

# **Einfluss des Kininogens auf die Neointimabildung**

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

vorgelegt von Fabian Reich  
aus Nürnberg

Giessen 2007

**Aus dem Labor für Molekulare Kardiologie des Zentrums  
für Innere Medizin des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. H. Tillmanns**

**Gutachter: Prof. Dr. H. Tillmanns**

**Gutachter: PD Dr. A. Oksche**

**Tag der Disputation: 29.02.2008**

**Meinen Eltern Karin und Peter**

**„Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum  
Erkennen, den Glauben zum Handeln“**

Max Planck [1858-1947]; dt. Physiker

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
1 Einleitung .....	1
1.1 Atherosklerose .....	1
1.2 Prävention und Stufentherapie der Atherosklerose .....	5
1.3 Pathophysiologie der Restenose .....	6
1.4 Remodeling .....	8
1.5 Erfolg und Misserfolg revaskularisierender Maßnahmen .....	9
1.6 Strategien zur Verhinderung der Restenose .....	10
1.7 Kininogen - bekannte Funktionen und molekularer Aufbau .....	12
1.8 Kininogen - Bindungspartner und Rezeptoren .....	13
1.9 Kininogen - Bedeutung und eventueller therapeutischer Einsatz .....	15
2 Fragestellung .....	17
3 Material und Methoden .....	18
3.1 Operationsbesteck .....	18
3.2 Reagenzien .....	18
3.3 Medikamente und Narkotika .....	19
3.4 Weitere Materialien .....	19
3.5 Verwendete Geräte .....	20
3.6 Grundsubstanz für die Herstellung des Gels .....	20
3.7 Verwendete Mäuse .....	21
3.8 Verwendete Antikörper und Färbe-Kits .....	21
3.8.1 Resorptionsnachweis des applizierten Kininogens ins Gefäß .....	21
3.8.2 Färbung von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) .....	21
3.8.3 Proliferationsmarker .....	22
3.8.4 Monozyten und Makrophagen Färbung .....	22
3.8.6 Apoptose Färbung .....	22
3.9 Versuchsschema .....	22
3.10 Bestrahlung und Transplantation .....	23
3.10.1 Modell zur Transplantation GFP positiver Knochenmarkszellen in Mäusen .....	23
3.10.2 Herstellung und Transplantation von GFP-positiven Knochenmarkszellen .....	25
3.11 Betäubung und Operation der Maus .....	26
3.11.1 Narkose .....	26
3.11.2 Operation .....	27
3.12 Verwendetes Kininogen, Zubereitung und Applikation des Gels .....	31
3.13 Fixierung und Entnahme der Gefäße .....	32
3.13.1 Fixierung .....	32
3.13.2 Gefäßentnahme .....	32
3.14 Anfertigen der Gefäßschnitte .....	33
3.15 Morphometrie der Gefäßschnitte .....	34
3.16 Färbungen .....	36
3.16.1 PCNA Färbung als Marker für proliferierende Zellen .....	36
3.16.2 Immunfluoreszenzfärbung der Kryoschnitte .....	38
3.16.3 Färbung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) .....	40
3.16.4 Färbung von Monozyten und Makrophagen (MOMA) .....	40
3.16.5 Nachweis apoptotischer Zellen (TUNEL-Markierung) .....	41
3.16.6 Resorptionsnachweis des Kininogens .....	44

3.17 Bewertung und Auszählung der gefärbten Schnitte .....	45
3.18. Statistik .....	45
4 Ergebnisse .....	46
4.1 Per Gel appliziertes Kininogen wird in Gefäße aufgenommen.....	46
4.2 Kininogen und Domäne 5 verhindern die Neointima-Bildung .....	48
4.3 Kininogen und Domäne 5 reduzieren die Proliferation glatter .....	50
Gefäßmuskelzellen in der Neointima und Media verletzter.....	50
Gefäße .....	50
4.4 Kininogen und Domäne 5 induzieren die Apoptose glatter .....	52
Gefäßmuskelzellen in der Neointima und Media.....	52
4.5 Zirkulierende Zellen aus dem Knochenmark tragen zur Bildung des neointimalen Gewebes bei und lassen sich durch den Einsatz von Kininogen und Domäne 5 reduzieren.....	54
4.6 HKa und Domäne 5 hemmen die Akkumulation zirkulierender VSMC-Progenitorzellen .....	56
4.7 Kininogen und Domäne 5 reduzieren die Anzahl von aus dem .....	59
Knochenmark stammenden Monozyten und Makrophagen in.....	59
neointimalem und medialem Gewebe .....	59
5 Diskussion .....	62
5.1 Gegenwärtige Strategien zur Therapie vaskuloproliferativer .....	62
Erkrankungen .....	62
5.2 Proliferationshemmung durch Kininogen und dessen Domäne 5 .....	66
5.3 Mechanismen der Apoptoseinduktion durch HKa und D5 .....	67
5.4 Effekt von Kininogen auf die Akkumulation von Progenitorzellen in neointimalem Gewebe .....	70
5.5 Kininogen vermindert die Akkumulation von mononukleären.....	73
Zellen im Entzündungsgebiet.....	73
5.6 Vergleich der Wirksamkeit von HKa und Domäne 5 .....	75
5.7 Wirkung des Kininogens auf die neointimale Hyperplasie.....	76
5.8 Problematik des verwendeten Modells und Vergleichbarkeit mit dem Menschen.....	78
5.9 Ausblick.....	79
6 Zusammenfassung .....	82
7 Summary .....	85
Literaturverzeichnis .....	87
Erklärung .....	101
Danksagung .....	102
Curriculum vitae.....	103

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actine
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin converting enzyme
APTT	Aktivierte Partielle Thromboplastin-Zeit
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
BMS	Bare metal stent
BTX	Knochenmarkstransplantation
°C	Grad Celcius
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
D	Domäne
DAPI	4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
DES	Drug eluting stent
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
FAK	Fokale Adhäsions-Kinase
FBG	Fibrinogen
FN	Fibronectin
g	Gramm
Gau	gauge
GFP	Green fluorescent protein
Gy	Gray
h	Stunde
HK	High molecular weight kininogen
HKa	Activated cleaved high molecular weight kininogen
HMG-CoA	3-Hydroxy-3methylglutaryl-Coenzym A
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule
IF	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär

kDa	Kilo Dalton
Kin	Kininogen
KM	Knochenmark
l	Liter
LDL	Low density lipoprotein
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1, Synonym: CD11a/CD18
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
M	molar
MAC-1	Makrophagen Antigen-1 Synonym: CD11b/CD18
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Proteine-1
M-CSF	Monocyte-Colony Stimulating Factor
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOMA	Antikörper gegen Monozyten und Makrophagen
N.	Nervus
N <sub>2</sub>	Molekularer Stickstoff
NaCl	Kochsalz (-lösung)
nm	Nanometer
No.	Nummer
NO	Stickstoffmonoxyd
Nr.	Nummer
ODN	Oligodesoxynukletotide
OH	Hydroxid
PA	Plasminogen Aktivator
PAI-1	Plasminogen-Aktivator Inhibitor-1
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigene
PDGF	Plateled derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
pH	Pontius hydrogenii
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
SMC	Smooth muscle cells
Tab.	Tabelle

TMR	Tetramethylrodamin
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-X nick-end-labeling
uPA	Urokinase Plasmiogen Aktivator
uPAR	Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEC	Vaskuläre Endothelzellen
VSMC	Vascular smooth muscle cell
VN	Vitronectin
Vol.	Volumen
WHO	World Health Organization

## **1 Einleitung**

Vaskuloproliferative Erkrankungen, wie die Atherosklerose und die Restenose nach Ballonangioplastie sind Hauptursache für die Entstehung des Herzinfarktes und anderer Erkrankungen des kardio- und zerebrovaskulären Systems. Dabei beginnt die Atherosklerose bereits im Jugendalter<sup>1</sup> und ist so stark, wie wenige andere Erkrankungen, durch die Lebensgewohnheiten der betroffenen Personen beeinflusst<sup>2</sup>.

Vaskuloproliferative Erkrankungen stellen mit einem Anteil von über 50% an der Gesamtmortalität (zerebrovaskuläre Ereignisse 14,3%, periphere Gefäßverschlüsse 17,5% und kardiale Ereignisse 18,1%) immer noch die Haupttodesursache in der westlichen Welt dar. Etwa 1,5 Millionen Bundesbürger haben chronische Arterienverschlüsse. Das spiegelt sich im Ergebnis mehrerer großangelegter Studien zum Herz-Kreislauf-System, wie zum Beispiel der "MONItoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease"- (MONICA-) Studie der Weltgesundheitsbehörde (WHO) wieder<sup>3</sup>.

### **1.1 Atherosklerose**

Im Laufe der Zeit hat sich das Verständnis für den Begriff der Atherosklerose als Gefäßerkrankung stark weiterentwickelt. Wurde sie am Anfang für eine blande Lipid-Speicherkrankheit gehalten, so verstehen wir die Atherosklerose heute als vielschichtige Erkrankung mit einer großen Verflechtung entzündlicher, inter-, intra- und extrazellulärer molekularer Mechanismen<sup>4-6</sup>.

Initialer Auslöser der Atherosklerose ist wahrscheinlich eine Endothelzellläsion, die durch einen atherogenen Stimulus, das heißt einen dauerhaften Reiz, mechanischer oder chemischer Art, verursacht wird. Der auslösende Reiz ist zum Beispiel eine verstärkte Druck- oder Dehnungsbelastung des Endothels<sup>7, 8</sup> bei einem arteriellen Hypertonus oder eine persistierende Hyperglykämie mit konsekutiver Glykosilierung von Eiweißen auf der Zellmembran, im Rahmen eines Diabetes mellitus<sup>4, 9, 10</sup>. Weiterhin bekannt als atherogene Risikofaktoren sind der Tabakrauch, die Hypercholesterinämie, die stammbetonte Adipositas und der Bewegungsmangel.

Durch die entstehenden Veränderungen am Endothel, kommt es zu dessen Dysfunktion und der Hochregulierung und Ausbildung von bestimmten Adhäsivrezeptoren an der Zelloberfläche (z.B. ICAM-1, VCAM-1)<sup>4</sup>. Das Endothel wird zunehmend für im Blut befindliche Zellen und Moleküle, wie zum Beispiel für oxidiertes LDL, durchlässig. Durch die strukturellen Veränderungen der Endothelzellen gerät sowohl die Balance zwischen der Ausschüttung vasodilatativer und vasokonstriktorischer, als auch die zwischen der Freisetzung pro- und antikoagulatorischer Substanzen durcheinander<sup>11</sup>. Endothelzellen schütten zudem chemotaktische Substanzen, sowie Zytokine aus. Diese führen zur Aktivierung von zirkulierenden Leukozyten (Monozyten) und vaskulären Vorläuferzellen (Progenitorzellen) aus der Blutbahn, die an das Endothel adhären und es per Diapedese durchwandern (Chemoattraktion)<sup>2</sup>.

Angeregt durch chemotaktische Stoffe (z.B. M-CSF) akkumulieren T-Lymphozyten (CD8+) und Monozyten (CD4+). Letztere differenzieren sich zu Makrophagen. Beide Zellen können sich gegenseitig stimulieren und produzieren und sezernieren Wachstums- und Entzündungsfaktoren (z.B. IF $\gamma$ , TNF $\beta$  und MCP-1). Die Stimulation geschieht auf parakrinem und autokrinem Wege<sup>2, 7, 12</sup>. Zum anderen werden Makrophagen durch die Aufnahme von LDL zur Produktion und Freisetzung von Zytokinen angeregt, die wiederum für die Expression von Adhäsionsmolekülen auf deren Oberfläche verantwortlich sind. Die von den Monozyten sezernierten Mediatorsubstanzen<sup>7</sup> führen im Weiteren zur Einwanderung und Proliferation von vaskulären, glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) aus der Media und der Adventitia, sowie zur Akkumulation von zirkulierenden VSMC-Progenitorzellen<sup>13-15</sup>, die zusammen mit den mononukleären Zellen im subendothelialen Bereich der Gefäßintima akkumulieren. Durch die mononukleären Zellen kommt es zu einer chronischen Entzündungsreaktion, deren Bedeutung bei der Entstehung der Atherosklerose in neueren Studien zunehmend unterstrichen wird<sup>2, 4, 5</sup>. Mononukleäre Zellen stellen somit einen Hauptmediator für die Entstehung der Atherosklerose dar.

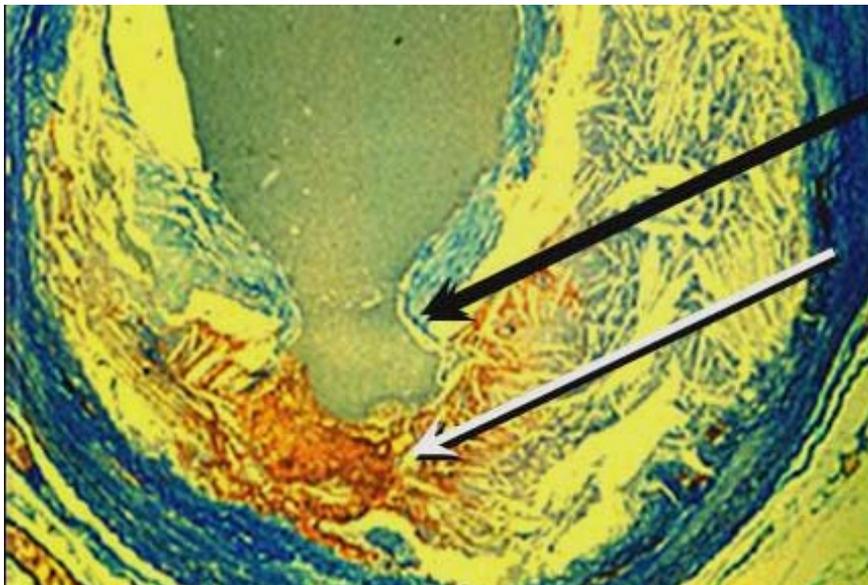
In Folge der Aufnahme von oxidiertem low density lipoprotein (LDL) entwickeln sich eingewanderte Makrophagen zu so genannten Schaumzellen, die sich in den Intimaläsionen in großer Zahl ansammeln können. Es entstehen fettige Streifen und Degenerationen, in denen sich lipidgefüllte Makrophagen und T-Lymphozyten befinden<sup>2</sup>. Durch das Ausschütten von Wachstumsfaktoren und Zytokinen kommt es im weiteren Verlauf zu Umbauprozessen in der Gefäßwand, wobei eingewanderte Muskelzellen mit der Bildung einer bindegewebigen, extrazellulären Matrix (ECM) beginnen und selbst Wachstumsfaktoren (PDGF, M-CSF, IGF-1 usw.) sezernieren<sup>16</sup>. Diese Muskelzellen unterscheiden sich von den so genannten kontraktilen, ortsständigen SMC der Media zum einen durch einen größeren Zellkörper, der vermehrt sekretorische und synthetisierende Organellen enthält. Zum anderen exprimieren sie vermehrt Integrine auf ihrer Oberfläche, die sie sensibler für chemotaktische Reize machen<sup>12, 17</sup>.

Mit weiterem Fortschreiten der Atherosklerose wandern mehr und mehr glatte Gefäßmuskelzellen in die Intima ein und produzieren, angeregt durch Wachstums- und Entzündungsfaktoren, extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagenfibrillen und Proteoglykane. Letztendlich kommt es zur Ausbildung einer dichten Kappe aus fibrösem Bindegewebe, die die atherosklerotischen Läsionen umhüllt und ihnen, je nach ihrer Dicke, Stabilität verleiht<sup>5</sup>.

Durch den chronisch entzündlichen Reiz sezernieren vor allem Makrophagen proteolytische Enzyme, die die stabilisierende Deckkappe ausdünnen und zu Nekrosen innerhalb des Gewebes führen können. Ist die fibröse Deckkappe dünn, was häufig an den seitlichen Begrenzungen der Plaques, den so genannten Schultern vorkommt, besteht durch rheologische Kräfte die Gefahr eines Intimaeinrisses<sup>4, 5</sup>. An den nicht mit Endothelzellen bedeckten Rissstellen adhärieren Thrombozyten, die einen gefährlichen, das Gefäß obliterierenden, Thrombus bilden können<sup>18</sup>. Die entstehenden Plaques können kalzifizieren und exulzerieren.

Im nunmehr instabilen Gewebe entstehen größere Einrisse der Intima, weitere Thromben lagern sich an und engen das Gefäß durch fortdauernde Umbauprozesse der Arterienwand ein. Die Umbauprozesse werden als Remodeling des Gefäßes bezeichnet<sup>19</sup>.

Zusammengefasst entsteht, ursprünglich ausgelöst durch einen dauerhaften atherogenen Reiz, ein fortlaufender, sich immer wiederholender Kreislauf von Zellattraktion, -migration, -akkumulation und -proliferation, Freisetzung von Mediatorsubstanzen und Bildung von extrazellulärer Matrix, mit der Folge eines chronischen Entzündungsprozesses, der das Gefäß immer mehr verengt und letztendlich verschließt, wenn dieser Kreislauf nicht durchbrochen wird.



**Abbildung 1** nach Michael J. Davies, MD

Die Abbildung zeigt zwei Stadien der Entstehung einer intraarteriellen Thrombose eines atherosklerotisch veränderten Gefäßes. 1. Ausdünnung der fibrösen Deckkappe (**schwarzer Pfeil**). 2. Einriss des Endothels (Plaqueruptur) mit konsekutiver Thrombogenität der Gefäßwand durch die freiliegende atherosklerotische Fettschicht (**weißer Pfeil**).

## 1.2 Prävention und Stufentherapie der Atherosklerose

Am Anfang der Atherosklerosetherapie stehen eine Reihe von Allgemeinmaßnahmen, wie die Gewichtsreduktion, eine mediterrane Ernährung, Raucharrest und körperliche Bewegung<sup>20</sup>.

Diese mehr prophylaktischen, als Lebensstiländerung bezeichneten Maßnahmen, zielen auf einen bewussteren Umgang mit der eigenen Gesundheit und verlangen vom Patienten ein gewisses Maß an Eigenverantwortung und Disziplin. Sie werden jedoch leider oft zu spät oder gar nicht ergriffen.

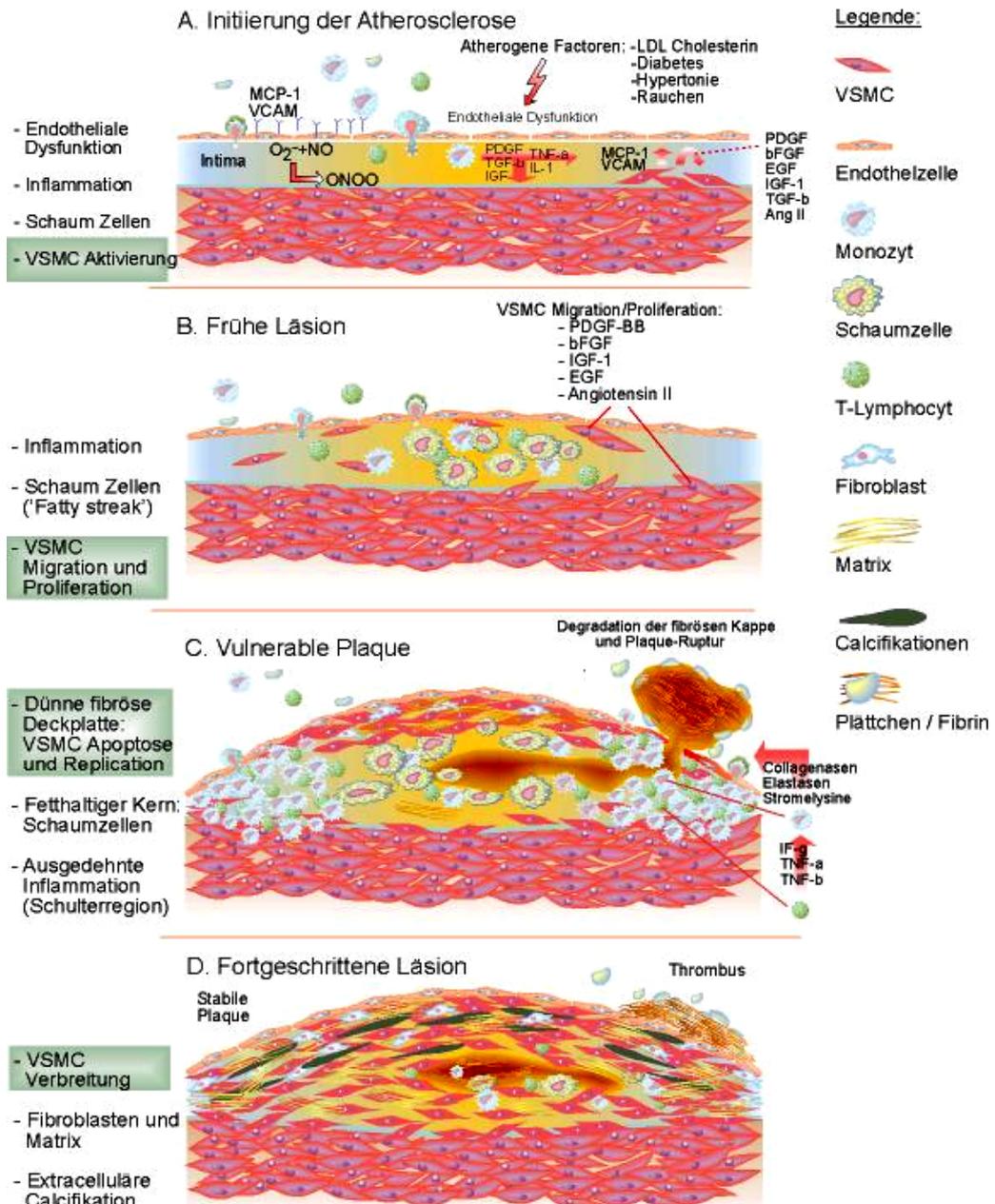
Meist bleibt der Einsatz von Pharmaka nicht aus, sollte aber im besten Falle die oben erwähnten Allgemeinmaßnahmen nur unterstützen. Die gegenwärtigen medikamentösen Strategien konzentrieren sich dabei auf eine Reduktion von sich im Blut befindlichen, atherogenen Substanzen.

Zu hohe Cholesterinwerte werden zum Beispiel mit HMG-CoA-Reduktase Hemmern (Statinen), zu hohe Blutdruckwerte mit  $\beta$ -Blockern bzw. ACE-Hemmern und zu hohe Blutzuckerwerte mit oralen, blutzuckersenkenden Medikamenten oder Insulin behandelt.

Hierbei fällt auf, dass besonders ACE-Hemmer<sup>21</sup> und Statine<sup>22, 23</sup> neben ihren eigentlichen Aufgaben, noch antiinflammatorische, pleiotrope Effekte aufweisen, die deren antiatherogene Eigenschaften unterstützen<sup>22-24</sup>.

Die Fließeigenschaften des Blutes im Rahmen der Atherosklerose und die Prognose nach akutem Koronarsyndrom, mit oder ohne therapeutischer Koronarangioplastie, können durch Inhibitoren der Thrombozytenaggregation, wie zum Beispiel ASS<sup>25</sup> oder Clopidogrel<sup>26</sup> verbessert werden<sup>27</sup>.

Ist die Atherosklerose und damit die Stenosierung der betroffenen Arterien weit fortgeschritten, helfen die medikamentösen Maßnahmen alleine nicht mehr, um den Blutfluss in den verengten Gefäßen aufrecht zu erhalten. Hier kommen minimalinvasive Verfahren, wie die Perkutane Transluminale (Koronar-) Angioplastie (PTA oder PTCA) mit oder ohne Stentimplantation, zum Einsatz<sup>28</sup>. Als Letztes steht die operative Therapie, in Form einer chirurgischen Revaskularisation oder einer Bypass-Operation.



**Abbildung 2** zeigt die aufeinander folgenden Stadien der Entstehung atherosklerotischer Läsionen.

### 1.3 Pathophysiologie der Restenose

Invasive revaskularisierende Maßnahmen sind durch einen hohen Prozentsatz von Wiederverschlüssen des betroffenen Gefäßes gekennzeichnet. Bei der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) sind die Möglichkeiten des Vorgehens (nur Ballonangioplastie versus Ballonangioplastie mit Stenting) und der vom Verfahren ausgehende Stimulus auf das Gefäß und den Organismus unterschiedlich<sup>28</sup>.

Zum Beispiel persistiert der Entzündungsreiz, der von einem Stent ausgeht und ist nicht einmalig, wie bei alleiniger Ballonangioplastie des Gefäßes<sup>29</sup>. Die ablaufenden molekularen und zellulären Prozesse, die zum Wiederverschluss führen, sind jedoch sehr ähnlich.

Die Restenose kann man als eine (Über-)Reaktion des Organismus auf die mechanische Verletzung der Arterien, im Zuge des Heilungsprozesses betrachten. Zwei wesentliche Faktoren tragen zur Restenose bei: Die Neointimabildung und das Gefäßremodeling<sup>30,31</sup>.

Die Restenose ist, wie die Atherosklerose, eine vaskuloproliferative Erkrankung mit dem Unterschied, dass der Prozess, ausgelöst durch die mechanische Dehnung und Verletzung des Gefäßes, schneller abläuft als bei der sich über Jahrzehnte entwickelnden Atherosklerose<sup>30</sup>.

Auslösende Faktoren der Restenose nach Ballonangioplastie sind die Zerstörung des Endothels, das Eindringen der Plaquestruktur und die Dehnung des gesamten betroffenen Gefäßabschnittes.

Durch den Wegfall der intakten endothelialen Oberfläche, kommt es zur Anlagerung von aktivierten Thrombozyten, die verstärkt Adhäsionsmoleküle (P-Selektine) exprimieren<sup>32</sup>. Zirkulierende Leukozyten adhären im Sinne einer Entzündungsreaktion, über ihre Oberflächenintegrine (z.B. Mac-1) an das entstandene Geflecht aus Thrombozyten und Fibrin. Die Leukozyten migrieren, angezogen durch einen chemotaktischen Gradienten durch das thrombotische Geflecht, durchwandern das zerstörte Endothel, infiltrieren tiefere Schichten des Gefäßes und differenzieren sich hauptsächlich zu Makrophagen. Der von den eingewanderten mononukleären Zellen vermittelte Entzündungsprozess ist entscheidend für den weiteren Verlauf der Neointimabildung und damit den Grad der Restenose<sup>4,33,34</sup>.

Alle bisher beteiligten Zellen setzen Zytokine frei. Dadurch migrieren SMC aus der Media und Adventitia<sup>35</sup> in die Innenschicht des Gefäßes und proliferieren dort. Die entstehende Neointima besteht aus ortsständigen Makrophagen, den eingewanderten SMC und einer ECM, die von letzteren synthetisiert wird.

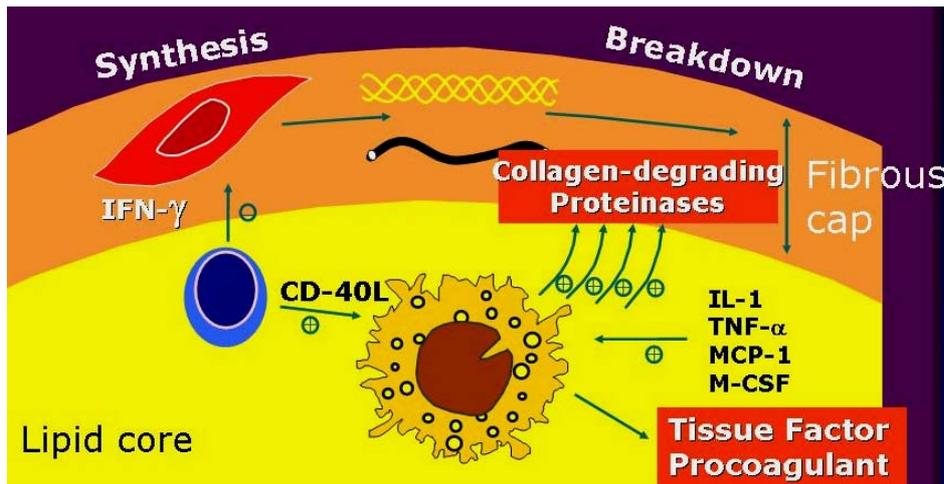
Sata et al. und andere Forschungsgruppen konnten in verschiedenen Studien zeigen, dass ein entscheidender Beitrag zur Bildung der Neointima auch von zirkulierenden Vorläuferzellen (Progenitorzellen) kommt, die an die geschädigte Intima adhäreren und sich zu glatten Gefäßmuskelzellen differenzieren<sup>17, 36, 37</sup>. Dass diese Prozesse beim Menschen und auch im Rahmen der Atherosklerose ähnlich ablaufen, ist noch nicht bewiesen, aber ebenfalls wahrscheinlich<sup>38, 39</sup>. Der Anteil dieser Zellen an allen Zellen der Neointima beträgt in Tierversuchen bis zu 50%<sup>40</sup>.

#### **1.4 Remodeling**

Gefäße unterliegen wie andere Gewebe dauernden Umbauprozessen. Der gesunde Körper vermag durch seine Fähigkeit der Regeneration ein Gleichgewicht von Zellen zur Aufrechterhaltung der Homöostase zu schaffen. Im Falle von persistierenden Umbauprozessen sind Gefäße bis zu einem gewissen Grade in der Lage, sich an die geänderte und verdickte Intima anzupassen und den Blutfluss aufrecht zu erhalten<sup>41</sup>. Hierbei stehen sich Faktoren gegenüber, die sich positiv auf das Gefäßlumen und damit den Durchfluss des Blutes auswirken (positives Remodeling). Dazu zählt die Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen in Neointima und Media, sowie bis zu einem gewissen Grad, der durch mononukleäre Zellen verursachte proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix. Die Apoptose führt Zellen in den programmierten Zelltod und verhindert eine zu starke Vermehrung des Gewebes<sup>42</sup>.

Dagegen stören Faktoren, wie der Aufbau extrazellulärer Matrixproteine und eine übermäßige Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen, durch einen Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus, das Gleichgewicht (negatives Remodeling)<sup>19</sup>. Solche durch chronische Inflammation getriggerten Umbauprozesse finden im Rahmen der Atherosklerose oder nach massiver mechanischer Verletzung durch Ballonangioplastie (mit oder ohne Stenting) statt<sup>43</sup>.

Letztendlich entsteht im fortgeschrittenen Verlauf von negativen Remodelingprozessen eine Stenosierung des Gefäßes, mit negativen Folgen für die Aufrechterhaltung des Blutflusses im betroffenen Organ.



**Abbildung 3** zeigt die Entstehung und das Remodeling der fibrösen Deckkappe atherosklerotischer Plaques. Der Aufbau der extrazellulären Matrix geschieht durch Proteinsynthese glatter Gefäßmuskelzellen (**rote Zelle**), der Abbau durch Sekretion von Proteinasen von Makrophagen (**gelbe Zelle**), die die fibröse Deckkappe ausdünnen (Abb. nach Libby P., *Circulation* 1995; 91: 2844-2850).

### 1.5 Erfolg und Misserfolg revaskularisierender Maßnahmen

Wird das verengte Gefäß durch eine PTA bzw. PCTA, mittels eines in das Gefäß eingeführten Katheterballons wieder revaskularisiert, so liegt die primäre Erfolgsquote zwar bei über 90%, es kommt aber gleichzeitig, in Folge des Dehnungsreizes und der Verletzung der Arterie, zu reflektorischen Gefäßkontraktionen (Elastisches Recoil) und zur Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Innerhalb des ersten halben Jahres nach Intervention, erfolgt so in 30-40% der Fälle eine Restenose des Gefäßes<sup>44, 45</sup>.

Das Elastische Recoil wird durch den Einsatz von Stents zwar verhindert, jedoch lässt sich damit noch nicht eine Adhäsion und Proliferation von Zellen am Stent verhindern, die diesen in 20-30% der Fälle wieder verschließen („*in-stent* Restenose“)<sup>46</sup>. 20% der Patienten mit einer Restenose eines dilatierten Gefäßes, benötigen letztlich eine Bypassoperation.

Auch hier kommt es jährlich in 10-30% der Fälle zu einem Transplantatversagen aufgrund einer Stenosierung der verpflanzten Gefäße<sup>47 48</sup>. Nach Implantation eines venösen Bypasses entsteht in 10-20% der Fälle eine Restenose. Nach 10 Jahren sind 50% aller venösen Bypässe wieder verschlossen<sup>49</sup>.

Der Grund hierfür liegt wohl in der mangelnden Adaptation der Venen an das Hochdrucksystem, in dem sie einem viel höheren Druck und Dehnungsreiz ausgesetzt sind. Arterielle Bypässe verschließen deswegen viel seltener und werden, falls möglich, bevorzugt als Gefäßersatz eingesetzt. Die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

### **1.6 Strategien zur Verhinderung der Restenose**

Die Forschung hat im Laufe der Zeit zahlreiche Strategien entwickelt, um die Restenose nach Gefäßverletzung zu minimieren oder gar zu verhindern. Es wurden Maßnahmen eingesetzt, die den Entzündungsreiz unterdrücken oder eine bessere Reendothelialisierung fördern sollten<sup>32, 50</sup>. Stents wurden dazu mit Antikörpern<sup>51</sup>, Glukokortikoiden<sup>52</sup>, Östrogenen<sup>53, 54</sup> oder NO-Donatoren<sup>55</sup> beschichtet. Wachstumsfaktoren für das Endothel und zytostatische Substanzen wurden appliziert<sup>56, 57</sup>. Aufgrund verschiedener Ursachen, z.B. zu geringer Freisetzung der Stoffe oder zu geringer Wirksamkeit schlugen diese Strategien aber fehl.

Als erfolgversprechendster Ansatz zur Verhinderung der Restenose, werden solche Verfahren gesehen, die den Wiedereintritt von Zellen in den Zellzyklus und dadurch deren Proliferation verhindern<sup>58</sup>. Zu diesen Verfahren zählen gentherapeutische Ansätze<sup>47</sup>, Strahlentherapie<sup>59</sup> und medikamentöse Stoffe wie Flavopiridol<sup>60</sup>, CVT-313<sup>61</sup>, Rapamycin<sup>62</sup> und Paclitaxel<sup>63, 64</sup>. Letztere zwei werden inzwischen mit Erfolg zur Beschichtung von Stents eingesetzt, die den Wirkstoff dann nach und nach an das verletzte Gefäß abgeben. Solche, einen Wirkstoff freisetzenden Stents oder drug eluting stents (DES), sind eine Weiterentwicklung der herkömmlichen, unbeschichteten bare metal stents (BMS).

Bei strahlentherapeutischen Verfahren konnte zwar primär die Restenoserate vermindert werden.

Es stellte sich jedoch heraus, dass der Einsatz von Strahlen zu gefährlichen Nebenwirkungen, wie der Bildung von *in-stent* Thromben oder in Beziehung zum bestrahlten Gebiet zu proximalen und distalen Stenosen (candy-wrapper-effect) führen kann<sup>59, 65, 66</sup>. Aufgrund der größeren klinischen Erfolge und der besseren Verträglichkeit von Rapamycin- und Paclitaxel-freisetzenden Stents, werden diese Verfahren nicht mehr angewandt.

Gentherapeutische Ansätze reichen von ‚antisense‘-Oligodesoxynukleotiden (AS-ODN) über Transkriptionsfaktor-decoy-Konstrukte bis hin zur Überexprimierung proliferationshemmender Gene, um einen zytostatischen Effekt in den Zellen zu erzielen. In den ersten kürzlich veröffentlichten Gentherapiestudien zur Reduktion der Restenose konnte gezeigt werden, dass ‚decoy‘-ODN gegen das Zellzyklusprotein E2F die Neointimabildung in peripheren und koronaren Bypassen signifikant verringern kann<sup>48, 67</sup>. Die einzige randomisierte Restenose-Studie am Menschen mit antisense-ODN, die gegen das nukleäre Protoonkogen c-myc gerichtet war, zeigte aber keine Reduktion der Restenose nach Stentimplantation<sup>68, 69</sup>.

Der derzeit erfolgreichste klinische Ansatz ist der Einsatz von Rapamycin- und Paclitaxel-freisetzenden Stents<sup>70</sup>. Durch mit Rapamycin (Sirolimus®) oder Paclitaxel (Taxol®) beschichtete Stents wird erfolgreich die Zellzyklusprogression und die Zellproliferation verhindert und somit der Anteil der *in-stent* Restenosen verringert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz von Sirolimus Stents, vier Jahre nach Implantation, eine geringere Anzahl an Restenosen, sowie eine signifikant geringere Zahl von kardiovaskulären Ereignissen zu erwarten ist<sup>71</sup>. Nichtsdestoweniger kommt es auch nach der Anwendung von DES zu Restenosen, besonders bei Patienten mit atherogenen Vorerkrankungen, wie Diabetes mellitus. Der Anteil nötiger Revaskularisationen oder schwerer kardialer Zwischenfälle nach Paclitaxel- oder Rapamycin-Stent Implantation liegt je nach Studie und Zeitpunkt des ‚follow-up‘ zwischen 8%-16%<sup>72</sup>.

Eine gefürchtete Nebenwirkung nach primär erfolgreicher Anwendung von DES ist die Stent-Thrombose, so dass ein optimaler Ansatz auch bei beschichteten Stents noch nicht gefunden ist<sup>73</sup>.

Neben der Migration glatter Gefäßmuskelzellen und deren Proliferation innerhalb der Neointima, wird in letzter Zeit auch zunehmend die Bedeutung der Rekrutierung von Entzündungs- und Progenitorzellen, die sich zu VSMC differenzieren, für die Entstehung der Restenose erkannt. Es wird diskutiert, ob der Misserfolg nach dem Einsatz bisheriger DES möglicherweise an der fehlenden Hemmung der Adhäsion zirkulierender Zellen an das verletzte Gefäß liegt.<sup>36, 74, 75</sup>

### **1.7 Kininogen - bekannte Funktionen und molekularer Aufbau**

Hochmolekulares Kininogen (HK) ist ein körpereigenes, aus 626 Aminosäuren bestehendes Einzelstrang- Plasma- Glykoprotein mit einem vom Glykosilierungsgrad abhängigen Molekulargewicht von 88-120 kDa. Das Molekül besteht aus 6 Domänen, die im Folgenden mit D1 bis D6 bezeichnet werden und unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen einnehmen<sup>76</sup>. HK wird auch bezeichnet als alpha2-thiol-Proteinase-Inhibitor und gehört zur Superfamilie der Cystatine, die Cystein-Proteinase Inhibitoren sind. Es wurde zunächst als Vorläufermolekül des bioaktiven Peptides Bradykinin identifiziert und hat eine durchschnittliche Plasmakonzentration von 0,67 µM<sup>77</sup>.

HK ist auch bekannt als William-Fitzgerald-Flaujeac Faktor oder einfach Fitzgerald Faktor des intrinsischen Pfades der Blutgerinnung und fungiert hier als aktivierender, nicht-enzymatischer Kofaktor für Faktor XII (Hagemann Faktor) und XI<sup>78</sup>. Diese aktivierende Funktion hat HK auch für Präkallikrein im Kinin-Kallikrein System<sup>76</sup>. Es spielt somit eine wichtige Rolle bei vielen pathophysiologischen Prozessen, wie der Fibrinolyse, Thromboseentstehung und bei Entzündungsprozessen.

Ein Mangel an Kininogen wird nicht nur mit einer verlängerten aPTT-Gerinnungszeit in Verbindung gebracht, sondern soll laut neueren Studien auch die Ausbildung von Bauchortenaneurysmen bei Brown Norway Ratten begünstigen und innere Organe für Fettdegeneration anfällig machen<sup>79</sup>.

Durch proteolytische Spaltung von hochmolekularem Kininogen mittels Kallikrein, entsteht durch Herauslösen des kurzlebigen Bradykinins, das Großteile der Domäne 4 enthält, das so genannte aktivierte Kininogen (HKa). Bei Bradykinin handelt es sich um einen potenten Vasodilatator, mit Einfluss auf den Blutdruck, die Permeabilität kleiner Blutgefäße und die Schmerzwahrnehmung. Zusätzlich fördert es noch die Angiogenese<sup>80</sup>. Bei HKa handelt es sich um ein durch Konformationsänderung entstandenes Doppelstrangmolekül, bestehend aus einer schweren Kette mit den Domänen 1, 2 und 3, sowie einer leichten Kette, die die Domänen 5 und 6 enthält. Beide Ketten sind über eine einzelne Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Im HKa ist im Vergleich zu HK an der Oberfläche ein grösserer Bereich der Domäne 5 exponiert<sup>76, 81</sup>.

### **1.8 Kininogen - Bindungspartner und Rezeptoren**

Die Folgen des beschriebenen Umfaltungsprozesses nach Spaltung von HK sind weitreichend. Gespaltenes Kininogen (HKa) kann nun an anionische Oberflächen, Zink und Heparin binden<sup>81, 82</sup>.

HKa bindet spezifisch und reversibel in Abhängigkeit von Zink an Endothelzellen und vermittelt dabei stärker als HK einen antiadhäsiven Effekt. HKa entsteht dabei hauptsächlich durch Kontaktaktivierung aus HK auf Endothelzellen<sup>83</sup>. Die endotheliale Zelloberfläche ist somit ein wichtiger Ort für die Bildung und Wirkung von HKa und Bradykinin<sup>84</sup>.

HKa und dessen Domäne 5 können darüber hinaus an das  $\beta$ 2-Integrin Mac-1 auf Leukozyten binden und es blockieren<sup>85</sup>. Mac-1 wird als entscheidendes Integrin bei der Adhäsion von mononukleären Zellen und zirkulierenden Progenitorzellen an das Endothel sowie zur Transmigration durch das Endothel benötigt<sup>86, 87</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), bei dem es sich um einen glycoposphatidylinositol verankerten Zelloberflächenrezeptor handelt, ein Bindungspartner von HKa und dessen Domäne 5 (D5), nicht aber von HK, auf der endothelialen Zelloberfläche existiert<sup>88</sup>. uPAR spielt eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix, an mononukleäre Zellen sowie von Progenitorzellen<sup>89</sup>. Über die Bindung von HKa und D5 an uPAR werden Wege der zellulären Kommunikation unterbrochen. Auf diese Weise wird der antiadhäsive, proapoptotische Effekt von HKa und D5 vermittelt<sup>88, 90</sup>. Vermittelt über diese Mechanismen haben HKa und im speziellen die Domäne 5 die Fähigkeit, genauso wie der Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen zu inhibieren<sup>91-93</sup>. Dies geschieht hauptsächlich über eine Bindung an uPAR<sup>92</sup>.

Der antiadhäsive und proapoptotische Effekt von HKa und D5 ist an das Vorhandensein und die Bindung der Zellen an extrazelluläre Matrixproteine, besonders Vitronectin (VN), geknüpft<sup>94</sup>. HKa und besonders die Domäne 5 binden direkt an VN und konkurrieren damit um die uPAR-abhängige Adhäsion von monozytären Zellen und Endothelzellen an VN<sup>95</sup>. In diesem Zusammenhang wird nur die VN- und nicht die Fibronectin-abhängige,  $\alpha\beta^3$ -integrin medierte Adhäsion durch HKa und Domäne 5 blockiert<sup>83</sup>. Der Plasminogen Aktivator Inhibitor PAI-1 hebt deswegen die proadhäsive Funktion von Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), der genauso wie HKa, Domäne 5 oder VN an uPAR bindet, auf<sup>96</sup>. Da VN und HK / HKa besonders in Abschnitten atherosklerotisch veränderter Koronararterien lokalisiert wurden, ist anzunehmen, dass die beschriebenen Interaktionen auch *in vivo* stattfinden und bei der Pathogenese vaskuloproliferativer Erkrankungen eine Rolle spielen.<sup>97</sup>

### **1.9 Kininogen - Bedeutung und eventueller therapeutischer Einsatz**

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass HKa und D5 die Apoptose induzieren. Der Grund für den apoptotischen Effekt auf verschiedene Zellreihen ist im Zusammenhang mit den antiadhäsiven Eigenschaften von HKa und D5, durch die Blockierung von Adhäsivrezeptoren (z.B.  $\beta$ 2-Integrine) auf Leukozytenoberflächen, Endothelzellen und VSMC zu sehen. Dadurch kommt es zur Unterbrechung der für die Rekrutierung z.B. von mononukleären Zellen und deren Adhäsion an Fibrinogen, Vitronectin und Endothelzellen im entzündeten Gewebe erforderlichen, chemotaktischen Prozesse<sup>82, 83, 90, 92</sup>. Dadurch, dass HKa und die Domäne 5 die Fähigkeit besitzen, die Apoptose von VSMC zu induzieren, ergibt sich als Konsequenz, dass beide Stoffe, konträr zum ebenfalls bei der Proteolyse von HK entstehendem Bradykinin, effektiv die Angiogenese hemmen können (Kinostatin)<sup>91, 93</sup>.

Innerhalb des HKa Moleküls gibt es bestimmte Regionen, die für die Blockierung besagter Adhäsivrezeptoren verantwortlich sind. Diese Regionen (H475-G497) liegen vorwiegend auf der Domäne 5 des Moleküls, die besonders viele der Aminosäuren Histidin, Glycin und Lysin enthält<sup>82</sup>. Daraus lässt sich die besondere Bedeutung der Domäne 5 innerhalb des Makromoleküls ableiten.

Durch die multiplen Interaktionen mit Rezeptoren auf Zelloberflächen hemmen HKa und D5 die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen und induzieren deren Apoptose.

Als weitere Konsequenz ergibt sich, dass HKa und die Domäne 5 des Kininogens, durch die hemmenden Einflüsse auf die uPAR- und Integrin-vermittelte Zelladhäsion von Endothelzellen, mononukleären Zellen und Progenitorzellen an VN, den Umbauprozess von Gefäßen positiv beeinflussen können<sup>93</sup>.

Bei den genannten Prozessen stellt sich gespaltenes hochmolekulares Kininogen (HKa), als klassischer nicht-enzymatischer Kofaktor in der "Kontaktphase" als ein wichtiger endogener Hämostasefaktor mit neuer Funktion als antiadhäsives und antiproliferatives Protein im Entzündungsgeschehen dar<sup>83</sup>.

Im Körper aktiviertes Kininogen und insbesondere die Domäne 5 blockieren durch deren Bindung an VN die uPAR-abhängige Leukozytenadhäsion.

Aufgrund der beschriebenen Bindungsepitope in der Domäne 5 für das  $\beta$ 2-Integrin Mac-1 können HKa und die isolierte Domäne 5 auch die Mac-1-abhängige Leukozytenadhäsion an Fibrinogen und das Endothel *in vitro* und *in vivo* blockieren<sup>82, 98</sup>.

Die genannten zellulären Funktionen definieren den uPAR Liganden Kininogen und die von der Domäne 5 abgeleiteten Mac-1 Inhibitoren als neue physiologische Regulatoren von adhäsiven und proliferativen Prozessen, deren antiadhäsive und antiinflammatorische Eigenschaften einen möglichen späteren Einsatz zur therapeutischen Intervention bzw. Prävention im Rahmen vaskuloproliferativer Erkrankungen, insbesondere der Restenose, erlauben könnten.

## 2 Fragestellung

Nach Ballonangioplastie tritt in vielen Fällen das Problem der Restenose auf.

Neuere Studien haben gezeigt, dass der Anteil an Zellen aus der Blutbahn, die an der Bildung der Neointima nach Gefäßverletzung beteiligt sind, bis zu 50% beträgt. Bei der vorliegenden Arbeit soll daher die Rolle von Kininogen und dessen Fragmenten auf die Monozyten- und Progenitorzell-Rekrutierung und die Rolle von diesen endogenen, antiinflammatorischen Komponenten auf die Extravasation und Akkumulation von monozytären Zellen und Progenitorzellen untersucht werden.

Zusätzlich will die Arbeit eine Antwort auf die Frage geben, ob Kininogen einen Einfluss auf die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen hat.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit, ist es festzustellen, ob durch den Einsatz von Kininogen und dessen Interaktion mit bestimmten Rezeptoren eine Reduktion der Gefäßantwort auf den Dehnungsreiz zu erzielen ist. Davon abgeleitet sollen eventuell mögliche neue Therapiekonzepte *in vivo* zur Intervention vaskulärer Erkrankungen, insbesondere der Restenose geprüft werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Operationsbesteck

<b>Produkt:</b>	<b>Hersteller:</b>
Feine ophthalmologische Schere nach Vannas, gerade, OC 498 R	Aesculap® AG & Co. KG D-78532 Tuttlingen, Deutschland
Arterienklemme BH 111	Aesculap® AG & Co. KG D-78532 Tuttlingen, Deutschland
Schere gebogen BC 61	Aesculap® AG & Co. KG, D-78532 Tuttlingen, Deutschland
Pinzette, gebogen, armiert OC 22 R	Aesculap® AG & Co. KG, D-78532 Tuttlingen, Deutschland
Schere gerade BC 30	Aesculap® AG & Co. KG, D-78532 Tuttlingen, Deutschland
Feine anatomische Pinzette OC 21R	Aesculap® AG & Co. KG, D-78532 Tuttlingen, Deutschland
Standardführungsdraht für Katheter C-SF-15-20, gerade	William Cook®, Europe DK-4632 Bjaeverskov
Kauter	ZIK- Medizintechnik, Marktheidenfeld

#### 3.2 Reagenzien

<b>Produkt:</b>	<b>Hersteller:</b>
Dulbecco's phosphate buffered saline	PAA Laboratories GmbH, A-4061, Pasching
Antibody Diluent Reagent Solution	Zymed® Laboratories Inc., CA-94080 San Francisco, USA
10% Non-immune goat serum	Zymed® Laboratories Inc., CA-94080 San Francisco, USA
Vectashield® mounting medium H 1000 for fluorescence	Vector Laboratories, CA-94010 Burlington, USA
Aqua ad iniectabilia	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun AG, D-34209 Melsungen
Isotone NaCl-Lösung zum Spülen Und Befeuchten	Baxter S.A., B-7860 Lessines
Aceton 99,8%	Merck AG, D-64271 Darmstadt
Formaldehyd 2%	Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe

TritonX-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89522 Steinheim
Gills Hematoxylin III	Merck AG, D-64271 Darmstadt
2-Propanol, reinst	Merck AG, D-64271 Darmstadt
Methanol 100%	Merck AG, D-64271 Darmstadt
Eosin Y	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89522 Steinheim
Phloxin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-89522 Steinheim
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH, D-76185 Karlsruhe
Natriumacetat	Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs
Wasserstoffperoxid 30%	Merck AG, D-64271 Darmstadt

### 3.3 Medikamente und Narkotika

Produkt:	Hersteller:
Isofluran-Baxter	Baxter Deutschland GmbH
Rompun 2%	Bayer AG, Leverkusen
Ketamin Inresa 50 mg/ml	Inresa, Freiburg
Atropinsulfat 0,5 mg/ml	Fresenius Kabi, Bad Homburg

### 3.4 Weitere Materialien

Produkt:	Hersteller:
Pipetten 1000 µl / 200 µl / 100 µl / 10 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, D-50389 Wesseling-Betzdorf
Einmalspritzen 1ml , Injekt F, Tuberkulin	B. Braun AG, D-34209 Melsungen
Einmalspritzen 5ml , Injekt Solo	B. Braun AG, D-34209 Melsungen
Sterile Nadel, BD Microlance™ 26 Gau, 0,45×13mm	BD Drogheda, Ireland
Sterile Nadel, 20 Gau, 0,9 × 70 mm	Terumo® Euope, 3001 Leuven, Belgien
Perfusionsbesteck mit Flügeln Micro Flo™, 0,5 × 20 mm (25 Gau)	Ind. Biomedica, Spa, Italy
Ethilon® 7-0 Faden schwarz, monofil Polyamid, nicht resorbierbar	Ethicon®, Johnson & Johnson, BE-1932 St.Stevens-Woluwe
Ethilon® 6-0 Faden schwarz, monofil, Polyamid, nicht resorbierbar	Ethicon®, Johnson & Johnson, BE-1932 St.Stevens-Woluwe
Fix-o-gum, Rubber-cement	Marabuwerke GmbH & Co. KG, D-71732 Tamm

Objektträger Super Frost® Plus	Menzel GmbH & Co. KG, D-38116 Braunschweig
Deckgläser für Objektträger	Menzel GmbH & Co. KG, D-38116 Braunschweig
Tissue Tek® OCT™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Netherlands
Safe Seal Microcentrifuge Tubes 0.65 ml/2 ml	Sorenson™ Bioscience, Inc., Utah, 84107 USA
Diamand® D <sub>10/100/200</sub> Certified Quality Tips 10µl//100µl/200µl	Gilson™ International B.V., Laan vans- Gravenmade 80, 2495 AS Den Haag, Netherlands
Dako® Pen	DakoCytomation, DK-2600 Glostrup
Softasept®, alkoholische Lösung zum Aufsprühen	B. Braun AG, D-34209 Melsungen
Parafilm®	American National Can™, Neenah, Wi-54956, USA

### 3.5 Verwendete Geräte

Fluoreszenzmikroskop: Leica <b>DMRB</b> mit UV-Licht und Fluoreszenzfiltern	Leica Microsystems, Ernst-Leitz-Str. 17-37 D-35578 Wetzlar
Mikroskop Leica S4E	Leica Microsystems, Ernst-Leitz-Str. 17-37 D-35578 Wetzlar
MST Minishaker	IKA® Works Inc., NC 28405 Wilmington
Biofuge pico, Heraeus®	Kendro® Labor Products, D-37520 Osterode
IKA® Vibrax VXR	IKA® Works Inc., NC 28405 Wilmington
Kryostat CM 1900	Leica Microsystems, Ernst-Leitz-Str. 17-37, D-35578 Wetzlar

### 3.6 Grundsubstanz für die Herstellung des Gels

Grundsubstanz	Pluronic F-127
Verwendete Konzentration	25 % wt/vol
Produktnummer	P2443
Hersteller	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-82054 Taufkirchen

### 3.7 Verwendete Mäuse

Inzuchtmäuse	C <sub>57</sub> /BL-6N, männlich
Haplotyp	H-2b
Farbe	Schwarz
Gewicht	22-25 g
Lieferant	Charles River Wiga, GmbH, Sandhofer Weg 7, D-97633 Sulzfeld

### 3.8 Verwendete Antikörper und Färbe-Kits

#### 3.8.1 Resorptionsnachweis des applizierten Kininogens ins Gefäß

##### Antikörper gegen Kininogen

K 1800 Kininogen, heavy chain, HMW	
Wirt	rat
Isotyp	monoclonal IgG, anti human
Konzentration	500 mg/l
Verwendete Verdünnung	1:10, 1:20 und 1:100
Hersteller	US Biological

##### Sekundärantikörper

Alexa Fluor 488 nm, grün	
Wirt	Goat
Isotyp	polyclonal IgG, anti-rat
Konzentration	2 mg/ml
Verwendete Verdünnung	1:150
Hersteller	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

#### 3.8.2 Färbung von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC)

##### Primärantikörper gekoppelt mit Farbstoff

Monoclonal Anti-Actin, $\alpha$ -Smooth Muscle-Cy3 antibody	Clone 1A4 Product No. C6198
Wirt	Rat
Isotyp	monoclonal IgG 2a, anti-mouse
Konzentration	Solution in 0,01 M phosphate buffered saline
Verwendete Verdünnung	1:500
Hersteller:	Sigma-Aldrich Chemie GmbH D-82024 Taufkirchen

### 3.8.3 Proliferationsmarker

PCNA Staining Kit, Lot No.30476714	Zymed® Laboratories Inc., CA-94080 San Francisco, USA
------------------------------------	--

### 3.8.4 Monozyten und Makrophagen Färbung

#### Primärantikörper

Rat Anti Mouse Macrophages/Monocytes	Clone number: MOMA2, IgG
Wirt	Rat
Isotyp	IgG anti-mouse
Konzentration	0,5 mg/ml
Verwendete Verdünnung	1:10
Hersteller	Serotec GmbH, D-40210 Düsseldorf

#### Sekundärantikörper

Alexa Flour® 546 nm, rot	
Wirt	Goat
Isotyp	polyclonal IgG, anti-rat
Konzentration	2 mg/ml
Verwendete Verdünnung	1:200
Hersteller	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA

### 3.8.6 Apoptose Färbung

In Situ Cell Death Detection Kit C 2156793 TMR red	Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim
---	---

### 3.9 Versuchsschema

Für das Experiment wurden vier Versuchsgruppen mit je nach Versuch vier bzw. sechs C57/BL-6 Mäusen gebildet. Ziel des Experimentes war es, die Resorption und die Wirkung des im Gel gelösten Kininogens und der Domäne 5 des Kininogens auf die Bildung, der durch Denudation der A. femoralis entstehenden Neointima, zu testen.

Um eine Abgrenzung der aus dem Knochenmark und dann später aus der Zirkulation stammenden mononukleären Zellen in der Gefäßwand (Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen) von anderen nicht zirkulierenden Zellen vornehmen zu können, wurden die Untersuchungen nach Denudation der A. femoralis an Mäusen durchgeführt, denen

Knochenmark aus „green fluorescent protein“ (GFP) exprimierenden Mäusen transplantiert wurde.

Als *in vivo* Modell dienten hier mit 11 Gy, myeloablativ bestrahlte C57/BL-6 Inzuchtmäuse, die nach der Bestrahlung Knochenmark von transgenen „green fluorescent protein“ (GFP) überexprimierenden Mäusen transplantiert bekamen. Aufgrund der grün markierten Spenderzellen ließen sich die Zellen, die ursprünglich dem Knochenmark entstammten und an der Neointimaentstehung im Empfängertier beteiligt waren, im Fluoreszenzlicht leicht identifizieren. 4 Wochen nach erfolgreicher Knochenmarkstransplantation (Bone marrow transplantation - BTX) wurde das Gefäß denudiert und weitere 3 Wochen später entnommen. Die erste Gruppe bekam nach der Operation weder Gel noch Kininogen/Domäne 5. Die zweite Gruppe fungierte als Kontrollgruppe und bekam nur Gel mit dem entsprechenden Lösungspuffer für Kininogen/D5 appliziert. Die dritte Gruppe bekam Gel mit aktiviertem Kininogen (HKa) und die vierte Gruppe Gel mit der Domäne 5 des Kininogens appliziert.

**Tabelle 1:** Angewandte Versuchsgruppeneinteilung

Versuchsgruppe	Verabreichter Stoff
- 1: 4 GFP Mäuse	→ ohne Gel
- 2: 6 GFP Mäuse	→ Nur Gel mit Puffer
- 3: 6 GFP Mäuse	→ Gel mit Kininogen
- 4: 6 GFP Mäuse	→ Gel mit Domäne 5 des Kininogens

### 3.10 Bestrahlung und Transplantation

#### 3.10.1 Modell zur Transplantation GFP positiver

##### Knochenmarkszellen in Mäusen

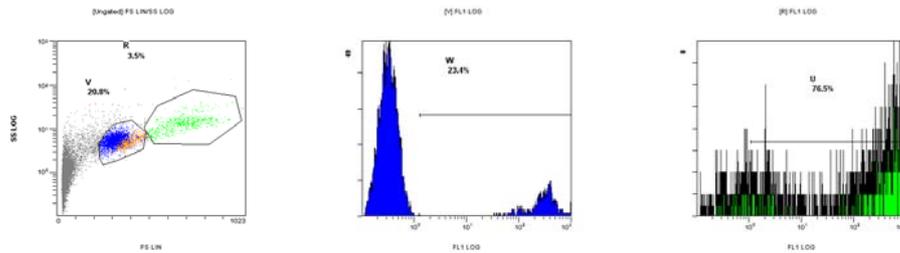
Als Spender- und Empfängermäuse dienten Wildtypmäuse bzw. transgene Mäuse der Reihe C57/BL-6 der Firma Charles River.

Die Spendermäuse, die uns freundlicherweise von Dr. R. Voswinckel, Abteilung für Innere Medizin II, am Universitätsklinikum Gießen und Marburg zur Verfügung gestellt wurden, exprimierten ubiquitär das „green fluorescent protein“ (GFP).

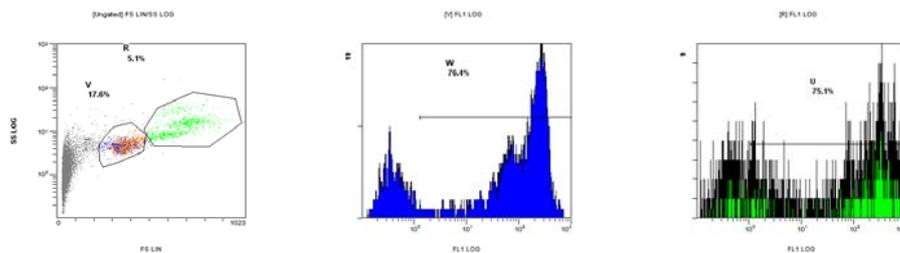
Die acht Wochen alten Empfängermäuse wurden mit einer letalen Dosis von 11 Gy bestrahlt, um deren Knochenmark zu zerstören.

Direkt nach Bestrahlung wurden den Empfängermäusen unfraktionierte Knochenmarkszellen der GFP-positiven Spendermäuse in das venöse Blutssystem injiziert. Weitere sechs Wochen nach der Knochenmarkstransplantation war das Knochenmark der Empfängermäuse mit GFP-positiven Zellen repopularisiert. Die mittels Durchflusszytometrie gemessene Repopulationsrate lag im Durchschnitt bei mehr als 85 %. Damit waren die Mäuse bereit zur Operation.

### 4 Wochen



### 6 Wochen



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

### 3.10.2 Herstellung und Transplantation von GFP-positiven

#### Knochenmarkszellen

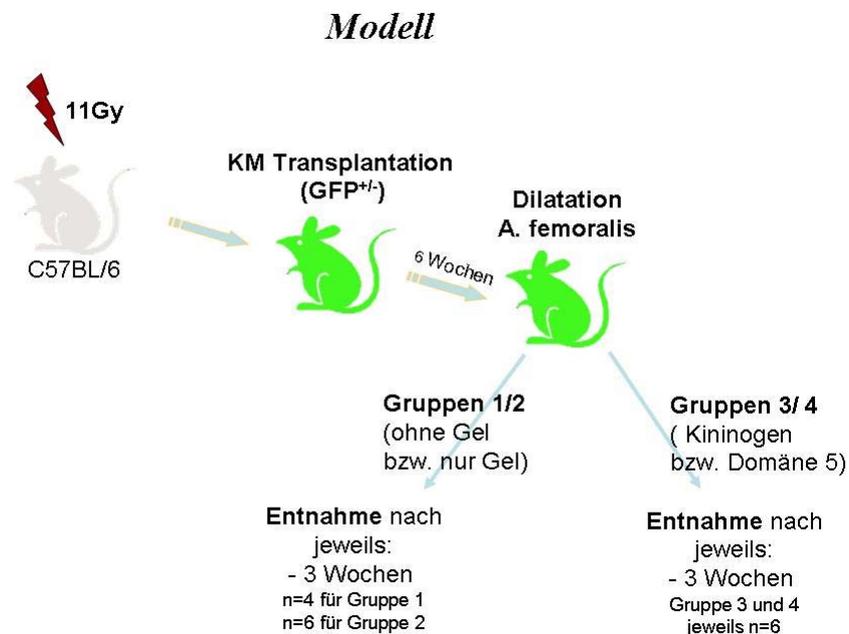
Die GFP positiven Spendermäuse wurden zur Gewinnung ihrer Knochenmarkszellen mit einer Überdosis Isofluran getötet. Anschließend wurden Femur und Tibia entnommen.

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurde die Knochenmarkshöhle mehrmals mittels einer 25 gauge Injektionsnadel, mit calcium- und magnesiumfreier "Hanks Balanced salt solution" (HBSS) gespült und die Suspension in einer sterilen Schale aufgefangen.

Anschließend wurden die Suspensionen mit einem Nylonsieb (40µm) filtriert und die aufgefangenen Zellen noch etwa zwei- bis dreimal mit HBSS gewaschen.

Die gewonnenen Knochenmarkszellen wurden in einer Neubauerkammer gezählt und anschließend in RPMI 1640 resuspendiert.

Jede der Mäuse erhielt nun 0,1 ml der hergestellten Knochenmarkssuspension in die Schwanzvene injiziert, was etwa  $3 \times 10^6$  Knochenmarkszellen entsprach.



**Abbildung 5:** Verwendetes Arbeitsmodell und Aufteilung der Versuchsgruppen.

### 3.11 Betäubung und Operation der Maus

Die nachfolgend beschriebenen Tierversuche erfolgten nach entsprechender Genehmigung durch das Regierungspräsidium Gießen und wurden unter Beachtung der Richtlinien für Tierversuche durchgeführt.

#### 3.11.1 Narkose

Um die Narkose einzuleiten, ließ man die Mäuse kurzzeitig, bis zur Bewusstlosigkeit, Isofluran inhalieren. Dazu tränkte man ein Stück Stoff mit dem Inhalationsnarkotikum und setzte die Maus zusammen mit dem Stoff in eine Inhalationskammer. Die Wirkung der Narkose ließ sich an der Atemfrequenz der Maus ablesen.

Zur darauf folgenden Dauernarkose der Mäuse wurde folgendes Schema verwendet:

**Tabelle 2:** Verwendetes Narkose- und Dosierungsschema.

<b>Verwendete Pharmaka:</b> - Rompun® 2% - Ketamin Inresa - NaCl 0,9 %	<b>Angewendetes Mischungsverhältnis:</b> 4 ml Ketamin + 1 ml Rompun® + 5 ml NaCl
<b>Dosierungsschema:</b> → 0,05-0,1 ml des oben genannten Mischungsverhältnisses i.m, 1:1 verdünnt mit NaCl.	

4 ml Ketamin Inresa® wurden mit 1 ml Rompun® 2% vermischt. Das Gemisch wurde anschließend 1:1 mit Kochsalzlösung (NaCl) verdünnt. Von dieser Lösung, die nochmals 1:1 mit NaCl verdünnt wurde, spritzte man den Mäusen, abhängig vom Gewicht, 0,05-0,1 ml intramuskulär in ein Bein. In dieser Dosierung hielt die Narkose aus Erfahrung etwa ein bis zwei Stunden.

Um vagale Reize durch die Narkose zu eliminieren, bekamen die Mäuse noch 0,1 ml Atropinsulfat intramuskulär, in der Verdünnung 1:10, in das zur ersten Injektion kontralaterale Bein.

### 3.11.2 Operation

Die für die Operation verwendeten Instrumente und Pharmaka wurden bereitgelegt.

Die narkotisierte Maus wurde auf dem Rücken liegend, mit Klebestreifen über den vorderen und hinteren unteren Extremitäten, unter dem Gesichtsfeld des Mikroskops so befestigt, dass in der kleinsten Vergrößerung der gesamte Operationsbereich am Oberschenkel sichtbar war.

Als nächstes wurden mit einer gebogenen Schere die Haare im Operationsbereich abgeschnitten und das Bein mit Desinfektionsmittel abgesprüht.

Mit einer geraden Schere wurde entlang des vermuteten Verlaufs der A. femoralis, von distal nach proximal, ein Hautschnitt gesetzt.

Spätestens jetzt wurde das Gefäß-Nerven-Paket am Oberschenkel sichtbar.

Mit zwei stumpfen Pinzetten wurde das über den Gefäßen befindliche Bindegewebe großzügig entfernt oder zur Seite gedrängt.

Als nächstes trennte man den N. femoralis von den Gefäßen, ohne diesen dabei zu verletzen.

Das Bindegewebe zwischen Nerv und Arterie wurde abgelöst: Mit einer Branche der Pinzette fuhr man unter den Nerv und hob diesen leicht an. Mit der zweiten Pinzette schob man das gespannte Bindegewebe stumpf zur Seite und löst es somit ab. Die Länge, über die der Nerv freigelegt werden sollte, richtete sich nach der Lage und der Länge der begleitenden A. femoralis. Als Orientierung diente die Länge vom Abgang der A. profunda femoris bis zum Übergang der A. femoralis communis in die A. iliaca externa. War der Nerv abgelöst, wurde er nach lateral weggelegt.

Im folgenden Schritt trennte man die Arteria von der Vena femoralis und zwar noch etwas weiter nach distal als den Nerv. Man hob mit einer stumpfen Pinzette die Arterie vorsichtig an und fuhr mit einer Branche der anderen Pinzette zuerst zwischen Arterie und Vene und dann unter dem Gefäß hindurch. Nun konnte man mit beiden Pinzetten das Bindegewebe wieder stumpf zur Seite drängen.

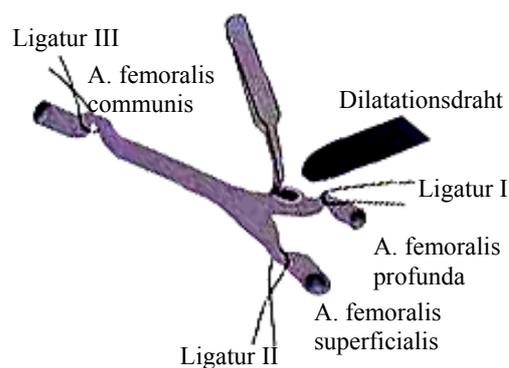
Als nächstes suchte man die A. profunda femoris und löste diese ebenso von der Vene.

Im Folgenden benötigte man drei Fäden mit einer Länge von etwa 10 cm und der Stärke 7-0 zum Anschlingen der freigelegten Gefäße.

Mit diesen Fäden wurde zunächst die A. femoralis, distal des Abgangs der A. profunda femoris angeschlungen (Ligatur II auf der Abbildung 6), dann die Arteria profunda selbst (Ligatur I) und zuletzt die A. iliaca externa, proximal des Übergangs zur A. femoralis (Ligatur III). Dazu führte man den Faden unter dem Gefäß hindurch und überkreuzte ihn einmal. Die Fäden fixierte man mit Klebestreifen am Fuß des Mikroskops.

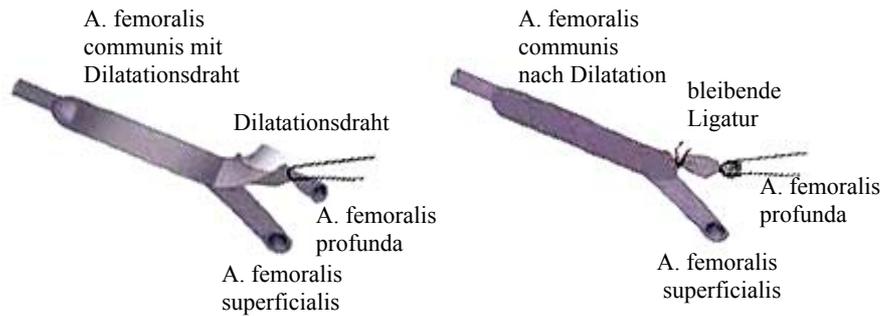
Vor der Denudation wurde Lidocain (Xylocain®) auf die Gefäße getropft, um sie zu erweitern. Die Fäden der angeschlungenen Gefäße wurden nun straff gezogen, um den Blutfluss kurzzeitig, während der Denudation, zu unterbrechen. An der A. profunda femoris wurde, etwas distal von deren Abgang, mit einer feinen Schere nach Vannas, ein kleiner Schnitt quer zur Verlaufsrichtung des Gefäßes gesetzt.

Mittels einer kleinen, zuvor hakenförmig abgebogenen Injektionsnadel erweiterte man das im Gefäß entstandene Loch, indem man die Arterie zur Seite zog.



**Abbildung 6:** Operationschema vor Einführung des Drahtes  
(Abbildung modifiziert nach Sata et al.)

Der Führungsdraht zur Denudation des Gefäßes wurde mit einer vorne gummierten Pinzette in das erweiterte Loch in der A. profunda femoris eingeführt und etwas vorgeschoben. Der Faden an der A. iliaca externa wurde leicht gelockert und der Draht bis zur A. iliaca externa vorgeschoben. Dort verblieb er eine Minute.



**Abbildung 7:** Schema während der Denudation

**Abbildung 8:** Schema nach der Denudation

(Abbildungen modifiziert nach Sata et al.)

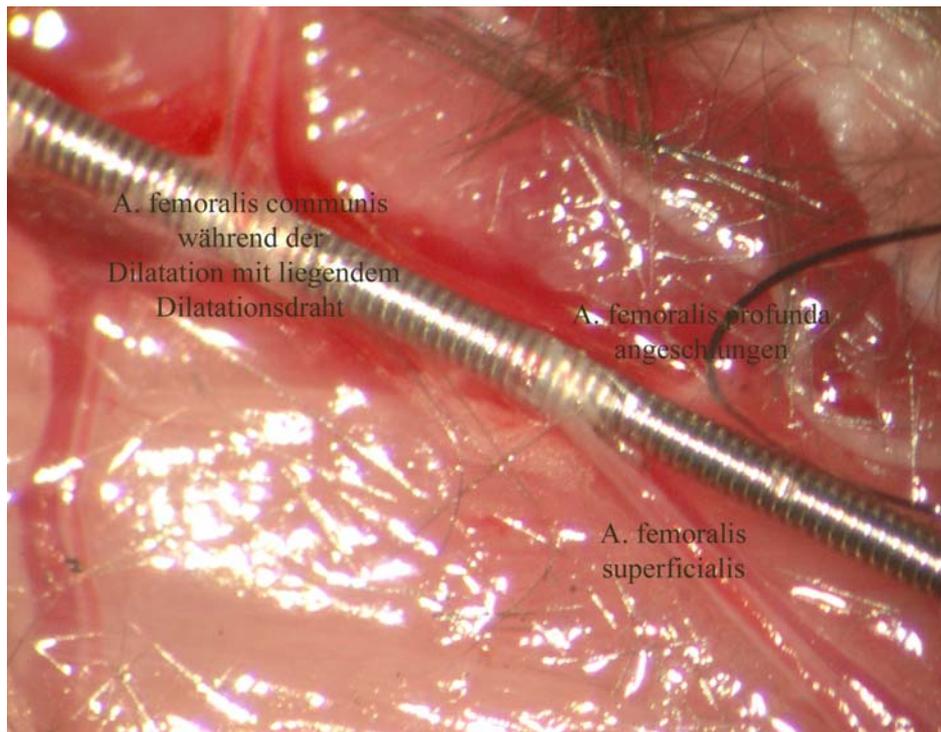
Bevor man den Draht entfernte, tropfte man erneut etwas Lidocain auf die Arterie und zog den gelockerten Faden wieder fest. Der Draht wurde entfernt.

Um eine Blutung zu verhindern wurde die A. profunda proximal und distal des Einschnittes mit Faden ligiert (Ethilon® 7-0, siehe oben). Danach entfernte man die zum Anschlingen verwendeten Fäden in umgekehrter Reihenfolge.

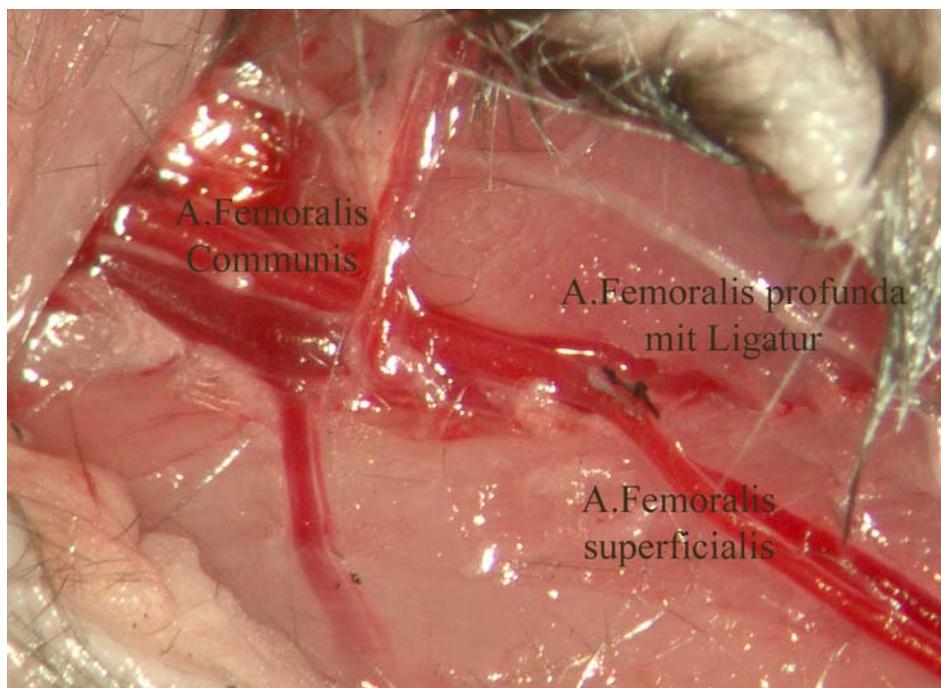
Die A. femoralis sollte nach dem Eingriff wieder komplett perfundiert sein. Dies konnte an der Färbung und der Pulsation des Gefäßes kontrolliert werden. Jetzt konnte das Gel verabreicht werden.

Nach der Applikation des Gels wurde der operierte Situs wieder verschlossen, das heißt die Haut über der denudierten Arterie mit Einzelknopfnähten zugenäht. Nach der Operation wurde die Maus bis zum Erwachen unter eine Wärmelampe gelegt, um ein weiteres Auskühlen des Körpers zu vermeiden.

Gleichzeitig bekam sie über einen Schlauch Sauerstoff (2 l/min per inhalationem) appliziert.



**Abbildung 9:** Operationssitus **während** der Denudation, mit Draht in der A. femoralis communis



**Abbildung 10:** Operationssitus nach abgeschlossener Operation mit Ligatur der A. profunda femoris

### **3.12 Verwendetes Kininogen, Zubereitung und Applikation des Gels**

Das 2-chain high molecular weight kininogen (HKa) wurde von Enzyme Research Laboratories; South Bend, IN, USA bezogen. Das aufgereinigte HKa zeigte eine Bande bei 110 kDa in nicht reduziertem sodium dodecyl sulphate (SDS) Gelen und zwei Banden von 62 und 46 kDa in reduzierten SDS Gelen. Glutathione-S-transferase (GST) Fusionspeptide der Domäne 5 des Kininogens wurden uns freundlicherweise von Dr. T. Chavakis, Universitätsklinikum Giessen-Marburg, zur Verfügung gestellt. Es wurde hergestellt, indem GST N-terminal mit den Sequenzen K 420 to S513 fusioniert wurde. Die Mutanten wurden über eine Glutathion Seule mit einer Reinheit von >95 % aufgereinigt. Die Peptidsynthese und die die HPLC Aufreinigung wurden von Dr J. Lambris (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) durchgeführt. Die Rückfaltung zur entsprechenden Tertiärstruktur von Cystein-haltigen Peptiden wurde mittels Oxidation für 3 Tage bei 4 °C unter kontinuierlicher Bewegung durchgeführt. Der Puffer hierfür bestand aus 50 mM Ammonium-Bicarbonat, pH 8,5 bei einer Endkonzentration von 100 mg/ml. Anschließend wurden die Peptide gefriergetrocknet.

Das thermosensible Gel musste erst zubereitet werden und wurde in Pulverform geliefert. Es wurde in einem Eppendorfgefäß in PBS bei 0 °C gelöst und in einem mit Eiswasser befüllten Topf aufbewahrt. Dem flüssigen Gel mengte man für die Versuchsgruppe drei 500 µmol/l aktiviertes Kininogen und für Versuchsgruppe vier Domäne 5, ebenfalls in der Konzentration 500 µmol/l bei.

Bei Raumtemperatur wurde das Gel fest und konnte verabreicht werden. Von dem Gel wurden in jeder Versuchsgruppe pro Maus 0,1ml um die denudierte Arterie gespritzt:

Eine große Injektionsnadel wurde an der Spitze stumpf geschliffen. Vom noch flüssigen Gel zog man 0,1 ml in eine Spritze auf und wartete, bis es bei Raumtemperatur fest wurde.

Bei der Applikation des Gels war darauf zu achten, dass die Arterie im denudierten Bereich komplett vom Gel umschlossen war.

Die abgeschliffene Injektionsnadel wurde unter das denudierte Gefäß geschoben, so dass die Spitze unter dem Gefäß zum Liegen kam. Jetzt wurde das Gel appliziert. So quoll es zu beiden Seiten der Arterie hervor und bedeckte sie rundherum.

### **3.13 Fixierung und Entnahme der Gefäße**

#### **3.13.1 Fixierung**

Zur Gefäßentnahme musste die Maus getötet werden, indem man sie eine Überdosis Isofluran® Inhalationsnarkotikum inhalieren ließ.

Bevor das denudierte Gefäß nach 3 Wochen entnommen werden konnte, wurde es in PBS gelöstem und auf pH 7,4 gepuffertem, 2% Paraformaldehyd (PFA) von intraluminal fixiert. Dies geschah systemisch durch linksventrikuläre Injektion über eine feine Injektionsnadel. Dazu wurde der Thorax der Maus eröffnet, mit einer feinen Injektionsnadel der linke Ventrikel punktiert und das PFA langsam appliziert. Durch den Druck der sich über dem Herzen befindlichen Wassersäule, wurde trotz Asystolie das Gefäßsystem perfundiert. Dieser Vorgang sollte mindestens fünf Minuten dauern, um eine ausreichende Inkubation des gesamten Gefäßes mit PFA zu gewährleisten.

Gleichzeitig wurde das noch im Gefäßsystem der Maus vorhandene Blut entfernt. Das passierte durch Setzen einer kleinen Inzision im rechten Vorhof, über die das Blut abfloss.

#### **3.13.2 Gefäßentnahme**

Nach der Fixation wurde durch einen Hautschnitt das ehemalige Operationsgebiet eröffnet und die denudierte A. femoralis communis aufgesucht.

Das gelang, indem man von den vormals gesetzten Ligaturen an der A. profunda femoris dem Gefäßverlauf nach proximal folgte.

Nun wurde das über dem Gefäßsystem befindliche Bindegewebe mit zwei stumpfen Pinzetten erneut entfernt und die denudierte Arterie so weit wie möglich freigelegt. Dabei war darauf zu achten, das Gefäß möglichst nicht zu verletzen.

Anschließend wurde die Arterie zuerst am Übergang der A. femoralis communis zur A. iliaca und dann am Abgang der A. profunda femoris herausgetrennt, in einer Petrischale mit PBS von Blutresten gereinigt und für über nacht in 2% PFA zur Verbesserung der Fixierung eingelegt.

War dies geschehen, wurde ein 0,65 ml Eppendorfgefäß mit Tissue Tek® befüllt und die fixierte Arterie der Länge nach darin eingebettet.

Zeigte das proximale Ende der Arterie in Richtung Öffnung des Gefäßes, wurde beim späteren Schneiden des Gefäßes das denudierte, distale Ende zuerst bearbeitet (siehe Schneiden des Gefäßes).

Als nächstes kam die fixierte und eingebettete Arterie im Eppendorfgefäß, zum Einfrieren in flüssigen Stickstoff (N<sub>2</sub>).

Das gefrorene Eppendorfgefäß wurde zur Konservierung in einem Tiefkühlschrank bei einer Temperatur von –80 °C aufbewahrt.

### **3.14 Anfertigen der Gefäßschnitte**

Zum Schneiden der Arterien diente ein Kryostat® CM 1900 der Firma Leica.

Die gefrorenen Gefäßblöcke wurden mit einer Zange vorsichtig aus dem Eppendorfgefäß gedrückt. Beim Schneiden wurde jeweils ein Gefäßblock, mit der flachen Seite nach unten, bei –24 °C im Inneren des Gerätes mit Tissue Tek® befestigt. Der Stempel mit dem Gefäßblock wurde eingespannt und konnte nun ebenfalls bei –24 °C bearbeitet werden.

Als Schichtdicke wurden 6–7 µm gewählt.

Jeweils drei Schnitte kamen auf einen beschichteten Objektträger (Super Frost® Plus; Menzel Gläser).

Die Lagerung der Schnitte auf den Objektträgern geschah wiederum bei –80 °C.

### 3.15 Morphometrie der Gefäßschnitte

Für die Morphometrie, zum Ausmessen der Dicke der Neointima, wurden pro Arterie jeweils fünf Objektträger mit je drei Schnitten bestückt. Von den drei Schnitten auf jedem Objektträger wurden zwei ausgewertet.

Jeweils zwei Schnitte, vom Anfang, der Mitte und dem Ende der entnommenen Arterie, wurden morphologisch ausgemessen, um die Neointimaentwicklung in ihrem gesamten Verlauf beurteilen zu können.

Für eine bessere Abgrenzung der einzelnen Gefäßschichten voneinander, wurden die Gefäßschnitte vor der Ausmessung mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

**Tabelle 3:** Verwendetes Schema für die Hämatoxylin-Eosin Färbung

<b>Herstellung der Eosinlösung:</b>	
100 ml EosinY gelöst in Aqua dest. (10 g/l)	
10 ml Phloxin gelöst in Aqua dest. (10 g/l)	
780 ml 95% Alkohol	
4 ml Eisessig	

<b>Färbung:</b>	<b>Inkubationszeit:</b>
1. Kryoschnitte in 4% PFA fixieren.	10 min
2. Schnitte in PBS rehydrieren.	15 min
3. Schnitte mit Gills Hämatoxylin III -Lösung inkubieren lassen (Merck Nr. 5173).	6 min
4. Schnitte in Eisessig, verdünnt mit PBS (1:100) geben.	1,5 min
5. Schnitte wässern in fließendem lauwarmem Wasser.	10 min
6. Schnitte mit Eosinlösung inkubieren.	3 min
7. Schnitte erneut fixieren (94ml 96% Propanol auf 6ml Eisessig).	2 min
8. Schnitte in 100% Propanol.	2 x 2 min
9. Schnitte mit mounting medium eindeckeln.	
10. Befestigen der Deckgläser mit Fix-o-gum.	

Zunächst stellte man eine Eosinlösung aus in destilliertem Wasser gelöstem Eosin, Phloxin, Alkohol und Eisessig her.

Die Kryoschnitte wurden zunächst 10 min in 4 °C kaltem PFA fixiert und 15 min mit PBS rehydriert. Danach ließ man die Schnitte 6 min mit der Hämatoxylin Lösung inkubieren und fixierte die Färbung 1,5 min in Eisessig. Zur weiteren Färbung wurden die Schnitte 3 min unter indirektem Kontakt mit fließendem Wasser im Färbebehälter gewaschen. Im nächsten Schritt färbte man die Schnitte 2 min mit der hergestellten Eosinlösung, fixierte erneut 2 x 2 min mit einer Mischung aus Alkohol und Eisessig und danach 3 min mit Propanol. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Eindeckmedium und Glas eingedeckelt.

Das Ausmessen der Gefäßschichten geschah histomorphometrisch mit dem Fotoprogramm KS 300/3.0 Windows release® 1997 der Firma Carl Zeiss Vision GmbH und einem an den Computer angeschlossenen Leica Fluoreszenz-Mikroskop.

Dabei sollte die arterielle Antwort auf den Dehnungsreiz und die Verletzung anhand der Bildung und Dicke der Neointima gemessen werden.

Unter dem Mikroskop wurde der Gefäßschnitt eingestellt. Auf dem Bildschirm umfuhr man nun mit Hilfe des Fotoprogramms und des Cursors zunächst das Lumen, dann die Lamina elastica interna und zum Schluss die Lamina elastica externa der Arterie.

Aus der Anzahl der für das Umfahren der genannten Strukturen verbrauchten Bildpixel ließen sich die Dicke der Neointima und der Media sowie das für die Untersuchung wichtige Verhältnis von Neointima zu Media berechnen (Neointima/Media-Ratio).

### **3.16 Färbungen**

#### **3.16.1 PCNA Färbung als Marker für proliferierende Zellen**

Für den Nachweis proliferierender Zellen wurde ein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) Färbe-Kit der Firma Zymed, das auf einem Streptavidin-Biotin System basiert, verwendet.

Die Kryoschnitte wurden 10 min in 4 °C kaltem Aceton fixiert, 15 min mit PBS rehydriert und 10 min mit non-immune goat serum (Ziegenserum) geblockt.

Jetzt kam der fertig zu verwendende, biotinylierte PCNA-Antikörper, der nicht weiter verdünnt wurde, für 60 min auf die zu färbenden Schnitte.

Die Schnitte wurden danach 3 x 2 min mit PBS gewaschen.

Anschließend kam die fertige Mischung der Streptavidin-Peroxidase für 10 min auf die Schnitte, die danach wieder 3 x 2 min mit PBS gewaschen wurden.

Die mitgelieferten Bestandteile der Farbstoffmischung aus drei Komponenten, bestehend aus einem Tropfen Substratpuffer, einem Tropfen DAB-Farbstoff und einem Tropfen 0.6% Wasserstoffperoxidlösung, wurden in 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst und für 4 min unter Lichtschutz auf die Schnitte aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 2 min mit destilliertem Wasser gewaschen, abgeklopft und mit Eindeckmedium und DAPI, als Gegenfärbung eingedeckelt. Die PCNA-gefärbten, proliferierenden Zellen erschienen braun.

**Tabelle 4:** Arbeitsschritte der PCNA Färbung mit dem PCNA Färbe-Kit

<b>Arbeitsschritte:</b>	<b>Inkubationszeit:</b>
1. Schnitte in Aceton fixieren	10 min
2. Schnitte mit PBS rehydrieren	15 min
3. Schnitte mit Ziegenserum blocken	10 min
4. Fertigen biotinylierten PCNA-Antikörper auf die Schnitte aufbringen	45 min
5. Schnitte mit PBS waschen	3 x 2 min
6. Fertige Mischung der Streptavidin- Peroxidase auf die Schnitte	10 min
7. Waschen der Schnitte mit PBS	3 x 2 min
8. Herstellung des DAB-Farbstoffgemisches	
9. Auftragen des Farbstoffgemisches auf die Schnitte	4 min
10. Waschen mit Aqua dest.	2 x 2 min
11. Eindeckeln mit DAPI und mounting- medium	

### 3.16.2 Immunfluoreszenzfärbung der Kryoschnitte

Das unten gezeigte Schema diente als Vorlage für alle Immunfluoreszenzfärbungen, wobei die verwendeten Primärantikörper und deren Dosierung differierten. Eine kurze Zusammenfassung und die Besonderheiten jeder Färbung sind gesondert beschrieben.

**Tabelle 5:** Verwendete Vorlage, im Sinne eines allgemeinen Schemas für die immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten

Arbeitsschritte:	Inkubationszeit:
1. Schnitte mit Aceton oder 2% PFA (jeweils bei 4 °C) fixieren	10 min
2. Schnitte in PBS bei Raumtemperatur rehydrieren	15 min
3. Schnitte mit Ziegen Serum blocken	10 min
4. Schnitte mit Primärantikörper der jeweiligen Verdünnung, bei Raumtemperatur bedecken.	45-60 min
5. Schnitte mit PBS waschen	2 x 5 min
6. Schnitte mit Sekundärantikörper, der jeweiligen Verdünnung unter Lichtschutz, bei Raumtemperatur bedecken	10-60 min
8. Schnitte mit PBS waschen	3 x 2 min
9. Objektträger mit mounting. Medium eindeckeln	
10 Deckgläser mit Fix-o-gum® versiegeln	

Die gefrorenen Schnitte wurden dem -80 °C Tiefkühlschrank entnommen und sofort für 10 min in 4 °C kaltem Aceton 99,8% oder 2% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend umfuhr man mit einem Diamantstift oder einem Fettstift (z.B. Dako Pen®) die Schnitte, um sie zu markieren. Von den 3 Gefäßschnitten diente jeweils einer als Negativkontrolle, wobei in diesem Fall jeweils nur die Antikörperverdünnungslösung bzw. ein nicht spezifischer Antikörper, anstatt des Primärantikörpers, auf den Schnitt gegeben wurde.

Alle weiteren Schritte verliefen gleich.

Die Schnitte wurden nun 15 min in PBS rehydriert und sollten ab hier nicht mehr austrocknen. Nun blockte man die Schnitte 10 min mit 10% Ziegen Serum, das nach der Einwirkzeit nur abgeklopft wurde.

Der primäre Antikörper wurde in Färbepuffer (antibody diluent reagent solution; Zymed™), entsprechend der jeweiligen Färbung verdünnt. Auf jeweils einen Schnitt kam, wie beschrieben, nur der Färbepuffer oder der unspezifische Antikörper. Man ließ damit die Schnitte 45-60 min, je nach Antikörper, bei Raumtemperatur inkubieren.

Anschließend wurden die Schnitte 2 x 5 min in PBS gewaschen. Dies passierte, indem man die Objektträger in ein Färbegefäß stellte, dieses mit PBS-Waschpuffer füllte und auf eine Schüttelplatte (Minishaker) stellte. Somit wurden die Gefäßschnitte unablässig mit PBS gewaschen.

Nun kam der sekundäre Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoff zum Einsatz. Er wurde wieder entsprechend der jeweiligen Färbung in Färbepuffer verdünnt, geschüttelt und für 15 Sekunden bei 14000/min zentrifugiert. Unter Lichtschutz ließ man ihn 10-60 min auf die Schnitte einwirken. Die Schnitte wurden danach 3 x 2 min in PBS gewaschen (siehe oben).

Als Gegenfärbung, zur Darstellung der Zellkerne, mischte man das Eindeckmedium (Vectashield® mounting medium) mit DAPI.

Pro 1 ml Eindeckmedium wurden 2-3 µl DAPI zugegeben und je ein Tropfen des Gemisches auf die Schnitte gefügt. Die Färbung war nun fertig und die Objektträger wurden mit Deckgläsern versehen. Um ein Austrocknen zu verhindern, versiegelte man die eingedeckten Objektträger noch mit Fix-o-gum®. Unter Lichtschutz wurden die Objektträger bis zur weiteren Verwendung tiefgekühlt, bei -20 °C, gelagert.

### **3.16.3 Färbung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC)**

Die Färbung wies glatte Gefäßmuskelzellen in der Media und anderen Schichten des Gefäßes nach.

Die Gefäßschnitte wurden 10 min mit Aceton fixiert, anschließend 15 min mit PBS rehydriert und 10 min mit Ziegen Serum geblockt.

Bei der Färbung der glatten Gefäßmuskelzellen war der rote Farbstoff zur Färbung des Muskelaktins bereits an den primären Antikörper gekoppelt, weswegen unmittelbar nach dem Blocken der Färbeprozess beginnen konnte. Der Antikörper gegen das  $\alpha$ -Muskel-Aktin glatter Gefäßmuskelzellen wurde mit Antikörperverdünnungslösung 1:500 verdünnt und auf die Schnitte gegeben.

Unter Lichtschutz wurde der Antikörper in feuchtem Milieu eine Stunde lang belassen und dann mehrmals mit PBS gewaschen. Die so gefärbten Schnitte wurden nun mit DAPI enthaltendem Eindeckmedium und mit einem Deckglas versehen.

### **3.16.4 Färbung von Monozyten und Makrophagen (MOMA)**

Der Färbung diente zum Nachweis mononukleärer Zellen, die entweder aus der Blutbahn kamen oder schon länger im Gewebe ansässig waren.

Die Kryoschnitte wurden, nach dem Entfernen aus dem Tiefkühlschrank sofort 10 min in 2% PFA fixiert, 15 min mit PBS rehydriert und 10 min mit Ziegen Serum geblockt.

Nun wurde der Primärantikörper gegen Monozyten und Makrophagen 1:10 verdünnt und auf die Schnitte aufgetragen. Dort wurde er in feuchtem Milieu im Inkubator 60 min belassen.

Die Schnitte wurden 3 x 2 Minuten mit PBS gewaschen. Nun kam der sekundäre Antikörper mit rotem Farbstoff (546 nm) in der Verdünnung 1:200 für 40 min auf die Schnitte. Die Schnitte wurden wieder mehrmals mit PBS gewaschen und mit DAPI und Eindeckmedium bedeckt.

### **3.16.5 Nachweis apoptotischer Zellen (TUNEL-Markierung)**

Zum Nachweis apoptotischer Zellen kam ein „in situ cell death detection kit® TMR red“ der Firma Roche™ zum Einsatz. Der Nachweis verwendete die sogenannte TUNEL-Reaktion (TdT-mediatet dUTP-X nick-end-labeling).

Dabei wurden apoptoseabhängige DNA-Einzelstrangbrüche (nicks) und Doppelstrangbrüche, unabhängig von einer Vorlage, an den entstehenden freien 3'-OH Enden durch eine Enzymreaktion [„terminal deoxynucleotidyl transferase“ (TdT)] mit dUTP markiert. An die dUTP Enden waren TMR (Tetramethylrodamin red) und Fluorescein gebunden, um die Reaktion unter dem Mikroskop sichtbar zu machen.

Vor Beginn des eigentlichen Färbeprozesses mussten mehrere Lösungen vorbereitet werden.

Mit PBS wurde eine 4% PFA-Lösung als Fixierungslösung, die auf pH 7,4 gepuffert war, frisch hergestellt.

Des Weiteren stellte man aus Triton-X-100, Natriumcitrat und PBS eine Permeabilisierungslösung frisch her (siehe Tabelle Vorbereitungen), mit der die Zellwand und die Kernmembran der apoptotischen Zellen für die Markierung durchlässig gemacht wurden.

Zunächst wurden die Kryoschnitte 20 min mit der Fixierungslösung fixiert und anschließend 30 min mit PBS gewaschen. In einem Behälter mit Eiswasser wurde inzwischen die Permeabilisierungslösung auf 2 °C abgekühlt. Nach dem Waschen kamen die Schnitte für 2 min in die kalte Permeabilisierungslösung und wurden anschließend 2 x 3 min mit PBS gewaschen.

Für die TUNEL-Reaktion sollte die Mischung erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden. Dazu wurden aus der im Kit enthaltenen Markierungslösung (dUTP-TMR label solution) 100 µl abgezogen, aserviert, und später als Negativkontrolle verwendet.

Die ebenfalls mitgelieferte Enzymlösung (TdT-enzyme solution) wurde in den Rest der Markierungslösung pipettiert und ergab nun die TUNEL-Reaktionslösung.

Nachdem die Zellen permeabilisiert und gewaschen worden waren, gab man wenig TUNEL-Reagenz auf die Schnitte, bedeckte sie mit Parafilm und ließ die Lösung eine Stunde bei 37 °C, in feuchter Umgebung, in einem Wärmeschrank einwirken.

Danach wurden die Schnitte 3 x 2 min mit Waschpuffer gewaschen und mit DAPI und Eindeckmedium bedeckt und versiegelt.

**Tabelle 6:** Herzustellende Lösungen, als Vorbereitung des unten beschriebenen Markierungsvorgangs.

<p><b><u>Vorbereitung:</u></b></p> <p><b>Fixierungslösung:</b> 80% PFA mit PBS auf 4 % verdünnen und auf pH 7,4 puffern. Benötigt wurden etwa 100 ml.</p> <p><b>Permeabilisierungslösung (für 100 ml):</b> 0,1 g Triton-X-100 + 0,1 g Natriumcitrat + 99,8 ml PBS</p>
---

**Tabelle 7** zeigt das Protokoll für die Markierung apoptotischer Zellen.

<b><u>Markierungsvorgang:</u></b>	
<b>Arbeitsschritte:</b>	<b>Inkubationszeit:</b>
1. Schnitte bei Raumtemperatur in die Fixierungslösung geben	20 min
2. Schnitte mit PBS waschen	30 min
3. Während Schritt 2 läuft, Herstellung der TUNEL-Lösung	
4. Schnitte in die auf 2 °C abgekühlte Permeabilisierungslösung stellen	2 min
5. Schnitte mit PBS waschen	2 x 3 min
6. Wenig TUNEL-Lösung, bzw. Negativlösung (label solution) auf die Schnitte geben, mit Parafilm bedecken und bei 37 °C, im Wärmeschrank in feuchter Umgebung lagern	60 min
7. Schnitte in PBS waschen	3 x 2 min
8. Schnitte mit DAPI und mounting-medium eindeckeln	

### **3.16.6 Resorptionsnachweis des Kininogens**

Im Folgenden ist der Nachweis der Aufnahme des Kininogens, aus dem nach der Operation verabreichten Gel, in das Gefäß beschrieben.

C57/BL-6 Mäusen wurde 12, 24 und 48 Stunden nach Operation und Applikation des Kininogen enthaltenden Gels, die denudierte A. femoralis, wie beschrieben, entnommen, in Tissue Tek® eingebettet, gefroren, geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht.

Die geschnittenen Arterien wurden zunächst 10 min mit 4% Acetonlösung fixiert, 15 min rehydriert und 10 min mit Ziegen Serum geblockt.

Der primäre Antikörper gegen Kininogen wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Klaus T. Preissner, Institut für Biochemie der Universität Marburg-Giessen, Standort Giessen, zur Verfügung gestellt.

Der Primärantikörper wurde mit Antikörperverdünnungslösung 1:10, 1:20 und 1:100 verdünnt und unter Lichtschutz für eine Stunde auf die Schnitte aufgetragen. Danach wurden die Schnitte 3 x 2 min mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper diente ein grüner (488 nm) „goat anti-rabbit“-Antikörper, in der Verdünnung 1:150. Gleichzeitig wurden glatte Gefäßmuskelzellen mit anti- $\alpha$ -smooth muscle actine in der Verdünnung 1:1000 eingefärbt, um die Grünfärbung besser zu diskriminieren. Beide Antikörper wurden entsprechend ihrer Verdünnung gemischt und verblieben wieder eine Stunde, unter Lichtschutz, auf den Schnitten.

Danach wurden die Objektträger zum Waschen in einem Gefäß auf eine Schüttelplatte, 2 x 3 min in PBS gestellt, abgeklopft und mit DAPI und Eindeckmedium versiegelt.

### **3.17 Bewertung und Auszählung der gefärbten Schnitte**

Alle Zellkerne innerhalb der Gefäßschnitte waren mit DAPI angefärbt und leuchteten unter der Fluoreszenzlampe, mit dem Blaufilter blau. Die mittels Immunhistochemie gefärbten Zellen, die unter der Fluoreszenzlampe mit Grünfilter rot leuchteten (PCNA Färbung braun), waren für die jeweilige Färbung positiv.

Zellen, die dem Knochenmark entstammten und in der Neointima oder anderen Gefäßschichten akkumulierten, leuchteten durch das GFP grün.

Gezählt wurden alle immunmarkierten roten, grünen (GFP+) und blauen (DAPI) Zellen. Für bestimmte Färbungen (Muskelzellen, Monozyten-Makrophagen und Apoptosezellen) waren auch Zellen interessant, die doppelt fluoreszierten (grün und rot), um bestimmte Aussagen treffen zu können.

### **3.18. Statistik**

Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte +/- der mittleren Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der „SigmaStat“ Software, Systat, Richmond, CA, USA mittels ANOVA.

Die Post-hoc Analysen wurden nach der Methode von Holm-Sidak durchgeführt. Ein *P*-Wert <0,05 wurde als signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen interpretiert.

## **4 Ergebnisse**

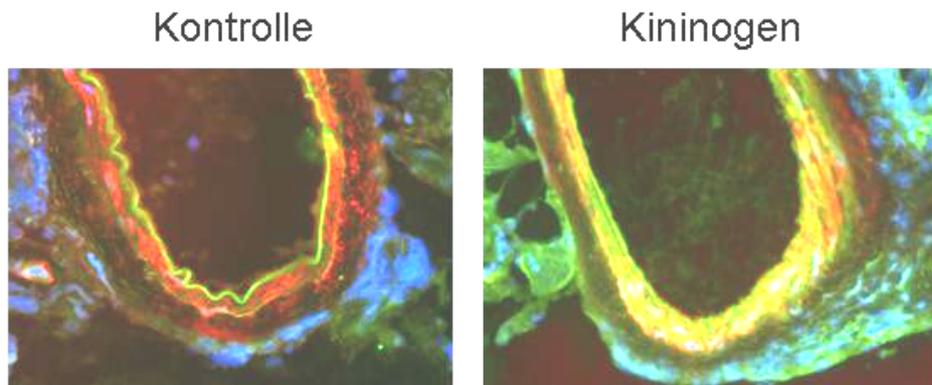
### **4.1 Per Gel appliziertes Kininogen wird in Gefäße aufgenommen**

Den Mäusen wurde nach Denudation der Femoralarterie Kininogen oder Domäne 5 über ein Gel (Pluronic F-127) appliziert, das als Trägersubstanz diente.

Zunächst sollte nachgewiesen werden, dass das verwendete Operationsschema und die Art der Applikation zu einer Resorption des Wirkstoffes in die Arterie führte.

Nach der Denudation der Arterie und der Applikation des Gels mit dem darin befindlichen Kininogen, wurden bei C57/BL-6 Mäusen, 12, 24 und 48 Stunden nach Operation das Gefäß entnommen und die Schnitte mit Antikörper gegen Kininogen inkubiert. Anschließend färbte man mit einem antikörpergekoppelten, fluoreszierenden Farbstoff gegen den ersten Antikörper. Es zeigte sich, dass Kininogen bereits nach 6 Stunden vom Gefäß resorbiert wurde und bis in das verletzte Gefäß hinein diffundierte. Das Maximum der Akkumulation im Gefäß war nach 24 Stunden erreicht und auch nach 48 Stunden noch nachweisbar.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die sich in dem Gel befindliche Wirksubstanz durch die Art, mit der sie verabreicht wurde, in das Gefäß aufgenommen wurde und somit ihre potentielle Wirkung zu entfalten vermochte.



**Abbildung 11: Per Gel appliziertes Kininogen wird in das Gefäß aufgenommen.**

Gezeigt sind zwei repräsentative Gefäßschnitte von Gefäßen, die 24 h nach Drahtdenudation entnommen und geschnitten wurden. Nach durchgeführter Operation wurde zuvor, wie beschrieben rund um die Arterien Gel gespritzt. Bei der rechten Arterie wurde zusätzlich Kininogen in der für alle Versuchsreihen verwendeten Konzentration im Gel gelöst.

Nach Markierung des Kininogens mit einem spezifischen Antikörper, wurde das Kininogen mit einem antikörpergekoppelten (grünen) Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht.

Im Vergleich zur Kontrolle (linkes Bild) erkennt man rund um das Gefäß und im Lumen das Gel, das durch die Färbung des Kininogens grünlich schimmert.

#### **4.2 Kininogen und Domäne 5 verhindern die Neointima-Bildung**

Um den Effekt des Kininogens und der Domäne 5 auf die Reduktion der Neointima zu untersuchen, wurden vier Versuchsgruppen gebildet.

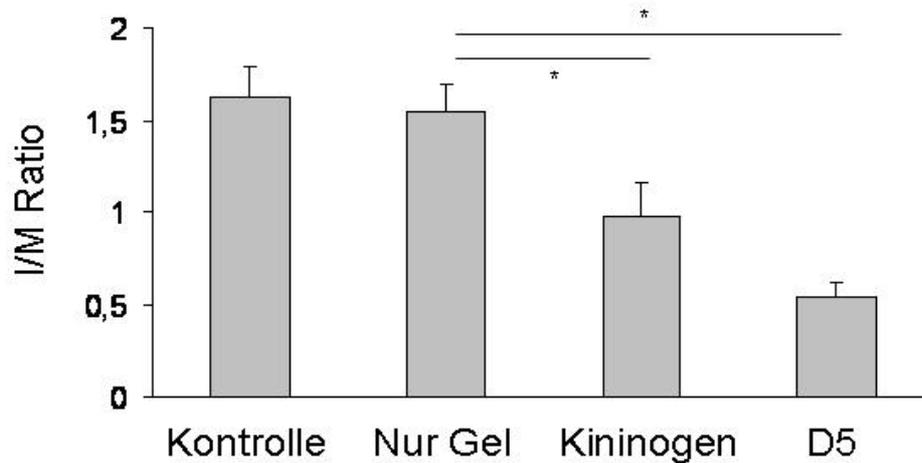
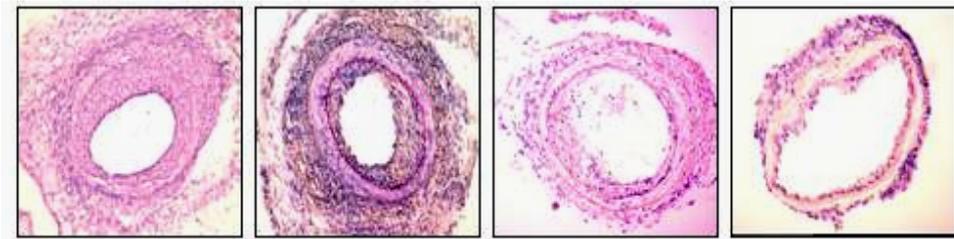
Die 1. Gruppe bekam nach der Denudation weder Gel noch andere Stoffe verabreicht. Um die Auswirkungen des Gels alleine zu prüfen, bekam die Gruppe 2, als Kontrollgruppe, nur das Gel mit dem Puffer in dem HKa bzw. D5 gelöst waren, Gruppe 3 bekam Gel mit HKa und die Gruppe 4 Gel mit Domäne 5 appliziert.

3 Wochen nach Denudation wurde das Gefäß entnommen und geschnitten. Das durch Histomorphometrie bestimmte Neointima/Media-Verhältnis (I/M Ratio) wurde mit der Kontrollgruppe, in der nur Gel appliziert wurde, verglichen. Die Kontrollgruppe zeigte, ähnlich wie die Gruppe ohne Gel, nach 3 Wochen in nahezu allen Gefäßabschnitten eine ausgeprägte Neointima-Bildung, die das Lumen der Arterie bis auf einen kleinen Bruchteil des Lumens der nicht dilatierten, kontralateralen (nicht gezeigt) Arterie einengte.

Das Verhältnis von Neointima zu Media betrug in der Gruppe 1 ohne Gel  $1,625 \pm 0,168$  und in der Kontrollgruppe 2, die nur Gel verabreicht bekam  $1,540 \pm 0,150$ . Das in der Gruppe 2 verabreichte Gel alleine hatte demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung der Neointima.

Anders war die Situation in den beiden anderen Gruppen. In der Gruppe 3, die HKa mit dem Gel verabreicht bekam, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Neointima Bildung auf ein Verhältnis von  $0,981 \pm 0,174$ . In der Gruppe 4, der Gel mit Domäne 5 appliziert wurde, war die Bildung der Neointima noch stärker, auf ein Neointima/Media-Verhältnis von  $0,549 \pm 0,076$  reduziert, so dass in einigen Schnitten, luminal der Lamina elastica interna, kaum noch Zellen oder neointimales Gewebe zu erkennen waren.

Die Bildung der Neointima ließ sich somit mit aktiviertem Kininogen (HKa) und noch stärker mit Domäne 5 verringern.



**Abbildung 12: Kininogen und die Domäne 5 verhindern die Neointimabildung in der A. femoralis der Maus.**

Oben sind repräsentative Schnitte der Femoralarterien der Maus 21 Tage nach Denudation der Gefäße gezeigt, denen in der Gruppe 1, nach Operation, weder Gel noch eine anderer Substanz appliziert wurde (Kontrolle). Gruppe 2 bekam nur das Gel als Trägersubstanz appliziert (nur Gel). Der Gruppe 3 wurde zusätzlich über das Gel Kininogen, der Gruppe 4 die Domäne 5 (D5) verabreicht.

Das darunter liegende Balkendiagramm zeigt die morphometrische Quantifizierung der denudierten Femoralarterien in den einzelnen Gruppen (n = 4 für Gruppe 1, n = 6 für die anderen 3 Gruppen, \*P<0.01). Gemessen wurde das Verhältnis von gebildeter Neointima zu Media (I/M Ratio). Dazu wurde die Fläche der Media errechnet, indem man die umfahrene Fläche entlang der Lamina elastica interna von der umfahrene Fläche entlang der Lamina elastica externa subtrahiert. Die Fläche der Neointima ergab sich entsprechend durch Umfahren der Fläche zwischen Lamina elastica interna und der Linie entlang des verbleibenden Lumens des Gefäßes. Das gezeigte Neointima/Media-Verhältnis errechnete sich durch Division der Fläche der Neointima durch die, wie vorher beschrieben, berechnete Fläche der Media.

### **4.3 Kininogen und Domäne 5 reduzieren die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in der Neointima und Media verletzter Gefäße**

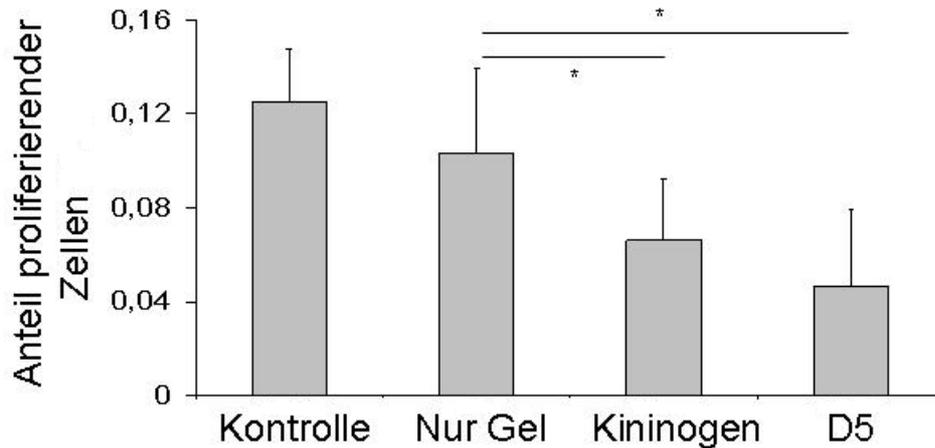
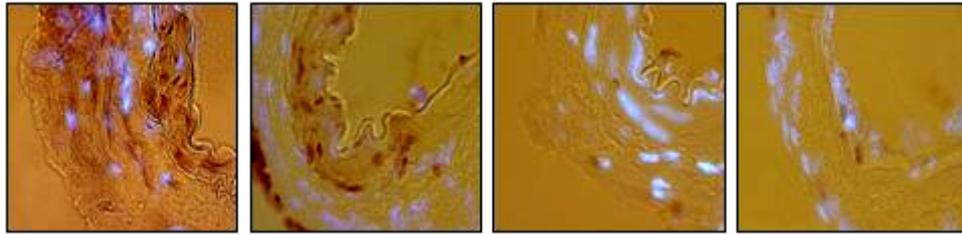
Für die Entstehung der Neointima sind einerseits glatte Gefäßmuskelzellen aus der Media und Adventitia verantwortlich, die in den verletzten Bereich migrieren und dort proliferieren. Andererseits adhären dort zirkulierende Zellen aus der Blutbahn, die sich zu glatten Gefäßmuskelzellen differenzieren können und ebenfalls zur Bildung der Neointima beitragen<sup>36, 74, 75</sup>.

Um eine Aussage über die für die Entstehung der Neointima entscheidende Proliferation von VSMC und anderer Zellgruppen machen zu können, wurden die 4 Versuchsgruppen auf die Proliferation vaskulärer Zellen hin untersucht. Hierfür wurden die Gefäßschnitte mit einem Antikörper gegen das „proliferating nuclear cell antigen“ (PCNA), einem Proliferationsmarker, immunhistochemisch gefärbt und der Anteil proliferierender Zellen in der Neointima und Media (Daten nicht gezeigt) bestimmt.

In der Kontrollgruppe 2, die nur das Gel verabreicht bekam und in der Gruppe 1 ohne Gel war eine starke Proliferationsaktivität zu erkennen. Der Anteil proliferierender Zellen in der Neointima lag dabei bei 11,9% ± 1,9% in der Gruppe 2, die nur Gel appliziert bekam und bei 11,3% ± 2,2% in der Gruppe 1.

Demgegenüber nahm die Anzahl proliferierender Zellen in der Gruppe 3, der Kininogen verabreicht wurde, stark ab (7,5% ± 1,9%), jedoch weniger stark, als in der Gruppe 4, die Domäne 5 appliziert bekam (4,6% ± 1,9%).

Damit konnte gezeigt werden, dass Kininogen und noch stärker die Domäne 5, die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen hemmten. Gel alleine wirkte sich nicht nachweisbar auf die Proliferation aus.



**Abbildung 13: Kininogen und die Domäne 5 verhindern die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in der Neointima der denudierten Gefäße.**

Oben werden für die 4 Versuchsgruppen repräsentative Gefäßschnitte der verletzten Femoralarterien 3 Wochen nach Operation gezeigt, bei denen alle Zellen die positiv für das PCNA waren, immunhistochemisch gefärbt wurden (braun gefärbte Zellen). Bei PCNA handelt es sich um einen Marker für proliferierende Zellen. Als Gegenfärbung diente DAPI, womit alle Zellkerne innerhalb der Gefäßschnitte markiert wurden (blaue Färbung).

Das darunter liegende Diagramm zeigt den Anteil der markierten, proliferierenden Zellen der Neointima in den 4 Versuchsgruppen (n = 4 für Gruppe 1, n = 6 für die 3 anderen Gruppen, \* P<0,01). Dazu wurden 3 Wochen nach Denudation der Femoralarterien alle proliferierenden Zellen in der Neointima gezählt (braune Zellen) und durch alle in der Neointima vorhandenen ausgezählten Zellen (blaue Zellkerne) dividiert.

#### **4.4 Kininogen und Domäne 5 induzieren die Apoptose glatter**

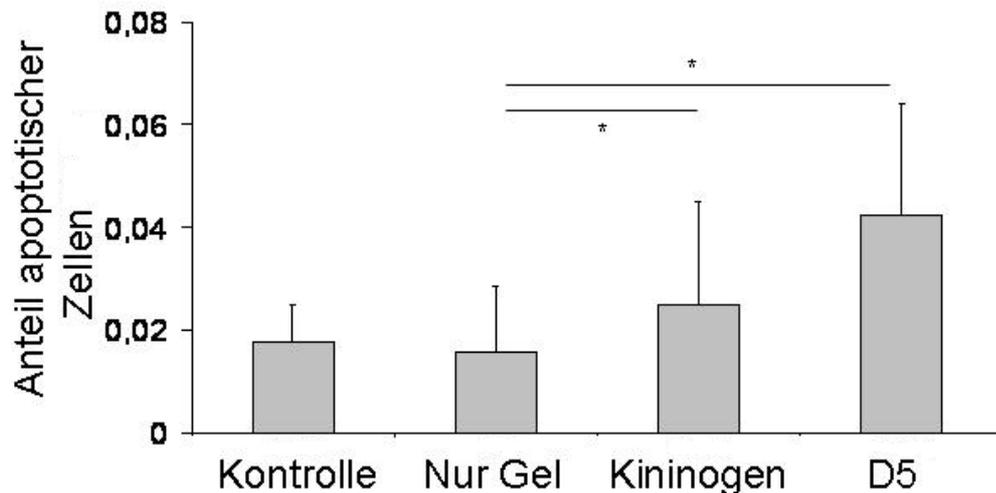
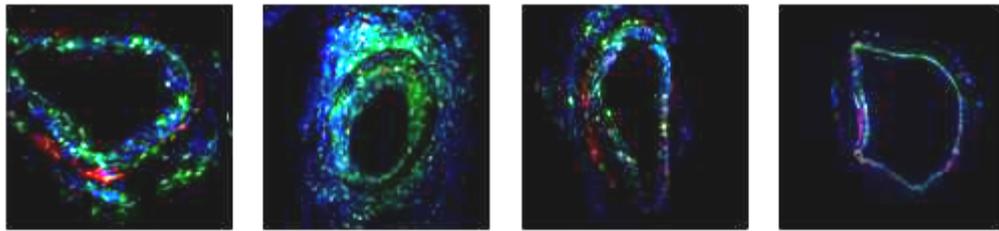
##### **Gefäßmuskelzellen in der Neointima und Media**

HKa und Domäne 5 induzierten in verschiedenen Studien, im Zusammenhang mit einer Hemmung der Adhäsion von zirkulierenden Zellen an Endothelzellen und einer Hemmung der Adhäsion von VSMC an die extrazelluläre Matrix, den programmierten Zelltod (Apoptose)<sup>90,92</sup>. Um überprüfen zu können, ob HKa und D5 auch *in vivo* zu einer verstärkten Apoptose neointimaler Zellen führten, wurde mittels der TUNEL-Reaktion ein Nachweisverfahren für apoptotische Zellen angewendet.

Damit sollten die Auswirkungen von beiden Stoffen im Zusammenhang mit der Apoptose, auf die Ausbildung der Neointima und somit indirekt auf die Akkumulation neointimaler Zellen untersucht werden.

Während in der Kontrollgruppe (Gruppe 2) mit Gel nur ein geringer Anteil apoptotischer Zellen zu finden war ( $1,3\% \pm 0,7\%$ ), nahm der Anteil in der Versuchsgruppe 3, mit Kininogen auf  $4,9\% \pm 1,4\%$  zu und war mit  $5,1\% \pm 1,3\%$  am höchsten in der Gruppe 4, die Domäne 5 verabreicht bekam. In der Gruppe 1 ohne Gel lag der Anteil apoptotischer Zellen bei  $1,8\% \pm 0,7\%$  und war damit ähnlich niedrig wie in der Kontrollgruppe.

Somit induzieren bzw. verstärken HKa und noch stärker Domäne 5 die Apoptose von neointimalen Zellen, die sich sowohl aus Zellen lokalen Ursprungs als auch aus Zellen der Zirkulation zusammensetzten. Das applizierte Gel alleine hatte in unserem Versuch keine Auswirkungen auf die Induktion der Apoptose.



**Abbildung 14: Kininogen und die Domäne 5 induzieren die Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen in der Neointima.**

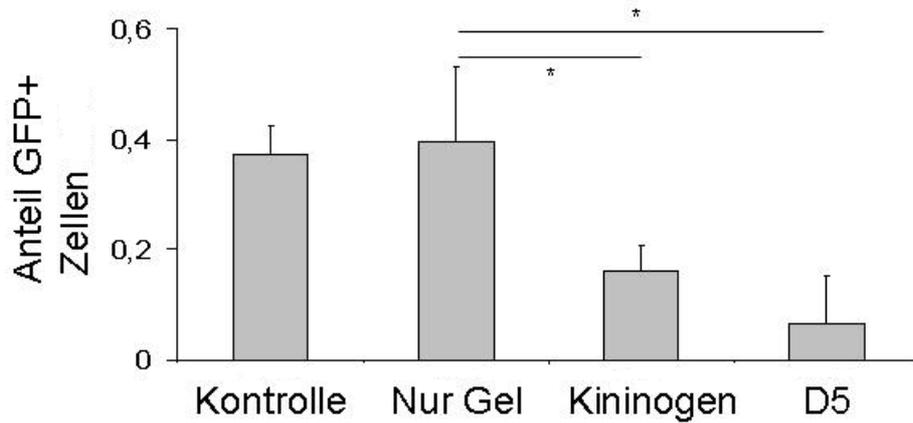
Die oben gezeigten Gefäßschnitte der operierten Mäuse sind repräsentativ für die 4 Versuchsgruppen. 3 Wochen nach Denudation wurden apoptotische Zellen der Femoralarterien mittels der TUNEL-Reaktion rot gefärbt (siehe oben). Zellen die dem Knochenmark entstammten waren GFP positiv (grün). Alle Zellkerne im Bereich der Gefäßschnitte wurden mit DAPI dargestellt (blau).

Das darunter liegende Diagramm zeigt den Anteil der apoptotischen Zellen (rot) an allen Zellen der Neointima (n =4 für Gruppe 1, n = 6 für alle anderen Versuchsgruppen, \* P<0.05). Dazu wurde in den Gefäßschnitten die Anzahl aller apoptotischen Zellen der Neointima durch die Anzahl aller im Bereich der Neointima vorhandenen Zellen (blaue Zellkerne) dividiert.

#### **4.5 Zirkulierende Zellen aus dem Knochenmark tragen zur Bildung des neointimalen Gewebes bei und lassen sich durch den Einsatz von Kininogen und Domäne 5 reduzieren**

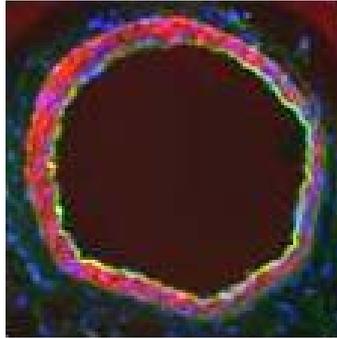
Um eine Aussage über die Herkunft der an der Entstehung der Neointima beteiligten Zellen machen zu können, wurden im Vorfeld der Operation C57/BL-6 Mäusen nach myeloablativer Bestrahlung Knochenmark von Spendermäusen injiziert, die ubiquitär GFP exprimierten. Somit ließ sich erkennen, welche Zellen, die in der Neointima oder anderen Abschnitten des Gefäßes zu finden waren, dem Knochenmark entstammten und primär über die Blutbahn in das geschädigte Gefäß gelangt waren. Analog zu vorausgegangenen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen<sup>36, 74, 75</sup> konnte beobachtet werden, dass ein erheblicher Teil der Zellen der Neointima und anderer Gefäßabschnitte grün fluoreszierten (GFP positiv) und damit dem Knochenmark entstammen mussten. Der Anteil grün fluoreszierender Zellen im gesamten Gefäßabschnitt lag dabei in den ersten beiden Gruppen bei etwa 40% und stimmte damit vom Zahlenwert mit den Ergebnissen oben genannter Forschergruppen überein. Durch den Einsatz von Kininogen und Domäne 5 konnte der Anteil dieser Zellen reduziert werden (Gruppe 3 und 4).

In der nicht denudierten kontralateralen Arterie fanden sich keine GFP-positive Zellen (siehe Abbildung).



**Abbildung 15: Zirkulierende Zellen des Knochenmarks akkumulieren in den verletzten Gefäßabschnitten und tragen zur Bildung der Neointima bei.**

Durch den Einsatz von Kininogen und Domäne 5 ließ sich der Anteil dieser Zellen reduzieren (n = 4 für Gruppe 1, n = 6 für die anderen 3 Gruppen, \* P<0.05). Im Diagramm wird der Anteil von aus dem Knochenmark stammenden, GFP positiven Zellen (grün) an allen Zellen der Gefäßschnitte (blaue Zellkerne, gefärbt mit DAPI) gezeigt. Das dargestellte Ergebnis entsteht durch Division aller grünen Zellen durch alle blau gefärbten Zellkerne.



**Abbildung 16: Abhängigkeit der Akkumulation von GFP-positiven Zellen von einer Gefäßverletzung.**

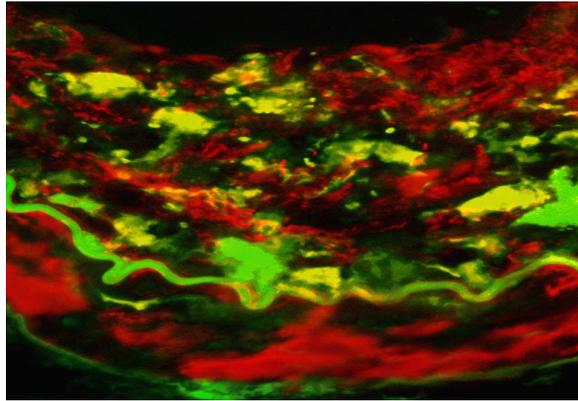
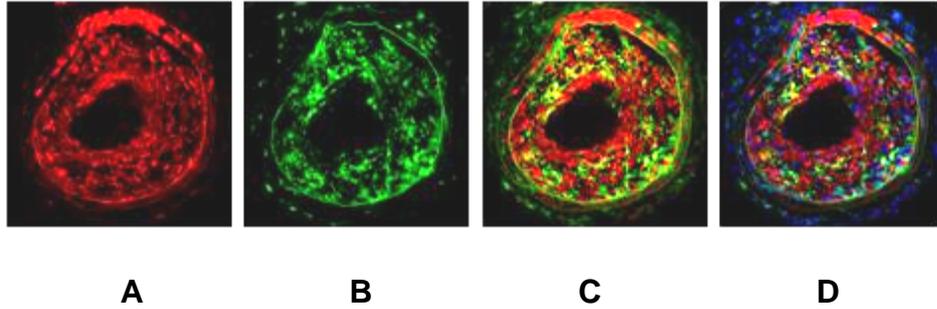
Gezeigt wird ein Gefäßschnitt der kontralateralen (nicht denudierten) Femoralarterie einer operierten, ubiquitär GFP-exprimierenden Maus. Es ist zu erkennen, dass im Gegensatz zu dilatierten Arterien luminal des Endothels keine GFP-positiven (grünen) Zellen akkumulieren.

**4.6 HKa und Domäne 5 hemmen die Akkumulation zirkulierender VSMC-Progenitorzellen**

Zur genaueren Differenzierung neointimaler Zellen wurden diese mit  $\alpha$ -SMA, einem Marker für glatte Gefäßmuskelzellen gefärbt. Dadurch ließ sich zusätzlich zur Frage, ob die Zellen dem Knochenmark entstammten, (GFP positiv) klären, ob die Zellen der Neointima und der Media GFP und gleichzeitig  $\alpha$ -SMA exprimierten, also primär zirkulierende Zellen mit Ursprung aus dem Knochenmark waren, die sich zu glatten Gefäßmuskelzellen differenziert hatten.

Der Anteil dieser doppelt fluoreszierender Zellen ( $\alpha$ -SMA und parallel GFP positiv) in der Neointima und Media, also der Anteil zirkulierender Knochenmarkszellen, die sich zu VSMC differenzierten, an allen glatten Gefäßmuskelzellen ( $\alpha$ -SMA positiv), wurde durch die Applikation von HKa oder Domäne 5 signifikant reduziert. So nahm der Anteil von  $28,3\% \pm 3,2\%$  für Gruppe 1 und  $25,4\% \pm 3,4\%$  für Gruppe 2, auf  $16,1\% \pm 4,7\%$  in der Gruppe 3 und  $6,6\% \pm 8,8\%$  für die Gruppe 4 ab.

Gel alleine hatte keinen hemmenden Einfluss auf die Rekrutierung und Differenzierung von Knochenmarkszellen.



**E**

**Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Färbung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) in einer Femoralarterie mit verschiedenen Fluoreszenzfiltern, 3 Wochen nach Denudation.**

**A:** Die Gefäßschnitte wurden mit  $\alpha$ -SMA, einem Antikörper gegen das Muskelaktin glatter Muskelzellen behandelt, an den ein roter Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Alle glatten Muskelzellen im Bereich der Schnitte stellten sich rot dar.

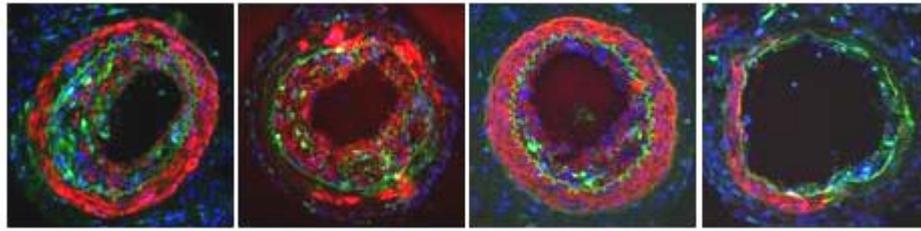
**B:** Das gleiche Gefäß wie in A wird nun durch einen anderen Fluoreszenzfilter gezeigt. Dabei stellten sich alle GFP positiven Zellen die dem Knochenmark entstammten grün dar.

**C:** Überlagerung der Bilder A und B des identischen Gefäßes. Zellen, die mit  $\alpha$ -SMA gefärbt wurden (rote Zellen) und gleichzeitig dem Knochenmark entstammten (grüne Zellen), erschienen gelb.

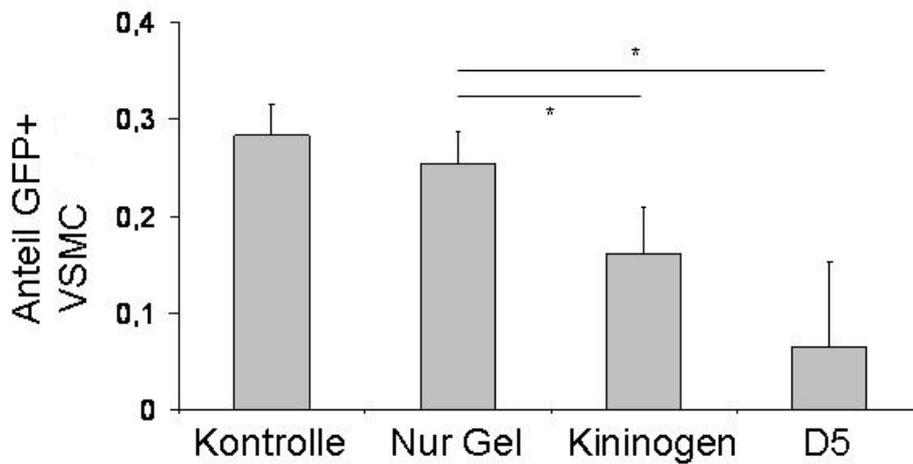
**D:** Zusätzlich zum Bild C wurden nun alle Zellkerne im Bereich der Gefäßschnitte mit DAPI blau gefärbt.

**E:** Ausschnittsvergrößerung von Bild C zur Darstellung der Kolokalisation von  $\alpha$ -SMA- und GFP positiven Zellen.

A



B



**Abbildung 18: Kininogen und die Domäne 5 hemmen die Akkumulation zirkulierender VSMC-Progenitorzellen in der Neointima.**

**A:** 3 Wochen nach Gefäßdenudation der Femoralarterien wurden die Gefäße entnommen, geschnitten und wie in Abbildung 15 beschrieben, mit  $\alpha$ -SMA (rot) und DAPI (blau) markiert und gefärbt.

Gezeigt werden 4 repräsentative Schnitte für die einzelnen Versuchsgruppen.

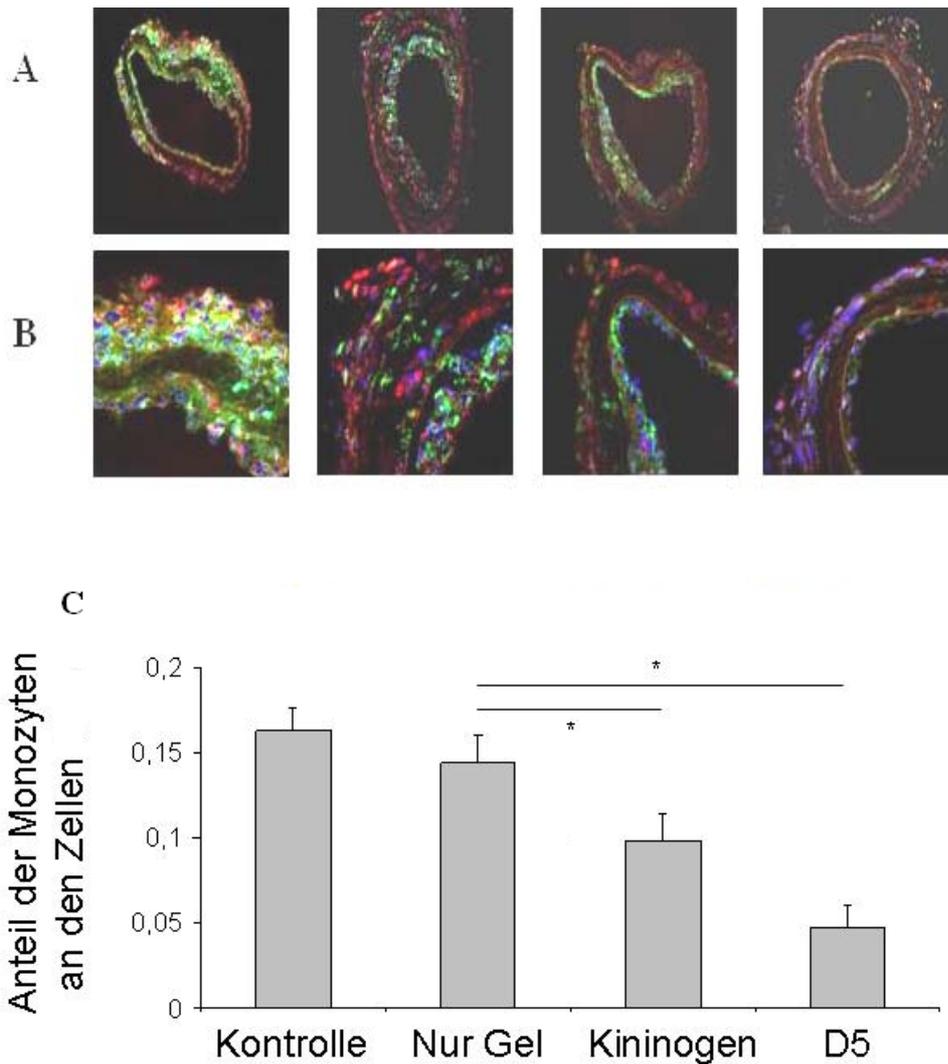
**B:** Das Diagramm zeigt für die 4 Versuchsgruppen den Anteil der Zellen, die für  $\alpha$ -SMA und gleichzeitig für GFP positiv waren ( $n = 4$  für Gruppe 1,  $n = 6$  für die anderen 3 Versuchsgruppen,  $* P < 0.05$ ). Es handelte sich somit um Zellen, die ursprünglich dem Knochenmark entstammten und sich zu glatten Gefäßmuskelzellen differenzierten. Die gezeigten Ergebnisse entstanden durch Division aller grün und gleichzeitig rot (doppelt) fluoreszierenden Zellen durch alle blauen Zellkerne.

#### **4.7 Kininogen und Domäne 5 reduzieren die Anzahl von aus dem Knochenmark stammenden Monozyten und Makrophagen in neointimalem und medialem Gewebe**

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen, die an der Bildung der Neointima beteiligt waren, wurden die Zellen der Gefäßschnitte zunächst mit einem Antikörper gegen Monozyten und Makrophagen markiert und danach angefärbt.

Am höchsten war der Anteil dieser Zellen mit  $16,3\% \pm 1,3\%$  in der Gruppe 1 ohne Gel und damit ähnlich hoch, wie in der Gruppe 2 (Kontrollgruppe) mit Gel ( $14,4\% \pm 1,6\%$ ). Am niedrigsten war der Anteil von monozytären Zellen und Makrophagen mit  $4,7\% \pm 1,4\%$  in der Gruppe 4 mit Domäne 5, gefolgt von der Gruppe 3, der Kininogen verabreicht wurde ( $9,8\% \pm 1,6\%$ ).

Diese Ergebnisse zeigten somit, dass HKa und besonders Domäne 5 die Adhäsion von zirkulierenden Knochenmarkszellen und Progenitorzellen hemmten. Da Monozyten und Makrophagen besonders in inflammatorisch verändertem Gewebe ansässig sind und HKa und Domäne 5 die Adhäsion von zirkulierenden Leukozyten hemmten, supprimierten HKa und D5 damit die inflammatorische Antwort auf die Verletzung des Gefäßes.



**Abbildung 19: Kininogen und die Domäne 5 reduzieren die Akkumulation von Entzündungszellen in den durch Denudation verletzten Gefäßabschnitten.**

**A:** gezeigt werden repräsentative Gefäßschnitte der 4 Versuchsgruppen. 3 Wochen nach Dilatation der Femoralarterien wurden die Arterien entnommen, geschnitten und mit MOMA-2, einem Antikörper gegen Monozyten und Makrophagen und einem rot fluoreszierenden Farbstoff markiert und gefärbt (rote Zellen).

Zellen die dem Knochenmark entstammten waren GFP positiv (grüne Zellen). Alle Zellkerne im Bereich der Gefäßschnitte wurden mit DAPI angefärbt (blaue Färbung).

**B:** gezeigt werden vergrößerte Ausschnitte der in **A** beschriebenen Gefäßschnitte für die 4 Versuchsgruppen. Zu erkennen sind die Zellen in den verschiedenen Färbungen. Entzündungszellen (rot), Zellen die dem Knochenmark entstammen (GFP positive Zellen) sind grün. Alle Zellkerne sind mit DAPI blau markiert.

**C:** das dazugehörige Balkendiagramm zeigt den Anteil der Entzündungszellen (markierte Monozyten und Makrophagen) in der Neointima an allen im Bereich des Gefäßschnittes vorhandenen (DAPI-positiven) Zellkernen. Gezählt wurden alle Entzündungszellen (rote Zellen) und alle blauen Zellkerne. Der Anteil der Entzündungszellen ergab sich aus der Division aller roten Zellen durch alle blauen Zellkerne (n = 4 für Gruppe 1, n = 6 für die anderen 3 Gruppen, \* P<0.01).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Gegenwärtige Strategien zur Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen**

Die Atherosklerose basiert auf einer chronischen Entzündungsreaktion, ausgelöst durch einen jahrelang persistierenden Reiz auf die Gefäßwandzellen. Wird die Erkrankung nicht durch verschiedene Maßnahmen therapiert, entstehen eine Vielzahl an Folgeerkrankungen, die zum Teil letal enden können<sup>4</sup>. Die Erkenntnisse über die Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose haben sich im Laufe der Zeit verändert und weiterentwickelt, so dass wir heute ein relativ genaues Bild über die ablaufenden zellulären und molekularen Mechanismen zeichnen können<sup>2, 5, 6, 10</sup>.

Da ständig neue Erkenntnisse hinzukommen, entwickelt die Wissenschaft weitere Therapiekonzepte, die viel versprechend sind, den Verlauf vaskuloproliferativer Erkrankungen zu verzögern, oder die Folgen zu bekämpfen<sup>99</sup>. Durch die Komplexität der ablaufenden Reaktionen im menschlichen Körper ist das Ziel, diese Erkrankungen endgültig therapieren zu können, noch längst nicht erreicht und bedarf weiterer Forschungsarbeit.

Bei der Restenose nach Ballonangioplastie laufen die Mechanismen im Gefäß, die zum Verschluss oder zur Stenosierung führen, schneller ab. Der Grund hierfür mag an der initialen Denudation, mit kompletter Zerstörung des Endothels im Bereich des eingesetzten Katheters liegen. Es kommt dadurch viel schneller zur Anlagerung von Thrombozyten und zirkulierenden Zellen der Blutbahn, mit dem Beginn einer Entzündungsreaktion<sup>43, 100</sup>.

Dies gibt Anlass darüber nachzudenken, wie man im Falle einer Ballonangioplastie den Reiz auf die Gefäßwand reduzieren könnte.

Seit Neuerem wird mit Erfolg versucht, durch direktes Stenting, das heißt gleichzeitiges Platzieren eines Stents und Denudation des stenosierten Gefäßes ohne vorherige Dilatation, die Verletzungen am Gefäß zu minimieren. Das vom Ballon gesetzte Gefäßtrauma ist hier also nur einmalig.

Gleichwohl dieses Verfahren die Gefäßwandentzündung um über 80% reduziert und die Neointimadicke verringert, kommt es immer noch zu späterem „Lumenverlust“ im Bereich des Stents<sup>101</sup>. Der vom Stent auf das Gefäß ausgeübte Reiz ist dabei wiederum Auslöser für eine persistierende Entzündungsreaktion mit der Folge eines negativen Gefäß-Remodeling Prozesses.

Die gegenwärtige Standardtherapie benutzt im Falle von komplexen Gefäßverschlüssen und bei Restenosen im Bereich normaler Metallstents Geflechte, die mit Rapamycin oder Paclitaxel beschichtet sind. Die Freisetzung dieser beiden Substanzen führt durch deren antiproliferative Eigenschaften zu einer wesentlich geringeren Restenoserate als bei herkömmlichen Metallstents<sup>63, 64, 70</sup>. Dennoch wird auch beim Einsatz solcher Stents in 8%-15% ein Wiederverschluss beobachtet<sup>73</sup>, der nicht zu vernachlässigen ist und die Grenzen dieses Verfahrens markiert. Darüber hinaus hemmen Rapamycin und Paclitaxel die Reendothelialisierung denudierter Gefäße und damit den raschen Heilungsprozess. Zusätzlich kommt es in seltenen Fällen zu gefürchteten *in-stent* Thrombosen, mit der Notwendigkeit einer Langzeithemmung der Thrombozytenaggregation (mit ASS und Clopidogrel) und einem konsekutiv erhöhten Blutungsrisiko. Die beschichteten Stents sind zudem sehr teuer und durch den Verbleib im Körper mit potentiellen Nebenwirkungen belastet. Ebenso sind die Langzeitwirkungen von DES auf den menschlichen Organismus noch nicht absehbar<sup>72, 99</sup>.

Neueste Strategien setzen entweder auf den Einsatz viel dünnerer Drahtgeflechte aus einer Kobalt- oder Magnesiumlegierung<sup>102</sup> oder auf so genannte biodegradierbare Stents. Bei letzteren handelt es sich um Geflechte aus Materialien (z.B. Milchsäurepolymere), die sich nach einer gewissen Zeit auflösen<sup>103</sup>. Damit erfüllen diese Stents gleich mehrere Eigenschaften. Sie verhindern das elastische Recoil, stabilisieren das Gefäß nach Angioplastie und lösen sich nach erfülltem Zweck wieder auf. Hat der Stent auch noch die Eigenschaft während seiner begrenzten Verweildauer eine intraluminale Adhäsion von Zellen zu verhindern, wäre zumindest im Falle der Ballonangioplastie ein ideales Behandlungskonzept zur Verhinderung der Restenose gefunden.

Der Conor Stent beispielsweise, der schon in klinischer Erprobung ist, hat verschiedene Polymer-Inlays, die als Substanzreservoir dienen und zeitlich versetzt Stoffe freisetzen können<sup>104</sup>. Die Toxizität dieser biodegradierbaren Stents für das Gefäß, durch so genannte biologische Korrosion, limitiert aber noch den breiten klinischen Einsatz und stellt die Zukunft dieses Verfahrens in Frage<sup>103</sup>. Darüber hinaus ist der Einsatz von Stents auch auf bestimmte, spezielle Indikationen, wie kurzstreckige Stenosen ohne Beteiligung des koronaren Hauptstammes beschränkt und stößt auch bei kleineren Gefäßen an seine Grenzen<sup>72</sup>.

Neuere Studien betonen immer wieder den Beitrag vaskulärer Progenitorzellen bei der Entstehung von negativen Remodeling-Prozessen nach Gefäßtraumata. Zellen aus dem Knochenmark sollen dabei, angezogen durch Zytokine von ortsständigen Muskel- und Entzündungszellen an die verletzte Intima adhären, dort akkumulieren und sich letztendlich zu glatten Gefäßmuskelzellen oder vaskulären Endothelzellen (VEC) differenzieren<sup>33,36</sup>.

Ein mögliches Behandlungsziel nach Gefäßverletzung wäre also die Verhinderung der Rekrutierung dieser Vorläuferzellen, die neben ihrer, für das Gefäß kurativen Potenz, genannte negative Eigenschaften besitzen.

Für die vorliegende Arbeit sollte daher mit Kininogen eine Substanz untersucht werden, die im Gegensatz zu den bisher erforschten, durchaus erfolgreich eingesetzten Stoffen, neben der antiproliferativen auch eine antiadhäsive und proapoptotische Komponente aufweist<sup>63,70,105</sup>.

Kininogen ist deshalb von besonderem Interesse, weil es in einer bestimmten Konzentration in jedem Menschen vorhanden und somit körpereigen ist<sup>77</sup>. Daher sollte es gut verträglich und mit wenigen Nebenwirkungen behaftet sein. Darüber hinaus sollte die Studie einen ersten Anhalt für die Funktion des physiologischerweise im Körper zirkulierenden Kininogens auf die Entstehung und Progression vaskuloproliferativer Erkrankungen geben.

In verschiedenen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass durch Kallikrein gespaltenes, hochmolekulares Kininogen und dessen Fragmente antiadhäsive Eigenschaften besitzen und die Apoptose von Zellen induzieren<sup>81, 83, 106</sup>. Es stellte sich daher die Frage, ob man diese Eigenschaften nutzen könnte, um sie zur Verhinderung der Restenose einzusetzen.

Es wurde ein etabliertes *in-vivo* Modell bei der Maus verwendet, das eine reproduzierbare, neointimale Hyperplasie als Korrelat für die Restenose nach Gefäßtrauma, induziert<sup>100</sup>.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass sowohl das auf das Gefäß applizierte, aktivierte Kininogen, als auch ein Fragment dieses Stoffes, die Domäne 5 in den Versuchen in das Gefäß aufgenommen wurden.

Wir untersuchten 3 Wochen nach Drahtdenudation, morphometrisch die Neointimabildung im Verhältnis zur Media. In der Tat konnte die Neointimabildung nach der verursachten Gefäßverletzung durch beide Stoffe stark reduziert werden.

Wir beobachteten, dass die Zellen, die die Neointima bildeten, zum Teil aus der Zirkulation rekrutiert wurden. Damit konnten wir die Ergebnisse von Forschergruppen bestätigen, die eine Beteiligung von aus dem Knochenmark stammenden Zellen an der Bildung der Neointima neben den aus dem verletzten Gefäßabschnitten rekrutierten glatten Gefäßmuskelzellen, fanden<sup>37, 75, 100, 107</sup>. Gleichzeitig gab es Zellen, die gleichzeitig zum GFP,  $\alpha$ -SMA exprimierten. Damit konnten wir zeigen, dass in unseren Versuchen die aus dem Knochenmark rekrutierten Zellen in der Lage waren, sich zu glatten Gefäßmuskelzellen zu differenzieren.

Der Anteil doppelt fluoreszierender Zellen konnte durch den Einsatz von HKa und D5 signifikant reduziert werden. Die Akkumulation von zirkulierenden Zellen aus dem Knochenmark in der Neointima, die zu VSMC differenzierten, wurde also durch HKa und D5 vermindert.

Unsere Ergebnisse belegen ebenso, dass der Anteil mononukleärer Zellen (Monozyten und Makrophagen) in der Neointima und subendothelialen Schichten und damit der durch diese Zellen verursachte Entzündungsreiz durch den Einsatz von HKa und D5 signifikant reduziert werden konnte.

## 5.2 Proliferationshemmung durch Kininogen und dessen Domäne 5

Wir untersuchten mit einem Marker für PCNA den Anteil proliferierender Zellen in der Neointima und Media der verletzten Gefäße. Wir stellten fest, dass die mit HKa und noch mehr die mit Domäne 5 behandelten Gefäße, eine starke Reduktion für PCNA-positive Zellen in beiden Gefäßabschnitten zeigten.

Der Kontakt zwischen der Zelloberfläche und der extrazellulären Matrix (ECM) dient nicht nur der mechanischen Stabilisierung, die die Gewebearchitektur kontrolliert, sondern initiiert auch bestimmte intrazelluläre Signale, die für die Funktion und das Fortbestehen der Zelle von Bedeutung sind. Die Zelladhäsion zur ECM wird für viele zelluläre Prozesse, wie für die Migration und Differenzierung, benötigt. Die Zelladhäsion ist auch essentiell für die Proliferation von Zellen<sup>42, 90</sup>.

Schon seit längerem ist bekannt, dass gespaltenes hochmolekulares Kininogen durch die Interaktion mit Rezeptoren auf verschiedenen Zellen, wie beispielsweise dem Urokinase-System auf EC antiadhäsive Effekte aufweist<sup>81, 106</sup>. Dadurch reduziert Kininogen Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte und veranlasst Zellen zur Apoptose<sup>82, 83, 90</sup>. Durch die Hinderung von Endothelzellen und VSMC, Kontakte zur ECM zu knüpfen einerseits und durch die durch Apoptose entstehende Reduzierung neointimaler Zellen andererseits, gelingt es im Falle der Applikation von HKa und D5, weniger Zellen an der Proliferation und damit dem Gefäßumbau zu partizipieren. Guo et al. konnten zeigen, dass in Endothelzellen, die auf VN wuchsen und mit HKa und D5 behandelt wurden, kaum Anzeichen für Zellausbreitung („cell spreading“) in der Architektur des Zytoskeletts erkennbar waren. Diese Zellen haben somit keine Möglichkeit mehr sich zu vermehren oder zur Synthese der ECM beizutragen<sup>90</sup>. Cao et al. konnten kürzlich belegen, dass HKa eine Signalkaskade aus VN-uPAR- $\alpha$ v $\beta$ 3-Caveolin-SRC-FAK-Paxillin unterbricht, die für Zelladhäsion, Proliferation und Zellüberleben von EC und VSMC verantwortlich ist<sup>88</sup>.

Da auch vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe die essentielle Bedeutung dieses Signaltransduktionsweges für die Proliferation von VSMC belegen konnten, ist davon auszugehen, dass HKa und D5 auch über die Hemmung der VN-uPAR- $\alpha\beta$ 3-Caveolin-SRC-FAK-Paxillin Signalkaskade einen antiproliferativen Effekt auf VSMC und EC ausübt<sup>108-110</sup>. Zusammen mit den zuvor genannten Ergebnissen liefert das eine Erklärung für den geringeren Anteil proliferierender Zellen in der Neointima.

In der vorliegenden Arbeit wird damit ein Nachweis für den antiproliferativen Effekt von HKa und D5 erbracht, mit positiven Auswirkungen auf die Reduktion der Neointima nach Gefäßverletzung.

### **5.3 Mechanismen der Apoptoseinduktion durch HKa und D5**

Bei der Apoptose handelt es sich um eine besondere Form des programmierten Zelltodes<sup>42</sup>, der von verschiedenen Mechanismen, unter anderem verschiedenen proteolytischen Systemen wie dem Plasminogen-Aktivierungs-System (PA-System), beeinflusst wird<sup>111</sup>. Die Apoptose hat wichtige Kontrollfunktionen beim Gewebeumbau und Remodeling, bei der Zellregulierung und bei bestimmten Krankheitszuständen, wie der Wundheilung<sup>112</sup>. Unsere Ergebnisse belegen, dass die Applikation der antiadhäsiven Moleküle, HKa und Domäne 5, nach Drahtdenudation zu einer verstärkten Apoptoseinduktion neointimaler Zellen führte.

Wie ist das nun zu bewerten?

Das Zellüberleben ortsständiger Zellen, wie SMC oder EC, ist an das Vorhandensein von Kontakten dieser Zellen zu anderen Zellen oder zu extrazellulären Matrixproteinen gebunden. Die Zellen adhäreren über Oberflächenintegrine vom  $\alpha\beta$ 3-Typ an VN, FN, Fibrinogen (FBG) und andere Matrixproteine<sup>113</sup>. Wurden die Oberflächenintegrine blockiert, kam es zur Apoptose der Zellen, wohingegen Apoptose durch Integrinbindung mit der Matrixkomponente VN verhindert werden konnte<sup>114</sup>. Diese gegensätzliche Beziehung von Zelladhäsion und programmiertem Zelltod mit der entscheidenden Rolle der  $\alpha\beta$ 3-Integrin-vermittelten Signalgebung konnte von Fukai et al. nachgewiesen werden<sup>113</sup>.

Al-Fakhri et al. konnten kürzlich zeigen, dass eine VN-abhängige Hemmung der Adhäsion von Endothelzellen und VSMC durch PAI-1 und HKa, positiv mit einer verstärkten Apoptoseaktivität dieser Zellen korrelierte. Dieses Phänomen, bei dem es durch Unterbrechung zellulärer Kontakte zum programmierten Zelltod kommt, wird als Anoikose bezeichnet<sup>115</sup>.

Unterstützt werden diese Beobachtungen von verschiedenen Forschungsgruppen, die den apoptoseinduzierenden Effekt von HKa und D5 auf Endothelzellen beschrieben<sup>90, 116</sup>.

Wie Guo et al kürzlich demonstrieren konnten, führt die Applikation von HKa und D5 zu einer Hemmung der Phosphorylierung und damit der Aktivierung der fokalen Adhäsions-Kinase (FAK) und Paxillin bei EC, die auf VN oder Gelatine wuchsen. Bei beiden Proteinen handelt es sich um antiapoptotische Signalmoleküle, die für die Zelladhäsion und das Zellüberleben von Bedeutung sind<sup>117</sup>. Die mit HKa und D5 behandelten Zellen konnten auf einen Bruchteil der ursprünglichen Zellzahl reduziert werden. Einige der restlichen, überlebenden Zellen zeigten die, für Apoptose übliche Morphologie. Daraus wurde geschlossen, dass die antiadhäsive Aktivität von HKa und D5 verantwortlich für deren apoptotischen Effekt ist und dass VN wahrscheinlich eine der ECM-Komponenten ist, die den antiadhäsiven Effekt von HKa und D5 vermittelt<sup>90</sup>. Weiterhin wurde berichtet, dass PAI-1 und HKa die Zelladhäsion und Migration bei der Atherosklerose modulieren<sup>84, 89, 94</sup>, aber auch den apoptotischen Zelltod vermitteln können<sup>112</sup>.

Es ist jedoch fraglich, ob diese Phänomene auch *in vivo* stattfinden.

In vorausgegangenen Arbeiten wurden humane, atherosklerotisch veränderte Iliacal- und Carotisarterien untersucht, in denen eine ausgeprägte Neointimabildung zu erkennen war. Es zeigte sich, dass in dem Gewebe entlang einer Grenze, in der sich Schaumzellen aus SMC und Makrophagen ansammelten, eine gesteigerte Apoptoseaktivität stattfand. Außerhalb dieser Linie und in gesundem Gewebe war kaum oder keine Apoptose erkennbar<sup>92</sup>.

Zusätzlich zu den apoptotischen Zellen beobachtete man in selbigen Bereichen kongruente Ansammlungen von VN, HK, PAI-1, uPAR und uPA. Dies ist ein Indiz für eine Interaktion dieser verschiedenen Komponenten, auch beim Menschen<sup>92</sup>.

Es bleibt nun noch zu diskutieren, wie sich die, durch HKa und D5 verstärkte Apoptose, auf das Fortschreiten von Gefäßdefekten auswirkt: Gefäßremodeling verlangt nach einem Gleichgewicht von Faktoren, die die Zelladhäsion, die Proliferation und die Migration fördern, als auch nach Faktoren, wie der Apoptose, die der Hyperplasie von Zellen entgegenwirken<sup>118</sup>. Die Apoptose verringert, wie beschrieben, die Anzahl neointimaler Zellen und den von diesen Zellen ausgehenden Beitrag auf das Fortschreiten des Gefäßumbaus<sup>112</sup>.

Dass die, durch die antiadhäsiven Komponenten HKa und D5, verstärkte Apoptoseaktivität das Gefäßremodeling positiv beeinflussen, das Fortschreiten von Gefäßdefekten verzögern und zu einer, wie in der vorliegenden Arbeit beobachteten, verringerten Neointimabildung beitragen kann, ist somit wahrscheinlich. Das Nebeneinander von apoptotischen Zellen und antiadhäsiven Komponenten bei der Atherosklerose humaner Gefäße zeigt jedenfalls die Wichtigkeit dieser Prozesse beim Gewebeumbau, zum Beispiel im Rahmen der Neointimabildung nach Gefäßverletzung<sup>92</sup>. Daher erscheint es schlüssig, dass über die Hemmung antiapoptotischer Mechanismen und die Hemmung der zellulären Adhäsion die Apoptose gefördert wird. Die bisher beschriebenen proapoptotischen Effekte von HKa und D5 wurden hier bestätigt. HKa und D5 scheinen somit, unterstützt durch die beobachteten Ergebnisse, die entscheidenden Substanzen zu sein, die zur Apoptoseinduktion und zur verminderten Neointimabildung beitragen.

#### **5.4 Effekt von Kininogen auf die Akkumulation von Progenitorzellen in neointimalem Gewebe**

Wie unsere Ergebnisse belegen, rekrutiert sich ein Teil neointimaler Zellen aus zirkulierenden Zellen des Knochenmarks. Diese Zellen haben die Potenz sich zu glatten Gefäßmuskelzellen zu differenzieren und tragen auf diese Weise zur Verengung des zuvor denudierten Gefäßes bei. Durch den Einsatz von HKa und D5 konnte der Anteil dieser aus dem Knochenmark stammenden VSMC signifikant reduziert werden. Es stellt sich nun die Frage, wie dieses Phänomen zu erklären ist?

Zahlreiche Versuchsgruppen fanden in verschiedenen Tiermodellen Beweise für die Beteiligung von Zellen aus dem Knochenmark an der Bildung von Neointimagewebe nach verschiedenen, die Gefäße schädigenden Maßnahmen<sup>36, 40, 74, 75</sup>. Obwohl die Rolle, von aus dem Knochenmark stammenden Zellen bei der Reparatur und dem Remodeling von Gefäßen beim Menschen noch nicht endgültig bewiesen ist, häufen sich die Hinweise, dass hämatopoetische Stammzellen oder Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in der Lage sind, sich zu vaskulären Endothelzellen (VEC) oder glatten Gefäßmuskelzellen zu differenzieren<sup>17, 107, 119</sup>.

Es wird vermutet, dass auch beim Menschen nach schweren Gefäßverletzungen, Progenitorzellen aus dem Knochenmark oder anderen Blutkompartimenten eine Rolle spielen, um die zerstörten Gefäßwandzellen durch funktionale Zellen zu ersetzen. Schober et al. konnten kürzlich beim Menschen eine positive Korrelation zwischen der Anzahl peripherer CD34-Zellen (Vorläuferzellen) und der Restenose nach koronarem Stenting beobachten. Die Restenoserate und der „Lumenverlust“ 8 Monate nach der Intervention war in der Gruppe, die kurz nach dem Eingriff eine vermehrte Anzahl an peripheren CD34-Zellen im Blut hatte, signifikant erhöht<sup>33</sup>. Unterstützung für diese Ergebnisse liefern zahlreiche Tiermodelle, die mit Gefäßverletzungen, Allografts und atherogenen Diäten arbeiteten und bei denen sich in den atherosklerotisch veränderten Geweben aus dem Knochenmark stammende Zellen wieder fanden, die sich zu VSMC differenzierten.

Die initiale Adhäsion von Progenitorzellen an die ECM oder EC wird dabei durch HKa über die Blockade der Oberflächenintegrine gehemmt<sup>13, 36, 120</sup>.

Dabei ist die Art der Gefäßverletzung wohl entscheidend für die Stärke der Rekrutierung. Wie Tanaka et al. kürzlich in einem Modell, das verschiedene Verletzungen bei ein und derselben Maus induziert, berichten konnten, wurden durch Drahtdilataion besonders viele zirkulierende Vorläuferzellen rekrutiert. Nach Setzen eines perivaskulären Cuff fanden sich dagegen kaum Zellen aus dem Knochenmark in neointimalem Gewebe, aber dafür in der Adventitia des Gefäßes<sup>74</sup>.

Es war daher interessant, welche Zellen in der Neointima der Mausearterie vorkamen und woher sie ihren Ursprung nahmen.

Als erstes wurde  $\alpha$ -SMA, ein Marker für glatte Gefäßmuskelzellen, verwendet. Zusätzlich zu den für  $\alpha$ -SMA positiven Zellen konnten Zellen, die aus dem Knochenmark stammten, durch die Expressierung von GFP unter dem Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden.

Wir stellten fest, dass ein erheblicher Teil der neointimalen Zellen für  $\alpha$ -SMA positiv waren und es sich somit um glatte Gefäßmuskelzellen handeln musste. Schon länger ist bekannt, dass VSMC den Hauptteil neointimaler Zellen ausmachen und für die Bildung der extrazellulären Matrix verantwortlich sind<sup>43</sup>. Die beteiligten VSMC rekrutieren sich dabei aus der Media und sogar der Adventitia der betroffenen Gefäßabschnitte<sup>35</sup>. Um im Folgenden die Herkunft dieser VSMC genauer zu untersuchen, betrachteten wir den Anteil doppelt fluoreszierender Zellen (GFP und  $\alpha$ -SMA positiv) in den gefärbten Gefäßschnitten. Dies sind also Zellen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben (GFP positiv) und trotzdem für  $\alpha$ -SMA positiv sind. Es stellte sich zunächst heraus, dass tatsächlich ein erheblicher Teil der Zellen in der Neointima für GFP positiv waren. Unter diesen grün fluoreszierenden Zellen war wiederum ein Teil, der sowohl rot ( $\alpha$ -SMA), als auch grün (GFP) fluoreszierte. Es musste sich hierbei also um Zellen handeln, die trotz ihrer Herkunft die Potenz hatten, sich zu glatten Gefäßmuskelzellen differenzieren zu können.

Solche als vaskuläre Progenitorzellen bezeichnete Zellen konnten schon in verschiedenen Studien als wesentlicher Beitrag zur neointimalen Hyperplasie identifiziert werden<sup>75, 100</sup>. Damit erbrachten wir erstens den Nachweis, dass an der Bildung der Neointima, Zellen aus dem Knochenmark beteiligt waren. Zweitens, dass diese Zellen zusätzlich  $\alpha$ -SMA exprimierten und somit die Potenz hatten sich, wie auch in anderen Studien belegt<sup>36, 40, 75</sup>, zu glatten Gefäßmuskelzellen zu differenzieren. Es konnte gezeigt werden, dass HKa und mehr noch Domäne 5, den Anteil solcher, aus dem Knochenmark stammender Zellen in der Neointima verminderten.

Vermutlich findet die Reduzierung der Progenitorzellen in der Neointima sowohl über die Hemmung der Adhäsion dieser Zellen an die Gefäßwand als auch über eine gesteigerte Apoptose dieser Zellen statt. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnte diese These an einem *in-vivo* Modell unterstützt werden. Die Ergebnisse liefern zudem eine weitere Erklärung für den positiven Effekt von HKa und D5 auf das Remodeling nach Gefäßverletzung.

## **5.5 Kininogen vermindert die Akkumulation von mononukleären Zellen im Entzündungsgebiet**

Durch immunhistochemische Färbung von Monozyten und Makrophagen 3 Wochen nach Gefäßdenudation, konnten wir den Anteil dieser Zellen in der gebildeten Neointima und der Media beobachten. Wie unsere Ergebnisse belegen, führte die Applikation von HKa und D5 zu einer signifikanten Abnahme dieser Zellen in beiden Gefäßschichten. Es stellt sich nun die Frage, wie die Beobachtung mit der Applikation von HKa und D5 zusammenhängt und welche Folgen dies für die Bildung der Neointima hat.

Leukozytenaktivierung und -adhäsion ans Endothel und die folgende transendotheliale Migration sind die entscheidenden Schritte bei der Rekrutierung von Zellen ins entzündete Gewebe. Dieser hochkoordinierte, mehrschrittige Prozess verlangt nach einer straffen Regulierung adhäsiver Ereignisse<sup>121</sup>. Unkontrollierte Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen führen zu pathologischen Entzündungen, die zum Beispiel Atherosklerose, Rheumatoide Arthritis oder andere chronisch entzündliche Erkrankungen verursachen<sup>82</sup>. Bei der akuten Entzündung sind die  $\beta$ 2-Integrine Mac-1 und LFA-1 die herausragenden Rezeptoren auf Leukozyten, die die Adhäsion dieser Zellen über den Gegenrezeptor ICAM-1 ans Endothel vermitteln. Mac-1 wird auf Neutrophilen und Monozyten exprimiert, wohingegen LFA-1 sich vorwiegend auf Lymphozyten befindet. Mac-1 ist auch Rezeptor für FBG und VN und vermittelt dadurch die Adhäsion und Migration von Neutrophilen und Monozyten an die extrazelluläre Matrix in entzündetem oder verwundetem Gewebe<sup>82, 122</sup>.

Die Ergebnisse verschiedener Studien belegen, dass HKa und D5 an Mac-1 auf Leukozyten binden und mit diesen Zellen um die Bindung an FBG konkurrieren<sup>87, 98</sup>. In einer Studie von Chavakis et al. konnte weiterhin gezeigt werden, dass HKa und D5 die Mac-1-abhängige (nicht die LFA-1-abhängige) Leukozytenadhäsion an FBG und Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* blockieren.

Genauso, wie die Bindung von Mac-1 an FBG konnte durch HK, HKa und D5 (weniger durch D3) die zinkabhängige Bindung zu löslichem ICAM-1 auf Endothelzellen gehemmt werden. HK, HKa und D5 (weniger D3) inhibierten dosisabhängig die Adhäsion von U937 Zellen und humanen, peripheren Blutmonozyten zu FBG und Endothelzellen. Der antiadhäsive Effekt wurde dabei durch direkte Interaktion der Kininogen-Abkömmlinge mit Mac-1 vermittelt und nicht über uPAR. Die Peptidsequenzen, die diese antiadhäsiven Eigenschaften vermittelten, konnten identifiziert werden und lagen auf der Domäne 5 von HKa. Dies ist ein weiterer Beleg für die herausragende Stellung der Domäne 5 für die antiadhäsiven Eigenschaften von HKa. Dass die Prozesse auch *in vivo* stattfinden wurde anhand eines Mausmodells gezeigt, bei dem durch Thioglykolapplikation eine Peritonitis erzeugt wurde. Nach Vorinjektion von D5 ins Peritoneum sank die Anzahl rekrutierter neutrophiler Granulozyten um 70%, ein Wert, der dem Gebrauch eines Antikörpers gegen Mac-1 glich<sup>82</sup>.

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass ein Patient mit HK-Defizienz (Fitzgerald-Defizienz) in einem Hautfenster (vermutlich durch die fehlende antiadhäsive Wirkung des Kininogens) eine exzessive Leukozytenmigration zeigte<sup>123</sup>.

Ein persistierender Entzündungsreiz, ausgelöst durch adhärierende Leukozyten nach Gefäßschädigung, gilt als entscheidender Faktor bei der Entstehung vaskuloproliferativer Erkrankungen<sup>4, 34</sup>. Der Entzündungsreiz wird von Entzündungszellen (Monozyten und Makrophagen) vermittelt, die einmal am Ort des Gefäßdefektes angekommen, eine Vielzahl an Zytokinen (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IF $\gamma$ ) sezernieren und somit die Gefäßschädigung noch weiter vorantreiben<sup>4, 36</sup>. Die Adhäsion der rekrutierten Monozyten und Makrophagen an EC und provisorische Matrixproteine, wie VN und FBG, kann also durch die Verabreichung von HKa und D5 reduziert werden. Logische Folge ist eine parallele Verminderung des von diesen Zellen ausgehenden Entzündungsreizes.

Damit liefern wir in unserem Modell einen starken Hinweis darauf, dass durch Einsatz der antiadhäsiven und antiinflammatorischen Komponenten HKa und D5 eine Reduzierung von Entzündungszellen in den verletzten Gefäßabschnitten stattfand.

Damit unmittelbar verbunden lässt sich die geringere Neointimabildung erklären, mit weitreichenden, positiven Folgen für die Aufrechterhaltung der Gefäßhomöostase.

### **5.6 Vergleich der Wirksamkeit von HKa und Domäne 5**

In unseren Versuchen zeigte sich, dass D5 effektiver die Neointimabildung, die Proliferation und die Entzündungsreaktion hemmte und zu einer stärkeren Apoptoseinduktion führte als HKa.

Dies steht zum Teil im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Forschergruppen, bei denen HKa effektiver bei der Vermittlung des antiadhäsiven Effektes und der Apoptoseinduktion war als D5<sup>84, 124</sup>. Wie lässt sich das erklären?

Zunächst ist zu erwähnen, dass es bis dato noch keine Untersuchungen in einem *in-vivo* Modell gab, die HKa und Domäne 5 hinsichtlich ihrer antiadhäsiven Eigenschaften auf das Gefäßremodeling, verglichen. Die bisher genannten Arbeiten untersuchten die Auswirkungen von HKa und D5 auf die Adhäsion von Zellen und auf verschiedene Komponenten der ECM vorwiegend *in vitro*. Zhang et al. stellten fest, dass D5 zwar die antiadhäsiven Eigenschaften von HKa vermittelte und dass D5 der entscheidende Abschnitt innerhalb des Moleküls war, der die Apoptose induzierte<sup>116</sup>. Dennoch war HKa effektiver. Die gleiche Beobachtung machten Guo et al. und Chavakis et al.<sup>82, 90, 93</sup>. Letztere hoben in einer Studie zusätzlich noch die antiadhäsiven Eigenschaften von D5 bei der Rekrutierung von Leukozyten hervor. Sie konnten sogar die Abschnitte innerhalb der Domäne 5 bestimmen, die für die Hemmung der Adhäsion verantwortlich waren<sup>82</sup>. Was dabei nicht berücksichtigt werden konnte waren jedoch die Diffusionseigenschaften beider Moleküle *in vivo*.

In unserem verwendeten Modell mussten HKa und D5 nach Applikation des Gels auf das Gefäß zunächst in das Gefäß gelangen, um dort wirken zu können. Eine mögliche Erklärung wäre somit, dass D5 aufgrund seiner geringeren Molekülgröße und seiner vorwiegend neutralen Aminosäuren<sup>82</sup> leichter durch das Gewebe diffundieren kann und *in loco* einen größeren Wirkstoffspiegel erreicht.

Um jedoch genauere Aussagen über die Effektivität von HKa und D5 treffen zu können müssen weitere Untersuchungen folgen, die die Wirkungsmechanismen beider Substanzen klären und eventuell den genauen intravasalen Wirkstoffspiegel an einem *in vivo* Modell klären.

Die positiven Effekte auf die, für die Verminderung der Neointimabildung nötigen Eigenschaften, waren in dieser Arbeit jedenfalls für beide Substanzen eindeutig zu belegen, obgleich Domäne 5 effektiver war.

### **5.7 Wirkung des Kininogens auf die neointimale Hyperplasie**

Wie unsere Ergebnisse verdeutlichen entstand durch den Einsatz von aktiviertem Kininogen und noch mehr durch D5 eine signifikante Reduktion der Neointimabildung nach dem durch Drahtdenudation verursachten Gefäßtrauma. Es stellt sich nunmehr die Frage, wie diese Beobachtungen mit den bereits beschriebenen Wirkungen von aktiviertem Kininogen und D5 auf das Gefäßremodeling zusammenhängen und wie diese Beobachtungen zu bewerten sind.

Zell zu Zell-Interaktionen und Zellinteraktionen mit der ECM bestimmen morphogenetische Prozesse während des Gefäßremodelings und den Ablauf inflammatorischer Prozesse, auch im Rahmen von Umbauvorgängen innerhalb von Gefäßen und bei der Bildung der Neointima nach Gefäßverletzungen<sup>83, 125, 126</sup>. Für die Akkumulation von Zellen innerhalb der Neointima müssen diese zunächst aus anderen Teilen des Gefäßes dorthin migrieren<sup>4, 5, 30</sup> oder an das Endothel adhären, sofern sie aus der Blutbahn, respektive dem Knochenmark, kommen<sup>75, 82</sup>.

Unter diesen rekrutierten Zellen sind Myofibroblasten, SMC, mononukleäre Zellen (Monozyten und Makrophagen) und EC<sup>5, 127</sup>. Im Weiteren proliferieren die an die Stelle der Verletzung rekrutierten Zellen und synthetisieren Proteine, die letztendlich die ECM bilden<sup>2, 72</sup>. Diese Mechanismen tragen alle zum negativen Remodeling und damit zur Verengung des verletzten Gefäßes bei.

Die Apoptose ist ein Mechanismus, der dem negativen Remodeling entgegenwirkt<sup>42, 82, 92</sup>. Zellen, denen der Kontakt zu anderen Zellen oder zu Proteinen der ECM fehlt, treten in den programmierten Zelltod ein (Anoikose)<sup>115</sup>. Wie unsere Ergebnisse und die obigen Ausführungen zeigen, haben das endogene HKa und die Domäne 5 dieses Moleküls, durch ihre multiplen Interaktionen mit Rezeptoren und Signalmolekülen, auf verschiedenen Zelloberflächen sowie durch die Unterbrechung von Signalkaskaden<sup>85, 89, 90, 92, 128</sup> Einfluss auf alle genannten Prozesse, die das Gefäßremodeling negativ beeinflussen. Kininogen und D5 hemmen die initiale Adhäsion von Entzündungszellen und Progenitorzellen aus der Blutbahn sowie die Migration von SMC an den Ort der Gefäßverletzung<sup>13, 36, 74, 83</sup>. Durch die herausragenden antiadhäsiven Eigenschaften und die Hemmung von Zellinteraktionen unterbinden HKa und D5 im Folgenden die Proliferation der beteiligten Zellen, die Entzündungsreaktion<sup>82</sup> und induzieren die Apoptose der rekrutierten Zellen<sup>90, 92</sup>.

Zusammen mit den Untersuchungen anderer Forschungsgruppen und belegt durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hemmen HKa und D5 die neointimale Hyperplasie durch ihre vielfachen Interaktionen während des Heilungs- und Entzündungsprozesses nach Gefäßdenudation. Sie sollten aufgrund ihrer besonderen Stellung als endogene Proteine besonders gut verträglich und mit wenigen Nebenwirkungen belastet sein und erscheinen deshalb eventuell auch für die Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen, besonders geeignet. Zusammengenommen liefern die Ergebnisse dieser Arbeit eine Bestätigung für die Wirkung der Kininogene, auch *in vivo* und bilden die Grundlage für weitere Forschungsarbeiten zum Einsatz endogener Substanzen in der Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen.

## **5.8 Problematik des verwendeten Modells und Vergleichbarkeit mit dem Menschen**

Bevor die Mäuse operiert wurden, bekamen sie eine, das gesamte Knochenmark zerstörende, Dosis Röntgenstrahlen appliziert und danach GFP-positives Knochenmark anderer Mäuse transplantiert. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit dem Menschen könnte man nun fragen, ob in diesem bestimmten Fall die Bestrahlung der Mäuse dazu beigetragen hat, dass Progenitorzellen aus der Blutbahn überhaupt erst adhären und dadurch zur Neointimabildung beitragen. Wie Sata et al. zeigen konnten ist jedoch der Anteil von Progenitorzellen in neointimalem Gewebe bestrahlter Mäuse ebenso hoch, wie der, in nicht bestrahlten.

Des Weiteren fanden sich keine Zellen mit Ursprung aus dem Knochenmark in Gefäßen bestrahlter Mäuse ohne Verletzung (eigene Ergebnisse siehe oben)<sup>36</sup>.

Das zeigt, dass die Bestrahlung einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Rekrutierung von Zellen aus dem Knochenmark als Beitrag zur neointimalen Hyperplasie hat.

Dennoch kommen weitere Fragen auf:

1. Sind die ablaufenden molekularen und zellulären Mechanismen der Maus oder anderer Versuchstiere mit denen beim Menschen vergleichbar oder zumindest so ähnlich, dass sich Ergebnisse mit der entsprechenden Vorsicht übertragen lassen?

2. Simuliert eine Drahtdenudation die Situation einer Ballonangioplastie? Die erste Frage wird jetzt noch nicht endgültig zufrieden stellend beantwortbar sein. Der Beitrag und die Bedeutung zirkulierender Zellen aus dem Knochenmark bei der Neointimabildung menschlicher Gefäße sind noch weitgehend unbewiesen. Jedoch fand man in Koronararterien von transplantierten Herzen, bei denen das Geschlecht des Grafts anders als das des Empfängers war, dass glatte Gefäßmuskelzellen, die intraluminales Gewebe bildeten, zum Teil vom Empfänger stammten.

Dies würde mit dem mutmaßlichen Ursprung dieser Zellen von Progenitorzellen aus dem Knochenmark des Empfängers übereinstimmen<sup>129</sup>. Das gleiche Phänomen zeigte sich nach Nierentransplantationen<sup>130</sup>.

Caplice et al. konnten in atherosklerotischen Läsionen bei Menschen nach Knochenmarkstransplantation, Spenderzellen finden<sup>131</sup>. Weiterhin mehren sich die Hinweise, dass beim Menschen nicht nur Zellen aus dem Knochenmark zu Umbauprozessen in Gefäßen beitragen, sondern dass ähnlich, wie bei Tiermodellen, die Art der Verletzung entscheidend für den Umbau des Gefäßes ist<sup>7, 132</sup>. Auf die zweite Frage kann man antworten, dass der wahrscheinlich entscheidende Auslöser der Restenose, nämlich die Denudation mit Zerstörung der Intima und Endothelzellverlust sowohl bei der Ballonangioplastie des Menschen, als auch bei der Drahtdilataion der Mäuserarterien, gegeben ist<sup>100</sup>.

In jedem Falle erhöht das von Sata etablierte und von uns verwendete Tiermodell, obwohl es niemals der genauen Situation beim Menschen gleicht, das Verständnis für die ablaufende zellulären Prozesse und ermöglicht in vielen Fällen die Untersuchung von Stoffen mit potentiell positiver Auswirkung auf eine neointimale Hyperplasie auch für den eventuellen späteren humanen Einsatz.

## **5.9 Ausblick**

Erfolg und Misserfolg beim Einsatz revaskularisierender Maßnahmen und das Versagen therapeutischer Strategien zeigt, dass ein endgültiges Konzept zur Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen noch nicht gefunden ist. In unseren Untersuchungen konzentrierten wir uns deshalb auf den körpereigenen Stoff Kininogen und dessen Domäne 5, um die Auswirkungen dieser beiden antiadhäsiv und antiinflammatorisch wirkenden Komponenten, in einem *in vivo* Mausmodell zu testen.

Die ablaufenden Interaktionen definieren HKa nicht nur als einen intrinsischen Regulator des Fibrinolyse-Systems, sondern durch seine Funktion als antiadhäsive Komponente, auch als Regulator der Angio- und Atherogenese<sup>83</sup>.

Abhängig von seiner lokalen Konzentration im entzündeten und verletzten Gewebe könnte Kininogen durch die Interaktionen mit den dort vorhandenen Rezeptorsystemen auf Zellen und seinen Interaktionen mit der ECM seine antithrombotischen<sup>133, 134</sup> und antiadhäsiven Eigenschaften ausspielen. Dass die beschriebenen Effekte des Kininogens und seiner Fragmente nicht nur *in vitro* stattfanden, konnte in der vorliegenden Arbeit und durch andere Forschergruppen belegt werden<sup>97, 135</sup>.

HKa und D5 verminderten wie in dieser Arbeit gezeigt, vergleichbar mit anderen *in vitro* und *in vivo* Modellen<sup>82, 87, 98</sup>, die Adhäsion von Monozyten und anderen Entzündungszellen. Die antiadhäsiven und antiinflammatorischen Mechanismen von HKa und seiner Fragmente könnten unter Berücksichtigung ihrer hohen Plasmakonzentration von enormer Wichtigkeit sein, um exzessive Leukozytenrekrutierung zu regulieren oder zu verhindern.

Die von HKa stammenden Peptidsequenzen, die in die dazu nötige Inhibierung der Mac-1 Funktion verwickelt waren, liegen auf der Domäne 5<sup>82</sup> und wären eine mögliche Grundlage für neue therapeutische Substanzen, die die Leukozytenrekrutierung und Extravasation ins entzündete oder verletzte Gewebe inhibieren, auch im Rahmen einer Ballonangioplastie nach Gefäßverengung. Eine lokale Injektion von diesen von HKa abgeleiteten Komponenten wäre somit eine mögliche Behandlungsstrategie, um den, durch die Dehnung des Gefäßes ausgehenden Entzündungsreiz und das folgende Gefäßremodeling, einzudämmen.

Das körpereigene Kininogen stellt im Behandlungskonzept der Restenose und Atherosklerose bisher eine Ausnahme dar, da es mit einem bestimmten, wahrscheinlich von Mensch zu Mensch unterschiedlichen Spiegel bereits im Körper vorhanden und so vermutlich mit geringen Nebenwirkungen verbunden ist<sup>77</sup>.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die Spiegelbestimmung des Kininogens eventuell auch als diagnostischer bzw. prognostischer Marker eine Bedeutung erlangen könnte.

Unsere Ergebnisse zusammen mit den Erkenntnissen anderer Forschergruppen belegen die möglichen Erfolge, die mit der Applikation von HKa und D5 im Zusammenhang mit vaskuloproliferativen Erkrankungen zu erzielen sind. Auch wenn der Weg bis zu einem therapeutischen Einsatz von Kininogen und dessen Fragmenten noch weit ist, so erhellen unsere Ergebnisse ein wenig die Zusammenhänge der komplexen Interaktionen der Stoffe am lebenden Objekt und sollten die Grundlage für weitere Forschungsarbeit sein, um vaskuloproliferative Erkrankungen zu bekämpfen. Körpereigenes Kininogen und davon abgeleitete Substanzen könnten in diesem Zusammenhang sowohl zur Prognoseabschätzung, zur Prävention, als auch zur späteren Therapie einen einflussreichen Beitrag liefern.

## 6 Zusammenfassung

Die Atherosklerose und die Restenose (Wiederverengung) von Gefäßen nach Ballonangioplastie sind vaskuloproliferative Erkrankungen.

Bei der Restenose führen die Zerstörung des Endothels und der dadurch ausgelöste Entzündungsreiz zur Rekrutierung verschiedener Zellen an den Ort der durch Dehnung verletzten Arterie. Dies geschieht durch eine gesteigerte Auswanderung (Migration) und Zellvermehrung (Proliferation) primär ortsständiger, glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) aus der Media und Adventitia des verletzten Gefäßes. Es wird vermutet, dass an der Restenose des Gefäßes, auch beim Menschen, Vorläuferzellen (Progenitorzellen) beteiligt sind, die dem Knochenmark entstammen, an das denudierte Gefäß adhären und sich zu VSMC oder vaskulären Endothelzellen (VEC) differenzieren können.

Zusätzlich adhären zirkulierende, mononukleäre Zellen an die verletzte Gefäßwand. Der durch die rekrutierten Zellen verursachte chronische Umbau (Remodeling) des Gefäßes mündet letztendlich in eine Neointimabildung mit Wiederverengung der Arterie, die den Erfolg revaskularisierender Maßnahmen limitiert. Die bis dato gewonnenen Erkenntnisse über die Mechanismen der Restenose ermöglichen zahlreiche Strategien zur Verhinderung der übermäßigen Zellrekrutierung.

Die an der Bildung der Neointima beteiligten Zellen folgen im Laufe der Entstehung vaskuloproliferativer Erkrankungen chemotaktischen Mediatoren, die von den beteiligten Zellen sezerniert werden, sobald sie am Ort der Gefäßverletzung angelangt sind. 4 Faktoren bestimmen im Weiteren den Prozess der Neointimabildung. Die freigesetzten Zytokine führen erstens zu weiterer Proliferation von VSMC und mononukleären Zellen sowie zweitens zu fortgesetzter zellulärer Migration. Drittens kommt es zu vermehrter Adhäsion zirkulierender Zellen an das Endothel und viertens treten einige der beteiligten Zellen in den programmierten Zelltod (Apoptose) ein. Die Proliferation, die Migration und die Adhäsion führen zur Progression der Neointimabildung (negatives Remodeling). Die Apoptose wirkt dem entgegen (positives Remodeling).

Die rekrutierten Zellen produzieren zudem Proteine, die eine extrazelluläre Matrix (ECM) formen, die wiederum einen entscheidenden Beitrag zur Neointimabildung liefert.

Bei der Akkumulation von Zellen in der Neointima spielen verschiedene Integrin-Rezeptoren für die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten, Zellkontakten zur ECM und über diese Integrine initiierte Signalkaskaden eine entscheidende Rolle. Die Blockierung der Integrine stellt somit einen wirkungsvollen Mechanismus zur Therapie vaskuloproliferativer Erkrankungen dar.

Es ist bekannt, dass das am Gerinnungssystem beteiligte, körpereigene Kininogen antiadhäsive Eigenschaften besitzt. Im Organismus wird es durch Kallikrein gespalten. Zurück bleibt, neben dem vasoaktiven Bradykinin das doppelsträngige, aktivierte Kininogen (HKa). HKa und ein Fragment dieser Substanz, die Domäne 5 (D5), interagieren mit unterschiedlichen Integrin-Rezeptoren auf Zellen, die zur Entstehung vaskuloproliferativer Erkrankungen beitragen. Das war der Anlass, in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von HKa und D5 auf das Gefäßremodeling zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass das endogene HKa und D5 die Proliferation von VSMC und mononukleären Zellen in der Neointima und Media hemmen. Wird HKa oder D5 in einem *in vivo* Modell auf ein Gefäß gegeben, das zuvor mit einem Draht überdehnt wurde, verringert dies den Anteil von Entzündungszellen (Monozyten und Makrophagen) im verletzten Gefäßabschnitt. Die Untersuchungen belegen, dass die Applikation von HKa und D5 zusätzlich zur Induktion der Apoptose neointimaler Zellen führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen die Beteiligung von Knochenmarkszellen am Remodeling bestätigt werden. Weiterhin wird zum ersten Mal in einem *in vivo* Modell gezeigt, dass HKa und D5 die Rekrutierung von Progenitorzellen in die Neointima hemmen.

Die vorgestellten Daten belegen, dass die beschriebenen Mechanismen durch die Applikation von HKa oder D5 zu einer Reduzierung der Neointimabildung führen.

Die präsentierten Ergebnisse über die Wirkung der endogenen Komponente HKa und dessen Domäne 5 im Rahmen einer durch Denudation entstandenen Gefäßverletzung erhöhen das Verständnis dieser antiadhäsiven Substanzen bei der Verhinderung gefäßverengender Prozesse.

Somit können diese neu gewonnenen Erkenntnisse die Grundlage für die Entwicklung neuer Strategien und effektiverer Therapien zur Behandlung vaskuloproliferativer Erkrankungen darstellen.

## 7 Summary

### **Two Chain High Molecular Weight Kininogen Prevents Vascular Smooth Muscle Progenitor Cell Accumulation to Sites of Vascular Injury and Prevents Neointima Formation**

**Background:** We previously described the anti-adhesive properties of endogenous two chain high molecular weight kininogen (HKa) and its peptide domain 5 (D5) during inflammatory cell recruitment. Since bone marrow-derived vascular progenitor cells substantially contribute to the pathogenesis of vasculoproliferative diseases, this study was aimed to evaluate the effect of HKa and D5 on the accumulation of circulating cells, the function of resident cells, and the vascular remodeling in a mouse model of femoral artery injury.

**Methods and Results:** 6 weeks after lethal irradiation and bone marrow transplantation from GFP-transgenic into C57/BL-6 background mice, the left femoral artery was dilated. Local peri-arterial application of HKa or D5 in a thermoresponsive polymer-gel to the injured artery reduced the accumulation of monocytes / macrophages (HKa:  $9.8\% \pm 1.6\%$ ; D5:  $4.7\% \pm 1.4\%$  vs. control:  $14.4\% \pm 1.6\%$ ) and prevented the accumulation of bone marrow-derived VSMC (GFP+/SMA+) in the neointima (HK:  $16.1\% \pm 4.7\%$ ; D5:  $6.6\% \pm 8.8\%$  vs. control:  $25.4\% \pm 3.4\%$ ). HKa and D5 also significantly reduced the number of proliferating (PCNA+) cells (HKa:  $7.5\% \pm 1.9\%$ ; D5:  $4.6\% \pm 1.9\%$  vs.  $11.9\% \pm 1.9\%$ ) and significantly increased the number of apoptotic neointimal VSMC (HKa:  $2.5\% \pm 2\%$ ; D5:  $4.2\% \pm 2.2\%$  vs.  $1.6\% \pm 1.3\%$ ) resulting in a significant reduction of neointimal thickening 21 days after vascular injury, (neointima/media ratio HKa:  $0.981 \pm 0.174$ ; D5:  $0.549 \pm 0.076$  vs.  $1.54 \pm 0.150$ ;  $n=6$ ;  $P<0.05$ ).

**Conclusion:** Our data indicate that HKa and D5 due to their antiadhesive properties decrease the inflammatory response, the accumulation of bone marrow-derived cells and proliferation of local neointimal cells, resulting in reduced neointima formation. Thus, these data add substantially to the understanding of the role of endogenous HKa, and therapeutic application of HKa may represent a novel approach to prevent vascular proliferative disease.

## Literaturverzeichnis

1. Velican C, Velican D. Coronary arteries in children up to the age of ten years II. Intimal thickening and its role in atherosclerotic involvement. *Med Interne*. 1976;14:17-24.
2. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791-804.
3. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, et al. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999;353:1547-1557.
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.
5. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419-420.
6. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
7. Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*. 2000;12:435-445.
8. Thubrikar MJ, Robicsek F. Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg*. 1995;59:1594-1603.
9. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, et al. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;84:489-497.
10. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973;180:1332-1339.
11. Luscher TF. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension? *Am J Hypertens*. 1990;3:317-330.

12. Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1510-1520.
13. Saiura A, Sata M, Hirata Y, et al. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med.* 2001;7:382-383.
14. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, et al. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996;93:2178-2187.
15. Religa P, Bojakowski K, Maksymowicz M, et al. Smooth-muscle progenitor cells of bone marrow origin contribute to the development of neointimal thickenings in rat aortic allografts and injured rat carotid arteries. *Transplantation.* 2002;74:1310-1315.
16. Reusch P, Wagdy H, Reusch R, et al. Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1996;79:1046-1053.
17. Campbell JH, Han CL, Campbell GR. Neointimal formation by circulating bone marrow cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:18-24; 24-15.
18. Fuster V, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation.* 1994;90:2126-2146.
19. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994;330:1431-1438.
20. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:972-978.
21. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 2003;12:70-88.
22. Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, et al. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation.* 2001;103:993-999.

23. Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, et al. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:684-691.
24. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, et al. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation.* 1999;100:230-235.
25. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1997;336:973-979.
26. Girolami B, Bernardi E, Prins MH, et al. Antithrombotic drugs in the primary medical management of intermittent claudication: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 1999;81:715-722.
27. Zhao L, Bath P, Heptinstall S. Effects of combining three different antiplatelet agents on platelets and leukocytes in whole blood in vitro. *Br J Pharmacol.* 2001;134:353-358.
28. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med.* 1994;331:489-495.
29. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1769-1776.
30. Libby P, Schwartz D, Brogi E, et al. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation.* 1992;86:III47-52.
31. Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, et al. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol.* 1991;17:758-769.
32. Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest.* 1975;32:339-351.

33. Schober A, Hoffmann R, Oprea N, et al. Peripheral CD34+ cells and the risk of in-stent restenosis in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol.* 2005;96:1116-1122.
34. Schober A, Weber C. Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:1249-1257.
35. Shi Y, O'Brien JE, Fard A, et al. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation.* 1996;94:1655-1664.
36. Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med.* 2002;8:403-409.
37. Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, et al. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;107:1411-1422.
38. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, et al. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation.* 2002;106:1199-1204.
39. Yurugi-Kobayashi T, Itoh H, Yamashita J, et al. Effective contribution of transplanted vascular progenitor cells derived from embryonic stem cells to adult neovascularization in proper differentiation stage. *Blood.* 2003;101:2675-2678.
40. Sata M. Molecular strategies to treat vascular diseases: circulating vascular progenitor cell as a potential target for prophylactic treatment of atherosclerosis. *Circ J.* 2003;67:983-991.
41. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, et al. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987;316:1371-1375.
42. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239-257.
43. Kearney M, Pieczek A, Haley L, et al. Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation.* 1997;95:1998-2002.
44. Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, et al. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial

- angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12:616-623.
45. Serruys PW, Luijten HE, Beatt KJ, et al. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circulation.* 1988;77:361-371.
46. Kuntz RE, Baim DS. Prevention of coronary restenosis: the evolving evidence base for radiation therapy. *Circulation* 2000;101:2130-2133.
47. Mangi AA, Dzau VJ. Gene therapy for human bypass grafts. *Ann Med.* 2001;33:153-155.
48. Mangi AA, Dzau VJ. Gene therapy for human bypass grafts. *Ann Med.* 2001;33:153-155.
49. Ohno T, Gordon D, San H, et al. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science.* 1994;265:781-784.
50. Castellot JJ, Jr., Addonizio ML, Rosenberg R, et al. Cultured endothelial cells produce a heparinlike inhibitor of smooth muscle cell growth. *J Cell Biol.* 1981;90:372-379.
51. Horvath C, Welt FG, Nedelman M, et al. Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted. *Circ Res.* 2002;90:488-494.
52. Pepine CJ, Hirshfeld JW, Macdonald RG, et al. A controlled trial of corticosteroids to prevent restenosis after coronary angioplasty. M-HEART Group. *Circulation.* 1990;81:1753-1761.
53. New G, Moses JW, Roubin GS, et al. Estrogen-eluting, phosphorylcholine-coated stent implantation is associated with reduced neointimal formation but no delay in vascular repair in a porcine coronary model. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2002;57:266-271.
54. Abizaid A, Albertal M, Costa MA, et al. First human experience with the 17-beta-estradiol-eluting stent: the Estrogen And Stents To Eliminate Restenosis (EASTER) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1118-1121.

55. von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:1137-1141.
56. Inoue M, Itoh H, Ueda M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. 1998;98:2108-2116.
57. Shibata M, Suzuki H, Nakatani M, et al. The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation. *Histochem Cell Biol*. 2001;116:471-481.
58. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999;99:2164-2170.
59. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, et al. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *N Engl J Med*. 1997;336:1697-1703.
60. Ruef J, Meshel AS, Hu Z, et al. Flavopiridol inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation In vivo after carotid injury in the rat. *Circulation*. 1999;100:659-665.
61. Brooks EE, Gray NS, Joly A, et al. CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation. *J Biol Chem*. 1997;272:29207-29211.
62. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med*. 2002;346:1773-1780.
63. Park SJ, Shim WH, Ho DS, et al. A paclitaxel-eluting stent for the prevention of coronary restenosis. *N Engl J Med*. 2003;348:1537-1545.
64. Axel DI, Kunert W, Goggelmann C, et al. Paclitaxel inhibits arterial smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and in vivo using local drug delivery. *Circulation*. 1997;96:636-645.

65. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, et al. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med.* 1998;339:1665-1671.
66. Costa MA, Sabat M, van der Giessen WJ, et al. Late coronary occlusion after intracoronary brachytherapy. *Circulation.* 1999;100:789-792.
67. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet.* 1999;354:1493-1498.
68. Kutryk MJ, Foley DP, van den Brand M, et al. Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized investigation by the Thoraxcenter of antisense DNA using local delivery and IVUS after coronary stenting (ITALICS) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:281-287.
69. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet.* 1999;354:1493-1498.
70. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003;349:1315-1323.
71. Sousa JE, Costa MA, Abizaid A, et al. Four-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up of patients treated with sirolimus-eluting stents. *Circulation.* 2005;111:2326-2329.
72. Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation.* 2005;111:2257-2273.
73. Jeremias A, Sylvia B, Bridges J, et al. Stent thrombosis after successful sirolimus-eluting stent implantation. *Circulation.* 2004;109:1930-1932.

74. Tanaka K, Sata M, Hirata Y, et al. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res.* 2003;93:783-790.
75. Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med.* 2003;13:249-253.
76. Weisel JW, Nagaswami C, Woodhead JL, et al. The shape of high molecular weight kininogen. Organization into structural domains, changes with activation, and interactions with prekallikrein, as determined by electron microscopy. *J Biol Chem.* 1994;269:10100-10106.
77. Schmaier AH, Smith PM, Purdon AD, et al. High molecular weight kininogen: localization in the unstimulated and activated platelet and activation by a platelet calpain(s). *Blood.* 1986;67:119-130.
78. Waldmann R, Abraham JP, Rebuck JW, et al. Fitzgerald factor: a hitherto unrecognized coagulation factor. *Lancet.* 1975;1:949-951.
79. Kaschina E, Stoll M, Sommerfeld M, et al. Genetic kininogen deficiency contributes to aortic aneurysm formation but not to atherosclerosis. *Physiol Genomics.* 2004;19:41-49.
80. Nishikawa K, Shibayama Y, Kuna P, et al. Generation of vasoactive peptide bradykinin from human umbilical vein endothelium-bound high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *Blood.* 1992;80:1980-1988.
81. Asakura S, Hurley RW, Skorstengaard K, et al. Inhibition of cell adhesion by high molecular weight kininogen. *J Cell Biol.* 1992;116:465-476.
82. Chavakis T, Kanse SM, Pixley RA, et al. Regulation of leukocyte recruitment by polypeptides derived from high molecular weight kininogen. *Faseb J.* 2001;15:2365-2376.
83. Chavakis T, Kanse SM, Lupu F, et al. Different mechanisms define the antiadhesive function of high molecular weight kininogen in integrin- and urokinase receptor-dependent interactions. *Blood.* 2000;96:514-522.

84. Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S, et al. Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest.* 1997;100:1481-1487.
85. Chavakis T, Santoso S, Clemetson KJ, et al. High molecular weight kininogen regulates platelet-leukocyte interactions by bridging Mac-1 and glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 2003;278:45375-45381.
86. Simon DI, Dhen Z, Seifert P, et al. Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *J Clin Invest.* 2000;105:293-300.
87. Wachtfogel YT, DeLa Cadena RA, Kunapuli SP, et al. High molecular weight kininogen binds to Mac-1 on neutrophils by its heavy chain (domain 3) and its light chain (domain 5). *J Biol Chem.* 1994;269:19307-19312.
88. Cao DJ, Guo YL, Colman RW. Urokinase-type plasminogen activator receptor is involved in mediating the apoptotic effect of cleaved high molecular weight kininogen in human endothelial cells. *Circ Res.* 2004;94:1227-1234.
89. Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:621-628.
90. Guo YL, Wang S, Cao DJ, et al. Apoptotic effect of cleaved high molecular weight kininogen is regulated by extracellular matrix proteins. *J Cell Biochem.* 2003;89:622-632.
91. Colman RW, Jameson BA, Lin Y, et al. Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatins) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood.* 2000;95:543-550.
92. Al-Fakhri N, Chavakis T, Schmidt-Woll T, et al. Induction of apoptosis in vascular cells by plasminogen activator inhibitor-1 and high molecular weight kininogen correlates with their anti-adhesive properties. *Biol Chem.* 2003;384:423-435.

93. Guo YL, Wang S, Colman RW. Kininostatin, an angiogenic inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1427-1433.
94. Preissner KT, May AE, Wohn KD, et al. Molecular crosstalk between adhesion receptors and proteolytic cascades in vascular remodelling. *Thromb Haemost.* 1997;78:88-95.
95. May AE, Kanse SM, Lund LR, et al. Urokinase receptor (CD87) regulates leukocyte recruitment via beta 2 integrins in vivo. *J Exp Med.* 1998;188:1029-1037.
96. Zeiffer U, Schober A, Lietz M, et al. Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by P-selectin and chemokines. *Circ Res.* 2004;94:776-784.
97. Lupu F, Bergonzelli GE, Heim DA, et al. Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1090-1100.
98. Sheng N, Fairbanks MB, Henrikson RL, et al. Cleaved high molecular weight kininogen binds directly to the integrin CD11b/CD18 (Mac-1) and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Blood.* 2000;95:3788-3795.
99. Sousa JE, Costa MA, Tuzcu EM, et al. New frontiers in interventional cardiology. *Circulation* 2005;111:671-681.
100. Sata M, Maejima Y, Adachi F, et al. A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2097-2104.
101. Rogers C, Parikh S, Seifert P, et al. Endogenous cell seeding. Remnant endothelium after stenting enhances vascular repair. *Circulation.* 1996;94:2909-2914.
102. Heublein B, Rohde R, Kaese V, et al. Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology? *Heart.* 2003;89:651-656.

103. Tamai H, Igaki K, Kyo E, et al. Initial and 6-month results of biodegradable poly-l-lactic acid coronary stents in humans. *Circulation*. 2000;102:399-404.
104. Finkelstein A, McClean D, Kar S, et al. Local drug delivery via a coronary stent with programmable release pharmacokinetics. *Circulation*. 2003;107:777-784.
105. Sousa JE, Serruys PW, Costa MA. New frontiers in cardiology: drug-eluting stents: Part I. *Circulation*. 2003;107:2274-2279.
106. Asakura S, Yang W, Sottile J, et al. Opposing effects of low and high molecular weight kininogens on cell adhesion. *J Biochem (Tokyo)* 1998;124:473-484.
107. Hillebrands JL, Klatter FA, Rozing J. Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:380-387.
108. Sedding DG, Braun-Dullaeus RC. Caveolin-1: dual role for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16:50-55.
109. Sedding DG, Hermsen J, Seay U, et al. Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo. *Circ Res*. 2005;96:635-642.
110. Braun-Dullaeus RC, Mann MJ, Sedding DG, et al. Cell cycle-dependent regulation of smooth muscle cell activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:845-850.
111. Wertz IE, Hanley MR. Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trends Biochem Sci*. 1996;21:359-364.
112. Cai L, Hales BF, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod*. 1997;56:1490-1497.
113. Fukai F, Mashimo M, Akiyama K, et al. Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide. *Exp Cell Res*. 1998;242:92-99.
114. Buckley CD, Pilling D, Henriquez NV, et al. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature*. 1999;397:534-539.

115. Frisch SM, Screaton RA. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:555-562.
116. Zhang JC, Claffey K, Sakthivel R, et al. Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *Faseb J.* 2000;14:2589-2600.
117. Xu LH, Owens LV, Sturge GC, et al. Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ.* 1996;7:413-418.
118. Isner JM, Kearney M, Bortman S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation.* 1995;91:2703-2711.
119. Badorff C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation.* 2003;107:1024-1032.
120. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth- muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat Med.* 2001;7:738-741.
121. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76:301-314.
122. Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, et al. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest.* 1989;83:2008-2017.
123. Rebeck JW. The skin window as a monitor of leukocytic functions in contact activation factor deficiencies in man. *Am J Clin Pathol.* 1983;79:405-413.
124. Colman RW, White JV, Scovell S, et al. Kininogens are antithrombotic proteins In vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2245-2250.
125. Pollanen J, Stephens RW, Vaheri A. Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells. *Adv Cancer Res.* 1991;57:273-328.
126. Lin CQ, Bissell MJ. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *Faseb J.* 1993;7:737-743.

127. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, et al. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol.* 1996;7:330-335.
128. Kanse SM, Kost C, Wilhelm OG, et al. The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1996;224:344-353.
129. Glaser R, Lu MM, Narula N, et al. Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts. *Circulation.* 2002;106:17-19.
130. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med.* 2001;345:93-97.
131. Caplice NM, Bunch TJ, Stalboerger PG, et al. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:4754-4759.
132. Zalewski A, Shi Y, Johnson AG. Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circ Res.* 2002;91:652-655.
133. Fay WP, Parker AC, Ansari MN, et al. Vitronectin inhibits the thrombotic response to arterial injury in mice. *Blood.* 1999;93:1825-1830.
134. Colman RW. Biologic activities of the contact factors in vivo--potentiation of hypotension, inflammation, and fibrinolysis, and inhibition of cell adhesion, angiogenesis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 1999;82:1568-1577.
135. Chavakis T, Preissner KT. Potential pharmacological applications of the antithrombotic molecule high molecular weight kininogen. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003;1:59-64.

## **Erklärung**

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. H. H. Tillmanns, Leiter des Zentrums für Innere Medizin Universitätsklinikum Giessen-Marburg, Standort Giessen, danke ich für die Unterstützung und die Ermöglichung des wissenschaftlichen Arbeitens in seiner Abteilung.

Mein besonderer und ausdrücklicher Dank, gilt Herrn Dr. med. Daniel Sedding, für das interessante Thema, die herausragende Betreuung dieser Arbeit, die tolle Arbeitsatmosphäre und die persönliche Förderung.

Dr. Sedding hat uns Doktoranden immer wieder motiviert, uns auf neue Ideen gebracht und unsere Anregungen vielfach umgesetzt. Bedanken möchte ich mich auch, für die kritische Durchsicht der Arbeit und die Möglichkeit eröffnet bekommen zu haben, im Labor für Molekulare Kardiologie, unter seiner Betreuung zu arbeiten.

Herrn Prof. Dr. K. T. Preissner danke ich für die Überlassung des Kininogens und der einzelnen Kininogendomänen sowie für die weitreichende Unterstützung unserer Arbeitsgruppe bei der Bearbeitung dieses Themas.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Kardiologie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Erwähnen möchte ich hier Frau Steffi Wolfram und besonders Herrn Harald Michnaes, der zu meiner tiefsten Bedauerung bereits verstorben ist und mich sehr unterstützt hat.

Danken möchte ich auch Herrn Hermann Kachelriess und Herrn Philipp Stieger für das Korrekturlesen und die Durchsicht der Arbeit.

Am Ende möchte ich nochmals ausdrücklich meinen Eltern und Stiefeltern danken, dass sie mir das Studium und die Promotion ermöglicht und mich bei meinen Vorhaben immer begleitet haben. Sie waren mir ein großer Rückhalt.

## **Curriculum vitae**

### **Persönliche Daten**

Name: Fabian Patrick Moritz Reich  
Wohnort: Hainstraße 8  
90537 Feucht  
Geburtsdatum: 07.04.1979  
Geburtsort: Nürnberg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Religion: evangelisch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1985-1989: Grundschule Feucht  
1989-1998: Leibniz Gymnasium Altdorf

### **Zivildienst**

09/98-10/99 Zivildienst am Krankenhaus Rummelsberg

### **Abschlüsse, Examina und Studium**

06/98 Allgemeine Hochschulreife  
10/99 Examen zum staatlich geprüften  
Krankenpflegehelfer  
04/00 Beginn des Studiums der Humanmedizin an  
der Justus Liebig Universität zu Giessen  
03/02 Physikum  
03/03 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

03/05 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
05/06 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
und Approbation zum Arzt

### **Praktisches Jahr**

04/05-08/05 Abteilung für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin am Akademischen  
Lehrkrankenhaus Wetzlar-Braunfels  
08/05-12/05 Abteilung für Allgemein- und  
Unfallchirurgie am Akademischen  
Lehrkrankenhaus Wetzlar-Braunfels  
12/05-03/06 Innere Medizin an der Züricher  
Höhenklinik Wald, 8639 Wald, Schweiz

### **Famulaturen**

07/02-08/02 Abteilung für internistische Hämatologie  
und Onkologie des Klinikums Nürnberg  
Nord  
08/03 Abteilung für Kardiologie des Zentrums für  
Innere Medizin der JLU Giessen  
08/04-09/04 Abteilung für Neurologie der Charité  
Berlin, Campus Benjamin Franklin  
09/04-10/04 Orthopädie in der Praxis Dr. med. Ansgar  
Flesch, Facharzt für Orthopädie in Feucht  
bei Nürnberg

### **Arbeit**

Seit 01/07 Assistenzarzt am Klinikum Nürnberg Nord,  
Abteilung Pneumologie

## Veröffentlichungen

*High Molecular Weight Kininogen Prevents Vascular Smooth Muscle Progenitor Cell Accumulation to Sites of Vascular Injury and Prevents Neointima Formation*

Sedding D. G.\*, **Reich F. P. M.\***, Chavakis T., Preissner K. T., Tillmanns H. H.

**\*Both authors contributed equally**

*Manuskript in Vorbereitung*

*3-Deazaadenosine Prevents Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointima Formation By Interfering With Ras-Signaling*

Sedding D. G., Tröbs M., **Reich F.**, Walker G., Bohle R. M., Fink L., Tillmanns H., Langheinrich A.

*Circ. Res. – In Revision*

## Abstracts

*Kininogen hemmt die Akkumulation glattmuskulärer Progenitorzellen nach Gefäßverletzung und verhindert die Neointimabildung*

**Reich F**, Sedding D, Chavakis T, Preissner K.T., Tillmanns H.

73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-  
Herz- und Kreislaufforschung e.V.