

**DER EINFLUSS DES „*Actin-binding Rho*  
*activating proteins*“ (*Abra*) AUF ARTERIOGENESE UND  
ANGIOGENESE IM ISCHÄMISCHEN MAUS  
HINTERLAUFMODELL**

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

vorgelegt von Leonie Großkettler  
aus Hameln

Gießen 2013

**Aus dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung**  
W. G. Kerckhoff Institut, Arbeitsgemeinschaft Experimentelle Angiologie

Bad Nauheim

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

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

Tag der Disputation: 29.08.2013

**Für meine Eltern**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Arteriosklerose</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie der Arteriosklerose	2
1.1.2	Therapie arteriosklerotischer Erkrankungen	3
1.1.3	Natürliche Umgehungskreisläufe	3
<b>1.2</b>	<b>Blutgefäßwachstum</b>	<b>4</b>
1.2.1	Vaskulogenese	4
1.2.2	Biologische Mechanismen der Vaskulogenese	5
1.2.3	Therapeutische Vaskulogenese	6
1.2.4	Angiogenese	6
1.2.5	Biologische Mechanismen der Angiogenese	6
1.2.6	Therapeutische Angiogenese	8
1.2.7	Medikamentöse Modifikation der Angiogenese	8
1.2.8	Arteriogenese	9
1.2.9	Unterschiede der Vaskulo-, Angio- und Arteriogenese	9
1.2.10	Theorien über die arteriogene Entstehung von Kollateralgefäßen	11
1.2.11	Morphologie präexistierender Kollateralgefäße	12
1.2.12	Physikalische und hämodynamische Kräfte der Arteriogenese	13
1.2.13	Schubspannung und Mechanotransduktion der Arteriogenese	15
1.2.14	Biologische Mechanismen der Arteriogenese	16
1.2.15	Therapeutische Arteriogenese	18
<b>1.3</b>	<b>Actin-binding Rho activating protein</b>	<b>19</b>
1.3.1	Entdeckung von Abra	20
1.3.2	Stimulation der Arteriogenese durch Abra	21
<b>1.4</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>24</b>
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.2	Geräte und Software	25
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Antikörper	26
<b>2.2</b>	<b>Methode</b>	<b>28</b>
2.2.1	Tiermodell	28
2.2.2	Versuchstiere	28
2.2.3	Knockout Tiere	29
2.2.4	Wildtyp Tiere	29
2.2.5	Markierungen der Tiere	29
2.2.6	Genotypisierung mittels PCR	29
2.2.7	Okklusion der A. femoralis	30
2.2.8	Laser Doppler Imaging	30
2.2.9	Messung der Durchblutung mit Laser Doppler Imaging	31

2.2.10	Hämoglobin-Sauerstoffsättigung	32
2.2.11	Messung der Hämoglobin Sauerstoffsättigung mit Spektrophotometrie	33
2.2.12	Aktive Fußbewegung	34
2.2.13	Messung der Aktiven Fußbewegung	34
2.2.14	Gewebeperfusion und Fixation	35
2.2.15	Gewebeproben und Histologie	37
2.2.16	Vorbereitung Gewebeschnitte	37
2.2.17	Hämatoxylin-Eosin Färbung	37
2.2.18	Immunhistochemie	38
2.2.19	Quantifizierungen der Kollateralarterien	39
2.2.20	Kapillarzählung	40
2.2.21	Angiographische Darstellung	40
2.2.22	Präparation des Kontrastmittels	41
2.2.23	Injektion des Kontrastmittels	42
2.2.24	Belichtung und Entwicklung der Angiographien	43
2.2.25	Statistische Analyse	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
3.1	Charakterisierung der <i>Abra</i> <sup>-/-</sup> Mäuse	44
3.2	Quantifizierung der Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis	47
3.2.1	Ergebnisse des Laser Doppler Imaging	47
3.2.2	Ergebnisse der Hämoglobin Sauerstoffsättigung	50
3.2.3	Ergebnisse der Aktiven Fußbewegung	51
3.2.4	Nekroseentwicklung	53
3.3	Post mortem Untersuchungen	54
3.3.1	Immunfärbung	54
3.3.2	Morphometrie der Kollateralarterien	54
3.3.3	Kapillardichte	60
3.3.4	Angiographien	62
3.4	Ergebnisse im Kontext der Literatur	64
3.4.1	<i>Abra</i> <sup>-/-</sup> Mäuse in der Arteriogeneseforschung	64
3.4.2	Möglicher Geschlechtereinfluss auf Arteriogenese	64
3.4.3	Eignung des Modells der chronischen Ischämie im Maushinterlauf	65
3.4.4	Apparative Quantifizierung der Arteriogenese	67
3.4.5	Funktionelle Quantifizierung der Arteriogenese	70
3.4.6	Quantitative und qualitative Analysen des verringerten Kollateralwachstums	73
3.4.7	Angiographische Evaluationen der Arteriogenese	75
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>77</b>
4.1	<i>Abra</i> Expression in der Arteriogenese	78
4.2	Verminderte Arteriogenese in Abwesenheit von <i>Abra</i>	79
4.3	Die Rolle von <i>Abra</i> in der Arteriogenese	81
4.4	<i>Abra</i> im Rho Signalweg	86
4.5	<i>Abra</i> im Vergleich zu anderen Aktin-bindenden Proteinen	88
4.6	Exkursion in die klinische Situation der Arteriogenese	89
4.6.1	Limitationen der arteriogenen Therapie	92
4.6.2	<i>Abra</i> in der medikamentösen arteriogenen Therapie	95

4.7 Schlussfolgerungen	97
5 ZUSAMMENFASSUNG	98
6 SUMMARY	99
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	100
8 LITERATUR	107
9 PUBLIKATION	114
10 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	115
11 DANKSAGUNG	116

# 1 EINLEITUNG

Arteriogenese bedeutet die Entwicklung einer arteriellen Zirkulation aus kleinen präexistierenden Arteriolen. Nach Okklusion großer Arterien kann so die periphere Blutversorgung des von Ischämie bedrohten Gewebes gesichert werden. Der therapeutischen Arteriogenese könnte zukünftig eine besondere medizinische Bedeutung zu kommen, um Patienten mit okklusiven arteriosklerotischen Verschlusskrankheiten durch medikamentöse Induktion von arteriellen Umgehungskreisläufen zu heilen.

Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren an verschiedenen Tiermodellen intensiv mit dem Ziel geforscht, die grundlegenden molekularen Mechanismen der Arteriogenese zu verstehen. Als interessanter Ansatzpunkt für die angestrebte medizinische Neovaskularisation bei Arteriosklerose kristallisierte sich dabei insbesondere das „Actin-binding Rho activating protein“ (Abra) heraus.

## 1.1 ARTERIOSKLEROSE

Charakteristisch für arteriosklerotische Erkrankungen des Gefäßsystems sind progressive Prozesse, bei denen Plaqueentstehung, Cholesterinablagerungen, Entzündungen, extrazelluläre Matrixformationen und Thrombosen eine entscheidende Rolle spielen<sup>1, 2</sup>. Das schleichende Fortschreiten der arteriosklerotischen Wandläsionen hat eine zunehmende Verengung des Gefäßlumens zur Konsequenz. Die hieraus resultierende Gewebeminderperfusion kann chronisch oder akut auftreten und Arterien jeglicher Größe in jedem Organsystem betreffen.

Progressives Plaquewachstum führt beispielweise in Koronargefäßen zur langsamen Verringerung der Blutversorgung und so zu einer Unterversorgung des Myokards, wodurch sich klinisch Angina Pectoris manifestieren kann. Diese Minderperfusion kann aufgrund der koronaren Flussreserve über einen undefinierten Zeitraum kompensiert werden. Darüber hinaus besteht das Risiko der plötzlichen Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques und einer Thrombosierung mit der Folge einer subtotalen oder totalen Stenosierung des Lumens und konsekutiver Infarzierung des nachgeschalteten Myokardgewebes.

### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIE DER ARTERIOSKLEROSE

Die durch Arteriosklerose bedingten Erkrankungen gehören in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität<sup>3</sup>. Aber auch in Schwellenländern sowie in Staaten der Dritten Welt gewinnt Arteriosklerose mit ihren Folgen zunehmend an medizinischer Bedeutung<sup>4</sup>. Da die globale Lebenserwartung resultierend aus der Weiterentwicklung der Medizin sowie das durchschnittliche Lebensalter aufgrund des demographischen Wandels ebenfalls weiter zunehmen, steigen Inzidenz und Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen. Systemische Folgen der Arteriosklerose auf das Herz-Kreislaufsystem werden daher in einigen Jahren zur einer der bedeutendsten Todesursachen werden<sup>5</sup>.

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) verursachen Hypertonie, zerebraler Insult, Krankheiten des Gefäßsystems sowie pathologische Veränderungen am Herzen weltweit jährlich bereits circa 17,3 Millionen Todesfälle<sup>4</sup>. Für das Jahr 2030 rechnet die WHO mit einem Anstieg auf 23,6 Millionen Todesfälle aufgrund dieser kardiovaskulären Krankheiten<sup>4</sup>. In der Bundesrepublik Deutschland führten bereits im Jahr 2009 die chronisch ischämische Herzerkrankung, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz die Statistik der häufigsten Todesursachen an. Kurz darauf folgen der apoplektische Insult und die zerebrovaskuläre Insuffizienz sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), alle drei ebenfalls Folgen der Arteriosklerose<sup>6</sup>.

Inbesondere durch die lange Behandlungsdauer zählen kardiovaskuläre Erkrankungen mit circa 50 bis 150 Milliarden US Dollar pro Jahr zu den kostenintensivsten Krankheitsbildern in den Industrieländern<sup>7</sup>. Arteriosklerotisch bedingte Erkrankungen sind aber nicht nur für hohe Kosten im Gesundheitssystem verantwortlich, sondern führen auch zu einem gesamtwirtschaftlichen Produktionsverlust sowie zu Limitationen der körperlichen und geistigen Leistungsfähigkeit der betroffenen Patienten.

### 1.1.2 THERAPIE ARTERIOSKLEROTISCHER ERKRANKUNGEN

Heutzutage kann modernste Medizin durch medikamentöse Antikoagulantien lebensbedrohlichen Arterienverschlüssen am Herzen, am Gehirn oder an Extremitäten teilweise präventiv vorbeugen. Aber auch bereits entstandene Komplikationen der Arteriosklerose können oftmals erfolgreich therapiert werden. Hier kommen beispielsweise kathetergestützte Revaskularisation durch perkutane transluminale (Koronar-) Angioplastie (PTCA/PTA), fakultativ mit Einbringung spezieller intraluminaler Gefäßstützen (sogenannter „Stents“), oder (koronare) Bypasschirurgie zum Einsatz. Diese Verfahren sind zwar effektive, aber auch kostenintensive Methoden, die Menschen in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen nur beschränkt zur Verfügung stehen<sup>8</sup>. Darüber hinaus wird der längerfristige Erfolg dieser palliativen Therapien durch das Risiko der Entwicklung einer (Re-) Stenose limitiert<sup>9</sup>. Bedauerlicherweise bringen circa 20 bis 30 % der Patienten mit besonders schwerer koronarer Arteriosklerose auch nicht die notwendigen Voraussetzungen für ein konventionelles angiographisches oder invasives operatives Verfahren mit<sup>10</sup>. Deshalb wird eine alternative Behandlungsstrategie zur Revaskularisation angestrebt, um sowohl die Symptome als auch den Verlauf fortgeschrittener koronararterieller Erkrankungen zu kontrollieren und modifizieren. Eine physiologische Methode hierfür wäre die therapeutische Förderung des koronaren Kollateralwachstums – die Induktion „natürlicher Bypässe“. Ein erfolgversprechender Ansatz könnte die nicht-invasive Wachstumsstimulation von endogenen Umgehungskreisläufen, also therapeutische Arteriogenese, sein<sup>11</sup>. Die hierfür notwendige natürliche Regenerationsfähigkeit des arteriellen Gefäßsystems wird an verschiedenen Stellen in der Medizin illustriert:

### 1.1.3 NATÜRLICHE UMGEHUNGSKREISLÄUFE

Kardiologen finden bei Koronarangiographien regelmäßig Patienten, die trotz hämodynamisch signifikanter Gefäßstenosen keine Zeichen einer myokardialen Ischämie aufweisen. In solchen Fällen werden extensive kollaterale Umgehungskreisläufe beschrieben, die das Hindernis des verschlossenen Gefäßes überbrücken und so die Blutversorgung des Myokards gewährleisten<sup>12, 13</sup>. Ähnliche, meist zufällig gemachte Beobachtungen sind bei Obduktionen in der Pathologie dokumentiert worden: Patienten ohne histologische und laborchemische Beweise oder klinische Symptome eines myokardialen Schadens zeigen *post mortem* trotz allem schwere Veränderungen ihrer Koronarien. Bei längerfristig bestehenden obstruktiven Läsionen haben sich kleine arterioläre Bypass-Verbindungen vergrößert und so als intraarterielle Anastomosen das verschlossene Koronargefäß umgangen<sup>14-17</sup>.

Dieses bemerkenswerte Phänomen natürlicher Umgehungskreisläufe kann allerdings vom menschlichen Körper in vielen Fällen nicht ausreichend genutzt werden. Die regenerativen Möglichkeiten sind eingeschränkt, weil unter physiologischen Bedingungen die funktionelle Wiederherstellung der Durchblutungskapazität eines verschlossenen Gefäßes inkomplett ist und bei circa 30 % bis 40 % der maximalen Leitfähigkeit endet<sup>18, 19</sup>. Zusätzlich können vorbestehende arteriosklerotische Gefäßveränderungen durch akute Probleme wie plötzliche Gefäßverschlüsse verkompliziert werden. Der Prozess der Arteriogenese hat in diesem Fall nicht genügend Zeit für die notwendigen Umbauprozesse und das Kollateralwachstum kann mit dem raschen Krankheitsverlauf nicht Schritt halten. Indem Kollateralgefäße durch medikamentöse Anreize wie Wachstumsfaktoren, Gen- oder Zelltherapie möglichst schnell zu funktionstüchtigen Arterien umgeformt werden, könnten mit therapeutischer Arteriogenese zeitnah oder eventuell auch prophylaktisch ausreichend große Umgehungskreisläufe erzeugt werden. Die Aufklärung der grundlegenden Mechanismen der Arteriogenese und letztendlich die Wachstumsstimulation solch endogener Bypass-Gefäße durch kurative pharmakologische Behandlung sind das Ziel der Arteriogeneseforschung.

## 1.2 BLUTGEFÄSSWACHSTUM

Im lebenden Organismus lässt sich die natürliche Entwicklung von Blutgefäßen in drei verschiedene Formen unterteilen, die als Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese bezeichnet werden. Um die möglichen therapeutischen Optionen und den medizinischen Nutzen diskutieren zu können, werden im Folgenden zunächst die unterschiedlichen Terminologien und die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Gefäßwachstumsprozesse genauer erläutert:

### 1.2.1 VASKULOGENESE

Bei der Embryonalentwicklung bildet sich als erste Organeinheit das kardiovaskuläre System. Bis zur Entstehung von Herz und Gefäßen wird der embryonale Organismus durch Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Vaskulogenese beschreibt dabei die primäre Entwicklung eines embryonalen Gefäßplexus aus sich *in situ* differenzierenden Angioblasten, die zur Entstehung von Blutgefäßen führen<sup>20</sup>, und zirkulierenden vaskulären Progenitorzellen<sup>21</sup>. Ursprünglich wurde angenommen, dass dieser Typ des Gefäßwachstums auf die Embryonalentwicklung beschränkt sei, doch in späteren Studien konnte auch postnatale Vaskulogenese nachgewiesen werden<sup>22</sup>.

### 1.2.2 BIOLOGISCHE MECHANISMEN DER VASKULOGENESE

Hämangioblasten sind die gemeinsamen Vorläuferzellen der endothelialen und hämatopoetischen Zellreihe. Bei der pränatalen Vaskulogenese bilden diese pluripotenten Zellen im Dottersack Blutzellinseln, deren periphere Zellschichten sich zu Endothelzellen entwickeln und verbinden, um ein primitives, unreifes Netzwerk aus Kapillaren, Arterien und Venen zu formen, den sogenannten Kapillarplexus<sup>23, 24</sup>. Aus den zentralen Schichten wiederum entstehen die hämatopoetischen Zellen. Stimulator dieser pränatalen Vaskulogenese ist der „Fibroblast Growth Factor-2“ (FGF-2), der in den pluripotenten Zellen die Vaskulogeneseprozesse induziert<sup>25, 26</sup>. Die ersten spezifischen Endothelzellsignalwege, die während der Vaskulogenese aktiviert werden, laufen über den „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und die VEGF-Rezeptoren (VEGFR) ab. Außerdem wichtig für die embryonale Gefäßentwicklung ist das Rezeptor-Liganden Tie-1 und Tie-2 System<sup>22</sup>. Zusätzlich spielen Integrine, die wichtige heterodimere Adhäsionsmoleküle an der Zelloberfläche sind, eine vaskulogene Schlüsselrolle<sup>27</sup>. Viele weitere Einflussfaktoren, wie unter anderem „Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor“ (GM-CSF)<sup>28</sup> und „Insulin-like Growth Factor-1“ (IGF-1)<sup>29</sup>, stimulieren ebenfalls die Mobilisation und Migration der Angioblasten in die Peripherie, wo diese schließlich zu reifen Zellen differenzieren.

Die knochenmarksabhängigen beziehungsweise gerade erst migrierten endothelialen Vorläuferzellen exprimieren unter anderem die drei Marker „Cluster of Differentiation 133“ (CD133), „Cluster of Differentiation 34“ (CD34) und VEGFR-2. Während des Differenzierungsprozesses zu Endothelzellen kann CD133 jedoch nicht mehr nachgewiesen werden, dafür beginnt zusätzlich die Expression von „Cluster of Differentiation 31“ (CD31), „Vascular Endothelial Cadherin“ (VE-Cadherin) und von-Willebrand-Faktor (vWF). Dies könnte die beginnende Reifung der endothelialen Progenitorzellen darstellen<sup>30</sup>. Diese zwei unterschiedlichen Typen der endothelialen Vorläuferzellen werden neben reifen Endothelzellen auch in der Blutzirkulation des adulten Organismus gefunden, was auf eine postnatale physiologische Rolle der Vaskulogenese schließen lässt<sup>31, 32</sup>.

### 1.2.3 THERAPEUTISCHE VASKULOGENESE

Die funktionelle Signifikanz der Vaskulogenese im Kontext von Ischämie im peripheren oder koronaren Gefäßsystem ist bisher noch nicht eindeutig bestimmt. Die bisherigen Ergebnisse sind sehr uneinheitlich und umfassen ein weites Spektrum an Schlussfolgerungen<sup>32</sup>. Auf diesem Gebiet ist daher noch ergänzende Forschung notwendig. Für eine Therapie mit dem Ziel der Neovaskularisierung könnte die therapeutische Vaskulogenese jedoch einen möglichen Ansatzpunkt darstellen.

### 1.2.4 ANGIOGENESE

Die *de novo* Sprossung von Kapillarnetzwerken aus Endothelzellen bereits bestehender postkapillarer Blutgefäße wird Angiogenese genannt<sup>20</sup> und findet sowohl im Embryonalstadium als auch im adulten Organismus statt, zum Beispiel bei Wundheilungsprozessen<sup>33</sup> oder Tumorwachstum<sup>34,35</sup>.

### 1.2.5 BIOLOGISCHE MECHANISMEN DER ANGIOGENESE

Angiogene Gefäße können durch drei unterschiedliche Mechanismen entstehen: Erstens Aussprossung von Endothelzellen, zweitens Entstehung von transendothelialen Zellbrücken oder drittens Einwanderung von periendothelialen Zellen, die zur Unterteilung eines Gefäßes führen („intussusception“). Voraussetzung für diese Prozesse ist die Vergrößerung der postkapillären Venolen<sup>36</sup>.

Die Gefäßneubildung während der Angiogenese wird durch viele stimulierende und inhibierende Einflussgrößen charakterisiert. Monozyten/Makrophagen, Mastzellen, Bindegewebszellen, Perizyten, Endothelzellen und pluripotente Progenitorzellen beeinflussen die Angiogenese durch Sekretion löslicher angiogener und antiangiogener Moleküle<sup>37</sup>. Die verschiedenen biologischen Faktoren ergeben ein komplexes Zusammenspiel in diesem vielschichtigen Prozess:

Als Trigger der Angiogenese gilt Ischämie, die in erster Linie zu einer Veränderung des pH-Wertes führt. Als Hauptantrieb wird Hypoxie (Unterversorgung eines Gewebes mit Sauerstoff) angesehen. Der Sauerstoffpartialdruck wird vom Prolin-Hydroxylase-HIF-System gemessen. Der „Hypoxia-Inducible Factor-1“ (HIF-1) ist ein Heterodimer aus HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  Ketten, die beide direkt an spezifische DNA-Sequenzen binden können<sup>38</sup>. Hypoxie stimuliert die Expression von HIF-1, es bindet an diese Hypoxia-Response Promotorenelemente der DNA und aktiviert so die Transkription einer Vielzahl von Genen,

unter anderem VEGF und VEGFR-1, Neuropilin-1 sowie Angiopoietin-2 und „inducible Nitric Oxide Synthase“ (iNOS), die unterschiedliche Einflüsse auf die Angiogenese haben. Nach der Hypoxie bedingten Aktivierung der Endothelzellen wird als erster morphologisch nachweisbarer Schritt eine starke, persistierende Vasodilatation der Arteriolen beobachtet. Stickstoffmonoxid (NO) ist für diese Vasodilatation verantwortlich und trägt signifikant zum proangiogenen Programm des Kapillarendothels bei, indem es Zellwachstum und Differenzierung via Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS), Elevation des „cyclic GMP“ (cGMP), Aktivierung der „Mitogen Activated Kinase“ (MAPK) und Expression von FGF-2 triggert<sup>39, 40</sup>. Außerdem vermittelt NO eine gesteigerte VEGF Transkription<sup>41</sup>. Das sezernierte Mitogen VEGF hat starke angiogene Eigenschaften, weist eine hohe Spezifität für Endothelzellen auf und führt durch eine Verminderung der Zell-Adhäsionsmoleküle, wie zum Beispiel VE-Cadherin und „Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1“ (PECAM-1), unter anderem zu einem Anstieg der Gefäßpermeabilität. Zusätzlich induziert VEGF verschiedene Kinasen, die Veränderungen in der Zellmembranstruktur auslösen. Daraufhin erfolgt die Extravasation von Plasmaproteinen, die wiederum für die auswandernden Endothelzellen eine günstige Atmosphäre schaffen. Das Glykoprotein Angiopoietin-1 wirkt dem permeabilitätssteigernden vaskulären Effekt von VEGF entgegen<sup>42</sup> und vermindert so die endotheliale Gefäßdurchlässigkeit<sup>43</sup>. Dieser Prozess basiert wahrscheinlich auf der Förderung der Interaktion zwischen Endothelzellen, Perizyten und umgebender extrazellulärer Matrix und schützt die Gefäße gegen Plasmaverlust<sup>44</sup>.

Die Degradierung der umgebenden Basalmembran der parenteralen Blutgefäße ist eine weitere wichtige Voraussetzung für die Invasion der sich teilenden Endothelzellen. Viele unterschiedliche Enzyme sind in diesen Vorgang verwickelt, besonders Proteasen und Proteasehemmer, wie Heparanasen, Serinproteasen, Chymasen und Matrix-Metallo-Proteasen (MMP), die für die Abbauprozesse zuständig sind. Bei der Gefäßsprossung sind insbesondere MMP-2, -3 und -9 involviert. Der Plasminogenaktivator „urokinase-type Plasminogen Activator“ (u-PA) konvertiert das Plasmaprotein Plasminogen zu Plasmin, das die verschiedenen MMPs aktiviert und Strukturproteine wie Laminin und Fibronectin abbaut<sup>45</sup>. Im nächsten Schritt der Angiogenese ist wieder eine Vielzahl an Zellen (zum Beispiel Fibroblasten, Monozyten, Mastzellen) involviert, welche die induzierte Migration der aktivierten Endothelzellen mit chemotaktischen Faktoren beeinflussen. Angiopoietin-2 löst interendotheliale Zellkontakte sowie die Extrazellulärmatrix auf<sup>46</sup> und durch Einflüsse von Wachstumsfaktoren wie VEGF, „Placental Growth Factor“ (PlGF), FGF-2 und „Platelet Derived Growth Factor“ (PDGF) wird die Proliferation der Endothelzellen stimuliert. Auch

hier gibt es wieder Antagonisten, wie beispielsweise Angiostatin, Endostain, Antithrombin III und Interferon  $\beta$ <sup>44</sup>. Am Ende der Proliferationsprozesse fördert NO die Anordnung und Organisation der Endothelzellen, um Gefäße zu formen<sup>47, 48</sup>. Das Lumen der neuen Kapillaren entsteht, indem sich Endothelzellen verdünnen und präexistente Kapillaren miteinander verschmelzen. Am Ende der Angiogenese hat das neue Kapillarlumen einen Durchmesser von 5 bis 8  $\mu\text{m}$ . Dieser Modellierungsvorgang wird durch VEGF, Angiotensin-1 und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin begünstigt. Eine Inhibierung dieses Prozesses erfolgt durch den Einfluss von Thrombospondin-1<sup>44</sup>. Die Terminierung der Endothelzellmigration wird durch Apoptose bestimmt. Abschließende Umstrukturierung („Remodeling“) führt letztendlich zu einem strukturierten Kapillarnetzwerk.

### 1.2.6 THERAPEUTISCHE ANGIOGENESE

Angiogenese trägt zu verschiedenen physiologischen und pathologischen Abläufen im lebenden Organismus bei. Auf physiologischer Seite sind hier zum Beispiel Wund- und Knochenheilungsprozesse sowie Reproduktionsvorgänge zu nennen, auf pathologischer Seite beispielsweise Tumorwachstum und altersabhängige Makuladegeneration<sup>47</sup>.

Angiogenese wird daher als vielversprechender Ansatz für die Therapie von Malignomen oder von ischämischen Erkrankungen, wie beispielsweise Myokardinfarkt, angesehen<sup>49</sup>. Die initial damit verbundene Hoffnung, dass mittels therapeutischer Angiogenese diese Krankheiten geheilt werden können, hat sich bisher jedoch nicht erfüllt<sup>50</sup>. Es bleibt fraglich, ob eine sogar sehr starke Vergrößerung des Kapillarbettes überhaupt effektiv die gesamte Durchblutung einer verschlossenen Arterie ausgleichen kann. In der Tat könnte hier eine medikamentöse Arteriogenesestimulation eine vielversprechende Alternative und einen möglichen Lösungsansatz für die Therapie ischämische bedingter Erkrankungen darstellen.

### 1.2.7 MEDIKAMENTÖSE MODIFIKATION DER ANGIOGENESE

Obwohl es zum jetzigen Zeitpunkt noch keine ausreichenden medikamentösen Möglichkeiten zur therapeutischen Angiogenese gibt, zeigen sich auf dem divergenten Gebiet der therapeutischen Anti-Angiogenese erste erfolgversprechende Therapieansätze.

In Nordamerika erhielten 2004 trotz anfänglicher Rückschläge aufgrund negativer Studienergebnisse die ersten antiangiogenen Medikamente eine Zulassung durch die „US Food and Drug Administration“ (FDA). „Bevacizumab“ ist ein humanisierter anti-VEGF-A-monoklonaler Antikörper, der nach erfolgreichen Phase III Studien in der mit 5-Fluoracil kombinierten Chemotherapie für metastasierte kolorektale Tumore zugelassen wurde <sup>51</sup>. „Pegaptinib“ blockiert die Aminosäure-Isoform des VEGF-A und hat eine Zulassung in der Therapie der altersabhängigen Makuladegeneration <sup>52</sup>.

Trotz dieser Erfolge muss die antiangiogene Arzneimittel-Therapie zukünftig weiter optimiert werden. Eine Anwendungsverbesserung könnte beispielsweise durch gezieltere Auswahl des profitierenden Patientenkontingents erreicht werden. Auch Kombinationsmöglichkeiten mit anderen medikamentösen Agenten müssen genauer untersucht und pharmakologische Interaktionen gegebenenfalls verbessert werden <sup>53</sup>.

### **1.2.8 ARTERIOGENESE**

Arteriogenese beschreibt die Entwicklung reifer Arterien aus präexistierenden Arteriolen nach einer Arterienokklusion <sup>54</sup>.

Die Mechanismen der Arteriogenese wurden zunächst nur bei koronaren Gefäßen beschrieben, aber die gleichen Prozesse finden auch im peripheren und cerebralen Gefäßsystem statt <sup>55, 56</sup>. Weiterführende Untersuchungen an Mäusen <sup>57</sup>, Ratten <sup>58</sup> Kaninchen <sup>59</sup> und Schweinen <sup>60, 61</sup> verdeutlichten zusätzlich den spezieübergreifenden Charakter der Arteriogenese.

### **1.2.9 UNTERSCHIEDE DER VASKULO-, ANGIO- UND ARTERIOGENESE**

Der Begriff Arteriogenese ist relativ neu und wurde in der Vergangenheit zunächst als Variante der Angiogenese angesehen. Aber obwohl einige Charakteristika übereinstimmen, unterscheidet sich die Arteriogenese sowohl in ihren Signaltransduktionswegen als auch in ihren Resultaten von den anderen Formen des Gefäßwachstums (Tabelle 1) <sup>62</sup>.

Bereits existente, also präformierte, Gefäße werden bei der Arteriogenese durch Umbauprozesse wie Zellproliferation und Umstrukturierung weiterentwickelt <sup>11, 63</sup>. Wenn im adulten Organismus eine Hauptarterie, wie zum Beispiel Koronar- oder Femoralarterie, akut oder chronisch stenosiert, kann ein ausgleichendes Wachstum von Blutgefäßen stattfinden, um durch natürliche Umgehungskreisläufe die Blutzirkulation zu kompensieren. Diese Transformation präexistierender Arteriolen in größere arterielle Gefäße nennt man

Arteriogenese. Sie zeichnet sich im Gegensatz zur Angiogenese dadurch aus, dass die Prozesse der Arteriogenese unabhängig von der Gewebsoxygenierung sind, Arteriogenese also unter Normoxie stattfindet <sup>64</sup>. Folglich ist Hypoxie kein zwingend notwendiger Trigger der Arteriogenese <sup>65</sup>. Hieraus resultiert, dass sich Arteriogenese typischerweise im Bereich der Arterienstenose ereignet. Anders als bei angiogenen Vorgängen können Arteriogeneseprozesse eine Durchblutungssteigerung bewirken und die okkludierte Arterie funktionell zum Teil oder vollständig ersetzen.

**Tabelle 1. Neovaskularisation: Entwicklung neuer Gefäßen im adulten Organismus.**  
 SDF-1: Serum-Derivated Faktor-1, HIF-1 $\alpha$ : Hypoxia-Inducible Faktor-1 $\alpha$ , modifiziert nach Simons <sup>50</sup>.

<b>Neovaskularisation</b>		
<b>Vaskulogenese</b>	<b>Angiogenese</b>	<b>Arteriogenese</b>
<i>De novo</i> Entwicklung aus Kapillaren oder Umgestaltung von präexistierenden Gefäßen aufgrund zirkulierender endothelialer und vaskulärer Vorläuferzellen	<i>De novo</i> Kapillarsprossung aus bestehenden postkapillären Venolen	Wachstum von präexistierenden Arteriolen zu Kollateralarterien und <i>de novo</i> Kollateralentstehung
Verletzungs- oder Lokalischämie bedingt	Ischämie bedingt	Normoxie
SDF-1 eventuell involviert	Lokale Regulation durch HIF-1 $\alpha$ Expression	Stimuliert durch lokale Veränderungen der Schubspannung und des Einstroms mononuklearer Zellen
Funktioneller Effekt unklar	2- bis 3-fache maximale Durchblutungssteigerung	20- bis 30-fache maximale Durchblutungssteigerung

### 1.2.10 THEORIEN ÜBER DIE ARTERIOGENE ENTSTEHUNG VON KOLLATERALGEFÄßEN

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob der Prozess der Arteriogenese außer Umformung präexistierender Gefäße auch Entstehung von *de novo* Kollateralarterien beinhaltet, ähnlich den Vorgängen der Angiogenese.

Die klassische Theorie eines reinen „Remodeling“-Mechanismus präexistierender Gefäße während der Arteriogenese wird durch eine Vielzahl von Versuchen unterstützt, beispielsweise am ischämischen Hinterlaufmodell an Nagetieren<sup>66</sup>. Es ist auch belegt, dass koronare Arteriolen am menschlichen Herzen existieren und als Reaktion auf arterielle Okklusion potentiell zu größeren Strukturen heranwachsen können, die in der Lage sind das Myokard vor Nekrose zu bewahren<sup>67-70</sup>. Komplementär hierzu positionierte Carmeliet *et al.* 2000 die *de novo* Sichtweise der Arteriogenese. Dieses ergänzende Konzept setzt voraus, dass Kapillaren glatte Muskelzellen rekrutieren und so muskuläre Kollateralgefäße *de novo* bilden können<sup>44</sup>. Der endgültige Beweis, ob ein *de novo* Prozess an Herzen existiert, ob dieser an der richtigen Stelle zwischen normoxer und ischämischer Region stattfindet, ob es eine Verbindung mit dem arteriellen Gefäßsystem gibt und ob so schließlich Muskelgewebe geschützt werden kann, steht noch aus<sup>71</sup>. Auch in der Peripherie von Säugetieren konnte bisher keine *de novo* Kollateralentstehung nachgewiesen werden. Stattdessen ist sicher, dass bei Arterienverschlüssen präexistierende Anastomosen erweitert und zu typischen Arterien umgebaut werden. Bei Ratten ist zum Beispiel ein großes Kollateralgefäß bereits vor arterieller Okklusion sichtbar, die sich anpasst und dann den größten Teil des kollateralen Blufflusses führt<sup>58</sup>. Auch beim Menschen werden vorbestimmte Kollateralwege in der vaskulären Peripherie beschrieben, die sich ohne interindividuelle Variationen bei Stenose der Arteriae (Aa.) iliacae modifizieren. Offensichtlich gibt es in der peripheren Zirkulation eine festgelegte Anzahl präexistierender arteriolärer Verbindungen. Bei C57BL/6 Mäusen handelt es sich beispielsweise um 8 und bei Kaninchen 38 vorbestehende Kollateralen, die sich nach Verschluss der Arteria (A.) femoralis vergrößern, sich jedoch selbst bei maximaler Stimulation durch Schubspannung nicht vervielfachen<sup>72, 73</sup>. Trotzdem kann während der frühen Phasen des Kollateralwachstums in der vaskulären Peripherie vor allem bei Kaninchen und Ratten eine höhere Anzahl an Gefäßen als vor Gefäßverschluss angiographisch dargestellt werden. Diese scheinbare Vermehrung könnte als Argument für die *de novo* Wachstumstheorie gewertet werden. Gleichwohl besteht eine Limitation der angiographischen Auflösung von circa 30 µm, daher könnten die vermeintlich „neuen“ Gefäße auch erst durch Wachstumsvorgänge sichtbar geworden sein<sup>74</sup>.

Zusammenfassend erscheint als wahrscheinlichste Variante, dass beide Mechanismen parallel präsent und aktiv sind, der quantitativ größere Beitrag zur Arteriogenese aber durch die Umformung präexistierender arterioläre Gefäße geleistet wird <sup>74</sup>.

### 1.2.11 MORPHOLOGIE PRÄEXISTIERENDER KOLLATERALGEFÄßE

Per Definition werden Gefäße, die Blut vom Herzen wegführen, als Arterien bezeichnet. Der strukturelle Wandaufbau einer Arterie ist typischerweise dreischichtig und besteht aus einer inneren Tunica intima, einer zentralen Tunica media und einer äußeren Tunica adventitia <sup>75</sup>.

1. **Tunica intima (Intima):** Lumenseitig wird eine Arterie kontinuierlich von Endothelzellen ausgekleidet, die wiederum einer dünnen Bindegewebsschicht aufsitzen. Diese sich anschließende Schicht nennt sich Lamina elastica interna und besteht aus elastischen Fasern. Zusammen ergeben Endothel und Lamina elastica interna die Schicht der Intima <sup>75</sup>.
2. **Tunica media (Media):** Die sich anschließende Media wird ebenfalls von einer elastischen Lamina interna und einer dünnen elastischen Lamina externa begrenzt und von mehreren Schichten glatter Muskelzellen gebildet. Die Dicke der Media ist abhängig von der Lage im Gefäßsystem, der Größe und den vorherrschenden Druckverhältnissen. Je höher der standzuhaltende Druck ist, desto dickere und zahlreichere Schichten an glatten Muskelzellen weist eine Arterie auf. Je geringer der Gefäßdurchmesser, desto weniger glatte Muskelzellschichten finden sich bei einer Arterie <sup>75</sup>.
3. **Tunica externa (Adventitia):** Die äußerste Schicht eines arteriellen Gefäßes wird Adventitia genannt und ist ebenfalls von einer Lamina elastica interna begrenzt. In der Adventitia findet sich eine große Menge Bindegewebe (Kollagen und Elastinfasern), aber auch Kapillaren, Venolen und Nervenfasern. Außerdem enthält die Adventitia glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Mastzellen, Makrophagen und Lymphozyten <sup>75</sup>.

Kleine Arterien mit wenig glatter Muskulatur werden vor ihrer Aufspaltung in Kapillaren als Arteriolen bezeichnet. Morphologisch betrachtet sind präformierte Kollateralgefäße mit einem Durchmesser von ungefähr 30 bis 50  $\mu\text{m}$  und ein bis zwei Schichten glatten Muskelzellen demnach Arteriolen<sup>76, 77</sup>. Im Perfusionsgebiet bilden diese Kollateralarterien einen Teil des akordenartig angeordneten Gefäßnetzwerkes<sup>72</sup>. Die größte Dichte haben diese präexistierenden Kollateralgefäße im Skelettmuskel, wo sie im mittleren Abschnitt die proximale mit der distalen Seite verbinden. Sowohl im proximalen als auch distalen Bereich des Muskels findet sich ein Anschluss an versorgende Arterien. In den Verbindungsarteriolen besteht unter physiologischen Bedingungen kein unidirektionaler, sondern ein oszillierender Blutfluss. Den kleinen Arteriolen fällt außerdem keine größere funktionelle Bedeutung zu, daher wird ein Prozess in der Embryonalentwicklung als Ursache für ihre Existenz angesehen, bei dem die terminale Differenzierung des primären Gefäßnetzwerkes zu Endarterien nur unvollständig ausgeführt wurde.

Während der Arteriogenese entstehen aus diesen schon existierenden Arteriolen größere, reife Arterien. Während der arteriogenen Umstrukturierung nimmt nicht nur der Durchmesser zu, sondern es findet auch ein Längenwachstum statt. Dies führt wahrscheinlich zu der typischen korkenzieherartigen Struktur neu gewachsener arteriogener Kollateralgefäße<sup>11</sup>.

### **1.2.12 PHYSIKALISCHE UND HÄMODYNAMISCHE KRÄFTE DER ARTERIOGENESE**

Bereits seit dem 19. Jahrhundert ist das Gesetz der Histomechanik bekannt, das die Beziehung zwischen vorherrschendem Blutfluss und Größe einer Arterie beschreibt<sup>78</sup>. Demnach bestimmt der Blutfluss die Arteriengröße und der Druck die Arterienwanddicke. Funktion determiniert also Form. Viele Studien haben gezeigt, dass erstens die Arteriengröße mit dem Fluss während der Entwicklung korrespondiert, zweitens die Arterien des adulten Organismus mit strukturellen Anpassungen auf Blutflussveränderung reagieren und drittens die Arterienlumina bei Blutflussmodifikationen unmittelbare physiologische Anpassungen im vaskulären Tonus vornehmen und persistierende Flussveränderungen später durch anatomische Anpassungen erwidern<sup>79-84</sup>. Dies bedeutet also, dass größere Arterien mit dauerhaft reduzierter Durchblutung ihr Lumen verkleinern, wohingegen kleinere Arterien mit längerfristig gesteigerter Durchblutung ihr Lumen vergrößern.

Wenn eine größere Arterie akut oder chronisch in relevantem Maße verschlossen wird, findet sich entlang der überbrückenden Anastomosen ein steiler Druckgradient zwischen dem Hoch- und Niederdruckgebiet. Die normalerweise nur gering ausgeprägte Durchblutung im Kapillargebiet erhöht sich dann um ein Vielfaches. Diese hämodynamische Veränderung beeinflusst die physikalischen Kräfte, die auf die Gefäßwand wirken. Unter anderem bestehen aufgrund des Blutdrucks Kräfte, die zu einer erhöhten tangentialen Kraft auf die Gefäßwand führen, was wiederum Auswirkungen auf die Umformung von Media und Adventitia hat<sup>85</sup>. Auf die Gefäßwand wirkt aber vor allem auch die Schubspannung. Letztere beeinflusst die Endothelzellen der Gefäßwand und wurde als Initiator der Arteriogenese identifiziert<sup>19, 81, 83, 86</sup>. Unter physiologischen Bedingungen herrscht in der A. femoralis eine Schubspannung von  $4,8 \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$  vor. Nach Okklusion der Femoralarterie beträgt die Schubspannung in den überbrückenden Arteriolen circa  $889 \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$ <sup>87</sup>. Die Schubspannung ist direkt proportional zur Durchblutung und der Blutviskosität und steht in inverser Beziehung zur dritten Potenz des kollateralen Gefäßradius. Demnach führt also eine verstärkte Durchblutung zu einer verstärkten Schubspannung, das einsetzende Wachstum vergrößert wiederum den Gefäßradius und die Schubspannung sinkt daraufhin wieder ab. Die Arteriogenese stoppt frühzeitig und ersetzt so ungefähr ein Drittel der Konduktanz der verschlossenen Arterie<sup>88, 89</sup>. Diese maximale Leitfähigkeit konnte bei Kaninchen durch Experimente mit arteriovenösen Seit-zu-Seit Anastomosen (AV-Shunts), die distal einer Ligatur der A. femoralis gesetzt wurden, gesteigert werden. Die Geschwindigkeit des Blutflusses und folglich die Schubspannung erhöhte sich auf das Vierfache im Vergleich zur kontralateralen ligierten Hinterlaufseite. Die Folge war eine starke arteriogene Antwort und erstmals eine komplette Kompensation und sogar Überkompensation der Konduktanz<sup>90</sup>.

Andere als mögliche Stimuli diskutierte Faktoren wie Wandspannung<sup>91</sup> oder pulsatile und zirkuläre Dehnung<sup>92</sup> der Arterienwand gelten aus folgenden Gründen als unwahrscheinlich: Wandspannung wird durch Druck und Radius bestimmt, unmittelbar nach einer Arterienokklusion fällt jedoch der distale Druck ab. Die pulsatile Dehnung ist ebenfalls niedrig, wenn der Druck gering ist. Eine maximale Arteriogenese erfolgt jedoch, wenn ein maximaler Fluss mit minimalen Pulsationen kombiniert wird (wie am Beispiel des AV-Shunts gezeigt werden konnte).

### 1.2.13 SCHUBSPANNUNG UND MECHANOTRANSDUKTION DER ARTERIOGENESE

Unter den verschiedenen physikalischen Kräften, welche die Größe des arteriellen Gefäßbaums kontrollieren, ist die Schubspannung die bedeutendste<sup>80-83, 93</sup>. Nach arterieller Okklusion findet ein nach außen gerichtetes und Lumen vergrößerndes Remodeling präexistierender Verbindungsarteriolen durch Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen statt. In den verbindenden Kollateralgefäßen ergibt sich, wie zuvor beschrieben, ein steiler Druckgradient zwischen der hohen präokklusiven und der sehr niedrigen postokklusiven Druckregion und verursacht eine vermehrte Schubspannung. Die Schubspannung unterstützt durch eine Deformation von Endothelzellen den Prozess der Umformung<sup>71</sup>:

Wenn die hämodynamischen Kräfte der Schubspannung auf das Endothel einwirken, wird eine Vielzahl von Signalkaskaden aktiviert. Es müssen dabei mindestens zwei am Endothel ansetzende mechanotransduktorische Signalwege zusammenspielen, um eine neue Arterie im Falle eines Arterienverschlusses zu formen. Erstens müssen die Anziehung-, Adhäsion- und Invasionsvorgänge knochenmarksstämmiger Zellen, die für das strukturelle Remodeling notwendig sind, koordiniert werden. Zweitens muss die Proliferation der Endothel- und glatten Muskelzellen stattfinden<sup>74</sup>.

Die früheste Antwort des ersten Signalwegs ist eine durch die erhöhte Schubspannung im Kollateralkreislauf nach Verschluss einer Hauptarterie bedingte Aktivierung und Expression von allen Stickstoffmonoxid (NO) Synthase Isoformen und NO Produktion. Durch Schubspannung kommt es zu einem Anstieg der eNOS, welche die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin katalysiert. Dies bedeutet eine NO-Zunahme, die wahrscheinlich Einfluss auf die iNOS-abhängigen Monozyten/Makrophagen nimmt. Anschließend erhöht sich als Folge der Schubspannung die Expression eines Proteinkomplexes aus VE-Cadherin, VEGF-Rezeptor-2 und PECAM<sup>94</sup>. Außerdem kommt es zur Produktion und Sekretion von VEGF, was wiederum die „Monocyte Chemoattractant Protein 1“ (MCP-1) Synthese im Endothel und in den glatten Muskelzellen der Tunica media induziert<sup>95</sup>. Durch Interaktionen mit aktivierten mechanosensitiven Calcium-Ionenkanälen wie dem „Transient Receptor Potential Cation Channel, subfamily V, member 4“ (TRPV4) entstehen schließlich Auswirkungen auf die osmotische Regulation des Endothels<sup>94, 96, 97</sup>.

Eine zeitlich nachgeordnete Antwort auf die Schubspannung ist die verstärkte Transkription von verschiedenen Faktoren wie „Cardiac Ankyrin Repeat Protein“ (CARP) und „Krüppel-like Factor-2“ (KLF-2) <sup>74</sup>. Desweiteren werden intrazelluläre Adhäsionsmoleküle „Inter-Cellular Adhesion Molecule-1“ (ICAM-1) und „Vascular Cell Adhesion Molecule-1“ (VCAM-1) sowie MCP-1 und „Transforming Growth Factor- $\beta$ “ (TGF- $\beta$ ) im aktivierten Endothel induziert <sup>74</sup>. Die Expression des Vasokonstriktors Endothelin-1 (Et-1) wird herabreguliert <sup>98, 99</sup>. Die Neuordnung der Mikrofilamente und Mikrotubuli und deren Elongation entlang der Flussrichtung sowie die Rekrutierung von Leukozyten sind weitere Effekte des Ansetzens der Schubspannung am Endothel <sup>86, 100</sup>.

Wie die am Endothel ansetzenden Kräfte der Schubspannung wachstumsstimulierend auf glatte Muskelzellen wirken, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar.

#### **1.2.14 BIOLOGISCHE MECHANISMEN DER ARTERIOGENESE**

Veränderte Durchblutungsgegebenheiten durch eine Arterienokklusion induzieren eine Erhöhung der Schubspannung, die wiederum das Endothel aktiviert und daher als wichtigster Trigger der Arteriogenese gilt.

Als frühestes sichtbares Zeichen der Arteriogenese kann ein ödemartiges Anschwellen und eine longitudinale Ausrichtung der Endothelzellen unter dem Elektronenmikroskop beobachtet werden, was vermutlich auf die Öffnung von Ionenkanälen zurückzuführen ist <sup>101</sup>. Die Zellen liegen dann nicht mehr in Richtung des Blutstromes, sondern erscheinen zufällig ausgerichtet. In diesen aktivierten Endothelzellen ist eine große Anzahl Zellorganellen, wie beispielsweise freie Ribosomen, im Zytoplasma enthalten. Das aktivierte Endothel bildet vermehrt MCP-1. Adhäsionsmoleküle locken zirkulierende mononukleäre Zellen aus dem Blut an, die an der Gefäßwand interagieren, adhären und transmigrieren und als Reservoir für Wachstumsfaktoren dienen <sup>102, 103, 104</sup>.

Zeitgleich findet eine Aktivierung der Monozyten und T-Zellen in der Tunica adventitia von peripheren Kollateralgefäßen oder Bindung dieser Zellen an das Endothel bei koronaren Kollateralen statt <sup>105</sup>. Anschließend produzieren diese aktivierten Monozyten wieder MCP-1 und locken weitere Monozyten an. Mononukleäre Zellen produzieren Proteasen und Wachstumsfaktoren, um das extrazelluläre Gerüst zu verdauen, Beweglichkeit zu ermöglichen und Platz für neue Zellen zu schaffen. Sie produzieren auch NO aus iNOS, das essentiell für Arteriogenese ist. Auch Thrombozyten heften sich an das aktivierte Endothel und setzen verschiedene Wachstumsfaktoren, wie Interleukin-4 oder PDGF frei. Diese regen wiederum

das Endothel zur weiteren Expression von Adhäsionsmolekülen an. Bedingt durch den Verlust von Plasmaproteinen, Erythrozyten und Thrombozyten an die Gefäßwände und die Adhäsion der Monozyten erhöht sich die Durchlässigkeit des Endothels. Außerdem wird im aktivierten Endothel durch Chloridkanalinhibitoren die Offenwahrscheinlichkeit der Calcium-abhängigen Chloridkanäle erhöht. Viele verschiedene Moleküle für Zellproliferation und Migration werden hochreguliert, wie beispielsweise MMP-2, „tissue-type Plasminogen Activator“ (t-PA), u-PA, „Focal Adhesion Kinase“ (FAK) und Integrin  $\alpha 5\beta 1$  und Integrin  $\alpha v\beta 3$ . Zusätzlich produziert das Endothel verstärkt GM-CSF, der zu einer Verlängerung der Überlebenszeit von Monozyten führt. Aus diesem Grund können die angelockten Monozyten große Mengen an weiteren Wachstumsfaktoren (zum Beispiel FGF-2) herstellen, was wiederum Einfluss auf die Restrukturierung der Gefäße hat <sup>87</sup>.

Zu Beginn infiltrieren die Monozyten zunächst die Tunica intima, dringen jedoch später auch vermehrt in die Tunica adventitia ein, wo sie eine akut inflammatorische Umgebung verursachen. Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 werden hochreguliert und Makrophagen sowie aktivierte Fibroblasten produzieren Wachstumsfaktoren und MMPs. Dies führt zur, nach Spezies unterschiedlichen, Vergrößerung des Gefäßes. In Folge der Entzündungsreaktion löst sich auch die Basalmembran des Gefäßes auf. Das umgebende Gewebe schafft außerdem Platz für das sich entwickelnde Gefäß <sup>87</sup>. Nach Abschluss der Adhäsion und Invasion sowohl der Monozyten als auch der Thrombozyten vollziehen sich zeitgleich die ersten Mitosen der Endothel- und Muskelzellen. Im Tiermodell kann dieser Prozess circa 24 Stunden nach akutem Verschluss beobachtet werden <sup>72</sup>.

Um aus den präexistierenden Kollateralen ein großes Kollateralgefäß zu formen, muss zusätzlich auch ein teilweiser Abbau und Ersatz der alten Gefäßstruktur vollzogen werden. Im Verlauf dieses Vorgangs werden zwei Phasen beschrieben: Proliferation und Umstrukturierung. Als erstes ereignen sich Migration und Proliferation der Endothelzellen. Auch die glatten Muskelzellen der Media treten in den Zellzyklus ein und leisten einen Großteil neuer Gewebsproduktion <sup>71</sup>.

Bei der Vorbereitung der Mitosen spielen Aktin-bindende Proteine wie Abra, Cofilin und Thymosin-beta-4 (Tmsb4) eine wichtige Rolle: Sie determinieren die Polymerisation und Maturation von Aktin und der „Ras homolog gene family“ (Rho) Signalweg wird aktiviert. Intergine und Connexine werden messbar hoch reguliert. Essentiell in diesen aufeinander abgestimmten Vorgängen sind die Transkriptionsfaktoren „Activator Protein-1“ (AP-1), „Early Growth Response Protein-1“ (EGR-1), CARP, „E-twenty six“ (Ets), der Rho-

Signalweg und die „Mitogen Activated Kinase-1“ (MAPK-1) und die „Mitogen Activated Kinase-3“ (MAPK-3). Je nach Größe der Spezies können die glatten Muskelzellen ihren Gefäßdiameter vergrößern (bis zu 3-fach in Mäusen, 10-fach in Kaninchen, 20-fach in Hunden und sogar mehr in Menschen). Diese Plastizität verdanken die glatten Muskelzellen der Möglichkeit, ihren Phänotyp vom physiologisch kontraktilen Typ zum synthetischen oder proliferativen Typ zu verändern. Die phänotypisch veränderten Muskelzellen verlieren viele Differenzierungsmarker, beispielsweise die meisten Aktin-Filamente, und gelten somit als dedifferenziert. Diese synthetischen glatten Muskelzellen wandern schließlich aus, um eine Neointima zu bilden. Die Ausrichtung der sich neu anordnenden glatten Muskelzellen orientiert sich sowohl zirkulär als auch longitudinal. Der Synthese-Typ der glatten Muskelzellen produziert extrazelluläre Matrix, Kollagen, Elastin und letztendlich die neue Lamina elastica interna<sup>87</sup>. Nach der Gefäßokklusion stoppt die Adaption der Kollateralen bereits bevor eine optimale Anpassung an die neuen Durchblutungsgegebenheiten erreicht ist<sup>106, 107, 108</sup>. Trotz der enormen Vergrößerung der Gefäßmasse (bis 50-fach) ist der Grad der funktionellen Wiederherstellung der Durchblutung somit inkomplett und endet koronar bei circa 35 % und peripher bei circa 40 % der maximalen Leitfähigkeit, obwohl die normale Durchblutung in Ruhe schnell erreicht wird<sup>88, 89</sup>.

### 1.2.15 THERAPEUTISCHE ARTERIOGENESE

Ein Kommentar von einem Pionier auf dem Gebiet der menschlichen Koronarzirkulation illustriert die Wichtigkeit der therapeutischen Arteriogenese. William F.M. Fulton bemerkt vorausschauend „If some means could emerge of encouraging the rate at which normal coronary arterial anastomoses enlarge to form the wide channels for collateral blood flow, then a considerable potential advantage would be gained in the management of ischemic heart disease“<sup>109</sup>.

Die Forschung über die arteriogene Entwicklung einer arteriellen Zirkulation aus kleinen präexistierenden Arteriolen, um die Okklusion einer Hauptarterie zu umgehen, hat in den letzten 100 Jahren bereits wichtige Hürden genommen: Zunächst wurde die Existenz der arteriogenen Vorläuferstrukturen bewiesen, außerdem wurde deren Funktion unter normalen und pathologischen Umständen demonstriert und schließlich wurde gezeigt, dass biologisch oder pharmazeutisch Einfluss auf die arteriogene Entwicklung genommen werden kann. Eine der letzten bestehenden Herausforderungen ist nun die erfolgreiche Therapie von Patienten mit arteriogenen Medikamenten.

Für die therapeutischen Ansätze der Arteriogenese ist es von enormer Bedeutung, die Wachstumsperiode der sich entwickelnden Arterien zu extendieren beziehungsweise wieder aufzunehmen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Gefäßwachstum sowohl durch Monozytenstimulation<sup>110</sup> als auch durch Endothelzellaktivierung<sup>111</sup> gesteigert werden kann. Ein weiterer wichtiger, aber noch unklarer Punkt für die Erforschung von Stimulatoren der Arteriogenese ist das Verständnis, wie die auf das Endothel einwirkenden Kräfte sich auf die glatten Muskelzellen der Tunica media auswirken und übertragen. Auf diesem Gebiet übernehmen anscheinend drei Signaltransduktionswege Schlüsselrollen: MAPK-, Rho- und NO-abhängige Signalwege. Weitere Forschung auf dem Gebiet der arteriogenen Signalübertragung ist daher unerlässlich. Der Einfluss der Rho-Signaltransduktion und besonders des „Actin-binding Rho activating Proteins“ (Abra) soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

### 1.3 ACTIN-BINDING RHO ACTIVATING PROTEIN

Das „Actin-binding Rho activating-protein“, kurz Abra genannt, wird synonym auch als „Striated Muscle Activator of Rho-dependent Signaling“ (STARS) oder „myocyte stress-1“ (ms-1) bezeichnet. Es handelt sich um ein muskelspezifisches, Aktin-bindendes Gen, das in der Lage ist, die „Serum Response Factor“ (SRF)-abhängige Transkription durch einen „Ras homolog gene family, member A“ (RhoA) und Aktin-Polymerisation involvierenden Mechanismus zu stimulieren<sup>112</sup>. Endogenes Abra findet sich im kardialen und skelettalen Muskelgewebe<sup>112</sup>. Im Herzgewebe wird Abra messenger RNA (mRNA) als Antwort auf Drucküberladung hochreguliert<sup>112, 113</sup>. Forcierte Überexpression von Abra in Herzgewebe von Mäusen resultiert in einer verstärkten Sensitivität für biochemische Stresstimuli bei kardialer Hypertrophie<sup>114</sup>. Kürzlich wurde außerdem gezeigt, dass Abra in Hypertrophie und Atrophie des menschlichen Skelettmuskels involviert ist<sup>115</sup>. Bisher wurde Abra in verschiedenen Tierarten identifiziert, es besteht demnach eine hohe evolutionäre Konservierung des Gens.

### 1.3.1 ENTDECKUNG VON ABRA

Im Jahr 2002 wurde die cDNA von Abra erstmals von zwei unabhängigen Gruppen kloniert. Mahadeva *et al.* suchten 2002 regulatorische Gene, die bei Signalwegen der linksventrikulären Hypertrophie beteiligt sind. Im Zuge ihrer Suche identifizierten sie eine neue cDNA<sup>113</sup>. Nach Drucküberlastung durch „Aortic banding“ im linken Ventrikel fanden sie einen Anstieg der mRNA. Da hierbei die Myozyten stark beansprucht wurden, bekam das exprimierte Gen zunächst den Namen ms-1.

Ebenfalls im Jahre 2002 entdeckten Arai *et al.* mit differentieller Genexpressionsanalyse ein bis *dato* unbekanntes Gen, das im frühen embryonalen Herzen exprimiert wird. Dieses Gen wurde ausschließlich in Herz- und Skelettmuskeln gefunden und erhielt aus diesem Grund den Namen STARS<sup>112</sup>. Obwohl *in silicio* keine Proteinmotive erkennbar waren, wurden im Experiment mittels Deletionsmutanten zwei separate Aktin-bindende Regionen identifiziert. Abra wurde von Arai *et al.* als Vermittler zwischen zytoskelettalen Signalen und dem Rho-Signalübertragung beschrieben. Hierdurch wiederum wird die transkriptionale Aktivität des SRF stimuliert und auch die Expression muskelspezifischer Gene angeregt<sup>112</sup>.

Inzwischen lautet der offizielle Terminus des Gens „Actin-binding Rho activating protein“ (Abra) für das humane beziehungsweise abra für das murine Homolog. Abra baut sich aus 317 Aminosäuren auf, besitzt ein Molekulargewicht von 45 kDa und ist hauptsächlich im gestreiften Muskel lokalisiert. Subzellulär findet sich Abra in der I-Bande des Sarkomers lokalisiert und weniger ausgeprägt in der sarkomerischen Struktur zwischen den Z-Scheiben. Im linken Ventrikel des Herzens wurde ein progressiver Anstieg von Abra vom embryonalen bis zum adulten Organismus beobachtet. Die Überlegung, dass Abra zur Gruppe fetaler Gene gehört und während der linksventrikulären Hypertrophie re-exprimiert wird, kommt aufgrund der Persistenz der Abra Expression im linken Ventrikel des adulten Organismus nicht in Betracht<sup>116</sup>. Die Abra mRNA Expression im linken Ventrikel nach „Aortic banding“ belegt im Zeitverlauf eine frühe dreifache Hochregulierung als Antwort auf Drucküberladung, obwohl noch keine linksventrikuläre Massenerhöhung gemessen werden konnte. Mahadeva *et al.* äußerten deshalb im Jahre 2002 die Vermutung, dass eine verstärkte Expression vom Abra Protein selbst der Auslöser für die entstehende Hypertrophie sein könnte<sup>113</sup>.

### 1.3.2 STIMULATION DER ARTERIOGENESE DURCH ABRA

Bei der Suche nach Genen, die in die Schubspannung induzierte Arteriogenese involviert sind, wurde von Troidl *et al.* 2009 eine Genexpressionsanalyse in wachsenden Kollateralen durchgeführt. Als eines der am stärksten hoch regulierten Gene wurde Abra identifiziert <sup>117</sup>.

Ein entscheidender Prozess während der Arteriogenese ist die verstärkte Proliferationsaktivität von glatten Muskel- und Endothelzellen. Untersuchungen zur Abra Überexpression zeigten, dass eine Abra Überexpression eine Proliferation der glatten Muskelzellen induziert. Die Versuche wurden *in vitro* in porcinen glatten Muskelzellen und auch in porcinen Endothelzellen der Aorta durchgeführt. Die Zellen befanden sich bei der Transfektion mit Abra im subkonfluenten (proliferativen) Phänotyp, entsprechend einer Wachstumssituation bei Kollateralgefäßen. Die Ergebnisse zeigen eine relativ gesteigerte Proliferationsaktivität der glatten Muskelzellen. Im Gegensatz hierzu hat eine Abra Überexpression keine mitogene Wirkung auf (aortale) Endothelzellen <sup>116</sup>.

Die beschriebene gesteigerte Expression von Abra resultiert nicht aus Umbauprozessen, sondern aus einer aktiven regulativen Funktion von Abra in den Wachstumsprozessen von Kollateralgefäßen. Diese funktionellen Implikationen in der Arteriogenese wurden von Troidl *et al.* (2008) zunächst durch die Modulation der Genexpression *in vivo* gezeigt. Eine Prüfung erfolgte durch lokalen, transienten Gentransfer mit Adenoviren, die sowohl zur Überexpression von Abra als auch zum „Knockdown“ vermittelt durch „small interfering RNA“ (siRNA) eingesetzt wurde <sup>116</sup>.

Der Rho-Kinase-Hemmer „Fasudil“ inhibiert deutlich die durch Abra stimulierte Arteriogenese. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass der Rho-Signalweg in die Abra induzierten proliferativen Prozesse involviert sein muss <sup>19</sup>.

Zusammenfassen lässt die aktuelle Literatur demnach eine funktionelle Bedeutung von Abra für arteriogene Prozesse vermuten.

## 1.4 AUFGABENSTELLUNG

Das vaskuläre System hat die Fähigkeit, sich durch Entwicklung und Wachstum einer kollateralen Zirkulation selbst zu heilen. Diese multifaktorielle Gefäßneubildung spielt in der Medizin eine Schlüsselrolle für die Entwicklung neuer Therapieoptionen. Da die aktuelle Literatur eine funktionelle Implikation von Abra für arteriogene Prozesse vermuten lässt, ist Abra ein vielversprechender Ansatzpunkt für weitere Forschung auf dem Gebiet der medizinischen Neovaskularisation. Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit sollte deshalb sein, systematisch den Einfluss von Abra auf den Mechanismus der Kollateralarterienentwicklung nach einem Hauptgefäßverschluss zu klären.

Hierzu sollten insbesondere folgende Fragestellungen betrachtet werden:

- Sind die Arteriogeneseprozesse bei fehlendem Abra vermindert?
- Hat Abra einen funktionellen Einfluss auf die Blutversorgung?
- Besetzt Abra eine aktive regulative Schlüsselrolle in der Arteriogenese?
- Stellt Abra einen möglichen Ausgangspunkt für arteriogene Therapieoptionen dar?

Eine Möglichkeit der funktionellen Untersuchung sind *in vivo* Experimente bei Knockout Tieren. Verminderte Arteriogeneseprozesse nach Ligatur der Femoralarterie wurden bereits für CD4<sup>-/-</sup> Mäuse<sup>118</sup>, MCP-1 Rezeptor (CCR2)<sup>-/-</sup> Mäuse<sup>119</sup> und „Notch ligand Delta-like-1“ (Dll-1)<sup>-/-</sup> Mäuse<sup>120</sup> gezeigt. Um nun zu definieren, inwiefern in Gen-defizienten Abra<sup>-/-</sup> Mäusen eine beeinträchtigte Arteriogenese stattfindet, wurden sowohl funktionelle als auch histologische Untersuchungen an dem gut etablierten Modell der Langzeit-Ischämie im Hinterlauf der Knockout und Wildtyp Maus durchgeführt und die zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen.

Zunächst erfolgte eine Genotypisierung der Tiere mit Hilfe einer Real Time Polymerase Chain Reaktion (RT PCR) Analyse, anschließend sollte das Fehlen von Abra mRNA speziell in der quergestreiften Skelettmuskulatur der Knockout Tiere bestätigt werden. Bei der eigentlichen Operation fand die standardisierte Ligatur der rechten A. femoralis statt. Während des Beobachtungszeitraumes sollten funktionelle Parameter quantifiziert werden, weshalb die Erholung der Durchblutung mittels Laser Doppler Imaging und zusätzlich die Hämoglobin Sauerstoff Sättigung gemessen wurden. Zur Klärung der Frage, ob eventuelle Unterschiede in der Erholung der Durchblutung auch einschränkende Auswirkungen auf die Funktion haben, wurden die veränderten Bewegungsabläufe in den Mäusehinterläufen mit der

Skala der aktiven Fußbewegung objektiviert. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurden in den Musculi (Mm.) adductorii morphometrische Analysen der Gefäßparameter durchgeführt, um strukturelle Differenzen aufzuzeigen. Zusätzlich wurde in den Mm. gastrocnemii eine Kapillar-Dichte-Bestimmung realisiert. Letzteres sollte vor allem die Spezifität des ischämischen Hinterlaufmodells für Arteriogeneseprozesse verifizieren. Abschließend Angiogramme der Hinterläufe beider Versuchsgruppen angefertigt, welche das tatsächliche Kollateralwachstum visualisieren sollten.

Ziel dieser Arbeit war schließlich die Beantwortung der Frage, ob Abra eine aktive, regulative Schlüsselrolle während des Wachstums von arteriogenen Kollateralen besitzt und daher Remodeling- und Arteriogeneseprozesse in Abra<sup>-/-</sup> Mäusen entsprechend verringert sind. Die gefundenen Ergebnisse sollten final im Kontext möglicher pharmakologischer Therapieoptionen der Arteriosklerose betrachtet werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

Die Firmensitze befinden sich in Deutschland (sofern nicht anders angegeben).

#### 2.1.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Alleinfuttermittel (Altromin®)	Altromin Spezialfutter, Lage
96 Well PCR Platten	Biorad, München
Dexpanthenol 5 % Augen- und Nasensalbe (Bepanthen®)	Bayer, Leverkusen
Dreiwegehahn (Discofix®)	Braun, Melsungen
Glasware	Schott, Mainz
Infusionsbesteck (Intrafix® Air)	Braun, Melsungen
Insulinspritzen zu 1 ml/40 I.E.	Braun, Melsungen
Kork	
Leukosilk® S	Beiersdorf, Hamburg
Objektträger, Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Optical Sealing Tape für PCR-Platten	Biorad, München
Tissue Tec®	OTC Compound, Miles Inc., USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Prolene 6-0	Ethicon, Norderstedt
Prolene 4-0	Ethicon, Norderstedt
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Strukturix Agfa	Röntgen Bender, Muttentz
Schutzhandschuhe Vasco® puderfrei	Braun, Melsungen
Spritzen 2 ml	Braun, Melsungen
Sterican® Kanülen 0,45 x 25 mm	Braun, Melsungen
Sterican® Kanülen 0,90 x 40 mm	Braun, Melsungen
Venenpunktionsbesteck 21 G, 0,8 x 20 mm (Venofix®)	Braun, Melsungen

## MATERIAL UND METHODEN

### 2.1.2 GERÄTE UND SOFTWARE

Balteau-Röntgenapparat	Machlett Laboratories, New York, USA
Brutschrank (Zellen), Hera cell	Kendro, Hamburg
Chirurgisches Operationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
	Döll & Co Medizintechnik, Hofheim a. T.
	Aesculap, Tuttlingen
Digitalkamera DM-LD	Leica, Wetzlar
FastPCR software	Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finnland
	Beetz, Langen
Filmentwicklungsmaschine Optimax	Epson, Tokio, Japan
Flachbettscanner Epson Perfection 4990	Leica, Wetzlar
Fluoreszenzmikroskop DM-RB	Leica, Wetzlar
Gefriermikrotom Kryostat CM 3000	Moor Instruments, Devon, UK
Laser Doppler Perfusions Imager MLDI 5063	
ImageJ®	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Magnetrührer Ika-Combimag®RCO	Ika-Labortechnik, Staufen i. Br.
Mikrofeinwaage Sartorius BP 211 D	Sartorius AG, Göttingen
Microsoft Excel®	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Operationsmikroskop M690/MS-C	Leica, Wetzlar
pH-Meter	WTW, inoLab, Weilheim
Röntgenfilmkassetten	Amersham Biosciences, USA
Stoppuhr	
Spektrophotometer AbTisSpec	LEA Medizintechnik, Giessen
SPSS 10.0	IBM, Armonk, USA
Thermozykler (iCycler®)	Biorad, München
Wärmeplatte	FMI, Seeheim
Wärmekammer	
Wasserbad	IKA-Labortechnik, Staufen
Vortex-2 Genie	Scientific Industries, Oregon, USA
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau

## MATERIAL UND METHODEN

### 2.1.3 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND ANTIKÖRPER

1X IQ SYBR Green Super Mix	Biorad, München
Adenosin	Sigma-Aldrich, München
Agefix	Agfa, Mortsel, Belgien
Aqua destillata	
Bismut (III) Chlorid	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
DAPI Kernfarbstoff, Molecular Probes®	I Invitrogen / Life Technologies, Carlsbad, USA
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin 2 %	Chroma, Münster
Ethanol	Sigma-Aldrich, München
Flüssigstickstoff	
FITC-Anti- $\alpha$ -SM Actin (monoklonal, 1:500)	Sigma-Aldrich, München
Glycin	Roth, Karlsruhe
Heparin	Sigma-Aldrich, München
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm
Hämalaun	Chroma, Münster
Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)	Braun AG Petzold GmbH, Melsungen
KCl	Roth, Karlsruhe
Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10 %)	Medistar GmbH, Holzwickede
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, München
Kodak LX 24 Entwickler	Kodak, Rochester, USA
Methylbutan	Sigma-Aldrich, München
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, München
NaN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München
Rindergelatine	Merck, Darmstadt
RNeasy Mini kit	Qiagen, Hilden
Superscript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen / Life Technologies, Carlsbad, USA
Superscript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen / Life Technologies, Carlsbad, USA

**MATERIAL UND METHODEN**

Turbo DNFree Kit	Ambion, Austin, USA
TRITC- BS-1 Lectin (1:30)	Sigma-Aldrich, München
Xylazinhydrochlorid (Xylazin® 2 %)	Medistar GmbH, Holzwickede
Xylol	Merck, Darmstadt
Zucker	Südzucker AG, Mannheim

## 2.2 METHODE

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden werden im Folgenden detailliert dargestellt.

### 2.2.1 TIERMODELL

Die dokumentierten Tierexperimente wurden durch das bioethische Komitee des Veterinärdezernats (Regierungspräsidium des Landes Hessen in Darmstadt) genehmigt. Alle Tiere wurden unter tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntgabe vom 18. Mai 2006 ordnungsgemäß behandelt und versorgt. Die Leitsätze der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde/Society of Laboratory Animal Science) wurden berücksichtigt. Die durchgeführten Tierversuche fanden unter Aufsicht des Leiters des Versuchsvorhabens, Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Schaper, und seiner Stellvertreterin, Dr. med. W. Schierling, sowie nach Absprache mit dem zuständigen Tierschutzbeauftragten und dem verantwortlichen Tierstalleiter statt. Die Tierexperimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. S. Szymanski und Frau Dr. med. H. Wustrack am Max-Planck-Institut Bad Nauheim durchgeführt.

Es wurde das *in vivo* Modell der einseitigen regionalen Langezeit-Ischämie in der Hintergliedmaße<sup>121</sup> durch Ligatur der Femoralarterie in Mäusen verwendet.

### 2.2.2 VERSUCHSTIERE

Die Unterbringung und der Umgang mit den Versuchstieren entsprachen dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Versuchstiere waren 8 bis 16 Wochen alt, wogen zwischen 17 und 28 g und trugen keine pathogenen Keime. Es wurden weibliche und männliche Mäuse verwendet, die Geschlechter- und Versuchsgruppengetrennt und maximal zu fünf in einem Standardkäfig gehalten wurden. Die Mäuse hatten während des gesamten Versuchszeitraumes *ad libitum* Zugang zu Wasser und Alleinfuttermittel (Altromin®). Der Tag- Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden.

Es wurden insgesamt 30 Tiere immunhistochemisch und sechs Tiere angiographisch untersucht.

## MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.3 KNOCKOUT TIERE

Für alle Untersuchungen wurden weibliche und männliche CL57BL/6 Mäuse mit deaktiviertem Abra Gen verwendet. Die erste Generation Abra<sup>-/-</sup> Mäuse wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. E. Olson (Department of Molecular Biology, University of Texas, Dallas, USA) zur Verfügung gestellt. Die nachfolgenden Knockout (KO) Tiere wurden im Max-Planck-Institut Bad Nauheim in der Abteilung für experimentelle Kardiologie gezüchtet. Nachdem die Tiere ein Alter von mindestens acht Wochen erreicht hatten, wurden die folgend beschriebenen Messungen durchgeführt.

### 2.2.4 WILD TYP TIERE

Als Kontroll-Tiere dieses Experimentes dienten ebenfalls männliche und weibliche nicht-transgene Wildtyp (WT) Mäuse mit CL57BL/6 Hintergrund. Die Geschwistertiere stammten aus der Abteilung für experimentelle Kardiologie des Max-Planck-Institutes in Bad Nauheim. Nach Erreichen eines Alters von mindestens acht Wochen wurden die Tiere für die vorliegende Studie verwendet.

### 2.2.5 MARKIERUNGEN DER TIERE

Zur eindeutigen Identifikation der Tiere in einem Käfig wurde den Mäusen mit einem „Ear Punch“ nach einem bestimmten Markierungsschema ein oder mehrere Löcher in die Ohren gestanzt. Hierdurch ergab sich ein einfaches, aber eindeutiges Zahlenschema. Es fanden sich bei dieser Methode keine Nebenwirkungen und war bei jedem Tier (bis auf der ersten Maus, deren Ohren intakt blieben) nur einmal erforderlich <sup>122</sup>.

### 2.2.6 GENOTYPISIERUNG MITTELS PCR

Um zu überprüfen, ob es sich tatsächlich um genetisch veränderte beziehungsweise nicht veränderte Tiere handelte, wurde bei allen Versuchsmäusen zunächst eine kleine Gewebeprobe mittels „Tail-Cut“ genommen. Anschließend wurde die DNA aller Tiere isoliert und nach Protokoll des Kits (QIAamp Tissue Kit) mithilfe PCR auf die Abra Zielsequenz untersucht.

Zusätzlich wurde einigen Tieren bei der finalen Operation Skelettmuskel der Hinterläufe entnommen, um auch in der quergestreiften Muskulatur mittels RT PCR eine gezielte Deletion der Abra mRNA bei Abra<sup>-/-</sup> Mäusen zu bestätigen.

## MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.7 OKKLUSION DER A. FEMORALIS

Initial wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion von 0,08 ml mit einer kombinierten Lösung aus 10 % Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und 2 % Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht) gelöst in 0,9 % NaCl Lösung im Verhältnis 1:1:2 anästhesiert. Bei Bedarf erhielten die Tiere Erhaltungsdosen des Narkotikums (circa 10 % der Initialdosis), die Dosierung erfolgte nach Wirkung.

Um die Augen während der Narkosezeit gegen Entzündung zu schützen, wurde beidseits eine panthenolhaltige Creme auf die Kornea aufgetragen. Die Tiefe der Narkose wurde durch den Rückzug der Hinterpfote bei mechanischer Berührung getestet. Die Anschlagszeit bis zum Erreichen der vollen Narkosetiefe betrug circa sechs Minuten.

Nachdem die präoperativen Laser-Doppler-Messungen durchgeführt waren, wurden die Tiere für die gesamte Dauer der Operation auf einer 37° Celsius (°C) warmen Platte positioniert. Die Gliedmaßen der Tiere wurden fixiert, um eine vollständige Immobilisation zu garantieren und den chirurgischen Erfolg sicher zu stellen.

Die rechte mediale Oberschenkelseite wurde vor Operationsbeginn enthaart und desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen nach GV-SOLAS-Richtlinien wurde die Haut mit einem Schnitt über dem rechten Ligamentum (Lig.) inguinale eröffnet. Die A. femoralis wurde durch stumpfe Präparation von der Vena (V.) femoralis und dem Nervus (N.) femoralis separiert. Anschließend wurde die A. femoralis distal der A. femoralis profunda und proximal der A. genus descendens ligiert. Hierbei wurde ein chirurgischer Doppelknoten mit 6-0 monofilen, nicht resorbierbaren Faden angewandt. Das Operationsgebiet wurde anschließend mit 0,9 % NaCl Lösung gespült, um das Gewebe vor dem Austrocknen zu schützen und Keime zu reduzieren. Schließlich wurde die Haut verschlossen, indem sie mit einem ebenfalls monofilen, nicht resorbierbaren 4-0 Faden in Einzelknopftechnik genäht wurde.

### 2.2.8 LASER DOPPLER IMAGING

Die Methode des Laser Doppler Imaging ist ein etablierte Methode, um mikrozirkulatorischen Durchblutung zu messen <sup>123</sup>. Die Technik beruht auf dem Prinzip der Dopplerverschiebung, die Christian Doppler 1842 in seiner Lichtwellen Theorie beschreibt. Das streng monochromatische Laserlicht weist typischerweise ein Frequenzspektrum zwischen 20 Hz und 20 kHz auf. Aufgrund der Laserpenetrationstiefe von ein bis zwei mm kann diese Methode der Fluximetrie verwendet werden, um die Durchblutung in Kapillaren nahe der Hautoberfläche, aber auch den etwas tiefer gelegenen Arteriolen und Venolen sowie natürlich auch in Mäusepfoten zu quantifizieren.

## MATERIAL UND METHODEN

Laser Doppler Imaging findet in vielen Bereichen der Medizin Anwendung. Zu nennen sind hier Untersuchungen in der Dermatologie, besonders bei Melanomen<sup>124, 125</sup>, bei Medikamentenentwicklung<sup>126</sup>, Ulzera<sup>127</sup>, Verbrennungen und „Skin grafts“<sup>128</sup>, Morbus Raynaud<sup>129</sup> sowie bei zerebralen Messungen<sup>130</sup>.

Der „Laser Blood Flow Imager“ ist ein hochauflösendes Gerät, das durch Verwendung eines spezialisierten Scannerkopfes den Strahl so fokussieren kann, dass eine Auflösung von 40 µm ermöglicht wird. In Kombination mit einer Arbeitsschrittgröße von 25 µm kann somit eine durchschnittliche Differenz von nur 11 µm gemessen werden: Dies entspricht einem halben Pixel (px) bei unabhängigen mikroskopischen Messungen<sup>131</sup>.

Mit einem Abstand von etwa 15 cm trifft das kohärente Laserlicht auf die Gewebeoberfläche, nachdem das zu scannende Gebiet zuvor definiert wurde. Die in das Gewebe eingedrungenen Laserstrahlen werden vom Gewebe reflektiert. Wenn es auf unbewegte Strukturen trifft, ändert sich die Richtung des Laserlichts, jedoch nicht seine Frequenz. Bewegte Strukturen hingegen, wie zum Beispiel Erythrozyten, reflektieren den Laserstrahl und verursachen aufgrund des Dopplereffekts eine Frequenzverschiebung. Die Erythrozytenkonzentration verändert die Amplitude des Dopplersignals und die durchschnittliche Flussgeschwindigkeit die Höhe der Frequenz<sup>132-135</sup>. Das zurückgeworfene, dopplerverschobene Licht wird vom Photodetektor als Powerspektrum ( $P(f)$ ) gesammelt, in zum Erythrozytenfluss proportionale arbiträre Perfusionseinheiten verrechnet und zur Darstellung eines farbcodierten Perfusionsbildes der mikrovaskulären Blutströmung verwendet<sup>135, 136</sup>. Die Technik des Laser Doppler Imaging ermöglicht so eine Evaluation der Perfusion in realer Zeit. Gleichzeitig wird aus der Intensität des reflektierten Lichtes ein fotorealistisches Bild erzeugt. Hierdurch wird eine Identifikation des Messareales zum Vergleich mehrerer Messungen ermöglicht<sup>137</sup>.

### 2.2.9 MESSUNG DER DURCHBLUTUNG MIT LASER DOPPLER IMAGING

Die Bestimmung der relativen Durchblutung in den hinteren Mäusepfoten erfolgte mithilfe eines roten 633 nm „Laser Doppler Perfusion Imager“ (MLDI 5063: Moor Instruments Ltd. UK). Die nichtinvasiven Messungen der Durchblutung wurden zunächst präoperativ mit Laser Doppler Imaging durchgeführt. Nach Ligierung der rechten A. femoralis wurde anschließend unmittelbar postoperativ wieder die Durchblutung mittels Laser Doppler Imaging gemessen. Im weiteren Forschungsexperiment erfolgten am 3., 7., 14. und 21. postoperativen Tag ebenfalls Laser-Doppler-Messungen.

**Table 2. Laser Doppler Imaging (LDI).** Versuchsaufbau zur Erfolgskontrolle der Operation.

**Anästhesie → LDI (präoperativ) → Operation → LDI (postoperativ)**

Um standardisierte Bedingungen zu erreichen, bekamen die Versuchsmäuse zunächst wie beschrieben eine Vollnarkose und wurden vor jeder Aufnahme für fünf Minuten in einer auf 37 °C klimatisierten Kammer positioniert. Die Tiere wurden dann auf den Rücken gelegt und beide Hinterläufe wurden mit Klebeband parallel zu einander mit der plantaren Seite nach unten auf ein Kissen befestigt, so dass die Rückseite der Pfoten dem Laserstrahl ausgesetzt war. Hinterher wurde die Scanning Region definiert. Die Pixelauflösung wurde auf 256 x 256 festgelegt und die Scan-Rate betrug 4 ms/px für 1,7 x 3,0 cm Fläche. Der Hintergrundwert wurde bestimmt, indem *post mortem* Messungen durchgeführt wurden und von jedem gemessenen Wert abgezogen wurden. Durch die Rechts-Links-Ratio wurde für jede Maus das Verhältnis der Durchblutung der okkludierten zur nicht okkludierten Seite bestimmt. Alle Ergebnisse wurden in Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

### 2.2.10 HÄMOGLOBIN-SAUERSTOFFSÄTTIGUNG

Der Messung der Hämoglobin-Sauerstoffsättigung liegt das Prinzip der Spektrophotometrie zugrunde<sup>138</sup>. Mit einem Spektrophotometer werden Konzentrationen von Stoffen durch die Überprüfung der Lichtdurchlässigkeit bei verschiedenen Wellenlängen ermittelt. Die Technik basiert auf den unterschiedlichen Intensitäten des angeregten und transmittierten Lichts. Das angeregte Licht wird von Linsen fokussiert und passiert dann einen Monochromator, der das Licht in einzelne Wellenlängen separiert. Nur eine spezielle Wellenlänge wird ausgewählt, welche die Probe passiert. Das transmittierte Licht wird durch einen Fotodetektor aufgenommen und in ein elektrisches Signal auf dem digitalen Bildschirm umgewandelt.

Hauptanwendungsbereiche der Spektrophotometrie sind:

- a) Bestimmung der Strahlungsabsorption durch eine Probe abhängig von der Wellenlänge (Absorptionsspektrum) zur qualitativen Identifizierung der Probe.
- b) Feststellung der Konzentration einer absorbierenden Probe mittels bekanntem Extinktionskoeffizienten oder Eichkurve.

## MATERIAL UND METHODEN

- c) Kinetische Messungen durch Bestimmung der zeitlichen Konzentrationsänderung einer absorbierenden Probe. Wenn eine Absorptionsänderung eines Reaktionsteilnehmers während der enzymatischen Reaktion stattfindet, kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch Verfolgung der zeitlichen Änderung der Absorption bestimmt werden <sup>2</sup>.

### 2.2.11 MESSUNG DER HÄMOGLOBIN SAUERSTOFFSÄTTIGUNG MIT SPEKTROPHOTOMETRIE

Die Hämoglobin Sauerstoffsättigung in den Mäusehinterläufen wurde mithilfe der Absorptions-Gewebe-Spektrometrie bestimmt (Absorption-Tissue-Spectrometry „AbTisSpec“, LEA Medizintechnik, Deutschland). Es handelt sich um ein Gewebephotometer zur nicht invasiven Bestimmung der Sauerstoffversorgung von durchbluteten Geweben. Es wird Weißlicht ausgesendet, das vom Hämoglobin abhängig von der Sauerstoffsättigung spektral verändert wird. Der optische Sensor detektiert dann das veränderte Farbspektrum und so den lokalen Wert der Sättigung des Hämoglobins. Zugleich wird die lokale Konzentration an Hämoglobin im untersuchten Gewebevolumen ermittelt.

AbTisSpec ist ein Zweikanalsystem für unterschiedliche Gewebetiefen. Mit Kanal eins werden die oberflächennahen Hämoglobinwerte ermittelt, Kanal zwei erfasst aufgrund seines größeren Messvolumens die Werte der Sauerstoffversorgung der tieferen Strukturen. In dieser Arbeit wurden Messungen aufgrund der verwendeten kleinen Nagetiere ausschließlich mit Kanal eins durchgeführt. Das Absorptionsspektrum wurde im Wellenlängenbereich von 500 bis 620 nm gemessen.

Die Mäuse wurden nach Anästhesie zunächst fünf Minuten in eine klimatisierte Kammer mit einer konstanten Temperatur von 37 °C platziert, um standardisierte Bedingungen zu erhalten. Der optische, zirkuläre Sensor wurde über den Pfoten der Tiere positioniert. Die Messungen wurden vor der Operation, unmittelbar nach der Operation und an den postoperativen Tagen 3, 7, 14 und 21 durchgeführt. Die Rechts-Links Ratio jeder Messung wurde berechnet. Die Ergebnisse wurden in Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SD) beschrieben.

## MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.12 AKTIVE FUßBEWEGUNG

Typischerweise zeigte sich bei den Mäusen nach der Ligatur der rechten A. femoralis eine beeinträchtigte Fußbewegung, entsprechend der verminderten Durchblutung in der rechten Pfote. Damit die aktive Fußbewegung („Active Foot Movement“) als objektiv-funktioneller Parameter bestimmt werden konnte, wurde zur Darstellung der funktionellen Erholung der unterbrochenen Blutzirkulation ein spezielles ordinales Punktesystem verwendet (Tabelle 3).

**Tabelle 3. Aktive Fußbewegung.** Punkteschema. Bewertet wird die Gliedmaße mit Femoralarterienokklusion.

<b>Punkte</b>	<b>Einteilung der aktiven Fußbewegung</b>
0	Keine Fußbewegung, Nekrose des Fußes oder der Zehen
1	Keine Belastung, passive Bewegung, Fuß wird gezogen
2	Leichte Belastung, aktive Bewegung, kein Spreizen der Zehen
3	Fast uneingeschränkte Belastung, Zehenspreizen eingeschränkt, Claudicatio
4	Uneingeschränkte Belastung und Bewegung

### 2.2.13 MESSUNG DER AKTIVEN FUßBEWEGUNG

Die Mäuse wurden randomisiert und verblindet einzeln in einen leeren Käfig gesetzt und zur Bewegung angehalten. Die Punktezahl null wurde an solche Tiere vergeben, die ihren rechten Hinterlauf gar nicht verwendeten. Die Mäuse in dieser Kategorie entwickelten häufig eine Nekrose. Im Fall einer fortschreitenden Nekrose wurde die entsprechende Maus mit einer Überdosis des Narkotikums getötet. Im Falle einer passiven Fußbewegung erhielten die Tiere einen Punkt auf der Skala. Auf dieser Ebene war die rechte hintere Gliedmaße an der eigentlichen Bewegung nicht aktiv beteiligt, sondern wurde nur gezogen. Mäuse, die ihre Zehen noch nicht spreizen konnten, aber ihren rechten Hinterlauf bereits wieder aktiv belasteten, wurden mit zwei Punkten bewertet. In die Kategorie drei wurden Tiere eingestuft, die ihre rechten Zehen mit Einschränkungen spreizen konnten und bei denen ein deutliches Hinken sichtbar war. Am oberen Ende der Skala bei vier Punkten befanden sich die Versuchstiere, die eine komplette Erholung der Fußbewegung zeigten. In diesem Fall war kein Unterschied mehr zwischen ligierter und unligierter Hinterlaufseite sichtbar.

## MATERIAL UND METHODEN

Es wurden am Operationstag einmal präoperativ Ausgangsmessungen der aktiven Fußbewegung durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine Unterschiede zwischen den rechten und linken Beinbewegungen einer Maus bestanden. Anschließend wurden die Punkte der aktiven Fußbewegung an den postoperativen Tagen 3, 7, 14 und 21 unmittelbar vor der Narkotisierung entsprechend der beschriebenen Ordinalskala zugeteilt. Die Ergebnisse wurden in Median  $\pm$  Standardabweichung notiert.

### 2.2.14 GEWEBEPERFUSION UND FIXATION

Zur morphologischen Beurteilung und Quantifizierung des Kollateralwachstums und der Kapillardichte wurden von 15 WT und 15 KO Tieren Gewebeproben entnommen und histologisch ausgewertet. Jeweils drei Wochen nach der Operation mit Ligatur der rechten A. femoralis fand die Durchführung der Gewebeentnahme statt. Hierzu wurde den Mäusen zunächst intraperitoneal 0,1 ml Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm) injiziert. Anschließend wurden die Tiere anästhesiert, indem sie eine Überdosis Ketamin und Xylazin (10 % Ketamin, 2 % Xylazin) in den Intraperitonealraum gespritzt bekamen. Die Mäuse wurden danach in Plastikschräbchen gelegt, die Gliedmaßen wurden gespreizt und fixiert. Nach Eröffnung des Brust- und Abdominalraums wurde der proximale Teil der Aorta aufgesucht und vom umliegenden Fettgewebe präpariert. Daraufhin wurde die Aorta descendens so proximal wie möglich inzisiert und eine zuvor an der Spitze abgeschnittene und dann stumpf präparierte Kanüle der Größe 21 G eingeführt. Unmittelbar danach erfolgte die Durchtrennung der V. cava inferior.

Die Gefäße wurden mithilfe von vorbereiteten Infusionsbestecken (die Membran wurde zunächst mehrfach durchstoßen) mit einer Dilatationslösung perfundiert, die 0,1 % Adenosin (Sigma) und 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA; Sigma) in Phosphat-gepufferten physiologischer Kochsalzlösung („Phosphate Buffered Saline“, PBS) enthielt (Tabelle 5). Der pH-Wert der Lösung betrug 7,4. Diese Dilatationslösung wurde für vier Minuten mit konstantem Druck von 100 cm H<sub>2</sub>O infundiert. Nach dem Erreichen der maximalen Vasodilatation, wurde die Infusion durch eine Lösung aus 3 % Paraformaldehyd (PFA; Sigma) in PBS (pH 7,4) ersetzt, die wiederum über 10 Minuten perfundiert wurde.

**MATERIAL UND METHODEN**

Die verwendete 3%-ige Paraformaldehyd (PFA)-Lösung wurde wie folgt hergestellt: (Tabelle 6): 30 g PFA Pulver wurden zu 1000 ml PBS hinzugefügt. Während des Verrührens wurden nach und nach zwei oder drei NaOH Kristalle der Lösung zugegeben, wodurch sich der pH-Wert langsam erhöhte. Nach dem vollständigen Auflösen des PFA-Pulvers wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

**Tabelle 4. PBS (Phosphate-Buffered Saline).**

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	1,44 g
Aqua destillata	1 L
Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH auf 7,4 eingestellt.	

**Tabelle 5. Dilatations-Puffer.**

Adenosin	1 g
BSA	5 g
PBS	1 L
Einstellung des pH-Werts mit HCl oder NaOH auf 7,4.	

**Tabelle 6. Paraformaldehyd (PFA) 3 %.**

PFA	30 g
PBS	1 L
Einstellung des pH-Werts mit HCl oder NaOH auf 7,4.	

## MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.15 GEWEBEPROBEN UND HISTOLOGIE

Zur Vorbereitung der Gewebeproben wurde die Haut an beiden Hinterläufen der zuvor gewebefixierten 30 Tiere entfernt. Anschließend wurden sowohl die Mm. adductorii als auch die Mm. gastrocnemii der ligierten und unligierten Seite entsprechend dem Gebiet der Kollateralarterien herausgeschnitten. Im Mm. adductorii erfolgte dies in dreiecksartiger Form, wobei die Basis des Dreiecks hierbei proximal der A. femoralis profunda lag. Die andere Seite befand sich lateral der A. femoralis in Richtung Knie und die dritte Seite des Dreiecks war die Verbindung des Knies mit der medialen Seite der A. femoralis profunda. Die Mm. gastrocnemii hingegen wurden komplett von der Achillessehne bis zum Caput laterale und Caput mediale entfernt.

Die Muskeln wurden nach der Entnahme in ein Zentrifugalmörserchen gelegt, das zuvor mit PBS gefüllt worden war. Nach 20 Minuten wurde PBS durch 10%-ige Saccharose-Lösung in PBS ersetzt und die Proben wurden 30 Minuten bei 4 °C ruhen gelassen. In dieser hyperosmolaren Lösung dehydrierten die Muskeln und sedimentierten zum Grund des Mörserchens. Anschließend wurde die Lösung mit einer 25%-igen Saccharose-Lösung in PBS getauscht. In dieser Lösung wurden die Muskeln für fünf Stunden bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurden die Muskelproben aus der Lösung genommen und aufrecht auf Korkplättchen platziert. Die gesamte Muskelmasse wurde mit „Tissue Tec“ (OTC Compound, Miles Inc., USA) überzogen und sofort in -150 °C kaltem Methylbutan gefroren. Im Anschluss daran wurden die Proben kurz in flüssigem Stickstoff (-180 °C) konserviert und bei einer Temperatur von -80 °C verwahrt.

### 2.2.16 VORBEREITUNG GEWEBESCHNITTE

Für die morphometrische Analyse wurden schließlich die Mm. adductorii und Mm. gastrocnemii aller Tiere aufgeblickt und mit einem Gefriermikrotom (Kryostat CM 300 Leica, Deutschland) geschnitten. Die 6 µm dicken Schnitte wurden auf Glasobjektträger aufgenommen.

### 2.2.17 HÄMATOXYLIN-EOSIN FÄRBUNG

Um vor der Immunhistochemie zunächst die Gewebeerhaltung und –beschaffenheit beurteilen zu können, wurde von den Gewebeproben eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung angefertigt (Tabelle 7). So wurden die Zellkerne der Präparate vom basischen Hämalaunblau angefärbt, alle anderen Strukturen wiederum erscheinen in unterschiedlichen Rotabstufungen.

**Tabelle 7. Färbeprotokoll. Hämatoxylin-Eosin Färbung.**

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

Anschließend wurden von jedem *M. gastrocnemius* neun Schnitte angefertigt, jeweils drei vom oberen, drei vom mittleren und drei vom unteren Drittel. Von jedem *M. adductor* wurden je zwei Schnitte aus dem oberen, mittleren und unteren Drittel genommen, in der Summe also sechs Schnitte pro Seite. Insgesamt wurden demnach pro Maus jeweils zwölf Schnitte der Adduktoren und 18 Schnitte der *Gastrocnemii* hergestellt. Die Zwischenräume zwischen den jeweiligen Schnittschichten waren bei allen Proben identisch. Nach dem Schneiden wurden die Gefrierschnitte kurz an der Luft getrocknet und dann in PBS gestellt.

### 2.2.18 IMMUNHISTOCHEMIE

Die unspezifischen Antikörper-Bindungen der Adduktoren wurden mit einer Mischung aus 0,4 % Glyzin und 0,2 % BSA geblockt (Tabelle 8), die für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben wurde. Dann wurden die glatten Muskelzellen gleichmäßig mit einem fluoreszierenden 5-Isothiocyanat (FITC)-konjugierten, monoklonalen Antikörper (AK) gegen „alpha-smooth-muscle-actin“ (sigma F3777) in der Verdünnung 1:500 angefärbt. Die Inkubationszeit der Schnitte betrug eine Stunde. Hinterher wurde der AK-Überschuss auf den Schnitten dreimal für fünf Minuten mit PBS abgewaschen.

## MATERIAL UND METHODEN

Das weitere Färbeprotokoll war für die Gewebsschnitte aus den Mm. gastrconemii und Mm. adductorii identisch:

Um die Endothelzellen anzufärben, wurden alle Muskel nun mit Tetramethylrhodamine Isothiocyanate (TRITC)- BS-1 Lectin (Sigma L5264) in einer Verdünnung von 1:30 in PBS angefärbt und die Schnitte für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Lectinüberschuss wieder dreimal für fünf Minuten in PBS abgewaschen. Danach wurden die Zellkerne mit 4', 6'-Diamidino-2-Phenyl-Indol (DAPI) (Molecular Probes D-3571) in einer Verdünnung von 1:1000 bei Raumtemperatur 10 Minuten gefärbt. Um den DAPI-Überschuss zu entfernen, wurden die Objektträger wieder dreimal fünf Minuten in PBS gewaschen. Abschließend wurde alle Schnitte mit Mowiol eingedeckelt. Nach dem Trocknen wurden die Objektträger bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt.

**Tabelle 8. Blocking Solution. Immunhistochemie.**

Glycin	0,4 g
BSA	0,2 g
PBS	100 ml

### 2.2.19 QUANTIFIZIERUNGEN DER KOLLATERALARTERIEN

Alle Adduktorenschnitte wurden mithilfe eines „DM-RB Leica Mikroskops“ (Deutschland) und einer „Leica DMLD Digital Kamera“ mit einer 40-fachen Vergrößerung fotografiert. Große Arterien wie die A. femoralis und die A. profunda femoris wurden nicht berücksichtigt. Durch die Computer gestützte Planimetrie Software „Image J“ wurde der Perimeter und der äußere und innere Durchmesser der Gefäße sowie die arterielle Gefäßfläche bestimmt.

Die Gefäßfläche von allen Arterien pro Muskel wurde gezählt um die Summe zu erhalten und den Mittelwert zu errechnen. Die Summe reflektiert eine Zunahme der Kollateralarterien, die nach der Ligatur gewachsen sind, und der Mittelwert beschreibt eine Vergrößerung der Gefäßperimeter. Die Umrechnung der 40-fachen Vergrößerung des Objektivs erfolgte in  $\mu\text{m}$  mithilfe der Pixel-Mikrometer-Ratio nach der folgenden Tabelle:

**Tabelle 9. Pixel-Mikrometer-Ratio.** DM-RB Mikroskop Leica.

<b>Objektiv</b>	<b>Pixel</b>	<b>Mikrometer <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>Pixel-Mikro-Ratio</b>
x40	619	100	6,19

Zusätzlich zur Summe und zum Mittelwert jeder Maus wurde auch die Rechts-Links-Ratio (R/L) berechnet, um das stattgehabte Kollateralwachstum zwischen Kontroll- und KO Mäusen zu vergleichen. Die Ergebnisse wurden in Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben (MW  $\pm$  SW).

### **2.2.20 KAPILLARZÄHLUNG**

Alle Gastrocnemii-Schnitte wurden ebenfalls mithilfe eines „DMRB Leica Mikroskops“ (Deutschland) und einer „Leica DM-LD Digital Kamera“ unter fluoreszierendem Licht aber mit einer geringeren Vergrößerung (25-fach) fotografiert. Von jedem Schnitt wurden drei willkürliche ausgewählte Aufnahmen angefertigt, dies entsprach pro Muskel 27 Bildern. Anschließend wurde die Anzahl der Kapillaren pro Muskelzelle bestimmt. Auch hier wurden wieder für jedes Tier die Summe und der Mittelwert berechnet. Schließlich wurde auch wieder die R/L-Ratio des Mittelwertes für jede experimentelle Tiergruppe kalkuliert, damit die Anzahl der Kapillaren pro Muskelzelle zwischen Kontroll-Mäusen und KO Tieren verglichen werden konnte. Die Ergebnisse wurden ebenfalls in Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung notiert.

### **2.2.21 ANGIOGRAPHISCHE DARSTELLUNG**

Um das Kollateralwachstum zu visualisieren, wurden anstelle einer Gewebsfixation bei jeweils drei WT und drei KO Mäusen vier Wochen nach Femoralarterienligatur *post mortem* Angiographien erstellt.

## MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.22 PRÄPARATION DES KONTRASTMITTELS

Zu 100 g Wismut Chlorid (Merck) wurde 800 ml 18%-ige NaCl-Lösung (Tabelle 10) zugefügt. Anschließend wurden während des Mixens 32 % HCl tropfenweise dazugegeben, bis das Wismut Chlorid sich vollständig auflöste. Dann wurde die Lösung durch ein Sieb filtriert. Ein 5 Liter (L)-fassender Becher wurden mit kaltem Wasser gefüllt. Daraufhin wurde der Becher auf dem Mixer platziert und 250 ml der Lösung in den Becher getropft. Das Element Wismut setzte sich innerhalb von 40 Minuten am Boden ab. Der Überstand wurde entfernt und das Wismut-Sediment wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Vor der Verwendung des Kontrastmittels wurde eine 10%-ige Gelatine-Lösung (Tabelle 11) in destilliertem Wasser mit 0,01 % Natriumazid vorbereitet. Die Wismut-Lösung wurde mit der gleichen Menge Gelatine vermischt und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Benutzung inkubiert. Unmittelbar vor der Perfusion wurde das Kontrastmittel dann mit destilliertem Wasser um 10 % verdünnt. Zusätzlich wurde das Kontrastmittel noch mit Bromphenolblau in einem hellblauen Farbton angefärbt, um einen guten Kontrast zum Muskelgewebe zu erhalten.

**Tabelle 10. Verwendete Lösungen. 18 % NaCl.**

NaCl	180 g
Aqua destillata	1000 ml

**Tabelle 11. Verwendete Lösungen. 10 % Gelatine.**

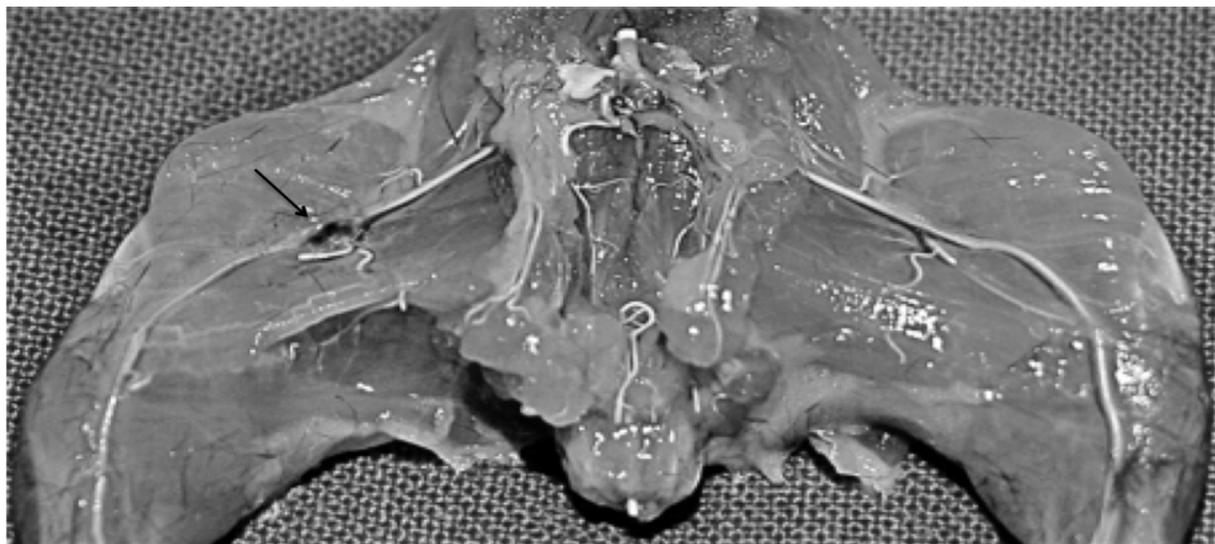
Gelatine	5 g
Aqua destillata	50 ml

## MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.23 INJEKTION DES KONTRASTMITTELS

Den Tieren wurde für die Herstellung der Angiogramme zunächst intraperitoneal eine Überdosis des Narkotikums aus Ketamin und Xylazin (10 % Ketamin, 2 % Xylazin) injiziert. Anschließend wurde den zuvor anästhesierten Mäusen 0,1 ml Heparin gespritzt (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm). Die abdominelle Aorta wurde daraufhin möglichst proximal cannuliert. In einer Spritze mit angeschlossener 21 G Butterfly-Kanüle wurde zunächst im Verhältnis 1:1 luftblasenfrei ein 0,9 % NaCl- und 25000 I.E. Heparin-Gemisch aufgezogen. Nach Eröffnen der V. cava inferior wurde anschließend das zuvor auf 38 °C angewärmte hellblaue Kontrastmittel mit konstantem Druck per Hand luftblasenfrei über die Aorta descendens in die Hintergliedmaßen infundiert (Abbildung 1).

Um die vorzeitige Aushärtung des Wismut-basierten Kontrastmittels und eine Vasokonstriktion infolge von Auskühlung zu vermeiden, wurden die Tiere während der Perfusion in ein Wasserbad mit 38 °C untergetaucht. Sobald eine Füllung der Beinarterien bis zum Knöchel erreicht war, wurden die Tiere zum Aushärten des Kontrastmittels für 20 Minuten mit Eis bedeckt. Danach wurde von den Muskeln der Hintergliedmaßen die Haut abpräpariert. Anschließend wurden die Abdominalorgane entfernt und der obere Teil des Körpers sowie der Schwanz abgetrennt.



**Abbildung 1. Kontrastmittel in den Hinterläufen der Aa. femoralis links und rechts einer  $Abra^{-/-}$  Maus. Pfeil: Ligatur rechte A. femoralis.**

## MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.24 BELICHTUNG UND ENTWICKLUNG DER ANGIOGRAPHIEN

Die Mäuse wurden schließlich in einem eigens zu diesem Zweck gebauten Fixationskasten aus Plexiglas platziert, der zuvor mit kaltem Wasser gefüllt worden war. Um optimale Kontraste zu erzielen, mussten die Tiere vollständig mit Wasser bedeckt sein. Der unter dem Kasten positionierte Röntgenfilm (Strukturix Fa. Agfa) wurde im „Balteau“-Röntgengerät bei 30/20 kV Spannung und 13/8 mA für 105/120 Sekunden (sec) belichtet.

In der Dunkelkammer wurden die belichteten Röntgenfilme für sechs Minuten durch Immersion in einem Kodak LX 24 Entwickler entwickelt. Nach dem Waschen des Filmes wurden sie wiederum für sechs Minuten in Agefix fixiert. Nach einem Wasserbad wurden die Filme in destilliertes Wasser getaucht und anschließend über Nacht getrocknet.

Zur Analyse wurden die Angiographien schließlich mit zweifacher Vergrößerung (200 %) gescannt (Epson Perfection 4990 Photo) und digitalisiert.

### 2.2.25 STATISTISCHE ANALYSE

Alle erhobenen Daten wurden mithilfe des Programms SPSS 19.0 (IBM) ausgewertet und mithilfe Microsoft Excel 2008 (Microsoft Corporation) grafisch präsentiert. Die Werte der experimentellen Gruppen wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM („Standard error of the mean“) dargestellt. Die statistische Verteilungswahrscheinlichkeit wurde mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test beziehungsweise dem Chi-Quadrat-Test bestimmt. Bei den gepaarten Stichproben wurde schließlich der Student t-Test oder der Chi-Quadrat-Test berechnet. Ein Wert mit der Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet.

## 3 ERGEBNISSE

Arteriogenese ist definiert als Formationsprozess neuer Arterien aus präexistierenden Kollateralarteriolen. Die Entwicklung dieser arterioarteriolen Anastomosen außerhalb ischämischer Regionen zu funktionellen Gefäßen kann die Funktion größerer Gefäße komplett ersetzen und ist so für die Blutversorgung des von Gefäßverschluss betroffenen Gewebes essentiell <sup>71</sup>.

Das in die Arteriogenesevorgänge involvierte muskelspezifische Abra bindet Aktin und kann SRF-abhängige Transkription durch einen RhoA- und Aktinpolymerisations-Mechanismus stimulieren <sup>112</sup>. Mit einem „Knockdown“ endogenen Abras in der Schubspannung-induzierten Arteriogenese konnte bereits gezeigt werden, dass Abra eine zentrale Bedeutung im arteriogenen Signalweg einnimmt. Eine Abra Überexpression führt zur Proliferation glatter Muskelzellen, stimuliert Arteriogenese und kann Schubspannung teilweise ersetzen <sup>116</sup>. Das Abra Expressionsprofil und die Abhängigkeit der Arteriogenese vom Rho-Signalweg lassen vermuten, dass Abra Kollateralremodeling anstößt. Folglich liegt die Hypothese nahe, dass die Arteriogenesevorgänge ohne Abra gehemmt ablaufen.

Die spezifische Inaktivierung von Genen bei KO Tieren ist ein etabliertes experimentelles Modell und ermöglicht, die wahrscheinliche Funktion des Abra Gens *in vivo* während der Arteriogenese genauer zu erforschen. Um die Konsequenzen des vermuteten arteriogenen Funktionsverlustes zu untersuchen, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit die arteriogene Antwort nach Ligatur der A. femoralis bei gendefizienten Abra<sup>-/-</sup> Mäusen charakterisiert.

### 3.1 CHARAKTERISIERUNG DER ABRA<sup>-/-</sup> MÄUSE

Die Abra<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten im direkten Vergleich zu den WT Mäusen einen unauffälligen Phänotyp. Der Ernährungszustand, die Körpergröße und das Gewicht wiesen im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Unterschiede auf. Die Gewichtsentwicklung differierte zwischen den experimentellen Gruppen nicht, wie in Tabelle 12 und Abbildung 2 ersichtlich ist. Das Verhalten der KO und WT Tiere war unauffällig. Die Ergebnisse der präoperativen Untersuchungen (Laser Doppler Imaging, Hämoglobin Sauerstoffsättigung, aktive Fußbewegung) ergaben keine Auffälligkeiten bei der Gefäßentwicklung oder Durchblutungssituation im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe unten).

**Tabelle 12. Entwicklung des Körpergewichts.** Überblick Gewicht in den experimentellen Gruppen während des Versuchszeitraumes.

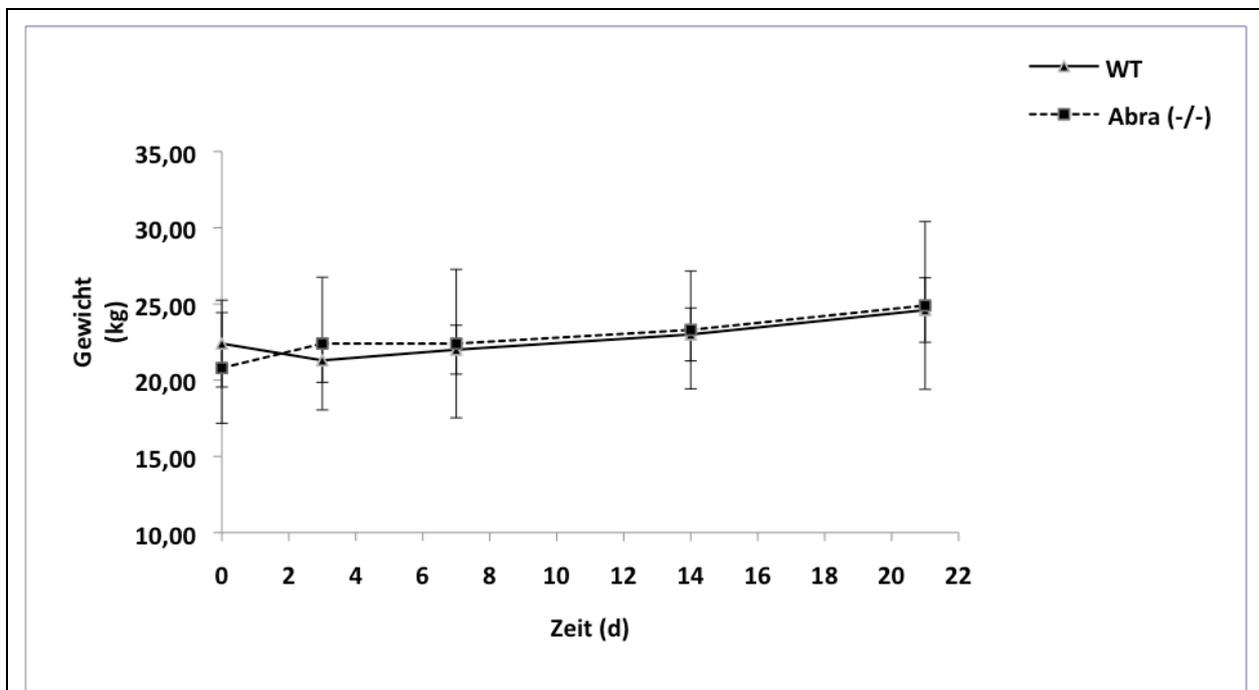
Gruppe	Prä OP	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	n
WT	22,4 ± 2,85	21,3 ± 1,44	22,0 ± 1,60	23,0 ± 1,74	24,6 ± 2,12	15 (12* <sup>*</sup> **)
	20,8 ± 3,63	22,4 ± 4,35	22,4 ± 4,87	23,3 ± 3,86	24,9 ± 5,50	
Abra	20,8 ± 3,63	22,4 ± 4,35	22,4 ± 4,87	23,3 ± 3,86	24,9 ± 5,50	15 (12*** <sup>***</sup> )
	0,34	0,38	0,77	0,81	0,87	
t-test	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

n: Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen

\* 1 Tier wurde ab Tag 14 wegen Nekrose nicht weiter berücksichtigt

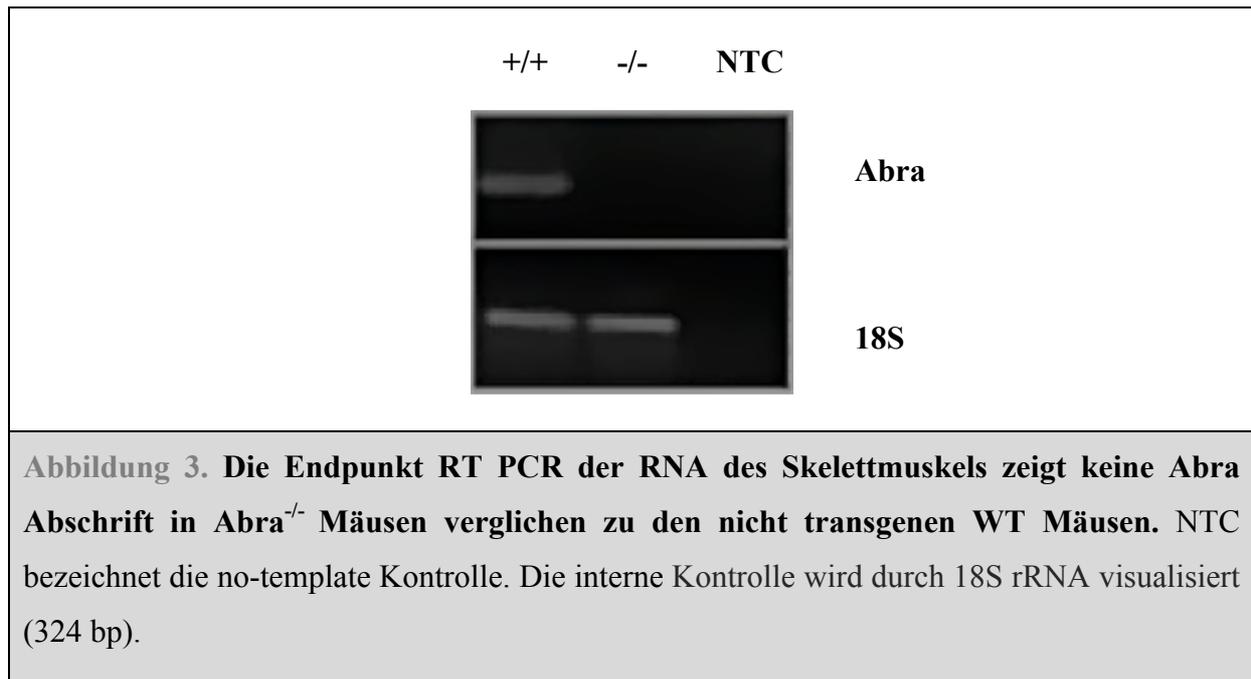
\*\* 2 Tiere starben während des Experiments

\*\*\* je 1 Tier wurde ab Tag 7, 14 und 21 wegen Nekrose nicht weiter berücksichtigt



**Abbildung 2. Entwicklung des Körpergewichts.** Vergleich Abra<sup>-/-</sup> und WT Mäuse während des Versuchszeitraumes. (Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben).

Zur Validierung des Tiermodells wurde zunächst eine Genotypisierung mittels DNA Analyse der Tailcuts angefertigt. Das Ergebnis der PCR bestätigte bei KO Tieren eine Abra Deletion. Außerdem wurde die gezielte Abra Deletion durch das Fehlen von Abra mRNA in homozygoten mutanten Skelettmuskeln mithilfe RT PCR nachgewiesen. Bei der RT PCR konnte bei KO Tieren die Abra Zielsequenz nicht nachgewiesen werden. Bei WT Mäusen hingegen war die Abra Sequenz erhalten (Abbildung 3).



### 3.2 QUANTIFIZIERUNG DER ARTERIOGENESE NACH LIGATUR DER A. FEMORALIS

Um die funktionellen Konsequenzen des Abra Knockouts auf Arteriogenese zu quantifizieren, wurden während des Versuchszeitraums verschiedene Parameter bestimmt: Messung des Laser Doppler Imaging, der Hämoglobin Sauerstoffsättigung und der aktiven Fußbewegung.

#### 3.2.1 ERGEBNISSE DES LASER DOPPLER IMAGING

Die Quantifizierung der Gewebepfusion in den distalen Hinterläufen der Abra<sup>-/-</sup> Mäuse und der WT Tiere mit ligierter A. femoralis erfolgte durch die Messung der Durchblutung mittels Laser Doppler Imaging. Auf diesem Wege wurde eine verminderte Arteriogenese in Abra<sup>-/-</sup> Mäusen demonstriert.

Die präoperativen Messungen wurden unmittelbar vor der Femoralarterienligatur durchgeführt und die postoperativen Messungen unmittelbar nach der Operation. Es konnte kein Unterschied in prä- und postoperativen Messungen zwischen Kontroll- und KO Mäusen festgestellt werden. Es zeigte sich unmittelbar nach der Okklusion in beiden Gruppen, Abra<sup>-/-</sup> (n = 15) und WT Mäusen (n = 15) mit CL57BL/6 Hintergrund, eine gleichartige Verminderung der Rechts/Links Ratio [1,01 ± 0,02 zu 0,08 ± 0,009 (Abra<sup>-/-</sup>) versus 1,01 ± 0,017 zu 0,08 ± 0,009 (WT)] (Tabelle 13).

**Tabelle 13. Laser Doppler Imaging.** Überblick über prä- und post- Laser Doppler Imaging Messungen in den experimentellen Gruppen.

Gruppe	Prä LDI	Post LDI	n
WT	1,01 ± 0,017	0,08 ± 0,009	15 (12* **)
Abra <sup>-/-</sup>	1,01 ± 0,02	0,08 ± 0,009	15 (12***)

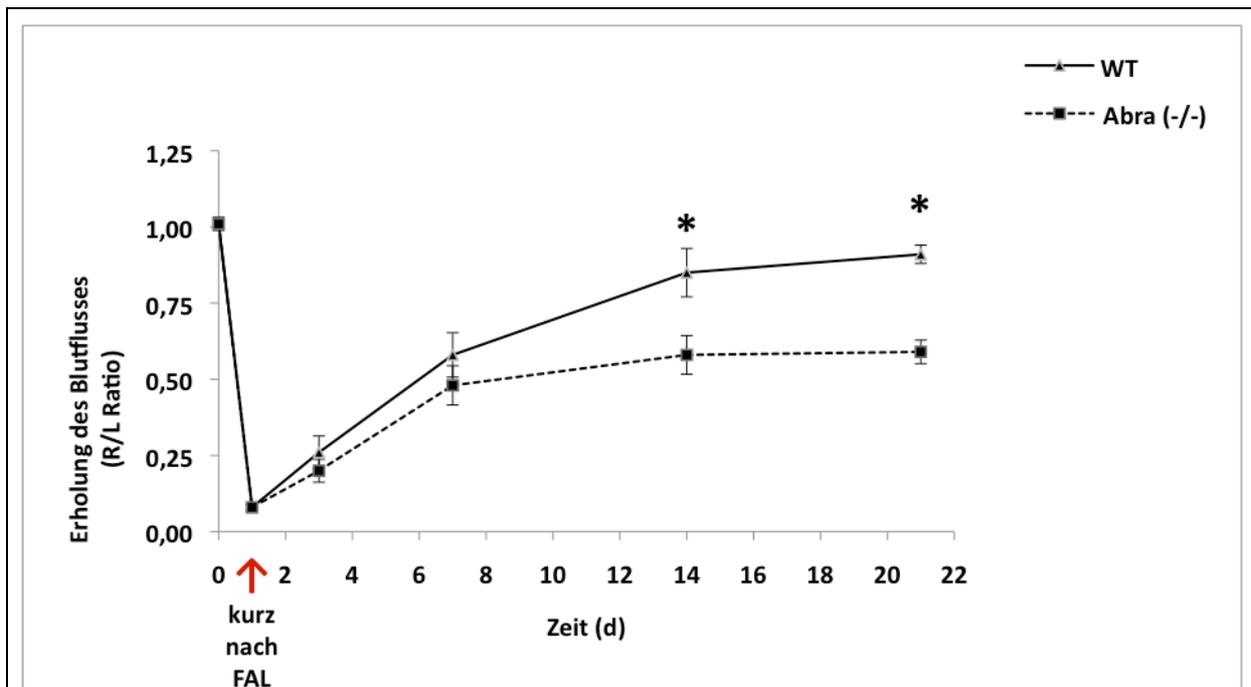
n: Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen

\* 1 Tier wurde ab Tag 14 wegen Nekrose nicht weiter berücksichtigt

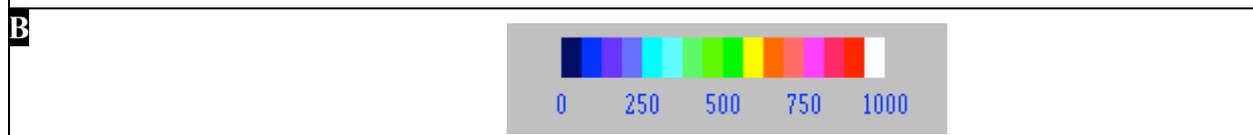
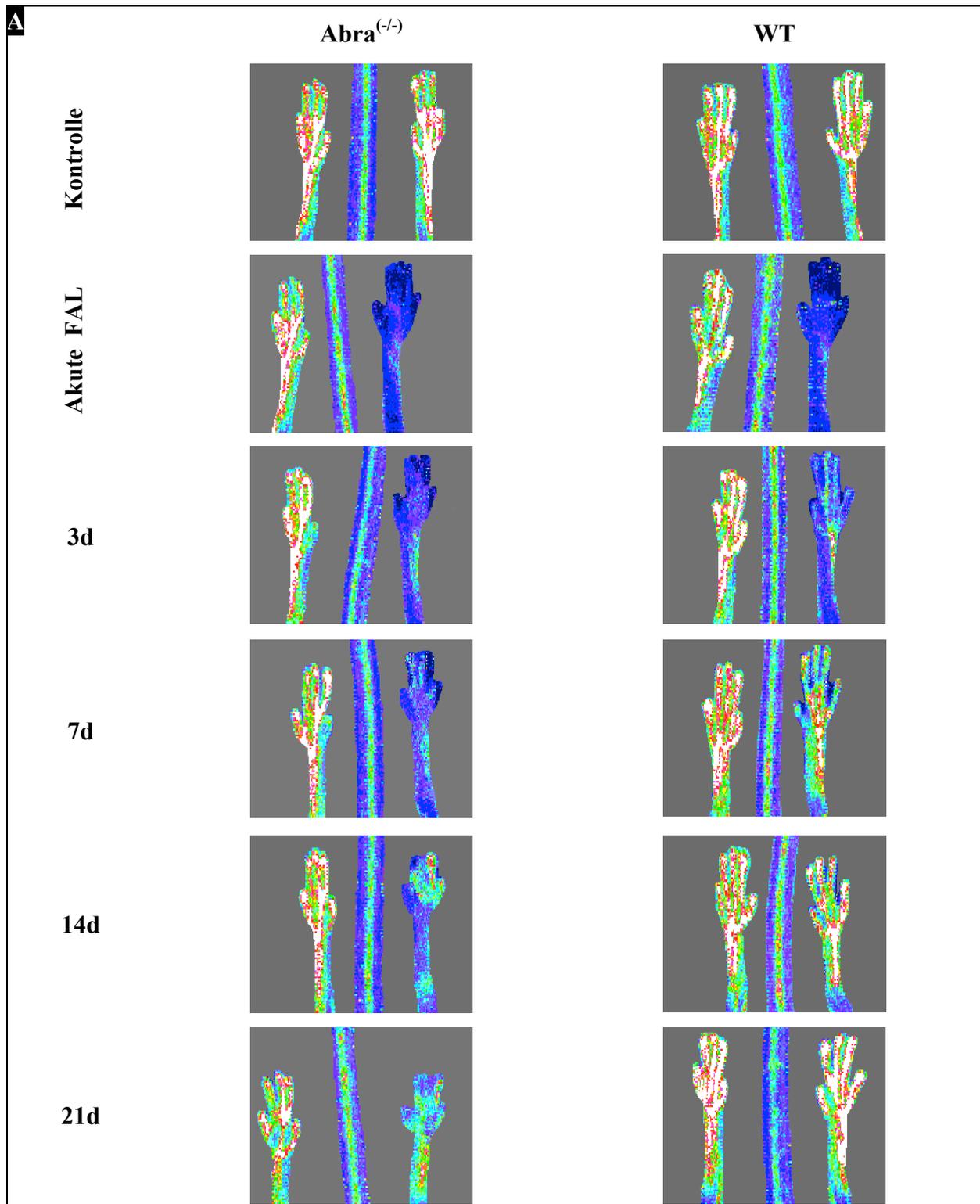
\*\* 2 Tiere starben während des Experiments

\*\*\* je 1 Tier wurde ab Tag 7, 14 und 21 wegen Nekrose nicht weiter berücksichtigt

Ab dem dritten postoperativen Tag wurde eine kontinuierliche Erholung der Durchblutung bis zu 91 % während des gesamten Beobachtungszeitraumes von drei Wochen in den Kontrolltieren beobachtet, wohingegen sich die Durchblutung in  $Abra^{-/-}$  Mäuse nach 14 Tagen nicht weiter als 59 % verbesserte (Abbildung 4). Ein signifikanter Unterschied zwischen  $Abra^{-/-}$  und WT wurde dementsprechend an Tag 14 [ $0,58 \pm 0,06$  ( $Abra^{-/-}$ ) versus  $0,85 \pm 0,08$  (WT)] und die maximale Differenz an Tag 21 [ $0,59 \pm 0,04$  ( $Abra^{-/-}$ ) versus  $0,91 \pm 0,07$  (WT)] gemessen. Repräsentative farbkodierte Bilder des Laser Doppler Imaging der Mäusehinterläufe beider Versuchsgruppen zeigt Abbildung 5.



**Abbildung 4. Erholung der Durchblutung nach Femoralarterienligatur (FAL).** Verminderte Erholung der Durchblutung in der rechten ligierten A. femoralis in den  $Abra^{-/-}$  Mäusen, ausgedrückt als Laser Doppler Perfusion Rechts zu Links Ratio (Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, \* $p \leq 0,05$  versus WT).



**Abbildung 5. Laser Doppler Imaging.** Repräsentative farbkodierte Bilder des Laser Doppler Imaging der Mäusehinterläufe. Femoralarterienligatur am rechten Hinterlauf [Abbildung A]. Farbkodierung des Laser Doppler Imaging [Abbildung B].

**3.2.2 ERGEBNISSE DER HÄMOGLOBIN SAUERSTOFFSÄTTIGUNG**

Die Hämoglobin Sauerstoffsättigung der hinteren Tierpfoten wurde bei den anästhesierten Mäusen unmittelbar vor und nach der Femoralarterienligatur an äquivalenten Positionen am operierten sowie nicht operierten Hinterlauf gemessen. Es konnten bei den präoperativen Messungen keinerlei Unterschiede zwischen Kontroll- und KO Gruppe festgestellt werden. Postoperativ wurde ein ähnlicher Abfall der Sauerstoffsättigung auf der verschlossenen Seite sowohl in *Abra<sup>-/-</sup>* als auch in WT Mäusen beobachtet [ $1,06 \pm 0,06$  zu  $0,12 \pm 0,05$  (*Abra<sup>-/-</sup>*) versus  $1,01 \pm 0,02$  zu  $0,09 \pm 0,008$  (WT)] (Tabelle 14).0

**Tabelle 14. Hämoglobin Sauerstoffsättigung.** Überblick über prä- und postoperative-O<sub>2</sub> Messungen in den experimentellen Gruppen.

Gruppe	Prä O <sub>2</sub>	Post O <sub>2</sub>	n
WT	$1,01 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,008$	15 (12* **)
<i>Abra<sup>-/-</sup></i>	$1,06 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,05$	15 (12***)

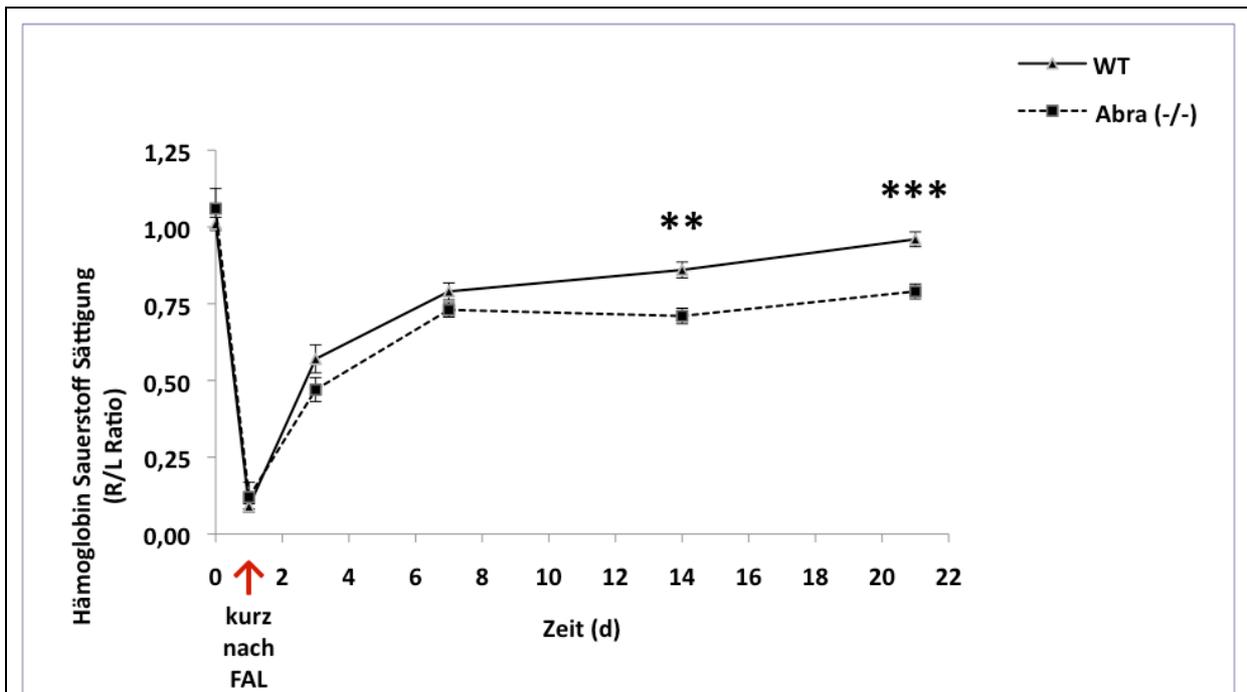
n: Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen

\* 1 Tier wurde ab Tag 14 wegen Nekrose nicht weiter berücksichtigt

\*\* 2 Tiere starben während des Experiments

\*\*\* je 1 Tier wurde ab Tag 7, 14 und 21 wegen Nekrose nicht weiter berücksichtigt

Ab dem dritten postoperativen Tag wurde eine stärkere Erholung der Sauerstoffsättigung in den WT Tieren im Vergleich zur *Abra<sup>-/-</sup>* Gruppe erkennbar, eine fast vollständige Erholung (96 %) der Kontrollgruppe wurde am Ende des Beobachtungszeitraumes von drei Wochen gemessen. Im gleichen Zeitraum erreichten die *Abra<sup>-/-</sup>* Mäuse nicht mehr als 79 % der präoperativen Werte. Die gemessene Oxygen-Differenz war beginnend ab dem 14. Tag [ $0,71 \pm 0,03$  (*Abra<sup>-/-</sup>*) versus  $0,86 \pm 0,03$  (WT)] signifikant und erreichte ihr Maximum nach 21 Tagen [ $0,79 \pm 0,02$  (*Abra<sup>-/-</sup>*) versus  $0,96 \pm 0,03$  (WT)], wie in Abbildung 6 gezeigt wird.



**Abbildung 6. Hämoglobin Sauerstoffsättigung nach Femoralarterienligatur.** Verzögerte Erholung der Hämoglobin Sauerstoffsättigung im rechten Hinterlauf der *Abra*<sup>-/-</sup> Mäuse, dargestellt als Hämoglobin Sauerstoffsättigung Rechts/Links Ratio (Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, \* $p \leq 0,05$  versus WT).

### 3.2.3 ERGEBNISSE DER AKTIVEN FUßBEWEGUNG

Die aktive Fußbewegung wurde unmittelbar vor der Operation und an den postoperativen Tagen 3, 7, 14 und 21 gemessen. Präoperativ hatten alle Mäuse beidseitig eine 100%-ige Fußbewegung und es konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden [ $4,00 \pm 0,00$  (*Abra*<sup>-/-</sup>) versus  $4,00 \pm 0,00$  (WT)].

Die *Abra*<sup>-/-</sup> Mäuse erholten sich insgesamt deutlich langsamer als die Kontrollgruppe. Die geringsten Unterschiede in der Aktiven Fußbewegung zwischen den Versuchstieren wurden an Tag drei gemessen [ $2,0 \pm 0,14$  (*Abra*<sup>-/-</sup>) versus  $2,4 \pm 0,19$  (WT)]. An Tag sieben wurde eine vergrößerte Differenz zwischen Kontroll- und KO Gruppe beobachtet, die jedoch noch nicht signifikant war. Signifikante Unterschiede wurden schließlich an den Tagen 14 und 21 beobachtet, wie in Tabelle 15 und Abbildung 7 zu sehen ist:

**Tabelle 15. Überblick aktive Fußbewegung.** Messungen in den experimentellen Gruppen.

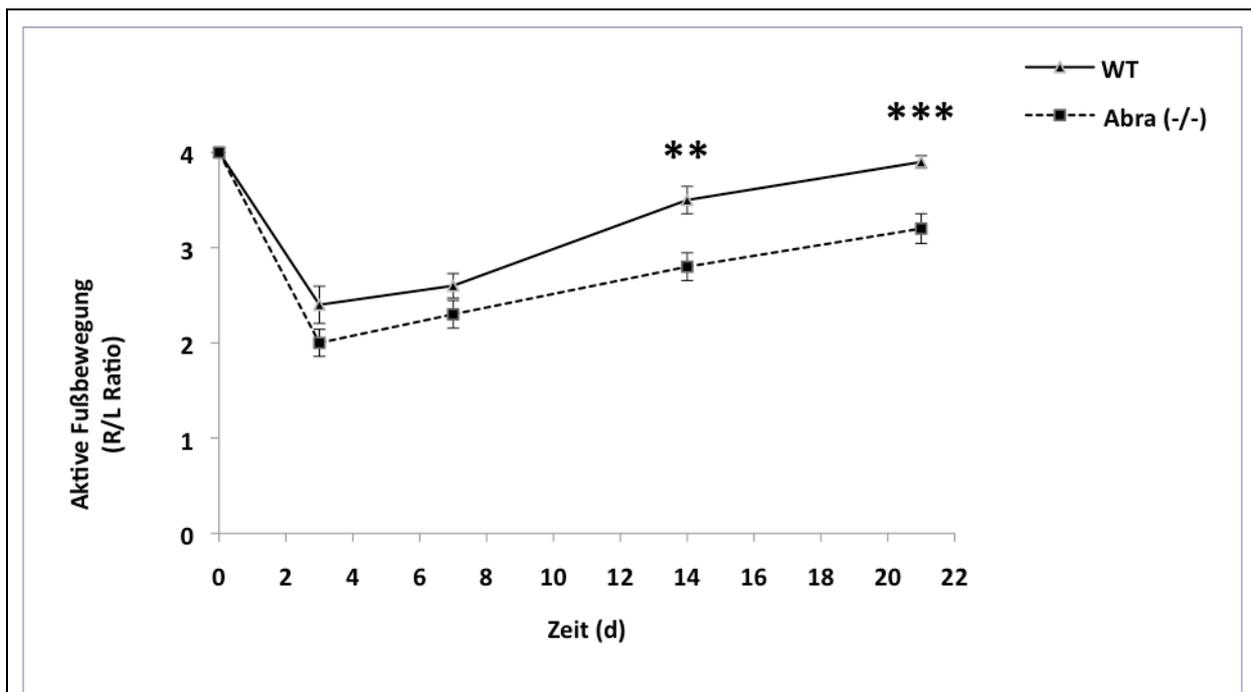
Gruppe	Prä OP	Tag 3	Tag 7	Tag 14	Tag 21	n
WT	4,0 ± 0,0	2,4 ± 0,19	2,6 ± 0,13	3,5 ± 0,14	3,9 ± 0,07	15 (12* **)
Abra <sup>-/-</sup>	4,0 ± 0,0	2,0 ± 0,14	2,3 ± 0,15	2,8 ± 0,15	3,2 ± 0,16	15 (12***)
χ <sup>2</sup> -Test	1,00	0,1119	0,1040	0,0027	0,0007	
	n.s.	n.s.	n.s.	p ≤ 0,01	p ≤ 0,01	

n: Anzahl der Tiere in den Versuchsgruppen

\* 1 Tier wurde ab Tag 14 wegen Nekrose nicht weiter berücksichtigt

\*\* 2 Tiere starben während des Experiments

\*\*\* je 1 Tier wurde ab Tag 7, 14 und 21 wegen Nekrose nicht weiter berücksichtigt



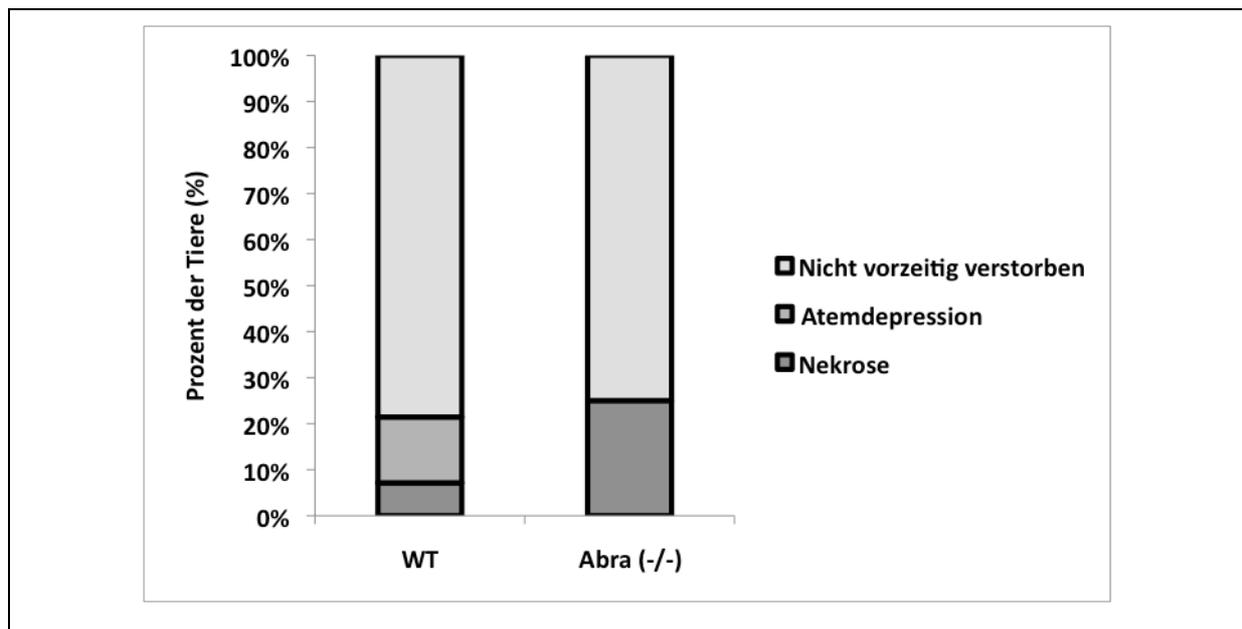
**Abbildung 7. Aktive Fußbewegung.** Die Messungen wurden präoperativ und an den postoperativen Tagen 3, 7, 14 und 21 nach der Ligatur der A. femoralis durchgeführt (n ≥ 24; Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001 versus WT).

### 3.2.4 NEKROSEENTWICKLUNG

An den postoperativen Tagen 7, 14 und 21 entwickelten insgesamt drei Tiere der  $Abra^{-/-}$  Gruppe am rechten Hinterlauf nekrotische Veränderungen und wurden bei der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. Bei zwei weiteren  $Abra^{-/-}$  Mäusen wurden beginnende klinische Zeichen einer Nekrose beobachtet. In der Kontrollgruppe fand sich nur bei einem Tier eine Nekrose am operierten Hinterlauf. Aus diesem Grund lässt sich auf eine bessere Blutversorgung in den WT Tieren schließen. Die nekrotischen Veränderungen der  $Abra^{-/-}$  Gruppe resultieren wahrscheinlich aus einem insuffizienten Kollateralwachstum und der daraus folgenden unzureichenden Durchblutung des operierten Hinterlaufes.

Zwei WT Mäuse verstarben im Laufe des Experiments an anästhesiologischen Komplikationen während der Narkoseeinleitung. Am ehesten handelte es sich um eine Xylazin-induzierte Atemdepression (siehe unten) <sup>139, 140</sup>.

Die Zusammenfassung der aufgetretenen Nekrose- und Narkosekomplikationen in den experimentellen Gruppen findet sich in Abbildung 8.



**Abbildung 8. Nekrose- und Narkosekomplikationen in den experimentellen Gruppen.**

Prozentuale Nekroseentstehung und narkoseinduzierte Atemdepression während des gesamten Versuchszeitraums. Nekrose des rechten Hinterlaufs bei einem Tier der WT Gruppe am 14. postoperativen Tag sowie bei je einem Tier der KO Gruppe an den postoperativen Tagen 7, 14 und 21. Atemdepression bei der Narkoseeinleitung bei je zwei Tieren der WT Gruppe. Jede Gruppe beinhaltete insgesamt 15 Mäuse.

### 3.3 POST MORTEM UNTERSUCHUNGEN

Zur Untersuchung, ob die verschlechterte Perfusion auf eine gestörte Arterio- oder Angiogenese zurückzuführen ist, wurden *post mortem* immunhistochemische Färbungen durchgeführt und die Morphometrie der Kollateralarterien sowie die Kapillardichte gemessen. Abschließend wurden noch Angiographien der Mäusehinterläufe angefertigt.

#### 3.3.1 IMMUNFÄRBUNG

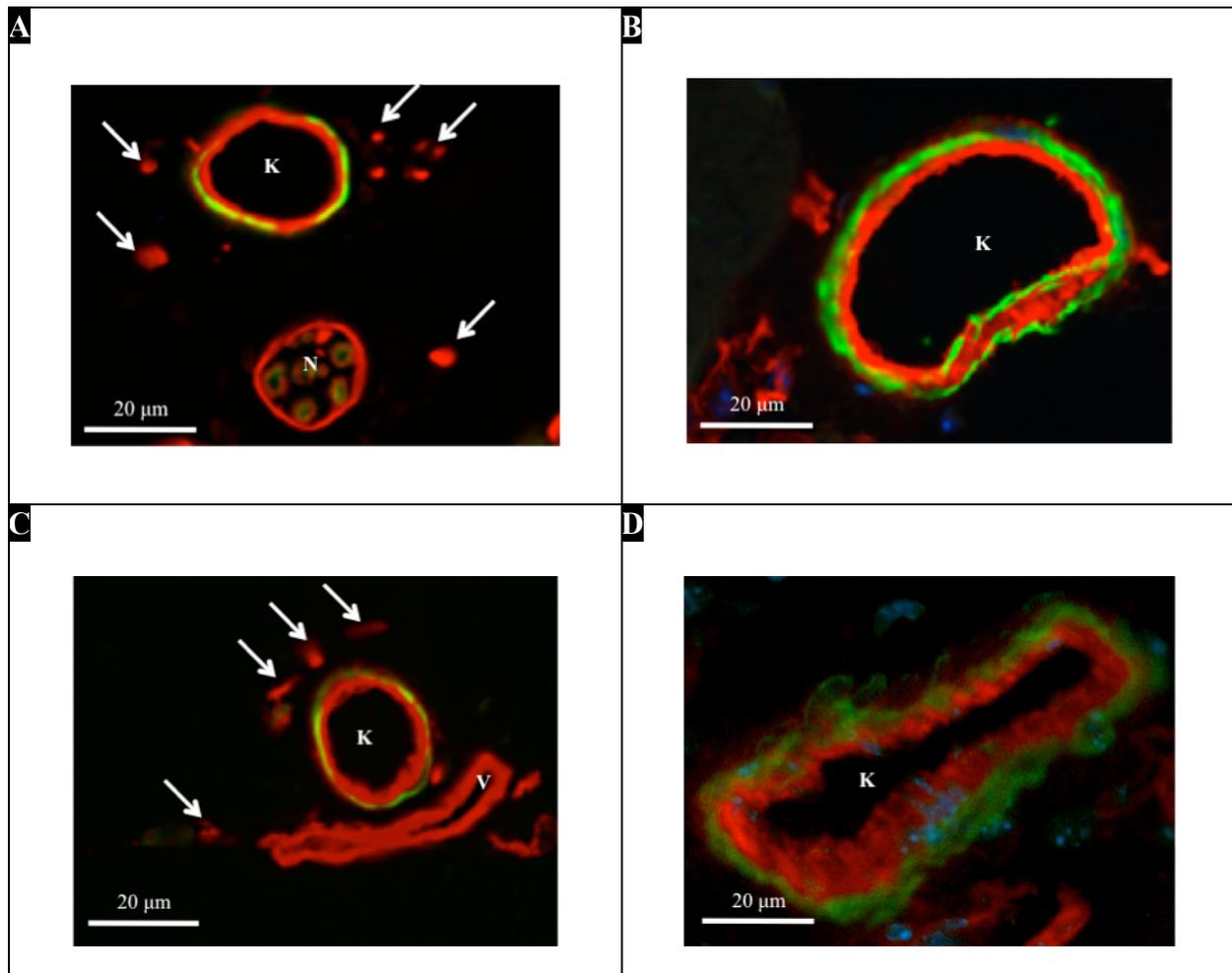
Mithilfe der Immunfärbungen wurden die Anatomie und Morphometrie der Kollateralarterien in der gesamten rechten und linken Adduktorengruppe bei insgesamt 24 WT und *Abra*<sup>-/-</sup> Mäusen evaluiert. Zusätzlich wurden noch Kapillaren in den Mm. *gastrocnemii* immunhistochemisch angefärbt, um zwischen Angiogenese und Kollateralwachstum zu differenzieren.

#### 3.3.2 MORPHOMETRIE DER KOLLATERALARTERIEN

Damit die Messung der Form und Gestalt der Kollateralarterien durchgeführt werden konnte, wurde 21 Tage nach Femoralarterienligatur eine Dilatation und Perfusionsfixierung angefertigt. Am Versuchsende wurden die Adduktorenmuskeln, in denen die Kollateralarterien verlaufen, entnommen. Von jedem M. *adductor* der ligierten und unligierten Hinterlaufseite wurden sechs Schnitte (zwei proximale, zwei mittlere und zwei distale) angefertigt. Die Kyrostatschnitte wurden mit primären Antikörpern „BS-1 Lectin“ zur Visualisierung des Endothels und „anti- $\alpha$ -smooth muscle actin“ zur Identifizierung von glatten Muskelzellen inkubiert sowie mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur Markierung von DNA angefärbt und analysiert.

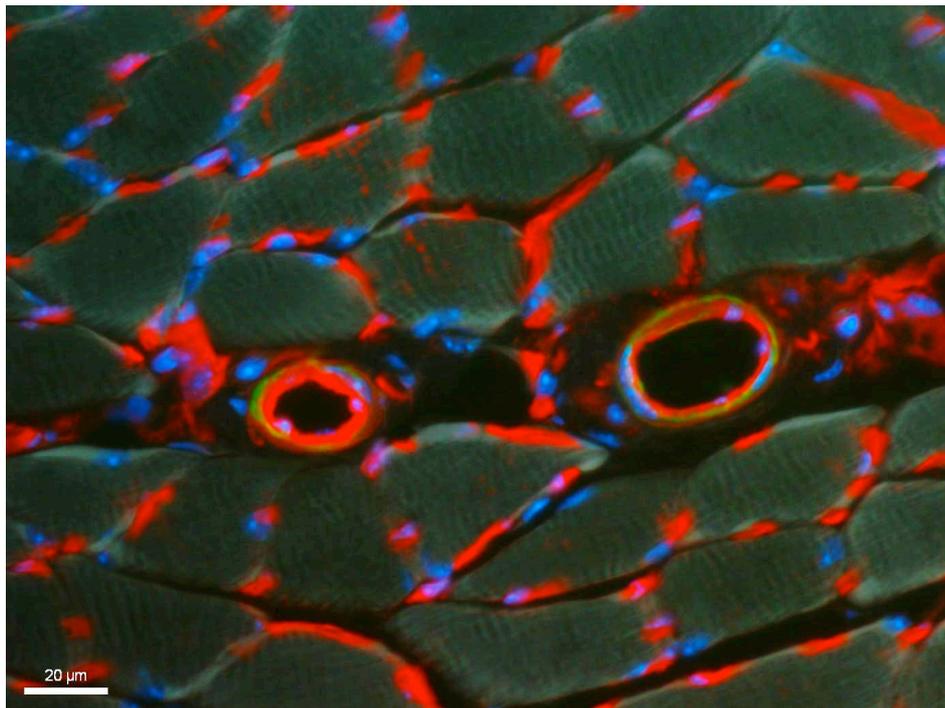
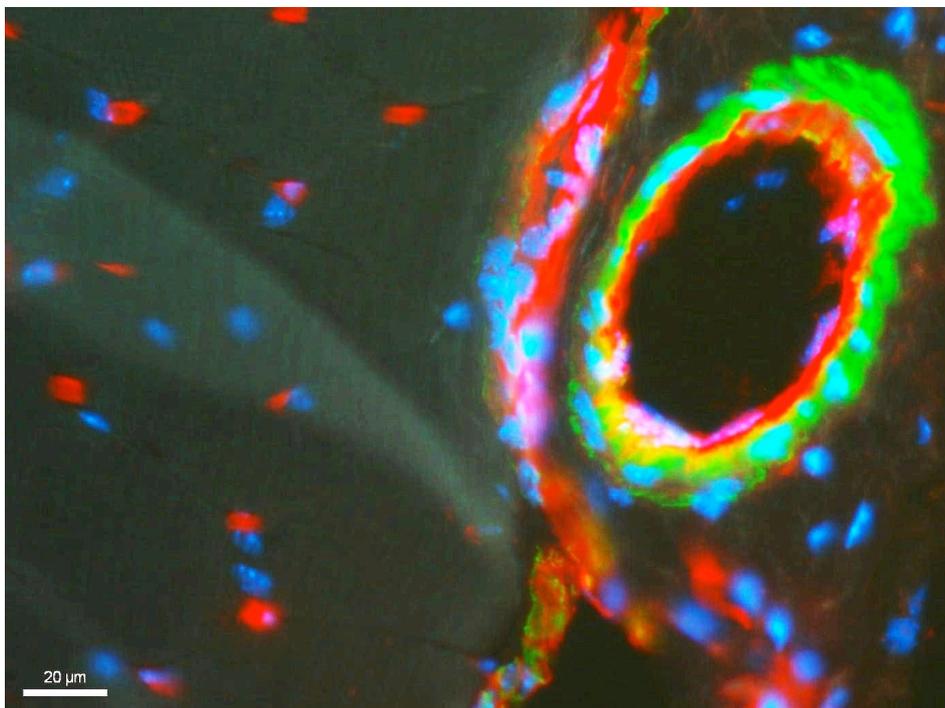
Die ligierte rechte Seite wurde direkt mit der nicht-ligierten linken Seite der Hinterläufe verglichen. Außerdem wurde die Rechts/Links Ratio errechnet.

Die präexistenten Kollateralarterien konnten aufgrund ihrer typischen Lokalisation in den oberflächlichen Schichten der Adduktorengruppe detektiert werden (M. *pectineus* und M. *adductor longus*). Aufgrund der zuvor durchgeführten Druckfixierung hatten die Kollateralarterien ein rundliches Lumen. Die Kollateralarterien von Venen zu unterscheiden, gelang daher anhand des meist kollabierten und schmaleren Lumens der Venen. Außerdem zeigten die Kollateralarterien eine dickere Tunica media (Abbildung 9).



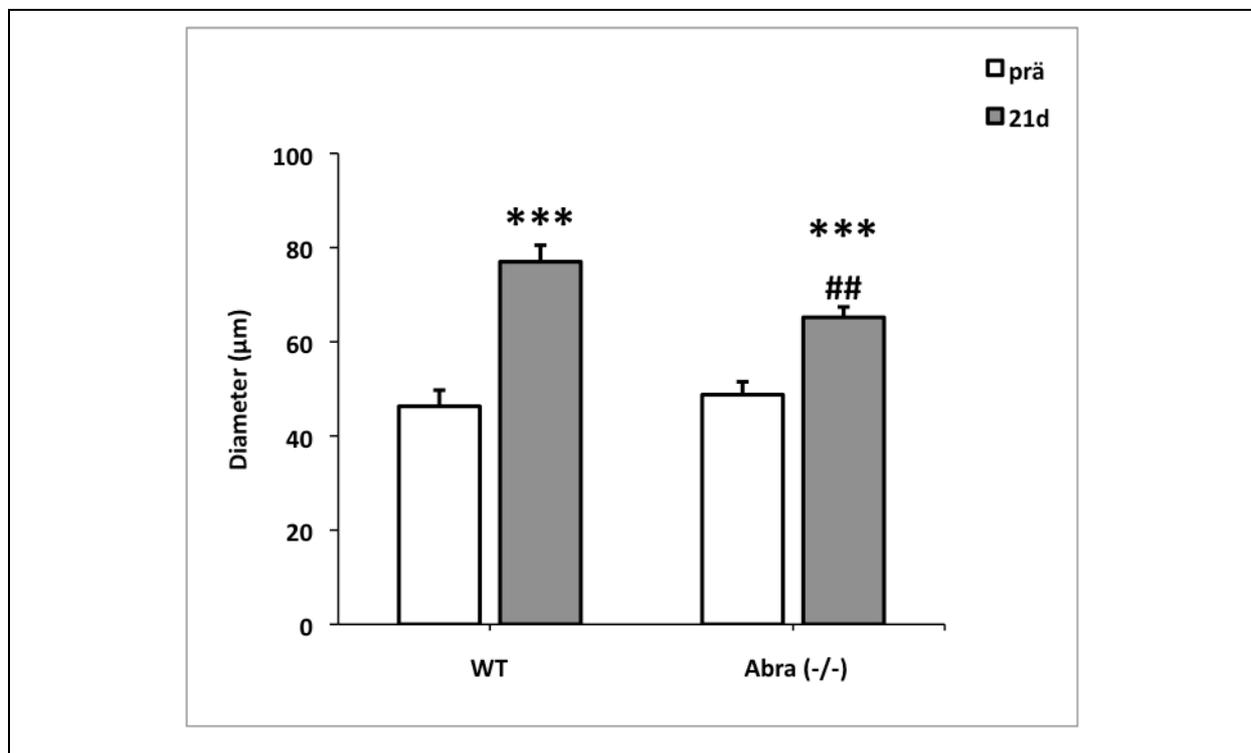
**Abbildung 9. Morphometrie. Mm. adductorii.** Abra<sup>-/-</sup> links [Abbildung A]. Abra<sup>-/-</sup> rechts [Abbildung B]. WT links [Abbildung C]. WT rechts [Abbildung D]. K: Kollaterale. N: Nerv. V: Vene. Pfeile: Kapillaren.

Auf der nicht-verschlossenen Seite waren charakteristischer Weise der Durchmesser der präexistierenden Kollateralarterien geringer, die Wandfläche kleiner sowie die Wanddicke schmäler, verglichen mit der operierten rechten Seite mit gewachsenen Kollateralarterien (Abbildung 10). Dies traf insbesondere auf die Kontrollgruppe, tendenziell aber auch auf die Abra<sup>-/-</sup> Versuchsgruppe zu. Der Unterschied KO versus WT Gruppe auf der ligierten Hinterlaufseite war statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ).

**A****B**

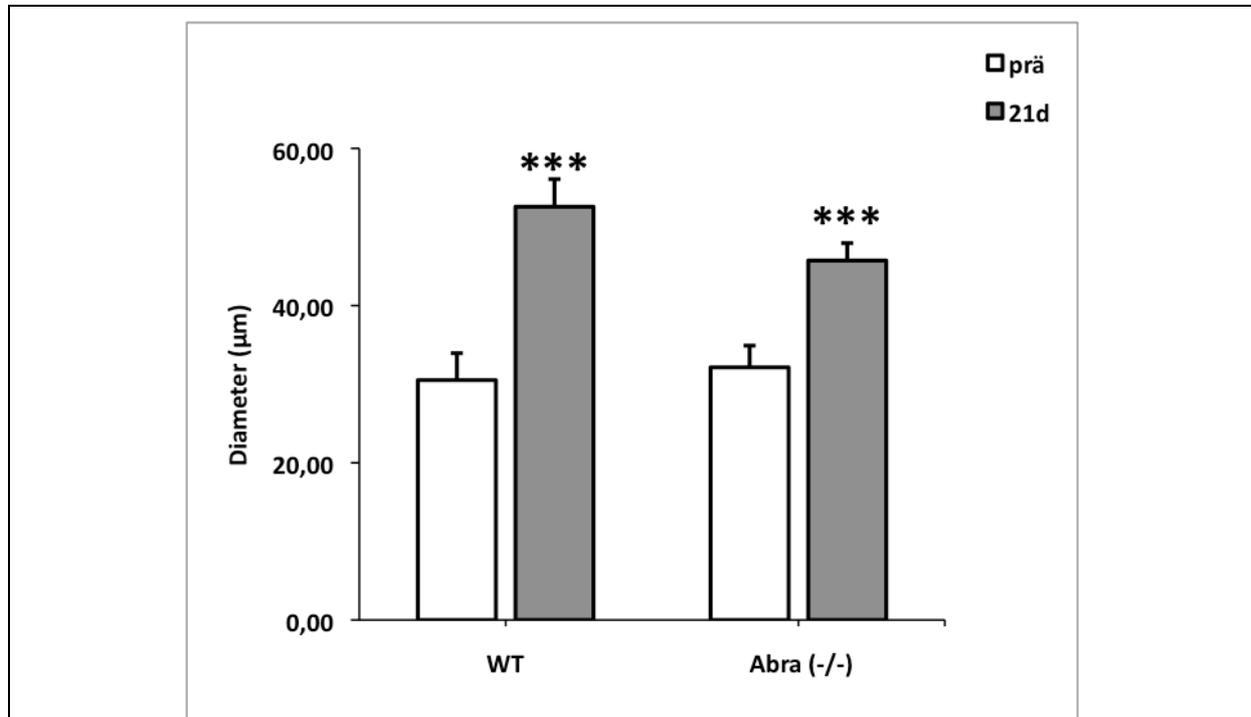
**Abbildung 10. Immunhistochemische Färbungen von Kollateralarterien von WT Mäusen (Vergrößerung x40).** Tunica Media grün, Endothel rot, Kerne blau. Linker Hinterlauf [Abbildung A]. Rechter Hinterlauf nach Femoralarterienligatur [Abbildung B].

Um zu definieren, ob die verbesserte Perfusion mit einer Vergrößerung des äußeren und inneren Kollateraldurchmessers einhergeht, wurde schließlich die Anatomie und Morphometrie der Kollateralarterien im gesamten Adduktormuskel der WT und *Abra*<sup>-/-</sup> Mäuse untersucht: Äußerer Diameter ( $46,3 \pm 3,4 \mu\text{m}$  versus  $48,7 \pm 3,8 \mu\text{m}$ ), innerer Diameter ( $30,5 \pm 2,9 \mu\text{m}$  versus  $32,1 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ), Wandfläche ( $1076 \pm 154 \mu\text{m}^2$  versus  $1123 \pm 167 \mu\text{m}^2$ ) und Wanddicke ( $16,5 \pm 1,2 \mu\text{m}$  versus  $16,0 \pm 1,1 \mu\text{m}$ ) der präexistente Arteriolen unterschieden sich nicht zwischen den WT und *Abra*<sup>-/-</sup> Mäusen. Nach Ligatur der A. femoralis vergrößerte sich in beiden Tiergruppen der äußere Kollateraldurchmesser, aber in *Abra*<sup>-/-</sup> Mäusen blieb der äußere Durchmesser signifikant kleiner als in WT Tieren (*Abra*<sup>-/-</sup>:  $65,2 \pm 2,2 \mu\text{m}$ ; WT:  $77,0 \pm 3,5 \mu\text{m}$ ) (Abbildung 11).



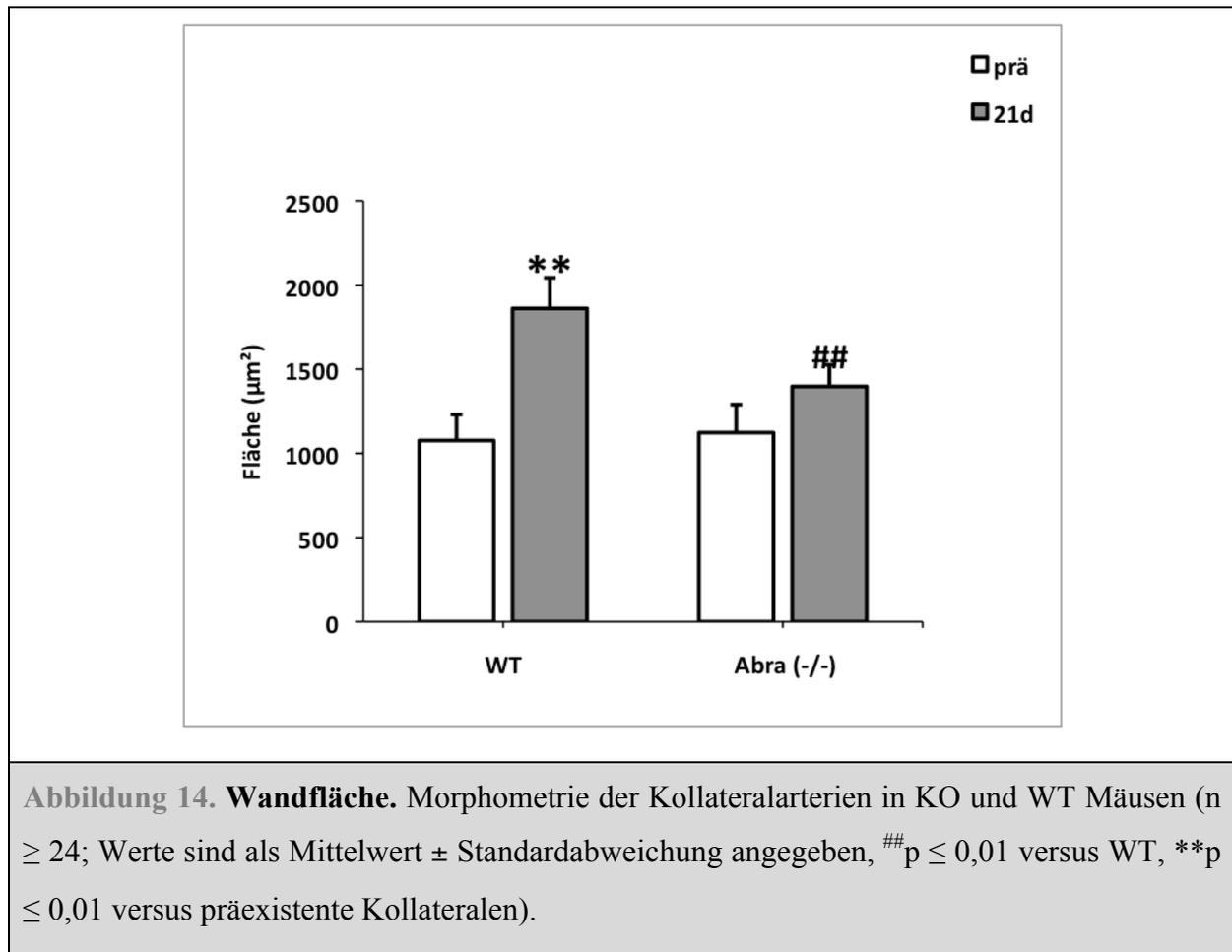
**Abbildung 11. Äußerer Diameter.** Morphometrie der Kollateralarterien in KO und WT Mäusen ( $n \geq 24$ ; Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, ##  $p \leq 0,01$  versus WT, \*\*\*  $p \leq 0,001$  versus präexistente Kollateralen).

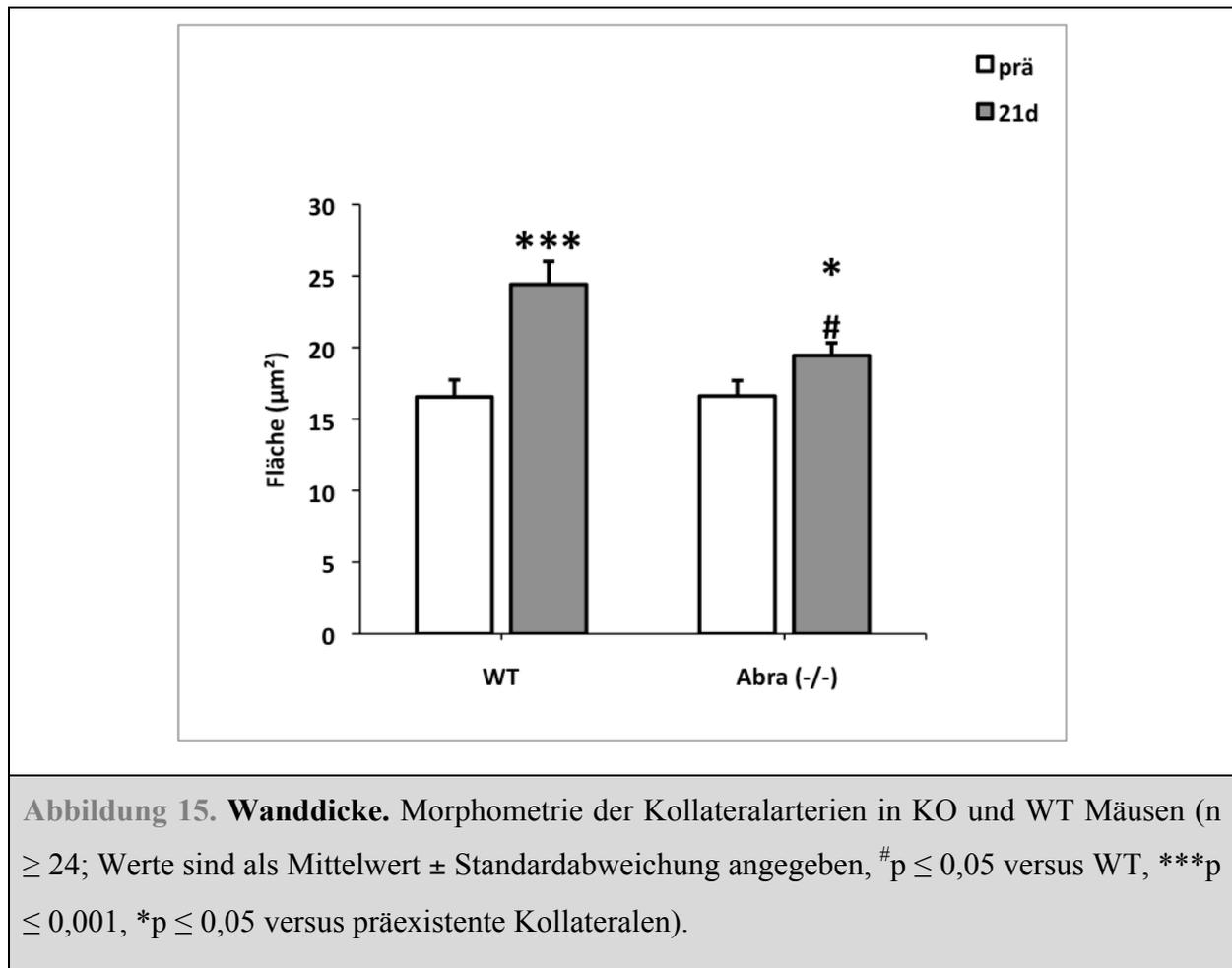
Der innere Durchmesser der Kollateralen vergrößerte sich ebenfalls nach Femoralarterienligatur in beiden experimentellen Gruppen. Ein Unterschied WT versus KO war hier zwar tendenziell erkennbar, aber nicht statistisch signifikant ( $Abra^{-/-}$ :  $45,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$ ; WT:  $52,6 \pm 3,5 \mu\text{m}$ ) (Abbildung 12).



**Abbildung 12. Innerer Diameter.** Morphometrie der Kollateralarterien in KO und WT Mäusen ( $n \geq 24$ ; Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben, \*\*\* $p \leq 0,001$  versus präexistente Kollateralen).

Besonders erwähnenswert ist, dass sich im Gegensatz zu den Ergebnissen des äußeren und inneren Diameters die Kollateralwandfläche und Wanddicke 21 Tage nach der Ligatur in den  $Abra^{-/-}$  Mäusen kaum vergrößerte und daher signifikant von den WT Tieren differierte (Wandfläche  $1397 \pm 129 \mu\text{m}^2$  versus  $1861 \pm 182 \mu\text{m}^2$ ,  $p \leq 0,05$ ; Wanddicke  $19,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$  versus  $24,4 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ,  $p \leq 0,001$ ) (Abbildung 14 und 15). Zusammengefasst ist in  $Abra$  KO Mäusen 21 Tage nach Femoralarterienligatur sowohl der Gefäßdurchmesser als auch die Wanddicke der Kollateralen reduziert.





**Abbildung 15. Wanddicke.** Morphometrie der Kollateralarterien in KO und WT Mäusen (n  $\geq$  24; Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben,  $^{\#}p \leq 0,05$  versus WT,  $***p \leq 0,001$ ,  $*p \leq 0,05$  versus präexistente Kollateralen).

### 3.3.3 KAPILLARDICHTE

Um die durch Sauerstoffunterversorgung induzierte Angiogenese im Unterschenkel zu quantifizieren, wurde die Kapillardichte bestimmt. In den Mm. gastrocnemii auf der unligierten Seite von WT Mäusen betrug die Kapillardichte  $1,67 \pm 0,14$  (Kapillaren/Muskelfaser) und  $1,74 \pm 0,12$  in auf der unligierten Seite bei Abra<sup>-/-</sup>. 21 Tage nach der Ligation zeigte die Kapillar/Muskelfaser Ratio in den Wadenmuskeln einen leichten aber nicht signifikanten Anstieg in beiden Gruppen (WT:  $1,78 \pm 0,05$ ; KO:  $1,82 \pm 0,12$ ) (Abbildung 16 und 17). Dies bedeutet, dass im Unterschenkel nach Femoralarterienligatur kein angiogener Stimulus vorhanden. Es zeigen sich zwischen den beiden Versuchsgruppen also keine Unterschiede, welche die gefundenen Differenzen der Laser Doppler Imaging Ergebnisse erklären könnten.

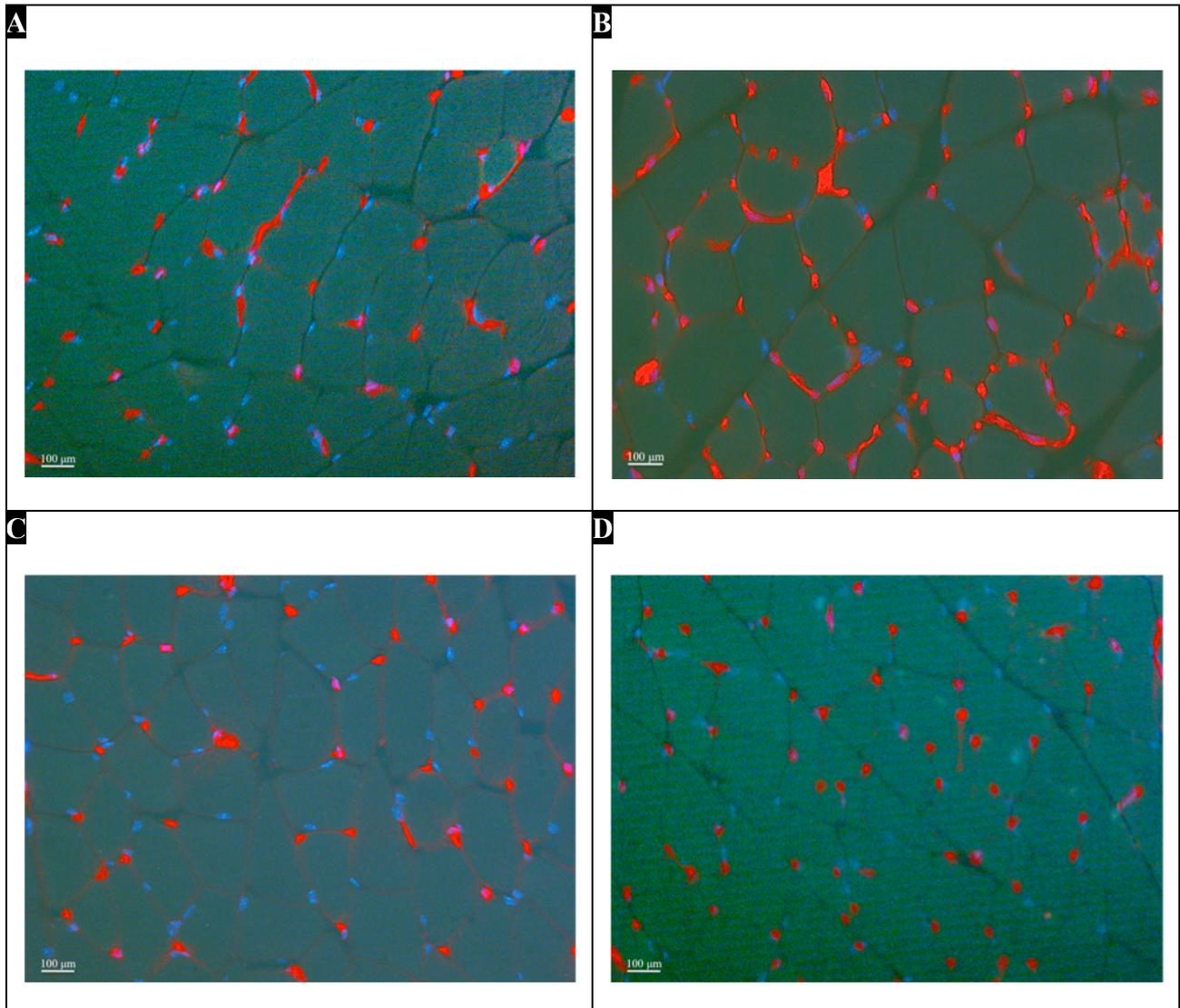
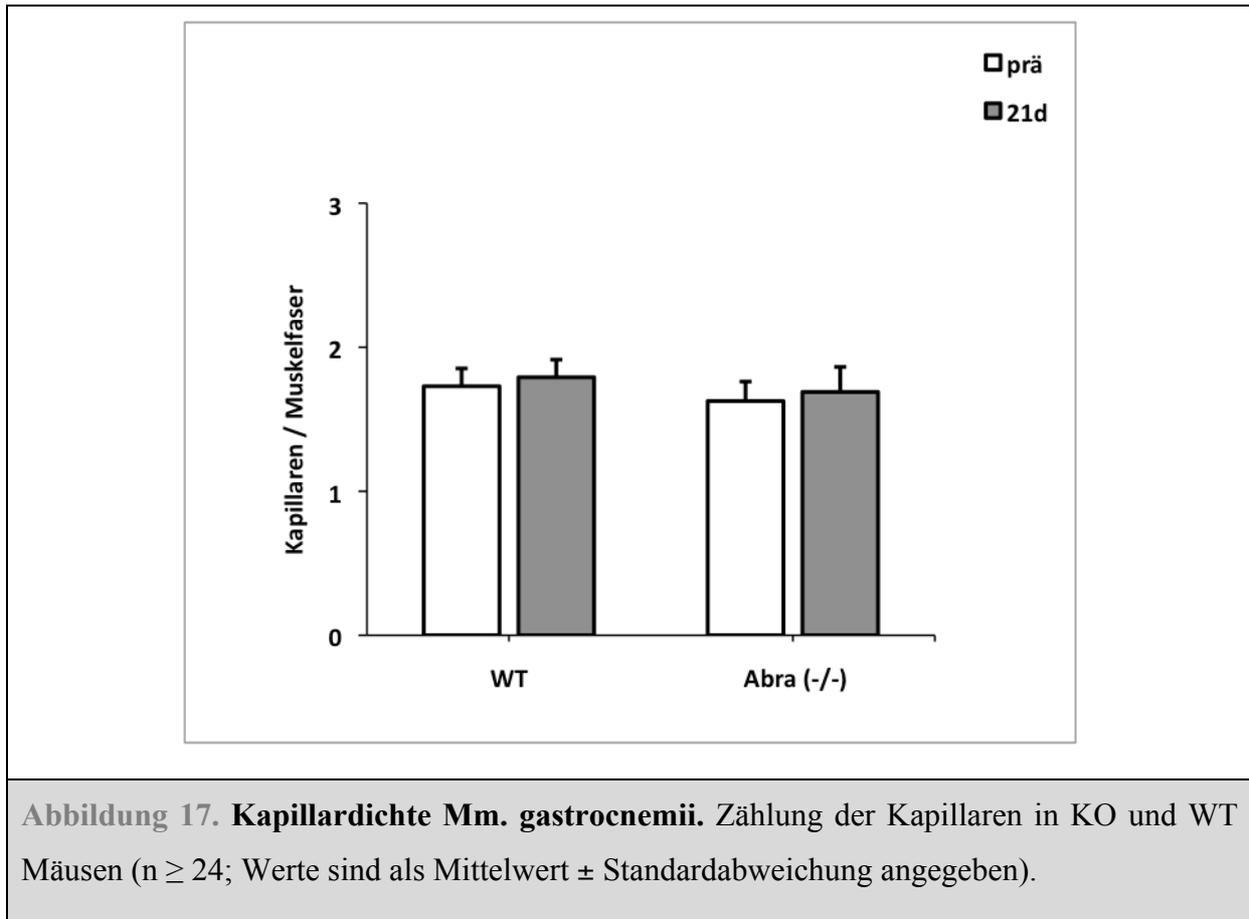


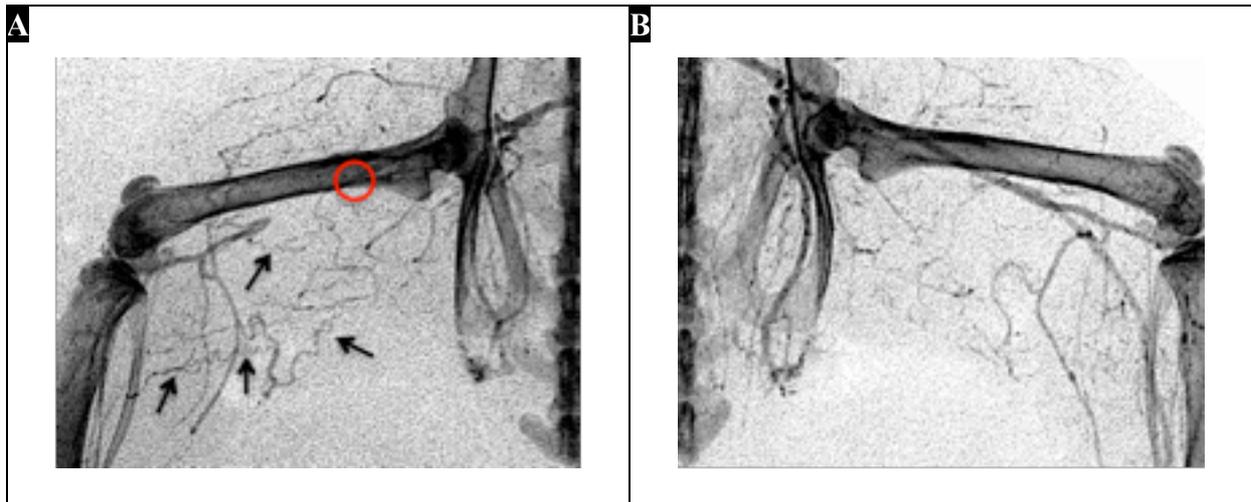
Abbildung 16. Kapillardichte *Mm. gastrocnemii*. *Abra*<sup>-/-</sup> links [Abbildung A]. *Abra*<sup>-/-</sup> rechts [Abbildung B]. WT links [Abbildung C]. WT rechts [Abbildung D]. Endothel rot, Kerne blau.



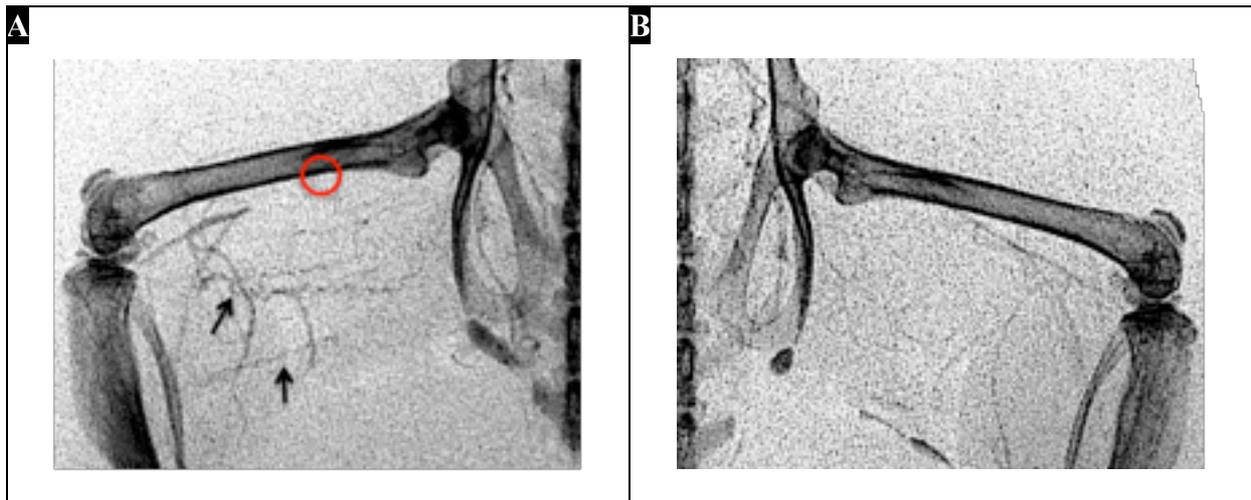
**Abbildung 17. Kapillardichte Mm. gastrocnemii.** Zählung der Kapillaren in KO und WT Mäusen ( $n \geq 24$ ; Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben).

### 3.3.4 ANGIOGRAPHIEN

*Post mortem* Angiogramme wurden schließlich 28 Tage nach dem Verschluss der rechten A. femoralis bei sechs Tieren (WT  $n = 3$  und KO  $n = 3$ ) angefertigt. Auf der nicht ligierten Seite wurden in beiden Versuchsgruppen nur dünne und wenige sichtbare präexistente Kollateralen gefunden. Größere, korkenzieherartige Gefäße wurden in allen Tieren auf der verschlossenen, rechten Seite identifiziert. Obwohl die Anzahl der sichtbaren Kollateralen aufgrund der geringen Auflösung nicht exakt quantifiziert werden konnte, waren Unterschiede zwischen WT und  $Abra^{-/-}$  Mäusen erkennbar. Die folgenden repräsentativen Angiogramme zeigen die Unterschiede der Kollateralarterienentwicklung auf der ligierten Seite in den experimentellen Gruppen (Abbildung 18 und 19).



**Abbildung 18. Repräsentative *post mortem* Angiogramme von Mäuse Hinterläufen der WT Versuchsgruppe.** 28 Tage nach Femoralarterienligatur am rechten Hinterlauf. Roter Kreis: Ligatur A. femoralis. Schwarzer Pfeil: Kornenzieherartige Kollateralgefäße. Rechter Hinterlauf [Abbildung A]. Linker Hinterlauf [Abbildung B].



**Abbildung 19. Repräsentative *post mortem* Angiogramme von Mäuse Hinterläufen der  $Abra^{-/-}$  Versuchsgruppe.** 28 Tage nach Femoralarterienligatur am rechten Hinterlauf. Rechter Hinterlauf [Abbildung A]. Linker Hinterlauf [Abbildung B]. Roter Kreis: Ligatur A. femoralis. Schwarze Pfeile: Weniger kornenzieherartige Kollateralgefäße.

### 3.4 ERGEBNISSE IM KONTEXT DER LITERATUR

Um die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bewerten zu können, sollen zunächst die verwendeten Methoden im Kontext der Arteriogeneseforschung näher betrachtet werden:

#### 3.4.1 ABRA<sup>-/-</sup> MÄUSE IN DER ARTERIOGENESEFORSCHUNG

*In vivo* Experimente bei Abra KO Tieren erlauben eine funktionelle Untersuchung verminderter Arteriogeneseprozesse nach Ligatur der Femoralarterie.

Die Endpunkt PCR ermöglichte die Genotypisierung der Mäuse und bestätigte das Fehlen von Abra mRNA speziell in der quergestreiften Skelettmuskulatur der Abra<sup>-/-</sup> Tiere. Dies diente zur Verifizierung, dass im weiteren Versuch Abra gen-defiziente Tiere verwendet wurden.

#### 3.4.2 MÖGLICHER GESCHLECHTEREINFLUSS AUF ARTERIOGENESE

Im verwendeten Versuchsaufbau wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere analysiert, da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung kein geschlechtsspezifischer Effekt auf Arteriogenese bekannt war. Am Kaninchen Modell der chronischen Hinterlaufischämie konnte im Jahre 2003 kein Einfluss des Geschlechts auf angiogene und arteriogene Prozesse festgestellt werden, lediglich einer Östrogendeffizienz nach Ovariectomie wurde ein negativer Effekt auf Arteriogenese zugeschrieben<sup>141</sup>.

Erst nach der Durchführung des vorliegenden Experiments wurde 2011 der Geschlechtseinfluss auf die Erholung der Durchblutung bei Mäusen im ischämischen Hinterlaufmodell untersucht. Zu Beginn des Versuches zeigten sich keine Unterschiede der Gefäßanzahl, aber die weiblichen Tiere hatten höhere Grundlevel VEGF und eNOS. Sieben Tage nach Femoralarterienligatur fanden sich bei den männlichen Tieren jedoch höhere Spiegel an VEGF, eNOS und „phosphorylated Vasodilator Stimulated Phosphoprotein“ (pVASP). Es wurde vermutet, dass in den weiblichen Mäusen eine verminderte vasodilatative Antwort und vergrößerte vasokonstriktorische Aktivität besteht, was zu einer verringerten Kollateralumformung führt<sup>142</sup>. Bei weiblichen C57BL/6 Mäusen wurde insgesamt eine geringere Flusserholung und verminderte Hinterlaufbewegung festgestellt. Aufgrund des komplexen multifaktoriellen Prozesses liegt die Vermutung nahe, dass das Tiergeschlecht einen Einfluss auf die Arteriogenese- und Angiogenesefähigkeit haben könnte.

In dem hier durchgeführten Tierversuch lag ein ungefähres Gleichgewicht zwischen weiblichen und männlichen Mäusen in der WT Gruppe vor, sodass hier von keiner negativen Beeinflussung der Ergebnisse durch das Geschlecht ausgegangen werden kann (WT ♂ 7 und ♀ 8). In der KO Gruppe jedoch fand sich ein leichtes Übergewicht an weiblichen Mäusen (KO ♂ 4 und ♀ 11). Vor dem Hintergrund der neusten Forschungsergebnisse lässt sich ein eher ungünstiger Effekt auf die arteriogenen Prozesse in der KO Versuchsgruppe vermuten. Die geschlechterspezifische Betrachtung der Nekroseentstehung unterstützt diesen Ansatz, da lediglich bei weiblichen KO Tieren eine Nekroseentwicklung beobachtet wurde. Eine eventuelle negative Beeinflussung der erhaltenen Ergebnisse kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um die spezifischen Interaktionen zwischen Geschlecht und Abrogenen genauer zu bestimmen, wären daher weitere geschlechtstrennte Versuchsreihen wünschenswert.

### 3.4.3 EIGNUNG DES MODELLS DER CHRONISCHEN ISCHÄMIE IM MAUSHINTERLAUF

Das Modell der chronischen Ischämie im Hinterlauf der Maus basiert auf dem akuten Verschluss der A. femoralis, welche das arterielle Hauptgefäß des Beines ist. Dieses Tiermodell wurde bereits in zahlreichen Studien verwendet, um arteriogene Mechanismen zu studieren. Verschiedene Varianten wurden für unterschiedliche Spezies wie Ratte<sup>58</sup>, Kaninchen<sup>143</sup> oder Schwein<sup>60</sup> entwickelt. Ein Maus-Modell der Arteriogenese wurde von Couffinhal *et al.* erstmals 1998 demonstriert. Die Autoren induzierten eine unilaterale Hinterlaufsischämie durch Ligatur des proximalen Endes der A. femoralis distal der A. saphena, die bei Menschen nur embryonal angelegt wird und noch vorgeburtlich verkümmert. Anschließend wurde die A. femoralis mit ihren begleitenden Ästen exzidiert<sup>121</sup>. Dieses umfangreiche operative Verfahren wurde seitdem durch verschiedene Forschungsgruppen optimiert. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete ischämische Maus Hinterlaufmodell wurde durch das Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim im Jahre 2002 vorgestellt<sup>57</sup> und von Limbourg *et al.* 2009 standardisiert („Nature protocol“)<sup>144</sup>. Im Unterschied zu vorherigen Mausmodellen wird bei dieser chirurgischen Intervention die A. femoralis unmittelbar distal der Abzweigung der A. femoralis profunda und proximal zu den Ästen der A. poplitea durch Ligation okkludiert. Daraufhin überbrücken die nicht verschlossenen A. circumflexa femoralis lateralis und A. femoralis profunda den Blutstrom zur distalen Gliedmaße. Sie anastomosieren über präexistente Kollateralkreisläufe mit der A. genou descendens, A. saphena und A. caudalis femoris. Diese entstehenden Anastomosen verhindern ausgedehnte Nekrosen und daraus resultierende Amputationen. In der Folge der

Ligatur der A. femoralis kommt es zur Ischämie des Unterschenkels und aufgrund der erhöhten Durchblutung in den Kollateralen zu ansteigenden Scherkräften in den arteriellen Kollateralgefäßen des Oberschenkels<sup>57, 121</sup>. Das verwendete Modell der chronischen Ischämie im Hinterlauf der Maus erlaubt daher, zwei physiologisch klar getrennte Bereiche des Hinterlaufs gleichzeitig zu untersuchen. Zum einen kann die unmittelbare Umgebung der okkludierten A. femoralis an der peripheren Extremität beurteilt werden. Das entsprechende Muskelgebiet ist der M. adductor. Hier herrschen in den Gefäßen der Umgehungskreisläufe die bereits ausführlich beschriebenen Scherkräfte vor, im Muskelgewebe selber findet sich ein weitgehend physiologisches Milieu<sup>145, 143</sup>. Zum anderen kann der Bereich der distalen Extremität bewertet werden. Dies liegt deutlich unterhalb der Okklusion und ist äquivalent zum M. gastrocnemius. Dieses distale Muskelgebiet wird ausschließlich durch Umgehungskreisläufe versorgt, so dass eine ausgeprägte Ischämie des Muskelgewebes zu finden ist<sup>145, 146</sup>.

Die Analyse des Remodelingprozesses infolge des Verschlusses der A. femoralis bei der Maus kann sowohl durch funktionelle als auch durch histologische und visuelle Untersuchungen, wie *post mortem* Angiogramme, erfolgen.

Im Vergleich zu anderen Arteriogenesemodellen in größeren Tieren hat das Mausmodell einige Vor-, aber auch Nachteile. Der Hauptvorteil liegt darin, dass gentechnisch veränderte Mäuse verwendet werden können, um den Einfluss unterdrückter Gen-Expression und Gen-Überexpression auf physiologische Funktionen zu studieren. Kleinere Tiere sind außerdem zur Testung von Wachstumsfaktoren geeignet, da nur niedrige effektive Dosen notwendig und somit die Kosten überschaubar wären. Um die statistische Anforderung zu erfüllen, können in einem vergleichsweise kurzem Zeitraum eine ausreichende Anzahl Mäuse operiert und hämodynamisch evaluiert werden. Dies ist aufgrund der praktikablen Messung der Durchblutung und einfachen Handhabung der Mäuse möglich.

Ein wesentlicher Nachteil des Mausmodells ist die geringe Gefäßgröße. Es besteht nicht die Möglichkeit, die direkte kollaterale Konduktanz zu messen. Stattdessen müssen zur Bestimmung der Erholung der Durchblutung ergänzende Methoden wie Laser Doppler Imaging, Hämoglobin Sauerstoffsättigung und aktive Fußbewegung verwendet werden. Wie bei allen Tiermodellen muss außerdem bedacht werden, dass Mäuse interindividuelle Unterschiede in ihrer Erholung der Durchblutung als Reaktion auf die akute Ischämie zeigen können. Dies kann zu größeren Variationen bei hämodynamischen Messungen führen.

Bereits Couffinhal *et al.* hatten für ihr Modell zur chronischen Ischämie im Maus Hinterlauf Tiere mit genetischem C57BL/6 Hintergrund verwendet, die relativ stark ausgebildete präexistente Kollateralgefäße haben und Ischämie gut tolerieren können<sup>57, 121</sup>. Da C57BL6 Mäuse gut regenerieren, sind sie insbesondere dafür geeignet, eine Verschlechterung der Durchblutungs-Regeneration (hier verursacht durch das fehlende Abra Gen) experimentell darzustellen. Aus diesen Gründen wurden auch für die vorliegenden Versuche C57BL/6 Mäuse ausgewählt. Als Kontrollgruppe dienten C57BL/6 WT Tiere. Die KO und WT Mäuse hatten somit denselben genetischen Hintergrund.

Zwei WT Mäuse verstarben, wie oben bereits erwähnt, im Laufe des Experiments an anästhesiologischen Komplikationen während der Narkoseeinleitung, obwohl die verwendete Ketamin/Xylazin Kombination Standard in der Veterinärmedizin ist<sup>147</sup>. Diese Narkosekombination ermöglicht ein relativ zuverlässiges relaxierendes, sedatives und analgetisches Niveau<sup>139</sup>. Außerdem bietet die Ketamin/Xylazin Narkose eine große Sicherheitsbreite mit relativ kleinem Nebenwirkungsprofil<sup>148-150</sup>. Bei geringer Überdosierung können jedoch potentiell tödliche Komplikationen auftreten, indem es zu einer Xylazininduzierten Depression des Atmungsapparates kommt<sup>139, 140</sup>. Der hämodynamisch-depressive Effekt der Ketamin/Xylazin Kombination ist außerdem ausgeprägter als bei volatilen Anästhetika<sup>151</sup>. Nach der langjährigen Erfahrung des Max-Planck-Instituts ist bei geplanter Messung des Laser Doppler Imagings und der Hämoglobin-Sauerstoffsättigungen die alternative Isofluran-Inhalationsnarkose allerdings nicht gut geeignet. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es daher keine unkomplizierte anästhetische Alternative zur Ketamin/Xylazin Narkosekombination mit vergleichbar großer Erfahrungsbreite. Aus diesem Grund wird Ketamin/Xylazin vermutlich trotz der beschriebenen Nachteile auch zukünftig das Mittel der Wahl zur Mäuseanästhesie beim vorliegenden Versuchsaufbau bleiben.

#### **3.4.4 APPARATIVE QUANTIFIZIERUNG DER ARTERIOGENESE**

Eine verminderte Arteriogenese resultiert in einem verringerten Kollateralwachstum und somit einer zunächst peripher reduzierten Blutzirkulation mit folgender verstärkter Angiogenese im Ischämiegebiet<sup>143</sup>. Zur Quantifizierung der Durchblutung gibt es grundsätzlich verschiedene gut etablierte Methoden, aber nur wenige Techniken stehen zur *in vivo* Messung der Durchblutung in kleinen Tieren wie beispielsweise Mäusen zur Verfügung

Um die Gewebepfusion in den distalen Hinterläufen der  $Abra^{-/-}$  Mäuse und nicht transgenen WT mit ligierter A. femoralis zu quantifizieren, wurde während der dreiwöchigen Observationsphase die Erholung der Durchblutung mittels Laser Doppler Imaging<sup>123</sup> und der Gefäßdicke mittels Hämoglobin Spectrophotometrie<sup>138</sup> bestimmt. Drei Tagen nach der Okklusion konnte in beiden Gruppen eine beginnende Erholung der Durchblutung beobachtet werden, die jedoch in der Kontrollgruppe ausgeprägter war. Dies kann als Hinweis auf eine langsamere Rekollateralisierung in den  $Abra^{-/-}$  defizienten Tieren gewertet werden. Diese vergleichsweise Verminderung der Durchblutung zeigte an den weiteren postoperativen Messzeitpunkten eine zunehmende Abweichung. Die Ruhedurchblutung steigerte sich in der Kontrollgruppe kontinuierlich bis eine beinahe vollständige Erholung am Ende des Beobachtungszeitraumes erreicht war, die Durchblutung in den Hinterläufen der  $Abra^{-/-}$  Mäuse hingegen blieb deutlich hinter diesem Resultat zurück. Diese Differenz demonstrierte eine verminderte Arteriogenese in  $Abra^{-/-}$  Mäusen.

Bei der Bewertung der gefundenen Unterschiede sollte jedoch bedacht werden, dass in dem vorliegenden Modell die Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs bei anästhesierten Mäusen unter Ruhebedingungen durchgeführt wurde. Ein Vergleich der Hämoglobin Sauerstoffsättigung bei aktiven Tieren würde vermutlich noch deutlichere Differenzen zeigen, war aber aufgrund der zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten nicht praktikierbar.

Um akkurate Messergebnisse mit Laser Doppler Imaging und Hämoglobin Sauerstoffsättigung zu erzielen, mussten einige Voraussetzungen im verwendeten Versuchsaufbau beachtet werden. Zum einen mussten die Tiere für die Dauer der Messung mit einem Narkotikum ruhig gestellt werden. In dieser Arbeit wurde hierfür, wie oben beschrieben, eine Ketamin/Xylazin Kombinationsanästhesie verwendet. Dabei muss in die Bewertung der Ergebnisse die depressive Wirkung der Ketamin/Xylazin-Kombination auf das kardiovaskuläre System durch eine Hemmung der Sympatikusaktivität sowie der myokardialen Kontraktilität durch die negativ ino- und chronotrope Wirkung des  $\alpha_2$ -Adresnozeptor-Agonisten Xylazin beachtet werden<sup>149, 152-156</sup>. Hierdurch kommt es zu einer deutlichen Verminderung der kardialen Hämodynamik und Leistung, was wiederum einen negativen Einfluss auf die periphere Durchblutungssituation in den Hinterläufen der Mäuse haben könnte. Dieser Effekt wurde jedoch durch die Verwendung der R/L Ratio wieder normiert und hat in der Interpretation der Ergebnisse keine Bedeutung.

Um Fehler zu vermeiden, die mit temporären Veränderungen in der Vasomotion der gemessenen Gefäße assoziiert ist, mussten die Mäuse zum anderen in einer klimatisierten Kammer unter standardisierten Temperatur unmittelbar bevor und während jeder Messung platziert werden. Es war ein fünfminütiges Vorwärmen der Mäuse bei 37 °C notwendig, damit eine suffiziente Vasodilatation erreicht wurde und so die Messkonditionen normiert waren. Zusätzlich war eine exakte Platzierung der Mäuse auf dem Unterlagepolster mit parallel orientierten Hinterläufen unabdingbar, um eine gleichmäßige Eindringtiefe des Laserlichts in beiden Pfoten zu gewährleisten. Außerdem durfte das gescannte Gebiet nur Gewebe der zu messenden Region enthalten, damit eine gute Auflösung erreicht werden kann. Bei der Messung der Hämoglobin Sauerstoffsättigung war außerdem eine exakte Platzierung des Sensors auf den Pfoten der Mäuse unbedingt notwendig.

Die Verwendung der Laser Doppler Imaging Technik zur Bestimmung der relativen Veränderungen der Durchblutung in kleinen experimentellen Tieren bietet den Vorteil einer Flussmessung ohne Isolierung oder invasive Freilegung der Blutgefäße. Dies ermöglicht eine Untersuchung der Gefäße bei erhaltenen physiologischen Funktionen. Abhängig von der Eindringtiefe des Laserlichts ins Gewebe, hat Laser Doppler Imaging außerdem sowohl oberflächlich als auch tief im Gewebe (maximal 1-2 mm) eine gute experimentelle und klinische Anwendbarkeit und kann beispielsweise zur Quantifizierung der zerebralen Durchblutung verwendet werden <sup>157</sup>. Die Methode des Laser Doppler Imaging erlaubt demnach eine Bestimmung der Durchblutungsfunktion sowohl auf mikrovaskulärem Level <sup>158</sup> als auch auf makrozirkulatorischer Ebene. Um aussagekräftige Ergebnisse über Erholung der Durchblutung in Mäusehinterläufen zu erhalten, ist die limitierte Penetrationstiefe des Laserlichts ins Gewebe ausreichend. Die Technik des Laser Doppler Imaging ist trotz dieser Vorteile nicht geeignet, um die absolute Durchblutung in einem bestimmten Gefäß zu messen <sup>159</sup>. Stattdessen zeigt Laser Doppler Imaging die relativen Veränderungen der regionalen Durchblutung an <sup>160</sup>.

Ein alternatives Prinzip zur Quantifizierung der Durchblutungssituation wäre beispielsweise die Radioaktive Mikrosphären Technik, die als eine Standardmethoden zur globalen und regionalen Durchblutungsmessung gilt. Allerdings besteht das Risiko einer Embolisation in den kleinen Mäusegefäßen, da sich die Mikrosphären mit einem Durchmesser über 15 µm präkapillär verfangen können <sup>161</sup>. Ist der Mikrosphärendurchmesser kleiner als 12 µm, führt dies zu erhöhter Dislokation ins umliegende Gewebe <sup>162</sup>. Beides würde zu falschen Interpretationen der gemessenen Ergebnisse führen. Diese Methode ist daher im Falle des vorliegenden Versuchsaufbaus nicht geeignet.

Alternativ gibt es die Option der farbigen Mikrosphärentechnik und die neuere Möglichkeit der fluoreszenzmarkierten Mikrosphärentechnik zur Durchblutungsbestimmung. Ein großes Problem bei beiden Methoden ist, dass die gefärbten oder fluoreszenzmarkierten Mikrosphären nur nach Isolation mit kompletter Gewebsverdauung sichtbar werden <sup>163</sup>. Daher sind ergänzende morphologische Untersuchungen nicht möglich und beide Mikrosphärentechniken im verwendeten Experiment ebenfalls nicht indiziert.

Als weitere Methode zur Bestimmung der arteriellen Durchblutung durch Kollateralgefäße sind „time-of-flight“ Angiogramme basierend auf Magnetresonanztomographie (MRT) <sup>73</sup>. Eine quantitative und repetitive Messung distal der Arterienokklusion zeigt hier die Umverteilung der Durchblutung *in vivo* und wird zukünftig eine verbesserte Bewertung der Daten im Modell der Langzeitischämie im Hinterlauf der Maus ermöglichen. Leider war diese Technik zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung am Max Planck Institut Bad Nauheim noch nicht ausreichend etabliert.

### **3.4.5 FUNKTIONELLE QUANTIFIZIERUNG DER ARTERIOGENESE**

Mithilfe der aktiven Fußbewegung wurden die funktionseinschränkenden Auswirkungen der unterschiedlichen Erholung der Durchblutung in operierten *Abra<sup>-/-</sup>* und WT Mäusen objektiviert. Der funktionelle Parameter der aktiven Fußbewegung klassifiziert den Progress des Kollateralarterienwachstums. Die bereits zuvor beschriebene standardisierte Skala basiert auf den klinischen Stadien der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, die nach Fontaine-Ratschow definiert werden (Tabelle 16).

Die gefundenen Ergebnisse implizieren eine kontinuierliche Erholung der Durchblutung in beiden experimentellen Gruppen, die jedoch in den  $Abra^{-/-}$  Tieren deutlich verzögert ausfällt: In der Observationsphase zeigte sich eine zunehmende Differenz der aktiven Fußbewegung zwischen den Versuchsgruppen. Die Kontrolltiere belasteten wesentlich früher den operierten Hinterlauf und zeigten am Ende nur geringfügige Unterschiede unter normaler Belastung. Im Gegensatz hierzu erholten sich die  $Abra^{-/-}$  Mäuse langsamer und keinesfalls komplett.

In der Literatur wird bei anderen Versuchstieren ebenfalls eine unvollständige Wiederherstellung der Durchblutung durch spontanes Wachstum nach arterieller Okklusion beschrieben. Beispielsweise findet sich bei der Koronarzirkulation des Hundes 35 % oder beim Kaninchenhinterlauf 40 % der maximalen Konduktanz, obwohl die normale Ruhedurchblutung in beiden Versuchsgruppen schnell erreicht wurde<sup>88, 89</sup>.

Die Resultate dieser Studien bestätigen somit die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse einer fast vollständigen Belastungsfähigkeit der  $Abra^{-/-}$  Tiere unter Ruhebedingungen und die suffiziente Erholung der Durchblutung der Kontrollgruppe nach Femoralarterienligatur. Am Ende des Beobachtungszeitraumes zeigten die WT Tiere am Hinterlauf mit operativ verschlossener A. femoralis funktionell eine beinahe 100%-ige Erholung. Dies entspricht einer uneingeschränkten Bewegung auf der operierten Seite und deckt sich mit früheren postoperativen Ergebnissen der aktiven Fußbewegung bei C57BL/6 Mäusen im ischämischen Hinterlaufmodell<sup>57</sup>. In der  $Abra^{-/-}$  Gruppe war nach Ende des Observationsfensters nur eine inkomplette Erholung messbar. Falls die aktive Fußbewegung jedoch länger als drei Wochen bestimmt werden würde, könnte eventuell auch in der KO Gruppe eine vollständige Erholung der Durchblutung beobachtet werden. Aus den gewonnenen Daten der aktive Fußbewegung konnte insgesamt auf eine verminderte Rekollateralisierung in den  $Abra^{-/-}$  Mäusen geschlossen werden.

**Tabelle 16. Vergleich Stadien der pAVK nach Fontaine-Ratschow und Stadien der aktiven Fußbewegung. Modifiziert nach Herold <sup>164</sup>.**

pAVK	Aktive Fußbewegung
<b>I</b> Beschwerdefreiheit	<b>4</b> Uneingeschränkte Bewegung
<b>II</b> Claudicatio intermittens (Belastungsschmerz)	
a) Schmerzfreie Gehstrecke > 200 m	<b>3</b> Aktive Bewegung, ohne dass die Zehen gespreizt werden
b) Schmerzfreie Gehstrecke < 200 m	<b>2</b> Zehenspreizen ist eingeschränkt, Claudication
<b>III</b> Ischämischer Ruheschmerz der Muskulatur	<b>1</b> Passive Bewegung, Fuß wird gezogen
<b>IV</b> Zusätzlich Nekrose/Gangrän/Ulkus	<b>0</b> Keine Fußbewegung, Nekrose des Fußes oder der Zehen

Der Vorteil der Messmethode der aktiven Fußbewegung ist die Vergleichbarkeit der experimentellen Werte mit der realen klinischen Situation. Der Nachteil ist wiederum, dass die Einteilung in die Stadien der aktiven Fußbewegung durch subjektive Bewertungen der evaluierenden Person beeinflusst wird. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, müssen daher alle Messungen einer Versuchsreihe von der gleichen Person durchgeführt werden. Damit möglichst objektive Ergebnisse erzielt werden, muss die Zuteilung der Punkte randomisiert und verblindet für die Untersuchungsgruppe erfolgen. Dieser Aspekten wurden in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt.

Die vier beziehungsweise fünf Punktestufen können geringe Verbesserungen und Unterschiede in der Verwendung des ischämischen Hinterlaufs nur ungenügend abbilden. So ist zwar insgesamt eine Tendenz der aktiven Fußbewegung der beiden experimentellen Gruppen erkennbar, eine exakte Abbildung der funktionellen Bewegungsmuster der einzelnen Tiere ist jedoch nicht möglich. Um eine noch differenziertere Aussage über den Einfluss des Abra<sup>-/-</sup> Gens auf die Durchblutungserholung zu treffen, müsste die Skala der aktiven

Fußbewegung um einige Unterpunkte erweitert und engmaschiger angewendet werden. Diese Verfeinerung der Einteilung würde allerdings auf Kosten der klinischen Vergleichbarkeit gehen und einen hohen Zeitfaktor erfordern. Außerdem löst ein aufwändigeres Einteilungsverfahren nicht das Problem der subjektiven Bewertungen des Versuchsleiters.

Zusammenfassend demonstrieren die Daten in der Kategorie der aktiven Fußbewegung eine verminderte Funktion der Hinterlaufseite mit Femoralarterienokklusion in  $Abra^{-/-}$  Mäusen. Diese Ergebnisse bestätigen die gefundenen Ergebnisse der quantifizierenden Messungen von Laser Doppler Imaging und Hämoglobin Sauerstoffsättigung. Alle Werte in Kombination implizieren eine verringerte Erholung der Durchblutung in  $Abra^{-/-}$  Tieren, die sowohl empirisch als auch funktionell zum Ausdruck kommt. Wahrscheinlich fand sich der geringere Anstieg in allen gemessenen Kategorien aufgrund eines tatsächlich verringerten, aber nicht komplett inhibierten, Kollateralwachstums in Gen-defizienten Tieren. Dies lässt Rückschlüsse auf die Position von  $Abra$  in der arteriogenen Signalkaskade zu. Vermutlich ist  $Abra$  keine essentielle Voraussetzung für Arteriogenese, sondern hat eher eine fördernde regulativ-modulierende Wirkung auf arteriogene Prozesse.

### **3.4.6 QUANTITATIVE UND QUALITATIVE ANALYSEN DES VERRINGERTEN KOLLATERALWACHSTUMS**

Um zu verifizieren, ob  $Abra$  in unserem Modell zum arteriogenen Kollateralwachstum beiträgt, wurden morphometrische Analysen der Kollateralen im gesamten rechten und linken Adduktorenmuskeln bei insgesamt 24 WT und  $Abra^{-/-}$  Mäusen angefertigt.

Die Gefäße der morphometrisch untersuchten Tiere wurden nicht angiographisch ausgewertet, damit sie zum Auswertungszeitpunkt nicht mit wismuthaltigem Kontrastmittel gefüllt waren. Der Vorteil der strikten Differenzierung beider Untersuchungsmethoden war, dass bei der morphometrischen Auswertung auch der innere Gefäßdiameter und die Dicke der Gefäßwand bestimmt werden konnten. Der Nachteil war, dass zur Angiographie nur eine geringere Tierzahl zur Verfügung stand (24 immunhistochemisch versus 6 angiographisch untersuchte Mäuse). In dem verwendeten Gewebsperforationsmodell wurde im Dilatations-Puffer eine spezifische Konzentration von Adenosin verwendet, um interindividuelle Unterschiede in der Vasodilatation zu vermeiden. Nach der Gewebsfixation wurden Kryoschnitte der zu evaluierenden Muskeln angefertigt. Der Vorzug dieser Methode ist, dass Kryoschnitte einfach zu schneiden sind und die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern erlauben.

Nach Anfertigung der Immunhistochemie wurden die histologischen Analysen der Mm. adductorii mithilfe eines konventionellen Fluoreszenzmikroskops durchgeführt. Das Gewebe der Tiere war mit endothelialen und glatten Muskelzellmarken angefärbt. Arterien der Kollateralregion mit einem Durchmesser kleiner als  $100 \mu\text{m}^2$  sowie Äste der A. femoralis profunda wurden nicht gezählt. Der Mittelwert der Kollateralgefäßfläche wurde kalkuliert, um mögliche strukturelle Differenzen aufzuzeigen. Die morphometrische Analyse wurde durchgeführt, wie durch Heil *et al.* im Jahr 2004 beschrieben<sup>119</sup>.

Verglichen mit anderen Studien, wo nur Epon eingebettete semi-dünne Schnitte von zwei oberflächliche Kollateralarterien pro Muskel mit Toluidin Blau angefärbt und unter dem Lichtmikroskop analysiert wurden<sup>165</sup>, war die hier verwendete Methode exakter, da alle Kollateralgefäße des M. adductor in die morphometrische Analyse eingeschlossen werden konnten. Die komplette Analyse ist von besonderer Bedeutung, da alle Kollateralgefäße zur Blutversorgung im distalen Perfusionsgebiet beitragen und daher in der Auswertung berücksichtigt werden sollten.

Die zuvor gewonnenen Ergebnisse der quantitativen und funktionellen Untersuchung der Durchblutung ließen vermuten, dass das Remodeling der Kollateralarterien bei  $\text{Abra}^{-/-}$  Mäusen geringer war als in den Kontrolltieren. Ziel der morphometrischen Auswertung war diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen. Um herauszufinden, ob die verringerte Erholung der Durchblutung der  $\text{Abra}^{-/-}$  Mäuse tatsächlich auf ein vermindertes Kollateralwachstum zurückzuführen ist, wurden zunächst histomorphologische Analysen des kollateralen Gefäßdiameters im Adduktormuskel durchgeführt. Der Diameter und die Wanddicke der präexistenten Arteriolen unterschieden sich zwischen den WT und  $\text{Abra}^{-/-}$  Mäusen nicht.

Während in den WT Tieren drei Wochen nach Arterienokklusion eine 75%-ige Vergrößerung des arithmetischen Mittels des Kollateralgefäßdiameters beobachtet wurde, vergrößerte sich in  $\text{Abra}^{-/-}$  Mäusen der durchschnittliche Kollateraldiameter nur um 47 %. Dies zeigt ein verschlechtertes Kollateralarterienwachstum in Mäusen mit fehlendem  $\text{Abra}$ . Der innere Gefäßdurchmesser und die arterielle luminale Gefäßfläche wurden evaluiert. Diese Methode ermöglicht die Messung der vaskulären Wandfläche. Im Gegensatz zum äußeren Gefäßdiameter vergrößerte sich der innere Diameter zwar ebenfalls tendenziell stärker in der WT Gruppe, die dargestellten Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant. Dies bestätigt einen tatsächlich vorhandenen arteriogenen Kollateralwachstumsstimulus und spricht gegen eine bloße Gefäßdilatation.

Im Vergleich zu diesen Ergebnissen nahmen Kollateral-Wandfläche und Kollateral-Wanddicke 21 Tage nach Ligatur in den  $Abra^{-/-}$  Mäusen kaum zu. Diese Messungen differieren signifikant von den eindrücklichen Resultaten der WT Tiere. Diese Ergebnisse bestätigen die obigen Perfusionsdaten und indizieren eine inkomplette Ausbildung der Kollateralarterien in Mäusen mit defizientem  $Abra$ .

Um die Spezifität des ischämischen Hinterlaufmodells für Arteriogeneseprozesse zu verifizieren, wurde zusätzlich in den *Mm. gastrocnemii* eine Kapillar-Dichte-Bestimmung durchgeführt. Hierzu wurden die histologischen Färbungen wie bei den morphometrischen Analysen im *Mm. gastrocnemii* angefertigt, ohne dass FITC-konjugierte, monoklonale Antikörper gegen Aktin des glatten Muskels verwendet wurden. Die Ergebnisse 21 Tage nach Ligation zeigten zwar eine leichte Zunahme der Kapillar/Muskelfaser Ratio im rechten Hinterlauf, aber es fanden sich weder bei WT und KO Tieren signifikanten Unterschiede. Zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigte sich auch keine relevante Differenz der Kapillardichte, die die gefundenen Ergebnisse der Durchblutungsmessungen erklären könnten. Im distalen Hinterlauf fand sich demnach kein Hinweis auf einen relevanten angiogenen Stimulus nach Femoralarterienligatur. Die Bestimmung der Kapillardichte brachte daher weitere Belege für die Arteriogenese-Spezifität des ischämischen Hinterlaufmodells. Das beobachtete Gefäßwachstum in den WT Mäusen ist demzufolge auf arteriogene Prozesse zurückzuführen, oder anders formuliert, das verminderte Kollateralwachstum der KO Mäuse resultiert aus einer eingeschränkten Arteriogenese, begründet durch das Fehlen von  $Abra$ .

### **3.4.7 ANGIOGRAPHISCHE EVALUATIONEN DER ARTERIOGENESE**

Zur Feststellung, ob das arteriogene Kollateralwachstum bei  $Abra^{-/-}$  Mäusen auch visuell quantifizierbar vermindert ist, wurden 28 Tage nach der Operation *post mortem* Angiogramme der Hinterläufe beider Versuchsgruppen angefertigt. Die Aorta abdominalis wurde hierzu am 28. Tag nach Femoralarterienligatur kanüliert und in die peripheren Arterien ein Kontrastmittel auf Wismut-Basis injiziert.

In der qualitativen Bewertung zeigte sich in den Angiographien der  $Abra^{-/-}$  Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich sichtbare Verminderung in Anzahl und Durchmesser der gewachsenen Kollateralgefäße.

Auf der Seite des okkludierten Hinterlaufs in WT Tieren konnte eine höhere Dichte eines gut entwickelten Kollateralnetzwerkes identifiziert werden. Die Kontrollgruppe zeigte entsprechend bessere funktionelle Ergebnisse (wie oben beschrieben). Die Mäuse mit defizientem Abra Gen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger und kleinere Kollateralarterien. Dieses Resultat korrespondiert mit der beobachteten schlechten funktionalen Erholung des rechten Hinterlaufes bei ligierter A. femoralis in Abra<sup>-/-</sup> Tieren.

Für eine exakte quantitative und statistische verwertbare Ausmessung der Kollateralgefäße war in allen Mäusen der arterielle Durchmesser zu gering und die Bildqualität aufgrund der zweifachen Vergrößerung nicht ausreichend. Es muss bei der Auswertung der Angiographien außerdem beachtet werden, dass bei dieser röntgenbasierten Methode eine limitierte Gefäßdetektion besteht, da die Gefäße erst durch Wachstum die Grenze der angiographischen Auflösung von circa 50 µm überschritten haben müssen. Es besteht also die Möglichkeit, Kollateralarterien wegen ihres zu geringen Durchmessers angiographisch nicht darstellen zu können. Die geringere Anzahl gefundener Kollateralgefäße in den Abra<sup>-/-</sup> Tieren könnte so erklärt werden.

Die Methode der Angiographie bietet also lediglich die Option qualitativer Evaluationen des Kollateralgefäßwachstums durch direkten optischen Vergleich zwischen den experimentellen Mäusegruppen und hat im quantitativen Bereich deutliche Limitationen.

Eine Möglichkeit, die Aussagekraft der Angiographien zu erhöhen, wäre die chronische Ischämie im Hinterlaufmodell mit größeren Versuchstieren durchzuführen: Beispielsweise finden sich bei Kaninchen 38 potentielle Kollateralen, wohingegen in C57BL/6 Mäusen nur acht bestehende Kollateralgefäße bestehen<sup>72, 73</sup>. Ein Nachteil dieses denkbaren Versuchsaufbaus wäre, dass keine KO Tiere untersucht werden könnten.

## 4 DISKUSSION

Arteriogenese ist definiert als multifaktorieller Prozess, der entweder durch positives Remodeling präexistierender Kollateralen oder durch *de novo* Arteriogenese mithilfe von Arterialisierung des Kapillarnetzes neue Arterien nach arterieller Okklusion bildet und so die Durchblutung adaptiert.

Im Gegensatz hierzu beschreibt Vaskulogenese eine Blutgefäßformation durch vaskuläre Progenitorzellen während der embryonalen Entwicklung<sup>20</sup>. Angiogenese stellt wiederum die *de novo* Formation eines kapillaren Netzwerkes dar, stimuliert durch Gewebeverletzungen, Hypoxie oder Ischämie<sup>87</sup>.

Die Biologie der Arteriogenese ist bisher unvollständig verstanden. Mit der detaillierten Aufklärung der grundlegenden Mechanismen der Arteriogenese soll die Möglichkeit geschaffen werden, Wachstum von Kollateralkreisläufen nach einem Arterienverschluss pharmakologisch zu stimulieren, um schneller funktionstüchtige Arterien zu formen. Schaper *et al.* verifizierten mit ihren Studien zum schubspannungsstimulierten Kollateralwachstum die zentrale Rolle des Rho-Signalwegs während der Arteriogenese und eine damit verbundene Hochregulation des Aktin-bindenden Proteins Abra<sup>19</sup>.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun systematisch der Einfluss des Abra Gens auf den Mechanismus der Kollateralarterienentwicklung nach einem Hauptgefäßverschluss untersucht und so die funktionelle Implikation von Abra für Arteriogenese definiert werden. Das Ziel dieser Studie war schließlich herauszufinden, ob Abra einen möglichen Ansatzpunkt in der Therapie vaskulärer Verschlusskrankheiten darstellt.

Im Einzelnen ergab die vorliegende Arbeit folgende Resultate:

1. Die quantitativen Messungen des Laser Doppler Imaging und der Hämoglobin-Sauerstoffmessung demonstrieren eine vergleichsweise verringerte Erholung der Durchblutung in Abra<sup>-/-</sup> Tieren.
2. Die funktionellen Messungen der aktiven Fußbewegung zeigen eine langsamere Erholung der Belastungsfähigkeit und somit der Durchblutung im rechten Hinterlauf bei Abra<sup>-/-</sup> Mäusen.

3. Die morphometrischen Analysen der Kollateralen in den Mm. adductorii verifizieren eine inkomplette Ausbildung der Kollateralarterien in Mäusen in Abwesenheit von Abra.
4. Die Kapillar-Dichte-Bestimmung in den Mm. gastrocnemii bestätigt die Spezifität des ischämischen Hinterlaufmodells für Arteriogeneseprozesse.
5. Die *post mortem* Angiographien unterstreichen visuell eine Verminderung in Anzahl und Durchmesser der gewachsenen Kollateralgefäße bei Abra<sup>-/-</sup> Mäusen.

Alle Ergebnisse dieser Arbeit zusammen genommen implizieren eine verschlechterte Arteriogenese in Abwesenheit von Abra, aber keinen kompletten arteriogenen Wachstumsausfall der Kollateralgefäße.

#### 4.1 ABRA EXPRESSION IN DER ARTERIOGENESE

Am Max-Planck-Institut Bad Nauheim konnten wir 2009 eine basale mRNA-Expression von Abra und das zugehörige Genprodukt in Blutgefäßen nachweisen.

Auf der Suche nach einem Vermittler des physikalischen Stimulus der Schubspannung in ein Wachstumssignal wurde zunächst das bewährte Arteriovenöse-Shunt Modell auf Ratten adaptiert und das Genexpressionsprofil in den durch Schubspannung zum Wachstum stimulierten Kollateralen analysiert. Es wurde eine Vermehrung von Transkripten gezeigt, die auf eine wichtige Rolle des Aktinzytoskelettes im Remodelingprozess hinweisen. Außerdem konnte auf eine Aktivierung des Rho/„Rho-Associated Kinase“ (ROCK)-Signalwegs und des Calcium-Signalwegs geschlossen werden<sup>117</sup>. Mit einer quantitative Real Time Polymerase Chain Reaktion (qRT PCR) wurde demonstriert, dass zusätzlich zu RhoA, SRF und Tmsb4 vor allem Abra in wachsenden Kollateralarterien stark (bis zum 16-fachen) hoch reguliert wird. Die verstärkte Expression des Abra kodierenden Gens korreliert mit der Einwirkung der Schubspannung in wachsenden Kollateralarterien und setzt so möglicherweise die Schubspannung in ein Wachstumssignal um. Zwischen Kontroll-, Ligatur- und Shunttieren wurde in den umgebenden Skelettmuskelzellen und in glatten Muskelzellen der Aorta jedoch keine Differenz in der Anzahl an Abra Transkripten gefunden, so dass lediglich in wachsenden Kollateralgefäßen von einer gesteigerten Abra Expression ausgegangen werden kann<sup>117</sup>. Bei der Bestimmung der zellulären Lokalisation von Abra in der Kollateralgefäßwand wurden Abra mRNA Transkripte vor allem in den Kernen sensorisch-tätiger Endothelzellen und auch im Zytosol proliferierender glatter Muskelzellen nachgewiesen<sup>117</sup>.

In der Literatur wird außerdem beschrieben, dass Abra auch während des hypertrophen Wachstums des Herzens Stress-induzierbar ist und als Antwort auf Calcineurin Aktivierung und Drucküberlastung deutlich vermehrt exprimiert wird<sup>112, 113</sup>. Denkbar wäre, dass die verstärkte Abra Expression Ursache oder Folge des Umbauprozesses in Herz und Gefäßen ist. Da aortale Zellen der Rate nach zyklischem Stress nicht mit der vermehrten Expression von Abra mRNA reagierten, ist davon auszugehen, dass die Hochregulation von Abra exklusiv durch Schubspannung induziert wird<sup>117</sup>.

Abra gilt somit als potentieller Mediator der Schubspannung und als Mitogen für glatte Muskelzellen in Zellkultur. Die exakte Rolle von Abra in Blutgefäßen konnte jedoch noch nicht abschließend definiert werden<sup>117</sup>.

#### 4.2 VERMINDERTE ARTERIOGENESE IN ABWESENHEIT VON ABRA

Um die in der vorliegenden Dissertation dargestellten Ergebnisse zu verstehen, müssen die zugrundeliegenden biologischen Prozesse und physiologischen Effekte der Arteriogenese betrachtet werden. Diese sind zum jetzigen Zeitpunkt trotz verschiedenster Bemühungen noch nicht vollständig verstanden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente stehen im Zusammenhang mit weiteren Versuchen, die zur Aufklärung der Rolle von Abra in der Arteriogenese gemacht wurden: Mithilfe von Abra<sup>-/-</sup> Mäusen wurde der „loss-of-function“ untersucht. Die Quantifikation der Gewebepfusion im distalen Hinterlauf der Abra<sup>-/-</sup> Mäuse nach Femoralarterienligatur und der nicht-transgenen Tiere durch Laser Doppler Imaging demonstriert eine verminderte Arteriogenese in Abra<sup>-/-</sup> Tieren. Diese konnte durch morphometrische Untersuchungen bestätigt werden, Die unveränderte Kapillardichte im distalen Hinterlauf beider Gruppen schloss einen angiogenen Stimulus als Ursache hierfür aus. Die Resultate der vorliegenden Studie belegen somit, dass die gezielte Deletion von Abra in Mäusen zu verminderten Arteriogeneseprozesse führt.

Zur genaueren Differenzierung wurden am Max-Planck-Institut Bad Nauheim auch Experimente zur „gain-of-function“ durchgeführt. Die Genexpression wurde *in vivo* moduliert<sup>116</sup> und zur schnellen Prüfung der Abra Funktion ein transienter, intra-kollateraler Gentransfer mit einem rekombinanten Adenoviren (Ad\_Abra) durchgeführt. Zur Transfektion von Abra wurde hierfür ein „Cytomegalie-Virus“ (CMV) Promotor verwandt. Ad\_Abra wurde intrakollateral in den Hinterlauf von Kaninchen injiziert. Dies ermöglichte die effiziente Modulation der Genexpression, begrenzt auf einen bestimmten Gefäßabschnitt<sup>166</sup>. Die Injektion wurde nach einer initialen Femoralarterienligatur ohne AV-Shunt durchgeführt, um

zu bestimmen, ob Abra alleine den Effekt von Schubspannung ersetzen kann. Eine temporäre Okklusion proximal der Ligatur unterbrach die Durchblutung und ermöglichte der Viruslösung eine Inkubationszeit von 30 Minuten innerhalb der Kollateralarterien, bevor der Verschluss wieder eröffnet wurde. Eine transgen-spezifische PCR bestätigte, dass virale Transkripte lediglich in den Kollateralen der Virus-behandelten Seite detektiert wurden, nicht aber im Gewebe auf der Kontrollseite. Eine Akkumulation des Virus konnte außerdem in der Milz beobachtet werden. Keine viralen Abra Transkripte erschienen in den Kollateralen von Ad\_LacZ behandelten Tieren. Ein Maximum einer 2,5-fachen Überexpression von Abra konnte erreicht werden. Dieses Ergebnis resultierte in einer signifikanten Verbesserung der maximalen kollateralen Konduktanz sieben Tage nach Gentransfer, was wiederum eine partielle hämodynamische Stimulation des Effektes eines AV-Shunts repräsentiert und vergleichbar mit Ergebnissen des arteriogenen Faktors MCP-1 ist<sup>18, 116, 167</sup>. Obwohl Abra nicht der Gruppe der Wachstumsfaktoren angehört, stimuliert Abra Überexpression also das Kollateralwachstum *in vivo*. Troidl *et al.* konnten so die natürliche arteriogene Antwort durch Abra belegen, aber keine vollständige Kompensation der Durchblutung erreichen.

Da Abra unter Bedingungen mit artifiziell erhöhter Schubspannung stark hoch reguliert wird, könnte in einem zukünftigen Versuchsaufbau angestrebt werden, eine Shunt-Operation in Abra<sup>-/-</sup> Mäusen zu etablieren, um eventuell eine noch stärkere Hemmung des Kollateralwachstums zu provozieren.

Die Stimulierung der Arteriogenese durch Abra-Überexpression konnte demnach durch Troidl *et al.* demonstriert werden, obwohl Abra nicht zur Gruppe der Wachstumsfaktoren gehört.

Im Rahmen der gleichen Grundlagenarbeit aus dem Max-Planck-Institut Bad Nauheim wurde auch der Umkehrschluss durch Adenoviren, die einen siRNA vermittelten „Knockdown“ endogenen Abras bewirken, geprüft. Ein Abra „Knockdown“ bewirkte eine deutliche Hemmung des Kollateralwachstums und damit der Arteriogenese. Dies impliziert, dass Abra Voraussetzung für Arteriogenese ist<sup>116</sup> und lässt sich mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit vereinbaren, dass die Wiederherstellung der arteriellen Blutversorgung ohne Abra vermindert ist. Es findet zwar eine Arteriogenese statt, diese setzt jedoch nur verzögert ein und bleibt erwartungsgemäß inkomplett. Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, dass Abra eine aktive regulative Rolle während des arteriogenen Signalwegs im Kollateralarterienwachstum spielt und bestätigt letztendlich den essentiellen Charakter von Abra für die Arteriogenese.

### 4.3 DIE ROLLE VON ABRA IN DER ARTERIOGENESE

Während der Arteriogenese finden sich in allen arteriellen Wandschichten strukturelle Veränderungen, der Fokus der Umbauprozesse liegt jedoch in der Tunica Media. Der Großteil der Gewebeproduktion erfolgt in den glatten Muskelzellen, die ihren Phänotyp von kontraktile zu proliferativ-synthetisch verändern können. Außerdem wird dieser Prozess von intrazellulären, kontraktilen, zytoskelettalen und extrazellulären Matrixproteinen aus embryonalen Expressionswegen begleitet<sup>168</sup>.

Zu Beginn der Arteriogenese kommt es zunächst zu einer Stress-induzierten Deformation von Endothelzellen und einer damit einhergehenden Veränderungen der zytoskelettalen Spannung und Organisation. In Folge dessen werden Signale ausgesendet, die gemeinsam agieren und wiederum zu einer Vielzahl von verschiedenen Antworten führen. Die Integrität des Zytoskeletts wird beeinflusst und hat damit Auswirkungen auf die Genexpression und das Wachstum von Muskelzellen.

In gestreiften Muskelzellen ist Abra subzellulär in der I-Bande und in geringerem Ausmaß zwischen den Z-Scheiben des Sarkomers lokalisiert. Abra könnte hier eine vermittelnde Rolle zwischen der Myozytenstruktur und der Muskelgenexpression spielen<sup>116, 169</sup>. Troidl *et al.* erweiterten diese Vermutungen über die Beeinflussung der potentiellen Mechanotransduktion durch Abra auch auf glatte Muskelzellen<sup>117</sup>. Die schubspannungsinduzierte Stimulation der Abra Transkription und Abra Translation im Zytoplasma von glatten Muskelzellen deutet auf eine potentielle Involvierung von Abra während der frühen Phase der Arteriogenese hin.

Bei einer Analyse des Abra Promotors finden sich zwei potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen, die stromaufwärts vom Transkriptionsstart lokalisiert sind und eine transkriptionale Kontrolle von Abra andeuten. Die erste dieser regulatorischen Einheiten beinhaltet eine TATA Box und eine „Myocyte-specific Enhancer Factor-2C“ (MEF-2C) Bindestelle und die zweite enthält eine TATA Box und eine „Activating Transcription Factor-4“ (ATF-4 oder CREB-2) Bindestelle. Diese Entdeckung erscheint plausibel, da die Calcium-abhängigen MEFs in vielen muskelspezifischen regulatorischen Prozessen involviert<sup>170, 171, 172</sup>. In der Tat wurde kürzlich auch eine MEF-2-abhängige Abra Transkription beschrieben<sup>114</sup>.

Zusätzlich finden sich in der Literatur Hinweise, dass der Abra Promotor auch eine „DNA replication-related element“ (DRE)-Seite enthält, an die wiederum der Calcium-abhängige Repressor „DRE-antagonist modulator“ (Dream) bindet, auch bekannt als „Kv channel interacting protein 3“ (Kcni3). Es finden sich also Hinweise auf eine potentiell Calcium-abhängige Regulation der Genexpression<sup>97</sup>. Calcium scheint auch in die Produktion von MCP-1 involviert zu sein<sup>173</sup>, das wiederum Voraussetzung für die Arteriogenese ist<sup>110,119</sup>.

Die Schubspannung in den Kollateralen verursacht als frühestes Ereignis der Arteriogenese eine Öffnung des mechanosensitiven Calcium-Ionenkanals TRPV4 in den Endothelzellen<sup>174</sup>, es folgt ein lang andauernder, niedrig dosierter Calcium-Einstrom in das Zytoplasma der Endothelzelle. Calcium bewirkt die Translokation von Dream vom Nukleus ins Zytoplasma und könnte so eine Abra Transkription induzieren<sup>175</sup>. Die Calcium-abhängigen Transkriptionsfaktoren „Nuclear Factor of Activated T-cells“ (NFAT), Dream und AP-1 werden hochreguliert und es kommt zur Expression von MCP-1, Aktivierung von eNOS und Produktion verschiedener Zytokine. Die Tatsache, dass Bindungsstellen von zwei der drei bekanntesten Calcium-abhängigen transkriptionalen Effektoren (NFAT, MEF-2, Dream) im Abra Promotor zu finden sind, unterstreicht die potentielle Calcium-abhängige Regulation<sup>176</sup>. Diesen Vermutungen müsste allerdings noch weiter biochemisch nachgegangen werden.

Abra könnte eine essentielle Position in der Übersetzung der Schubspannung bei glatten Muskelzellen in ein Wachstumssignal einnehmen. Wie im vorherigen Absatz beschrieben wäre ein mögliches Mechanotransduktionsschema, dass eine schubspannungs-induzierte Öffnung von TRPV4 über Calcium-vermittelte Translokation des transkriptionalen Repressors Dream zu einer erhöhten Abra Expression führt.

Abra initiiert über den Rho/ROCK Signalweg die Migration von Monozyten, fördert als potentieller Mediator die Proliferationsaktivität von glatten Muskelzellen und bedingt die differentielle Expression einer Reihe weiterer Gene. Theoretisch wäre denkbar, dass Abra in Zellkultur als direktes Mitogen für glatte Muskelzellen agiert oder aber indirekt der Reprogrammierung eines bestimmten Wachstumsphänotyps mitwirkt, der durch die Replikationsmöglichkeit in eine autonome, mitogen-unabhängige Art charakterisiert ist, ähnlich wie es bereits für embryonale aortale glatte Muskelzellen in Zellkultur gezeigt werden konnte<sup>177, 178</sup>. Der physikalische Stimulus der Schubspannung kann also durch Abra in ein Wachstumssignal überführt werden<sup>116</sup>.

Eine Überexpression von Abra stimuliert entsprechend die Arteriogenese und kann so die Stimulation durch Schubspannung teilweise ersetzen. Beim Knockout von Abra scheint die Reorganisation, vermittelt durch Rho-GTPasen, des Zytoskeletts, nur verlangsamt abzulaufen<sup>179</sup>. Abra könnte daher als initialer Regulator der Arteriogenese bezeichnet werden.

#### 4.4 ARTERIOGENE SIGNALWEGE

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich vor allem drei Signaltransduktionswege, die während des komplexen Prozesses der Arteriogenese aktiviert werden: Der Rho-Signalweg, der NO-Signalweg und der Ras/„Extracellular signal-Regulated Kinase“ (ERK, entspricht MAPK) Signalweg<sup>59, 102</sup>. Viele Details über die arteriogene Signalkaskade gelten zum jetzigen Zeitpunkt noch als unklar.

Verschiedene physiologische Kräfte beeinflussen die Größe des arteriellen Gefäßbaums, die Schubspannung gilt aber als die wichtigste<sup>80, 83</sup> und als Initiator der Arteriogenese (siehe Kapitel 1.2.13). Wie die durch Schubspannung in der Endothelzelle generierten Signale in eine Wachstumsstimulation für die glatte Muskelschicht der Media übersetzt werden, die wiederum vom Endothel durch die Lamina elastica interna getrennt ist, bleibt aktuell unklar. Keine der bereits bekannten endothelialen streß-responsiven Proteine wie KLF-2<sup>180</sup>, PECAM-cadherin-VEGFR-2-complex<sup>181</sup> oder TRPV4<sup>182</sup> erklären die Proliferation der glatten Muskelzellen in der Media. Bisher konnten auch keine Kontaktstellen zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen in den Kollateralen nachgewiesen werden<sup>85, 91</sup>. Es wird daher von diffundierbaren Transmittern zur Kommunikation ausgegangen, zum Beispiel NO, Sauerstoffradikale, Endothelin und/oder löslichen Faktoren wie VEGF. Weitere Untersuchungen wären wünschenswert, um die Frage der Kommunikation zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen zu klären.

Durch die erhöhte Schubspannung werden in jedem Fall verschiedene zusammenspielende Signale in der Endothelzelle ausgelöst<sup>183, 184</sup>, unter anderem Expression von Chemokinen<sup>167</sup>, Produktion von Adhäsionsmolekülen<sup>72</sup>, Rho-Aktivierung und NO-Produktion sowie Hochregulation von Integrinen<sup>185</sup>. Es lässt sich feststellen, dass die mechanische Schubspannung also nicht durch einen einzelnen Mechanorezeptor in eine interne Antwort übersetzt wird<sup>186</sup>. Insbesondere Integrinen wird eine wichtige Bedeutung im arteriogenen Übertragungsprozess zugesprochen<sup>187, 188</sup>. Das heterodimere Intergrin  $\alpha\beta_3$  gilt beispielsweise als ein wichtiges Signal für Arteriogenese, denn es ist in Endothelzellen und glatten Muskelzellen von wachsenden Gefäßen selektiv erhöht<sup>188</sup> und wirkt als Effektor der Rho-GTPase (Abbildung 20). Gleichzeitig beeinflussen auch die Rho-GTPasen die Integrine.

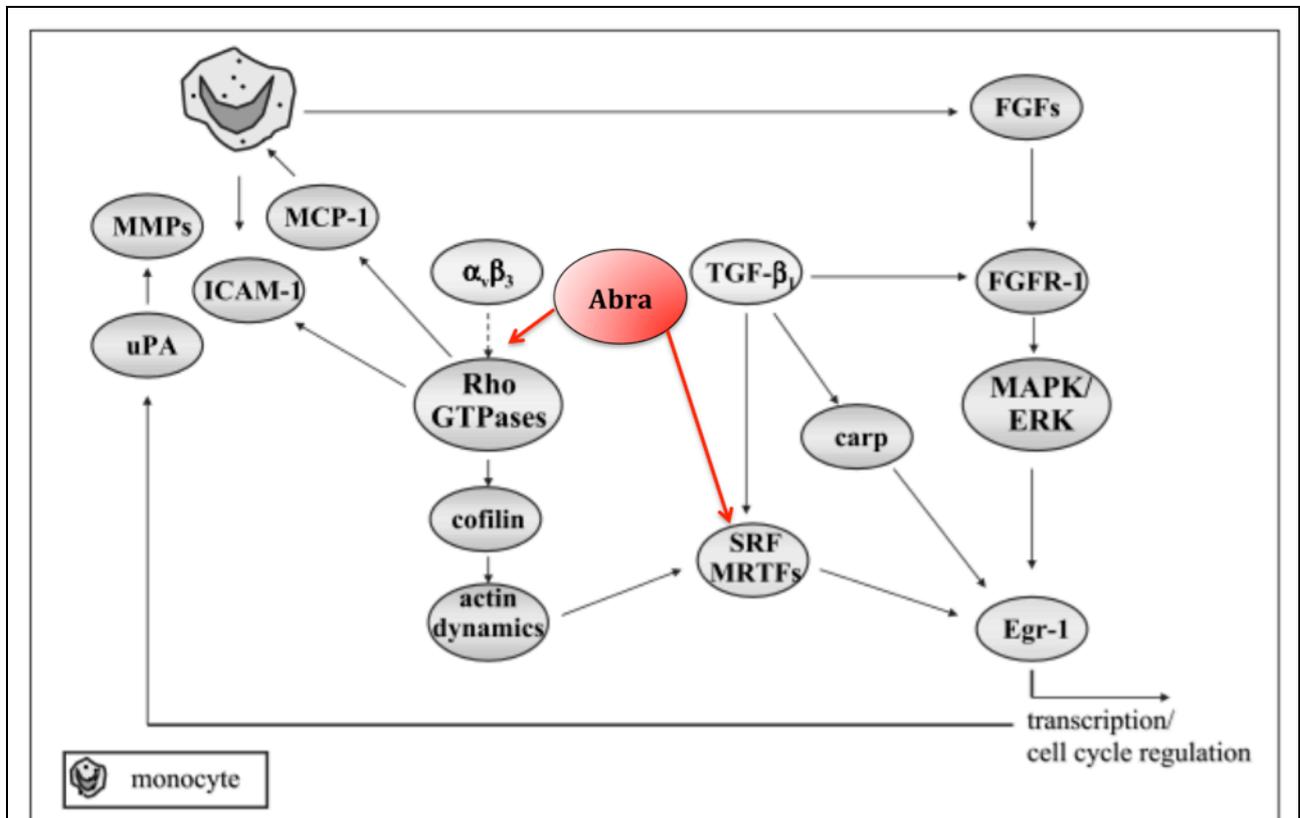


Abbildung 20. Schematisches Flussdiagramm des Rho- und des Ras/MAPK-Signalwegs in der Arteriogenese. Dargestellt sind die Transkriptionsfaktoren SRF/MRTFs und Egr-1 sowie die Induktionsfaktoren  $\alpha\beta_3$  und TGF- $\beta_1$ . Abra aktiviert RhoA und MRTFs. Nach Deindl 2007<sup>189</sup>.

Nach der Aktivierung des Rho-Signalwegs werden RhoA, Cofilin, FAK und Vimentin im Gewebe der wachsenden Kollateralarterien deutlich hochreguliert<sup>19, 190</sup>. Der Rho-Signalweg beeinflusst die Zellbeweglichkeit und Modifikation des endothelialen Aktin-Zytoskeletts<sup>191</sup> und bewirkt somit die Reorganisation von Kollateralgefäßen während der Arteriogenese. Außerdem spielt der Rho-Signalweg eine wichtige Rolle in der Proliferation glatter Muskelzellen<sup>192</sup>. Den Beweis für die arteriogene Bedeutung des Rho-Signalwegs liefert der Rho-Signalweg-Antagonist „Fasudil“, der die Rho Kinase hemmt und so als Inhibitor von Arteriogeneseprozessen fungiert<sup>19</sup>.

Das Vorliegen von NO erscheint ebenfalls grundlegend, um den Rho-Signalweg zu aktivieren<sup>193</sup>. NO kann während der Arteriogenese in wachsenden Kollateralgefäßen verstärkt nachgewiesen werden<sup>194</sup> und produziert wahrscheinlich einen Rho-activating Faktor, der durch hohe Schubspannung aktiviert wird<sup>195</sup>. NO stammt aus den Monozyten/Makrophagen im perivaskulären Raum, die dort autokrin aktiviert und zur Mitogen-Produktion stimuliert werden<sup>71</sup>. Das Vorhandensein von NO gilt als wichtige Verbindung in den arteriogenen Signalwegen, da eine Hemmung der NO-Synthese mithilfe von L-NAME die Transkription von *Abra* blockiert, den RAS-MAPK Signalweg verhindert und die Arteriogenese hemmt<sup>117</sup>. Experimentelle NO-Infusionen führten allerdings nicht zu einer vermehrten Durchblutung. Auch eine Überexpression von eNOS in transgenen Mäusen konnte keine Arteriogenese stimulieren<sup>196</sup>. NO scheint außerdem auch einen starken antiproliferativen Effekt zu haben, daher wird vermutet, dass der komplexe NO-Signalweg zum größten Teil noch unverstanden ist.

Der Rho- und der NO-Signalweg scheinen eine gleichwertige Bedeutung in der Arteriogenese zu haben, da die jeweilige Inhibierung jegliche Arteriogenesevorgänge hemmt. Die gemeinsame Endstrecke beider Signalwege ist vermutlich die Ras/MAPK Signalkette.

Signale von Wachstumsfaktoren werden durch den RAS-ERK Signalweg übersetzt und führen so zur Zellproliferation<sup>197</sup>. Auch Mitglieder dieses Signalwegs sind mit hoher Aktivität in wachsenden Kollateralgefäßen zu finden. Die Signalübertragung des RAS-MAPK-Systems ist abhängig von der Bioverfügbarkeit von „Fibroblast Growth Factor Receptor-1“ (FGFR-1), dessen Expression positiv durch TGF- $\beta$ 1 beeinflusst wird<sup>198, 199</sup>. Wie gebundenes TGF- $\beta$ 1 während der Arteriogenese aktiviert wird, ist noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass TGF- $\beta$ 1 als Produkt der proteolytischen Spaltung von Plasminogen durch uPA aktiviert wird

#### 4.4 ABRA IM RHO SIGNALWEG

Abra als muskelspezifisches Aktin-bindendes Protein hat die Eigenschaften, den Rho-Signalweg zu aktivieren, die Aktindynamik und die zytoskelettale Integrität sowie die SRF abhängige Gentranskription zu beeinflussen<sup>112</sup>. Somit ist Abra in diverse Mechanismen involviert, die das arterielle Kollateralwachstum beeinflussen und gegebenenfalls positiv beeinflussen können.

Die Aktivierung vom Rho-Signalweg wird durch mechanische Belastung ausgelöst<sup>113</sup>. Von früheren Studien weiß man, dass der Rho-Signalweg in Durchblutungs-abhängige Umformung von kleinen Arterien<sup>201</sup> und insbesondere in Arteriogeneseprozesse involviert ist<sup>19</sup>. Demzufolge scheint Abra eine wichtige Rolle in der Arteriogenese zu spielen. Verstärkte Rho Expression in Schubspannungs-stimulierten Kollateralen und in Ad\_Abra behandelten Kollateralen suggerieren eine kausale Verbindung von Abra und RhoA während der Arteriogenese.

Im Zytoplasma der glatten Muskelzellen wachsender Kollateralarterien wird die Transkription und Translation vom Abra stark hoch reguliert, wie Troidl *et al.* zeigen konnten<sup>117, 202</sup>. Abra aktiviert das Protein RhoA<sup>112</sup>, das wiederum das Zellwachstum bei Zellformveränderungen reaktiv unterstützt<sup>203</sup>. Außerdem stimuliert Abra die Translokation von „Myocardin-Related Transcription Factors“ (MRTFs). Diese wiederum beinhalten transkriptionale Koaktivatoren und regulieren die SRF abhängige Transkription<sup>189, 204</sup>. SRF selber wird ebenfalls unter Bedingungen mit hoher Schubspannung hoch reguliert<sup>189</sup>. Die RhoA-abhängige Regulation des Aktin-Zytosklettes beeinflusst selektiv die Differenzierung der Genexpression in glatten Muskelzellen, indem die SRF abhängige Transkription durch Abra moduliert wird<sup>205</sup>. SRF ist Transkriptionsfaktor einer Vielzahl von Genen, die in Zellproliferation und –differenzierung involviert sind<sup>189</sup>. SRF bindet insbesondere über „Serum Response Element“ (SRE)-Bindungsstellen an den Promoter von Egr-1 und stimuliert die Egr-1 Transkription<sup>206</sup>. Egr-1 ist für Progression, Migration und Proliferation im Zellzyklus wichtig<sup>189</sup>. Die Hochregulation von SRF scheint unabhängig von der Aktivierung der MAPK-1 und -2 zu sein<sup>71</sup>.

Veränderungen der Aktindynamik sind kennzeichnend für Arteriogenese: Der Phänotyp-Wechsel der glatten Muskelzellen vom kontraktilen zu synthetischen Status wird durch den Verlust von Aktin-Filamenten charakterisiert, was wiederum Resultat der Herunterregulation von Aktin-Transkripten und auch abhängig vom Grad der Aktin-Polymerisation ist. Durch chronisch erhöhte Schubspannung verlängert sich der Dedifferenzierungsstatus von glatten Muskelzellen und reguliert in der Folge die differentielle Expression von Aktin(de)polymerisations Proteinen wie Destrin, Cofilin 1, Cofilin 2 und Transgeline 2 herauf<sup>90</sup>. Die immunhistochemische Anfärbung von F-Aktin und G-Aktin zeigt, dass F-Aktin fragmentierter vorliegt während G-Aktin in Shuntgefäßen stärker akkumuliert. Abra unterstützt aktiv die Formation von F-Aktin<sup>112</sup> und könnte so seine pro arteriogenen Effekte erreichen. Rho-Aktivierung wiederum führt zu Aktin-Polymerisation. Dieser anscheinende Widerspruch korrespondiert und erweitert vorausgegangene Feststellungen über forcierte Abra Überexpression: Eine erhöhte Expression von Abra als Reaktion auf Streß-Stimulation resultiert initial in einem Kompensationsmechanismus bei erhöhtem (monomeren?) Aktinanteil, um die zytoskelettale Integrität und die arterielle Funktion aufrecht zu erhalten<sup>114</sup>. Die länger anhaltende Überexpression der Abra Expression führt zu Adaptation, die im Mausmodell der kardialen Hypertrophie wiederum zu adversen kardialen Umbau<sup>114</sup> oder im Modell mit Femoralarterienligatur bei Ratten und Kaninchen zu verstärktem Kollateralwachstum führt. Interessanterweise kommt es in beiden Fällen parallel zur Abra Überexpression zu einer Aktivierung eines SRF-abhängigen fetalen Genprogramms im resultierenden vaskulären Umbauprozess<sup>168</sup>.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass es in Abwesenheit von Abra zu einer verminderten Arteriogenese, aber nicht zu einem kompletten arteriogenen Wachstumsausfall der Kollateralgefäße kommt, erklären sich vor diesem Hintergrund. In Abra<sup>-/-</sup> Mäusen fehlt zum einen die Aktivierung von RhoA durch Abra und somit die unterstützende Wirkung bei der Umformung des Endothels. Zum anderen findet keine Stimulation der MRTFs durch Abra statt und somit kommt es zu einer verminderten Transkription von SRF und in der Folge zu einer Verminderung von Egr-1. Zusätzlich fehlt die unterstützende Polymerisation von Aktin, der zytoskelettale Umbau läuft daher vermutlich vermindert oder verzögert ab. Dies verlangsamt die Prozesse der Arteriogenese, die Arteriogenesevorgänge werden aber nicht vollständig gehemmt, lediglich die unterstützende arteriogene Wirkung durch Abra fehlt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Abra an der Initiation der Arteriogenese beteiligt ist und im frühen Stadium der Arteriogenese bis zum 16-fachen exprimiert wird. Diese Abra Expression wird wahrscheinlich unter Schubspannungsstimulation aufrechterhalten und reguliert. Abra hat also eine funktionelle Konsequenz für das Kollateralwachstum. Außerdem wird die Proliferation von glatten Muskelzellen durch Abra stimuliert. Die essentielle Implikation von Abra für den arteriogenen Signalweg konnte in der vorliegenden Arbeit untermauert werden: Ohne Abra findet ein verschlechtertes arteriogenes Kollateralwachstum statt. Eine reduzierte Ansprechempfindlichkeit auf Stress-Signale und eine reduzierte SRF Aktivität könnte den gefundenen anti-arteriogenen Effekt in Abra<sup>-/-</sup> Mäusen erklären<sup>204</sup>. Abra könnte somit eine Position im vorhandenen existierenden Signalwege als Verbindung zwischen dem mechanischen Stimulus der Schubspannung und Proliferation der glatten Muskelzellen innehaben und so zu einem besseren Verständnis des Prozesses beitragen. Im Umkehrschluss erscheint Abra als eventuell geeigneter Kandidaten für weitere pharmakologische Forschung mit dem Ziel des therapeutischen Gefäßwachstums.

#### 4.5 ABRA IM VERGLEICH ZU ANDEREN AKTIN-BINDENEN PROTEINEN

Eine wichtige Rolle in der Arteriogenese spielen neben Abra noch weitere Aktin-bindende Proteine, die sowohl Polymerisation als auch Maturation von Aktin determinieren<sup>71</sup>. Während des arteriogenen Wachstums von Kollateralen werden diese Gene stark hochreguliert: Zum Beispiel Cofilin (2,8-fach) und Tmsb4 (2,4-fach)<sup>116</sup>. Außerdem zeigen Destrin und Transgelin Expressionsänderungen während des Kollateralumbaus<sup>116</sup>.

Tmsb4 gehört zur inhomogenen Gruppe der Thymosine<sup>207</sup>, die besonders in Zellen mit hoher Motilität vorkommen. Es existieren circa 15 homologe beta-Tymosine, bestehend aus 40 bis 44 Aminosäuren. Tmsb4 hat Einfluss auf alle drei Formen der Neovaskularisierung und kann die Differenzierung von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen triggern<sup>208</sup>. An Abra bindet nicht nur Aktin, sondern wahrscheinlich auch Tmsb4 und weitere Gene, die bereits im Zusammenhang mit Gefäßwachstum beschrieben wurden (unpublizierte Daten). Falls sich diese Vermutung bestätigt, könnte eine genauere Einordnung von Abra in bestehende arteriogene Signalwege erfolgen: TRPV4 und Abra führen im zeitlichen Verlauf die Kaskade der Genexpression nach Ligatur und AV-Shunt an, gefolgt von CARP, KLF-2 und Tmsb4. Eine kausale Abhängigkeit der Transkripte kann somit vermutet werden<sup>116</sup>.

Ein weiteres Protein, das zur Reorganisation des Zytoskeletts beiträgt, ist Cofilin. Im Gegensatz zu Abra sind zwei Isoformen von Cofilin bekannt, die sich während der Arteriogenese in denselben Zellen finden. Cofilin-1 wird in Endothelzellen und Cofilin-2 in glatten Muskelzellen von wachsenden Kollateralen exprimiert<sup>190</sup>. Nach experimenteller Femoralarterienligatur bei Kaninchen zeigte sich eine Steigerung von Cofilin-2 in der frühen Phase der Arteriogenese, aber keine Änderung von Cofilin-1. Dies impliziert, dass vor allem die Isoform Cofilin-2 am Anfang des Arteriogeneseprozesses von Bedeutung ist, wobei andere Daten darauf hinweisen, dass dieses Ergebnis Speziesabhängig ist<sup>85</sup>. Schaper *et al.* vermuten daher, dass beide Isoformen von Cofilin beim arteriogenen Gefäßumbau in verschiedenen Zellen zu bestimmten Zeitpunkten des Kollateralarterienwachstums unterschiedliche Rollen einnehmen<sup>85</sup>.

Der Rho-Signalweg beeinflusst während der Arteriogenese nicht nur Abra, sondern kontrolliert auch die Aktivität des Proteins Cofilin. Wie oben beschrieben, werden zunächst Integrine durch den mechanischen Stress der Schubspannung aktiviert und interagieren wechselseitig mit Rho-GTPasen. Die Effektoren der Rho-GTPasen aktivieren wiederum vermutlich auch Cofilin. Die Phosphorylierungs-Status von Cofilin wird durch die LIM Kinasen und die slingshot Phosphatase kontrolliert: LIM-Kinasen phosphorylieren Cofilin und führen so zur Inaktivierung, die Slingshot-Phosphatase aktiviert Cofilin durch Dephosphorylierung. Aktiviertes Cofilin führt zur Depolymerisation von Aktinfilamenten. Die Veränderung des kontraktilen Phänotyps zum synthetischen Phänotyp der glatten Muskelzellen ist Bedingung für die Mobilität während der arteriogenen Umbauphase. Parallel zu Hochregulation von Cofilin-2 wird „ $\alpha$ -smooth muscle actin“ herunterreguliert, es kann also von einem gemeinsamen Mechanismus ausgegangen werden. Aktiviertes Cofilin-2 unterstützt also den Wechsel von Aktin bei Migration und Proliferation der Zellen und somit die Progression der Arteriogenese. Abra und Cofilin nehmen somit beide eine zentrale Rolle im zytoskelettalen Umbau während der Arteriogenese ein.

#### 4.6 EXKURSION IN DIE KLINISCHE SITUATION DER ARTERIOGENESE

Verschiedene Publikationen beschäftigen sich mit der therapeutischen Arteriogenese, um Techniken und Erkenntnisse aus der experimentellen Grundlagenforschung in den klinischen Alltag umzusetzen<sup>209-211</sup>.

Da es sich bei Arteriogenese bekanntermaßen um keinen Ischämie-bedingten Prozess wie beispielsweise Angiogenese handelt, formen sich im verwendeten ischämischen Maus Hinterlaufmodell die Kollateralen nahe der Unterbrechung der Femoralarterie und nicht im ischämischen distalen Gebiet des M. gastrocnemius. So kann arterielle Umformung und/oder *de novo* Wachstum initiiert werden.

Der funktionelle Ausfall einer Arterie wie bei progredienter Stenose kann physiologisch nur durch ein „neues“ arterielles Gefäß kompensiert werden. Die effektivste Möglichkeit, die Blutversorgung bei Patienten mit hochgradigen arteriosklerotische Stenosen beispielsweise epikardialer Koronararterien oder anderer hämodynamisch relevanter Gefäßverengungen wiederherzustellen, wäre daher ein neu wachsender arteriogener Bypass zur Umgehung des Verschlusses. Der ideale natürliche Bypass sollte in etwa die gleiche Größe und das gleiche Flussvolumen haben wie das verschlossene Gefäß.

Vor circa 50 Jahren zeigte Fulton, dass kleine präexistierende verbindende Anastomosen am menschlichen Herzen bestehen <sup>212</sup>. In der Tat weisen die meisten humanen Organe ein vorbestehendes Netzwerk an Arteriolen auf, das unter einen Druckgradienten positiven Umbauprozessen unterliegt. Obwohl also grundsätzlich alle menschlichen Herzen in unterschiedlichem Maße die erforderlichen Voraussetzungen zur Arteriogenese besitzen, entwickeln im klinischen Alltag den notwendigen kollateralen Fluss nur relativ wenige Patienten, wie heutzutage mithilfe von Koronarangiographien *in vivo* dargestellt werden kann. Die Entstehung von suffizienten Kollateralarterien braucht Zeit, die in einer Situation eines akuten thrombarteriellen Verschlusses nicht gegeben ist. Die Patienten mit einem gut entwickelten Kollateralnetzwerk haben wahrscheinlich von einer chronischen Stenose mit langsamem Wachstum von muralen Thromben und nicht unbedingt von einem zufälligen stimulierten arteriogenen Signalweg profitiert. Seiler vermutet daher, dass ein gut kollateralisiertes Myokard einen akuten koronaren Verschluss mit nur minimaler Nekrose überstehen kann <sup>69</sup>. Physiologische Überlegungen lassen vermuten, dass hier Arteriogenese und nicht Angiogenese der bevorzugte Typ der Neovaskularisation zur Wiederherstellung dieser peripheren oder myokardialen Perfusion ist, denn so bilden sich die Kollateralarterien nahe der Unterbrechung der Arterie und nicht im distalen Ischämiegebiet <sup>213</sup>. Die Zukunft der arteriogenen Forschung liegt daher in der Stimulierung des Wachstums eines kompensierenden Kollateralnetzwerkes.

Heutzutage können kardiologische Patienten mit Angina Pectoris Beschwerden, die keine Besserung auf medikamentöse Therapie zeigen, bereits häufig erfolgreich interventionell oder operativ therapiert werden. In der Regel kommt zunächst eine Koronarangiographie mit PTCA zum Einsatz. Bei Stenosen über 70 %, die durch diese interventionelle Maßnahmen nicht komplett revaskularisiert werden können, und bei Hauptstammstenosen über 50 % erfolgt die Indikationsstellung zur aortokoronaren Bypass-Operation. Einige Patienten haben jedoch Kontraindikationen für diesen herzchirurgischen Eingriff, wie beispielsweise diffuse Koronarsklerose, höchstgradig eingeschränkte linksventrikuläre Ejektionsfraktion, stark reduzierter Allgemeinzustand oder fehlende Zustimmung zur operativen Behandlung. Um die Lebensqualität solcher Patienten zu verbessern, könnte eine medikamentöse Therapie zur Stimulation therapeutischer Arteriogenese als mögliche Option gelten. Ziel ist die pharmakologische Induktion neuer arterieller Gefäße, welche die effektive Blutzufuhr zum nicht mehr versorgten Myokardareal garantieren.

Aber auch im weiteren angiologischen Krankheitsbild der pAVK könnten Induktoren der Arteriogenese eine zukunftsweisende Rolle spielen. Die klinische Relevanz einer möglichen medikamentöser Arteriogeneseinduktion im Stenosegebiet wäre bei Gefäßverschlüssen ohne Möglichkeit einer konservativen Revaskularisierung durch lokale Lyse oder Einsetzen eines Gefäßstents gegeben. Dies ist beispielsweise bei Stenosen distal der Poplitealtrifurkation der Fall.

Ein therapeutisches Gefäßwachstum könnte eventuell artifiziell durch die Applikation von Wachstumsfaktoren, Zellen oder durch Verwendung erhöhter Schubspannung induziert werden<sup>90</sup>. Verschiedene klinische Studien beschäftigen sich bereits mit dem Einfluss der viel versprechendsten Wachstumsfaktoren wie VEGF; FGF-2 und GM-CSF auf arteriogene oder auch angiogene Prozesse<sup>214, 215</sup>. Als weitere Optionen, um das arteriogenen Wachstum zu steigern, gelten parakrin-aktive Monozyten oder auch adulte Stammzellen<sup>65</sup>. Eine pharmakologische Stimulation der Arteriogenese scheint außerdem möglich mit medikamentösen NO-Donoren<sup>71</sup>. Weitere relevante Faktoren zur Stimulation von Gefäßwachstum werden noch erforscht. Bis heute hat jedoch keine der zahlreichen Studien entgegen den großen Erwartungen eine durchbrechende klinische Relevanz bewiesen.

#### 4.6.1 LIMITATIONEN DER ARTERIOGENEN THERAPIE

Die poststenotische Blutversorgung durch Stimulation des arteriogenen Gefäßwachstums zu gewährleisten, ist Aufgabe und Ziel der therapeutischen Arteriogenese. Die aktuellen Ansätze der klinischen Therapie weisen jedoch einige Limitationen auf.

Der Vorgang der Arteriogenese kann beispielsweise in Tierversuchen durch Vergrößerung der Schubspannung mithilfe einer AV-Fistel verbessert werden. Mit dem AV-Shunt-Modell konnte im Tierversuch bewiesen werden, dass eine vollständige Wiederherstellung der maximalen Konduktanz prinzipiell möglich ist und die Aufrechterhaltung des physikalischen Stimulus allein sämtliche Wachstumsfaktorbehandlungen in ihrer Wirkung übertrifft<sup>19</sup>. Technisch wären herz- oder gefäßchirurgische Eingriffe zur Anlegung eines prästenotischen AV-Shunts beim Menschen durchführbar. Dieser Ansatz ist im klinischen Alltag aufgrund der verstärkten peripheren Ischämie jedoch nur sehr eingeschränkt praktikabel: Es kommt über das entstehende Niedrigwiderstandgebiet zu einem verstärkten Blutabfluss und kann zu einem Steal-Syndrom mit retrograden Strömungen führen. Bei Hämodialyse Patienten mit operativ angelegten peripheren AV-Fisteln lässt sich diese Komplikation regelmäßig beobachten.

Es ist theoretisch auch denkbar, durch angiogene Stimulation die notwendige Blutversorgung mithilfe eines stark vergrößerten Kapillarbetts in der entsprechenden Verschlussregion zu erreichen. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die notwendige Vergrößerung des Kapillarbettes extrem sein muss und wahrscheinlich *in vivo* nicht erreichbar ist. Entsprechende Studien lassen sich nicht zitieren.

Natürlich wurde auch der Einfluss unterschiedlicher aussichtsreicher Wachstumsfaktoren auf Arteriogenese in verschiedenen klinischen Studien eruiert, es zeigen sich allerdings bisher nicht die erwarteten Resultate.

In den klinischen Untersuchungen konnte beispielsweise nur bei sehr hohen Dosen von rhVEGF (recombinant human Vascular Endothelial Growth Factor) ein signifikanter Unterschied dargestellt werden, der sich angiographisch allerdings auch nur tendenziell widerspiegeln ließ<sup>216</sup>.

Durch Applikation von FGF-2 sowohl intrakoronar als auch systemisch über einen langen Zeitraum, zeigten Epstein *et al.* bei Hunden nur eine Steigerung der kollateralen Durchblutung von circa 40 % und eine unvollständige Wiederherstellung der Funktion der verschlossenen Arterie<sup>217, 218</sup>. Entsprechend ergab sich in der klinischen Untersuchung am Menschen zwar eine signifikanter Rückgang der Frequenz von Angina Pectoris Beschwerden nach Anwendung von FGF-2, aber im „Single Photon Emission Computed Tomography“ (SPECT) zeigte sich keine detektierbare Steigerung der myokardialen Perfusion<sup>219</sup>. In pAVK Patienten ließ eine Einzelbolusgabe rhFGF-2 zunächst eine signifikante Verbesserungen der funktionellen Gehzeit vermuten, bei doppelter Dosis fand sich jedoch kein Unterschied zur Placebogruppe. Das Ergebnis dieser Studie ist insbesondere aufgrund des Mangels an harten Parametern zur Quantifizierung der Ergebnisse fraglich<sup>220</sup>.

Auch der Einfluss von GM-CSF auf den „Collateral Flow Index“ (CFI) wurde bei Patienten mit koronarer Gefäßkrankheit (KHK) invasiv gemessen<sup>221</sup>. In dieser klinischen Studie konnte erstmals eine signifikant verbesserte Durchblutung den Koronararterien nach GM-CSF Gabe dokumentiert werden. Aufgrund methodischer Probleme wie beispielsweise kurzer Beobachtungsdauer, kleiner Studienpopulation sowie hoher intrinsischer Variabilität des CFI sollten diese Ergebnisse zwar eher zurückhaltend bewertet werden, aber könnten Anlass zu zukünftigen Studien geben<sup>222, 223</sup>.

Zwischen den oftmals erfolgreichen experimentellen Tierversuchen und den tatsächlichen Resultaten in klinischen Studien finden sich also häufig Diskrepanzen. Die Versuchstiere zeigen eventuell andere Reaktionen auf eine mögliche medikamentöse Behandlung als die hauptsächlich älteren und polymorbiden Patienten in der klinischen Praxis, bei denen sich vermutlich auch eine altersabhängige Verminderung der Kollateralgefäße findet<sup>224</sup>.

Zu berücksichtigen ist zusätzlich, dass selbst in Tierversuchen die einzelne Anwendung eines Wachstumsfaktors nicht die vollständige physiologische Durchblutung wieder herstellen kann. Daher ist es notwendig, mögliche pharmakologische Kombinationen beispielsweise von Abra und verschiedenen Wachstumsfaktoren zur optimierten Stimulation der Arteriogenese zu erforschen. Dies könnte eventuell auch den positiven Effekt einer niedrigeren Effektivendosis und geringeren Nebenwirkungen haben.

In jeder pharmakologischen Therapie spielen Pharmakodynamik, also die Wirkung des Arzneimittels, und Pharmakokinetik mit Resorption, Verteilung und Elimination die entscheidenden Rollen. Das passende Agens muss grundsätzlich an den richtigen Ort gelangen, um erfolgreich wirken zu können<sup>225</sup>. Daher ist es unabdingbar, die richtige Dosis und die passende Applikationsart herauszufinden, um ein optimales arteriogenes Behandlungsergebnis zu erzielen.

Systemischen Applikationen von Medikamenten finden sich häufig vergesellschaftet mit generalisierten Nebenwirkungen und einer nur geringen Wirkstoffaufnahme im Zielgewebe. Eine systemische Anwendung arteriogener Stimuli könnte bei Patienten mit schwerer Arteriosklerose aufgrund eines proarteriogenen Effekts zu schweren Komplikationen führen: Beispielsweise könnte eine pathologische Arteriogenese induziert werden oder eine Akkumulation zu Entzündungen führen. Auch birgt die pharmakologische Stimulierung eines Arterienwachstums immer das Risiko eines verstärkten Tumorwachstums. Zu berücksichtigen sind außerdem die Plasmahalbwertszeiten. Bei Wachstumsfaktoren ist beispielsweise die Halbwertszeit aufgrund von Abbau und Bindung an Endothelzellen sehr kurz<sup>208</sup>, bei einer möglichen direkten Applikation von Abra oder eines Abra Stimulus muss die Plasmahalbwertszeit noch eruiert werden. Natürlich sollte auch bedacht werden, dass eine systemische Anwendung für Patienten komfortabler und weniger invasiv ist. Am praktischsten wäre in der Tat eine orale Applikationsform, unter Umständen könnten neuartige NO-Donoren die genannten Voraussetzungen erfüllen.

Es erscheint insgesamt schwierig, eine neue arteriogene Therapie zu formulieren, die speziell das Ziel eines neuen arteriogenen Umgehungskreislaufes hat, aber andere Gefäße nicht beeinflusst und wenig unerwünschte generalisierte Effekte aufweist.

Die Alternative zur systemischen Applikation ist die lokale Anwendung beispielsweise via Angiographie. Ein klarer Vorteil der lokalen Anwendung wären weniger systemische Nebenwirkungen. Ein lokaler Einzelbolus könnte jedoch möglicherweise keinen ausreichenden Wirkspiegel erreichen. In diesem Fall wäre eine längere oder häufigere Exposition notwendig. Um eine effektive Dosis zu erreichen, wären bei Wachstumsfaktoren beispielsweise beinahe toxische Dosen notwendig, bei Abra könnte dies ebenfalls der Fall sein. Die im Tiermodell oftmals erfolgte Applikation durch Katheter oder Mikropumpen erscheint nicht umsetzbar in der klinischen Praxis. Die ideale Zubringung und Dosierung eines möglichen Agens bleibt somit problematisch.

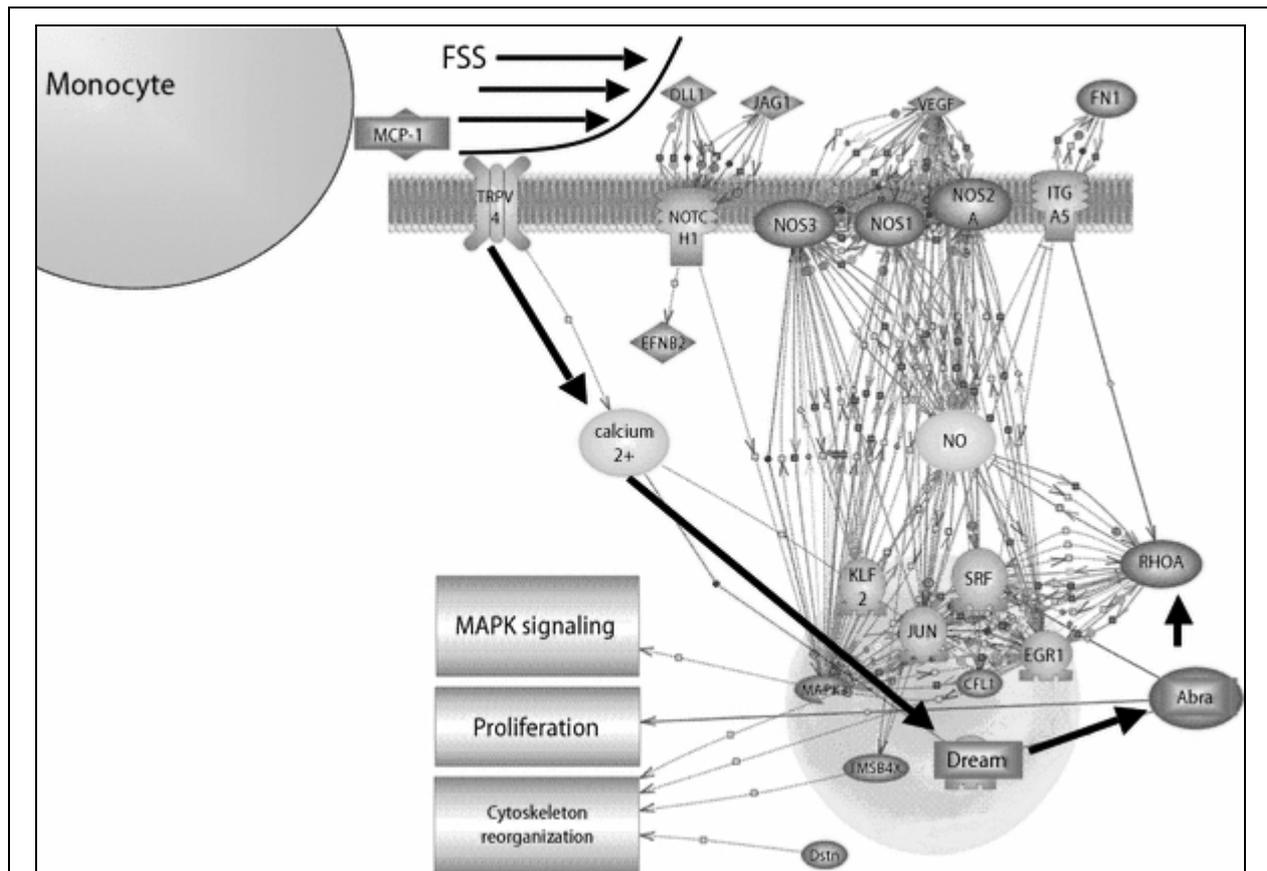
Bei allen diskutierten arteriogenen Therapieoptionen ist zu bedenken, dass eine mögliche medikamentöse arteriogene Therapie nur bei chronischen Gefäßverschlüssen sinnvoll eingesetzt werden kann. Weiterhin wäre bei Patienten mit gesteigerten kardiovaskulären Risikofaktoren eine prophylaktische Applikation zur Arteriogenese-Steigerung denkbar. Im Akutereignis eines plötzlichen Gefäßverschlusses erscheint die arteriogene Therapie ungeeignet.

Im Idealfall sollte ein arteriogener Therapieansatz eine maximale Arteriogenese bei minimaler Effektiv-Wirkdosis erreichen. Diese Forderung kann nur ein zentraler Faktor der Arteriogenese erfüllen, der fördernden Charakter auf arteriogene Prozesse hat. Ziel der arteriogenen Forschung sollte sein, die molekularen Unterschiede zwischen normalen Arterien und Kollateralarterien zu detektieren, sich auf diese zu konzentrieren und eine Gen- oder RNA-basierte Therapie finden. In diesem Zusammenhang gilt Abra ein wichtiger Baustein, um den Mechanismus wachsender Kollateralarterien nach arterieller Stenose besser zu verstehen.

#### **4.6.2 ABRA IN DER MEDIKAMENTÖSEN ARTERIOGENEN THERAPIE**

Abra hat eine zentrale Rolle in der komplexen Induktion der Arteriogenese inne, indem es den physikalischen Stimulus in eine Aktivierung des Rho/ROCK-Signalwegs überträgt. Eine genbasierte pharmakologische Therapie könnte gegebenenfalls teilweise den Effekt der Schubspannung ersetzen, wie in Abbildung 21 ersichtlich ist.

Ein möglicher Ansatzpunkt der arteriogenen Therapie scheint daher die medikamentöse Hochregulation von Abra zu sein. Zum jetzigen Zeitpunkt kann Abra jedoch nicht als simples Agens verabreicht werden. Stattdessen müsste ein pharmakologischer Stimulus zur Hochregulation von Abra verwendet werden. Eine arteriogene Effektivitätssteigerung könnte gegebenenfalls durch Kombination mit den verschiedenen getesteten Wachstumsfaktoren wie beispielsweise rhVEGF, rhFGF-2 oder rhGM-CSF erreicht werden.



**Abbildung 21. Netzwerk Analyse der exprimierten Proteine involviert in Arteriogenese.** Verschiedene Liganden und Rezeptoren agieren zusammen, um eine Variationen von Transkriptionsfaktoren und Signalwegen via Calcium und NO zu aktivieren. Die dicken Pfeile indizieren den Schubspannung aktivierten Signalweg über Abra. Nach Schaper 2009 <sup>71</sup>.

Um eine Zulassung als pro-arteriogenes Medikament zu bekommen, müsste nach der theoretischen Grundlagenforschung zunächst jedoch zwingend eine klinische Arzneimittelstudie aufgelegt werden. Die präklinischen Studien dauern im Durchschnitt bereits circa zehn Jahre. Nur circa 8 % der Wirkstoffe haben überhaupt Aussicht auf die anschließenden klinischen Studienphasen 0-III <sup>226</sup>. Bis ein potentieller arteriogener Wirkstoff auf der Basis von Abra zur klinischen Zulassung kommt, ist es also noch ein sehr weiter Weg. In der Konklusion gilt es also zunächst noch viel intensiver den molekularen Mechanismus der arteriogenen Wirkung von Abra zu erklären. Dann ergeben sich möglicherweise weitere Ansatzpunkte für zukünftige präklinische Forschungen.

#### 4.7 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nach Abra Knockout belegt eindrucksvoll die funktionelle Relevanz und zentrale Rolle von Abra in der Arteriogenese. Abra stimuliert die Proliferation glatter Muskelzellen und ist an der Initiation der Arteriogenese beteiligt.

Die Quantifizierung der Gewebsperfusion im distalen Hinterlauf der Abra<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu den Kontroll Tieren mit Femoralarterienokklusion sowie Laser Doppler Imaging, Hämoglobin Sauerstoffsättigung und auch funktioneller Beobachtungen mittels aktiver Fußbewegung demonstrierte eine verminderte Arteriogenese in Abra<sup>-/-</sup> Mäusen. Dies wurde weiterhin durch morphometrische Analysen im Mm. Aductorii untermauert. Die Arteriogenese Spezifität des verwendeten ischämischen Maus Hinterlaufmodells wurde durch eine normale Kapillardichte in den distalen Hinterläufen in beiden Gruppen verifiziert und ein angiogener Stimulus als Ursache des Kollateralwachstums somit ausgeschlossen. Die Visualisierung der verminderten Arteriogenese erfolgte schließlich mittels angiographischer Evaluationen.

Zusammenfassend zeigte sich bei Deletion von Abra ein verminderte Erholung der Durchblutung im ischämischen Hinterlauf nach experimenteller Okklusion der A. femoralis. Die Verschlechterung begründet sich in verringerten Remodeling- und Arteriogeneseprozessen in Abra<sup>-/-</sup> Mäusen verbunden mit entsprechend verschlechtertem Wachstum von Kollateralen. Die Ergebnisse indizieren, dass Abra eine aktive regulative Schlüsselrolle in der Arteriogenese einnimmt. Somit könnte Abra auch in der therapeutischen Arteriogenese eine pharmakologische Relevanz haben und sollte als vielversprechender Forschungsansatz in ergänzenden grundlegenden Studien weiter evaluiert werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind von erheblicher medizinischer und volkswirtschaftlicher Relevanz. Daher ist die Entwicklung innovativer und effektiver Therapieoptionen auf diesem Gebiet vom größten wissenschaftlichen Interesse. Ein neuer therapeutischer Ansatzpunkt ist die Stimulation des Wachstums arterio-arteriolarer Kollateralgefäße durch Arteriogenese. Durch das so induzierte endogene Gefäßwachstum könnten chronische Gefäßstenosen überbrückt werden. In vorangegangenen Studien stellte sich das Gen *Abra* als vielversprechender Kandidat heraus. Deshalb wurde in der hier vorliegenden Dissertation das Potenzial von *Abra* zur Beeinflussung der Arteriogenese mit Hilfe gendefizienter Mäuse (*Abra*<sup>-/-</sup> Mäuse) sowie verschiedenen molekularbiologischen, biochemischen und histologischen Verfahren untersucht.

Im ischämischen Hinterlaufmodell wiesen nach dem Verschluss der Femoralarterie verschiedene Parameter auf ein reduziertes Wachstum von Kollateralarterien hin. So war die Perfusion im Hinterlauf als Maß der Transportleistung der Kollateralgefäße in den *Abra*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Kontrolltieren genau wie die distale Sauerstoffsättigung signifikant reduziert. Als klinischer Parameter wurde der Score der aktiven Fußbewegung erhoben, dieser bestätigte die Hinweise ebenso. In morphometrischen Analysen aus Gewebspräparaten der *Mm. adductorii* war eine reduzierte Kaliberzunahme der Kollateralgefäße im Vergleich zu Gewebe aus WT Kontrolltieren festzustellen. Zugleich zeigte sich eine diskret, aber nicht signifikant erhöhte Kapillardichte in den *Mm. gastrocnemii* der *Abra*<sup>-/-</sup> Mäusen, es war also in beiden Versuchsgruppen kein relevanter angiogener Stimulus vorhanden. Auch *post mortem* Angiographien unterstrichen optisch eine Verminderung in Anzahl und Durchmesser der gewachsenen Kollateralgefäße bei *Abra*<sup>-/-</sup> Mäusen.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit, dass unter Abwesenheit von *Abra* das Wachstum von Kollateralen nach Femoralisligatur signifikant reduziert ist, aber nicht vollständig zum Erliegen kommt. Daraus kann auf eine wichtige Rolle von *Abra* für das Wachstum von Kollateralgefäßen im Falle arterieller Stenosen geschlossen werden.

## 6 SUMMARY

Cardiovascular diseases are of increasing medical and economic importance. Therefore, developing innovative and effective therapies are of outstanding scientific interest. A new possible therapeutic option is stimulating the growth of arterio-arteriolar collaterals by means of arteriogenesis. By inducing endogen vessel growth chronic stenosis might be bypassed. In previous studies a gene called *Abra* turned out to be a promising candidate. For this reason, in this dissertation the potential of *Abra* to influence arteriogenesis was analyzed in different molecular biological, biochemical and histological ways.

Different parameters pointed to a reduced collateral growth after occlusion of the femoral artery in the mouse model of hindlimb ischemia. For instance, perfusion in the hindlimb as well as distal oxygen saturation was significantly reduced in *abra* mice compared to littermates, which underlines the diminished transport capacity of knockout collaterals. The clinical parameter of active foot movement verified this observation. Furthermore, morphometric analyses of tissue samplings in *Mm. adductorii* showed a reduced calibre increase of collateral vessels compared to the results of the wild-type group. At the same time appeared a not significant higher capillary density in the *Mm. gastrocnemii* of *abra* mice, which confirms the absence of an angiogen stimulus in both groups. In addition, *post mortem* angiographies emphasize a reduction in number and diameter of growing collaterals in *abra*<sup>-/-</sup> mice.

To draw a conclusion, the data of this study suggest a significant reduction of collateral growth after femoral artery occlusion in the absence of *abra*, but not a complete deficit. This means, *abra* occupies a central position in the pathway of growing collateral vessels in the case of artery stenosis.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>A</b>	
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
Abra	Actin-binding Rho-activating protein
Ad_Abra	rekombinantes Adenovirus
AP-1	Activator Protein-1
ATF-4	Activating Transcription Faktor-4
AV	arteriovenös
<b>B</b>	
BS-1 Lectin	Bandeiraera Simplicifolia-1 Lectin
BSA	Rinderserumalbumin
<b>C</b>	
°C	Grad Celsius
CARP	Cardiac Ankyrin Repeat Protein
CD4	Cluster of Differentiation 11b
CD11b	Cluster of Differentiation 31
CD31	Cluster of Differentiation 31
CD34	Cluster of Differentiation 34
CD133	Cluster of Differentiation 133
CFI	Collateral Flow Index
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter

cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
CREB-2	cAMP-Response Element Binding protein 2
<b>D</b>	
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indol
Dll-1	Delta-like-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dream	DRE antagonist modulator
dyn	1g · cm/s <sup>2</sup>
<b>E</b>	
EGR-1	Early Growth Response Protein-1
eNOS	endotheliale NO Synthase
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
Et-1	Endothelin-1
Ets	E-twenty six
<b>F</b>	
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAL	Femoralarterienligatur
FDA	US Food and Drug Administration
FGF-2	Fibroblast Growth Faktor-2
FGFR-1	Fibroblast Growth Faktor Rezeptor-1
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
<b>G</b>	
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Faktor

GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde (Society of Laboratory Animal Science)
<b>H</b>	
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF-1	Hypoxia-Inducible Faktor-1
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Faktor-1 $\alpha$
HIF-1 $\beta$	Hypoxia-Inducible Faktor-1 $\beta$
Hz	Hertz
<b>I</b>	
I.E.	Internationale Einheiten
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molekül-1
IGF-1	Insulin-like Growth Faktor-1
iNOS	inducible NO Synthase
<b>K</b>	
Kcnip3	Kv channel interacting protein 3
kDA	Kilodalton
KHK	Koronare Gefäßkrankheit
kHz	Kilohertz
KLF-2	Krüppel-like Faktor-2
KO	Knockout
kV	Kilovolt
<b>L</b>	
l	Liter
LDI	Laser Doppler Imaging

<b>M</b>	
m	Musculus
MAPK	Mitogen Activated Kinase
MAPK-1	Mitogen Activated Kinase-1
MAPK-3	Mitogen Activated Kinase-3
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEF-2	Myocyte-specific Enhancer Faktor-2
MEF-2C	Myocyte-specific Enhancer Faktor-2C
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Mm.	Musculi
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metallo-Proteasen
MMP-2	Matrix-Metallo-Protease-2
MMP-3	Matrix-Metallo-Protease-3
MMP-9	Matrix-Metallo-Protease-9
mRNA	messenger RNA
MRTFs	Myocardin-Related Transcription Faktors
ms-1	myocyte stress -1
MW	Mittelwert
<b>N</b>	
n	Anzahl
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NFAT	Nuclear Faktor of Activated T-cells
nm	Nanometer

NO	Stickstoffmonoxid
NTC	No Template Control
<b>P</b>	
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Faktor
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molekül-1
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii
PIGF	Placental Growth Faktor
RNA	Ribonukleinsäure
PTA	perkutane transluminale Ballon Angioplastie
PTCA	perkutane transluminale Ballon Koronar-Angioplastie
pVASP	phosphorylated Vasodilator Stimulated Phosphoprotein
<b>Q</b>	
qRT PCR	quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaktion
<b>R</b>	
R/L	Rechts/Links-Ratio
Rho	Ras homolog gene family
RhoA	Ras homolog gene family, member A
rhFGF-2	Recombinant human Fibroblast Growth Faktor-2
rhGM-CSF	Recombinant human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Faktor

rhVEGF	Recombinant human Vascular Endothelial Growth Faktor
RNA	Ribonukleinsäure
RT PCR	Real Time Polymerase Chain Reaktion
ROCK	Rho-Associated Kinase
<b>S</b>	
SD	Standardabweichung
SDF-1	Serum Derivated Faktor-1
SEM	Standard Fehler des Mittelwertes (Standard error of the mean)
siRNA	small interfering RNA
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Faktor
STARS	Striated Muscle Aktivator of Rho-dependent Signaling
<b>T</b>	
Tab.	Tabelle
TGF- $\beta$	Transforming Growth Faktor- $\beta$
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Faktor- $\beta$ 1
Tmsb4	Thymosin-beta-4
t-PA	tissue-type Plasminogen Aktivator
TRITC	Tetramethylrhodamine Isothiocyanate
TRPV4	Transient Rezeptor Potential Cation Channel, subfamily V, member 4
<b>U</b>	
u-PA	urokinase-type Plasminogen Aktivator
US	United States

<b>V</b>	
V.	Vena
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molekül-1
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Faktor
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Faktor-A
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VEGFR-2	VEGF-Rezeptor-2
vWF	von-Willebrand-Faktor
<b>W</b>	
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
<b>μ</b>	
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
<b>χ</b>	
χ <sup>2</sup> -Test	Chi-Quadrat-Test

## 8 LITERATUR

1. Sanz, J., Fayad, Z. A. (2008): Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 451: 953-957.
2. Libby, P. (2002): Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
3. Ross, R. (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.
4. World Health Organization (2011): Cardiovascular Diseases. Genf. URL: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en). Stand 30.01.2012.
5. Murray, C. J., Lopez, A. D. (1997): Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349: 1436-1442.
6. Statistisches Bundesamt (2010): Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12, Reihe 4, Wiesbaden: Statistisches Bundesamt.
7. Nature Biotechnology 18 (2000): Cardiovascular Disease. URL: [http://www.nature.com/nbt/journal/v18/n10s/full/nbt1000\\_IT15.html](http://www.nature.com/nbt/journal/v18/n10s/full/nbt1000_IT15.html). Stand 09.01.2013.
8. Meyer, B. J., et al. (1996): Interventional cardiology in Europe 1993. Working Group on Coronary Circulation of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 17: 1318-1328.
9. Serruys, P. W., et al. (2001): Comparison of coronary-artery bypass surgery and stenting for the treatment of multivessel disease. *N Engl J Med* 344(15): 1117-1124.
10. Seiler, C. (2003): The human coronary collateral circulation. *Heart* 89: 1352-1357.
11. Helisch, A., Schaper, W. (2003): Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation* 10: 83-97.
12. Hansen, J. F. (1989): Coronary collateral circulation: clinical significance and influence on survival in patients with coronary artery occlusion. *Am Heart J* 117: 290-295.
13. Lambiase, P. D., Marber, M. S. (2002): Factors determining heterogeneity in coronary collateral development: A clinical perspective. *Exp Clin Cardiol* 7: 120-127.
14. Blumgart, H. L., Zoll, P. M. (1950): Wessler S. Angina pectoris, a clinical pathologic study of 177 cases. *Trans Assoc Am Physicians* 63: 262-267.
15. Schlesinger, M. J., Davis, D. (1940): Studies of the relation of the clinical manifestations of angina pectoris, coronary thrombosis and myocardial infarction to the pathologic findings. *Am. Heart J.* 19.
16. Zoll, P. M., et al. (1951): Interarterial coronary anastomoses in the human heart, with particular reference to anemia and relative cardiac anoxia. *Circulation* 4: 797-815.
17. Gregg, D. E. (1974): The natural history of coronary collateral development. *Circ Res* 35: 335-344.
18. Hofer, I.E., et al. (2001): Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res* 49: 609-617.
19. Eitenmuller, I., et al. (2006): The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res* 99: 656-662.
20. Risau, W. (1997): Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674.
21. Rafii, S. (2000): Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 105: 17-19.
22. Ribatti, D., et al. (2001): Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev* 100: 157-163.
23. Conway, E., et al. (2001): Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-521.
24. Choi, K., et al. (1998): A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125: 725-732.
25. Flamme, I., et al. (1997): Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 173: 206-210.
26. Kazemi, S., et al. (2002): Differential role of bFGF and VEGF for vasculogenesis. *Cell Physiol Biochem* 12: 55-62.
27. Brooks, P. (1996): Role of integrins in angiogenesis. *Eur. J. Cancer* 32A: 2423-2429.
28. Takahashi, T., et al. (1999): Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5: 794-814.
29. Han, R., (2003): Insulin-like growth factor-1 receptor mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 159-169.
30. Hristov, M., et al. (2003): Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1185-1189.
31. Luttun, A., Carmeliet, P. (2003): De novo vasculogenesis in the heart. *Cardiovasc Res* 58: 378-89.
32. Asahara, T., Kawamoto, A. (2004): Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C572-579.
33. Jang, Y. C. (1999): Role of alpha(v) integrins and angiogenesis during wound repair. *Wound Repair Regen* 7: 375-380.

34. Folkman, J. (1976): The vascularization of tumors. *Sci Am* 234: 58-64, 70-73.
35. Papetti, M., Herman, I. M. (2002): Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-970.
36. Kutryk, M., Stewart, D. J. (2003): Angiogenesis of the heart. *Microsc Res Tech* 60: 138-158.
37. Karamysheva, A. F. (2008): Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc.)*.
38. Semenza, G. (2004): Hydroxylation of HIF-1 oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 19: 176-182.
39. Hood, J. D. *et al.* (1998): VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 274: H1054-1058.
40. van der Zee, R. *et al.* (1997): Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 95: 1030-1037.
41. Kimura, H., *et al.* (2000): Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95: 189-197.
42. Thurston, G., *et al.* (1999): Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286: 2511-2514.
43. Thurston, G., *et al.* (2000): Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6: 460-463.
44. Carmeliet, P. (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395.
45. Mignatti, P., Rifkin, D. B. (1996): Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* 49: 117-137.
46. Maisonpierre, P., *et al.* (1997): Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55-60.
47. Folkman, J. (1992): The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 3: 65-71.
48. Carmeliet, P. (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653-660.
49. Folkman, J. (2007): Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev. Drug Discov* 6: 273-286.
50. Simons, M. (2005): Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* 111: 1556-1566.
51. Hurwitz, H., *et al.* (2004): Bevacizumab plus irinotecan, fluoracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 350: 2335-2342.
52. Kerbel, R., Folkman, J. (2002): Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev. Cancer* 2: 727-739.
53. Ferrara, N., Kerbel, S. (2005): Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438: 967-974.
54. Scholz, D., *et al.* (2001): Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis* 4: 247-257.
55. Busch, H. J., *et al.* (2003): Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 621-628.
56. Buschmann, I. R., *et al.* (2003): Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* 108: 610-615.
57. Scholz, D., *et al.* (2002): Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol* 34: 775-787.
58. Herzog, S., *et al.* (2002): Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H2012-2020.
59. Arras, M., *et al.* (1998): Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 101: 40-50.
60. Voskuil, M., *et al.* (2003): Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1422-1428.
61. Buschmann, I. R., *et al.* (2003): Invasive and non-invasive evaluation of spontaneous arteriogenesis in a novel porcine model for peripheral arterial obstructive disease. *Atherosclerosis* 167: 33-43.
62. Schaper, W., Buschmann, I. (1999): Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc Res* 43: 835-837.
63. de Muinck, E. S. (2004): Re-evaluating therapeutic neovascularisation. *J Mol Cell Cardiol* 36: 25-32.
64. Helisch, A., *et al.* (2006): Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 520-526.
65. Schaper, W., Scholz, D. (2003): Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1143-1151.
66. Barie, P. S., Mullins, R.J. (1988): Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *J Surg Res* 44: 284-307.
67. Fulton, W. (1965): *The coronary arteries*. Illinois.
68. Baroldi, G., Scmazzone, G. (1967): *Coronary Circulation in the normal and the pathological heart*. Washington, DC.
69. Zbinden, R., *et al.* (2007): Coronary collateral flow in response to endurance exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14: 250-257.
70. Zbinden, R., *et al.* (2004): Direct demonstration of coronary collateral growth by physical endurance exercise in a healthy marathon runner. *Heart* 90: 1350-1351.

71. Schaper, W. (2009): Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol* 104: 5-21.
72. Scholz, D., *et al.* (2000): Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* 436: 257-270.
73. Wagner, S., *et al.* (2004): Magnetic resonance angiography of collateral vessels in a murine femoral artery ligation model. *NMR Biomed* 17: 21-27.
74. Cai, W., Schaper, W. (2008): Mechanisms of arteriogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40: 681-692.
75. Rhodin, J. A. G. (Hrsg.) (1980): *Architecture of the vessel wall*. Bethesda: Am. Physiol. Soc.
76. Gattone, V. H., *et al.* (1986): Microvascular smooth muscle cell quantification from scanning electron microscope preparations. *Anat Rec* 216: 443-447.
77. Walmsey, J. G., *et al.* (1982): Quantitative morphology of arterioles from the hamster cheek pouch related to mechanical analysis. *Microvasc Res* 24: 249-271.
78. Thoma, R. (Hrsg.) (1983): *Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems*. Stuttgart: Enke.
79. Schretzenmeyer, A. (Hrsg.) (1933): Über kreislaufregulatorische Vorgänge bei Muskelarbeit. *Pflügers Archiv* 232: 743-748.
80. Rodbard, S. (1975): Vascular caliber. *Cardiology* 60: 4-49.
81. Langille, B. (1993): Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix. *J Cardiovasc Pharmacol* 21: S11-17.
82. Holtz, J. *et al.* (1984): Flow dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol* 6: 1161-1169.
83. Ben Driss, A., *et al.* (1997): Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am J Physiol* 272: H851-858.
84. Davies, P. (1995): Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Review* 76: 519-560.
85. Schaper, W., Schaper, J. (Hrsg.) (2004): *Arteriogenesis*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.
86. Girard, P. R., Nerem, R. M. (1995): Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. *J Cell Physiol* 163: 179-193.
87. Buschmann, I., Schaper, W. (1999): Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci* 14: 121-125.
88. Schaper, W., *et al.* (1976): Quantification of collateral resistance in acute and chronic experimental coronary occlusion in the dog. *Circ Res*: 371-377.
89. Kinnaird, T., *et al.* (2004): Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*: 1543-1549.
90. Pipp, F., *et al.* (2004): Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1664-1668.
91. Schaper, W., (Hrsg.) (1971): *The Collateral Circulation of the Heart*. Amsterdam: Elsevier North Holland Publishing Company.
92. Pasyk, S., *et al.* (1982): DNA synthesis in coronary collaterals after coronary artery occlusion in conscious dog. *Am J Physiol* 242: H1031-1037.
93. Tronc, F., *et al.* (1996): Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 1256-1262.
94. Tzima, E. I., *et al.* (2005): A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437: 426-431.
95. Shyy, Y. J., *et al.* (1994): Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4678-4682.
96. Troidl, C., *et al.* (2009): Trpv4 induces collateral vessel growth during regeneration of the arterial circulation. *J Cell Mol Med* 13: 2613-2621.
97. Wustrack, H. *et al.* (2009): Stimulierung des Wachstums peripherer und zerebraler Kollateralarterien zur Erhöhung der intravasalen Flussrate im Tiermodell. *Gefäßchirurgie* 14: 24-30.
98. Malek, A., Izumo, S. (1992): Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* 263: C389-396.
99. Malek, A. M., *et al.* (1993): Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5999-6003.
100. Malek, A. M., Izumo, S., (1996): Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J Cell Sci* 109: 713-726.
101. Ziegelhoeffer, T., *et al.* (2003): Inhibition of collateral artery growth by mibefradil: possible role of volume-regulated chloride channels. *Endothelium* 10: 237-246.
102. Schaper, J., *et al.* (1976): The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 370: 193-205.

103. Higashi, Y., *et al.* (2004): Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia. *Circulation* 109: 1215-1218.
104. Shintani, S., *et al.* (2001): Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103: 897-903.
105. Polverini, P. J., *et al.* (1977): Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* 269: 804-806.
106. Kamiya, A., Togawa, T. (1980): Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* 239: H14-21.
107. Unthank, J. L., *et al.* (1996): Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat. *Circ Res* 79: 1015-1023.
108. Zarins, C. K., *et al.* (1987): Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis. *J Vasc Surg* 5: 413-420.
109. Fulton, W. (1969): The morphology of coronary arterial anastomoses in health and disease and their influence on ischaemic myocardial damage. *Acta Cardiol* 12: 38-67.
110. Heil, M., *et al.* (2002): Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H2411-2419.
111. Schaper, W., Ito, W.D. (1996): Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 79: 911-919.
112. Arai, A., *et al.* (2002): STARS, a striated muscle activator of Rho signaling and serum response factor-dependent transcription. *J Biol Chem* 277: 24453-24459.
113. Mahadeva, H. *et al.* (2002): ms1, a novel stress-responsive, muscle-specific gene that is up-regulated in the early stages of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *FEBS Lett* 521: 100-104.
114. Kuwahara, K., *et al.* (2007): Modulation of adverse cardiac remodeling by STARS, a mediator of MEF2 signaling and SRF activity. *J Clin Invest* 117: 1324-1334.
115. Lamon, S., *et al.* (2009): Regulation of STARS and its downstream targets suggest a novel pathway involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* 587: 1795-1803.
116. Troidl, K. (2008): Die Rolle des „Actin-binding Rho activating protein“ (Abra) während der Arteriogenese. Justus-Liebig-Universität.
117. Troidl, K., *et al.* (2009): Actin-binding rho activating protein (Abra) is essential for fluid shear stress-induced arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 2093-2101.
118. Stabile, E., *et al.* (2003): Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 108: 205-210.
119. Heil, M., *et al.* (2004): Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* 94: 671-677.
120. Limbourg, A., *et al.* (2007): Notch ligand Delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis. *Circ Res* 100: 363-371.
121. Couffinhal, T., *et al.* (1998): Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152: 1667-1679.
122. Weiß, J., Maeß, J. (Hrsg.) (2003): *Haus- und Versuchstierpflege*. Stuttgart: Enke Verlag.
123. O'Doherty, J., *et al.* (2009): Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration. *J Biomed Opt* 14: 034025.
124. Ilias, M. A., *et al.* (2004): Assessment of pigmented skin lesions in terms of blood perfusion estimates. *Skin Res Technol* 10: 43-49.
125. Stucker, M., *et al.* (2006): Increased laser Doppler flow in skin tumors corresponds to elevated vessel density and reactive hyperemia. *Skin Res Technol* 12: 1-6.
126. Kragh, M., *et al.* (2001): Quantitative estimates of angiogenic and anti-angiogenic activity by laser Doppler flowmetry (LDF) and near infra-red spectroscopy (NIRS). *Eur J Cancer* 37: 924-929.
127. Malanin, K., *et al.* (2004): Dynamics of cutaneous laser Doppler flux with concentration of moving blood cells and blood cell velocity in legs with venous ulcers and in healthy legs. *Angiology* 55: 37-42.
128. Jeng, J. C., *et al.* (2003): Laser Doppler imaging determines need for excision and grafting in advance of clinical judgment: a prospective blinded trial. *Burns* 29: 665-670.
129. Kanetaka, T., *et al.* (2004): Laser Doppler skin perfusion pressure in the assessment of Raynaud's phenomenon. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 27: 414-416.
130. Tonnesen, J., *et al.* (2005): Laser Doppler flowmetry is valid for measurement of cerebral blood flow autoregulation lower limit in rats. *Exp Physiol* 90: 349-355.
131. Linden, M., *et al.* (1998): Evaluation of enhanced high-resolution laser Doppler imaging in an in vitro tube model with the aim of assessing blood flow in separate microvessels. *Microvasc Res* 56: 261-270.
132. Fullerton, A., *et al.* (2002): Guidelines for visualization of cutaneous blood flow by laser Doppler perfusion imaging. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis based upon the HIRELADO European community project. *Contact Dermatitis* 46: 129-140.
133. Choi, C. M., Bennett, R. G. (2003): Laser Dopplers to determine cutaneous blood flow. *Dermatol Surg* 29: 272-280.
134. Duteil, L., *et al.* (1985): A double wavelength laser Doppler system to investigate skin microcirculation. *IEEE Trans Biomed Eng* 32: 439-447.

135. Nilsson, G. E., *et al.* (1980): Evaluation of a laser Doppler flowmeter for measurement of tissue blood flow. *IEEE Trans Biomed Eng* 27: 597-604.
136. Wardell, K., *et al.* (1993): Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. *IEEE Trans Biomed Eng* 40: 309-316.
137. Moor Instruments (2013): URL: <http://www.moor.co.uk>. Stand 09.01.2013.
138. Tsai, A. G., *et al.* (2003): Oxygen gradients in the microcirculation. *Physiol Rev* 83: 933-963.
139. Erhardt, W., *et al.* (1984): A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med (Berl)* 184: 159-169.
140. Arras, M., *et al.* (2001): Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med* 51: 443-456.
141. Kyriakides, Z. S., *et al.* (2003): Gender does not influence angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia. *Int J Cardiol* 92: 83-91.
142. Peng, X., *et al.* (2011): Gender differences affect blood flow recovery in a mouse model of hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 300, H2027-2034.
143. Ito, W. D., *et al.* (1997): Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol* 273: H1255-1265.
144. Limbourg, A., *et al.* (2009): Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* 4: 1737-1746.
145. Walgenbach, K. J., *et al.* (1995): Ischaemia-induced expression of bFGF in normal skeletal muscle: a potential paracrine mechanism for mediating angiogenesis in ischaemic skeletal muscle. *Nat Med* 1: 453-459.
146. Scholz, D., *et al.* (2003): Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration. *Mol Cell Biochem* 246: 57-67.
147. Heard, D. J. (1993): Principles and techniques of anesthesia and analgesia for exotic practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 23: 1301-1327.
148. Hart, C. Y., *et al.* (2001): Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1938-1945.
149. Takuma, S., *et al.* (2001): Anesthetic inhibition in ischemic and nonischemic murine heart: comparison with conscious echocardiographic approach. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2364-2370.
150. Wixson, S. K., *et al.* (1987): The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. *Lab Anim Sci* 37: 736-742.
151. Janssen, B. J., *et al.* (2004): Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H1618-1624.
152. Roth, D. M., *et al.* (2002): Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H2134-2140.
153. Chaves, A. A., *et al.* (2001): Non-invasive echocardiographic studies in mice: influence of anesthetic regimen. *Life Sci* 69: 213-222.
154. Yang, X. P., *et al.* (1999): Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol* 277: H1967-H1974.
155. Kiatchoosakun, S., *et al.* (2001): Effects of tribromoethanol anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular function in mice. *Comp Med* 51: 26-29.
156. Tan, T. P., *et al.* (2003): Assessment of cardiac function by echocardiography in conscious and anesthetized mice: importance of the autonomic nervous system and disease state. *J Cardiovasc Pharmacol* 42: 182-190.
157. Bolognese, P., *et al.* (1993): Laser-Doppler flowmetry in neurosurgery. *J Neurosurg Anesthesiol* 5: 151-158.
158. Barfod, C., *et al.* (1997): Laser-Doppler measurements of concentration and velocity of moving blood cells in rat cerebral circulation. *Acta Physiol Scand* 160: 123-132.
159. Smits, G. J., *et al.* (1986): Evaluation of laser-Doppler flowmetry as a measure of tissue blood flow. *J Appl Physiol* 61: 666-672.
160. Tabrizchi, R. (2000): Methods of blood flow measurement in the arterial circulatory system. *J Pharmacol Toxicol Methods* Sep-Oct 44: 375-384.
161. Warren, D. J., Ledingham, J. G. (1975): Measurement of intrarenal blood-flow distribution in the rabbit using radioactive microspheres. *Clin Sci Mol Med* 48: 51-60.
162. Fan, F. C., *et al.* (1979): Determinations of blood flow and shunting of 9- and 15-micrometer spheres in regional beds. *Am J Physiol* 237: H25-33.
163. Unger, E. (2001): Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res.* 49: 497-506.
164. Herold, G. (2008): *Innere Medizin*. Dr. med. Gerd Herold. Köln.
165. Scholz, D., *et al.* (2003): Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (PlGF) -/- mice. *J Mol Cell Cardiol* 35: 177-184.

166. Eitenmueller, I. (2005): Gen-tragender Transfer viraler Vektoren in den peripheren Kreislauf des Kaninchens. Justus-Liebig-Universität.
167. Ito, W. D., *et al.* (1997): Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 80: 829-837.
168. Troidl, C. *et al.* (2012): *Vascular Repair*. Second edition ed. Hoboken (New Jersey): Wiley-Blackwell.
169. Chien, K. R., Olson, E. N. (2002): Converging pathways and principles in heart development and disease: CV@CSH. *Cell* 110: 153-162.
170. Gossett, L. A., *et al.* (1989): A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* 9: 5022-5033.
171. Black, B. L., Olson, E. N. (1998): Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 167-196.
172. McKinsey, T. A., *et al.* (2002): MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci* 27: 40-47.
173. Yuan, Z., *et al.* (2009): Microarray analysis of gene expression in mouse aorta reveals role of the calcium signaling pathway in control of atherosclerosis susceptibility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1336-1343.
174. Liedtke, W., *et al.* (2003): TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14531-14536.
175. Carrion, A. M., *et al.* (1999): DREAM is a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398: 80-84.
176. Savignac, M., *et al.* (2007): Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. *Pflugers Arch* 454: 523-533.
177. Cook, C. L., *et al.* (1994): Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 189-196.
178. Majesky, M. W. (2000): Novel genes for mitogen-independent smooth muscle replication. *Circ Res* 87: 532-534.
179. Galbraith, C. G., *et al.* (1998): Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 40: 317-330.
180. Dekker, R. J., *et al.* (2005): Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes. *Am J Pathol* 167: 609-618.
181. Tzima, E., *et al.* (2005): A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437: 426-431.
182. Troidl, C., *et al.* (2008): Trpv4 induces collateral vessel growth during regeneration of the arterial circulation. *J Cell Mol Med*.
183. Sultan, C., *et al.* (2004): A computational tensegrity model predicts dynamic rheological behaviors in living cells. *Ann Biomed Eng* 32: 520-530.
184. Ingber, D. E. (1997): Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* 59: 575-599.
185. Broich, K., *et al.* (2003): Av $\beta$ 3 integrin is increased in growing collateral arteries after femoral artery occlusion in the rabbit. *Eur Heart J* 2.
186. Busse, R., Fleming, I. (2003): Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci* 24: 24-29.
187. Hynes, R. O. (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25.
188. Fernandez, B., Broich, K. (2004): *Cell-cell and cell-matrix interactions*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.
189. Deindl, E. (2007): Arteriogenesis: a focus on signal transduction cascades and transcription factors. *Thromb Haemost* 98: 940-943.
190. Boengler, K., *et al.* (2003): Identification of differentially expressed genes like cofilin2 in growing collateral arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 300: 751-756.
191. Demicheva, E., *et al.* (2008): Stretch-induced activation of the transcription factor activator protein-1 controls monocyte chemoattractant protein-1 expression during arteriogenesis. *Circ Res* 103: 477-484.
192. Loirand, G., *et al.* (2006): Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 98: 322-334.
193. Troidl, K., *et al.* (2010): Effects of endogenous nitric oxide and of DETA NONOate in arteriogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 55: 153-160.
194. Cai, W. (2004): *Structural remodeling during growth of collateral vessels*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.
195. Fleming, I., *et al.* (2005): Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci* 118: 4103-4111.
196. Mees, B., *et al.* (2007): Endothelial nitric oxide synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*: 1926-1933.
197. Vogel, S., *et al.* (2006): MEK hyperphosphorylation coincides with cell cycle shut down of cultured smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 206: 25-34.

198. Thannickal, V. J., *et al.* (1998): Upregulated expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors by transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) mediates enhanced mitogenic responses to FGFs in cultured human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 437-441.
199. Deindl, E., *et al.* (2003): Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res* 92: 561-568.
200. Grande, J. P. (1997): Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 27-40.
201. Wesselman, J. P., *et al.* (2004): Role of the Rhoa/Rho kinase system in flow-related remodeling of rat mesenteric small arteries in vivo. *J Vasc Res* 41: 277-290.
202. Troidl, K. *et al.* (2006): Intra-collateral adenoviral gene transfer of actin-binding Rho activating protein (Abra) improves collateral conductance. *Eur Heart J*. 27: 453 (Abstr.)
203. Mammoto, A., *et al.* (2004): Role of RhoA, mDia, and ROCK in cell shape-dependent control of the Skp2-p27kip1 pathway and the G1/S transition. *J Biol Chem* 279: 26323-26330.
204. Kuwahara, K., *et al.* (2005): Muscle-specific signaling mechanism that links actin dynamics to serum response factor. *Mol Cell Biol* 25: 3173-3181.
205. Mack, C.P., *et al.* (2001): Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem* 276: 341-347.
206. Shin, S. Y., *et al.* (2006): Suppression of Egr-1 transcription through targeting of the serum response factor by oncogenic H-Ras. *EMBO J* 25: 1093-1103.
207. Hannappel, E. (2007): beta-Thymosins. *Ann N Y Acad Sci* 1112: 21-37.
208. Smart, N., *et al.* (2007): Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 445: 177-182.
209. Koerselman, J., *et al.* (2003): Coronary collaterals: an important and underexposed aspect of coronary artery disease. *Circulation* 107: 2507-2511.
210. Schultz, A., *et al.* (1999): Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 100: 547-552.
211. Sherman, J. A., *et al.* (2006): Humoral and cellular factors responsible for coronary collateral formation. *Am J Cardiol* 98: 1194-1197.
212. Fulton, R. E., *et al.* (1969): Intravenous urographie in renal insufficiency. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 106.
213. Cao, Y. (2010): Therapeutic angiogenesis for ischemic disorders: what is missing for clinical benefits? *Discov Med* 9: 179-184.
214. van Royen, N., *et al.* (2001): Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res* 49: 543-553.
215. Schirmer, S. H., van Royen, N. (2004): Stimulation of collateral artery growth: a potential treatment for peripheral artery disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2: 581-588.
216. Henry, T. D., *et al.* (2003): The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107: 1359-1365.
217. Unger, E. F., *et al.* (1994): Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol* 266: H1588-H1595.
218. Lazarous, D. F., *et al.* (1995): Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation* 91: 145-153.
219. Simons, M., *et al.* (2002): Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 105: 788-793.
220. Lederman, R. J., *et al.* (2002): Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 359: 2053-2058.
221. Seiler, C., *et al.* (2001): Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 104: 2012-2017.
222. Werner, G. S. (2002): Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. *Circulation* 105: e175 (author reply e75).
223. Schaper, W. (2001): Therapeutic arteriogenesis has arrived. *Circulation* 104: 1994-1995.
224. Cai, W. J., *et al.* (2003): Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H31-40.
225. Karow, T. (2008): *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Pulheim.
226. Kubinyi, H. (2003): Drug research: myths, hype and reality. *Nat Rev Drug Discov* 2: 665-668.

## 9 PUBLIKATION

Troidl K, Rüdinger I, Cai WJ, Mücke Y, **Grossekettler L**, Piotrowska I, Apfelbeck H, Schierling W, Volger OL, Horrevoets AJ, Grote K, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Troidl C. (2009)

*Actin-binding rho activating protein (Abra) is essential for fluid shear stress-induced arteriogenesis.*

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

## 10 ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

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

---

## 11 DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim angefertigt. Ich danke dem geschäftsführenden Direktor Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Braun für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit an diesem wissenschaftlich renommierten Forschungsinstitut.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Bereitstellung diese überaus interessanten und vielseitigen Dissertationsthemas sowie der Betreuung und Unterstützung meiner Promotion.

Großer Dank gebührt auch Herrn Dr. Matthias Heil für die Initiierung dieser Dissertation am Max-Planck-Institut Bad Nauheim und die unermüdliche Beantwortung aller meiner Fragen.

Insbesondere möchte ich Frau Dr. biol. hom. Kerstin Troidl sehr herzlich für die fachlich exzellente Unterstützung und ihre unglaubliche Geduld und ihr Engagement im Korrigieren und Diskutieren meiner Arbeit danken.

Bei Frau Sandra Rühl bedanke ich mich für die geduldige Einführung in das Laborwesen, die immunhistochemischen Methoden und die Grundlagen der Molekularbiologie

Für die fachlich kompetente Einweisung in den tierexperimentellen-operativen Bereich danke ich Herrn Dr. Tibor Ziegelhoeffer und Frau Dr. Sandra Grimm.

Außerdem danke ich von ganzem Herzen Bastian, ohne den ich diese Dissertation wahrscheinlich nicht begonnen und auch nicht zuende geführt hätte.

Ich danke meinen Eltern für alles.