziiert war. Zur Normalisierung wurde eine Rehybridisierung mit einer Sonde gegen die 18S rRNA durchgeführt (unten).

Hybridisierung für die Blutgefäße, die Lunge, den rechten Ventrikel des Herzens und den Uterus (siehe Abbildung 3.8). In den anderen untersuchten Organen waren nur schwache Signale zu beobachten. Da Osteoglycin auf der RNA- und Proteinebene eine hohe Homologie zum humanen Mimecan aufwies, wurde überprüft ob eine ähnliche Verteilung der Expression in verschiedenen humanen Geweben nachweisbar war. Hierzu wurde ein kommerzieller Blot verwendet. Auf dem „MTE™ Array“ der Firma Clontech war mRNA aus 76 verschiedenen humanen Geweben fixiert, neben normalen, adulten Geweben auch fötale und solche aus verschiedenen Tumorarten. Damit war es gleichzeitig auch möglich zu überprüfen, ob Osteoglycin auch während der Angiogenese exprimiert wird. Auch im humanen Gewebe ergab sich ein Hybridisierungsmuster, das dem in *O. cuniculus* vergleichbar war. Deutliche Signale wurden für die Aorta, den Uterus und die Ovarien erhalten (siehe Abbildung 3.9). Schwache Signale ergaben sich für andere Teile des kardiovaskulären Systems, wie z.B. Herz (linkes und rechtes Atrium, Ventrikel), Teile des Verdauungstraktes (Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum), fötale Gewebe (Herz, Niere, Lunge) und das Rückenmark. Keine Signale wurden für die verschiedenen Tumore gefunden. Dies verdeutlicht, dass Osteoglycin keine Rolle während der Angiogenese spielt.

3.3.1 Differentielle Osteoglycin-Expression während der Embryogenese

Da die Arteriogenese auch Charakteristika zeigt, die an die Embryogenese erinnern, sollte anhand der Embryogenese bei *M. musculus* untersucht werden, ob Osteoglycin auch während dieses Prozesses differentiell exprimiert wird. Hierzu wurde wiederum auf einen kommerziellen Blot zurückgegriffen. Der „Mouse Embryo Full Stage Blot“ der Firma Seegene besteht aus RNA, die zu verschiedenen Zeitpunkte der Embryogenese aus den Embryonen gewonnen wurde (4,5

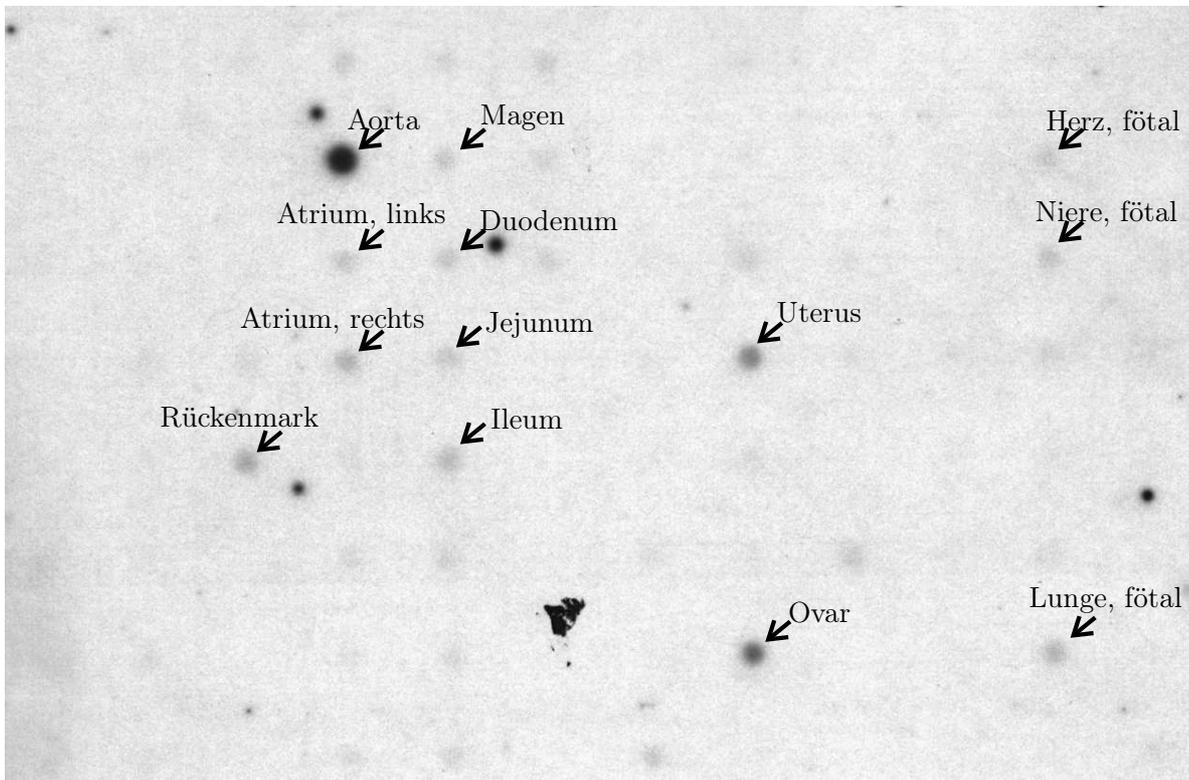


Abb. 3.9: Hybridisierung des MTE™ Array mit dem Klon AK74F3. Dieser kommerziell erhältliche Array (Clontech) enthielt mRNA aus 76 verschiedene humanen Gewebe, neben normalen Geweben auch fötale und solche aus verschiedenen Arten von Tumoren. Verwendet werden konnte dieser Array, da Osteoglycin aus *O. cuniculus* auf der Ebene der mRNA eine hohe Homologie zum humanen Osteoglycin aufwies (89%, Genbank Acc. No. XM 011797.3). Durch das Vorhandensein von mRNA aus Tumorgewebe konnte überprüft werden, ob Osteoglycin auch während der Angiogenese exprimiert wird. Im humanen Gewebe ergab sich ein Hybridisierungsmuster, dass dem in *O. cuniculus* vergleichbar war. Deutliche Signale wurden für die Aorta, den Uterus und die Ovarien erhalten, wobei bei der Aorta das mit Abstand stärkste Signal zu beobachten war. Schwache Signale ergaben sich für andere Teile des kardiovaskulären Systems, wie z.B. linkes und rechtes Atrium, Ventrikel, Teile des Verdauungstraktes (Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum) und das Rückenmark. In verschiedenen fötalen Geweben (Herz, Niere, Lunge) wurden ebenfalls schwache Signale gefunden, korrespondierend mit den Befunden, die während der Embryogenese gewonnen wurden (siehe Abbildung 3.10). Für mRNA, die aus Tumoren gewonnen worden war, wurde kein Signal erhalten.

bis 18,5 Tage nach Befruchtung). Zu den frühen Zeitpunkten (4,5 bis 6,5 Tage nach Befruchtung) war eine starke Osteoglycin-Expression zu sehen (siehe Abbildung 3.10). Diese Expression wurde allerdings nicht durch die Vorgänge im Embryo hervorgerufen, sondern nur durch den Uterus. Bei den frühen Zeitpunkten wurde die RNA aus dem Embryo und dem umgebenden Gewebe einschließlich des Uterus gewonnen. Dies wird auch beim Vergleich mit der Abbildung des „MTE™ Array“ auf Seite 51 und des Organ-Blots auf Seite 50 deutlich. Bei diesen beiden Blots war ein starkes Signal im Uterus zu sehen. Zwischen Tag 7,5 und Tag 10,5 nach Befruchtung waren keine oder nur sehr schwache Signale bemerkbar. Erst ab Tag 11,5 nach Befruchtung waren wieder stärkere Signale zu finden. Ab Tag 10,5 nach Befruchtung wurde die RNA für den Blot nur aus dem Embryo gewonnen. Daher kann der Anstieg in der Osteoglycin-Expression nur durch eine stärkere Expression während der Embryogenese hervorgerufen werden.

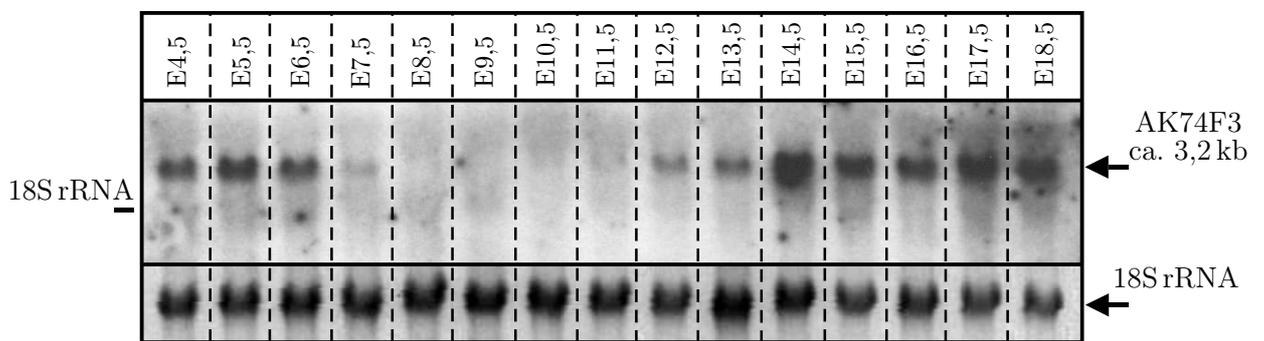


Abb. 3.10: Osteoglycin-Expression in der Mausembryogenese. Der „Mouse Embryo Full Stage Blot“ der Firma Seegene besteht aus RNA, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese aus den Embryonen gewonnen wurde (4,5 bis 18,5 Tage nach Befruchtung). Mit diesem Blot sollte überprüft werden, ob Osteoglycin auch während der Embryogenese eine differentielle Regulation zeigt. Während der frühen Phase der Embryogenese (4,5 bis 6,5 Tage nach Befruchtung) war eine deutliche Osteoglycin Expression nachweisbar. Da zu diesen Zeitpunkten aber RNA verwendet wurde, die aus dem gesamten Uterus mit Embryo isoliert worden war, entsprach das Signal dem schon bekannten aus dem Uterus (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.8). Ab dem Zeitpunkt Tag 10,5 nach Befruchtung wurde zur Isolation der RNA nur der Embryo ohne umgebenden Uterus verwendet. Nach diesem Zeitpunkt sind Unterschiede in Osteoglycin Expression also Folgen einer differentiellen Regulation während der Embryogenese. Zwischen dem Tag 7,5 und dem Tag 10,5 nach Befruchtung war nur eine sehr schwache Expression feststellbar. Beginnend mit dem Tag 11,5 nach Befruchtung begann die Expression der Osteoglycin mRNA aber zu steigen. Ab dem Tag 14,5 war das Niveau der Expression gleichmäßig hoch. Zur Normalisierung wurde eine Rehybridisierung mit einer Sonde gegen die 18S rRNA durchgeführt (unten). Die Position der 18S rRNA ist zur Orientierung markiert. (E4,5 = 4,5 Tage nach Befruchtung, E5,5 = 5,5 Tage nach Befruchtung, usw.)

3.3.2 Lokalisation der Osteoglycin mRNA im untersuchten Gewebe

Nachdem mittels Hybridisierung die differentielle Expression der Osteoglycin mRNA nachgewiesen war, wurde im nächsten Schritt überprüft, in welchen Geweben, bzw. Zellen diese mRNA exprimiert wird. Mit Hilfe einer *in Situ* Hybridisierung wurde gezeigt, dass Osteoglycin in den glatten Muskelzellen der Blutgefäßwand exprimiert wurde (Abbildung 3.11). Verwendet wurde Gewebe, das drei Tage nach Okklusion der Femoralarterie entnommen wurde. In den

Endothelzellen wurde keine Expression gefunden, ebenso nicht in den angrenzenden Gewebereichen. Allerdings waren in Nervenfasern im Muskel Signale zu finden (hier nicht gezeigt, da nicht im direktem Zusammenhang mit der Arteriogenese). Diese Beobachtung wurde durch eine Veröffentlichung von Nagarajan u. a. (2002) unterstützt, die zeigte, dass Osteoglycin in Schwann-Zellen exprimiert wird. Aufgrund der verwendeten Methode, die keine quantitativen Ergebnisse ermöglichte, konnte die differentielle Expression von Osteoglycin in der *in Situ* Hybridisierung nicht gezeigt werden. Zusammenfassend war festzustellen, dass der Klon AK74F3

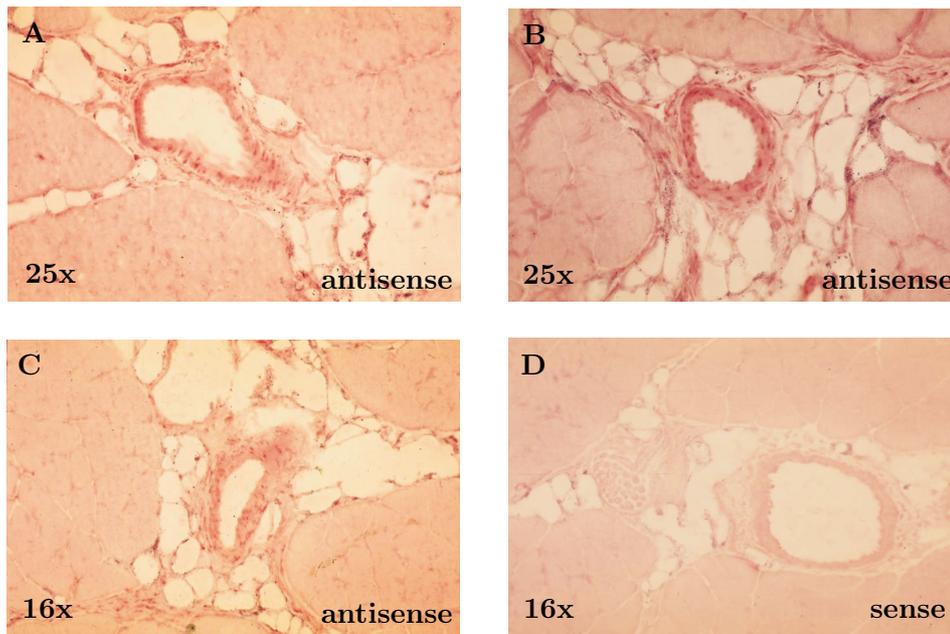


Abb. 3.11: *In Situ* Hybridisierung mit dem Klon AK74F3. Eine *in Situ* Hybridisierung mit dem Klon AK74F3 (Osteoglycin) wurde verwendet, um den Ort der mRNA Expression zu bestimmen. Als Probe wurde *in Vitro* transkribierte, mit Digoxigenin markierte RNA verwendet. Als Template für die Reaktion war die vollständige Osteoglycin cDNA verwendet. Als Kontrolle wurde eine Hybridisierung mit der sense Probe durchgeführt, die keine Signale ergab (D). Verwendet wurden Kryoschnitte (10 μ m) von Kollateralen nach drei Tagen Okklusion. Mit der antisense Probe wurden deutliche Signale in der Schicht der glatten Muskelzellen gefunden (A, B, C). Die Endothelzellen sind negativ, ebenso wurde in den umgebenden Bereichen im Muskel keine Signale gefunden.

nach Verschluss der Femoralarterie eine deutliche differentielle Expression zeigte. Aufgrund des einsetzenden Kollateralwachstums wird die Expression der Osteoglycin mRNA gedrosselt. Ort der Expression der Osteoglycin mRNA sind die glatten Muskelzellen der Gefäßwand.

3.4 Die differentielle Expression des Proteins Osteoglycin

In den vorhergehenden Untersuchungen konnte die differentielle Expression von Osteoglycin auf der Ebene der RNA nachgewiesen werden. Dieser Befund sollte im weiteren auch auf das zugehörige Protein ausgeweitet werden, da das Protein das eigentliche aktive Element darstellt.

Als Hindernis zeigte sich zu diesem Zeitpunkt allerdings die Tatsache, dass kein Antikörper erhältlich war, mit dem eine Untersuchung im gewählten Modell möglich gewesen wäre.

Die verfügbaren Antikörper reagierten entweder nur global mit dem Keratansulfatresten der Keratansulfat-Proteoglykane, ohne zwischen einzelnen Proteinen zu unterscheiden, oder sie waren gegen das Osteoglycin aus dem Rind gerichtet und reagierten nicht mit dem Osteoglycin aus dem Kaninchen. Daher wurde ein polyklonaler Antikörper, der im verwendeten Modell eingesetzt werden konnte, hergestellt. Dies wurde von einem kommerziellen Anbieter (Eurogentec, Belgien) durchgeführt. Als Antigen wurden zwei Peptide aus der Osteoglycin Aminosäuresequenz verwendet. Das erste Peptid (Antikörper 459) umfasste die Aminosäuren Nummer 18 bis Nummer 33³, das zweite Peptid (Antikörper 460) die Aminosäuren Nummer 79 bis Nummer 84 aus der abgeleiteten Osteoglycin Aminosäuresequenz. Es wurden zwei Ratten mit beiden Peptiden immunisiert und das erhaltene Antiserum anschließend mit Hilfe von Affinitätsäulen aufgereinigt. Erhalten wurden bei dem verwendeten Immunisierungsprotokoll zwei Antikörper, die gegen verschieden Bereiche im Osteoglycin gerichtet waren.

Im Westernblot zeigte der Antikörper 460 eine Doppelbande, die eine Größe zwischen ca. 36 und 40 kDa aufwies. Dies entspricht dem theoretischen Molekulargewicht von Osteoglycin. Die Doppelbande deutet auf Unterschiede in der Glykosylierung hin, wie sie durch verschieden zusammengesetzte Seitenketten auftreten können. In der Literatur wird für Osteoglycin (Mi-

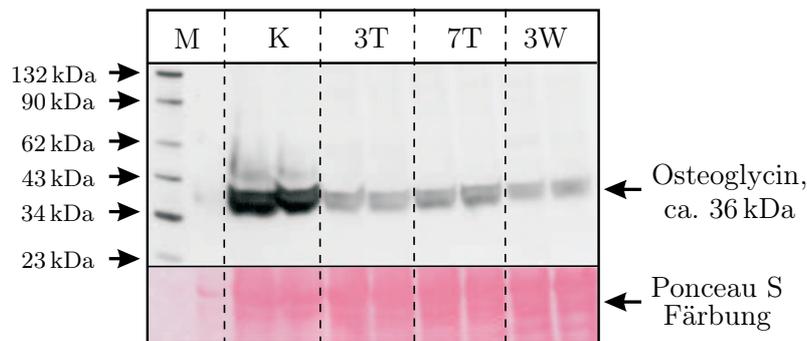


Abb. 3.12: Western-Blot mit dem Antikörper AK460. Der Antikörper 460 war gegen ein Peptid, das die Aminosäuren 79 bis 84 der Osteoglycinsequenz umfasste, gerichtet. In der immunologischen Detektion im Western Blot reagierte er mit einer Doppelbande, die eine Größe zwischen 36 und 40 kDa hatte. Diese Größe entspricht der theoretischen Größe von Osteoglycin, die ohne das Signalpeptid 31,74 kDa betrug. Die Doppelbande war auf Unterschiede in der Glykosylierung zurückzuführen. Die Literaturangaben für die Größe von Osteoglycin (Mimecan, Rind, siehe Funderburgh u. a. (1997)) belaufen sich auf 25 kDa für das eigentliche Protein ohne sekundäre Modifikationen. Ob diese Größe auch für das Osteoglycin aus *O. cuniculus* zutraf wurde später überprüft. Auch auf Proteinebene zeigte Osteoglycin eine differentielle Regulation als Antwort auf die Okklusion der Femoralarterie. Drei Tage nach Okklusion der A. femoralis war eine Reduktion auf 43% des Kontrollwertes zu beobachten ($p < 0,001$), nach sieben Tagen betrug der Wert 48% ($p < 0,01$). Im Gegensatz zu dem im Northern Blot beobachteten Expressionsverlauf war auch nach drei Wochen Kollateralwachstum die Menge des Osteoglycin Proteins noch auf 40% des Kontrollwertes reduziert ($p < 0,01$). Ein gleichmäßiger Auftrag der Proteinproben auf das Gel wurde nach dem Blotten durch Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft (unten). (K = Kontrolle, 3T = 3 Tage nach Okklusion, 7T = 7 Tage nach Okklusion, 3W = 3 Wochen nach Okklusion, M = Cruz Marker Molecular Weight Standard)

mecan, *B. taurus*) ein Größe von 25 kDa angegeben (Funderburgh u. a. 1997). Ob diese Größe

³Bei diesem Peptid wurde die C-terminale Aminosäure Tyrosin gegen Cystein ausgetauscht, um die Kopplung an das Trägermolekül zu ermöglichen.

auch für das Homolog aus *O. cuniculus* zutrifft, die ermittelte Größe also durch die Glykosylierungen über der Größe des eigentlichen Proteinkerns lag, wurde zu einem späteren Zeitpunkt verifiziert.

Die Expressionsunterschiede des Proteins in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Okklusion der Femoralarterie entsprachen denen, die für die mRNA beobachtet wurden. Nach drei Tagen Kollateralwachstum war die Proteinmenge auf 44% des Kontrollwertes abgesunken ($p < 0,001$), nach sieben Tagen waren es 51% des Kontrollwertes (siehe Abbildung 3.12, $p < 0,01$). Auffallend war, dass auch drei Wochen nach Verschluss der Femoralarterie noch eine deutliche Reduktion des Proteins auf ca. 44% des Kontrollwertes in ruhenden Gefäßen bestand ($p < 0,01$). Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen der Northern Hybridisierungen. Bei diesen war nach drei Wochen eine mRNA-Expression von 75% des Kontrollwertes zu beobachten. Die sich daraus ergebende Hypothese, dass die Änderung der Proteinmenge der Änderung der mRNA-Expression mit Verspätung folgt, konnte nicht bestätigt werden. Auch vier Wochen nach Okklusion der Femoralarterie war die Menge an Osteoglycin Proteinmenge noch deutlich reduziert, wie in Abbildung 3.13 gezeigt wird.



Abb. 3.13: Western-Blot mit dem Antikörper 460, 4 Wochen. Mit diesem Western Blot sollte überprüft werden, ob die Menge an Osteoglycin Protein zu einem späteren Zeitpunkt als die mRNA auf den Kontrollwert zurückkehrte. Zum Zeitpunkt 4 Wochen nach Okklusion war die Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle immer noch deutlich auf ca. 40% reduziert. Ein gleichmäßiger Auftrag der Proteinproben auf das Gel wurde nach dem Blotten durch Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft (unten). (K = Kontrolle, 3T = 3 Tage nach Okklusion, 7T = 7 Tage nach Okklusion, 3W = 3 Wochen nach Okklusion, 4W = 4 Wochen nach Okklusion, M = Cruz Marker Molecular Weight Standard)

Im Gegensatz zu den bisher betrachteten Northern Hybridisierungen wurden die verwendeten Western Blots nicht normalisiert. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass keine entsprechenden Proteine zur Normalisierung verfügbar waren. Die normalerweise zur Normalisierung verwendeten Proteine GAPDH und Actin konnten nicht verwendet werden, da sie im Zusammenhang mit der Arteriogenese eine nachgewiesene differentielle Expression aufweisen (GAPDH: Deindl u. a. (2002), Actin: (Cai u. a. 2000)). Ein gleichmäßiger Auftrag der Proteinproben auf das Gel wurde nach dem Blotten durch Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft (siehe Seite 37).

Mit dem zweiten Antikörper 459, der gegen das Peptid aus dem N-terminalen Bereich gerichtet war, war zu diesem Zeitpunkt kein Signal zu erhalten, bzw. nur in den Kontrollproben und nicht in den Proben nach Okklusion.

3.4.1 Immunologische Lokalisation von Osteoglycin im untersuchten Gewebe

Da der Antikörper 460 spezifisch reagierte und Osteoglycin in den Gewebeextrakten erkannte, konnte dieser Antikörper zur immunologischen Detektion von Osteoglycin in wachsenden Kollateralen verwendet werden. Hierzu wurden Gefrierschnitte (Dicke: $7\ \mu\text{m}$) von Gewebeproben aus dem Quadriceps von *O. cuniculus* angefertigt, die sowohl aus Tieren mit Okklusion der Femoralarterie stammten, als auch aus Tieren ohne Okklusion. In der Kontrollsituation - ohne Okklusion der Femoralarterie - wurde ein deutliches Signal für Osteoglycin in der Tunica adventitia der Gefäße gefunden (siehe Abbildung 3.14). Neben diesem Signal in Blutgefäßen war Osteoglycin auch in den umgebenden Arealen zu finden, insbesondere in den die Muskeln umgebenden Faszien. Nach sieben Tagen Wachstum der Kollateralarterien war die Lokalisation des Proteins nicht beeinflusst. Auch das Signal in den Faszien zeigte ein unveränderte Intensität. In den wachsenden Kollateralen war Osteoglycin dahingegen deutlich reduziert. Bis auf geringe Reste war das Protein nicht mehr detektierbar. Die immunologische Reaktion im Gewebeschnitt ergab somit ein Bild, das den Ergebnissen aus dem Western Blot entsprach.

3.4.2 Osteoglycin ist ein Glykoprotein

In der abgeleiteten Osteoglycin Aminosäuresequenz sind drei mögliche Stellen für eine N-Glykosylierung zu finden. Daher sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob Osteoglycin aus *O. cuniculus* an diesen Stellen modifiziert ist. Hierfür wurde der enzymatische Abbau der Seitenketten (siehe 2.2.10.2) gewählt.

Wie in Abbildung 3.15 erkennbar, kommt es durch die Deglykosylierung zu einer Veränderung der Größe des Proteins Osteoglycin. Nach Entfernen der Seitenketten war eine Reduktion des Molekulargewichtes auf ca. 30 kDa zu beobachten. Gleichzeitig mit der Reduktion im Molekulargewicht bewirkte die Entfernung der Seitenketten auch, dass die vorher beobachtete Doppelbande nicht mehr vorhanden war. Erklärbar ist dies dadurch, dass zwei der möglichen drei Glykosylierungsstellen verwendet wurden, aber auch durch eine Veränderung in der Struktur der Glykosylierung. Die Veränderung in der Masse des Proteins beträgt circa 3-4 kDa. Daher ist es wahrscheinlich, dass nur eine der drei möglichen Glykosylierungsstellen verwendet wird.

Beim Vergleich der Signalstärken vor und nach Deglykosylierung war zu beobachten, dass die Signale nach Deglykosylierung subjektiv stärker wurden. Die densitometrische Auswertung ergab aber, dass das Verhältnis der Signale zu einander dem der glykosylierten Proben entsprach (siehe hierzu auch Abbildung 3.12). Dies deutet auf eine sterische Beeinflussung der Antikörperbindung durch die Seitenketten hin. Als nächster Schritt schloss sich die Beantwortung der Frage, ob an allen drei Glykosylierungsstellen eine Modifikation vorliegt, an. Hierzu wurden die Proben für unterschiedliche Zeiten mit dem Enzym inkubiert. Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, war die Veränderung der Masse unabhängig von der Reaktionsdauer. Auch nach einer kurzen Reaktionsdauer von zehn Minuten war die Reduktion um circa 3-4 kDa schon vollständig vorhanden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Protein Osteoglycin nur an einer der drei möglichen Stellen eine Glykosylierung aufweist. Welche der drei möglichen Stellen verwendet wird, ließ sich mit den verwendeten Methoden nicht nachweisen.

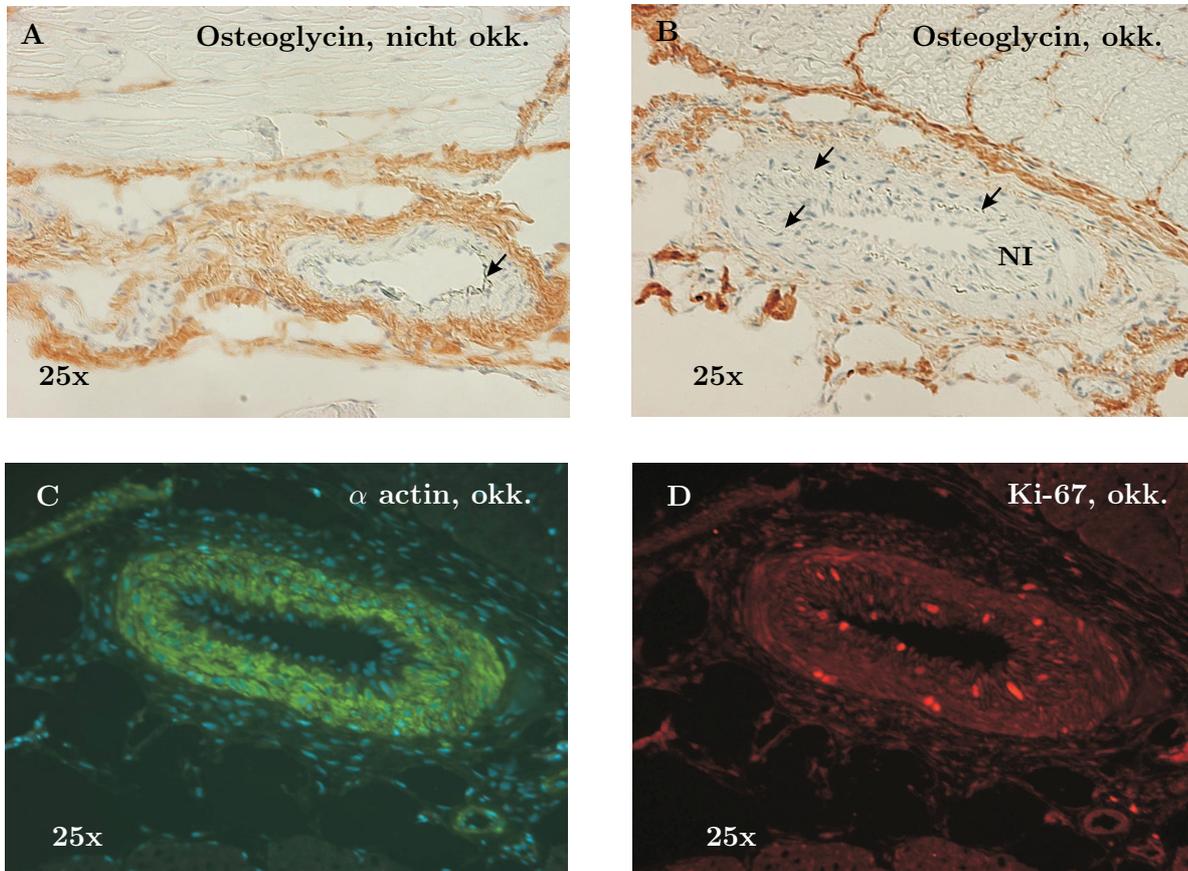


Abb. 3.14: Lokalisation des Proteins Osteoglycin im Gewebe, dargestellt sind Querschnitte ruhender Gefäße und wachsender Kollateralen. Verwendet wurde wiederum der Antikörper AK460. Im ruhenden Gefäß (A), ohne Okklusion der Femoralarterie, war Osteoglycin in der Tunica adventitia nachweisbar. Zu erkennen war weiterhin der reguläre Aufbau der Blutgefäße mit Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia. Die Membrana elastica interna war intakt (Pfeil). Zusätzlich zum Auftreten von Osteoglycin in der Adventitia, war es auch im umgebenden Gewebe nachweisbar, hauptsächlich in den Faszien der Muskeln. Sieben Tage nach Okklusion der A. femoralis war die Lokalisation des Proteins Osteoglycin in den wachsenden Kollateralen unverändert (B). In der Menge war es im Vergleich zur Kontrollsituation deutlich vermindert. Neben dieser Änderung im Proteingehalt war am wachsenden Gefäß auch die Bildung einer Neointima (NI) zu beobachten. In dieser Neointima waren die glatten Muskelzellen kleiner als in der Media und zeigten eine helikale Ausrichtung. Die alte Membrana elastica interna war zerrissen und teilweise abgebaut (Pfeile). In (C) und (D) sind serielle Schnitte der, in (B) dargestellten, Kollaterale zu sehen. Die immunhistochemische Anfärbung von „α smooth muscle actin“ (C) wurde zur Darstellung der glatten Muskelzellen verwendet. Die Anfärbung der Zellkerne mit dem Farbstoff DAPI (blaue Fluoreszenz) diente der besseren Orientierung. Der Nachweis, dass das betrachtete Gefäß eine wachsende Kollaterale war, wurde mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (D) geführt.

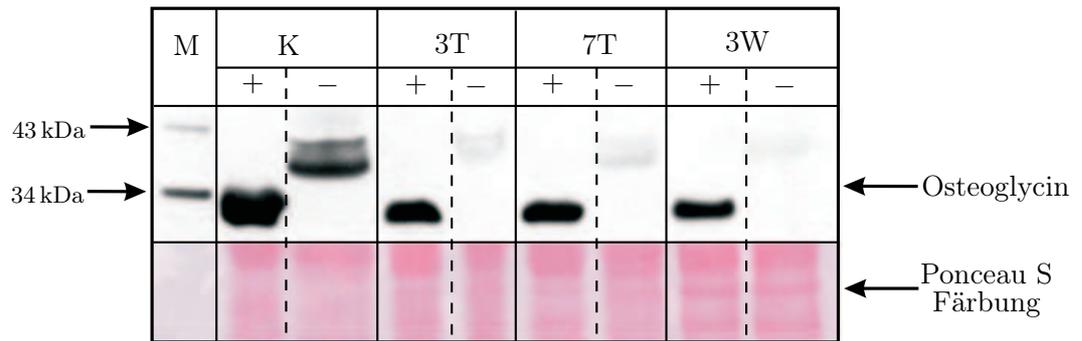


Abb. 3.15: Western-Blot, deglykosyliert mit PNGaseF. Bei diesem Western-Blot wurden die Proteinpräparationen vor dem Auftrag mit dem Enzym PNGaseF deglykosyliert. Dieses Enzym entfernt Zuckerseitenketten, die über das Stickstoffatom der Amidgruppe der Aminosäure Asparagin an Proteine gebunden sind. In den Proben nach Deglykosylierung (-) ist eine Reduktion des Molekulargewichts des Proteins Osteoglycin zu beobachten. Diese Abnahme beläuft sich auf circa 3-4 kDa. In den Proben mit intakten Zuckerseitenketten (+) war, wie schon in der Abbildung 3.12 gezeigt, eine Doppelbande zu beobachten. Diese wurde offensichtlich durch Unterschiede in der Glykosylierung hervorgerufen, da bei den deglykosylierten Proben diese Doppelbande nicht erkennbar war. Auffällig war außerdem die starke Zunahme der Signale nach Entfernen der Seitenketten. Allerdings nahm die Signalstärke über alle Proben betrachtet gleichmäßig zu, sodass keine Veränderung der Verhältnisse zueinander zu verzeichnen war. Verwendet wurde der Antikörper AK460. Ein gleichmäßiger Auftrag der Proteinproben auf das Gel wurde nach dem Blotten durch Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft (unten). (K = Kontrolle, 3T = 3 Tage nach Okklusion, 7T = 7 Tage nach Okklusion, 3W = 3 Wochen nach Okklusion, M = Cruz Marker Molecular Weight Standard, + = deglykosyliert, - = nicht deglykosyliert)

3.5 Untersuchungen an kultivierten glatten Muskelzellen

Da nicht alle Aspekte, die die Regulation von Osteoglycin während der Arteriogenese betrafen, im verwendeten Tiermodell zu untersuchen waren, wurden einzelne Untersuchungen an kultivierten glatten Muskelzellen durchgeführt. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich um Primärkulturen, die aus der Aorta von *O. cuniculus* isoliert wurden. Die isolierten Zellen wurden auf ihre Reinheit und die Abwesenheit anderer Zelltypen mit Hilfe von immunologischen Färbungen untersucht. Die Zellen zeigten das für Zellen vom Typ der glatten Muskelzellen typische Expressionsmuster der beiden Proteine „ α smooth muscle actin“ und „smooth muscle myosin heavy chain“ (Worth u. a. 2001). Es wurden keine Verunreinigungen durch Endothelzellen und Fibroblasten festgestellt wie in Abbildung 3.17 exemplarisch dargestellt. Als positive Kontrolle diente bei den immunologischen Färbungen eine Kultur von Endothelzellen, die ebenfalls aus der Aorta von *O. cuniculus* isoliert wurden. Diese Kultur bestand nicht nur aus Endothelzellen, sondern enthielt auch andere Zelltypen, die ebenfalls in der Aortenwand zu finden waren (u. a. glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Daten nicht gezeigt).

3.5.1 Welche Hinweise zur Regulation gibt es?

Zur Aufklärung möglicher regulatorischer Signalwege wurden die kultivierten Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert. Hierzu wurden die glatten Muskelzellen drei Tage ohne Serum kultiviert, um eine Synchronisation der Zellen zu erreichen. Verwendet wurden Kulturen, die vorher in der entsprechenden Anzahl auf Zellkulturschalen ausgesät worden waren, um gleichmäßige Kulturen zur Verfügung zu haben. Die Zellen wurden in den Passagen vier bis sechs verwendet und waren zum Zeitpunkt der Stimulation subkonfluent (circa 75% Konfluenz). Stimuliert wurden die Kulturen mit Oncostatin M (10 ng/ml), FGF-2 (20 ng/ml), TGF- β 1 (5 ng/ml), Interleukin 6 (20 ng/ml), Interleukin 11 (20 ng/ml), PDGF-AB (10 ng/ml) und GM-CSF (10 ng/ml). Zusätzlich wurden die angegebenen Wachstumsfaktoren in den gleichen Konzentration zusammen mit MCP-1 (10 ng/ml) in einer Ko-Stimulation eingesetzt. Da MCP-1 eine nachgewiesene stimulierende Wirkung auf die Arteriogenese hat, sollte die Frage überprüft werden, ob MCP-1 auch auf die Expression von Osteoglycin wirkt oder die Wirkung anderer Wachstumsfaktoren moduliert. Nach 24, 48 und 72 h Stimulation wurde die RNA aus den Zellen isoliert und anschließend die Höhe der Osteoglycin Expression mittels Northern Hybridisierung bestimmt.

In der grafische Darstellung der Werte (Abbildung 3.18) zeigte sich, dass deutliche Effekte nur in Form einer Abnahme der Osteoglycin-Expression auftraten. Erhöhungen der Expression traten nur gering auf, maximal bis zu einem Faktor von 1,6. Besonders deutlich war der Effekt von Oncostatin M. Nach 24 h war die Expression auf 40% des Kontrollwertes (serumfreie, unstimulierte Zellen) gesunken und nahm weiter ab auf 31% ($p < 0,05$) nach 48 h und 27% ($p < 0,05$) nach 72 h Stimulation. FGF-2 führte zu einer vergleichbaren Abnahme der Expression der Osteoglycin-mRNA. Bei beiden Wachstumsfaktoren war kein deutlicher Einfluss durch MCP-1 nachweisbar. Auch alleine zeigte MCP-1 keinen Effekt. Die Wirkung von TGF- β 1 auf die Expression von Osteoglycin wurde dahingegen von MCP-1 beeinflusst. TGF- β 1 alleine zur Stimulation eingesetzt, zeigte nur 48 h nach Zugabe eine Wirkung in Form einer Reduktion der Expression auf circa 60% des Kontrollwertes. Zu den anderen Zeitpunkten war nur ein sehr geringer Effekt sichtbar. TGF- β 1 zusammen mit MCP-1 zu Stimulation eingesetzt, änderte dieses

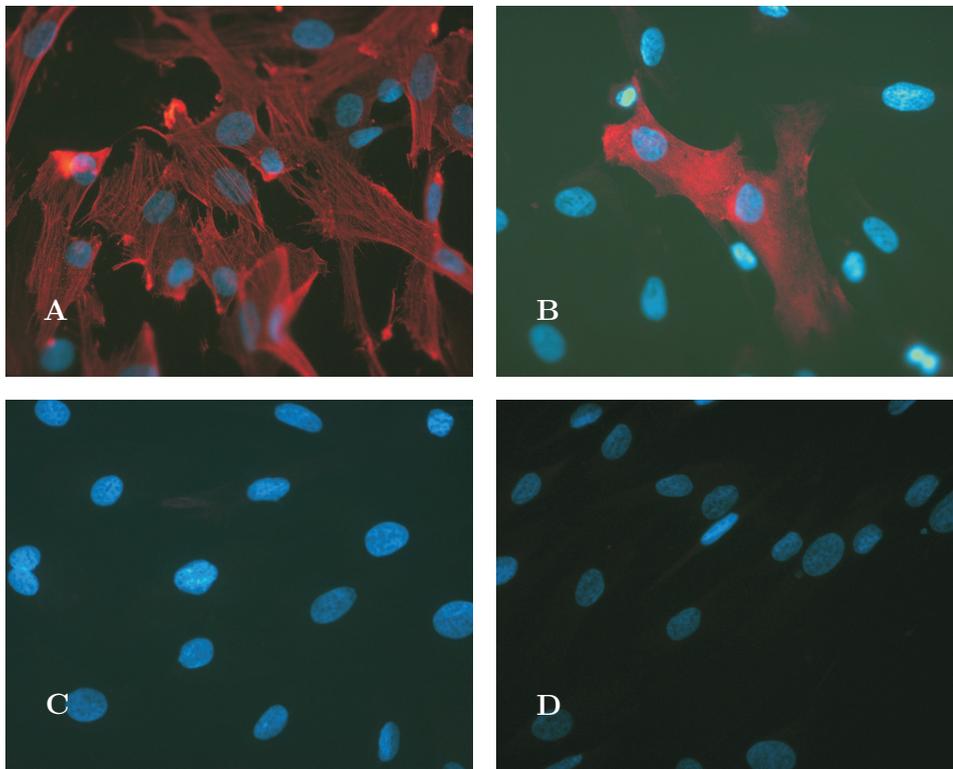


Abb. 3.17: Charakterisierung von Zellen durch immunologische Färbung. Alle in dieser Arbeit verwendeten Kulturen von glatten Muskelzellen waren Primärkulturen aus der Aorta von *O. cuniculus*. Diese mussten daher vor der Durchführung von Versuchen auf Reinheit und Abwesenheit anderer Zellen überprüft werden. In der oberen Reihe sind zwei Marker für glatte Muskelzellen dargestellt. Alle Zellen sind positiv für „ α -smooth muscle actin“ (A). Der Marker „smooth muscle myosin heavy chain“ (B) wird nur von einigen Zellen in der Kultur exprimiert, eine Beobachtung die typisch ist für glatte Muskelzellen in Kultur. Mit diesen beiden Markern konnte also gezeigt werden, dass in der Kultur glatte Muskelzellen vorhanden waren. Die Abwesenheit anderer Zellen ist in der unteren Reihe veranschaulicht. Mit einem Antikörper gegen das so genannte „human fibroblast surface protein“ (C) wurde auf Fibroblasten getestet. Endothelzellen sollten mit einem Antikörper, der gegen den „von Willebrand Faktor“ gerichtete war, nachgewiesen werden (D). Diese beiden Antikörper wurden vorher an einer Kultur, die entsprechende Zellen aus der Aorta von *O. cuniculus* enthielt, überprüft. Die Kultur war für beide Marker negativ, es wurden also keine verunreinigende Zellen nachgewiesen. Zur besseren Orientierung wurde bei allen Färbungen zusätzlich die Zellkerne mit dem Farbstoff DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz). (Vergrößerung 40fach)

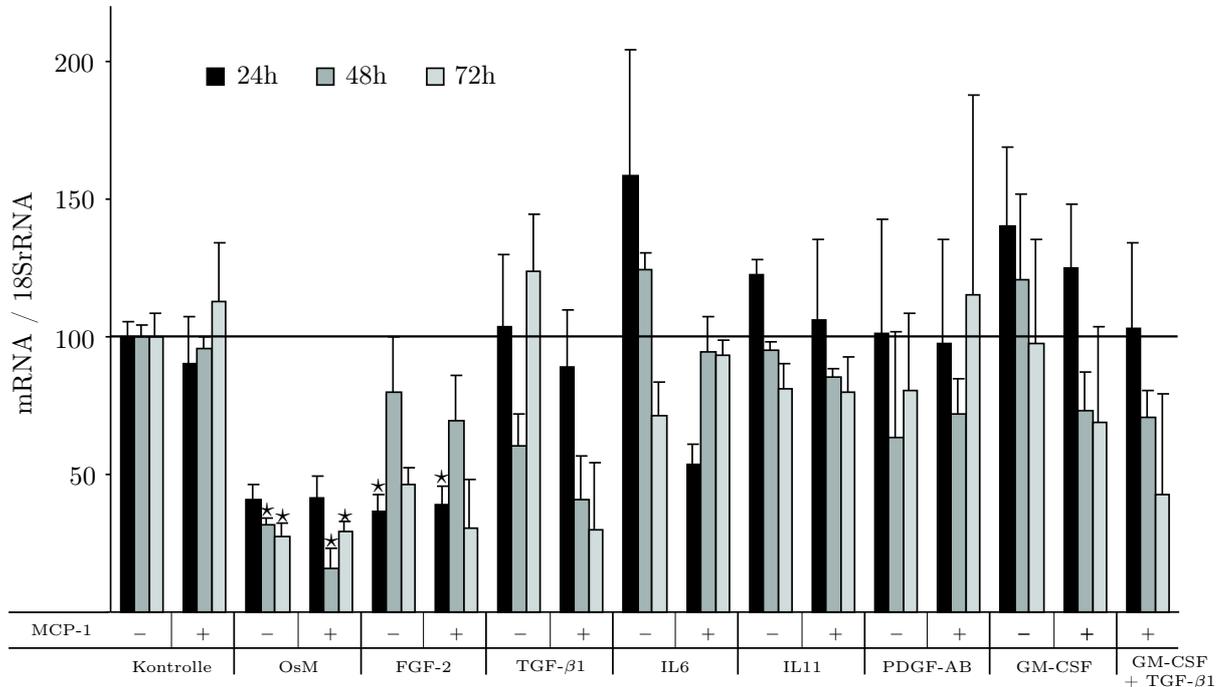


Abb. 3.18: Northern-Blot, stimulierte Zellen. Zur Aufklärung möglicher regulatorischer Signalwege wurden Kulturen von glatten Muskelzellen mit Oncostatin M (OsM, 10 ng/ml), FGF-2 (20 ng/ml), TGF-β1 (5 ng/ml), Interleukin 6 (IL6, 20 ng/ml), Interleukin 11 (IL11, 20 ng/ml), PDGF-AB (10 ng/ml) und GM-CSF (10 ng/ml) stimuliert. Verwendet wurden die angegebenen Wachstumsfaktoren entweder mit MCP-1 (+, 10 ng/ml) in einer Ko-Stimulation oder alleine (-). MCP-1 hat eine nachgewiesene stimulierende Wirkung auf die Arteriogenese (Ito u. a. 1997b). Ob diese stimulierende Wirkung auf die Arteriogenese mit einem Einfluss auf die Osteoglycin Expression verbunden ist, sollte mit diesem Versuchsansatz überprüft werden. Nach 24, 48 und 72 h Stimulation wurde die RNA aus den Zellen isoliert und anschließend die Höhe der Osteoglycin Expression mittels Northern Hybridisierung bestimmt. Deutliche Effekte traten nur in Form einer Abnahme der Osteoglycin-Expression auf. Erhöhungen der Expression waren nur gering, es wurde maximal ein Faktor von 1,6 beobachtet (IL6, 24 Stunden Stimulation). Besonders deutlich war der Effekt von Oncostatin M, das zu einer Reduktion auf 27 bis 40% des Kontrollwertes (serumfreie, unstimulierte Zellen) führte. FGF-2 führte zu einer vergleichbaren Abnahme der Expression der Osteoglycin-mRNA. Bei beiden Wachstumsfaktoren war kein Einfluss durch MCP-1 nachweisbar, dies galt auch für die meisten anderen Faktoren. Auch alleine zeigte MCP-1 keinen Effekt. Einzig die Wirkung von TGF-β1 wurde durch MCP-1 moduliert. TGF-β1 allein zur Stimulation eingesetzt, zeigte nur 48 h nach Zugabe eine Wirkung in Form einer Reduktion der Expression auf circa 60% des Kontrollwertes. Zu den anderen Zeitpunkten war nur ein sehr geringer Effekt sichtbar. Wurde es zusammen mit MCP-1 zu Stimulation eingesetzt, änderte sich dieses Bild: Der Werte bei 24 h blieb weiterhin unverändert. 48 h nach Beginn der Stimulation war die Expression bereits auf 40% des Kontrollwertes gesunken, nach 72 h sank die Osteoglycin-Expression weiter auf 30% des Kontrollwertes. (* $p < 0,05$)

Bild: Der Werte bei 24 h blieb weiterhin unverändert. 48 h nach Beginn der Stimulation war die Expression bereits auf 40% des Kontrollwertes gesunken, nach 72 h sank die Osteoglycin-Expression weiter auf 30% des Kontrollwertes. Die anderen Wachstumsfaktoren zeigten, allein oder in Kombination mit MCP-1, nur geringe Einflüsse auf die Expression von Osteoglycin.

3.5.2 Hat die Inhibierung von Osteoglycin einen Einfluss auf die Zellen?

Die bislang geschilderten Befunde zeigten, dass die Höhe der Expression des Gens (und auch des Proteins) Osteoglycin an den Phänotyp der glatten Muskelzellen gebunden ist. Nicht proliferierende Zellen vom synthetischen Phänotyp zeigten eine hohe Expression. In proliferierenden Zellen ist die Expression gering. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Fragestellung, welche Effekte durch einen äußeren Einfluss auf die Osteoglycin Expression hervorgerufen werden können. Als Arbeitshypothese wurde hierbei die Annahme gewählt, dass eine Veränderung der Expression des Proteins Osteoglycin einen direkten Einfluss auf die Proliferation hat. Hierbei musste berücksichtigt werden, dass die basale Expression in den glatten Muskelzellen hoch war. Weiterhin war zu beobachten, dass deutliche Effekte nach der Zugabe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen hauptsächlich als verminderte Expression sichtbar wurden. Daher war bei einer Überexpression des Proteins Osteoglycin kein deutlicher Einfluss auf die glatten Muskelzellen zu erwarten. Im umgekehrten Fall, also der Inhibierung der Expression, war eine höhere oder länger andauernden Proliferation der glatten Muskelzellen zu erwarten. Um die Expression von Osteoglycin zu unterdrücken, wurden antisense Oligonukleotiden ausgewählt. Zur Verfügung standen zwei antisense Oligonukleotide (anti-1 und anti-2, siehe Tabelle 2.2), zwei entsprechende mit der reversen Sequenz als Kontrolle (anti1rev und anti2rev) und ein Oligonukleotid mit einer zufälligen Sequenz (scramble), ebenfalls als Kontrolle. Hierbei handelte es sich um Phosphothioate, also Nukleotide bei denen eines der nicht verbindenden Sauerstoffatome gegen ein Schwefelatom ausgetauscht ist. Oligonukleotide mit dieser Modifikation sind widerstandsfähiger gegen den Abbau durch Nukleasen und erreichen eine Halbwertszeit von sieben Tagen im Zellkulturmedium (Schlingensiepen u. a. 1997). Das Oligonukleotid anti-1 entsprach den Basen 101 bis 124 der Osteoglycin cDNA (siehe Anhang 5.1), das Oligonukleotid anti-2 den Basen 125 bis 148. Diese beiden Oligonukleotide lagen somit in der Nähe des Startcodons der proteincodierenden Sequenz. Durch einen Homologievergleich wurde sichergestellt, dass diese verwendeten Oligonukleotide möglichst nur Homologie zum Osteoglycin aufwiesen und zu keinen anderen Sequenzen homolog waren. Bei den Kontrollen wurde so ausgeschlossen, dass sie zufällig mit der mRNA anderer Gene reagierten.

Als erster Schritt war zu überprüfen, ob eine Aufnahme der Oligonukleotide aus dem Medium durch die Zellen erfolgt. Die Zellen wurden dazu während unterschiedlicher Zeiträume mit Medium, das das Oligonukleotid in einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ enthielt, überschichtet. Verwendet wurde das Oligonukleotid anti-1, das für dieses Experiment am 5'-Ende mit Fluorescein markiert war, um einen Nachweis im Fluoreszenz-Mikroskop zu ermöglichen. Wie in der Abbildung 3.19 dargestellt, wurde das Oligonukleotid von den Zellen aus dem Medium aufgenommen und lagerte sich zunehmend im Zellinneren ab. Nach dem Nachweis, dass die Zellen die Oligonukleotide aus dem Medium aufnehmen können, war die Frage zu stellen, ob die Oligonukleotide einen nachweisbaren Einfluss auf die Expression von Osteoglycin haben. Grundsätzlich ist für diese Überprüfung eine Messung des untersuchten Proteins nach Zugabe der Oligonukleotide anderen Methoden vorzuziehen. Allerdings ist zur Gewinnung der nötigen

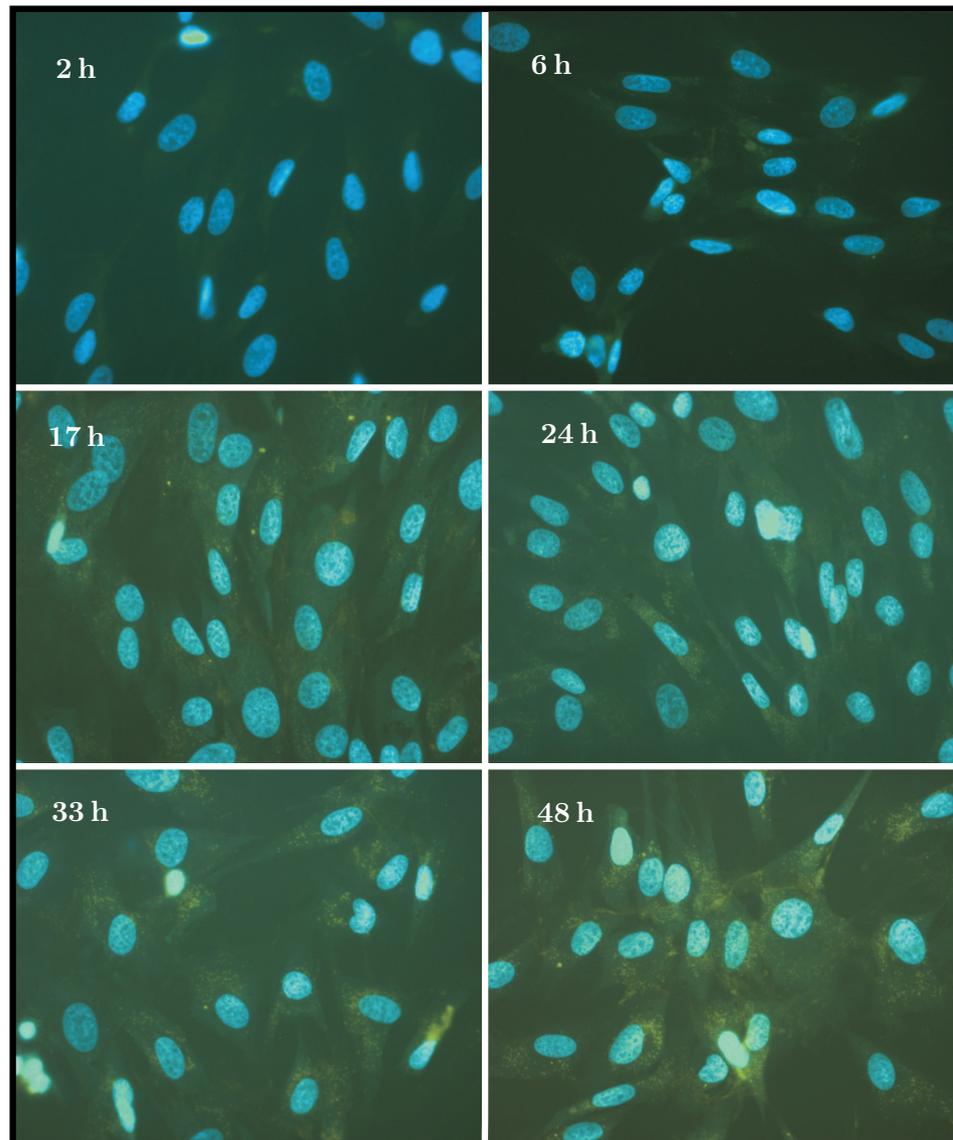


Abb. 3.19: Aufnahme der antisense Oligonukleotide in Abhängigkeit von der Zeit. Für die Versuche mit antisense Oligonukleotiden war zu überprüfen, ob die Oligonukleotide von den glatten Muskelzellen (*O. cuniculus*) aus dem Medium aufgenommen wurden. Überprüft wurde dies mit dem Oligonukleotid anti-1, das zu diesem Zweck am 5'-Ende mit dem Farbstoff Fluorescein markiert war. Nachdem die Zellen in Zellkulturschalen ausgesät worden waren und sich angeheftet hatten, wurden sie mit Medium, das das Oligonukleotid in einer Konzentration von $2\ \mu\text{M}$ enthielt, überschichtet. Zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und zur besseren Orientierung zusätzlich die Zellkerne mit dem Farbstoff DAPI blau angefärbt. Die Aufnahme des Oligonukleotides durch die Zellen war ein zeitabhängiger Prozess. Bereits nach zwei Stunden war die Aufnahme von wenigen Oligonukleotiden möglich. Nach circa 17 Stunden war die Aufnahme dann deutlich nachweisbar, erkennbar an einer intensiven grünen Färbung der Zellen. Die aufgenommenen Oligonukleotide wurden innerhalb des beobachteten Zeitraums auch nicht wieder aus den Zellen entfernt oder abgebaut, wie an der deutlichen Färbung auch nach 48 Stunden erkennbar war. (Vergrößerung für alle 40 fach)

Proteinextrakte eine hohe Anzahl von Zellen und damit auch von Medium mit Oligonukleotiden nötig. Da dies an der Menge der Oligonukleotide, die zur Verfügung stand, scheiterte, wurde mit einer semiquantitativen PCR überprüft, ob die Expression der Osteoglycin mRNA durch die antisense Oligonukleotide abnimmt. Verwendet wurden die Primer 74F3FL und 74F3R11. Diese Primer erzeugten ein spezifisches PCR-Produkt von 105 bp, das die Basen 120 bis 224 der Osteoglycin cDNA umfasste. Als Kontrolle wurde mit den Primer 18Sfwd und 18Srev (siehe Tabelle 2.2) ein Fragment der 18SrRNA von 62 bp amplifiziert (Basen 1445 bis 1506 der 18SrRNA von *O. cuniculus*, Genbank Acc. No. X00640) und ebenfalls auf das Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 3.20). Ein Effekt der Oligonukleotide auf der Ebene der mRNA konnte nur für das Oligonukleotid anti-2 nach zehn Tagen Einwirkzeit deutlich gezeigt werden. Die Verringerung der Osteoglycin PCR-Produkte für die Oligonukleotide anti-1 und anti-2 nach sechs Tagen Einwirkzeit war nur von geringem Ausmaß. Daher war ein Effekt der Oligonukleotide, der durch den Abbau von mRNA durch das Enzym RNaseH (Baker und Monia 1999) hervorgerufen wurde, nur für ein Oligonukleotid zu einem Zeitpunkt nachweisbar. Allerdings war aufgrund der verwendeten Methodik ein deutlicher Nachweis der Wirkung der Oligonukleotide nur möglich, wenn es zu einem vollständigen Abbau der mRNA kam. Etwaige Unterschiede in der Expression mit und ohne Einfluss der Oligonukleotide sind mit einer semiquantitativen PCR schwer nachweisbar, hierzu wäre eine realtime Methode besser geeignet gewesen. Da somit kein direkter Beweis für die Wirksamkeit der Oligonukleotide erbracht werden konnte, wurde direkt mit den Untersuchungen fortgefahren.

Den weiteren Untersuchungen lag die oben angeführte Arbeitshypothese zugrunde, daher war bei der Untersuchung, ob die verwendeten Oligonukleotide einen Einfluss auf die Osteoglycin Expression haben, eine Bestimmung der Anzahl der Zellen nötig. Hierzu wurden die Zellen gleichmäßig in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen (Oberfläche je Vertiefung circa 962 mm²) ausgesät. Eingesetzt wurden die Oligonukleotide in einer Konzentration von 2 µM. Gleichzeitig wurde die Serumkonzentration im Medium von 20% auf 10% reduziert. In Vorversuchen (hier nicht dargestellt) konnte gezeigt werden, dass bei dieser Konzentration die Rate der Proliferation der Zellen etwa halbmaximal war. Durch diese Reduktion der Serumkonzentration sollte verhindert werden, dass etwaige schwache Einflüsse der Oligonukleotide durch eine starke Zellteilung verdeckt würden. Die Oligonukleotide wurden erst 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen zugegeben, um einen Einfluss auf die Anheftung der Zellen zu verhindern (Zeitpunkt 0 Tage). Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine indirekte Methode verwendet. Diese Methode beruht auf der Umsetzung der Substanz MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einen blauen und unlöslichem Formazan. Dieses Reaktionsprodukt konnte anschließend photometrisch vermessen werden, die gemessene optische Dichte war ein direktes Mass für die Anzahl der Zellen (siehe 2.2.11.5). Der MTT-Assay wurde entwickelt, um eine grosse Anzahl von Proben bzw. Zellkulturen bearbeiten zu können. Er ist geeignet die Aktivität und Zahl von Zellen zu bestimmen (Mosmann 1983; Denizot und Lang 1986). Die Ergebnisse der Versuchsreihen sind exemplarisch in der Abbildung 3.21 dargestellt. Ersichtlich wurde, dass die Oligonukleotide einen stimulierenden Effekt auf die glatten Muskelzellen hatten, dieser war aber unabhängig von der Sequenz des Oligonukleotides. Sowohl die antisense Oligonukleotide als auch die Kontrollen führten zu einem fast identischem Anstieg der Zellzahl. Am Tag 13 nach Zugabe der Oligonukleotide war die maximale Zellzahl erreicht, danach kam es zu einer Verringerung der Zellzahl. In der Kontrolle ohne Oligonukleotide war bis zum Tag 17 ein stetiger Anstieg der Zellzahl zu beobachten.

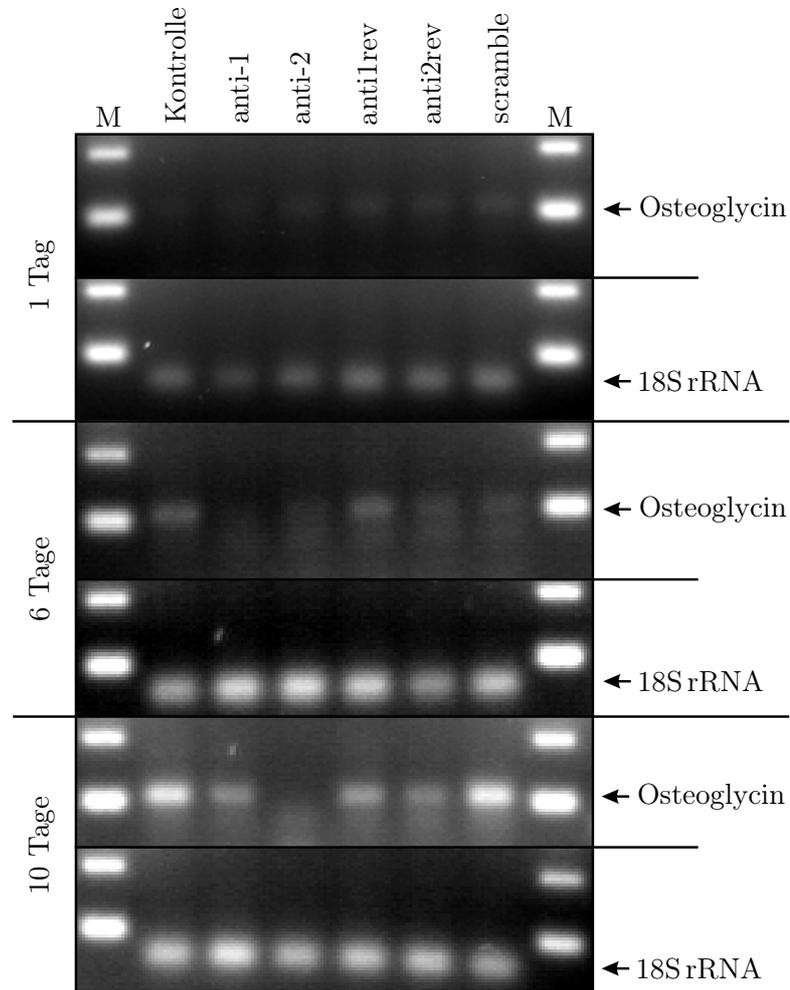


Abb. 3.20: Auswirkung der antisense Oligonukleotide auf die Expression der Osteoglycin mRNA in glatten Muskelzellen (*O. cuniculus*). Mit einer semiquantitativen PCR wurde überprüft, ob die Expression der Osteoglycin mRNA durch die antisense Oligonukleotide abnimmt. Die hierfür verwendeten Primer (74F3FL und 74F3R11, siehe Tabelle 2.2) erzeugten ein spezifisches PCR-Produkt von 105 bp, als Kontrolle wurde ein Fragment der 18SrRNA von 62 bp amplifiziert (Primer 18Sfwd und 18Srev, siehe Tabelle 2.2) und ebenfalls auf das Agarosegel aufgetragen. Ein Effekt der Oligonukleotide auf der Ebene der mRNA konnte nur für das Oligonukleotid anti-2 nach zehn Tagen Einwirkzeit deutlich gezeigt werden. Die Verringerung der Osteoglycin PCR-Produkte für die Oligonukleotide anti-1 und anti-2 nach sechs Tagen Einwirkzeit war nur von geringem Ausmaß. Daher war ein Effekt der Oligonukleotide, der durch den Abbau von mRNA durch das Enzym RNaseH hervorgerufen wurde, nur für ein Oligonukleotid zu einem Zeitpunkt nachweisbar. (M = Marker, 100 bp Leiter, zu sehen sind die Banden bei 100 bp und 200 bp)

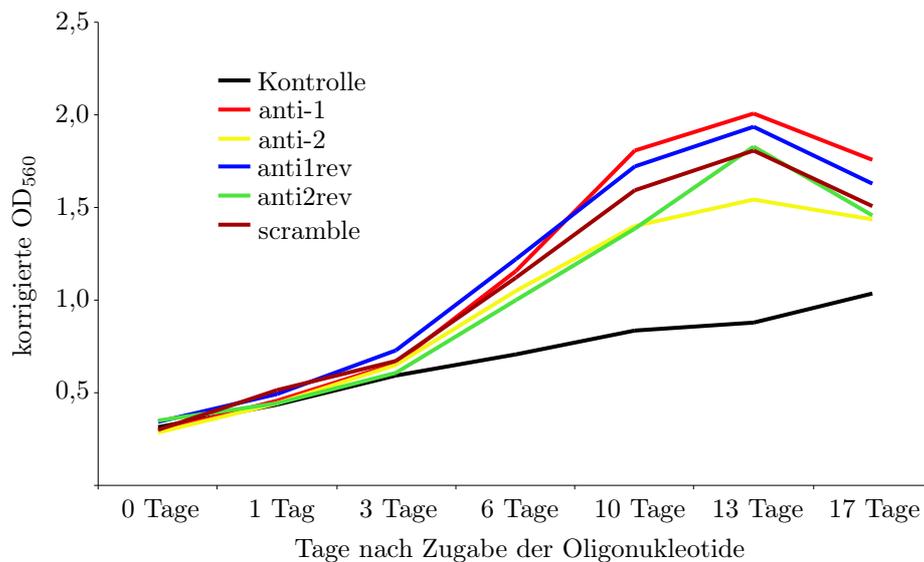


Abb. 3.21: Wachstumsassay nach Zugabe von antisense Oligonukleotiden. Ermittelt wurde das Wachstum von glatten Muskelzellen (*O. cuniculus*) nach der Zugabe von antisense Oligonukleotiden, bzw. den entsprechenden Kontroll-Oligonukleotiden. Die Kontrollkurve zeigt das Wachstum der Zellen ohne Oligonukleotide. Dieser Wachstumsversuch wurde in Zellkulturschalen mit sechs Vertiefungen durchgeführt (Oberfläche je 962 mm²), verwendet wurde Medium mit 10% Serum, das die Oligonukleotide in einer Konzentration von 2 μ M enthielt. Das Wachstum der Zellen wurde mit einem Assay ermittelt, der auf der Bestimmung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen beruhte (siehe Seite 40). Die ermittelte optische Dichte bei 560 nm ist direkt proportional zur Anzahl der Zellen. Bei der Analyse der Wachstumsrate wurde deutlich, dass die Oligonukleotide einen stimulierenden Einfluss auf die Proliferation der Zellen hatten. Dieser betraf aber sowohl die beiden antisense Oligonukleotide die gegen Osteoglycin gerichtet waren, als auch die drei Kontroll-Oligonukleotide. Daher kann es sich bei dieser Erhöhung der Proliferationsrate nur um einen unspezifischen Effekt gehandelt haben. Das normale Wachstum der Zellen wird durch die Kontrollkurve repräsentiert und lag deutlich unter dem, welches die Kulturen mit Oligonukleotiden zeigten. Bis zum Tag 13 nach Zugabe der Oligonukleotide zeigten diese Kulturen einen stetigen Anstieg der Zellzahl, danach kam es zu einer Verringerung der Anzahl. Die Kontrollen ohne Oligonukleotide zeigten bis zum Tag 17 einen beständiges Anwachsen der Zellzahl.

3.5.3 Ohne Osteoglycin verläuft die Arteriogenese schneller

Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von Osteoglycin während des Wachstums von Kollateralen wurden an Exemplaren der Art *M. musculus* durchgeführt. Diesen war das Gen für Osteoglycin entfernt worden (Osteoglycin^{-/-}, Tasheva u. a. (2002)), eine Expression von Osteoglycin war nicht mehr nachweisbar. Die Durchführung der Versuche, zur Induktion des Wachstums von Kollateralen, entsprach dem Vorgehen bei *O. cuniculus*. Es wurde nur die Femoralarterie im rechten Hinterbein ligiert. Das linke Hinterbein diente als Kontrolle bei den anschließenden Messungen. Die Entwicklung der Kollateralen wurde mit einer indirekten Methode verfolgt. Mit dem „Laser Doppler Perfusion Imager“ konnte der Blutfluss im Unterschenkel der untersuchten Tiere nicht-invasiv bestimmt werden (Heil u. a. 2002b). Gemessen wurde der relative Blutfluss, also das Verhältnis im Blutfluss des Hinterbeines mit Okklusion zum Hinterbein ohne Okklusion. Dieser Wert wurde unmittelbar vor und nach dem Verschluss der Femoralarterie, sowie drei und sieben Tage nach dem Verschluss der Femoralarterie ermittelt.

Vor dem Verschluss der Femoralarterie waren keine Unterschiede im relativen Blutfluss bei den Osteoglycin^{-/-} Tieren und dem Wildtyp vorhanden (siehe Abbildung 3.22). Bei den Tieren ohne Osteoglycin-Expression war unmittelbar nach dem Verschluss der Femoralarterie der relative Blutfluss signifikant höher ($p < 0,05$), als bei den Tieren mit Osteoglycin-Expression. Nach drei Tagen Wachstum der Kollateralen stieg der relative Blutfluss beim Wildtyp deutlicher an. Dieses Bild wandelte sich nach sieben Tagen Kollateralwachstum. Zu diesem Zeitpunkt hatte der relative Blutfluss bei den Osteoglycin^{-/-} Tieren wieder den Wert vor Okklusion erreicht. Damit ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zum Wert beim Wildtyp, dessen relativer Blutfluss einen Wert von 0,84 erreichte.

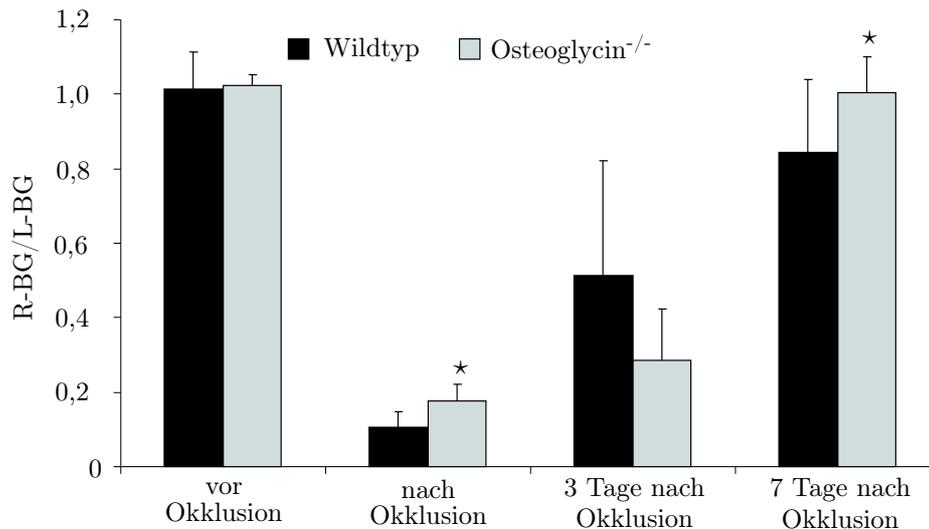


Abb. 3.22: Analyse der Osteoglycin^{-/-} Tiere. Bei Tieren der Art *M. musculus*, deren Gen für Osteoglycin inaktiviert wurde (Osteoglycin^{-/-}, Tasheva u. a. (2002)) wurde das Wachstum von Kollateralen durch Okklusion der Femoralarterie induziert. Zur Bestimmung des Kollateralwachstums wurde der Blutfluss in den Unterschenkeln mit einem „Laser Doppler Perfusions Imager“ bestimmt. Angegeben ist das Verhältnis der Werte von rechtem und linkem Unterschenkel. Die Okklusion der Femoralarterie wurde im rechten Bein durchgeführt, das linke diente als Kontrolle. Dargestellt ist also das Verhältnis des kollateralen Blutfluss zum normalen Blutfluss (R-BG/L-BG), jeweils für die Osteoglycin^{-/-} Tiere und den Wildtyp. Unmittelbar nach Okklusion der Femoralarterien ist der verbleibende Blutfluss bei den Tiere ohne Osteoglycin Expression um den Faktor 1,7 höher. Drei Tage nach Okklusion der Femoralarterie ist der kollaterale Blutfluss bei den Osteoglycin^{-/-} Tieren geringer als beim Wildtyp (0,28 zu 0,51). Diese erreichen nach drei Tagen die Hälfte des normalen Blutfluss. Nach sieben Tagen Kollateralwachstum ist der Blutfluss bei den Osteoglycin^{-/-} Tieren deutlich höher als beim Wildtyp. Der kollaterale Blutfluss bei den gentechnisch veränderten Tieren ist zu diesem Zeitpunkt gleich dem Blutfluss im Unterschenkel ohne Okklusion der Femoralarterie. (★ $p < 0,05$)

4 Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, welche Gene im Zusammenhang mit dem Wachstum von Kollateralen eine differentielle Regulation aufweisen. Der Einsatz der DDRT-PCR ermöglichte es dabei, auch differentiell exprimierte Gene zu finden, deren Sequenz noch nicht bekannt war. Für die DDRT-PCR wurden 48 verschiedene Primerkombinationen verwendet. Diese Anzahl erlaubte ein Screening, das theoretisch 98% der vorhandenen mRNA-Moleküle erfasste (Berechnung nach Liang u. a. (1995)). Zur Identifikation der erhaltenen 191 Genfragmente diente die Sequenzierung aller Klone und deren anschließender Vergleich mit bekannten Genen, durch das Blast-Programm (Altschul u. a. 1997). Eine Homologie von mehr als 75% zu bekannten Genen zeigten 95 der isolierten Genfragmente. Da es das Ziel dieser Arbeit war, Gene zu identifizieren, deren differentielle Regulation während des Wachstums von Kollateralen noch nicht bekannt war, wurden diese von den weiteren Untersuchungen ausgenommen. Ebenfalls nicht näher untersucht wurden die 26 Genfragmente, die Homologien zu mitochondrialen oder ribosomalen Genen aufwiesen.

Die verbliebenen 70 Genfragmente, die keine signifikante Homologie zu bekannten Genen aufwiesen, sollten im weiteren näher auf ihre Expression untersucht werden. Um eine erste Bestätigung der differentiellen Expression zu erhalten und damit auch falsch positive Klone ausschließen zu können, wurden diese 70 Genfragmente einer Analyse im Slot-Blot Verfahren (auch „reverser Northern“ genannt) unterzogen. Im Zusammenhang mit der DDRT-PCR verwendeten mehrere Autoren (Mou u. a. 1994; Wadhwa u. a. 1996; Zhang u. a. 1996; Hung u. a. 1999) dieses Verfahren bereits, um die Anzahl falsch positiver Klone zu reduzieren. Nach der Auswertung der durchgeführten Hybridisierungen war eine hohe Anzahl an falsch positiven Klonen zu bemerken. Es verblieben noch sieben Klone, die nach den Befunden aus dem Slot-Blot eine differentielle Regulation aufwiesen. Diese geringe Zahl lag in einem Rahmen, der mit den Ergebnissen in den oben genannten Publikationen vergleichbar war.

Neben diesen sieben Klonen, die alle (nach den vorher gewählten Kriterien) keine Homologien zu bekannten Genen aufwiesen, wurden auch zwei Klone, die Homologie zum humanen „ γ -smooth muscle actin“ (Klon Ak35b1, Acc. No. X16940) und zum „ α -smooth muscle actin“ aus *O. cuniculus* (Klon AK115b, Acc. No. X60732) hatten, weiter untersucht. Damit sollte ein Nachweis über die Verwendbarkeit der Methode geführt werden. Bei wachsenden Kollateralen im Herz von *C. familiaris* konnten Cai u. a. (2000) nachweisen, dass „ α -smooth muscle actin“ vermindert exprimiert wird. War das Wachstum und „Remodelling“ der Kollateralen abgeschlossen, stieg die Expression wieder an. Das Protein „ α -smooth muscle actin“ unterliegt einer differentiellen Regulation, in Abhängigkeit vom Status der glatten Muskelzellen, wie in mehreren Publikationen gezeigt. Beginnen glatte Muskelzellen zu proliferieren, kommt es zu einem Wechsel vom kontraktiven zum synthetischen Phänotyp, eine Änderung, die mit einer verminderten „ α -smooth muscle actin“ Expression einhergeht (Owens 1995). Aber auch während der pathologischen Veränderungen eines Blutgefäßes kommt es zu einer Änderung der Expression dieses Proteins. Glukhova u. a. (1988) berichteten, dass „ α -smooth muscle actin“ in der sub-endothelialen Intima arteriosklerotischer Plaques im Vergleich zu normalen, gesunden Gefäßen

reduziert vorkommt. Die in dieser Arbeit in der Northern Hybridisierung gezeigte differentielle Regulation der für diese Proteine kodierenden mRNA entsprach also den Erwartungen.

In der Liste der isolierten Genfragmente (siehe im Anhang auf Seiten 95–100) finden sich weitere Gene, deren Beteiligung am Wachstum von Kollateralen bekannt ist. Als Beispiele sollen hier die Klone 15a2, 153b2 und 181b2 betrachtet werden. Die Expression des Transkriptionsfaktors „*egr-1*“ (Klon 15a2, Homologie 90,5%; Acc. No X52541) war in wachsenden Kollateralen, drei Tage nach Verschluss der A. femoralis, verstärkt. Aus anderen Arbeiten liegen Ergebnisse vor, die ebenfalls eine erhöhte „*egr-1*“ Expression in wachsenden Kollateralen nachweisen. Diese betreffen allerdings nur die ersten 24 Stunden nach Okklusion der Femoralarterie (Deindl u. a. 2001b). Eine direkte Bestätigung der Ergebnisse der „DDRT-PCR“ ist dies nicht, da insbesondere ein kurzzeitige erhöhte Expression von „*egr-1*“ nicht auszuschließen ist. Allerdings ist in anderen Modellen gezeigt worden, dass „*egr-1*“ durch eine chronische Erhöhung der Wandschubspannung induziert wird (Sho u. a. 2002). Diese Induktion war auch noch fünf und sieben Tage nach Einsetzen der erhöhten Wandschubspannung nachweisbar.

Für den Klon 153b2 ergab der Vergleich mit der Datenbank eine Homologie von 91,9% zum humanen „N-cadherin“ (Acc. No M34064). Aus den Ergebnissen der „DDRT-PCR“ wurde eine schwächere Expression, drei Wochen nach Verschluss der Femoralarterie, deutlich. Belegt ist eine Beteiligung des Adhäsionsmoleküls „N-cadherin“ an der Bildung der Neointima. Nach der Verletzung der Halsschlagader durch einen aufblasbaren Katheder bei *Sus scrofa* kam es zu einer verringerten Expression von „N-cadherin“ in der entstehenden Neointima (Blindt u. a. 2004). Die verminderte Expression dieses Proteins führte zu einer schwächeren Verbindung der glatten Muskelzellen mit der extrazellulären Matrix und anderen Zellen. Dadurch wurde die Wanderung der glatten Muskelzellen erleichtert. Nachweisbar war die verminderte Expression von „N-cadherin“ 14 und 28 Tage nach der Verletzung des Gefäßes. Nach 90 Tagen war die Expression wieder auf das normale Niveau gestiegen. Der mittels „DDRT-PCR“ isolierte Klon war drei Wochen nach Beginn des Kollateralwachstums vermindert exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt ist die Bildung der Neointima in den wachsenden Kollateralen deutlich ausgeprägt, so dass die verminderte Expression von „N-cadherin“ dem oben beschriebenen Befund entsprach.

Gleiches kann auch für den Klon 181b2 (Homologie zum IGF II, 93,8%; Acc. No X03562) angenommen werden. Bekannt ist für IGF II, dass es ebenfalls an der Bildung der Neointima beteiligt ist (Bayes-Genis u. a. 2000). Diese verstärkte Expression erleichterte die Wanderung von glatten Muskelzellen in die Neointima. Die mit „DDRT-PCR“ gefundene schwächere Expression nach drei Wochen Kollateralwachstum ist entsprechend dem Verhalten von „N-cadherin“ zu bewerten. Mit diesen veröffentlichten Daten und der in dieser Arbeit gezeigten differentiellen Regulation der mRNA wurde deutlich gezeigt, dass die verwendete Methode geeignet war, Gene zu identifizieren, die im Verlauf des Wachstums von Kollateralen differentiell exprimiert wurden.

4.1 Nur zwei Klone zeigten signifikante Unterschiede in der Expression

Von den sieben Klonen, die durch eine „Northern Hybridisierungen“ in ihrer Expression untersucht wurden, zeigten nur zwei Klone Unterschiede in der Expression, die statistisch signifikant waren. Bei allen anderen Klonen war keine statistische Signifikanz nachweisbar. Dies lag einerseits an nur geringen Unterschieden in der Expression nach drei Tagen oder drei Wochen Okklusion der Femoralarterie im Vergleich zur Kontrolle, andererseits aber auch an zu großen

Standardabweichungen bei der Auswertung der einzelnen Hybridisierungen. Hier wird eine der Beschränkungen der DDRT-PCR deutlich: die hohe Anzahl an falsch positiven Klonen. In dieser Arbeit wurde versucht, die Zahl der falsch positiven Klone dadurch zu reduzieren, dass eine Überprüfung im Slot-Blot-Verfahren vor der Bestätigung in der „Northern Hybridisierung“ durchgeführt wurde. Der Einsatz des Slot-Blots hat zu einer deutlichen Reduktion der zu bestätigten Klone geführt, die gewählten Parameter waren aber anscheinend nicht optimal genug, um eine sichere Aussage zu treffen. In den oben bereits genannten Veröffentlichungen haben die Autoren Mengen von 5 bis 50 μg RNA eingesetzt, während in dieser Arbeit lediglich 4 μg verwendet wurden, da die Menge an verfügbarer RNA aufgrund des verwendeten Modells stark limitiert war. Wird das Mengenverhältnis der RNA einer Zelle betrachtet, zeigt sich, dass der überwiegende Teil aus ribosomalen RNA-Molekülen besteht. Aus diesem ungünstigen Mengenverhältnis ergab sich eine Fehlerquelle, die zu falschen Signalen im Slot-Blot führte.

Die Klone AK19a1 und AK74b2 zeigten beide eine signifikante, differentielle Expression. Der Klon AK19a1 war nach drei Wochen Okklusion der A. femoralis in seiner Expression deutlich erhöht (240% im Vergleich zur Kontrolle). Der Klon AK74b2 war drei Tage nach Verschluss der Femoralarterie mit einem Wert von 35% im Vergleich zur Kontrolle deutlich in seiner Expression vermindert ($p < 0,05$ für beide Klone). Diese zwei Klone sollten im weiteren näher charakterisiert werden.

Da beide Klone mit Hilfe der DDRT-PCR isoliert worden waren, befanden sich die bekannten Fragmente im 3'-Bereich der zugehörigen mRNA. Der erste Schritt bei der weiteren Bearbeitung der beiden ausgewählten Klone musste daher die Isolation der vollständigen cDNA sein. Hierzu wurde auf einen kommerziell erhältlichen Kit zurückgegriffen: den „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ der Firma Clontech (siehe Seite 35). Nach den Vorgaben des Herstellers, für einen erfolgreichen Einsatz dieses Kits, sollte die mittlere Schmelztemperatur der genspezifischen Primer oberhalb von 65°C liegen. Beim Klon AK19a1 war dies nicht möglich, da im bekannten Sequenzabschnitt keine entsprechenden Primer zu finden waren, daher wurden zwei Primer mit einer geringeren mittleren Schmelztemperatur ausgewählt (19GSP, $T_M = 59,3^\circ\text{C}$ und 19NGSP, $T_M = 55,9^\circ\text{C}$). Die genspezifischen Primer für den Klon AK74b2 erfüllten mit 64,6°C (74GSP), bzw. 54,2°C (74NGSP) aus den gleichen Gründen die Vorgaben ebenfalls nicht genau. Die Bedingungen der PCR, die zur Amplifikation der cDNA diente, wurden daher entsprechend angepasst. Es war mit diesen angepassten Bedingungen möglich, für den Klon AK74b2 eine cDNA mit einer Länge von circa 2,5 kb zu isolieren (Bezeichnung dieses neuen Klons: AK74F3). Für den Klon AK19a1 konnte keine vollständige cDNA isoliert werden. Auch eine erneute Anpassung der Reaktionsbedingungen blieb ohne Erfolg. Daher beschränkte sich die weitere Arbeit auf den Klon AK74F3.

4.2 Der Klon AK74b2/F3 ist ein Proteoglykan

Ein Homologievergleich mit der ermittelten Sequenz des Klons AK743 ergab eine hohe Homologie zum „osteoinductive factor“ aus dem Rind (87%, Genbank Acc. No. M37974). Dieses Gen wurde zuerst von Bentz u. a. (1989) isoliert. Die Namensgebung erfolgte, da diesem Faktor anfänglich eine Wirkung auf das Wachstum von Knochen zugeschrieben wurde. In einer späteren Veröffentlichung (Bentz u. a. 1991) wird allerdings berichtet, dass dieser Effekt auf das Wachstum von Knochen auf eine Verunreinigung des isolierten Proteins mit den Proteinen „bone morphogenetic protein 1“ und „bone morphogenetic protein 2“ beruhte. Daher wird in

dieser Publikation das Protein und das entsprechende Gen in „Osteoglycin“ umbenannt. Diese Bezeichnung des Proteins implizierte aber weiterhin eine Rolle des Proteins als Bestandteil von Knochen. Dies entspricht aber nicht den Tatsachen, da Osteoglycin (Protein) im Knochen nicht nachweisbar war (Funderburgh u. a. 1997). Der Nachweis gelang aber in einer Vielzahl anderer Gewebe. Besonders hoch war die Menge an Osteoglycin im Bindegewebe und dem Auge. Die Autoren schlugen daher eine Umbenennung in „Mimcan“ vor. Da sich diese Bezeichnung in der Literatur noch nicht vollständig durchgesetzt hat, wird in dieser Arbeit weiterhin die Bezeichnung Osteoglycin verwendet.

In der mit dem Klon AK74F3 neu isolierten cDNA befand sich ein Bereich von 896 bp der für ein Protein von 298 Aminosäuren kodierte. Wie in Tabelle 3.2 gezeigt, war auch dieses Protein in hohem Maße homolog zu den entsprechenden Proteinen aus anderen Spezies. Aufgrund seiner Primärstruktur kann Osteoglycin in die Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane eingeordnet werden. Diese Familie von Proteinen besteht aus mindestens elf Mitgliedern, die in drei Klassen eingeteilt werden. Die Klasse I besteht aus den drei Mitgliedern Decorin (Krusius und Ruoslahti 1986), Biglycan (Fisher u. a. 1991) und Asporin (Henry u. a. 2001). Die zahlenmäßig stärkste Klasse ist die Klasse II, in der Fibromodulin (Oldberg u. a. 1989), Lumican (Blochberger u. a. 1992), Keratocan (Corpuz u. a. 1996), PREL (Bengtsson u. a. 1995) und Osteoadherin (Sommarin u. a. 1998) zusammengefasst werden. Osteoglycin bildet zusammen mit Epiphygan, das auch als PG-Lb bezeichnet wird (Shinomura und Kimata 1992; Johnson u. a. 1997) und Opticin (Reardon u. a. 2000) die Klasse III. Der Name „small leucine-rich“ Proteoglykane leitet sich von einer zentralen Domäne mit mehreren Wiederholungen einer leucinreichen Sequenz ab. Das Molekulargewicht liegt bei den bekannten „small leucine-rich“ Proteoglykane im Bereich von 35 bis 45 kDa. Alle Mitglieder dieser Familie weisen sekundäre Modifikationen auf. In der zentralen Domäne sind dies Glykosylierungen am Asparagin. Zusätzlich sind Glycosaminoglykane an die Proteine gebunden, beim Osteoglycin Keratansulfat. Diese Modifikationen werden aber in Abhängigkeit vom Ort der Expression durchgeführt und sind nicht in allen Geweben nachweisbar.

Osteoglycin wurde bislang aus sieben verschiedenen Tierarten isoliert. Sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene ergaben sich hohe Homologiewerte. Dies belegt eine hohe Konservierung des Gens während der Evolution und lässt auf identische Funktionen des Proteins in den verschiedenen Spezies schließen. Am ausführlichsten wurde Osteoglycin am Rind studiert. Zusammen mit zwei anderen Keratansulfat-Proteoglykanen (Keratocan und Lumican) stellt es das häufigste Proteoglykan der Kornea dar. Dieses häufige Vorkommen deutet auf eine entscheidende Rolle dieser drei Proteine in der Kornea hin. Untersuchung von Erbkrankheiten belegen die außerordentliche Bedeutung dieser Proteine für eine normal Struktur und Transparenz der Kornea. Bei der erblichen Stoffwechselerkrankung „makuläre Hornhautdystrophie“ liegt eine Störung der Keratansulfatsynthese vor. In der Kornea betroffener Patienten wurden keine Keratansulfat-Proteoglykane gefunden, stattdessen waren Glykoproteine mit ungewöhnlich langen Oligosaccharidresten vorhanden (Hassell u. a. 1980). Diese bildeten unregelmäßig geformte Ablagerungen in der extrazellulären Matrix der Kornea, dadurch kam zu einer Eintrübung der Kornea und letztlich zur Erblindung. Bei der „makulären Hornhautdystrophie“ war neben den Effekten am Auge auch eine Veränderung der Feinstruktur der Keratansulfat-Proteoglykane im Knorpelgewebe zu beobachten (Plaas u. a. 2001). Es wurden keine oder nur sehr kurze Keratansulfat-Ketten ausgebildet, denen die charakteristischen Sulfatgruppen fehlten. Untersuchungen an verheilenden Narben in der Kornea lieferten weitere Belege für die

entscheidende Rolle der Keratansulfat-Proteoglykane in der Kornea. Im Tierversuch an *O. cuniculus* wurde von Hassell u. a. (1983) gezeigt, dass die anfänglich trüben Narben kein Keratansulfat enthielten. Innerhalb eines Jahres wurde die normale Struktur und Zusammensetzung der Proteoglykane in diesen Narben wieder hergestellt, gleichzeitig erreichten sie wieder die normale Transparenz. In dieser Veröffentlichung finden sich erste Hinweise auf eine mögliche regulative Rolle der Keratansulfat-Proteoglykane: In den Narben war der Abstand der Abstand der Kollagenfasern zueinander größer, als in den unverletzten Bereichen der Kornea.

4.3 Verteilung und Expression der Osteoglycin mRNA

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Osteoglycin mRNA eine Länge von 3,2 kb hatte, sowohl in ruhenden und wachsenden Kollateralen, als auch in den anderen untersuchten Geweben. Im Gegensatz zu der mRNA aus *O. cuniculus* wird Osteoglycin bei *B. taurus* hauptsächlich in Form von zwei mRNA mit einer Länge von 2,6 kb und 2,5 kb exprimiert, teilweise ist auch die Expression einer längeren Form mit 4,4 kb zu beobachten (Funderburgh u. a. 1997). Mit Längen der Osteoglycin mRNA von 1,9 kb, 2,4 kb und 3,6 kb fand sich bei *H. sapiens* eine entsprechende Längenverteilung (Madison u. a. 1990). Die unterschiedlichen Längen der bovinen Osteoglycin mRNA beruhen auf dem alternativen Spleißen der prä-mRNA. Hierbei wurden die ersten beiden Exons variabel verwendet, d. h. es wurden mRNA-Moleküle mit oder ohne eines dieser beiden Exons erzeugt (Tasheva u. a. 1997). Darüberhinaus kam es zu einer alternativen Verwendung von Polyadenylierungsstellen (Tasheva u. a. 1999). Alle beobachteten Unterschiede in den verschiedenen mRNA-Molekülen lagen aber außerhalb des für das Protein kodierenden Bereichs, so dass nur ein Protein hergestellt wurde.

Die Situation bei *O. cuniculus* mit der Expression einer einzigen mRNA entsprach den Beobachtungen bei *M. musculus*; auch hier wurde nur eine mRNA mit einer Länge von 3,7 kb gefunden (Ujita u. a. 1995). Von Funderburgh u. a. (1997) liegen auch Angabe zur Expression von Osteoglycin in verschiedenen bovinen Geweben vor. Diese waren weitgehend deckungsgleich mit den Resultaten, die in dieser Arbeit für Osteoglycin gefunden wurden. Geringe Unterschiede bestehen aber durchaus: so fand sich bei *O. cuniculus* eine Expression in der Lunge, wie in Abbildung 3.8 gezeigt. Bei *B. taurus* war in der Lunge keine Expression nachweisbar, allerdings war bei dieser Spezies eine Expression in der Niere und im Skelettmuskel vorhanden (siehe Funderburgh u. a. 1997, Fig. 7). Die höchste Expression fanden die Autoren in der Kornea, der Lederhaut und in kultivierten Keratozyten, Strukturen die in dieser Arbeit nicht untersucht wurden. Die aufgezeigten Unterschiede, zwischen der Expression von Osteoglycin in *O. cuniculus* und *B. taurus*, waren nur graduell und lassen nicht auf ein vollständig unterschiedliches Expressionsmuster schließen. Insbesondere die starke Expression in Blutgefäßen, bzw. der Aorta, war bei beiden Tierarten zu beobachten und stützte die Vermutung, dass Osteoglycin außerhalb des Auges hauptsächlich von Zellen der Blutgefäße exprimiert wurde. Dies konnte aus den *in Situ* Hybridisierung in dieser Arbeit an ruhenden und wachsenden Kollateralen geschlossen werden. Die ebenfalls in dieser Arbeit gefundene Osteoglycin-Expression in Nervenfasern entsprach Ergebnissen von Nagarajan u. a. (2002). Eingesetzt wurden in der zitierten Veröffentlichung Hybridisierungen auf „Microarrays“, die zeigten, dass myelinisierte Schwann Zellen Osteoglycin verstärkt exprimierten.

Bei der Zusammenfassung der bislang zitierten Resultate ist eine genaue, zelluläre Lokalisation der Osteoglycin-Expression nur eingeschränkt möglich. Im allgemeinen waren die Unter-

suchungen bislang auf die Ebene der Organe beschränkt. Nur von einzelnen Zelltypen ist die Expression von Osteoglycin bekannt. Hierzu zählen Keratozyten, Schwann-Zellen und glatte Muskelzellen. Zur Expression von Osteoglycin in anderen Geweben hat unsere Arbeitsgruppe kürzlich genauere Daten vorgelegt (Fernandez u. a. 2003). Mit Hilfe von *in Situ* Hybridisierungen wurde gezeigt, dass Osteoglycin in den meisten Geweben von und in der Nähe von Blutgefäßen exprimiert wurde, Ausnahmen sind nur die Lunge und die Leber. In diesen Organen wurde eine Expression auch im Knorpel, den Alveolen, und im Gallengang gefunden. Die in dieser Arbeit in der Abbildung 3.11 gezeigte Expression von Osteoglycin, ist ebenfalls auf die glatten Muskelzellen beschränkt. Dieser Befund entspricht damit den bislang bekannten Ergebnissen und trägt zur Verfeinerung des Bildes bei. Osteoglycin ist ein wichtiges Protein von glatten Muskelzellen, das in allen Bereichen des Gefäßsystems exprimiert wird.

Über den Verlauf der Osteoglycin-Expression während der Embryogenese der Mammalia liegen bislang nur die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse vor. Verwendet wurde ein kommerziell erhältlicher Blot, der eine Aussage über den Verlauf der Expression während der Embryogenese bei *M. musculus* zuließ. Osteoglycin war in der „Northern Hybridisierung“ zu den Zeitpunkten 4,5 bis 7,5 Tage nach Befruchtung (E4,5 bis E7,5) und 12,5 bis 18,5 Tage nach Befruchtung (E12,5 bis E18,5) nachweisbar (siehe Abbildung 3.10), während des zwischen diesen Bereichen liegenden Zeitraums war keine Expression detektierbar. Bis zum Tag E6,5 wurde für die Isolation der verwendeten RNA der gesamte Uterus mit den darin befindlichen Embryonen verwendet. Die beobachtete Expression war daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das maternale Gewebe beschränkt. Dies ließ sich aus den Ergebnissen der „Northern Hybridisierungen“ im Gewebe (Abbildung 3.8) und dem „MTETM Array“ (Abbildung 3.9) schließen. Unterstützt wird diese Interpretation der Ergebnisse durch eine Veröffentlichung, die die Expression und Lokalisation anderer Proteine aus der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane während der frühen embryonalen Entwicklung zeigte. Die Proteine Decorin, Biglycan, Lumican und Fibromodulin waren in den frühen Stadien (Tag 1 bis Tag 7) in ihrer Expression auf das Gewebe des Uterus beschränkt und nicht im Embryo nachweisbar. Die Menge und Zusammensetzung dieser Proteine veränderte sich mit dem Aufbau des Deciduums und der Einnistung des Embryos. Vor der Einnistung waren Decorin und Lumican deutlich nachweisbar, Biglycan und Fibromodulin nur schwach, bzw. nicht vorhanden. Nach der Einnistung des Embryos war die Mengenverteilung der Proteine genau umgekehrt vorhanden (San Martin u. a. 2003).

Aussagen zum Expressionsverlauf von Osteoglycin im eigentlichen Embryo sind ab dem Tag E7,5 möglich, denn ab diesem Zeitpunkt wurde für die Isolation der RNA nur der Embryo verwendet (Tag 7,5 bis Tag E9,5 allerdings noch mit extraembryonalem Gewebe). Aus den Ergebnissen ließ sich eine starke Zunahme der Osteoglycin-Expression ab dem Tag E11,5 ablesen. Direkte Parallelen zwischen den hier geschilderten Resultaten und bereits veröffentlichten Ergebnissen waren nicht zu finden, da eine Untersuchung zur Expression und Lokalisation von Osteoglycin während der Embryogenese noch nicht durchgeführt wurde. Untersucht wurde die Expression von Osteoglycin während der Embryogenese bislang nur bei *G. gallus* und *C. japonica*. Allerdings waren die Arbeiten bei *G. gallus* (Dunlevy u. a. 2000) auf die Kornea und bei *C. japonica* auf den Tag 16 (Corpuz u. a. 2000) der Entwicklung beschränkt. Daher lassen sich keine direkten Parallelen zu den Ergebnissen dieser Arbeit finden. Bei der Entwicklung der Kornea von *G. gallus* war Osteoglycin nur gering exprimiert und die Höhe der Expression nahm im Gegensatz zum Verlauf bei *M. musculus* ab. Bei *C. japonica* wurde zum genannten Zeitpunkt die relative Expression der Osteoglycin mRNA in verschiedenen Organen und Gewe-

ben gezeigt. Dieses embryonale Expressionsmuster war weitestgehend deckungsgleich mit den schon bekannten adulten Mustern aus *B. taurus* und *O. cuniculus*. Es war wieder eine starke Expression in den verschiedenen Teile des Auges zu beobachten, aber auch im Herz und in Blutgefäßen war die Expression deutlich vorhanden. Die bislang vorhandenen Ergebnissen erlauben es nicht, einen klaren zeitlichen und örtlichen Verlauf der Osteoglycin Expression während der Entwicklung des Embryos zu zeichnen. Insbesondere, da in den beiden zitierten Veröffentlichungen keine Zuordnung der Expression von Osteoglycin zu bestimmten Zelltypen erfolgte. Genauere Angaben liegen aber zu anderen „small leucine-rich“ Proteoglykanen vor. Ebenfalls während der Entwicklung der Kornea bei *G. gallus* wurden die Proteine Lumican und Keratocan, also Mitglieder der Klasse II der „small leucine-rich“ Proteoglykane, untersucht (Dunlevy u. a. 2000). Diese beiden Proteine zeigten auch eine Abnahme der Expression mit zunehmenden Alter des Embryos. Das Expressionsprofil von Lumican entsprach dem für Osteoglycin bei *C. japonica*, allerdings war die Lumican Expression im Auge wesentlich höher (Corpuz u. a. 2000). Keratocan war in seiner Expression auf das Auge beschränkt und konnte in keinem anderen Gewebe nachgewiesen werden. Entsprechende Beobachtungen wurden bei *M. musculus* gemacht. In der Embryonalentwicklung war Keratocan ab dem Tag E13,5 nachweisbar. Die Expression beschränkte sich aber auf die Augen und die zugehörigen Vorläuferzellen, eine Beobachtung, die auch beim adulten Tier gemacht wurde (Liu u. a. 1998). Das bovine Keratocan war ebenfalls nahezu ausschließlich auf die Strukturen des Auges beschränkt, nur in der Haut, dem Ligamentum nuchae („Nackenband“) und im Skelettmuskel war eine, allerdings sehr geringe, Expression nachweisbar (Corpuz u. a. 1996). Untersuchungen zur Expression der mRNA für die Proteoglykane Decorin, Biglycan, Fibromodulin, Lumican und Chondroadherin zu späteren Zeitpunkten der Embryogenese liegen von Wilda u. a. (2000) vor. Diese zeigten eine hohe Expression dieser Proteine ab dem Tag E11,5, entsprechend dem Verlauf der Expression von Osteoglycin. Hauptsächlich war die Expression an Orten lokalisiert, an denen es zum Aufbau und Organisation der extrazellulären Matrix kam. Bis auf Decorin, dass nur im Bindegewebe vorhanden war, wurden alle untersuchten Proteine auch im Knorpel exprimiert. Mit den Ergebnissen, die in der Abbildung 3.10 dargestellt sind, war es möglich, den zeitlichen Verlauf der Osteoglycin-Expression zu beschreiben. Wie oben diskutiert, ist dieser deckungsgleich mit den Befunden, die von der Embryogenese anderer Tierarten vorliegen. Von welchen Zelltypen Osteoglycin während der Embryogenese exprimiert wird, ist anhand der bislang vorliegenden Informationen nicht eindeutig festzulegen. Die gerade geschilderten Ergebnisse zu den anderen „small leucine-rich“ Proteoglykanen und die Beobachtungen zur Embryogenese von *C. japonica* können helfen, diese Zelltypen zu bestimmen. Zellen der Augen, bzw. deren Vorläufer sind mit Sicherheit Orte, an denen Osteoglycin während der Embryogenese exprimiert wird. Aber auch Gewebe mit verstärkter Expression von Komponenten der extrazellulären Matrix ließen eine Expression von Osteoglycin erwarten.

4.4 Verteilung und Expression des Proteins Osteoglycin

Mit den hier gezeigten Ergebnissen wurde für das Protein Osteoglycin, mit der Beteiligung am Wachstum von Kollateralen, ein neuer funktioneller Zusammenhang aufgezeigt. Bislang wurde dieses Protein nahezu ausschließlich im Zusammenhang mit der Kornea und der Regulation der Transparenz dieser Struktur untersucht. Bei *O. cuniculus* wurde Osteoglycin in Form eines Glykoproteins mit einer Größe von ungefähr 36 bis 40 kDa exprimiert. Die beobachtete Doppel-

bande resultierte aus geringen Unterschieden in der Glykosylierung. Nach der enzymatischen Entfernung der Seitenketten war sie nicht mehr vorhanden (Abbildungen 3.12 und 3.15). Die Deglykosylierung führte gleichzeitig zu einer Abnahme des Molekulargewichts auf circa 30 kDa. Die ermittelte Aminosäuresequenz für Osteoglycin aus *O. cuniculus* war 298 Aminosäuren lang. Damit lag sie im oberen Längenbereich der bekannten Aminosäuresequenzen aus anderen Spezies, die zwischen 290 Aminosäuren (*X. laevis*) und 299 Aminosäuren (*B. taurus*) lang waren. Das theoretische Molekulargewicht lag bei 33,92 kDa, ohne das Signalpeptid betrug das Gewicht 31,74 kDa.

Ausführlich untersucht wurde die Größe des bovinen Osteoglycin. Dieses hatte ein theoretisches Molekulargewicht von 34 kDa (ohne Signalpeptid, Funderburgh u. a. (1997)). Tatsächlich waren aber in der Kornea unterschiedliche Größen von Osteoglycin nachweisbar. Diese unterschiedlichen Größen entstanden durch sekundäre Modifikationen, ausgehend von einem Proteinkern mit einer Größe von 25 kDa. Der ursprünglich isolierte, so genannte „osteoinductive factor“ (Bentz u. a. 1989), mit einem Molekulargewicht von 12 kDa wurde im Auge und anderen Geweben nicht nachgewiesen. Die Autoren schlugen folgende Interpretation für die verschiedenen Größen vor: Osteoglycin wird als Prä-Protein von circa 36 kDa (theoretisch 34 kDa) exprimiert, dieses Prä-Protein war aber ausschließlich in kultivierten Keratozyten nachweisbar. Das native Osteoglycin, mit einer Größe von 25 kDa, entsteht durch proteolytische Spaltung des Prä-Proteins. Im Auge war es zusätzlich glykosyliert und mit Keratansulfat-Seitenketten modifiziert. Die Glykosylierung des bovinen Osteoglycin ist, ebenso wie beim Osteoglycin aus *O. cuniculus* (siehe Abbildung 3.6 an drei Stellen möglich). Tatsächlich waren zwei unterschiedlich große, glykosylierte Osteoglycin-Formen, mit einer Masse von 36 kDa und 48 kDa, nachzuweisen. Die weitere Modifikation des Proteins, an der dritten Glykosylierungsstelle, mit Keratansulfat führte zu variablen Größen von circa 36 bis 100 kDa (Funderburgh u. a. 1991). Die Formen mit 25 und 48 kDa traten nur in der Kornea auf, in allen anderen Geweben und Organen nur die 36 kDa Form. Eine weitergehende Modifikation mit Keratansulfat war hier nicht nachweisbar. Diese Ergebnisse für das bovine Osteoglycin entsprachen also den in dieser Arbeit gezeigten Resultaten, allerdings sind die Molekulargewichte nicht direkt vergleichbar. Bei *O. cuniculus* und *B. taurus* hatte das Prä-Protein ein nahezu identisches Molekulargewicht, eine Tatsache, die sich aus der hohen Homologie erklären ließ. Die im Gewebe vorliegende, glykosylierte Form war ebenfalls im Bereich von 36 kDa im „Western Blot“ zu finden. Unterschiedlich war allerdings das Molekulargewicht der nicht glykosylierten Form, das in dieser Arbeit mit circa 30 kDa im Western Blot bestimmt wurde, dargestellt in der Abbildung 3.15. Die für das bovine Osteoglycin (25 kDa Form) angegebene, N-terminale Aminosäure war, einschließlich der umgebenden Sequenz, auch bei *O. cuniculus* zu finden. Eine theoretische Berechnung, des durch Spaltung entstehenden Fragments, ergab ebenfalls ein Molekulargewicht von 25 kDa. Zusammenfassend wird aus diesen Vergleichen deutlich, dass Osteoglycin in den verschiedenen Spezies hoch homolog ist. Auch liegt eine nahezu identische Expressions- und Größenverteilung vor, dies deutet auf ähnliche Funktionen des Proteins in allen Spezies hin.

Der oben bereits erwähnte Artikel von Fernandez u. a. (2003) beschreibt die Lokalisation des Proteins Osteoglycin in verschiedenen Organen von *O. cuniculus*. Wie schon für die mRNA gezeigt (siehe oben), war Osteoglycin in allen untersuchten Organen an den Blutgefäßen lokalisiert. In peripheren Gefäßen war Osteoglycin ein Bestandteil der Adventitia, in größeren Gefäßen war das Protein auch an einzelnen Stellen der Media zu finden. Dies ist ein überraschender Befund, da die Expression von Osteoglycin in den glatten Muskelzellen der Media erfolgt (Abbildung

3.11). Osteoglycin wird also in der Gefäßwand exprimiert, aber in der Adventitia abgelagert, ist also direkt am Kontakt mit dem umgebenden Gewebe beteiligt. Die Endothelzellen und der subendotheliale Raum zeigte keine Proteinexpression, eine Expression der mRNA war auch nicht nachweisbar. An oder in kleineren Gefäßen (Arteriolen und Kapillaren) war das Protein nicht nachweisbar. Wie schon von Shanahan u. a. (1997) für die Osteoglycin mRNA in arteriosklerotischen Plaques gezeigt, ist auch das Protein in den Plaques exprimiert. Hier liegt aber eine Besonderheit im Vergleich zu den sonstigen Befunden: In frühen Stadien der Arteriosklerose war eine Osteoglycin-Expression auch in Endothelzellen zu finden. In fortgeschrittenen Stadien der Plaquebildung war Osteoglycin als eine Proteinschicht zwischen der Neo-Intima und der Media zu finden. Die Interpretation die vorgeschlagen wurde ist, dass Osteoglycin eine Barriere für die Migration der glatten Muskelzellen bildet. Die Beobachtung, dass Osteoglycin von den wandernden glatten Muskelzellen nicht exprimiert wurde, belegt wiederum, dass die Osteoglycin-Expression an den Phänotyp der Zellen gebunden ist.

4.5 Osteoglycin ist ein Marker für differenzierte glatte Muskelzellen

Die Resultate dieser Arbeit belegen, dass Osteoglycin während des Wachstums von Kollateralen einer differentiellen Regulation unterlag. Dies wurde sowohl für die mRNA als auch für das Protein nachgewiesen. Erkennbar war, dass die Expression in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand erfolgte. Das Endothel war hieran offensichtlich nicht beteiligt, wie durch *in Situ* Hybridisierung (Abbildung 3.11) und immunologische Methoden (Abbildung 3.14) verdeutlicht wurde. Die Osteoglycin mRNA Expression war drei und sieben Tage nach Okklusion der Femoralarterie deutlich reduziert (Abbildung 3.7). Werden diese einzelnen Beobachtungen zusammengefasst, wird deutlich, dass die Expression von Osteoglycin an den phänotypischen Status der glatten Muskelzellen gebunden ist. In den ersten sieben Tagen des Kollateralwachstums war die Proliferation dieser Zellen hoch, wie in verschiedenen Tiermodellen gezeigt wurde (Scholz u. a. 2000, 2002). Danach nahm die Proliferationsrate wieder ab und die glatten Muskelzellen wechselten langsam vom synthetischen zum kontraktiven Phänotyp. Daraus kann abgeleitet werden, dass Osteoglycin ein Marker für differenzierte glatte Muskelzellen ist. Die verringerte Osteoglycin-Expression ist ein gemeinsames Merkmal vieler pathologischer Veränderungen der Blutgefäße. Von Shanahan u. a. (1997) wurden Ergebnisse zur Expression von Osteoglycin nach experimenteller Verletzung von Blutgefäßen und in arteriosklerotischen Plaques vorgelegt. Diese wiesen ebenfalls in die schon beschriebene Richtung: Osteoglycin wird von proliferierende glatten Muskelzellen vermindert exprimiert. Diese Beobachtungen zur Osteoglycin-Expression unter verschiedenen Bedingungen und die oben angeführten Beobachtungen im Zusammenhang mit der verminderten Expression von „ α -smooth muscle actin“ während verschiedener Prozesse in den Blutgefäßen¹ unterstreicht, dass Blutgefäße nur ein beschränktes Repertoire an möglichen Reaktionen auf pathologische Einflüsse haben. Sie können nur mit wenigen, genau festgelegten, Expressionsmustern reagieren. Im Gegensatz zur Atherosklerose oder der Restenose nach Verletzung der Gefäßwand, sind diese Prozesse beim Wachstum von Kollateralen aber genauer reguliert und führen nicht zu einem Verschluss des Gefäßes.

Der Verlauf der Expression der Osteoglycin mRNA entsprach genau dem Verlauf der Pro-

¹Proliferation von glatten Muskelzellen: (Owens 1995), Atherosklerose: (Glukhova u. a. 1988), Wachstum von Kollateralen: (Cai u. a. 2000)

liferation der glatten Muskelzellen. Die Beobachtung, dass das Expressionsprofil des Proteins Osteoglycin nicht mit dem Expressionsprofil der mRNA deckungsgleich verläuft, entspricht den Erkenntnissen, die für die Entwicklung von Kollateralen gewonnen wurden. Die Wachstumsrate der Kollateralen erreichte nach ungefähr drei Wochen ein Plateau (Scholz u. a. 2000). Die proliferative Aktivität in den Kollateralen setzte sich aber über diesen Zeitpunkt fort, allerdings ohne größere Zunahme des Durchmessers. Auch nach längerer Zeit waren die morphologischen Strukturen in den neu gebildeten Kollateralen deutlich von jenen in ruhenden Gefäßen zu unterscheiden. Offensichtlich griffen neben der Regulation auf der Ebene der mRNA weitere Mechanismen, die zu einem weiterhin verstärkten Abbau des Proteins auch in späten Phasen des Kollateralwachstums führten. Osteoglycin als Bestandteil der extrazellulären Matrix scheint bei der Regulation der Abläufe des Kollateralwachstums eine entscheidende Rolle zu spielen. Die, die wachsende Kollaterale umgebende, Matrix bildet die Basis für das Wachstum des Gefäßes und ist während des gesamten Geschehens einer intensiven Umgestaltung durch MMPs unterworfen (Cai u. a. 2003). Dies wird auch das in der Matrix lokalisierte Protein Osteoglycin betreffen.

4.6 Welche Faktoren beeinflussen die Expression von Osteoglycin?

An kultivierten glatten Muskelzellen aus der Aorta von *O. cuniculus* konnte untersucht werden, welche Faktoren die Expression von Osteoglycin beeinflussen. Zur Stimulation der Zellen wurden Wachstumsfaktoren und Zytokine verwendet, von denen entweder eine Beteiligung am Wachstum von Kollateralen bekannt war oder die einen direkten Effekt auf die Proliferation von glatten Muskelzellen haben. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Stimulation subkonfluent, hatten also einen proliferativen Phänotyp. Dies entspricht nicht der Situation in der wachsenden Kollaterale, da in dieser die glatten Muskelzellen in der Media dicht geschichtet vorliegen. Die entsprechende Situation in der Zellkultur wäre also eine konfluente Kultur gewesen. Zellen im Stadium der Konfluenz reagieren aber nur noch eingeschränkt auf Stimulation. Daher wurden subkonfluente Kulturen verwendet. Gemeinsam sind dem proliferativen Phänotyp, wie er in subkonfluenten Kulturen vorhanden ist und dem synthetische Phänotyp der glatten Muskelzellen in wachsenden Kollateralen, die proliferative Aktivität. Dies legt die Vermutung nahe, dass die glatten Muskelzellen in beiden Situationen ähnlich auf Stimulation reagieren.

Werden die gezeigten Ergebnisse insgesamt betrachtet (Abbildung 3.18), sind zwei Beobachtungen zu machen: Erstens ist auffällig, dass deutliche Effekte nur in Form einer verringerten Expression von Osteoglycin zu beobachten sind. Nur wenige Faktoren zeigten eine Steigerung der Expression, die auch nur sehr gering war. Daran schließt sich sofort die zweite Auffälligkeit an: Die Werte zeigten teilweise sehr hohe Standardabweichungen, insbesondere bei Expressionswerten größer 100%. Dies erschwert eine genau Beurteilung der Effekte einzelner Faktoren. Die Gründe für diese starke Streuung der Messwerte werden weiter unten diskutiert.

Die Faktoren zur Stimulation der glatten Muskelzellen waren: Oncostatin M, FGF-2, TGF- β 1, Interleukin 6, Interleukin 11, PDGF-AB und GM-CSF. Die Stimulation erfolgte über 24, 48 und 72 h, um eine etwaige zeitliche Abhängigkeit der einzelnen Faktoren detektieren zu können. Diese wurden entweder allein oder mit MCP-1 in einer Ko-Stimulation verwendet, da in mehreren Studien belegt werden konnte, dass dieser Faktor die Bildung von Kollateralen entscheidend stimuliert (Ito u. a. 1997b; Hoefler u. a. 2001; Voskuil u. a. 2003). Tiere denen der Rezeptor für MCP-1 (CCR-2) fehlte, hatten im Experiment ein deutlich verlangsamtes Wachstum der Kol-

lateralen (Heil u. a. 2004). Zusätzlich zu diesem Effekt auf die Monozyten, induzierte MCP-1 die Proliferation humaner, glatter Muskelzellen (Selzman u. a. 2002). Der Effekt den MCP-1 auf die Zellen hatte, war in dieser Untersuchung mit dem Effekt von PDGF-AB vergleichbar. Andere Berichte in der Literatur zu der Frage, ob MCP-1 eine mitogene Wirkung auf glatte Muskelzellen hat, sind in ihrer Aussage konträr. Von Ikeda u. a. (1995) wurde veröffentlicht, dass MCP-1 die Proliferation von glatten Muskelzellen aus *R. norvegicus* inhibiert. Mit einer mitogenen Wirkung auf glatte Muskelzellen, die ebenfalls aus der Aorta von *R. norvegicus* gewonnen worden waren, hatte MCP-1 in einer Untersuchung von Porreca u. a. (1997) eine konträre Wirkung.

MCP-1 wird von glatten Muskelzellen der Gefäßwand produziert. Stimuliert wird diese Expression unter anderem bei einer experimentellen Auflockerung der extrazellulären Matrix (Colonnello u. a. 2003). Die Effekte, die MCP-1 auf glatte Muskelzellen in anderen Untersuchungen hatte, traten in dieser Arbeit nicht auf, bzw. war ein Effekt von MCP-1 nur in Kombination mit anderen Faktoren nachweisbar. In der Abbildung 3.18 sind die Ergebnisse der „Northern Hybridisierungen“ grafisch dargestellt. MCP-1 allein zeigte keinen Einfluss auf die Expression von Osteoglycin. Beeinflusst wurde die Expression von Osteoglycin aber durch Oncostatin M, FGF-2 und TGF- β 1 in Kombination mit MCP-1. Die anderen getesteten Faktoren hatten nur geringe Einflüsse. Insgesamt muss zu den Ergebnissen aber angemerkt werden, dass nur bei wenigen Faktoren ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle feststellbar war. Begründet ist dies in den hohen Standardabweichungen, die für die einzelnen Experimente auftraten. Der hauptsächliche Grund hierfür ist in der Heterogenität der kultivierten Zellen zu suchen. Diese Heterogenität ist nicht durch die Verunreinigung mit anderen Zelltypen verursacht, da bei der Überprüfung der Kulturen (Abbildung 3.17) keine anderen Zelltypen nachweisbar waren. Die Ursache lag vielmehr in den Unterschieden, die die glatten Muskelzellen aus der Aorta aufwiesen. Von verschiedenen Autoren wurde berichtet, dass aus der Media oder der Neointima isolierte glatte Muskelzellen², deutliche Unterschiede im Phänotyp und der Genexpression zeigten (eine Überblick findet sich bei Shanahan und Weissberg (1998) und Hao u. a. (2003)). Aber auch bei Zellen, die im verwendeten Tiermodell nur aus der Media isoliert wurden, waren unterschiedliche Phänotypen nachweisbar (Bochaton-Piallat u. a. 1996). Zusammengefasst ergeben die geschilderten Beobachtungen, dass die glatten Muskelzellen in der Aorta nicht monoklonalen Ursprungs sind. Vielmehr fanden sich mehrere Subpopulationen, die deutlich unterschiedlich reagieren konnten. Eine dieser Subpopulationen hatte die Fähigkeit zu migrieren und bildete, nach Verletzung des Gefäßes, die glatten Muskelzellen der Neointima. Diese Zellen reagierten auch anders auf die Stimulation mit Wachstumsfaktoren. Am Beispiel der Wachstumsfaktoren IGF I, PDGF-BB und FGF-2 veranschaulichten Myit u. a. (2003), dass Zellen aus der Neointima stärker reagierten. Bei den bislang betrachteten Arbeiten muss allerdings berücksichtigt werden, dass glatte Muskelzellen, die aus der Neointima isoliert wurden, einem pathologisch veränderten Umfeld entstammen. Es ergibt sich somit die Frage, ob die geschilderten Erkenntnisse auf glatte Muskelzellen, die aus einer gesunden, unverletzten Aorta stammen, übertragen werden können. Diese Frage beantworteten Lemire u. a. (1994) mit glatten Muskelzellen, die sie aus der Aorta von neugeborene Individuen (*R. norvegicus*, Media) isolierten. Ausgehend von diesen Isolaten klonierten sie einzelne Zelllinien, die sich deutlich in ihrem Phänotyp unterschieden.

²Diese Versuche wurden mit *R. norvegicus* als Tiermodell durchgeführt. Die Bildung der Neointima erfolgte, nachdem das Endothel der Aorta mechanisch verletzt wurde.

Diese Unterschiede zeigten sich sowohl im Spektrum der exprimierten Proteine (z. B. Elastin und Osteopontin), als auch in der Morphologie und dem Wachstum in Kultur. Für adulte Tiere (*B. taurus*) wurden entsprechende Beobachtungen von Frid u. a. (1994) veröffentlicht. Diese bewiesen, dass bei dieser Spezies ebenfalls verschiedene Populationen glatter Muskelzellen in der Media eines gesunden Gefäßes (pulmonale Arterie) vorliegen. Die Heterogenität der glatten Muskelzellen nimmt ab, je weiter distal von der Aorta die Zellen isoliert werden (Stiebellehner u. a. 2003). Werden diese Beobachtungen auf vorliegende Arbeit übertragen, wäre zu fordern gewesen, die Zellen nur aus der Media distaler Gefäße zu isolieren, um eine möglichst einheitliche Zellpopulation zu erhalten. Bei der Betrachtung der Größenverhältnisse, die bei *O. cuniculus* vorliegen, wird aber deutlich, dass diese Forderung nicht zu erfüllen war. Periphere Gefäße erreichen nur geringe Durchmesser³ und sind daher ohne die Verwendung eines Kontrastmittels nicht zu lokalisieren und die Ausbeute an isolierten glatten Muskelzellen wäre sehr gering gewesen. Daher war nur die Isolation von glatten Muskelzellen aus der Aorta praktikabel. Bei der Bewertung der gewonnenen Resultate müssen daher die Abweichungen, mit denen die Zellen auf die verwendeten Faktoren reagieren, berücksichtigt werden. Die Tendenz der Ergebnisse blieb allerdings bei allen Versuchen gleich, es kam aber zu Schwankungen zwischen den einzelnen Replikaten. Diese führten dann zu den hohen Standardabweichungen.

Nach der Stimulation mit Oncostatin M nahm die Expression von Osteoglycin ab, nach 24 h war die Expression auf 40% des Kontrollwertes gesunken und nahm weiter ab auf 31% ($p < 0,05$) nach 48 h und 27% ($p < 0,05$) nach 72 h Stimulation. Oncostatin M wurde für die geschilderten Experimente ausgewählt, da es, nach Angaben von Grove u. a. (1993), mitogen auf glatte Muskelzellen aus der Aorta von *O. cuniculus* wirkte. Ein direkter Zusammenhang zwischen Oncostatin M und dem Wachstum von Kollateralen wurde bislang noch nicht bewiesen. Bekannt ist allerdings, dass dieses Zytokin von aktivierten Macrophagen, denen eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Kollateralen zukommt (Arras u. a. 1998), gebildet wird (Rose und Bruce 1991). Interessant ist in diesem Zusammenhang weiterhin, dass Oncostatin M die Bildung von MMP-9 in glatten Muskelzellen induziert (Nagata u. a. 2003). Hieraus ergibt sich eine Parallele zur Bildung von Kollateralen, da diese in der Neointima ebenfalls eine erhöhte Konzentration der MMP-9 zeigten (Cai u. a. 2000). Die hier gezeigte starke Verminderung der Expression von Osteoglycin durch Oncostatin M, deutet auf eine wichtige Rolle dieses Faktors während der Anfangsphase der Arteriogenese hin. In wachsenden Kollateralen war zwei bis drei Tage nach Okklusion der Femoralarterie die Ansammlung der Monozyten am höchsten (Scholz u. a. 2000). Dies war auch der Zeitpunkt, zu dem die Osteoglycin mRNA, in den wachsenden Kollateralen, stark vermindert exprimiert wurde (siehe Abbildung 3.7). In kultivierten Zellen erreichte die Stimulation mit Oncostatin M nach 72 h den stärksten Effekt. Diese Ergebnisse lassen sich in der Hypothese zusammenfassen, dass Oncostatin M in der Anfangsphase des Kollateralwachstums einen verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix induziert. Zu späteren Zeitpunkten ist anzunehmen, dass die Wirkung, die Oncostatin M ausgeübt hat, durch andere Faktoren übernommen wird, da Monozyten nur in den ersten drei Tagen nachweisbar sind. Allerdings kann eine anfängliche Induktion des Abbaus der Matrix ausreichend sein, da proliferierende glatte Muskelzellen weniger Komponenten der extrazellulären Matrix produzieren.

Oncostatin M gehört in eine Familie von Zytokinen, zu der auch Interleukin 6 und Interleukin 11 gehören. Für Interleukin 6 wurde nachgewiesen, dass es die Migration von glatten

³Die A. femoralis von *O. cuniculus* erreicht einen Durchmesser von ungefähr 1,6 mm (Scholz u. a. 2000).

Muskelzellen stimuliert. Ein Effekt, der durch eine Reorganisation der Aktinfasern des Zytoskeletts induziert wurde und außerdem noch von der Phosphorylierung der „Focal adhesion kinase“ abhängig war (Wang und Newman 2003). Innerhalb der ersten 24 h nach Verschluss der Femoralarterie wurde Interleukin 6 verstärkt exprimiert. Das verwendete Tiermodell bei dieser Untersuchung war *M. musculus* (Lee u. a. 2004). Interleukin 6 hatte nur einen geringen Einfluss auf die Expression von Osteoglycin in glatten Muskelzellen. Nur nach 24 h Stimulation war ein Anstieg auf 160% des Kontrollwertes nachweisbar, nach 48 h wurden 120% des Kontrollwertes gemessen und nach 72 h war die Expression dann auf 72% des Kontrollwertes gesunken. Auffällig war aber, dass diese Werte durch eine Ko-Stimulation mit MCP-1 beeinflussbar waren. Nach 48 und 72 h Stimulation lagen die Expressionswerte für Osteoglycin bei annähernd 100% des Kontrollwertes, nach 24 h Stimulation war eine Verringerung des Wertes auf 53% zu messen. Dies stellt eine komplette Umkehr des Effektes der Stimulation dar. Insbesondere stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu Berichten aus der Literatur, in denen gezeigt wurde, dass MCP-1 die Bildung von Interleukin 6 durch glatte Muskelzellen stimuliert (Viedt u. a. 2002), bei gleichzeitiger Anregung der Proliferation. Ein möglicher Ansatz diesen Widerspruch aufzulösen wäre einerseits, eine Dosisabhängigkeit der Stimulation durch Interleukin-6 anzunehmen, die bei hohen Konzentrationen zu einer Abnahme der Osteoglycin-Expression führte. Andererseits wäre aber auch denkbar, dass MCP-1 seine proliferationsfördernde Wirkung nur im Zusammenspiel mit anderen Faktoren entfalten kann und die gesteigerte Proliferation dann zu einer Abnahme der Osteoglycin mRNA führte. Diese Frage müsste durch weitere Versuche beantwortet werden, denkbar wäre hier der Einsatz unterschiedlicher Interleukin 6 Konzentrationen bei gleichzeitiger Bestimmung der Zellzahl, um eine eventuell erhöhte Proliferation nachweisen zu können.

Ebenfalls ohne Effekt auf die Expression von Osteoglycin blieb die Stimulation der Zellen mit Interleukin 11. Auch die Ko-Stimulation mit MCP-1 zeigte keine Auswirkung. Ein bekannter Effekt, den Interleukin 11 auf glatte Muskelzellen ausübte, war die Abschwächung der von FGF-2 ausgelösten Proliferation der Zellen (Zimmerman u. a. 2002). Der Mechanismus der hinter dieser Abschwächung stand, war eine Verhinderung der Induktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Gleichzeitig wirkte sich dies Induktion auch auf die Expression von Interleukin 6 und 8 aus.

Die drei Zytokine Interleukin 6, Interleukin 11 und Oncostatin M besitzen den gemeinsamen Rezeptor „gp130“; dieser wurde bei den hier vorliegenden Untersuchungen aber nicht angesprochen, da nur Oncostatin M eine deutliche Wirkung auf die Expression von Osteoglycin hatte. Interleukin 6 und Interleukin 11 hatten keinen, bzw. nur einen geringen Einfluss auf die Expression von Osteoglycin.

Durch den Wachstumsfaktor FGF-2 wurde die Expression von Osteoglycin in glatten Muskelzellen ebenfalls verringert. Vergleichbar zum Oncostatin M hatte eine Ko-Stimulation mit MCP-1 keinen Einfluss auf die ermittelten Werte. FGF-2 hat eine bekannte mitogene Wirkung auf glatte Muskelzellen (Myit u. a. 2003). Für diesen Wachstumsfaktor sind mehrere Rezeptoren beschrieben. So ist z. B. auf glatten Muskelzellen der Rezeptor FGFR-1 zu finden. Die Bindung von FGF-2 an seinen Rezeptor und die biologische Aktivität dieses Faktors wird von Komponenten der extrazellulären Matrix beeinflusst. Bekannt ist in diesem Zusammenhang der modulierende Einfluss von Heparin/Heparan-ähnlichen Glykosaminoglykanen (HLGAG). Diese sind auf der Außenseite der Zellmembran zu finden und können FGF-2 binden (Natke u. a. 1999). In Mutanten von *M. musculus*, die weniger Heparansulfat bildeten, war eine deutlich höhere DNA-Synthese nach Stimulation mit FGF-2 zu finden. Diese verstärkte Antwort der

Zellen auf die Stimulation resultierte aus einer verringerten Bindung von FGF-2 (Tran u. a. 2004) an die extrazelluläre Matrix und damit einer erhöhten Stimulation der Zellen, da mehr freies FGF-2 vorlag. Der direkte Zusammenhang zwischen FGF-2 und dem Wachstum von Kollateralen wurde bereits mehrfach belegt. In der Adventitia der Kollateralen wurde FGF-2 verstärkt exprimiert (Cai u. a. 2003). Durch die Gabe von FGF-2 konnte das Wachstum der Kollateralen beschleunigt werden und damit die Durchblutung nach Gefäßverschluss verbessert werden. Dies gelang sowohl bei lokaler Anwendung von FGF-2 (Unger u. a. 1994), als auch bei systemischer Anwendung (Lazarous u. a. 1995). Eine ähnliche Verbesserung des kollateralen Blutflusses wurde von Hershey u. a. (2003) auch für den nahe verwandten Wachstumsfaktor FGF-1 beobachtet. Bei Untersuchungen des natürlichen, nicht durch Wachstumsfaktoren oder Zytokine stimulierten Ablaufs des Kollateralwachstums, zeigte sich allerdings, dass FGF-2 selber nicht differentiell exprimiert wurde. Auffällig war aber eine verstärkte Expression und eine verstärkte Aktivität des Rezeptors FGFR-1, innerhalb der ersten 12 Stunden nach Okklusion der Femoralarterie (Deindl u. a. 2003). FGF-2 wurde bereits im Rahmen einer klinischen Studie an Patienten mit Durchblutungsstörungen der Beine aufgrund von Verschlüssen der zuleitenden Gefäße (A. femoralis, A. poplitea, A. tibialis) getestet (Lederman u. a. 2002). Eine einmalige Gabe von FGF-2 war ausreichend, um eine Linderung der Symptome zu erreichen und resultierte in einer verlängerten Ausdauer beim Lauffest auf einem Laufband.

Vergleichbar zum Interleukin 6, war auch bei TGF- β 1 ein deutlicher Effekt auf die Osteoglycin-Synthese der glatten Muskelzellen nur in der Ko-Stimulation mit MCP-1 nachweisbar. TGF- β 1 alleine hatte nur einen kurzfristig hemmenden Einfluss auf die Osteoglycin-Expression (Reduktion auf 60% des Kontrollwertes nach 48 h). Im Rahmen des Kollateralwachstums ist die Rolle, die TGF- β 1 spielt, noch nicht eindeutig definiert. In den wachsenden Kollateralen war TGF- β 1 nachweisbar und eine exogene Gabe von TGF- β 1 führte zu einer deutlichen Verbesserung der Durchblutung sieben Tage nach Okklusion der Femoralarterie (van Royen u. a. 2002). Eine differentielle Regulation, allerdings erst in einer späteren Phase, von TGF- β 1 in wachsenden Kollateralen wurde kürzlich gezeigt (Lee u. a. 2004). Weiterhin ist bekannt, dass TGF- β 1 die Expression von weiteren Genen, die am Wachstum von Kollateralen beteiligt sind, reguliert. Eines dieser Gene ist *Carp*, das innerhalb der ersten 24 h nach Verschluss der A. femoralis deutlich erhöht exprimiert wird. Diese Erhöhung der Expression wird durch TGF- β 1 ausgelöst, entsprechende Ergebnisse aus *in Vitro* (Kanai u. a. 2001) und *in Vivo* (Boengler u. a. 2003) Studien liegen vor. Auf isolierte glatte Muskelzellen wirkt TGF- β 1 antiproliferativ, ein Effekt der sich in mehreren, unterschiedlichen Experimenten zeigte. Zugabe von exogenem TGF- β 1 zu kultivierten Zellen führte, in Abhängigkeit von der gewählten Zytokinkonzentration, zu einer Verringerung der Proliferation (Halloran u. a. 1995). Der gegenteilige Effekt trat nach Verminderung des endogen in den Zellen verfügbaren TGF- β 1 durch die Transfektion eines antisense Konstruktes ein: Die glatten Muskelzellen zeigten eine deutlich erhöhte Proliferation, gemessen durch erhöhte DNA-Synthese (Khanna 2004). Neben diesen direkten Effekten auf die Rate, mit der glatte Muskelzellen proliferieren, hatte TGF- β 1 auch indirekte Effekte. Mii u. a. (1993) konnten nachweisen, dass eine Vermehrung der Zellen, die durch Stimulation mit FGF-2, PDGF oder EGF ausgelöst worden war, durch TGF- β 1 inhibiert wurde. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu dem oben angeführten positiven Effekt, den TGF- β 1 auf das Wachstum von Kollateralen hatte, da dieses ja in großem Maße durch proliferierende glatte Muskelzellen charakterisiert ist. Von van Royen u. a. (2002) wurde ein indirekter Mechanismus vorgeschlagen: TGF- β 1 führt zu einer verstärkten Expression des Rezeptors Mac-1 auf Mono-

zyten, diese können dadurch besser an die Endothelzellen adhären und transmigrieren mit einer erhöhten Rate in die subendothelialen Schichten. Eine Quelle für TGF- β 1 in wachsenden Kollateralen könnten die Endothelzellen sein, da diese auf eine experimentelle Erhöhung der Wandschubspannung mit einer verstärkten Produktion des Zytokines reagieren (Cucina u. a. 1998). Die Auswirkungen, die TGF- β 1 auf die Expression von Proteoglykanen hat, wurden in verschiedenen Zelltypen untersucht. Bei kultivierten Endothelzellen (Aorta, *B. taurus*) führte die Stimulation mit TGF- β 1 zu einer erhöhten Bildung von Proteoglykanen, ein Effekt der abhängig von der Konfluenz der Kultur war (Kaji u. a. 2000). In subkonfluenten Kulturen kam es ausschließlich im Medium zu einer Anreicherung von Proteoglykanen, während in konfluenten Kulturen eine Anreicherung sowohl im Medium, als auch in den Zellen zu beobachten war. Die hier untersuchten glatten Muskelzellen verhalten sich nach der Stimulation mit TGF- β 1 anders als Endothelzellen. Eine deutliche Änderung der Osteoglycin mRNA ist nicht zu verzeichnen. Wäre der Effekt dieses Zytokines auf glatte Muskelzellen vergleichbar mit dem auf Endothelzellen, wäre ein Anstieg der mRNA zu vermuten gewesen. Auffallend ist hierbei auch der starke Einfluss der Ko-Stimulation mit MCP-1. Wurden beide Zytokine, die alleine keine deutliche Wirkung zeigten, gemeinsam zur Stimulation der Zellen verwendet, wurde die Osteoglycin mRNA vermindert exprimiert (24 h Stimulation: 89% des Kontrollwertes; 48 h: 40%; 72 h: 30%). Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist die Induktion des Rezeptors für TGF- β 1 durch MCP-1 und der dadurch erst ermöglichten Antwort der Zellen auf die Stimulation. Ein indirekter Nachweis für diese Hypothese zeigte sich beim Blick auf die Daten, die bei der Stimulation der Zellen mit GM-CSF erhalten wurden.

GM-CSF hatte nur einen milden Effekt auf die Expression der Osteoglycin mRNA. Dieser wurde auch durch eine Ko-Stimulation mit MCP-1 nur gering geändert. Die Wirkung von GM-CSF auf das Kollateralwachstum ist bereits aus verschiedenen Studien bekannt. GM-CSF hatte eine fördernde Wirkung auf das Wachstum von Kollateralen, ein Effekt, der durch gleichzeitige Gabe von MCP-1 noch gesteigert werden konnte (Buschmann u. a. 2001). Auch in einer klinischen Studie wurde bereits gezeigt, dass die Gabe von GM-CSF den kollateralen Blutfluss verbessert (Seiler u. a. 2001). Ein Effekt der Stimulation mit GM-CSF auf die Expression von Osteoglycin trat in den hier gezeigten Experimenten nur ein, wenn eine Ko-Stimulation mit MCP-1 und TGF- β 1 durchgeführt wurde. In einer Veröffentlichung von Chen u. a. (2003) finden sich Hinweise, die helfen diese Befunde zu erklären. In glatten Muskelzellen (in diesem Fall aus den Luftwegen der Lunge gewonnen) kam es zu einer verstärkten Expression der TGF- β -Rezeptoren vom Typ I, II und III. Angewendet auf diese Arbeit kann daher postuliert werden, dass eine Änderung der Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen, ausgelöst durch die Gabe von MCP-1 oder GM-CSF, zu einer veränderten Antwort der Zellen auf die Stimulation mit TGF- β 1 führt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wären aber noch weitere Untersuchungen nötig, wie z. B. die Beantwortung der Frage, welche Rezeptoren durch die verschiedenen Faktoren verstärkt oder vermindert exprimiert werden.

In den hier präsentierten Untersuchungen hatte die Stimulation mit PDGF-AB ebenfalls nur geringe Auswirkungen auf die Expression von Osteoglycin. Dies war umso verwunderlicher, als dass PDGF-AB ein Mitogen für glatte Muskelzellen ist (Hughes u. a. 1996) und daher ein stärkeren Rückgang der Expression hätte auslösen müssen. Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch wäre anzunehmen, dass PDGF-AB in diesen Versuchen nur eine geringe mitogene Wirkung auf die Zellen hatte. Die Zellen proliferieren schon, aufgrund der Bedingungen, in der subkonfluenten Kultur. Der zusätzliche mitogene Effekt von PDGF-AB

hat dann nur einen geringen Effekt. Für Decorin, ebenfalls ein Mitglied der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane, wurde ein entsprechendes Verhalten nach Stimulation mit PDGF gezeigt. Auch dieses Proteoglykan wird bei der Stimulation von kultivierten glatten Muskelzellen nicht beeinflusst (Schönherr u. a. 1993).

Insgesamt bleibt festzustellen, dass nur wenige Faktoren die Expression von Osteoglycin veränderten. Deutliche Effekte waren nur in einer Verringerung der Expression zu finden. Faktoren, die eine starke Änderung der Expression der Osteoglycin mRNA bewirkten, waren Oncostatin M und FGF-2. TGF- β 1 zeigte deutliche Effekte nur in Kombination mit MCP-1 und GM-CSF. Die Wirkung von FGF-2 auf Osteoglycin entsprach den Erwartungen und war ein weiterer Beleg dafür, dass die mRNA in proliferierenden glatten Muskelzellen vermindert exprimiert wird. Der Zusammenhang zwischen Osteoglycin und FGF-2 ist so auch in den wachsenden Kollateralen zu vermuten. Eine differentielle Expression von Osteoglycin nach der Stimulation mit Oncostatin M ist bislang noch nicht gezeigt worden. Dieser neue Befund weist auf eine Beteiligung von Oncostatin M beim Wachstum von Kollateralarterien hin. Wie oben angeführt, haben die Effekte, die Oncostatin M auf glatte Muskelzellen in Kultur ausübt, Parallelen zum Geschehen in wachsenden Kollateralen. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob Oncostatin M in wachsenden Kollateralen verstärkt exprimiert wird, da hierzu bislang noch keine Untersuchungen veröffentlicht wurden.

4.7 Ein Vergleich mit anderen „small leucine-rich“ Proteoglykanen

Die bislang geschilderten Ergebnisse belegen eine wichtige Rolle des Proteins Osteoglycin in den untersuchten Blutgefäßen und wachsenden Kollateralarterien. Es ist ein häufiger Bestandteil der Adventitia und wird nach dem Verschluss der Femoralarterie vermindert exprimiert. Auch andere Mitglieder der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane sind in Blutgefäßen nachgewiesen worden. Die beiden Proteoglykane Decorin und Biglycan sind natürliche Bestandteile der Adventitia der Aorta (Theocharis und Karamanos 2002). In pathologisch veränderten Aorten waren diese Proteine differentiell exprimiert oder verändert lokalisiert. In Aneurysmen der Aorta wurde Biglycan deutlich vermindert exprimiert. Die Expression von Decorin war unverändert, allerdings zeigte dieses Protein eine veränderte Lokalisation in den Aneurysmen. Diese Veränderung bestand in einer Verschiebung von der Adventitia zur Intima (Theocharis und Karamanos 2002). In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung waren arteriosklerotische Läsionen in der Aorta nachweisbar, die von einer Gewebeschicht umgeben waren, die einen hohen Gehalt an Decorin aufwiesen. Diese differentielle Lokalisation des Proteins Decorin wurde in ähnlicher Ausprägung auch für Osteoglycin beobachtet. In normalen, gesunden Aorten war Osteoglycin ebenfalls hauptsächlich in der Adventitia zu finden. Bei der Betrachtung fortgeschrittener, arteriosklerotischer Läsionen (Tiermodell: *O. cuniculus*) war auch für Osteoglycin die Verschiebung der Expression in Richtung der Intima zu sehen. Weiter wurde Osteoglycin von Zellen gebildet, die einen Ring um die Plaques bildeten (Fernandez u. a. 2003). Für Biglycan wurde eine entsprechende Verteilung des Proteins von Kunjathoor u. a. (2002) berichtet.

Neben diesen Parallelen in der Expression von Osteoglycin und Decorin bei verschiedenen Gefäßkrankheiten zeigten beide Proteinen auch eine gleichartige Regulation in kultivierten Zellen. Für Osteoglycin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es nicht, bzw. nur gering auf die Stimulation glatter Muskelzellen mit TGF- β 1 oder PDGF-AB reagierte. Ein entsprechendes Verhalten des Proteins Decorin wurde von Schönherr u. a. (1993) berichtet, die auch zeigten,

dass Biglycan nach Stimulation mit diesen Faktoren deutlich verstärkt exprimiert wurde. Die Reaktion von Decorin auf FGF-2 ist nicht derart eindeutig zu definieren, da Abhängigkeiten vom Typ der verwendeten Zellen bekannt sind. In Fibroblasten führte die Stimulation mit FGF-2 zu einer erhöhten Expression von Decorin (Tan u. a. 1993). Endothelzellen zeigten keine Änderung der Decorin mRNA nach Stimulation mit FGF-2, allerdings auch nicht nach Stimulation mit TGF- β (Nelmarkka u. a. 1997). In glatten Muskelzellen wurde der Einfluss von FGF-2 auf die Expression von Decorin bislang noch nicht untersucht. Neben diesen Reaktionen auf Wachstumsfaktoren, reagieren Decorin und Osteoglycin noch auf einem gänzlich anderen Einfluss ähnlich: Beide Proteine werden nach Bestrahlung mit UV-Licht verstärkt exprimiert. Für Osteoglycin wurde dies an kultivierten Keratozyten nachgewiesen (Tasheva und Conrad 2003), für Decorin in Biopsien nach therapeutischer Bestrahlung mit UV-Licht (Sawada u. a. 2003).

4.8 Osteoglycin reguliert die Bildung von Kollagenfasern

Ein wichtiges Merkmal der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane ist die Fähigkeit, an Kollagen-Fasern zu binden und deren Bildung zu beeinflussen. Für die Proteine Decorin und Lumican wurde berichtet, dass sie die Bildung von Kollagenfasern in einem *in Vitro* Experiment deutlich verlangsamen (Rada u. a. 1993). Dieser hemmende Effekt war nicht an das Vorhandensein der Glykosaminoglykan-Seitenketten gebunden, auch die Proteinkerne ohne Seitenketten zeigten diesen Effekt. Nach der chemischen Reduktion der Proteine und damit dem Auflösen der Sekundärstruktur, war keine Hemmung der Bildung von Kollagenfasern nachweisbar. In Gegenwart der beiden Proteoglykane lief die Bildung der Kollagenfasern nicht nur langsamer ab, es wurden auch Fasern mit einem geringeren Durchmesser gebildet. Die Bindung der einzelnen Proteoglykane erfolgt an bestimmte Stellen der Kollagenfaser. Lumican und Fibromodulin binden hierbei dieselbe Stelle der Faser, wohingegen Decorin eine unabhängige Bindungsstelle an der Kollagenfaser hat (Svensson u. a. 2000). Gemeinsam ist diesen drei Proteoglykanen eine Form, die an ein Hufeisen erinnert. Diese Form ermöglicht, dass die Proteoglykane jeweils zwei Kollagenmoleküle binden und diese in einem gleichmäßigem Abstand zueinander anordnen. Dadurch wird ein gleichmäßiger Aufbau der Kollagenfasern erzwungen.

Bei der Analyse gentechnisch manipulierte Tiere, denen Gene für einzelne Mitglieder der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane fehlten, waren Veränderungen in der Struktur der Kollagenfasern zu beobachten. Tiere, deren Gene für Fibromodulin (Svensson u. a. 1999), Keratocan (Liu u. a. 2003), Decorin (Danielson u. a. 1997) oder Lumican (Chakravarti u. a. 1998) inaktiv waren, zeigten veränderte Kollagenstrukturen in der Haut und anderen Geweben. Diese veränderte Struktur führte unter anderem dazu, dass die Haut unter Zugbelastung wesentlich stärker gedehnt werden konnte, als dies bei Exemplaren des entsprechenden Wildtyps der Fall war. Abgesehen von diesen Auffälligkeiten bei der Struktur der Kollagenfasern, entwickelten sich die verschiedenen transgenen Tiere normal und zeigten keine veränderte Embryonalentwicklung. Bei Tieren, denen das Gen für Keratocan oder Lumican inaktiviert wurde, waren auch Veränderungen am Auge bemerkbar. Fehlte Keratocan in der Kornea, zeigte diese im Querschnitt eine geringere Wölbung als die Kornea aus dem Wildtyp. Diese Erscheinung ist mit einer Erkrankung der humanen Kornea vergleichbar, bei der es durch eine Mutation im Keratocan-Gen ebenfalls zu einer Verringerung der Keratocan-Menge in der Kornea kommt (Pellegata u. a. 2000). Bei einem Mangel an Lumican kam es zu einer Erblindung der Tiere,

hervorgerufen durch eine abnehmende Transparenz der Kornea mit zunehmendem Alter. Diese Befunde beweisen die wichtige Rolle, die die verschiedenen Mitglieder der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane beim Aufbau der extrazellulären Matrix haben.

Während des Wachstums der Kollateralen wird Osteoglycin vermindert exprimiert. Dieser Befund und entsprechende Resultate, die aus der Literatur zu entnehmen sind, ermöglichen es die Rolle von Osteoglycin im Verlauf des Wachstums von Kollateralen zu beschreiben. Wie die anderen Mitglieder der Proteinfamilie wirkt Osteoglycin regulierend auf die Biosynthese und Bildung der Kollagenfasern, die die Blutgefäße umgeben, ein. Kürzlich wurde von Tashva u. a. (2002) berichtet, dass beim Ausschalten des Gens für Osteoglycin bei *M. musculus* (Osteoglycin^{-/-}) ein Phänotyp auftritt, der dem beim Ausschalten der anderen „small leucine-rich“ Proteoglykane entspricht. Auch diese Tiere zeigten eine veränderte Kollagenstruktur in der Haut und in der Kornea. Damit kann die Regulation der Kollagen-Biosynthese durch Osteoglycin als erwiesen angesehen werden. Diese Regulation betrifft primär den Durchmesser der Kollagenfasern. Eine Regulation des Abstandes der Kollagenfasern ist, da Osteoglycin im Gewebe nur einfache Zuckerseitenketten, die kein Keratansulfat enthalten trägt (siehe Abbildung 3.15), nicht anzunehmen. Der Abstand der Kollagenfasern im Gewebe und hauptsächlich im Auge, wird durch die modifizierten Zuckerseitenketten (modifiziert mit Keratansulfat oder Dermatansulfat) der „small leucine-rich“ Proteoglykane beeinflusst. Hierbei bindet der Proteinkern an die Kollagenfaser und die Seitenketten interagieren mit den Seitenketten anderer „small leucine-rich“ Proteoglykane und garantieren so einen gleichmäßigen Abstand der Kollagenfasern (Scott 2001).

4.9 Beeinflusst Osteoglycin die Wirkung von Wachstumsfaktoren?

Verschiedene Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass Osteoglycin nicht nur an der Regulation der Biosynthese von Kollagenfasern beteiligt ist, sondern auch Funktionen darüberhinaus hat. Von anderen Mitgliedern der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane ist bekannt, dass sie die Proliferation von Zellen direkt beeinflussen und auch die Wirkung von Wachstumsfaktoren modulieren können. Für die Proteoglykane Biglycan, Decorin und Fibromodulin ist nachgewiesen, dass sie TGF- β binden (Hildebrand u. a. 1994). Diese Bindung von Wachstumsfaktoren an Proteine der extrazellulären Matrix kann deren Aktivität beeinflussen. Für Decorin wurde gezeigt, dass es die Wirkung von TGF- β 1 durch die Bindung inhibiert (Yamaguchi u. a. 1990). Diese Untersuchung wurde an „Chinese hamster ovary“ Zellen durchgeführt und war nicht an das Vorhandensein der Glykosylierungen des Proteins gebunden. Rekombinantes, nicht glykosyliertes Decorin wirkte kompetitiv auf die Interaktion. Auch in anderen Zelltypen konnte eine Interaktion von Decorin mit TGF- β 1 nachgewiesen werden. Eine Inhibierung der Decorin-Expression durch ein antisense-Konstrukt führte zu einer verringerten Sensitivität für TGF- β 1 bei Myoblasten (Riquelme u. a. 2001). Für Osteoglycin ist eine Interaktion mit TGF- β 1 oder eine Beeinflussung der Wirkung dieses Faktors bislang nicht nachgewiesen. Ausgehend von den Ergebnissen, die für die anderen Mitglieder der Proteinfamilie vorliegen, und anhand der Tatsache, dass die Glykosylierungen für die Interaktion mit TGF- β 1 nicht nötig sind, ist dies aber auch für Osteoglycin in den präexistenten Kollateralen zu vermuten.

Einzelne Proteine aus der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane können auch direkt die Proliferation von Zellen (hauptsächlich Tumorzellen) beeinflussen. Yoshioka u. a. (2000) veröffentlichten, dass Lumican inhibierend auf die Transformation von Zellen zu Tumorzellen

wirkt. Zellen, in denen Lumican rekombinant exprimiert wurde, konnten nur noch im geringen Umfang durch die Onkogene *v-src* und *v-K-ras* zu Tumorzellen transformiert werden. Gleichzeitig wuchsen Tumore, die durch diese Zellen induziert wurden, deutlich langsamer als die Kontrollen ohne rekombinante Lumican-Expression. Für Decorin ist ebenfalls bekannt, dass es anti-onkogen wirkt. Vergleichbar zur Wirkung von Lumican führte die rekombinante Expression von Decorin in Tumorzellen ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung des Wachstums dieser Zellen (Santra u. a. 2000). Ein Effekt, der von der Menge des gebildete Decorin abhängig war. Die zitierte Untersuchung wurde an Zellen die einem Mammakarzinom entstammten⁴ durchgeführt, aber auch von anderen Krebszelltypen ist bekannt, dass deren Wachstum durch Decorin inhibiert wurde. Zu nennen wären in diesem Zusammenhang Zelllinien, die Dickdarmkarzinomen, Zervixkarzinomen oder Melanomen entstammten (Santra u. a. 1997). Nach Angaben von Troup u. a. (2003) ist eine reduzierte Expression von Lumican und Decorin mit einer schlechten Prognose bei invasiven Mammakarzinomen korreliert. Ein weiterer Befund, der die hemmende Wirkung dieser beiden Proteoglykane auf die Zellproliferation unterstreicht. In allen zitierten Untersuchungen war die inhibierende Wirkung der Proteoglykane unabhängig vom Vorhandensein etwaiger Glykosylierungen, sowohl die unmodifizierten, als auch die glykosylierten Proteine zeigten eine vergleichbare Wirkung. Als Mechanismus für die inhibitorische Wirkung, wurde für Decorin die Interaktion mit dem EGFR nachgewiesen. Durch Decorin wurde die Expression dieses Rezeptors verringert und gleichzeitig die Aktivierung des Rezeptors verhindert. Dies führte zu einer Aufregulation des CDK Inhibitors p21^{WAF1/CIP1} und abschließend zu Arretierung der Zellen in der G₁ Phase des Zellzyklus (Csordas u. a. 2000). Diese geschilderten Einflüsse, die die beiden Proteoglykane Decorin und Lumican auf das Wachstum von Zellen, bzw. Tumorzellen haben, erscheinen auch für Osteoglycin möglich. Dies insbesondere, da alle Proteine aus der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane die schon bekannte, an ein Hufeisen erinnernde, Form aufweisen. Ebenfalls nicht notwendig für die inhibitorische Wirkung ist das Vorhandensein der Glykosylierungen. Daher erscheint es möglich, dass die Strukturen, die für die Interaktion zwischen Decorin und dem EGFR nötig sind, auch beim Osteoglycin vorhanden sind. Berücksichtigt werden muss hierbei allerdings, dass die Struktur der Proteine leichte Unterschiede aufweist. So unterscheiden sich die einzelnen Klassen der „small leucine-rich“ Proteoglykane durch die Anzahl der „leucine-rich repeats“⁵; daher muss diese Hypothese genauer überprüft werden. Der EGFR ist auf glatten Muskelzellen nachgewiesen und ist in diesen Zellen ebenfalls an der Regulierung der Proliferation beteiligt. Wird seine Aktivierung durch einen spezifischen Antikörper verhindert, kommt es zu einer Inhibierung der Proliferation von glatten Muskelzellen (Chan u. a. 2003). Diese beiden ursprünglich unabhängigen Befunde können zusammengefasst und auf Osteoglycin übertragen werden. Während des Wachstums der Kollateralen ist damit eine regulierende Wirkung von Osteoglycin auf die Proliferation der glatten Muskelzellen gegeben, entsprechend der hemmenden Wirkung, die Decorin auf die Teilung von Tumorzellen hat. Als Mechanismus, der hinter der verminderten Expression des EGFR steht, ist eine Reaktion der Zellen auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix wahrscheinlich. Die verringerte Expression von Osteoglycin ist dann ein Faktor, der die Proliferation der glatten Muskelzellen ermöglicht, da der inhibierende Effekt wegfällt.

⁴Verwendete Zelllinie für diese Untersuchung: MDA-453

⁵Decorin und Lumican beinhalten 11 „leucine-rich repeats“ (Matsushima u. a. 2000). Osteoglycin weist sechs, bzw. sieben „leucine-rich repeats“ auf (siehe Abbildung 3.6).

4.10 Osteoglycin und wachsende Kollateralen: Aktion oder Reaktion?

In der Adventitia der Blutgefäße ist Osteoglycin einer der Faktoren, der die Bildung der Kollagenfasern in der extrazellulären Matrix beeinflusst. Werden präexistente Kollateralen durch den Verschluss der Femoralarterie (oder einer anderen Arterie) zum Wachstum angeregt, wird Osteoglycin vermindert exprimiert. Aus den Ergebnissen, die an kultivierten glatten Muskelzellen gewonnen wurden, ist eine Beteiligung der Faktoren Oncostatin M, FGF-2 und TGF- β 1 (im Zusammenhang mit MCP 1) ableitbar (siehe Abbildung 3.18). An kultivierten Zellen bewirkten die genannten Faktoren eine Abnahme der Osteoglycin-Expression. Ein entsprechender Effekt ist auch im Gewebe, in diesem Fall also den wachsenden Kollateralen, anzunehmen. Für FGF-2 und TGF- β 1 ist ein Einfluss auf das Wachstum von Kollateralen belegt (Unger u. a. 1994; van Royen u. a. 2002), für Oncostatin M ist dies anzunehmen (siehe oben). Die Quelle dieser Faktoren ist nicht eindeutig geklärt. Bislang veröffentlichten Ergebnisse lassen aber den Schluss zu, dass sie von Monozyten angeliefert werden (Arras u. a. 1998; van Royen u. a. 2002) und nicht direkt von den Zellen des Gefäßes gebildet werden. Die unmittelbaren Befunde, die in dieser Arbeit gezeigt wurden, lassen sich also einfach in den Ablauf des Kollateralwachstums einfügen: Der Verschluss der Femoralarterie führt zu einer Aktivierung der Endothelzellen und zur Einwanderung von Monozyten. Im Gewebe der Blutgefäßwand schütten diese eingewanderten Monozyten verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, u. a. FGF-2 und TGF- β 1, aus. Die von diesen beiden Faktoren ausgelöste verringerte Expression von Osteoglycin steht im direkten Zusammenhang mit dem Abbau der extrazellulären Matrix und der einsetzenden Proliferation der glatten Muskelzellen. Die verminderte Expression wird, von den angelieferten Faktoren, in den glatten Muskelzellen der Media induziert. Da das Protein nicht in der Media, sondern in der Adventitia lokalisiert ist, wird dessen Abbau auch von anderen Faktoren beeinflusst. Dies sind hauptsächlich verschiedene Matrix-Metalloproteinasen, die direkt in der Adventitia und den angrenzenden Bereichen gebildet werden (Cai u. a. 2003). In diesem Zusammenhang ist die Frage zu stellen, ob Osteoglycin eine aktive, regulative Rolle während des Wachstums der Kollateralen hat oder die verminderte Expression nur eine Folge des Abbaus der extrazellulären Matrix ist. Die Beantwortung dieser Frage würde helfen, die molekularen Zusammenhänge bei der Regulation des Kollateralwachstums besser zu entschlüsseln und zu verstehen.

4.11 Untersuchungen an Osteoglycin^{-/-} Tieren

Die oben erwähnten Tiere, deren Gen für Osteoglycin ausgeschaltet wurde, sind eine ideale Voraussetzung um die Funktionen, die Osteoglycin beim Kollateralwachstum ausübt, näher zu charakterisieren. Erste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass diese Tiere nach Verschluss der Femoralarterie ein schnelleres Wachstum der Kollateralen und eine verbesserte Erholung des Blutfluss aufwiesen (verglichen mit dem entsprechendem Wildtyp). Dies ist sowohl kurz nach dem Setzen der Ligatur zu beobachten, als auch sieben Tage nach der Operation (siehe Abbildung 3.22). Der bessere Blutfluss in den Osteoglycin^{-/-} Tieren, unmittelbar nach dem Verschluss der Femoralarterie, ist durch eine veränderte Struktur der Blutgefäßwand zu erklären. Da keine Expression von Osteoglycin vorhanden ist, kommt es zu einer Veränderung der Kollagenstruktur und dadurch zu einer stärkeren Dehnbarkeit der Haut (Tasheva u. a. 2002). Ein Effekt, der auch für die Wand der Blutgefäße anzunehmen ist. Die stärkere Dehnbarkeit der Blutgefäßwand resultiert in einer höheren Dilatation der präexistenten Kollateralen. Dadurch

ist der verbleibende Blutfluss, unmittelbar nach der Okklusion der Femoralarterie, bei den Osteoglycin^{-/-} Tieren höher als bei den entsprechenden Wildtypen (Osteoglycin^{+/+}).

Dieser anfängliche Befund ist noch kein eindeutiger Hinweis auf eine entscheidende Rolle des Proteins Osteoglycin beim Wachstum der Kollateralen. Allerdings deutet das schnellere Wachstum der Kollateralen, also die stärkere Durchblutung sieben Tage nach Verschluss der Femoralarterie, auf eine wichtige Rolle von Osteoglycin hin. Zu diesem Zeitpunkt ist der Blutfluss bei den Osteoglycin^{-/-} Tieren bereits wieder auf das normale Niveau gestiegen. Der Wert für den relativen Blutfluss in den Osteoglycin^{+/+} Tieren betrug 0,84 und war damit signifikant geringer ($p < 0,05$). Zu beachten ist allerdings, dass drei Tage nach Okklusion der Femoralarterie die Verhältnisse genau umgekehrt waren. Nach drei Tagen Kollateralwachstum zeigten die Tiere mit normaler Osteoglycin Expression einen höheren relativen Blutfluss als die Osteoglycin^{-/-} Tiere. Auffallend ist aber die starke Streuung der Messwerte bei den Osteoglycin^{+/+} Tieren. Begründet liegt dies darin, dass die untersuchten Stämme genetisch nicht genügend einheitlich waren. Bei der Erzeugung der einzelnen Linien wurde eine Rückkreuzung auf den Wildtyp nicht durchgeführt (E. Tasheva, persönliche Mitteilung), daher ergibt sich eine höhere Variabilität der einzelnen Individuen. Die angeführten Ergebnisse sind daher noch als vorläufig zu betrachten⁶. Die Tendenz der Versuche, insbesondere sieben Tage nach Verschluss der A. femoralis, zeigt aber die wichtige Rolle, die Osteoglycin beim Wachstum der Kollateralen hat. Die Veränderung der Kollagenstruktur in den Gefäßen der Osteoglycin^{-/-} Tieren ermöglicht ein schnelleres Wachstum der Kollateralen und damit eine schnellere Normalisierung der Durchblutung. Vergleichbare Befunde sind bislang für Osteoglycin oder andere Mitglieder der Familie der „small leucine-rich“ Proteoglykane noch nicht veröffentlicht worden.

Als mögliche Erklärung für das schnellere Wachstum der Kollateralen in den Osteoglycin^{-/-} Tieren ist ein indirekter Einfluss anzunehmen. Wie bereits für die Situation unmittelbar nach Okklusion der Femoralarterie ausgeführt, sind die Gefäße in den gentechnisch veränderten Tieren stärker dehnbar. Diese mechanische Komponente hat einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf des Kollateralwachstums. Der initiale Auslöser des Wachstums von Kollateralen ist die Erhöhung der Wandschubspannung, hervorgerufen durch den zunehmenden Blutfluss nach Okklusion. Gleichzeitig bedingt der höhere Blutfluss und damit höhere Druck in der präexistenten Kollaterale eine Zunahme der tangentialen Spannung der Gefäßwand. Diese erhöhte tangentielle Spannung ist ein wichtiger Faktor für den weiteren Verlauf der Entwicklung der Kollateralen (Schaper 1967). Durch diesen mechanischen Einfluss werden die glatten Muskelzellen gedehnt und zur Proliferation angeregt (Wilson u. a. 1993). Die Höhe der tangentialen Spannung der Blutgefäßwand wird, neben dem im Gefäß herrschenden Druck, auch von der Stärke und dem Aufbau der Blutgefäßwand beeinflusst (Scholz u. a. 2001). In den bislang zur Untersuchung des Wachstums von Kollateralen verwendeten Tiermodellen endet das Wachstum der Kollateralen frühzeitig, also vor der Wiederherstellung der vollständigen Konduktanz. In den wachsenden Kollateralen nimmt die Stärke der Wand durch die Proliferation der glatten Muskelzellen zu und die tangentielle Wandspannung kehrt dadurch auf den normalen Wert zurück. Damit ist der auslösende Reiz nicht mehr vorhanden und die Entwicklung der Kollateralen kommt zum Erliegen (Schaper und Scholz 2003). In den Osteoglycin^{-/-} Tieren ist eine höhere tangentielle Wandspannung zu erwarten, da die Gefäßwand stärker gedehnt werden kann. Da diese stärker-

⁶Zur Zeit wird die Rückkreuzung der einzelnen Linie durchgeführt, um Linien mit einem einheitlichem genetischem Hintergrund zu erhalten.

re Dehnbarkeit durch die veränderte Kollagenstruktur bedingt ist, bleibt sie auch im Verlauf des Kollateralwachstums erhalten. Damit ist auch der Reiz, der zur Proliferation der glatten Muskelzellen und dadurch zur Zunahme des Durchmessers führt, weiterhin vorhanden. In den Osteoglycin^{-/-} Tieren kommt es also nicht zu einem vorzeitigen Abbruch des Kollateralwachstums. Gleichzeitig ist auch anzunehmen, dass das Kollateralwachstum in diesen Tieren schneller verläuft, da die tangentielle Wandspannung größere Werte annimmt und somit der die Proliferation fördernde Reiz größer ist.

Zusätzlich zu dieser mechanischen Komponente ist ein beschleunigtes Wachstum der Kollateralen möglich, da das „Remodelling“ der extrazellulären Matrix schneller erfolgen kann. Durch die veränderte Kollagenstruktur ist zu vermuten, dass diese leichter durch abbauende Enzyme zu beeinflussen ist. Bislang fehlen für diese Annahme allerdings schlüssige Belege.

4.12 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen ersten Einblick in die Aufgaben und Effekte, die Osteoglycin nach der Okklusion der Femoralarterie in wachsenden Kollateralen ausübt. Die aufgezeigten Möglichkeiten, über die Osteoglycin das Geschehen beeinflussen kann, müssen aber noch genauer untersucht werden, um ein abschließendes Bild zeichnen zu können. Hauptaugenmerk soll dabei anfänglich auf der Untersuchung der Osteoglycin^{-/-} Tiere liegen. An diesen Tieren kann der Einfluss von Osteoglycin auf das Wachstum von Kollateralen, im Zusammenhang mit den anderen beteiligten Faktoren, untersucht werden. Notwendig wäre z. B. die Untersuchung der morphologische Änderung, im Vergleich zum Wildtyp, aber natürlich auch die Fortführung und Ausweitung der oben angeführten Versuche.

Auch Untersuchungen an kultivierten glatten Muskelzellen können helfen, wichtige Aspekte zu klären, da diese es erlauben, einzelne Effekte isoliert zu betrachten. Neben den bereits verwendeten glatten Muskelzellen aus der Aorta von *O. cuniculus*, soll versucht werden auch aus den Osteoglycin^{-/-} Tieren entsprechende Zellen zu isolieren. Für einzelne Experimente ist auch die Verwendung von immortalisierten Zelllinien möglich. Mit diesen verschiedenen Zellen kann ein hemmender Einfluss durch Osteoglycin auf die Proliferation überprüft werden. Als einfacher Versuch wäre die Beschichtung von Zellkulturschalen mit Osteoglycin⁷ durchführbar. Sollte Osteoglycin eine hemmende Wirkung auf die Proliferation haben, würden Zellen auf beschichteten Schalen ein verlangsamtes Wachstum zeigen. Aber auch die rekombinante Überexpression von Osteoglycin in den verschiedenen Zelllinien ist denkbar, idealerweise natürlich in den Zellen aus den Osteoglycin^{-/-} Tieren, da in diesen Zellen kein endogenes Osteoglycin vorhanden ist. Darüberhinaus muss auch die Frage geklärt werden, ob Osteoglycin mit TGF- β 1 oder dem EGFR interagieren kann. Denkbar ist hier die Beschichtung von Reaktionsgefäßen mit Osteoglycin und anschließende Bindungsstudien mit verschieden markierten Faktoren, zusätzlich abgesichert durch die kompetitive Gabe von nicht markierten Faktoren.

Im Hinblick auf die Funktion von Osteoglycin bei der Regulation der Kollagenbiosynthese und die daraus resultierende, unregelmäßige Form der Kollagenfasern soll auch noch überprüft werden, ob diese veränderte Kollagenstruktur den Abbau der extrazellulären Matrix erleichtert. Ein genaues Verständnis der Vorgänge in der extrazellulären Matrix dieser Tiere kann helfen,

⁷Die hierfür nötige rekombinante Expression des Proteins ist im Moment in Arbeit. Verwendet werden Insektenzellen, die eine Expression von glykosylierten Proteinen erlauben.

den Einfluss der oben geschilderten mechanischen Faktoren besser zu verstehen. Insbesondere sind diese Versuch nötig, um zu entscheiden, welche Einflüsse eine übergeordnete Rolle beim Wachstum von Kollateralen spielen.

5 Anhang

5.1 Nukleotidsequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Klone

>AK19a1

```
1 AAAAAAGAATT TCAGGATTCC TATATAGATA GGCTATAAAG TCATGTAATT TGGAAAGCAG
61 TGTTCATTA TGGAAAGAGCT CTCAAGTTGC TTGTAAAGCT AATCTAATTA AAAAGATGTA
121 TAAATGTTCT T
```

>AK35b1

```
1 GAAGATCAAG ATTATCGCTC CCCCAGAGCG GAAGTACTCG GTCTGGATCG GGGGCTCCAT
61 CCTGGCCTCC CTCTCCACCT TCCAGCAGAT GTGGATCAGC AAGCCTGAGT ATGATGAAGC
121 CGGGCCCTCC ATTGTCCACA GGAAGTGCTT CTA AAAAGTCA GAACAGCTTC TCTGAGGGTC
181 CCCTCGAGAC TGCTCTGTGA CCACTCATGA CACATTA AAA CCTGCAAGCC T
```

>AK66a2

```
1 CAAGAGTGTG AATTGCACAT ATTATGTAAC A tTTTTTATT GTCTGAAGTC TAAAGTGCAT
61 GGGTGCTTCT GAATCACAAAG ATAGGCATGA GTGTCAAGAG GACTCCAGCA TCAGAACGGG
121 CTATTAGAAG AGCTCCTTAA CAATGCTCTG TGCAGGAGGA GGAGAGAAAT TCTCTTGTTT
181 TCTTTACCCT GTGAACCCGT GGTCTTTCAC AC
```

>AK74b2

```
1 CCTAGAATGA TCTCATATCT GTTTTTCAAT TATTCACCCC ATTTGTCAAA GCTGATTCCA
61 AAATTAAGTT TTTTCACTAA AGCATCTGTG ATCTCTTAAG GCCACAGTAT TACCCTCACA
121 ATGCTTACTA ATTCATTAC T TATTCTGAT ATTAACGATC ATAAATATTG TATGCTTCT
181 TATAATTTTG TGTGCATGCC TCATTTCTCT GTGACTGAAC GCTCACTATG AGCACATCTG
241 AATTGAATAT ACAATAAATA TTGTGAAATC CACCTAAC
```

>AK81b1

```
1 AAGCTTCGGG TAAAGGAGTC TGGGTGGTGG CCGCGGCCTC TGGGCTGGGG ATGTACCGAG
61 CTCCCAGTGA AGGAAGGGGA GCTGAGCCCG AGCCATGGCC AGTACAGTGG TAGCGGTTGG
121 ATTGACCATT GCTGCTGCAG GATTTGCAGG CCGTTATGTG TTGCAAGCCA TGAAGCATAT
181 GGAGCCTCAA GTAAAGCAAAG TTTTCAAAG TCTACCAAAA TCTGCCTTCA GTGGCGGTTA
241 TTACAGAGGT GGATTTGAAC CAAAATGAC AAAACGAGAA GCAGCGTTAA TACTAGGCGT
301 AAGCCCTACT GCCAATAAAG GAAAAATAAG AGATGCACAT CGACGAATTA TGCTCTTAAA
361 TCACCCAGAC AAAGGAGGAT CTCCTTATAT AGCAGCCAAA ATCAATGAAG CTAAAGATTT
421 ACTAGAAGGT CAAGCTAAAA AATGAAGTAA ATATATGAAT TTTCAG
```

>AK86b2

```
1 TATGAAATTT TAAATTTTCA AGGCAGTTGG TTTCTGTTAGT AGACTGTAAA TGCTCTGAGT
61 AGTAGAAAAC TCTTGTTATG TCTAGCCAAA ATATATAAAT NGTAAGAGTT GTAAAAGGGG
121 AGATTTTAGC C
```

>AK105b2

```
1 CCTAGAATGA TCTCATATCT GTTTTTCAAT TATTCACCCC ATTTGTCAAA GCTGATTCCA
61 AAATTGAAGT TTTTCACTA AAGCATCTGT GATCTCTTAA GGCCACAGTA TTACCCTCAC
121 AATGCTTACT AATTCATTCA CTTATTTTGA TATTAACGAT CATAAATATT GTATGCTTTC
181 TTA AAAATTTT GTGTGCATGC CTCATTTCTC TGTGACTGAA CGCTCACTAT GAGCACATCT
241 GAATTGAATA TACAATAAAT ATTGTGAAAT CCCC
```

>AK74F3

```
1 ACGCGGGGAC ACAAAAACCTG CACAACAGCT GCAACGGGAA AAAGAAAGTT TTGTTCCACA
61 GGCAGTAGGC CACTAGTTTA TTAGCTTCCA GTCACCTGAG TTCCTACTAA AATGAAGACT
121 CTGCGGTCTA CACTTCTCCT GCTCCTGTTT GTGCCTCTGA TAAAGCCAGC ACCACCAGCT
181 CCGCAGGAAT CACCCCTCAC CTTGACTAT GCAGCAGATC ATTTGGAAGA AGCCATATTT
241 AGCCAAGATT ATGAGGATAA ATACTTGGAT GGAAAAAATA TTGAGGAAAA ACAAACAATG
301 GTAAGATCTG TCAAGAGAAG TCTTGAATTA CAAAAAGATG AAAGTGTAAC ACCAGCACCT
361 CCCAAGAAAG AAAATGATGA AATGCCCACT TGCTTGCTAT GTGTCTGTTT AAGCGGCTCT
421 GTGTACTGTG AAGAAGTTGA CATTGATGCT GTACCACCTT TGCCAAAGGA ATCAGCCTAT
481 CTCTATGCCC GATTCAACAA AATTA AAAAAG CTGACTGCCA AAGATTTTGC AGACATGCCT
541 AACTTAAGAA GGCTTGATTT TACGGGAAAT TTGATAGAAG ACATAGAAGA TGGTACTTTT
601 TCAAAAACCTG CTCTGTTAGA AGAACTTTC AATTGCTGAAA ATCAACTACT GAAACTCCCA
661 GTTCTTCTCT CCAAGCTCAC TTTATTTAAT GCAAAAATATA ATAAAATCAA GAGTAGAGGA
721 ATCAAAGCAA ACACATTCAA AAAACTGAAT AACCTCTCTT TCCTGTACTT GGACCACAAT
781 GCCCTAGAAT CTGTGCCTCC TAATCTGCCA GAAAGTTTGC GTGTAATTCA CCTTCAGTTT
841 AACAACATAA CATCAATTAC AGATGATACA TTCTGCAAGG CTAATGACAC TCGTTACATA
901 CGGGACCGCA TTGAAGAAAT ACGGCTGGAG GGCAATCCAA TTGCTTTGGG AAAGCATCCA
961 AACAGTTTCA TTTGCTTGAA AAGATTACCT ATAGGGACAT ACTTTTAAGC ATGATCAACA
1021 CAGCATATAA ACAAATACTC ATAATCTATC TCCACAATGT CTAAAGAAAT GCAAGCATTG
1081 GCTTAATACT AACTTTGTAC TTTACTATGA AAGAATTTTG TTTAAGCAAG CATGTTCAAA
1141 GTCTTACATA TGGCAAGTAA AAAGCTCCAA TCACCAAGTT CAAAACAAAG TAATGTGAAA
1201 CTATTTAAAC AACATTACAA AATTCTTCCA GTTCATACCA GACTGCCATT TAAAAGGCAT
1261 GTAAATACTC CAATCTGAGA TGCATAATTT CCATTACAAA TTAAGTGAAG AGATAAATCC
1321 AAGAAACTCT CAACTGTTGC CTTTCTGCGC CTTTACCATA TCTGAAAAT ATTTAAGGCA
1381 GCTGTTCCCA AAGCTCTGCA AAGCTGAGTA TTTCCAGCAG TCTCCATTTT CCTTTATGAC
1441 TCACACATCA GGCATAAGA AGCAGGAACT TTGTTTCTT CCTATCAAAG CAGCTATTTT
1501 ATTATTATAT TTCACTCAGT GCAAAAATAG GGTATAGTCC CAAACCTAGG CAAAATTTTC
1561 CAAGTAAAGT AAAATTTTAC TCTGATAAAA AGTTGTCATA GAAATGTTGA AAGTTATTCT
1621 ACTTTGTGGT CACTTAAA ATATTTAGTA AAATAGTAAA AAAAAATTCA TCTAAAACCTT
1681 AACATTGTAA GTTTACCACA AAACCTTTAA GAAAGTCAAG CAGGCCAAAC CCAGTAAGTT
1741 CACACAAAAA ATCCAGAAG TTCAACCTGA TTTCCAGAGA ATAGCTGTAA GGTTCTCCAT
1801 TGTAAGGTT TTTGAATATG AGGTAAGTGC AAATTATTTT AATTTTACAC TGCAGGAATG
1861 AGAATGTCAT CAACAAATTT TTTTCCAACA TAGGGAAGGA AAATAAAGTA CATGCTAGGG
1921 TGTTACTGCT ACCACATTCC CATTATCCAT ACATGTTTAC TCAAACCTGGT TTCAGAGCAA
1981 CGTTTCCAAA CACCCTTGAT GAATGAAACA TTTAACATGA GACGTAAAT GTTCTATATC
2041 ACAATGCTGC CAGGATTTAAA GGTCTTACAA TAACTCTCCT TATAATCTAC TTAAAAGTCT
2101 TAGTCTACAA CACTACTTTG TGTAATAAAA AAAGTTTTTC AGTGTTTTAG AAACATGAAT
2161 CCAAATATA TATGAAAAAT CAGCATTATT TCTATTATAA ATTACACCTT TGAATCAAGT
2221 TAGCTTCTGT ATATACTATT CCCAGAACAC ATTCTTATTC CCATTTTAAA AGCACTTGCT
2281 TGTTTCTTCC CCCTACCTAG AATGATCTCA TATTTGTTTT TCAATTATTC ACCCCATTG
2341 TCAAAGCTAA TTCCAAAATT AAAGTTTTCT CACTAAAGCA TCTGTGATCT CTTAAGGCCA
2401 CAGTATTACC CTCACAATGC TTAATAATTC ATTCATTAT TTTGATATTA ACGACCATAA
2461 ATATTATATG CTTTCTTATA ATTTTGTGTG CAT
```

5.2 Aminosäure-Sequenzen der in dieser Arbeit untersuchten Klone

>Osteoglycin

```

1 MKTLRSTLLL LLFVPLIKPA PPAPQESPLT FDYAADHLEE AIFSQDYEDK YLDGKNIEEK
61 QTMVRSVKRS LELQKDESVT PAPPKKENDE MPTCLLCVCL SGSVYCEEVD IDAVPPLPKE
121 SAYLYARFNK IKKLTAKDFA DMPNLRRLDF TGNLIEDIED GTFSKLALLE ELSLAENQLL
181 KLPVLPKLT LFNAYNKIK SRGIKANTFK KLNNLSFLYL DHNALESVPP NLPESLRVIH
241 LQFNNITSIT DDTFCKANDT RYIRDRIEEI RLEGNPIALG KHPNSFICKL RLPIGTYF*
    
```

5.3 Aufstellung der mittels DDRT-PCR isolierten Klone

Aufstellung der isolierten DDRT-PCR-Klone. (3TnO = 3 Tage nach Okklusion, 3WnO = 3 Wochen nach Okklusion)

Klon	Primer	Änderung	Homologie zu
1a1	H-TA/AP4	stärker 3WnO	Rabbit MHC classII; Globin-Gene
1a2	H-TA/AP4	stärker 3WnO	tumor associated protein;
2b2	H-TA/AP4	schwächer 3WnO	C. elegans cosmid
3b2	H-TA/AP5	schwächer 3WnO	plasminogen activator human; IGF1
4b1	H-TA/AP4	schwächer 3WnO	mitochondriale Gene
4b2	H-TA/AP4	schwächer 3WnO	human DNA/Cosmide; α tropomyosin rabbit
5a2	H-TA/AP4	stärker 3WnO	ribosomal protein L30 human
6b1	H-TC/AP4	schwächer 3WnO	human β -tropomyosin
6b2	H-TC/AP4	schwächer 3WnO	rabbit angiotensin converting isoenzym gene
8a	H-TC/AP4	stärker 3WnO	human DNA sequence
9a	H-TC/AP4	stärker 3WnO	human DNA sequence
11b1	H-TA/AP8	schwächer 3WnO	human isopeptidase T-3
11b2	H-TA/AP8	schwächer 3WnO	12S rDNA, mitochondrial
12a1	H-TA/AP2	stärker 3TnO	rat CLP36 MRNA
12a2	H-TA/AP2	stärker 3TnO	C. elegans, Drosophila, Yeast: Cosmid
13a1	H-TA/AP2	stärker 3TnO	human ribosomal protein S26
14a1	H-TA/AP2	stärker 3TnO	protein tyrosin phosphatase
15a2	H-TC/AP1	stärker 3TnO	human early growth response 1 protein
16b1	H-TC/AP1	schwächer 3TnO	human Hox 1.8 gene
18b2	H-TC/AP4	schwächer 3TnO	genomic sequence human
19a1	H-TC/AP5	stärker 3TnO	C. elegans cosmid
20a1	H-TA/AP3	stärker 3TnO	C. elegans cosmid, Human telomere
21a2	H-TA/AP3	stärker 3TnO	human telomere, Drosophila DNA
22a1	H-TA/AP4	stärker 3TnO	NADH dehydrogenase, mitochondrial
23a1	H-TA/AP4	stärker 3TnO	human chromosome 17
25a2	H-TA/AP5	stärker 3TnO	human cosmid, human T-cell receptor
26a	H-TA/AP5	stärker 3TnO	mouse I3 gene, human Hepg2 3'region
27a	H-TA/AP10	stärker 3TnO	human chromosome 16

Aufstellung der isolierten DDRT-PCR-Klone, fortgesetzt

Klon	Primer	Änderung	Homologie zu
28a	H-TA/AP10	stärker 3TnO	C. elegans, Yeast DNA
30b1	H-TA/AP11	schwächer 3TnO	B. taurus microsatellite DNA
30b2	H-TA/AP11	schwächer 3TnO	human chromosome 16
31a2	H-TA/AP11	stärker 3TnO	human KIAA0235 gene
32a1	H-TA/AP12	stärker 3TnO	human ADP/ATP translocase
32a2	H-TA/AP12	stärker 3TnO	human BAC clone
33a	H-TA/AP13	stärker 3TnO	human non-histone chromatin protein
34a	H-TA/AP13	stärker 3TnO	human DNA for DB1, zinc finger
35b1	H-TC/AP6	schwächer 3TnO	smooth muscle γ actin
36b1	H-TC/AP7	schwächer 3TnO	18S rDNA
38b1	H-TC/AP9	schwächer 3TnO	rat cholecystokinin type-A receptor
39a1	H-TC/AP10	stärker 3TnO	rabbit ferritin H-chain
40b1	H-TC/AP10	schwächer 3TnO	rat profilaggrin
40b2	H-TC/AP10	schwächer 3TnO	human KIAA0566 protein
42a1	H-TC/AP11	stärker 3TnO	rat AIRC mRNA for AIR carboxylase-SAICAR synthetase
43b1	H-TC/AP11	schwächer 3TnO	16s rDNA, mitochondrial
44b1	H-TC/AP12	schwächer 3TnO	human chromosome Y
47b1	H-TC/AP15	schwächer 3TnO	human chromosome X
48b1	H-TC/AP14	schwächer 3TnO	ribosomal protein S3a
52a1	H-TG/AP2	stärker 3TnO	human chromosome 11q12.2 PAC
53b1	H-TG/AP3	schwächer 3TnO	human BAC clone
53b2	H-TG/AP3	schwächer 3TnO	human 4-hydroxyphenylpyruvat-dioxygenase
54b1	H-TG/AP3	schwächer 3TnO	nucleolar protein B23.2 gene
58b1	H-TG/AP5	schwächer 3TnO	human CpG-Island
59b2	H-TG/AP5	schwächer 3TnO	human DNA
60b1	H-TG/AP5	schwächer 3TnO	rabbit α 1-casein gene
61b1	H-TG/AP5	schwächer 3TnO	human chromosome X
61b2	H-TG/AP5	schwächer 3TnO	human mRNA for Golgi antigen gcp372
62b1	H-TG/AP5	schwächer 3TnO	human nuclear factor NF45 mRNA
63b1	H-TG/AP5	schwächer 3TnO	human DNA
64b1	H-TG/AP6	schwächer 3TnO	C. elegans cosmid, Human clone LM1955
64b2	H-TG/AP6	schwächer 3TnO	rabbit SINE and LINE repeat unit
65a1	H-TG/AP7	stärker 3TnO	NADH dehydrogenase, mitochondrial
65a2	H-TG/AP7	stärker 3TnO	human ribosomal protein S11
66a1	H-TG/AP7	stärker 3TnO	human cosmid
66a2	H-TG/AP7	stärker 3TnO	no Match
68b1	H-TG/AP9	schwächer 3TnO	bovine glutaminy cyclase
69b1	H-TG/AP9	schwächer 3TnO	rabbit myosin heavy chain

5.3 Aufstellung der mittels DDRT-PCR isolierten Klone

Aufstellung der isolierten DDRT-PCR-Klone, fortgesetzt

Klon	Primer	Änderung	Homologie zu
69b2	H-TG/AP9	schwächer 3TnO	laminin receptor homolog, human
70b2	H-TG/AP9	schwächer 3TnO	human chromosome 22
72b1	H-TG/AP9	schwächer 3TnO	human cosmid from Xq28, human γ -glutamyl hydrolase
73b2	H-TG/AP9	schwächer 3TnO	human PAC, human γ -glutamyl hydrolase
74b1	H-TG/AP10	schwächer 3TnO	rat ribosomal protein L15
74b2	H-TG/AP10	schwächer 3TnO	eucaryotic DNA, human cosmid
75b1	H-TG/AP10	schwächer 3TnO	human erythrocyte adducin α subunit
75b2	H-TG/AP10	schwächer 3TnO	A. thaliana BAC
76b2	H-TG/AP10	schwächer 3TnO	human megakaryocyte stimulating factor
77b1	H-TG/AP10	schwächer 3TnO	no Match
78b2	H-TG/AP10	schwächer 3TnO	C. elegans DNA
80a2	H-TG/AP8	stärker 3TnO	rabbit 18S rRNA
81b1	H-TG/AP11	schwächer 3TnO	human chromosome 11q12
81b2	H-TG/AP11	schwächer 3TnO	ribosomal RNA
82b1	H-TG/AP11	schwächer 3TnO	human DNA
83a1	H-TG/AP11	stärker 3TnO	human ribosomal protein L27a
84b1	H-TG/AP11	schwächer 3TnO	mouse m-Numb (m-nb) RNA
86b2	H-TG/AP11	schwächer 3TnO	Mycoplasma capricolum DNA
87b1	H-TG/AP11	schwächer 3TnO	human retinoblastoma susceptibility gene
87b2	H-TG/AP11	schwächer 3TnO	no Match
89b1	H-TG/AP12	schwächer 3TnO	Human 12q24 PAC
89b2	H-TG/AP12	schwächer 3TnO	Human Xp22 BAC
90b1	H-TG/AP12	schwächer 3TnO	human titin, rabbit titin
90b2	H-TG/AP12	schwächer 3TnO	mitochondrial DNA
91b1	H-TG/AP12	schwächer 3TnO	no Match
91b2	H-TG/AP12	schwächer 3TnO	ubiquinone oxidoreductase
92a1	H-TG/AP13	stärker 3TnO	rabbit muscle glycogen phosphorylase
93b1	H-TG/AP13	schwächer 3TnO	human spermidine
93b2	H-TG/AP13	schwächer 3TnO	D. melanogaster
94b2	H-TG/AP13	schwächer 3TnO	mitochondrial genes
95b1	H-TG/AP13	schwächer 3TnO	human Mac-1 gene
95b2	H-TG/AP13	schwächer 3TnO	human DNA
96a1	H-TG/AP14	stärker 3TnO	mitochondrial genes
97b1	H-TG/AP14	schwächer 3TnO	human mRNA for KIAA0016 gene
97b2	H-TG/AP14	schwächer 3TnO	human DNA
98b1	H-TG/AP14	schwächer 3TnO	rabbit T-cell receptor
98b2	H-TG/AP14	schwächer 3TnO	mitochondrial DNA
101b1	H-TA/AP9	schwächer 3WnO	no Match

Aufstellung der isolierten DDRT-PCR-Klone, fortgesetzt

Klon	Primer	Änderung	Homologie zu
101b2	H-TA/AP9	schwächer 3WnO	human PAC
102b1	H-TA/AP9	schwächer 3WnO	human Sequences
103b2	H-TA/AP9	schwächer 3WnO	Sequences from patent US56448249
105b2	H-TA/AP10	schwächer 3WnO	no Match
106a1	H-TA/AP10	stärker 3WnO	heparan sulfate proteoglycan core protein
106a2	H-TA/AP10	stärker 3WnO	A. thaliana, human cosmid
107b1	H-TA/AP10	schwächer 3WnO	no Match
107b2	H-TA/AP10	schwächer 3WnO	mitochondrial DNA
109b1	H-TA/AP10	schwächer 3WnO	branchio-oto-renal syndrom candidate gene
110a2	H-TA/AP11	stärker 3WnO	anhidrotic ectodermal dysplasia protein gene
111b1	H-TA/AP12	schwächer 3WnO	human DNA
111b2	H-TA/AP12	schwächer 3WnO	human clone 23587, pig mRNA for gp96/GRP94
112b1	H-TA/AP12	schwächer 3WnO	genomic sequence from human 13
112b2	H-TA/AP12	schwächer 3WnO	human DNA, (IGF2)
114b	H-TC/AP6	schwächer 3WnO	human DNA
115b	H-TC/AP6	schwächer 3WnO	rabbit α -smooth muscle actin
116b	H-TC/AP6	schwächer 3WnO	rat trg gene
117b	H-TC/AP7	schwächer 3WnO	rabbit as1-casein gene, MHC class II, keratin k3
118a1	H-TC/AP7	stärker 3WnO	C. elegans cosmid
118a2	H-TC/AP7	stärker 3WnO	hsp 90
119b	H-TC/AP7	schwächer 3WnO	mitochondrial DNA
120b	H-TC/AP8	schwächer 3WnO	no Match
121a1	H-TC/AP8	stärker 3WnO	son3 protein
122b	H-TC/AP8	schwächer 3WnO	P. Falciparum, human T-cell receptor
124b	H-TC/AP9	schwächer 3WnO	human RY-1 mRNA for putative nucleic acid binding protein
125b	H-TC/AP9	schwächer 3WnO	rat Gax protein, human Mox-2
128b1	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	P. falciparum,
128b2	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	C. elegans cosmid
129b1	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	human gene for antigen of antibody Ki-67
129b2	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	eucaryotic DNA
130b1	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	human soluble guanylate cyclase
130b2	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	human MN1 mRNA
131b2	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	human F1-ATPase, mitochondrial, α subunit
132b1	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	porcine mRNA for preproendothelin
133b1	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	rabbit fast skeletal myosin heavy chain
134b1	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	C. elegans, human DNA
134b2	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	human mRNA for titin protein
135b1	H-TC/AP11	schwächer 3WnO	mouse glycreol-3-phosphate acyltransferase

5.3 Aufstellung der mittels DDRT-PCR isolierten Klone

Aufstellung der isolierten DDRT-PCR-Klone, fortgesetzt

Klon	Primer	Änderung	Homologie zu
142b1	H-TC/AP12	schwächer 3WnO	<i>C. elegans</i>
143a1	H-TC/AP12	stärker 3WnO	human DNA
143a2	H-TC/AP12	stärker 3WnO	<i>P. falciparum</i>
144a1	H-TC/AP12	stärker 3WnO	prosome β -subunit
144a2	H-TC/AP12	stärker 3WnO	mitochondrial DNA
145a1	H-TC/AP12	stärker 3WnO	human putative RING finger protein
145a2	H-TC/AP12	stärker 3WnO	human putative tumor supressor
146b1	H-TC/AP12	schwächer 3WnO	<i>B. taurus</i> lactoferrin gene
146b2	H-TC/AP12	schwächer 3WnO	ileal sodiumdependent bile acid transp.
147b1	H-TC/AP12	schwächer 3WnO	mitochondrial DNA rabbit
148b2	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	glycogen phosphorylase
149a2	H-TC/AP13	stärker 3WnO	human PROS-27 mRNA
150b2	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	<i>C. elegans</i> cosmid, human DNA
151b1	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	<i>C. elegans</i> cosmid
151b2	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	human surface antigene
152b1	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	<i>C. elegans</i> DNA
152b2	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	<i>H. sapiens</i> mRNA for protein containing MBD1
153b1	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	human α catenin
153b2	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	human N-cadherin
154b1	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	human DNA-binding protein
154b2	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	human phosphatidylinositol-4-kinase
155b1	H-TC/AP13	schwächer 3WnO	<i>P. falciparum</i>
159b	H-TG/AP6	schwächer 3WnO	mitochondrial DNA
162a1	H-TG/AP6	stärker 3WnO	<i>H. sapiens</i> sin3 associated polypeptide p18
164b	H-TG/AP6	schwächer 3WnO	<i>H. sapiens</i> BAC contains cytc oxidase
165b1	H-TG/AP7	schwächer 3WnO	<i>H. sapiens</i> thyroid receptor
165b2	H-TG/AP7	schwächer 3WnO	<i>A. thaliana</i> , <i>H. sapiens</i> DNA
166b1	H-TG/AP7	schwächer 3WnO	<i>Fugu rubripes</i> DNA
167b1	H-TG/AP7	schwächer 3WnO	<i>Mycobacterium smegmatis</i> dGTPase
167b2	H-TG/AP7	schwächer 3WnO	<i>Mycobacterium leprae</i>
168a1	H-TG/AP7	stärker 3WnO	<i>C. elegans</i> cosmid, human Hox 1.5
168a2	H-TG/AP7	stärker 3WnO	rabbit mitochondrial DNA
169b1	H-TG/AP8	schwächer 3WnO	chloroplast DNA, <i>C. elegans</i>
170b1	H-TG/AP8	schwächer 3WnO	human DNA
170b2	H-TG/AP8	schwächer 3WnO	<i>C. elegans</i>
177b1	H-TG/AP10	schwächer 3WnO	human DNA
179a1	H-TG/AP11	stärker 3WnO	human isopeptidase T-3
181b2	H-TG/AP11	schwächer 3WnO	IGF II

Aufstellung der isolierten DDRT-PCR-Klone, fortgesetzt

Klon	Primer	Änderung	Homologie zu
183a2	H-TG/AP11	stärker 3WnO	eucaryotic DNA
185b1	H-TG/AP11	schwächer 3WnO	mouse follistatin like protein, human MAC-25
187b2	H-TG/AP12	schwächer 3WnO	human DNA
189b1	H-TG/AP12	schwächer 3WnO	human NADH ubiquinone oxireductase
190b1	H-TG/AP12	schwächer 3WnO	human DNA clone 23899
191b1	H-TG/AP12	schwächer 3WnO	human DNA
191b2	H-TG/AP12	schwächer 3WnO	human DNA
192b1	H-TG/AP12	schwächer 3WnO	human DNA, T-cell receptor, KIAA0143 gene
193b1	H-TG/AP16	schwächer 3WnO	human DNA
193b2	H-TG/AP16	schwächer 3WnO	rat rsec5

5.4 Abkürzungsverzeichnis

μ l	Mikroliter
Ang1	Angiopoetin 1
Ang2	Angiopoetin 2
bp	Basenpaare
CCR 2	CC chemokine receptor 2
CDK	Cyclin-dependent Kinase
cDNA	einzelsträngige DNA komplementär zu einer RNA, hergestellt durch reverse Transkription
Da	Dalton, atomare Masseneinheit
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
egr-1	Early growth response-1, Transkriptionsfaktor
FGFR-1	Fibroblast growth factor receptor-1
FGF 2	Fibroblast growth factor-2
GM CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
h	Stunde
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IGF II	Insulin like growth factor II
IGF I	Insulin like growth factor I
ips	Impulse (radioaktive Zerfälle) pro Sekunde
kg	Kilogramm
MCP 1	Monocyte chemoattractant protein-1

mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix Metallo Proteinase
mRNA	messenger RNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDGF	Platelet-derived growth factor
PlGF	Placenta growth factor
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
TGF β	Transforming growth factor- β
TNF α	Tumor necrosis factor- α
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growthfactor
Vol	Volumen

Literaturverzeichnis

ALTSCHUL, S. F. ; MADDEN, T. L. ; SCHAFFER, A. A. ; ZHANG, J. ; ZHANG, Z. ; MILLER, W. ; LIPMAN, D. J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. In: *Nucleic Acids Res* 25 (1997), Nr. 17, S. 3389–402

ARRAS, M. ; ITO, W. D. ; WINKLER, B. ; SCHAPER, J. ; SCHAPER, W.: Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. In: *J Clin Invest* 101 (1998), Nr. 1, S. 40–50

BAKER, B. F. ; MONIA, B. P.: Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. In: *Biochim Biophys Acta* 1489 (1999), Nr. 1, S. 3–18

BAYES-GENIS, A. ; CONOVER, C. A. ; SCHWARTZ, R. S.: The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. In: *Circ Res* 86 (2000), Nr. 2, S. 125–30

BENGTSSON, E. ; NEAME, P. J. ; HEINEGARD, D. ; SOMMARIN, Y.: The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Nr. 43, S. 25639–44

BENTZ, H. ; NATHAN, R. M. ; ROSEN, D. M. ; ARMSTRONG, R. M. ; THOMPSON, A. Y. ; SEGARINI, P. R. ; MATHEWS, M. C. ; DASCH, J. R. ; PIEZ, K. A. ; SEYEDIN, S. M.: Purification and Characterization of a Unique Osteoinductive Factor from Bovine Bone. In: *J Biol Chem* 264 (1989), Nr. 34, S. 20805–10

BENTZ, H. ; THOMPSON, A. Y. ; ARMSTRONG, R. ; CHANG, R. J. ; PIEZ, K. A. ; ROSEN, D. M.: Transforming growth factor-beta 2 enhances the osteoinductive activity of a bovine bone-derived fraction containing bone morphogenetic protein-2 and 3. In: *Matrix* 11 (1991), Nr. 4, S. 269–75

BLINDT, R. ; BOSSERHOFF, A.-K. ; DAMMERS, J. ; KROTT, N. ; DEMIRCAN, L. ; HOFFMANN, R. ; HANRATH, P. ; WEBER, C. ; VOGT, F.: Downregulation of N-cadherin in the neointima stimulates migration of smooth muscle cells by RhoA deactivation. In: *Cardiovasc Res* 62 (2004), Nr. 1, S. 212–22

BLOCHBERGER, T. C. ; VERGNES, J. P. ; HEMPEL, J. ; HASSELL, J. R.: cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Nr. 1, S. 347–52

BOCHATON-PIALLAT, M. L. ; ROPRAZ, P. ; GABBIANI, F. ; GABBIANI, G.: Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (1996), Nr. 6, S. 815–20

BOENGLER, K. ; PIPP, F. ; FERNANDEZ, B. ; ZIEGELHOEFFER, T. ; SCHAPER, W. ; DEINDL, E.: Arteriogenesis is associated with an induction of the cardiac ankyrin repeat protein (carp). In: *Cardiovasc Res* 59 (2003), Nr. 3, S. 573–81

BULLOCK, W. O. ; FERNANDEZ, J. M. ; SHORT, J. M.: XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* Strain with beta-galactosidase selection. In: *BioTechniques* 5 (1987), S. 376–9

BURRIDGE, K. ; FERAMISCO, J. R.: Microinjection and localization of a 130K protein in living fibroblasts: a relationship to actin and fibronectin. In: *Cell* 19 (1980), Nr. 3, S. 587–95

BUSCHMANN, I. ; HOEFER, I. ; HEIL, M. ; SCHAPER, W.: Anti-Adhesion Monoclonal Antibodies Against ICAM Inhibit Arteriogenesis. In: *J Am Coll Cardiol* 33 (Suppl I) (1999), S. 911–1 (Abstract)

BUSCHMANN, I. R. ; HOEFER, I. E. ; ROYEN, N. van ; KATZER, E. ; BRAUN-DULLEAUS, R. ; HEIL, M. ; KOSTIN, S. ; BODE, C. ; SCHAPER, W.: GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. In: *Atherosclerosis* 159 (2001), S. 343–56

CAI, W. J. ; KOLTAI, S. ; KOCSIS, E. ; SCHOLZ, D. ; KOSTIN, S. ; LUO, X. ; SCHAPER, W. ; SCHAPER, J.: Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. In: *Am J Physiol* 284 (2003), Nr. 1, S. H31–40

CAI, W.-J. ; VOSSCHULTE, R. ; AFSAH-HEDJRI, A. ; KOLTAI, S. ; KOCSIS ; ELISABETH ; SCHOLZ, D. ; KOSTIN, S. ; SCHAPER, W. ; SCHAPER, J.: Altered Balance Between Extracellular Proteolysis and Antiproteolysis is Associated with Adaptive Coronary Arteriogenesis. In: *J Mol Cell Cardiol* 32 (2000), S. 997–1011

CARMELIET, P.: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. In: *Nat Med* 6 (2000), Nr. 3, S. 389–95

CHAKRAVARTI, S. ; MAGNUSON, T. ; LASS, J. H. ; JEPSEN, K. J. ; LAMANTIA, C. ; CARROLL, H.: Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. In: *J Cell Biol* 141 (1998), Nr. 5, S. 1277–86

CHAN, A. K. ; KALMES, A. ; HAWKINS, S. ; DAUM, G. ; CLOWES, A. W.: Blockade of the epidermal growth factor receptor decreases intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. In: *J Vasc Surg* 37 (2003), Nr. 3, S. 644–9

CHEN, G. ; GROTENDORST, G. ; EICHHOLTZ, T. ; KHALIL, N.: GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression by inducing TGF-beta receptors. In: *Am J Physiol* 284 (2003), Nr. 3, S. L548–56

CHOMCZYNSKI, P. ; SACCHI, N.: Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. In: *Anal Biochem* 162 (1987), S. 156–9

COLONNELLO, J. S. ; HANCE, K. A. ; SHAMES, M. L. ; WYBLE, C. W. ; ZIPORIN, S. J. ; LEIDENFROST, J. E. ; ENNIS, T. L. ; UPCHURCH, G. R. J. ; THOMPSON, R. W.: Transient exposure to elastase induces mouse aortic wall smooth muscle cell production of MCP-1 and

RANTES during development of experimental aortic aneurysm. In: *J Vasc Surg* 38 (2003), Nr. 1, S. 138–46

CONRAD, M. C. ; ANDERSON, J. L. ; GARRET, J. B.: Chronic collateral growth after femoral artery occlusion in the dog. In: *J Appl Physiol* 31 (1971), Nr. 4, S. 550–5

CORPUZ, L. M. ; DUNLEVY, J. R. ; HASSEL, J. R. ; CONRAD, A. H. ; CONRAD, G. W.: Molecular Cloning and relative tissue expression of keratocan and mimecan in embryonic quail cornea. In: *Matrix Biol* 19 (2000), S. 693–8

CORPUZ, L. M. ; FUNDERBURGH, J. L. ; FUNDERBURGH, M. L. ; BOTTOMLEY, G. S. ; PRAKASH, S. ; CONRAD, G. W.: Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Nr. 16, S. 9759–63

CSORDAS, G. ; SANTRA, M. ; REED, C. C. ; EICHSTETTER, I. ; MCQUILLAN, D. J. ; GROSS, D. ; NUGENT, M. A. ; HAJNOCZKY, G. ; IOZZO, R. V.: Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 42, S. 32879–87

CUCINA, A. ; STERPETTI, A. V. ; BORRELLI, V. ; PAGLIEI, S. ; CAVALLARO, A. ; D'ANGELO, L. S.: Shear stress induces transforming growth factor-beta 1 release by arterial endothelial cells. In: *Surgery* 123 (1998), Nr. 2, S. 212–7

DANIELSON, K. G. ; BARIBAULT, H. ; HOLMES, D. F. ; GRAHAM, H. ; KADLER, K. E. ; IOZZO, R. V.: Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. In: *J Cell Biol* 136 (1997), Nr. 3, S. 729–43

DEINDL, E.: 18S ribosomal RNA detection on Northern blot employing a specific oligonucleotide. In: *Biotechniques* 31 (2001), Nr. 6, S. 1250, 1252

DEINDL, E. ; BOENGLER, K. ; ROYEN, N. van ; SCHAPER, W.: Differential expression of GAPDH and β -actin in growing collateral arteries. In: *Mol Cell Biochem* 236 (2002), S. 139–46

DEINDL, E. ; BUSCHMANN, I. ; HOEFER, I. E. ; PODZUWEIT, T. ; BOENGLER, K. ; VOGEL, S. ; ROYEN, N. van ; FERNANDEZ, B. ; SCHAPER, W.: Role of Ischemia and of Hypoxia-Inducible Genes in Arteriogenesis After Femoral Artery Occlusion in the Rabbit. In: *Circ Res* 89 (2001), Nr. 9, S. 779–86

DEINDL, E. ; FERNANDEZ, B. ; ZIEGELHOEFFER, T. ; SCHAPER, W.: Collateral artery growth is associated with an increased expression of Egr-1. In: *FASEB J* 15(suppl) (2001), S. A1079. Abstract 798.7

DEINDL, E. ; HOEFER, I. E. ; FERNANDEZ, B. ; BARANCIK, M. ; HEIL, M. ; STRNISKOVA, M. ; SCHAPER, W.: Involvement of the Fibroblast Growth Factor System in Adaptive and Chemokine-Induced Arteriogenesis. In: *Circ Res* 92 (2003), S. 561–8

DENIZOT, F. ; LANG, R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. In: *J Immunol Methods* 89 (1986), Nr. 2, S. 271–7

DIATCHENKO, L. ; LAU, Y. F. ; CAMPBELL, A. P. ; CHENCHIK, A. ; MOQADAM, F. ; HUANG, B. ; LUKYANOV, S. ; LUKYANOV, K. ; GURSKAYA, N. ; SVERDLOV, E. D. ; SIEBERT, P. D.: Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Nr. 12, S. 6025–30

DUNLEVY, J. R. ; BEALES, M. P. ; BERRYHILL, B. L. ; CORNUET, P. K. ; HASSEL, J. R.: Expression of the Keratan Sulfate Proteoglycans Lumican, Keratocan and Osteoglycin/Mimecan During Chick Corneal Development. In: *Exp Eye Res* 70 (2000), S. 349–62

FERNANDEZ, B. ; KAMPMANN, A. ; PIPP, F. ; ZIMMERMANN, R. ; SCHAPER, W.: Osteoglycin expression and localization in rabbit tissues and atherosclerotic plaques. In: *Mol Cell Biochem* 246 (2003), Nr. 1-2, S. 3–11

FISHER, L. W. ; HEEGAARD, A. M. ; VETTER, U. ; VOGEL, W. ; JUST, W. ; TERMINE, J. D. ; YOUNG, M. F.: Human biglycan gene. Putative promoter, intron-exon junctions, and chromosomal localization. In: *J Biol Chem* 266 (1991), Nr. 22, S. 14371–7

FRID, M. G. ; MOISEEVA, E. P. ; STENMARK, K. R.: Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. In: *Circ Res* 75 (1994), Nr. 4, S. 669–81

FUNDERBURGH, J. L. ; CORPUZ, L. M. ; ROTH, M. R. ; FUNDERBURGH, M. L. ; TASHEVA, E. S. ; CONRAD, G. W.: Mimecan, the 25-kDa Corneal Keratan Sulfate Proteoglycan, Is a Product of the Gene Producing Osteoglycin. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 44, S. 28089–95

FUNDERBURGH, J. L. ; FUNDERBURGH, M. L. ; MANN, M. M. ; CONRAD, G. W.: Unique glycosylation of three keratan sulfate proteoglycan isoforms. In: *J Biol Chem* 266 (1991), Nr. 22, S. 14226–31

GIURIATO, L. ; SCATENA, M. ; CHIAVEGATO, A. ; GUIDOLIN, D. ; PAULETTO, P. ; SARTORE, S.: Rabbit ductus arteriosus during development: anatomical structure and smooth muscle cell composition. In: *Anat Rec* 235 (1993), Nr. 1, S. 95–110

GLUKHOVA, M. A. ; KABAKOV, A. E. ; FRID, M. G. ; ORNATSKY, O. I. ; BELKIN, A. M. ; MUKHIN, D. N. ; OREKHOV, A. N. ; KOTELIANSKY, V. E. ; SMIRNOV, V. N.: Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988), Nr. 24, S. 9542–6

GROVE, R. I. ; EBERHARDT, C. ; ABID, S. ; MAZZUCCO, C. ; LIU, J. ; KIENER, P. ; TODARO, G. ; SHOYAB, M.: Oncostatin M is a mitogen for rabbit vascular smooth muscle cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993), Nr. 3, S. 823–7

HALLORAN, B. G. ; PROROK, G. D. ; SO, B. J. ; BAXTER, B. T.: Transforming growth factor-beta 1 inhibits human arterial smooth-muscle cell proliferation in a growth-rate-dependent manner. In: *Am J Surg* 170 (1995), Nr. 2, S. 193–7

HAO, H. ; GABBIANI, G. ; BOCHATON-PIALLAT, M.-L.: Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003), Nr. 9, S. 1510–20

HASELL, J. R. ; CINTRON, C. ; KUBLIN, C. ; NEWSOME, D. A.: Proteoglycan changes during restoration of transparency in corneal scars. In: *Arch Biochem Biophys* 222 (1983), Nr. 2, S. 362–9

HASELL, J. R. ; NEWSOME, D. A. ; KRACHMER, J. H. ; RODRIGUES, M. M.: Macular corneal dystrophy: failure to synthesize a mature keratan sulfate proteoglycan. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1980), Nr. 6, S. 3705–9

HEIL, M. ; ZIEGELHOEFFER, T. ; HELISCH, A. ; WAGNER, S. ; MARTIN, S.: Arteriogenesis (Collateral Artery Growth) after Femoral Artery Occlusion Is Reduced in Mice Lacking CC-Chemokine-Receptor-2. In: *Circulation* 106 (2002), Nr. 19, II, S. 276 (Abstract)

HEIL, M. ; ZIEGELHOEFFER, T. ; PIPP, F. ; KOSTIN, S. ; MARTIN, S. ; CLAUSS, M. ; SCHAPER, W.: Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. In: *Am J Physiol* 283 (2002), S. H2411–9

HEIL, M. ; ZIEGELHOEFFER, T. ; WAGNER, S. ; FERNANDEZ, B. ; HELISCH, A. ; MARTIN, S. ; TRIBULOVA, S. ; KUZIEL, W. A. ; BACHMANN, G. ; SCHAPER, W.: Collateral Artery Growth (Arteriogenesis) After Experimental Arterial Occlusion Is Impaired in Mice Lacking CC-Chemokine Receptor-2. In: *Circ Res* 94 (2004), Nr. 5, S. 671–7

HELISCH, A. ; SCHAPER, W.: Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. In: *Microcirculation* 10 (2003), Nr. 1, S. 83–97

HENRY, S. P. ; TAKANOSU, M. ; BOYD, T. C. ; MAYNE, P. M. ; EBERSPAECHER, H. ; ZHOU, W. ; CROMBRUGGHE, B. de ; HOOK, M. ; MAYNE, R.: Expression Pattern and Gene Characterization of Asporin. A newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 15, S. 12212–21

HERMAN, I. M.: Actin isoforms. In: *Curr Opin Cell Biol* 5 (1993), Nr. 1, S. 48–55

HERSHEY, J. C. ; CORCORAN, H. A. ; BASKIN, E. P. ; GILBERTO, D. B. ; MAO, X. ; THOMAS, K. A. ; COOK, J. J.: Enhanced hindlimb collateralization induced by acidic fibroblast growth factor is dependent upon femoral artery extraction. In: *Cardiovasc Res* 59 (2003), Nr. 4, S. 997–1005

HERZOG, S. ; SAGER, H. ; KHMELEVSKI, E. ; DEYLLIG, A. ; ITO, W. D.: Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. In: *Am J Physiol* 283 (2002), S. H2012–20

HILDEBRAND, A. ; ROMARIS, M. ; RASMUSSEN, L. M. ; HEINEGARD, D. ; TWARDZIK, D. R. ; BORDER, W. A. ; RUOSLAHTI, E.: Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. In: *Biochem J* 302 (Pt 2) (1994), S. 527–34

HOEFER, I. E. ; ROYEN, N. van ; BUSCHMANN, I. R. ; PIEK, J. J. ; SCHAPER, W.: Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. In: *Cardiovasc Res* 49 (2001), Nr. 3, S. 609–17

HOEFER, I. E. ; ROYEN, N. van ; RECTENWALD, J. E. ; BRAY, E. J. ; ABOUHAMZE, Z. ; MOLDAWER, L. L. ; VOSKUIL, M. ; PIEK, J. J. ; BUSCHMANN, I. R. ; OZAKI, K.: Direct Evidence for Tumor Necrosis Factor-alpha Signaling in Arteriogenesis. In: *Circulation* 105 (2002), S. 1639–41

HUGHES, A. D. ; CLUNN, G. F. ; REFSON, J. ; DEMOLIOU-MASON, C.: Platelet-derived growth factor (PDGF): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. In: *Gen Pharmacol* 27 (1996), Nr. 7, S. 1079–89

HUNG, H. L. ; SONG, F. ; GEWIRTZ, A.: A method for identifying differentially expressed genes in rare populations of primary human hematopoietic cells. In: *Leukemia* 13 (1999), Nr. 2, S. 295–7

IKEDA, U. ; OKADA, K. ; ISHIKAWA, S. ; SAITO, T. ; KASAHARA, T. ; SHIMADA, K.: Monocyte chemoattractant protein 1 inhibits growth of rat vascular smooth muscle cells. In: *Am J Physiol* 268 (1995), Nr. 3 Pt 2, S. H1021–6

IOZZO, R. V.: The Family of the Small Leucine-Rich Proteoglycans: Key Regulators of Matrix Assembly and Cellular Growth. In: *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32 (1997), Nr. 2, S. 141–74

ITO, W. D. ; ARRAS, M. ; SCHOLZ, D. ; WINKLER, B. ; HTUN, P. ; SCHAPER, W.: Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. In: *Am J Physiol* 273 (1997), Nr. 3, S. H1255–65

ITO, W. D. ; ARRAS, M. ; WINKLER, B. ; SCHOLZ, D. ; SCHAPER, J. ; SCHAPER, W.: Monocyte Chemotactic Protein- 1 Increases collateral and Peripheral Conductance After Femoral Artery Occlusion. In: *Circ Res* 80 (1997), Nr. 6, S. 829–37

JOHNSON, H. J. ; ROSENBERG, L. ; CHOI, H. U. ; GARZA, S. ; HOOK, M. ; NEAME, P. J.: Characterization of epiphycan, a small proteoglycan with a leucine-rich repeat core protein. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 30, S. 18709–17

KAJI, T. ; YAMADA, A. ; MIYAJIMA, S. ; YAMAMOTO, C. ; FUJIWARA, Y. ; WIGHT, T. N. ; KINSELLA, M. G.: Cell density-dependent regulation of proteoglycan synthesis by transforming growth factor-beta(1) in cultured bovine aortic endothelial cells. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 2, S. 1463–70

KANAI, H. ; TANAKA, T. ; AIHARA, Y. ; TAKEDA, S. ; KAWABATA, M. ; MIYAZONO, K. ; NAGAI, R. ; KURABAYASHI, M.: Transforming growth factor-beta/Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells. In: *Circ Res* 88 (2001), Nr. 1, S. 30–6

KHANNA, A.: Concerted effect of transforming growth factor-beta, cyclin inhibitor p21, and c-myc on smooth muscle cell proliferation. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (2004), Nr. 3, S. H1133–40

- KRUSIUS, T. ; RUOSLAHTI, E.: Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986), Nr. 20, S. 7683–7
- KUNJATHOOR, V. V. ; CHIU, D. S. ; O'BRIEN, K. D. ; LEBOEUF, R. C.: Accumulation of biglycan and perlecan, but not versican, in lesions of murine models of atherosclerosis. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002), Nr. 3, S. 462–8
- LAZAROUS, D. ; SCHEINOWITZ, M. ; SHOU, M. ; HODGE, E. ; RAJANAYAGAM, S. ; HUNSBERGER, S. ; ROBINSON, W. ; STIBER, J. ; CORREA, R. ; EPSTEIN, S. E.: Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. In: *Circulation* 91 (1995), Nr. 1, S. 145–53
- LEDERMAN, R. J. ; MENDELSON, F. O. ; ANDERSON, R. D. ; SAUCEDO, J. F. ; TENAGLIA, A. N. ; HERMILLER, J. B. ; HILLEGASS, W. B. ; ROCHA-SINGH, K. ; MOON, T. E. ; WHITEHOUSE, M. J. ; ANNEX, B. H.: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. In: *Lancet* 359 (2002), Nr. 9323, S. 2053–8
- LEE, C. W. ; STABILE, E. ; KINNAIRD, T. ; SHOU, M. ; DEVANEY, J. M. ; EPSTEIN, S. E. ; BURNETT, M. S.: Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice. In: *J Am Coll Cardiol* 43 (2004), Nr. 3, S. 474–82
- LEMIRE, J. M. ; COVIN, C. W. ; WHITE, S. ; GIACHELLI, C. M. ; SCHWARTZ, S. M.: Characterization of cloned aortic smooth muscle cells from young rats. In: *Am J Pathol* 144 (1994), Nr. 5, S. 1068–81
- LIANG, P. ; BAUER, D. ; AVERBOUKH, L. ; WARTHOF, P. ; ROHRWILD, M. ; MULLER, H. ; STRAUSS, M. ; PARDEE, A. B.: Analysis of altered gene expression by differential display. In: *Methods Enzymol* 254 (1995), S. 304–21
- LIANG, P. ; PARDEE, A. B.: Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction. In: *Science* 257 (1992), Nr. 5072, S. 967–71
- LIU, C.-Y. ; BIRK, D. E. ; HASSELL, J. R. ; KANE, B. ; KAO, W. W.-Y.: Keratocan-deficient mice display alterations in corneal structure. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 24, S. 21672–7
- LIU, C.-Y. ; SHIRAISHI, A. ; KAO, C. W.-C. ; CONVERSE, R. L. ; FUNDERBURGH, J. L. ; CORPUZ, L. M. ; KAO, W. W.-Y.: The Cloning of Mouse Keratocan cDNA and Genomic DNA and the Characterization of Its Expression during Eye Development. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 35, S. 22584–8
- LONGLAND, C. J.: The Collateral Circulation Of The Limb. In: *Ann R Coll Surg Engl* 13 (1953), S. 161–4
- MACKAY, F. ; LOETSCHER, H. ; STRUEBER, D. ; GEHR, G. ; LESSLAUER, W.: Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type TNF-R55. In: *J Exp Med* 177 (1993), Nr. 5, S. 1277–86

MADISON, L. ; NEUBAUER, M. ; PLOWMAN, G. ; ROSEN, D. ; SEGARINI, P. ; DASCH, J. ; THOMPSON, A. ; ZIMAN, J. ; BENTZ, H. ; PURCHIO, A.: Molecular Cloning of a Novel Bone-Forming Compound: Osteoinductive Factor. In: *DNA AND CELL BIOLOGY* 9 (1990), Nr. 5, S. 303–9

MATSUSHIMA, N. ; OHYANAGI, T. ; TANAKA, T. ; KRETSINGER, R. H.: Super-motifs and evolution of tandem leucine-rich repeats within the small proteoglycans–biglycan, decorin, lumican, fibromodulin, PRELP, keratocan, osteoadherin, epiphycan, and osteoglycin. In: *Proteins* 38 (2000), Nr. 2, S. 210–25

MAXWELL, M. ; HEARSE, D. ; DM, Y.: Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: A critical determination of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. In: *Cardiovasc Res* 21 (1987), S. 737–46

MCGUFFIN, L. J. ; BRYSON, K. ; JONES, D. T.: The PSIPRED protein structure prediction server. In: *Bioinformatics* 16 (2000), Nr. 4, S. 404–5

MII, S. ; WARE, J. A. ; KENT, K. C.: Transforming growth factor-beta inhibits human vascular smooth muscle cell growth and migration. In: *Surgery* 114 (1993), Nr. 2, S. 464–70

MOSMANN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J Immunol Methods* 65 (1983), Nr. 1-2, S. 55–63

MOU, L. ; MILLER, H. ; LI, J. ; WANG, E. ; CHALIFOUR, L.: Improvements to the differential display method for gene analysis. In: *Biochem Biophys Res Commun* 199 (1994), Nr. 2, S. 564–9

MYIT, S. ; DELAFONTAINE, P. ; BOCHATON-PIALLAT, M.-L. ; GIRAUD, S. ; GABBIANI, G. ; BRINK, M.: Different growth properties of neointimal and medial smooth muscle cells in response to growth factors. In: *J Vasc Res* 40 (2003), Nr. 2, S. 97–104

NAGARAJAN, R. ; LE, N. ; MAHONEY, H. ; ARAKI, T. ; MILBRANDT, J.: Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Nr. 13, S. 8998–9003

NAGATA, T. ; KAI, H. ; SHIBATA, R. ; KOGA, M. ; YOSHIMURA, A. ; IMAIZUMI, T.: Oncostatin M, an interleukin-6 family cytokine, upregulates matrix metalloproteinase-9 through the mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway in cultured smooth muscle cells. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003), Nr. 4, S. 588–93

NATKE, B. ; VENKATARAMAN, G. ; NUGENT, M. A. ; SASISEKHARAN, R.: Heparinase treatment of bovine smooth muscle cells inhibits fibroblast growth factor-2 binding to fibroblast growth factor receptor but not FGF-2 mediated cellular proliferation. In: *Angiogenesis* 3 (1999), Nr. 3, S. 249–57

NELIMARKKA, L. ; KAINULAINEN, V. ; SCHONHERR, E. ; MOISANDER, S. ; JORTIKKA, M. ; LAMMI, M. ; ELENUS, K. ; JALKANEN, M. ; JARVELAINEN, H.: Expression of small extracellular chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans is differentially regulated in human endothelial cells. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 19, S. 12730–7

- NEUMANN, B. ; MACHLEIDT, T. ; LIFKA, A. ; PFEFFER, K. ; VESTWEBER, D. ; MAK, T. ; HOLZMANN, B. ; KROENKE, M.: Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. In: *J Immunol* 156 (1996), Nr. 4, S. 1587–93
- NILIUS, B. ; EGGERMONT, J. ; VOETS, T. ; DROOGMANS, G.: Volume-activated Cl⁻ channels. In: *Gen Pharmacol* 27 (1996), S. 1131–40
- OLDBERG, A. ; ANTONSSON, P. ; LINDBLOM, K. ; HEINEGARD, D.: A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). In: *EMBO J* 8 (1989), Nr. 9, S. 2601–4
- ORLANDI, A. ; EHRLICH, H. P. ; ROPRAZ, P. ; SPAGNOLI, L. G. ; GABBIANI, G.: Rat aortic smooth muscle cells isolated from different layers and at different times after endothelial denudation show distinct biological features in vitro. In: *Arterioscler Thromb* 14 (1994), Nr. 6, S. 982–9
- OWENS, G. K.: Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. In: *Physiol Rev* 75 (1995), Nr. 3, S. 487–517
- PELLEGATA, N. S. ; DIEGUEZ-LUCENA, J. L. ; JOENSUU, T. ; LAU, S. ; MONTGOMERY, K. T. ; KRAHE, R. ; KIVELA, T. ; KUCHERLAPATI, R. ; FORSIUS, H. ; CHAPELLE, A. de la: Mutations in KERA, encoding keratocan, cause cornea plana. In: *Nat Genet* 25 (2000), Nr. 1, S. 91–5
- PIPP, F. ; HEIL, M. ; ISSBRUCKER, K. ; ZIEGELHOEFFER, T. ; MARTIN, S. ; HEUVEL, J. van den ; WEICH, H. ; FERNANDEZ, B. ; GOLOMB, G. ; CARMELIET, P. ; SCHAPER, W. ; CLAUSS, M.: VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. In: *Circ Res* 92 (2003), Nr. 4, S. 378–85
- PLAAS, A. H. ; WEST, L. A. ; THONAR, E. J. ; KARCIOGLU, Z. A. ; SMITH, C. J. ; KLINTWORTH, G. K. ; HASCALL, V. C.: Altered fine structures of corneal and skeletal keratan sulfate and chondroitin/dermatan sulfate in macular corneal dystrophy. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 43, S. 39788–96
- PORRECA, E. ; DI FEBBO, C. ; REALE, M. ; CASTELLANI, M. L. ; BACCANTE, G. ; BARBACANE, R. ; CONTI, P. ; CUCCURULLO, F. ; POGGI, A.: Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells. In: *J Vasc Res* 34 (1997), Nr. 1, S. 58–65
- RADA, J. A. ; CORNUET, P. K. ; HASSELL, J. R.: Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. In: *Exp Eye Res* 56 (1993), Nr. 6, S. 635–48
- REARDON, A. J. ; LE GOFF, M. ; BRIGGS, M. D. ; MCLEOD, D. ; SHEEHAN, J. K. ; THORNTON, D. J. ; BISHOP, P. N.: Identification in vitreous and molecular cloning of opticin, a novel member of the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 3, S. 2123–9

- RIQUELME, C. ; LARRAIN, J. ; SCHONHERR, E. ; HENRIQUEZ, J. P. ; KRESSE, H. ; BRANDAN, E.: Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor beta and accelerates skeletal muscle differentiation. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 5, S. 3589–96
- RISAU, W.: Mechanisms of angiogenesis. In: *Nature* 386 (1997), Nr. 6626, S. 671–4
- ROSE, T. M. ; BRUCE, A. G.: Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia-inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991), Nr. 19, S. 8641–5
- ROYEN, N. van ; HOEFER, I. E. ; BUSCHMANN, I. ; HEIL, M. ; KOSTIN, S. ; DEINDL, E. ; VOGEL, S. ; KORFF, T. ; AUGUSTIN, H. ; BODE, C. ; PIEK, J. J. ; SCHAPER, W.: Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. In: *FASEB J* 16 (2002), S. 432–4
- SAN MARTIN, S. ; SOTO-SUAZO, M. ; DE OLIVEIRA, S. F. ; APLIN, J. D. ; ABRAHAMSOHN, P. ; ZORN, T. M. T.: Small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) in uterine tissues during pregnancy in mice. In: *Reproduction* 125 (2003), Nr. 4, S. 585–95
- SANTRA, M. ; EICHSTETTER, I. ; IOZZO, R. V.: An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 45, S. 35153–61
- SANTRA, M. ; MANN, D. M. ; MERCER, E. W. ; SKORSKI, T. ; CALABRETTA, B. ; IOZZO, R. V.: Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. In: *J Clin Invest* 100 (1997), Nr. 1, S. 149–57
- SAWADA, H. ; ISOGAI, Z. ; MORITA, A.: Altered decorin expression of systemic sclerosis by UVA1 (340-400 nm) phototherapy: immunohistochemical analysis of 3 cases. In: *BMC Dermatol* 3 (2003), Nr. 1, S. 2
- SCHAPER, J. ; KOENIG, R. ; FRANZ, D. ; SCHAPER, W.: The endothelial surface of growing coronary collateral arteries: Intimal margination and diapedesis of monocytes; A combined SEM and TEM study. In: *Virchows Arch* 370 (1976), S. 193–205
- SCHAPER, W.: Tangential wall stress as a molding force in the development of collateral vessels in the canine heart. In: *Experientia* 23 (1967), Nr. 7, S. 595–6
- SCHAPER, W.: Experimental infarcts and the microcirculation. In: HEARSE, D. J. (Hrsg.) ; YELLON, D. M. (Hrsg.): *Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct Size Limitation*. New York : Raven Press, 1984, S. 79–90
- SCHAPER, W. ; ITO, W. D.: Molecular Mechanisms of Coronary Collateral Vessel Growth. In: *Circ Res* 79 (1996), Nr. 5, S. 911–9
- SCHAPER, W. ; M., D. ; LEWI, P.: DNA-synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. In: *Circ Res* 28 (1971), S. 671–9

SCHAPER, W. ; PIEK, J. J. ; MANOZ-CHAPULI, R. ; WOLF, C. ; ITO, W.: Collateral Circulation of the Heart. In: WARE, J. A. (Hrsg.) ; SIMONS, M. (Hrsg.): *Angiogenesis and Cardiovascular Disease*. New York, NY, Oxford : Oxford University Press, 1999, S. 159–98

SCHAPER, W. ; SCHOLZ, D.: Factors Regulating Arteriogenesis. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003), Nr. 7, S. 1143–51

SCHLINGENSIEPEN, R. ; BRYSCH, W. ; SCHLINGENSIEPEN, K.-H.: *Antisense: from technology to therapy*. Berlin [u.a.] : Blackwell Science, 1997 (6Blackwell Science). – 365 S
herr490

SCHÖNHERR, E. ; JARVELAINEN, H. T. ; KINSELLA, M. G. ; SANDELL, L. J. ; WIGHT, T. N.: Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 differentially affect the synthesis of biglycan and decorin by monkey arterial smooth muscle cells. In: *Arterioscler Thromb* 13 (1993), Nr. 7, S. 1026–36

SCHOLZ, D. ; CAI, W. J. ; SCHAPER, W.: Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. In: *Angiogenesis* 4 (2001), Nr. 4, S. 247–57

SCHOLZ, D. ; ELSAESER, H. ; SAUER, A. ; FRIEDRICH, C. ; LUTTUN, A. ; CARMELIET, P. ; SCHAPER, W.: Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (PlGF) -/- mice. In: *J Mol Cell Cardiol* 35 (2003), S. 177–84

SCHOLZ, D. ; ITO, W. D. ; FLEMING, I. ; DEINDL, E. ; SAUER, A. ; WIESNET, M. ; BUSSE, R. ; SCHAPER, J. ; SCHAPER, W.: Ultrastructure and molecular histology of rabbit hindlimb collateral artery growth (arteriogenesis). In: *Virchows Arch* 436 (2000), Nr. 3, S. 257–70

SCHOLZ, D. ; ZIEGELHOEFFER, T. ; HELISCH, A. ; WAGNER, S. ; FRIEDRICH, C. ; PODZUWEIT, T. ; SCHAPER, W.: Contribution of Arteriogenesis and Angiogenesis to Postocclusive Hindlimb Perfusion in Mice. In: *J Mol Cell Cardiol* 34 (2002), S. 775–87

SCOTT, J. E.: Structure and function in extracellular matrices depend on interactions between anionic glycosaminoglycans. In: *Pathol Biol (Paris)* 49 (2001), Nr. 4, S. 284–9

SEILER, C. ; POHL, T. ; WUSTMANN, K. ; HUTTER, D. ; NICOLET, P. A. ; WINDECKER, S. ; EBERLI, F. R. ; MEIER, B.: Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. In: *Circulation* 104 (2001), Nr. 17, S. 2012–7

SELZMAN, C. H. ; MILLER, S. A. ; ZIMMERMAN, M. A. ; GAMBONI-ROBERTSON, F. ; HARKEN, A. H. ; BANERJEE, A.: Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation. In: *Am J Physiol* 283 (2002), Nr. 4, S. H1455–61

SHANAHAN, C. M. ; CARY, N. R. B. ; OSBOURN, J. K. ; WEISSBERG, P. L.: Identification of Osteoglycin as a Component of the Vascular Matrix. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997), Nr. 11, S. 2437–47

SHANAHAN, C. M. ; WEISSBERG, P. L.: Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (1998), Nr. 3, S. 333–8

SHINOMURA, T. ; KIMATA, K.: Proteoglycan-Lb, a small dermatan sulfate proteoglycan expressed in embryonic chick epiphyseal cartilage, is structurally related to osteoinductive factor. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Nr. 2, S. 1265–70

SHO, E. ; SHO, M. ; SINGH, T. M. ; NANJO, H. ; KOMATSU, M. ; XU, C. ; MASUDA, H. ; ZARINS, C. K.: Arterial enlargement in response to high flow requires early expression of matrix metalloproteinases to degrade extracellular matrix. In: *Exp Mol Pathol* 73 (2002), Nr. 2, S. 142–53

SHYY, J. Y. ; LIN, M. C. ; HAN, J. ; LU, Y. ; PETRIME, M. ; CHIEN, S.: The cis-acting phorbol ester '12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetat'-responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Nr. 17, S. 8069–73

SILVESTRE, J. S. ; MALLAT, Z. ; DURIEZ, M. ; TAMARAT, R. ; BUREAU, M. F. ; SCHERMAN, D. ; DUVERGER, N. ; BRANELLEC, D. ; TEDGUI, A. ; LEVY, B. I.: Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. In: *Circ Res* 87 (2000), Nr. 6, S. 448–52

SILVESTRE, J. S. ; MALLAT, Z. ; TAMARAT, R. ; DURIEZ, M. ; TEDGUI, A. ; LEVY, B. I.: Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: role in ischemia-induced angiogenesis. In: *Circ Res* 89 (2001), Nr. 3, S. 259–64

SOMMARIN, Y. ; WENDEL, M. ; SHEN, Z. ; HELLMAN, U. ; HEINEGARD, D.: Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 27, S. 16723–9

STIEBELLEHNER, L. ; FRID, M. G. ; REEVES, J. T. ; LOW, R. B. ; GNANASEKHARAN, M. ; STENMARK, K. R.: Bovine distal pulmonary arterial media is composed of a uniform population of well-differentiated smooth muscle cells with low proliferative capabilities. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285 (2003), Nr. 4, S. L819–28

SVENSSON, L. ; ASZODI, A. ; REINHOLT, F. P. ; FASSLER, R. ; HEINEGARD, D. ; OLDBERG, A.: Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 14, S. 9636–47

SVENSSON, L. ; NARLID, I. ; OLDBERG, A.: Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. In: *FEBS Lett* 470 (2000), Nr. 2, S. 178–82

TAKAHASHI, K. ; TAKAGI, M. ; OGHAMI, K. ; NAKAI, M. ; KOJIMA, A. ; NADALL-GINARD, B. ; SHIBATA, N.: Inhibition of smooth muscle cell Migration and proliferation caused by transfection of the human calponin gene is associated with enhanced cell matrix adhesion and reduced PDGF responsiveness. In: *Circulation* 88 (1993), S. 1–174 (Abstract)

TAN, E. M. ; HOFFREN, J. ; ROUDA, S. ; GREENBAUM, S. ; FOX, J. W. t. ; MOORE, J. H. J. ; DODGE, G. R.: Decorin, versican, and biglycan gene expression by keloid and normal dermal fibroblasts: differential regulation by basic fibroblast growth factor. In: *Exp Cell Res* 209 (1993), Nr. 2, S. 200–7

- TASHEVA, E. S. ; CONRAD, G. W.: The UV responsive elements in the human mimecan promoter: a functional characterization. In: *Mol Vis* 9 (2003), S. 1–9
- TASHEVA, E. S. ; CORPUZ, L. M. ; FUNDERBURGH, J. L. ; CONRAD, G. W.: Differential Splicing and Alternative Polyadenylation Generate Multiple Mimecan mRNA Transcripts. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 51, S. 32551–6
- TASHEVA, E. S. ; FUNDERBURGH, M. L. ; MCREYNOLDS, J. ; FUNDERBURGH, J. L. ; CONRAD, G. W.: The Bovine Mimecan Gene. In: *J Biol Chem* 26 (1999), S. 18693–701
- TASHEVA, E. S. ; KOESTER, A. ; PAULSEN, A. Q. ; GARRETT, A. S. ; BOYLE, D. L. ; DAVIDSON, H. J. ; SONG, M. ; FOX, N. ; CONRAD, G. W.: Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. In: *Mol Vis* 8 (2002), S. 407–15
- THEOCHARIS, A. D. ; KARAMANOS, N. K.: Decreased biglycan expression and differential decorin localization in human abdominal aortic aneurysms. In: *Atherosclerosis* 165 (2002), Nr. 2, S. 221–30
- TRAN, P. K. ; TRAN-LUNDMARK, K. ; SOININEN, R. ; TRYGGVASON, K. ; THYBERG, J. ; HEDIN, U.: Increased Intimal Hyperplasia and Smooth Muscle Cell Proliferation in Transgenic Mice With Heparan Sulfate-Deficient Perlecan. In: *Circ Res* 94 (2004), Nr. 4, S. 550–8
- TROUP, S. ; NJUE, C. ; KLIEWER, E. V. ; PARISIEN, M. ; ROSKELLEY, C. ; CHAKRAVARTI, S. ; ROUGHLEY, P. J. ; MURPHY, L. C. ; WATSON, P. H.: Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. In: *Clin Cancer Res* 9 (2003), Nr. 1, S. 207–14
- TSUJI, N. ; KAMAGATA, C. ; FURUYA, M. ; KOBAYASHI, D. ; YAGIHASHI, A. ; MORITA, T. ; HORITA, S. ; WATANABE, N.: Selection of an internal control gene for quantitation of mRNA in colonic tissues. In: *Anticancer Res* 22 (2002), Nr. 6C, S. 4173–8
- UJITA, M. ; SHINOMURA, T. ; KIMATA, K.: Molecular cloning of the mouse osteoglycin-encoding gene. In: *Gene* 158 (1995), S. 237–40
- UNGER, E. ; BANAI, S. ; SHOU, M. ; LAZAROUS, D. ; JAKLITSCH, M. ; SHEINOWITZ, M. ; CORREA, R. ; KLINGBEIL, C. ; EPSTEIN, S.: Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. In: *Am J Physiol* 266 (1994), S. H1588–95
- VELCULESCU, V. E. ; ZHANG, L. ; VOGELSTEIN, B. ; KINZLER, K. W.: Serial analysis of gene expression. In: *Science* 270 (1995), Nr. 5235, S. 484–7
- VIEDT, C. ; VOGEL, J. ; ATHANASIOU, T. ; SHEN, W. ; ORTH, S. R. ; KUBLER, W. ; KREUZER, J.: Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002), Nr. 6, S. 914–20
- VIRLON, B. ; CHEVAL, L. ; BUHLER, J. M. ; BILLON, E. ; DOUCET, A. ; ELALOUF, J. M.: Serial microanalysis of renal transcriptomes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 26, S. 15286–91

- VOSKUIL, M. ; VAN ROYEN, N. ; HOEFER, I. E. ; SEIDLER, R. ; GUTH, B. D. ; BODE, C. ; SCHAPER, W. ; PIEK, J. J. ; BUSCHMANN, I. R.: Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1. In: *Am J Physiol* 284 (2003), Nr. 4, S. H1422–8
- WADHWA, R. ; DUNCAN, E. ; KAUL, S. C. ; REDDEL, R. R.: An effective elimination of false positives isolated from differential display of mRNAs. In: *Mol Biotechnol* 6 (1996), Nr. 2, S. 213–7
- WAHLBERG, E.: Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. In: *J Vasc Surg* 38 (2003), Nr. 1, S. 198–203
- WANG, Z. ; NEWMAN, W. H.: Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. In: *J Surg Res* 111 (2003), Nr. 2, S. 261–6
- WHO: *The World Health Report 1999* -. 1999. – ISBN 92 4 156194 7
- WILDA, M. ; BACHNER, D. ; JUST, W. ; GEERKENS, C. ; KRAUS, P. ; VOGEL, W. ; HAMMEISTER, H.: A comparison of the expression pattern of five genes of the family of small leucine-rich proteoglycans during mouse development. In: *J Bone Miner Res* 15 (2000), Nr. 11, S. 2187–96
- WILSON, E. ; MAI, Q. ; SUDHIR, K. ; WEISS, R. H. ; IVES, H. E.: Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF. In: *J Cell Biol* 123 (1993), Nr. 3, S. 741–7
- WOLF, C. ; CAI, W. J. ; VOSSCHULTE, R. ; KOLTAI, S. ; MOUSAVIPOUR, D. ; SCHOLZ, D. ; AFSAH-HEDJRI, A. ; SCHAPER, W. ; SCHAPER, J.: Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. In: *J Mol Cell Cardiol* 30 (1998), Nr. 11, S. 2291–305
- WORTH, N. F. ; ROLFE, B. E. ; SONG, J. ; CAMPBELL, G. R.: Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. In: *Cell Motil Cytoskeleton* 49 (2001), Nr. 3, S. 130–45
- YAMAGUCHI, Y. ; MANN, D. M. ; RUOSLAHTI, E.: Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. In: *Nature* 346 (1990), Nr. 6281, S. 281–4
- YANG, H. T. ; DESCHENES, M. R. ; OGILVIE, R. W. ; TERJUNG, R. L.: Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation. In: *Circ Res* 79 (1996), Nr. 1, S. 62–9
- YOSHIOKA, N. ; INOUE, H. ; NAKANISHI, K. ; OKA, K. ; YUTSUDO, M. ; YAMASHITA, A. ; HAKURA, A. ; NOJIMA, H.: Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras. In: *J Virol* 74 (2000), Nr. 2, S. 1008–13
- ZHANG, H. ; ZHANG, R. ; LIANG, P.: Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. In: *Nucleic Acids Res* 24 (1996), Nr. 12, S. 2454–5

ZIEGELHOEFFER, T. ; SCHOLZ, D. ; HELISCH, A. ; WAGNER, S. ; SCHAPER, W.: Swelling cell-doing well? Volume-regulated chloride channels and arteriogenesis. In: *J Mol Cell Cardiol* 34 (2002), S. A71 Abstract

ZIMMERMAN, M. A. ; SELZMAN, C. H. ; REZNIKOV, L. L. ; RAEBURN, C. D. ; BARNES, K. ; MCINTYRE, R. C. J. ; HAMIEL, C. R. ; HARKEN, A. H.: Interleukin-11 attenuates human vascular smooth muscle cell proliferation. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283 (2002), Nr. 1, S. H175–80

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe Molekulare Kardiologie der Abteilung Experimentelle Kardiologie des Max-Planck-Institutes für Physiologische und Klinische Forschung (W. G. Kerckhoff-Institut) in Bad Nauheim unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schaper angefertigt.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schaper, für seine freundliche Aufnahme in der Abteilung Experimentelle Kardiologie des Max Plank Instituts für Physiologische und Klinische Forschung, Bad Nauheim.

Herrn Prof. Dr. Rainer Renkawitz möchte ich herzlich für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation am Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Justus-Liebig Universität Giessen zu vertreten.

Nicht unerwähnt bleiben darf der Beitrag, den Herr Dr. René Zimmermann zu dieser Arbeit geleistet hat. Mein Dank an ihn gilt insbesondere für die ausführliche Diskussion der vorhandenen und der ausbleibenden Ergebnisse.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern der Abteilung Experimentelle Kardiologie und der Arbeitsgruppe Vascular Genomics der Kerckhoff Klinik für die Ernst und weniger Ernst gemeinten Ratschläge und Tips danken, die erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ermöglicht wurde diese Arbeit hauptsächlich durch die seelische und moralische Unterstützung meiner Ehefrau Nadine und meiner Familie, für deren Zuspruch und Rückhalt ich mich nicht genug bedanken kann.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Sohn Lennart für sein Lachen bedanken und mich für die Zeit, die ich mit dieser Arbeit und nicht mit ihm verbracht habe, entschuldigen.

Danke!