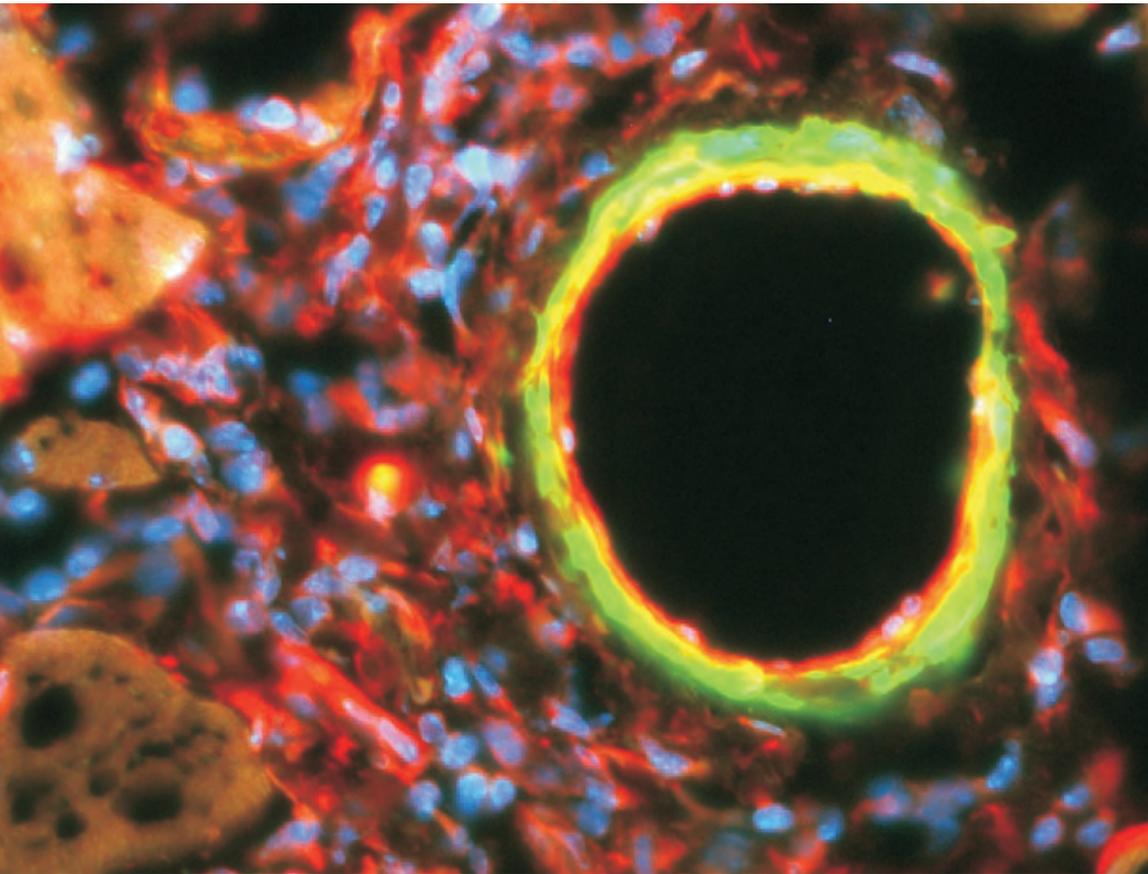


Analyse des arteriogenen Potentials des  
Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP)  
nach adenoviralem Gentransfer im  
ischämischen Maushinterlauf



SANDRA GRIMM



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Eberhard Burkhardt  
und  
dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung  
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

**Analyse des arteriogenen Potentials des  
Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP)  
nach adenoviralem Gentransfer  
im ischämischen Maushinterlauf**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**SANDRA GRIMM**  
Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

---

Gutachter:

Prof. Dr. Eberhard Burkhardt

Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

Tag der Disputation: 5. Juli 2010

***Meiner verstorbenen Kollegin Dr. med. vet. Barbara Kühnhold***



„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und 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.

Sandra Grimm

Gießen 2010

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Hintergrund .....	1
1.2	Zielsetzung .....	3
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Morphologie und Physiologie des Blutgefäßsystems.....</b>	<b>5</b>
2.1.1	Arterien und Arteriolen .....	5
2.1.2	Kapillaren .....	7
2.1.3	Venen und Venolen.....	8
<b>2.2</b>	<b>Entwicklung von Blutgefäßen.....</b>	<b>9</b>
2.2.1	Vaskulogenese.....	9
2.2.2	Angiogenese .....	11
2.2.2.1	Einflüsse und Mechanismen der Angiogenese .....	11
2.2.3	Arteriogenese .....	13
2.2.3.1	Einfluss physikalischer Kräfte auf die Arteriogenese.....	13
2.2.3.2	Molekulare und zelluläre Effekte der erhöhten Schubspannung .....	14
2.2.3.2.1	Wirkung der endothelialen Stickoxidsynthetase (eNOS) auf das Gefäßsystem.....	16
2.2.3.3	Inflammatorische Zellen stimulieren die Arteriogenese durch die Freisetzung von Zytokinen .....	19
2.2.3.4	Einfluss weiterer Wachstumsfaktoren auf die Arteriogenese .....	20
2.2.3.5	Umbau (Remodeling) der Kollateralgefäße.....	23
<b>2.3</b>	<b>Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP).....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Gentherapie – Einsatz viraler Vektoren .....</b>	<b>27</b>
2.4.1	Gentransfer mittels rekombinantem Adenovirus Typ 5.1.....	28

---

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiermodell zur Induktion einer chronischen Ischämie im Maushinterbein .....</b>	<b>31</b>
3.1.1	Material .....	32
3.1.1.1	Versuchstiere .....	32
3.1.1.2	Medikamente.....	32
3.1.2	Methoden .....	32
3.1.2.1	Narkose.....	32
3.1.2.2	Operationstechnik .....	32
3.1.2.3	Bewertung der Bewegungsaktivität.....	34
<b>3.2</b>	<b>Hämodynamische Auswertung in vivo und Bestimmung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins .....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Relative Blutflussmessung in vivo mittels Laser-Doppler-Imaging .....	34
3.2.2	Sauerstoffsättigung des Hämoglobins.....	35
<b>3.3</b>	<b>Viraler Gentransfer des Wachstumsfaktors CARP .....</b>	<b>36</b>
3.3.1	Infektion mit CARP in vitro .....	36
3.3.1.1	Proteinbiochemie .....	36
3.3.1.1.1	Bearbeitung des Probenmaterials.....	36
3.3.1.1.1.1	Material.....	36
3.3.1.1.1.2	Methode.....	37
3.3.1.1.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	37
3.3.1.1.2.1	Material.....	37
3.3.1.1.2.2	Methode.....	38
3.3.1.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
3.3.1.1.3.1	Material.....	38
3.3.1.1.3.2	Methode.....	39
3.3.1.1.4	Western Blot Verfahren.....	40
3.3.1.1.4.1	Material.....	40
3.3.1.1.4.2	Methode.....	40
3.3.1.1.5	Ponceaufärbung.....	41
3.3.1.1.5.1	Material.....	41
3.3.1.1.5.2	Methode.....	41

---

3.3.1.1.6	Immunologische Proteindetektion .....	41
3.3.1.1.6.1	Material .....	41
3.3.1.1.6.2	Methode .....	42
3.3.2	Infektion mit CARP in vivo .....	43
3.3.2.1	Material .....	43
3.3.2.2	Methode .....	43
<b>3.4</b>	<b>Gewinnung und Aufarbeitung der Adduktorenmuskulatur .....</b>	<b>44</b>
3.4.1	Perfusionsfixation .....	44
3.4.1.1	Material .....	44
3.4.1.2	Methode .....	45
3.4.2	Entnahme und Lagerung der Adduktorenmuskulatur .....	46
3.4.2.1	Material .....	46
3.4.2.2	Methode .....	46
<b>3.5</b>	<b>Morphometrische Auswertung .....</b>	<b>46</b>
3.5.1	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	46
3.5.2	Kapillarfärbung .....	47
3.5.2.1	Material .....	47
3.5.2.2	Methode .....	47
3.5.3	Auswertung der Gefäßdurchmesser und der Wanddicke .....	48
<b>3.6</b>	<b>Auswertung und Statistik .....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Infektion von HUVECs und der Adduktorenmuskulatur im Mausmodell mit Ad.5.1-CARP-GFP zur Überprüfung des adenoviralen Vektors .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Infektion der Adduktorenmuskulatur mit Ad.5.1-CARP-GFP .....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Hämodynamische Auswertung und Sauerstoffsättigung des Hämoglobins im Maushinterlauf nach Gentransfer mit Ad.5.1-CARP-GFP .....	54
4.2.2	Bewegungsaktivität der okkludierten Hintergliedmaße nach CARP- Genapplikation .....	61
4.2.3	Überprüfung des Gewichts der Gastrocnemiusmuskulatur .....	63
4.2.4	Morphometrische Auswertung der Kollateralgefäße nach CARP-GFP- Genapplikation .....	63

---

<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1</b>	<b>Ligatur der Femoralarterie im Mausmodell .....</b>	<b>66</b>
<b>5.2</b>	<b>Viraler Gentransfer .....</b>	<b>67</b>
5.2.1	Nachweis der Expression des adenoviralen Genkonstrukts in vitro und anschließende Infektion der Adduktorenmuskulatur.....	68
5.2.2	Einfluss einer vektorinduzierten Immunreaktion auf die Arteriogenese .....	70
<b>5.3</b>	<b>CARP Überexpression potenziert den Vorgang der Arteriogenese .....</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>78</b>
<b>8.1</b>	<b>Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel.....</b>	<b>78</b>
<b>8.2</b>	<b>Medikamente .....</b>	<b>78</b>
<b>8.3</b>	<b>Operationszubehör .....</b>	<b>78</b>
<b>8.4</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>79</b>
<b>8.5</b>	<b>Hämodynamik und Sauerstoffsättigung .....</b>	<b>79</b>
<b>8.6</b>	<b>Laborzubehör .....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>82</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>88</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Hintergrund

Die koronare Herzerkrankung, die zum einen durch eine Stenose und zum anderen durch eine Okklusion der Koronararterien gekennzeichnet ist, gehört in den Industriestaaten zu den typischen Herzerkrankungen mit häufiger Todesfolge<sup>1</sup>. Hierbei kommt es pathophysiologisch gesehen durch eine arteriosklerotische oder atherosklerotische Veränderung der Koronararterien entweder zu einer akuten oder langsam eintretenden Stenose, die zu einer Verschlechterung der Gewebsperfusion bis hin zu einer Ischämie des Herzmuskels führt. Schließlich kann das Auftreten einer Thrombembolie zu einer Koronararterienokklusion führen. Diese kardiovaskuläre Erkrankung kann in einem akuten und rezidivierenden Myokardinfarkt (AMI), einer Angina pectoris oder einer Herzinsuffizienz resultieren.

Allein in Deutschland erleiden täglich laut der Deutschen Herzstiftung (2007) durchschnittlich 745 Menschen einen Herzinfarkt. Dank der weitreichenden Präventivmaßnahmen und des Fortschritts der medizinischen Technik konnte sogar in den vergangenen Jahren ein Rückgang der Mortalität innerhalb der ersten 24 Stunden verzeichnet werden (Abb. 1.1)<sup>2</sup>.

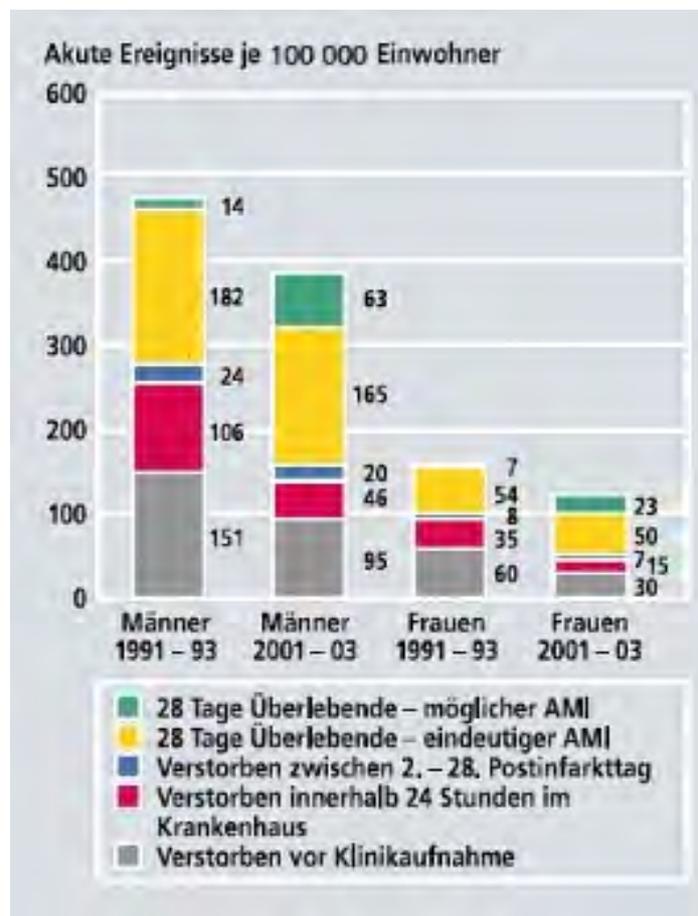


Abb. 1.1:

Altersstandardisierte Morbidität an akutem Myokardinfarkt (AMI; tödliche und nichttödliche AMI inklusive koronare Todesfälle) je 100.000 Einwohner nach Geschlecht und Versorgungsstadium; Alter 25 – 74 Jahre. MONICA/KORA – Herzinfarktregister 1991–1993 und 2001–2003<sup>2</sup>.

Nach den veröffentlichten Angaben des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden starben 148.641 Personen im Jahr 2005 an einer ischämischen Herzerkrankung. Dies entspricht 17,9 % aller registrierten Todesfälle. Im Jahr 2007 waren dagegen 16,3 % aller Verstorbenen von einer ischämischen Herzerkrankung betroffen. Die chronische ischämische Herzkrankheit und der akute Myokardinfarkt sind damit die beiden häufigsten Todesursachen in Deutschland<sup>3</sup>. Auch in den USA leiden rund 79 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen. Der chronische Bluthochdruck stellt hierbei den essentiellsten Risikofaktor dar, der allein 72 Millionen Personen betrifft, gefolgt von der koronaren Herzerkrankung mit 15,8 Millionen Patienten. Dabei entfallen 52 % der an einer kardiovaskulären Erkrankung registrierten Todesfälle in den USA auf die koronare Herzkrankheit<sup>4</sup>.

Sowohl in Deutschland als auch in den USA steigt die Prävalenz für die koronare Herzerkrankung ab dem 65. Lebensjahr deutlich an. Dies begründet die Annahme, dass mit zunehmend älter werdender Gesellschaft von einer weiter steigenden Inzidenz in naher Zukunft ausgegangen werden muss<sup>3, 4</sup>. Auf globale Sicht wird mit einer noch viel höheren Inzidenz zu rechnen sein, da sich die traditionellen Lebensgewohnheiten asiatischer, osteuropäischer, südafrikanischer und südamerikanischer Länder dem westlichen Lebensstil mehr und mehr anpassen<sup>5</sup>.

Verantwortlich für das häufige Auftreten einer kardiovaskulären Stenose oder Okklusion ist die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des Gefäßsystems. Bis heute können Gefäßstenosen ausschließlich invasiv behandelt werden, wie durch das Öffnen der Gefäßverschlüsse (Perkutane Transluminale Revaskularisation oder Thrombolyse) beziehungsweise durch die Schaffung von Umgehungskreisläufen (Gefäßtransplantation, Bypassoperation)<sup>6</sup>. Der langfristige Erfolg wird jedoch durch häufig auftretende Gefäßrestenotisierung oder Thromboisierung begrenzt. Zudem gibt es Patienten mit Herz-Kreislaufenerkrankungen, die nicht mittels der genannten chirurgischen Verfahren therapiert werden können<sup>6, 7</sup>.

Schon seit langem ist bekannt, dass der Organismus potentiell die Fähigkeit besitzt, natürliche Bypässe durch den Umbau so genannter Kollateralgefäße auszubilden<sup>8</sup>. So bleiben im Extremfall bestehende Koronarverschlüsse bei einigen Patienten kardiologisch völlig unauffällig und werden erst nach ihrem Tode eher zufällig z. B. im Rahmen einer Autopsie entdeckt<sup>9</sup>. Voraussetzung für die Ausbildung der präexistenten Kollateralen ist, dass sich der Verschluss des zu umgehenden Gefäßes langsam entwickelt und damit genügend Zeit für das Wachstum der

Kollateralen gegeben ist. Bei den meisten Patienten entwickelt sich die Stenose jedoch schneller als das Wachstum der Kollateralgefäße, so dass sich ein Infarkt bildet<sup>8,9</sup>.

In klinischen Studien fand man heraus, dass Patienten, die aufgrund eines Gefäßverschlusses gut ausgebildete Kollateralgefäße entwickelten, in der angiographischen Darstellung in vivo weniger Beschwerden nach durchgeführter Ballondilatation zeigten als Patienten, bei denen kein Kollateralgefäßwachstum um die Okklusionsstelle festgestellt werden konnte. Generell vermindert das Vorhandensein von Kollateralgefäßen die Gefahr von links-ventrikulären Aneurysmen nach akuter Koronarokklusion mit der Folge, dass die Überlebensrate nach myokardialer Infarzierung deutlich steigt<sup>10, 11</sup>. Dies unterstreicht klar die Notwendigkeit für neue Therapieansätze und deren erfolversprechendes Potential im Bereich der Arteriogenese.

## **1.2 Zielsetzung**

Unter Anwendung eines intramuskulären Gentransfers sollte das potentiell arteriogene Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP) auf seine Fähigkeit hin, das Kollateralgefäßwachstum positiv zu beeinflussen, untersucht werden. Hierzu war eine adenovirale Infektion der Adduktorenmuskulatur im ischämischen Maushinterlaufmodell im Bereich der präformierten Kollateralgefäße vorgesehen. Das Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP) war an einen adenoviralen Vektor gebunden. Zusätzlich zum CARP sollte der adenovirale Vektor auch noch das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren, welches über den gleichen Promotor gestartet werden sollte wie auch das CARP-Gen (Ad.5.1-CARP-GFP).

Das CARP ist ein Transkriptions-Kofaktor und wird als eines der frühen Faktoren im Prozess der Arteriogenese hochreguliert. In vitro führt die Überexpression von CARP zu einer gesteigerten Expression des Akutphasegens „immediately early gene response-1“ (Egr-1), ein Transkriptionsfaktor, der zu den DNA-bindenden Zinkfinger-Proteinen gehört und somit ein frühes Aktivierungsgen darstellt. Egr-1 reguliert die Expression vieler Gene, welche in inflammatorische Prozesse involviert sind und die Arteriogenese stimulieren.

Um einen eventuellen immunvermittelten Einfluss auf die Arteriogenese nach erfolgreicher Infektion der Adduktorenmuskulatur mit dem adenoviralen Vektor Ad.5.1-CARP-GFP auszuschließen, sollte eine Kontrollgruppe mit vektorgebundenem grün fluoreszierendem Protein (Ad.5.1-GFP) behandelt werden. Eine zweite Kontrollgruppe sollte die gleiche Volumenmenge an steriler NaCl-Lösung intramuskulär injiziert erhalten wie die beiden Gruppen, die die Infektion mit adenoviralem Vektor erfahren haben. Auf diese Weise sollte eine mögliche Wirkung, verursacht durch eine Muskeltraumatisierung aufgrund der großen Volumina, auf die Arteriogenese untersucht werden. Die dritte Kontrollgruppe sollte ausschließlich mit der Okklusion der Femoralarterie behandelt werden, um eine objektive Aussage zu den beiden anderen Kontrollreihen und zur CARP-Gruppe treffen zu können.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Morphologie und Physiologie des Blutgefäßsystems**

Das Herz-Kreislaufsystem stellt bei allen höher entwickelten Tieren und beim Menschen ein schnell regulierbares Transportsystem dar, welches aus dem Herzen, als dessen zentralem Organ, und den Blutgefäßen – den Arterien, den Arteriolen, den Kapillaren, den Venolen und den Venen – besteht. Das Herz-Kreislaufsystem übernimmt den Transport der Atemgase O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> sowie die Versorgung des Gesamtorganismus mit Nährstoffen und den Abtransport der Metaboliten. Außerdem reguliert das System den Wasser- und Elektrolythaushalt aber auch die Beförderung von Hormonen, Enzymen und Stoffen des Immunsystems sowie die der Blutzellen<sup>12</sup>.

Die Morphologie von Arterien und Venen basiert auf einem gemeinsamen Grundbauplan. In der Fachliteratur wird zwischen der Tunica interna (Intima), der Tunica media (Media) und der Tunica externa (Adventitia) unterschieden.

Die Tunica interna bildet die innere Wandung der Gefäße. Diese Schicht wird luminal in das Endothel, welches von einer Basalmembran umgeben wird, das bindegewebige Stratum subendotheliale und eine Membrana elastica interna unterteilt. Die Tunica media ist gekennzeichnet durch mehrere Schichten glatter Muskelzellen, in die in unterschiedlicher Zahl und Dichte elastische und kollagene Fasern eingelagert sind. Die Tunica externa besteht aus fibroelastischem Kollagen, das einen spiralg angeordneten Faserverlauf zeigt und somit eine lockere Verbindung des Gefäßes mit dem Nachbargewebe bildet<sup>13, 14</sup>.

Als Korrektiv zum wesentlich höheren Blutdruck im arteriellen Kreislauf sind die Gefäßwände der Arterien im Vergleich zu denen der Venen deutlich stärker ausgebildet.

#### **2.1.1 Arterien und Arteriolen**

Arterien sind Leitungsgefäße, die immer vom Herzen wegführen. Vom rechten Ventrikel des Herzens ausgehend leitet die Pulmonalarterie das sauerstoffarme Blut zum Austausch von CO<sub>2</sub> gegen O<sub>2</sub> in den kleinen Kreislauf bzw. Lungenkreislauf, um dann das sauerstoffreiche Blut über die Pulmonalvene zurück zum linken Herzen zu transportieren. Das vom linken Ventrikel des Herzens über die Aorta ausgetriebene sauerstoff- und nährstoffreiche Blut wird sodann über zahlreiche Arterien und

Arteriolen in die peripher gelegenen Organe und Gewebe befördert. In den entsprechenden Organ- und Gewebeteilen verästeln sich die Gefäße zunehmend, so dass schließlich die Anzahl an Arterien bei sukzessiv kleiner werdendem Durchmesser ständig zunimmt. Aus den kleinsten arteriellen Gefäßen, den Arteriolen, gehen dann unter weiterer Aufzweigung in eng vernetzte Endstrombahnen die Kapillaren ab. Da das Blut vom Herzmuskel pulsatorisch ausgestoßen wird, besteht eine wichtige Funktion der herznahen Gefäße darin, den Blutfluss in eine zunehmend kontinuierliche Strömung umzuwandeln. Dieses Phänomen bezeichnet man als Windkesselfunktion. Die peripher gelegenen Arterien erhalten den intravasalen Druck aufrecht. Diese beiden funktionellen Unterschiede spiegeln sich auch morphologisch wieder. Die herznahen Gefäße stellen Arterien vom elastischen Typ und die peripher gelegenen Arterien vom muskulären Typ dar. Den muskulären Typ kennzeichnet eine deutlich ausgeprägte, zirkulär bis leicht spiralig verlaufende glatte Muskelzellschicht in der Tunica media, während die Arterien vom elastischen Typ meist aus gefensterten elastischen Fasernetzen aufgebaut sind, zwischen denen kurze, verzweigte Muskelzellen ausgespannt sind. Diese werden auch als Spannmuskeln bezeichnet und sind für den Spannungsgrad des elastischen Gerüstwerks verantwortlich<sup>13, 14</sup>.

Die Arteriolen sind in ein bis drei Lagen die kleinsten noch mit glatter Muskulatur ausgestatteten Gefäße des arteriellen Hochdrucksystems. Sie gehören zu den so genannten Widerstandsgefäßen. Durch ihre Fähigkeit zur Vasokonstriktion und Vasodilatation variieren sie den peripheren arteriellen Blutdruck und regulieren zusammen mit den präkapillären Sphinkteren den Blutdurchfluss des Kapillargebiets.

### 2.1.2 Kapillaren

Die Blutkapillaren bilden ein fein verzweigtes und stoffwechselaktives Netz, das zwischen den kleinsten Arteriolen sowie den postkapillären Venolen ausgebildet ist (Abb. 2.1). Sie sind quantitativ und funktionell von Bedeutung.

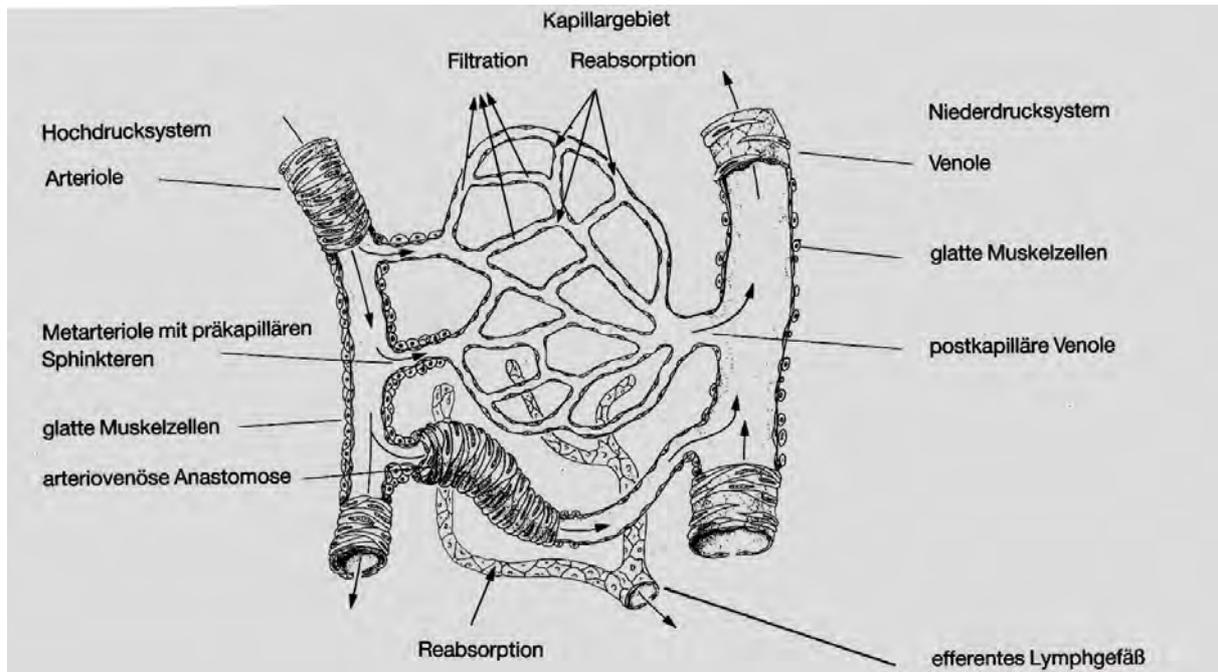


Abb. 2.1: Die Kapillaren bilden das stoffwechselaktive Netzwerk zwischen Arteriolen und Venolen (Quelle: Liebich H.-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. 5. Auflage, Stuttgart, New York: Schattauer 2009; mit freundlicher Genehmigung des Schattauer Verlags)<sup>14</sup>.

Die Kapillaren bestehen aus einem einschichtigen Endothel, welches auf einer intakten oder unterbrochenen Basalmembran liegt. Zum Teil werden die Kapillaren von Perizyten umgeben, welche als undifferenzierte Mesenchymzellen einen hohen Grad an funktioneller Transformationsfähigkeit aufweisen. Physiologisch gesehen lässt die dünne Wandung der Kapillaren die Blutzellen und das Blutplasma zusammen mit sämtlichen Nährstoffen und Stoffwechselprodukten in den interstitiellen Raum übertreten.

Es werden drei Kapillartypen (Abb. 2.2) in Abhängigkeit zur Funktion verschiedener Gewebe und Organe differenziert. Die häufigste auftretende Form der Kapillaren ist die geschlossene Kapillare. Sie weist eine dicke geschlossene Endothelzellschicht mit intakter Basalmembran auf. Der transepitheliale Stoffaustausch ist bei diesem

Kapillartyp erschwert, wie z. B. in den Gehirn- und Muskelkapillaren. In anderen Organen und Geweben ist die Endothelauskleidung der Kapillaren dünner und unvollständig, da sie in großer Zahl intrazelluläre Poren, die so genannten Fenestrationsen, besitzen. Diese mit einem feinen Diaphragma versehen siebartigen Öffnungen haben einen Durchmesser von 70 bis 100 nm und werden als gefenesterte Kapillare bezeichnet. Sie treten z. B. im Kapillarnetz des Magen-Darm-Traktes auf. Eine dritte Form von Kapillaren ermöglicht einen beschleunigten Stoffaustausch aufgrund eines lockeren Endothelverbandes mit interzellulären Spalten und einer zumeist unterbrochenen oder ganz fehlenden Basalmembran. Diese offenen Kapillaren mit diskontinuierlichem Endothel werden auch als sinusoide Kapillaren charakterisiert und treten beispielsweise in Leber, Milz und Knochenmark auf<sup>13, 14</sup>.

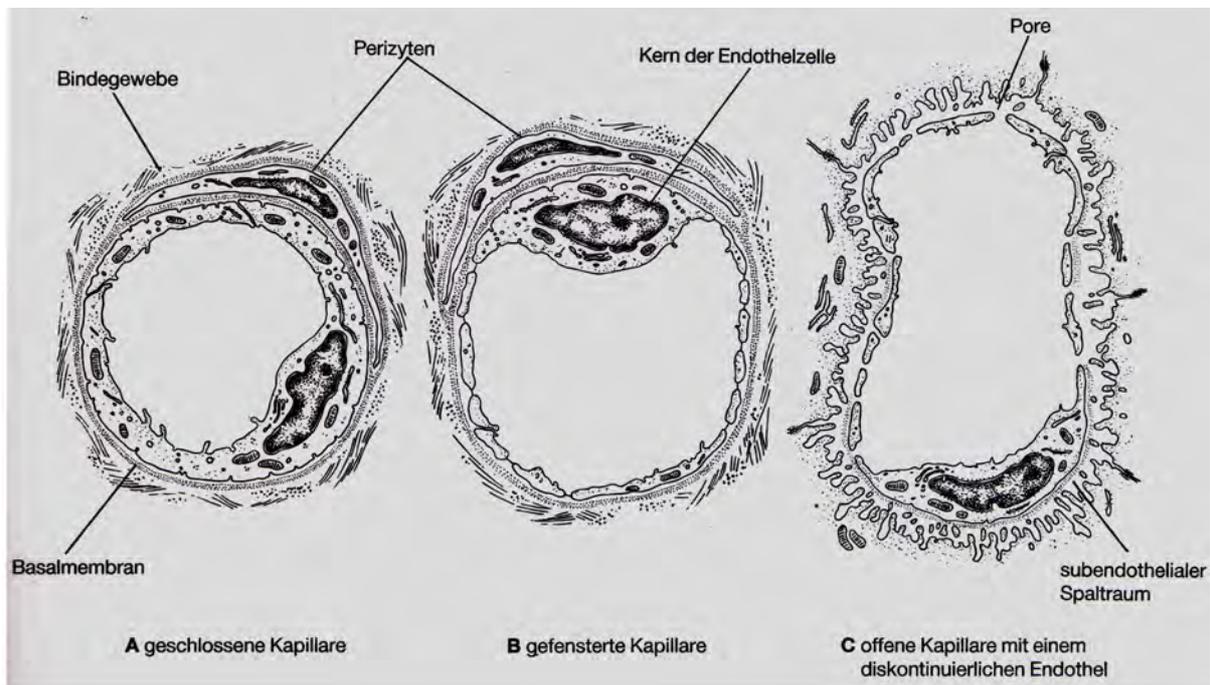


Abb. 2.2: Die Zeichnungen A – C zeigen den schematischen Aufbau von Kapillargefäßen (Quelle: Liebich H.-G. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. 5. Auflage, Stuttgart, New York: Schattauer 2009; mit freundlicher Genehmigung des Schattauer Verlags)<sup>14</sup>.

### 2.1.3 Venen und Venolen

Die Venen führen das sauerstoffarme Blut wieder zurück zum Herz und werden zusammen mit den Venolen dem Niederdrucksystem zugeordnet. Funktionell dient das venöse System außerdem der Blutspeicherung. Nahezu 85 % des gesamten

Blutvolumens zirkuliert im Niederdrucksystem. Dies wird durch eine im Vergleich zum arteriellen System vielfach größere passive Dehnungsfähigkeit (Compliance) der Gefäßwand infolge einer Blutvolumenzunahme ermöglicht. Die Muskelzellschicht der Tunica media ist dünnwandiger und stärker mit kollagenen und elastischen Fasern durchsetzt. Die Tunica externa stellt ein bindegewebiges Netz zum Nachbargewebe her. Insbesondere im Bereich der Skelettmuskulatur unterstützt die Muskelkontraktion das Niederdrucksystem aktiv beim Rücktransport des Blutes. Als Besonderheit der Venen sind die von der Tunica interna ausgebildeten Venenklappen zu erwähnen. Sie sind in regelmäßigen Abständen angeordnet und verhindern eine Strömungsumkehr des Blutflusses<sup>12-14</sup>.

## **2.2 Entwicklung von Blutgefäßen**

Die neue Ausbildung von Blutgefäßen ist bei einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen, wie beispielsweise der Embryogenese, dem weiblichen Reproduktionszyklus, der Wundheilung, dem Tumorwachstum und der Tumormetastasierung sowie der Revaskularisation ischämischer Gewebe, von essentieller Bedeutung. Die Gefäßbildung läuft nach verschiedenen Mechanismen ab, weshalb drei unterschiedliche Typen des Gefäßwachstums differenziert werden: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese<sup>15</sup>.

### **2.2.1 Vaskulogenese**

Der Terminus Vaskulogenese beschreibt die de novo-Entstehung eines primitiven Gefäßplexus während der Embryogenese. Hierbei differenzieren sich zunächst Mesenchymzellen des Dottersacks in so genannte Hämangioblasten, die sich zu Zellaggregaten, den Blutinseln, zusammenlagern (Abb. 2.3.A - D). Die innere Zellpopulation dieser Blutinseln entwickelt sich zu hämatopoietischen Vorläuferzellen, wobei sich die Zellen der Randregion zu endothelialen Progenitorzellen (EPCs), die man auch als Angioblasten bezeichnet, differenzieren<sup>5, 16</sup>. Die Fusion der einzelnen Blutinseln führt schließlich zur Differenzierung der Angioblasten unter Einwirkung verschiedener Wachstumsfaktoren, wie vascular endothelial growth factor (VEGF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), basic fibroblast growth factor (bFGF) und insulin-like growth factor-1 (IGF-1), zu

Endothelzellen, welche für das Auswachsen des primitiven vaskulären Netzwerks verantwortlich sind<sup>17, 18</sup>.

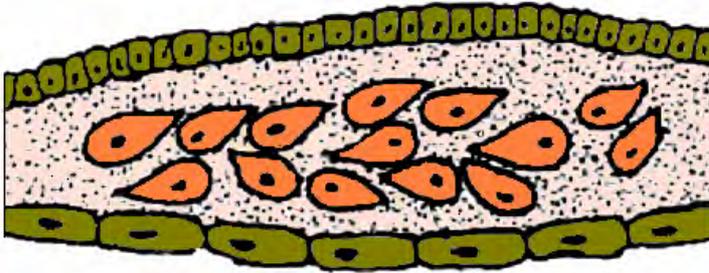


Abb. 2.3.A  
Bildung des Mesoderms.

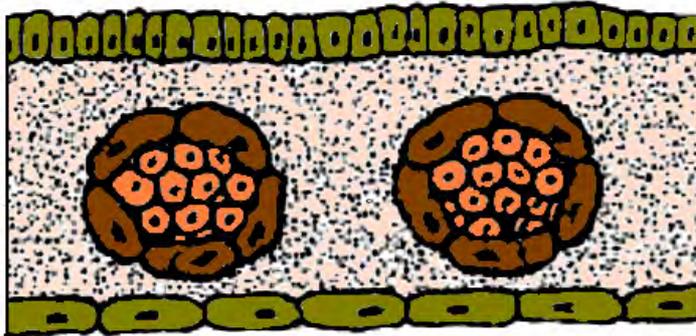


Abb. 2.3.B  
Differenzierung von Blutinseln, bestehend aus Angioblasten und haematopoietischen Vorläuferzellen.

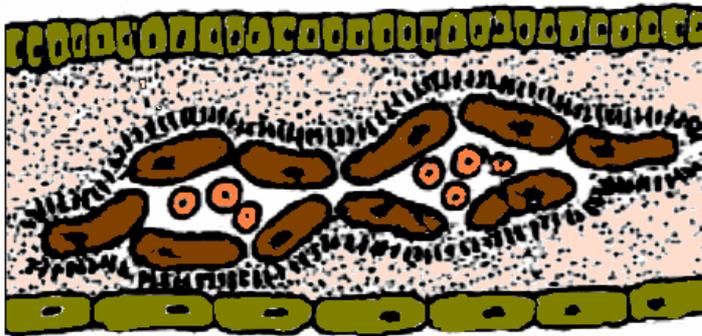


Abb. 2.3.C  
Fusion der Blutzellen und Differenzierung der Angioblasten zu Endothelzellen.

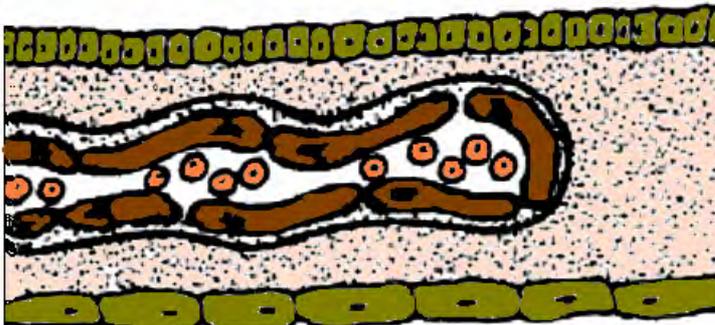


Abb. 2.3.D  
Entstehung des primären Gefäßplexus.

Abb. 2.3.A - D: Schematische Darstellung der Vaskulogenese<sup>19</sup>.

In Anlehnung an diesen während des Embryonalwachstums ablaufenden Prozess benennen einige Forschergruppen die Differenzierung von CD34-positiven, endothelialen Progenitorzellen zu Endothelzellen und die mögliche Entstehung neuer Gefäße infolge einer arteriellen Stenose als Neovaskulogenese<sup>20</sup>.

## **2.2.2 Angiogenese**

Im Gegensatz zur Vaskulogenese, die nur während der Embryonalentwicklung abläuft, kann die Angiogenese auch im adulten Organismus beobachtet werden. Die der Vaskulogenese anschließenden Wachstums- und Differenzierungsprozesse, welche zur Ausreifung des Gefäßsystems führen, werden als Angiogenese bezeichnet. Hierbei kommt es ausgehend von bestehenden Blutgefäßen zur Neubildung von Kapillaren<sup>15</sup>. Dieser Prozess ist durch endotheliale Zellmigration und Proliferation gekennzeichnet<sup>10</sup>.

Die Bezeichnung „Angiogenese“ wurde erstmals im Jahr 1935 von Hertig aufgegriffen, als er die Bildung neuer Blutgefäße in der Plazenta beschrieb<sup>21</sup>. 1971 erweiterte Folkmann den Begriff im Zusammenhang mit der Vaskularisation solider Tumore<sup>22</sup>. Der heutige Wissenstand zeigt, dass die Angiogenese nicht mehr nur ein Prozess ist, der sich der Vaskulogenese in der embryonalen Entwicklung anschließt, sondern auch im adulten Organismus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen auftritt, z. B. während der Follikulogenese, der Wundheilung, der Tumorentstehung und Tumormetastasierung, der Bildung von Retinopathien und der rheumatischen Arthritis<sup>23, 24</sup>.

Der Angiogenese liegen zwei unterschiedliche Entwicklungswege zur Bildung neuer Blutgefäße zugrunde. Die Kapillaren können entweder aus schon bestehenden Gefäßen auswachsen, was auch als Sprossung (engl.: „Sprouting“) bezeichnet wird, oder neue Gefäße entwickeln sich durch eine längsgerichtete Einstülpung der Gefäßwände, so dass aus einem Gefäß zwei neue entstehen. Dieser Vorgang wird Intussuszeption genannt.

### **2.2.2.1 Einflüsse und Mechanismen der Angiogenese**

Der initiale Impuls für die Angiogenese wird durch eine Gewebhypoxie eingeleitet. Die Hypoxie kann durch unzureichende Sauerstoffanreicherung des Blutes bei Herz-

oder Lungenversagen, durch einen Gefäßverschluss oder aber eine neoplastische Veränderung mit einer daraus resultierenden Ischämie zustande kommen<sup>25</sup>. Ebenso kann eine erhöhte Kapillarpermeabilität bei Entzündungsprozessen und immunologischen Reaktionen zur Ausbildung eines entzündlichen Ödems führen, welches eine Hypoxie des umliegenden Gewebes hervorruft<sup>26</sup>.

Das hypoxische Gewebe reagiert mit der Induktion verschiedener Mediatoren, um die Hypoxie zu kompensieren. Ein bekannter Mediator ist der Transkriptionsfaktor hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), ein heterodimeres Protein, welches aus einer HIF-1 $\alpha$  und einer HIF-1 $\beta$  Untereinheit besteht. Die HIF-1 $\beta$  Untereinheit ist immer präsent, während die Expression des HIF-1 $\alpha$  von der intrazellulären Sauerstoffkonzentration kontrolliert wird.

HIF-1 aktiviert die Transkription verschiedener Gene, wie z. B. die des Erythropoietin, von Glukosetransportern, glykolytischen Enzymen, VEGF, das den stärksten angiogenen Faktor darstellt, und weiteren Genen, deren Produkte an verschiedenen Prozessen zur Verbesserung der Sauerstoffversorgung beteiligt sind<sup>27</sup>.

Die durch die Hypoxie aktivierten Endothelzellen reagieren mit der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO), was eine Vasodilatation zur Folge hat. Zugleich wird die Expression von VEGF hochreguliert, welches wiederum die Gefäßpermeabilität, die Leukozytenadhäsion sowie die Freisetzung von Metalloproteinasen und endothelialen Vorläuferzellen erhöht<sup>28</sup>. Studien haben gezeigt, dass VEGF wiederum die endotheliale Stickoxidsynthetase (eNOS) triggert und somit die weitere NO-Freisetzung fördert<sup>17</sup>. Hierbei binden VEGF-A, -B und -C an ihre spezifischen Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. VEGFR-1 spielt vor allem bei der endothelialen Permeabilität und der Zellmigration eine wichtige Rolle, während VEGFR-2 von Endothelzellen und deren Progenitorzellen exprimiert wird und somit für deren Überleben, Proliferation und Differenzierung verantwortlich ist<sup>29</sup>. VEGFR-3 wird während der embryonalen Entwicklung in stärkerem Maße exprimiert und dient damit der Neugestaltung von Gefäßen und der Angiogenese<sup>17</sup>.

Auch Angiopoietine und deren Rezeptoren werden über Hypoxie reguliert. Die Angiopoietine sind spezifische Liganden der endothelspezifischen Tyrosinkinase Tie-2. Angiopoietin-1 (Ang-1) spielt eine wichtige Rolle bezüglich des Aufbaus von neu gebildeten Gefäßen und der Aufrechterhaltung der Gefäßfunktionalität, indem es der durch VEGF erhöhten Gefäßpermeabilität entgegenwirkt und die Gefäßstrukturen festigt<sup>16, 30</sup>, während unter dem Einfluss von Angiopoietin-2 (Ang-2) als natürlichem

Antagonisten von Ang-1 die endotheliale Sprossung weiter angetrieben wird. Ang-2 beteiligt sich an der Ablösung von glatten Muskelzellen und der Auflockerung der Extrazellulärmatrix, um so die endotheliale Zellmigration zu fördern und die inter-endothelialen Zellkontakte zu erleichtern.

Der Abbau der Extrazellulärmatrix dient nicht nur der Zellmigration, sondern auch der Freisetzung von Wachstumsfaktoren – wie z. B. bFGF, VEGF und insulin-like growth factor-1 (IGF-1), welche ansonsten innerhalb der Matrix gebunden bleiben würden. Über 20 Matrix-Metalloproteinasen beteiligen sich an der Auflösung der interzellulären Strukturen.

Schließlich führen alle diese Mediatoren in einem komplexen Zusammenspiel zur Migration der Endothelzellen in die Extrazellulärmatrix, wo sie sich zu soliden Strängen verbinden. Durch weiteres Einlagern und Ausdünnen von Endothelzellen sowie der Fusion benachbarter Gefäße bilden die Endothelstränge ein Lumen aus und wachsen in Länge und Durchmesser heran<sup>16, 17</sup>.

### **2.2.3 Arteriogenese**

Die Arteriogenese unterscheidet sich grundlegend von den ersten beiden Formen der Gefäßentwicklung. Hierbei kommt es durch Zellproliferation und Umstrukturierung zum Auswachsen präformierter Gefäße, welche als so genannte Kollateralgefäße zwischen dem arteriellen Geflecht angelegt sind. Diese arterio-arteriolaren Anastomosen haben bei Mäusen einen Durchmesser von ca. 35 µm und bestehen aus Endothelzellen, der Membrana elastica interna und ein bis zwei Lagen von glatten Muskelzellen<sup>31</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen nehmen diese Gefäße ausschließlich Einfluss auf die kapillaren Perfusionsverhältnisse. Kommt es jedoch zu einer chronischen oder akuten Okklusion einer Hauptarterie, besitzen die Kollateralen die Möglichkeit, in Länge und Durchmesser auszuwachsen und fungieren so als natürlicher Bypass<sup>23</sup>.

#### **2.2.3.1 Einfluss physikalischer Kräfte auf die Arteriogenese**

Treibende Kraft der Arteriogenese ist nicht wie bei der Angiogenese die Hypoxie, vielmehr spielt die veränderte Schubspannung (fluid shear stress = FSS) eine entscheidende Rolle. Schon seit vielen Jahren ist bekannt, dass veränderte Druckverhältnisse entweder zu einer Regression oder aber zum Wachstum eines

Gefäßes führen. Verantwortlich hierfür sind longitudinale, circumferente und radiale Druckveränderungen der Gefäßwandung<sup>25</sup>.

Die totale oder subtotale Okklusion einer Hauptarterie führt zu einem Blutdruckabfall im poststenotischen Bereich. In Folge dessen kommt es zu einer Umverteilung des Blutflusses entlang eines Druckgradienten über präexistente Kollateralgefäße. Die hierdurch plötzlich erhöhte Durchblutung sowie die erhöhte Schubspannung führen zur Aktivierung des Endothels und zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren.

Mit Hilfe der Gleichung zur Berechnung von Newtonischen Flüssigkeiten kann die

Schubspannung berechnet werden:  $\tau = \frac{4\eta Q}{\pi R^3}$ .

Die Gleichung enthält die Blutviskosität  $\eta$  und den inneren Gefäßdurchmesser  $R$ . Eine Zunahme des Blutflusses  $Q$  resultiert direkt in einer erhöhten Schubspannung<sup>32</sup>.

### 2.2.3.2 Molekulare und zelluläre Effekte der erhöhten Schubspannung

Die Aktivierung des Endothels wird durch eine erhöhte Schubspannung infolge einer Gefäßstenose ausgelöst. Dies führt zur Hochregulation verschiedenster Gene, die die Arteriogenese beeinflussen, auch wenn nicht alle diese Gene während dieses Prozesses eine Schlüsselrolle einnehmen. Als erstes reagieren die Endothelzellen nach Zunahme der Schubspannung mit einer Zellschwellung. Diese wird durch die Öffnung von Chlorid-Kanälen, die das Zellvolumen regulieren, initialisiert und verleiht den Endothelzellen ein ödematöses Aussehen<sup>33</sup>. Es wird vermutet, dass verschiedene Integrine, die extrazellulär an den Endothelzellen verankert sind, als Sensoren die erhöhte Schubspannung messen. Dieses Signal wird anschließend über das Zytoskelett in den Zellkern an ein shear stress responsive element (SSRE) übermittelt. Diverse Gene beinhalten in ihrem Promotor ein SSRE. Kommt es zur Zunahme der Schubspannung, bewirkt das SSRE im Promotor die Transkriptionsaktivität des jeweiligen Gens. Auf diese Weise wird die physikalische Kraft in eine biochemische Reaktion umgewandelt<sup>34, 35</sup>. Ein SSRE wurde bisher im Promotor 40 verschiedener Gene gefunden wie etwa in Egr-1, der endothelialen Stickoxidsynthetase (eNOS), dem platelet derived growth factor-B (PDGF-B), dem monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und dem intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)<sup>5, 33, 36</sup>.

In Bezug auf die Monozytenattraktion und -adhäsion, die eine der wichtigsten Funktionen in der Arteriogenese einnehmen, spielen MCP-1, ICAM-1 und 2 sowie die vaskulären Adhäsionsmoleküle (VCAM) eine besondere Rolle. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich Monozyten und andere Leukozyten im Blutstrom in inaktiviertem Zustand und damit nur mit einer sehr geringen Adhäsionstendenz an die Endothelzellwand. Der erste Kontakt zwischen Monozyten und dem Gefäßendothel wird als Rolling bezeichnet. Hierbei werden die Monozyten regelrecht an der Gefäßwand über die Bindung von Selektinen ausgebremst. Wie bereits oben erwähnt, führt die Zunahme der Schubspannung über ein SSRE zur Expression von MCP-1 ausgehend von den aktivierten Endothelzellen. Sie transferieren MCP-1 an die Endothelzelloberfläche, wo es an Proteoglykane gebunden präsentiert wird. MCP-1 nimmt als chemischer Lockstoff Einfluss auf die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut, indem es an den CC-Chemokin-Rezeptor 2 (CCR2) von Monozyten bindet und die Expression der Integrine LFA-1 und Mac-1 zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren wie VEGF, PIGF und TGF- $\beta$  auf diesen stimuliert<sup>37, 38</sup>. Diese Integrine gehören zu den heterodimeren Proteinen, die aus einer variablen  $\alpha$ -Kette und einer nichtvariablen  $\beta$ -Kette bestehen. Das LFA-1 Integrin ist aus einer  $\alpha_L$ -Untereinheit (CD11a) und einer  $\beta_2$ -Untereinheit (CD18) aufgebaut, das Mac-1 Integrin hingegen besteht aus einer  $\alpha_M$ -Untereinheit (CD11b) und einer  $\beta_2$ -Untereinheit (CD18). Dabei präsentiert die  $\beta_2$ -Untereinheit den leukozyten-spezifischen Teil der Integrine. Die bevorzugten korrespondierenden Adhäsionsmoleküle sind ICAM-1 und 2 sowie VCAM-1, die ebenfalls von den aktivierten Endothelzellen exprimiert werden. ICAM-1 wird zudem auch auf glatten Muskelzellen exprimiert. Schließlich führt die Bindung von Mac-1 und LFA-1 an diese korrespondierenden Bindungspartner zu einer adäquaten Adhäsion der Monozyten an die Endothelzellwand und initiieren die nachfolgende Transmigration<sup>38, 39</sup>. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion von MCP-1 oder von CCR2 zu einer nicht ausreichenden Arteriogenese in Folge beeinträchtigter Monozyteninvasion führt. Dies demonstriert die besondere Bedeutung des MCP-1-CCR2 Signalwegs für die Rekrutierung von Monozyten und das Wachstum von Kollateralgefäßen<sup>40, 41</sup>.

Egr-1 ist ein nuklearer Transkriptionsfaktor, der zur Gruppe der Zink-Fingerproteine gehört und sich hierüber an der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen

beteiligt. Die Egr-1-Expression wird von arteriolen Endothelzellen und glatten Muskelzellen während der frühen Phase der Arteriogenese hochreguliert, weshalb das Protein eines der initialen Faktoren des Kollateralgefäßwachstums darstellt. Die Transkriptionsaktivität von Egr-1 ist verantwortlich für die Induktion verschiedener Wachstumsfaktoren, wie transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und PDGF-A sowie Gewebethromboplastin (tissue factor, TF), das zur extrinsischen Gerinnung zählt<sup>39, 42</sup>.

PDGF wird in fünf Isoformen differenziert. Sie rekrutieren Perizyten und induzieren die Proliferation und die Migration von glatten Muskelzellen durch die Stimulation inflammatorischer Mediatoren und anderen Wachstumsfaktoren, welche dann in autokriner Form ihre Wirkung ausüben<sup>39, 42</sup>.

#### **2.2.3.2.1 Wirkung der endothelialen Stickoxidsynthetase (eNOS) auf das Gefäßsystem**

Die endotheliale Stickoxidsynthetase ist in den Endothelzellen der Gefäße lokalisiert und sowohl an der Angiogenese als auch an der Arteriogenese beteiligt.

Der Gefäßtonus wird maßgeblich mit Hilfe einer konstitutiven endothelialen Sezernierung von NO den entsprechenden Blutdruckbedürfnissen des Organismus angepasst. Hierbei greift NO regulatorisch in die Gefäßdilataion ein und schützt das Gefäßendothel vor Thrombozytenaggregation sowie Leukozytenadhäsion.

Die endotheliale Stickoxidsynthetase (eNOS) ist für die Bildung von NO verantwortlich. Aktiviert wird die eNOS durch veränderten FSS, welcher über die Aktivierung der Serinkinase Akt und der Proteinkinase A eine Serinphosphorylierung einleitet, die zur NO-Synthese führt<sup>43, 44</sup>. Die Produktion von NO basiert auf der Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin durch die eNOS. Schließlich diffundiert das im Endothel gebildete NO in die glatte Muskelzellschicht, wo es die Guanylatcyclase aktiviert. In einem weiteren Schritt, wandelt die Guanylatcyclase GTP zu cGMP um, welches schließlich die Vasodilatation durch eine Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration einleitet<sup>45</sup>.

Das Stickoxid nimmt eine wichtige Rolle in der Angiogenese ein und wird auch in Bezug auf das Kollateralgefäßwachstum kontrovers diskutiert. Die Angiogenese betreffend leitet die eNOS primär die erforderliche Vasodilatation ein und führt zur Proliferation und Migration von Endothelzellen<sup>46</sup>. Hierbei nimmt die eNOS zusammen

mit HIF-1 eine Schlüsselrolle ein, da beide an der Induktion von VEGF beteiligt sind. Die eNOS wirkt indirekt, indem sie die Aktivität der Proteinkinase C reduziert und so VEGF hochreguliert. Gleichzeitig triggert die Expression von VEGF wiederum die Freisetzung von NO. VEGF ist somit einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren sowohl bei der physiologischen als auch bei der pathologischen Angiogenese und spielt bei der endothelialen Permeabilität, der Zellmigration sowie der Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen eine wichtige Rolle<sup>47</sup>.

Während der Arteriogenese kommt es initial durch die Zunahme der Schubspannung nach eingetretenem Gefäßverschluss zur Hochregulation der eNOS und einer damit verbundenen zunehmenden NO-Freisetzung, die eine Vasodilatation hervorruft und den Gefäßwiderstand sowohl in den Kollateralarterien als auch in den Gefäßen im ischämischen Gebiet reduziert. Im weiteren Verlauf der Arteriogenese kommt es zur Expression von diversen Adhäsionsmolekülen, zur Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen und zur Proliferation von glatten Muskelzellen<sup>38, 43</sup>. Beide Prozesse sind elementar für die Arteriogenese, werden aber durch den Einfluss von NO minimiert. NO inhibiert die Proliferation der glatten Muskelzellen, indem es die cyclinabhängige Kinase 2 hemmt. Sie ist für den Ablauf des Zellzyklus verantwortlich<sup>48</sup> sowie für die Migration von glatten Muskelzellen, infolge reduzierter Aktivität von MMP-2 und MMP-9<sup>49</sup>. Außerdem verhindert NO die Expression von MCP-1, so dass keine Bindung von Monozyten an die Endothelzellen möglich ist<sup>50</sup>.

Diese Fakten ließen die Frage aufkommen, welche Rolle die eNOS nun tatsächlich in der Arteriogenese einnimmt. Mees et al.<sup>51</sup> untersuchten hierzu einen eNOS-überexprimierenden Mausstamm im Vergleich zu einem eNOS-defizienten Mausstamm und einem Wildtypmausstamm. In der Studie konnte belegt werden, dass der eNOS-überexprimierende Mausstamm ausschließlich bei der unmittelbar postoperativen Messung eine signifikant verbesserte Durchblutung in der distalen Gliedmaße und eine signifikant bessere Sauerstoffsättigung zeigte. Mit diesen Ergebnissen konnte bereits die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die eNOS-Überexpression initial eine signifikante Vasodilatation hervorgerufen hat, jedoch ohne positiven Einfluss auf die folgenden arteriogenen Prozesse über 21 Tage bleibt. Dies konnte ebenfalls anhand der eNOS-defizienten Mäuse belegt werden. Die Blutflussmessungen zeigte konstant über 21 Tage eine stark beeinträchtigte Durchblutung und eine deutlich reduzierte Sauerstoffsättigung. Um den Effekt der Vasokonstriktion in den eNOS-defizienten Tieren zu umgehen, wurde diesen in einer weiteren

Versuchsreihe der NO-Donor SNAP (S-Nitroso-N-Acetylpenicillamin) intraperitoneal appliziert. Dieser NO-Donor führte zu einer ausgeprägten Vasodilatation mit einer Zunahme der Durchblutung in den eNOS-defizienten Tieren. Das Ergebnis belegte, dass die eNOS-defizienten Tiere ein entsprechend gutes Wachstum der Kollateralgefäße aufweisen wie auch die Wildtyp-Gruppe, jedoch nicht zur entsprechenden Vasodilatation dieser, aufgrund der beeinträchtigten NO-Produktion, befähigt sind. Schließlich zeigte die morphometrische Auswertung in allen drei Gruppen keine Differenz im Gefäßdurchmesser, jedoch eine signifikant geringer ausgeprägte Wanddicke in den eNOS-überexprimierten Tieren – ein Beweis für die verminderte Proliferation von glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von NO<sup>51</sup>. Auch in einer eigenen bisher unveröffentlichten Studie wurde die Überexpression der eNOS mittels Gentransfer überprüft. Hierzu wurde die eNOS an einen adenoviralen Vektor gebunden und intramuskulär im Bereich der präformierten Kollateralgefäße injiziert. Die so provozierte Überexpression der eNOS nahm dabei jedoch – wie von Mees et al.<sup>51</sup> bereits veröffentlicht – keinen positiven Einfluss auf den Prozess der Arteriogenese.

Den Ergebnissen von Mees et al.<sup>51</sup> und den eigenen bisher nicht veröffentlichten Befunden stehen Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen gegenüber, die in Folge einer Hochregulation der eNOS in Kollateralgefäßen und in ischämischen Gebieten eine positive Entwicklung der Arteriogenese haben dokumentieren können<sup>52, 53</sup>. Brevetti et al.<sup>54</sup> induzierten eine schwere Ischämie durch Okklusion der Arteria iliaca externa. Nach zehntägiger Ischämie wurde eNOS intravasal mit Hilfe eines adenoviralen Genkonstrukts überexprimiert. Zur Kontrolle diente ein Adenovirus ohne Transgen und die Salzlösung PBS. Die intravasale Infektion von eNOS resultierte in einem vierfach höheren Blutfluss im Vergleich zu der mit Kontrollvirus- bzw. mit PBS-behandelter Gruppe. Die angiografische Auswertung der eNOS-infizierten Tiere zeigte eine Zunahme der Kollateralgefäßanzahl und deren Durchmesser. Die Kapillardichte wies keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf<sup>54</sup>.

Betrachtet man die Erkenntnisse von Mees et al.<sup>51</sup> und Brevetti et al.<sup>54</sup> im Kontext, geben sie Aufschluss über die unterschiedlichen pathophysiologischen Prozesse und deren molekularen Abläufe in verschiedenen Erkrankungen. So zeigen sie, dass der Einfluss von NO bei einem Gefäßverschluss ohne ausgeprägte Ischämie durch die direkte Umleitung des Blutflusses in präformierte Kollateralen keine Bedeutung für

die arteriogenen Abläufe aufweist, während eine induzierte verstärkte Freisetzung von NO bei schwerer Ischämie zu einer wesentlich verbesserten Reperfusion der Kollateralgefäße führt. Dies gibt einen Ansatz für weitere Studien vor, in denen die NO-Freisetzung in Folge von Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie oder durch den Genuss von Tabak beeinträchtigt ist und so eine dauerhafte Vasokonstriktion hervorruft. Der Erfolg einer Reperfusion ist demnach komplex zu sehen und scheint zumindest in Bezug auf die NO-Freisetzung individuelle Entscheidungen zu fordern.

### **2.2.3.3 Inflammatorische Zellen stimulieren die Arteriogenese durch die Freisetzung von Zytokinen**

Durch die Aktivierung der Endothelzellen führt der erhöhte FSS indirekt zur Invasion von Monozyten und anderen inflammatorischen Zellen, die eine große Anzahl an unterschiedlichen Zytokinen freisetzen. Monozyten, die nicht aus der Blutstrombahn in die verschiedenen Gewebe bzw. Organe immigriert sind und dort zu residenten Makrophagen werden, gehen in die Apoptose und werden eliminiert. Bei bestimmten pathologischen Bedingungen jedoch, wie zum Beispiel inflammatorischen Prozessen, werden Monozyten rekrutiert und deren Lebensdauer verlängert. Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (GM-CSF) ist zwar in erster Linie für die Proliferation, Differenzierung und Mobilisation inflammatorischer Zellen aus dem Knochenmark verantwortlich, Untersuchungen haben aber gezeigt, dass GM-CSF die Apoptoserate bei Monozyten verringern kann. Die Produktion und Freisetzung von GM-CSF erfolgt durch Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten. Außerdem wird dieses Zytokin zusammen mit ICAM-1 und MCP-1 von den durch erhöhten FSS aktivierten Endothelzellen sezerniert<sup>37, 55</sup>. Wie bereits oben erwähnt, binden die Monozyten mit ihren spezifischen Liganden LFA-1 und Mac-1 an die endothelialen Oberflächenmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 und werden so durch das Endothel in tiefere Abschnitte der Gefäßwand geleitet. Im perivaskulären Bereich der Kollateralgefäße (sonst nicht bzw. nur bei Atherosklerose) differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen, die wiederum große Mengen an Faktoren, wie MCP-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und bFGF sowie abbauende Enzyme, wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), produzieren. Diese MMPs bauen durch ihre proteolytische Aktivität die Strukturen der Gefäßwand ab und ermöglichen so weiteren Monozyten über diese geschaffenen Zwischenräume die Invasion. Außerdem wird so die Signalübertragung

in parakriner Form zwischen dem Endothel und den glatten Muskelzellen weitergeleitet<sup>32, 37</sup>.

Mastzellen bilden in der Adventitia von wachsenden Kollateralgefäßen Zellaggregate und können bis zu sechs Wochen nachgewiesen werden<sup>33</sup>. Wie die Monozyten stammen sie und ihre Vorläuferzellen aus dem Blutstrom und können über die Produktion von MMP9 ihre Zellmigration in die Gefäßwand steuern. Hier stimulieren sie durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie FGF-2 und TGF- $\beta$ , die Proliferation glatter Muskelzellen. Indirekt nehmen die Mastzellen auch Einfluss auf die Arteriogenese, indem sie chemotaktisch auf Monozyten einwirken und ihre Differenzierung zu Makrophagen durch die Freisetzung inflammatorischer Zytokine, wie MCP-1 und TNF- $\alpha$ , unterstützen. Außerdem wirken sie durch die Produktion von GM-CSF anti-apoptotisch auf Monozyten. Mastzellen können aber auch einen direkten Einfluss auf Monozyten/ Makrophagen ausüben, indem sie bei diesen die Freisetzung von Interleukinen induzieren, welche dann wiederum die Produktion von MMPs aktivieren<sup>32</sup>.

Auch Lymphozyten scheinen indirekt über die Rekrutierung von Monozyten einen positiven Effekt auf die Arteriogenese auszuüben. So konnte die Gruppe von Epstein<sup>56</sup> in Mäusen mit fehlendem CD4<sup>+</sup> T-Zell Antigen eine verminderte Reperfusion nach Okklusion der Femoralarterie beobachten. Wurden diese Mäuse mit isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen behandelt, kam es zu einer Besserung des Blutflusses und zu einer deutlich erhöhten Makrophagenakkumulation<sup>56</sup>.

#### **2.2.3.4 Einfluss weiterer Wachstumsfaktoren auf die Arteriogenese**

In einer Vielzahl von Studien konnten eine Reihe von Wachstumsfaktoren identifiziert werden, die beim Wachstum von Kollateralgefäßen beteiligt sind. Diese Faktoren induzieren beispielsweise die Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen, oder sie wirken chemoattraktiv auf Leukozyten.

##### *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*

VEGF gehört zu den best studierten angiogenen Faktoren. Er erhöht maßgeblich die Zellpermeabilität über die Phosphorylierung und Aktivierung der eNOS, stimuliert die endotheliale Zellproliferation und -migration sowie die Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark<sup>16</sup>. VEGF wirkt über die Bindung an seine spezifischen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2. In früheren Studien wurde

gezeigt, dass beide Rezeptoren auf Endothelzellen und nur VEGFR-1 auf Monozyten exprimiert werden<sup>57</sup>. Neben VEGF konnte der VEGF-homologe placenta growth factor (PlGF) als einziger spezifischer Ligand von VEGFR-1 identifiziert werden, was zur Annahme führte, dass vor allem dem PlGF eine über die Monozyten vermittelte arteriogene Bedeutung zuzusprechen ist. Pipp et al.<sup>57</sup> haben nachgewiesen, dass die Infusion von PlGF deutlich das Kollateralgefäßwachstum steigert, während die Infusion von VEGF ohne Einfluss auf die Arteriogenese bleibt<sup>57</sup>. Verantwortlich hierfür ist die Bindung von VEGF an beide Rezeptoren VEGFR-1 und -2. Primär scheinen die VEGFR-2 zuerst von VEGF besetzt zu werden, so dass die Bindung des VEGFR-1 nicht mehr zu einer ausreichenden Sättigung und damit verbundenen arteriogenen Wirkung führt<sup>57</sup>. Ishida et al. wiesen in einer in vitro-Studie VEGFR-1 und VEGFR-2 in glatten Muskelzellen nach<sup>58</sup>. Die Applikation von VEGF zeigte eine verstärkte Migration von glatten Muskelzellen, die durch die Infusion von PlGF noch weiter gefördert wurde und zu einer stärker ausgebildeten glatten Gefäßmuskelschicht der Kollateralen führte<sup>57, 58</sup>. Folglich werden die unterschiedlichen Mechanismen der Arteriogenese bzw. der Angiogenese durch den Wachstumsfaktor VEGF maßgeblich über seine Rezeptoren beeinflusst. Aufgrund des spezifischen VEGFR-1-Liganden PlGF wirkt diese Verbindung durch erhöhte endotheliale Adhäsion und Transmigration von Monozyten arteriogen, während die Bindung von VEGF an beide Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 eine geringe arteriogene – vielmehr eine angiogene Stimulierung – über die Sprossung von Endothelzellen unterstützt. Pipp et al.<sup>57</sup> bewirkten erst durch eine deutlich höhere VEGF-Applikation das gewünschte Kollateralgefäßwachstum, was auf eine entsprechend höhere Dosisabhängigkeit des VEGF im Verhältnis zum stimulierten Kollateralwachstum unter dem Einsatz von MCP-1 oder PlGF hinweist. Höhere Dosierungen bringen jedoch das Risiko von Nebenwirkungen mit sich, weshalb die selektive Aktivierung des VEGFR-1 die bessere Methode in der arteriogenen Therapie zu sein scheint<sup>57</sup>.

#### *Transforming growth factor- $\beta_1$*

Die Expression von TGF- $\beta$  wird infolge einer erhöhten Schubspannung auf verschiedenen Zelltypen induziert. Vor allem TGF- $\beta_1$  stimuliert indirekt über die Induktion der Expression von MCP-1 die Monozytenchemotaxis. So konnte nach intravasaler Infusion von TGF- $\beta_1$  eine deutliche Zunahme der Monozytenintegri-

und eine dadurch erhöhte Adhäsion an die Endothelzellen beobachtet werden<sup>59</sup>. Der Haupteffekt von TGF- $\beta$ <sub>1</sub> ist also monozytenmediert, wobei auch noch andere Zytokine und Faktoren, wie IL-1, TNF- $\alpha$ , b-FGF, PDGF und CARP aktiviert werden<sup>33, 60, 61</sup>.

### *Fibroblast growth factor (FGF)*

Die Familie der FGFs besteht aus 23 strukturell unterschiedlichen Polypeptiden, die an vier verschiedene Tyrosin-Kinaserezeptoren binden<sup>62, 63</sup>. Eine besondere Aufgabe übernehmen FGF-1 und FGF-2. Sie sind nicht nur an angiogenen, sondern auch an arteriogenen Prozessen beteiligt sind. Die Arbeitsgruppe von Deindl et al.<sup>64</sup> konnte im Kaninchenhinterlaufmodell in Northern-Blot-Analysen weder für FGF-1 noch für FGF-2 eine Erhöhung der mRNA-Konzentration verzeichnen, jedoch wurden die korrespondierenden Rezeptoren von FGF-1 und FGF-2 verstärkt hochreguliert. Sie zeigten einen deutlich positiven Einfluss auf die Arteriogenese. Primär wird FGFR-1 in der frühen Phase der Arteriogenese stärker exprimiert. Nach immunohistochemischer Färbung konnte die Expression von FGFR-1 in arteriellen glatten Muskelzellen des Musculus quadriceps detektiert werden. Auch auf Monozyten, Fibroblasten und Perizyten wurden FGFR-1 nachgewiesen, was für eine besondere Rolle des FGFR-1 in der Signaltransduktion der Arterienwand während der frühen Phase der Arteriogenese spricht<sup>64</sup>. Gleichzeitig besitzen Monozyten die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren wie FGF-2 freizusetzen<sup>39</sup>. In vitro Versuche haben gezeigt, dass Monozyten, die selbst FGFR-1 exprimieren und mit FGF-2 behandelt wurden, eine deutlich höhere Expression der Integrine Mac-1 und LFA-1 zeigten als unter dem Einfluss von MCP-1. Initial werden FGF-1 und FGF-2 während der adaptiven Arteriogenese nach Einwirkung der hämodynamischen Kräfte von den Gefäßzellen sezerniert, wirken aktivierend und chemoattraktiv auf Monozyten, welche dann wiederum FGFs freisetzen und so das Kollateralgefäßwachstum unterstützen. Die Arteriogenese wird demnach von FGFs in parakriner Art und Weise gefördert<sup>64</sup>.

Auch wenn FGF-1 und FGF-2 an angiogenen und arteriogenen Prozessen beteiligt sind, konnte ihnen hierbei bisher noch keine Schlüsselrolle zugewiesen werden. Die Untersuchungsergebnisse mit FGF-2 überexprimierenden und FGF-2 knockout Mäusen ließen keine eindeutigen Schlüsse zu. So entwickelten transgene Mäuse mit FGF-2-Überexpression keine Gefäßdefekte, jedoch zeigten sie eine Chondrodysplasie und eine erhöhte Bereitschaft zur Angiogenese, sofern weitere

angiogene Substanzen zur Verfügung standen. Im Herzen führte eine Überexpression von FGF-2 durch Einsatz des Rous Sarcoma Virus Promotors zu einer 20 %igen Zunahme der Kapillardichte und zu einer bis zu 45 %igen Überlebensrate geschädigter cardialer Myozyten. In FGF-2 knockout Mäusen kam es dagegen nur zu milden Gefäßdefekten, die zu einer verzögerten Wundheilung, einer verminderten Kontraktilität von vaskulären glatten Muskelzellen und einer reduzierten Durchbutungsrate sowie zu einer Thrombozytose führten. Diese milden Dysfunktionen wirkten sich nicht weiter auf die Lebensfähigkeit und Fertilität der Tiere aus. Auch phänotypisch waren die knockout Mäuse nicht von Wildtypmäusen zu unterscheiden. In FGF-1 knockout Mäusen konnten keine Abnormalitäten beobachtet werden. Die Untersuchung von FGF-1 und FGF-2 doppel-knockout Mäusen zeigten die gleichen phänotypischen Defekte, wie sie bereits bei FGF-2 defizienten Tieren beschrieben wurden. Es wird vermutet, dass weitere FGFs das Fehlen von FGF-1 und FGF-2 kompensieren oder aber dass die FGFs nur eine untergeordnete Rolle unter physiologischen Bedingungen einnehmen<sup>65</sup>.

### **2.2.3.5 Umbau (Remodeling) der Kollateralgefäße**

Bereits 24 Stunden nach Gefäßokklusion tritt die Proliferation verschiedener Gefäßzellen in Kraft. Der Höhepunkt der morphologischen Veränderung wird nach drei bis sieben Tagen erreicht. Bis zur dritten Woche post okklusionem kann eine mitogene Aktivität der Gefäßzellen beobachtet werden, jedoch in deutlich schwächerer Form als während der Tage drei bis sieben<sup>66</sup>. Die Wachstumsprozesse der Kollateralgefäße betreffen vor allem die glatten Muskelzellen, Endothelzellen, die Adventitia und Fibroblasten und werden durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, ausgehend von der Matrix und den Monozyten, stimuliert.

Die verstärkte Zellmitose verläuft parallel zur morphologischen Veränderung der glatten Muskelzellen. Sie zeigen eine Zunahme des rauen endoplasmatischen Retikulums und eine höhere Anzahl an freien Ribosomen, ein Hinweis für die Transformation von der kontraktilen in die proliferative Phase. Letzteres zeigt sich in einer Degeneration der Aktin-Filamente. Hierbei sind Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) beteiligt<sup>66</sup>. Monozyten und Makrophagen können verschiedene MMPs exprimieren. Die lokale Stimulation der Arteriogenese mit MCP-1 führt zu einer gesteigerten Expression und Aktivität von MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9<sup>67</sup>. Die erhöhte Expression von MMPs führt zum Abbau der Extrazellulärmatrix und der dem

Gefäß benachbarten Skelettmuskulatur, um so Platz zum Wachstum der Kollateralgefäße zu schaffen<sup>38</sup>.

Die Proliferations- und Umbauprozesse kommen schließlich durch die sukzessive Zunahme des Gefäßdurchmessers zum Abschluss. Initial führt der erhöhte FSS zu einem herabgesetzten Spannungseinfluss der Gefäßwand infolge der Dehnung und Dickenabnahme der Wandung. Dieser erhöht den zirkulären Wandstress der glatten Muskelzellen und stimuliert auf diese Weise deren Proliferation. Nimmt der Gefäßradius während der Umbauprozesse nun langsam zu, reduziert sich der zirkuläre Wandstress und das Kollateralgefäßwachstum limitiert sich selbst<sup>32, 38</sup>.

### **2.3 Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP)**

CARP wurde erstmals 1995 als ein zytokininduzierter Transkriptions-Kofaktor in humanen Endothelzellen identifiziert<sup>68</sup>. Es gehört zur Familie der Ankyrine, welche für die Bindung und Organisation von vielen integralen Membran- und zytoplasmatischen Proteinen verantwortlich sind. Die CARP-cDNA des Kaninchens hat eine Molekülmasse von 36 kDa und besteht aus einer so genannten PEST-ähnlichen Sequenz, welche zum Ziel hat, am Protein einen schnellen Abbau einzuleiten. Die bestehenden vier „Ankyrin Repeats“ (Ankyrin-Wiederholungen) beteiligen sich zum einen an Protein-Protein-Interaktionen, und zum anderen erkennen diese Sequenzen zellkernlokalisierte Signale und fungieren so als Transkriptions-Kofaktor. Eine direkte Bindung des CARP an die DNA findet jedoch nicht statt<sup>69</sup>. Das CARP-Gen umfasst insgesamt neun Exons. Die Ankyrin Repeats sind auf den Exons 5, 6, 7 und 8 kodiert, wobei das Genprodukt jeweils aus 33 Aminosäuren besteht<sup>70</sup>.

CARP ist als frühes Protein an der embryonalen und fetalen Differenzierung des Herzmuskels beteiligt. Erstmals wurde CARP während der kardiogenen Myogenese als Transkriptions-Kofaktor von YB-1 identifiziert, der über die Bindung an die HF-1a Region von HF-1 für die Aktivierung der für die leichte Myosinkette kodierenden Gene verantwortlich ist. Postnatal führt die Überexpression von CARP zu einer Hemmung von Troponin C und dem atrialen natriuretischen Peptid. Das bedeutet, dass CARP auch als Transkriptions-Korepressor fungiert<sup>71-73</sup>.

An insuffizienten Hundeherzen wurde CARP aus der Ventrikelmuskulatur isoliert<sup>74</sup>. In humanen Herzen war CARP infolge einer Dilatation oder ischämischen Kardiomyopathie deutlich bei einer Linksherzinsuffizienz erhöht<sup>75</sup>. Schließlich konnte

CARP als Marker für eine Herzhypertrophie definiert werden<sup>74</sup>. An der Entwicklung der Herzhypertrophie sind verschiedene Gene beteiligt, unter anderem Egr-1, welches wahrscheinlich durch eine Hochregulation von CARP in seiner Expression und Aktivität beeinflusst wird. Die Aktivierung von CARP selbst erfolgt über das herzspezifische Homeobox-Gen Nkx2.5, welches mit dem Zink-Finger-Transkriptionsfaktor GATA4 interagiert und den Maus-CARP-Promotor über das proximale GATA cis-Element aktiviert. GATA4 aktiviert im Herzmuskel nach  $\alpha$ -adrenerger Stimulation außerdem Endothelin-1 und brain natriuretic peptide (BNP), was vermuten lässt, dass die CARP-Aktivität durch die GATA-Faktoren nach  $\alpha$ -adrenerger Stimulation direkt beeinflusst wird<sup>72</sup>.

An kultivierten Herzmyozyten konnte festgestellt werden, dass der CARP-Promotor durch die Proteinkinase p38 aktiviert wird. Diese Proteinkinase gehört einem Signalweg an, der an verschiedenen Hypertrophien beteiligt ist, und beinhaltet eine  $\alpha$ -adrenerge Signalgebung<sup>72</sup>. Immunhistochemisch konnte CARP sowohl im Zytosol als auch im Nukleus von Endothelzellen und glatten Muskelzellen detektiert werden, während der Nachweis in Skelettmuskelzellen nur im Nukleus erfolgte<sup>69</sup>.

In einer Studie von Boengler et al.<sup>69</sup> wurde beobachtet, dass das CARP nach Überexpression im Zytosol von cos-1 Zellen in den Zellkern wanderte, worauf anschließend eine Induktion der Expression des Zink-Fingerproteins Egr-1 verzeichnet werden konnte. In in vitro Untersuchungen wurde nach Einfluss der Schubspannung – dem Hauptstimulus der Arteriogenese – sowohl die CARP-mRNA als auch die Egr-1-mRNA hochreguliert. Im Maushinterlaufmodell führt der FSS zu einer Induktion des Egr-1 über ein SSRE, welches direkten Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta_1$  und bFGF ausübt und somit am Prozess der Arteriogenese maßgeblich beteiligt ist. Außerdem bindet Egr-1 an den Promotor des urokinase-Plasminogenaktivators (u-PA), welcher in die Infiltration von Monozyten involviert ist. In einem weiteren Versuch von Boengler et al. führte die Infusion von TGF- $\beta_1$  im Kaninchenmodell zu einer Zunahme der CARP-mRNA<sup>69</sup>. Das weist darauf hin, dass CARP als Zielgen von TGF- $\beta_1$  während der frühen Arteriogenese in Erscheinung tritt. Die in vitro Untersuchung mit c2/c2 Zellen zeigte, dass TGF- $\beta_1$  die Induktion des CARP über SMAD-Proteine, die an den CARP-Promotor binden, und über die stressabhängige mitogenaktivierte Proteinkinase p38 eingeleitet wird<sup>69, 75</sup>. Diese Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass TGF- $\beta_1$  und Egr-1 nach Zunahme der Schubspannung deutlich stärker exprimiert werden. Die Freisetzung von Egr-1

nimmt wiederum direkten Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta_1$ , das wiederum CARP hochreguliert. Auf diese Weise wird ein positives Feedback in Gang gesetzt. CARP ist somit aktiv an der Initiation und Regulation des Kollateralgefäßwachstums beteiligt.

SMAD-Proteine übernehmen nach Induktion durch TGF- $\beta_1$  die Signalübertragung an den CARP-Promotor. Initial kommt es zur Phosphorylierung von SMAD2 und SMAD3. Diese bilden ein Heteromer mit SMAD4. Dieses Konstrukt tritt schließlich in den Zellkern über und aktiviert die Gentranskription. SMAD6 und SMAD7 hemmen dagegen TGF- $\beta_1$ . Kanai et al.<sup>76</sup> untersuchten, welches der SMAD-Proteine für die Aktivierung des CARP-Promotors verantwortlich ist. Sie fanden heraus, dass SMAD3 an der CAGA-Region des CARP-Promotors bindet und auf diese Weise die Expression von CARP einleitet<sup>76</sup>.

Untersuchungen der bei der Wundheilung ablaufenden Prozesse zeigten ebenfalls eine signifikante Erhöhung der CARP-Expression. Dies wurde in Zusammenhang mit einer Neovaskularisation, einer gesteigerten Durchblutung und einer Migration von vaskulären Endothelzellen gebracht<sup>75</sup>. Han et al.<sup>77</sup> entdeckten unter hypoxischen Bedingungen, dass eine gesteigerte CARP-Expression die Widerstandsfähigkeit von H9c2-Zellen (kultivierte Kardiomyozyten der Ratte) gegenüber Apoptose steigert. Initial wurden die H9c2-Zellen mit verschiedenen Stressfaktoren wie Glukoseentzug und Hypoxie behandelt. Hierbei wurde eine Induktion von GADD153 festgestellt, ein Gen, das zu den Apoptose-einleitenden Genen gehört und das unter anderem die Expression von CARP hemmt. In einem weiteren Versuch transfizierte man H9c2-Zellen mit einem CARP-codierenden Plasmid, das eine dauerhafte Expression von CARP gewährleistete. Dieses verringerte signifikant die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber durch hypoxieinduzierten apoptotischen Zelltod. Das lässt annehmen, dass eine verminderte CARP-Expression zum Teil zum apoptotischen Zelltod beiträgt<sup>77</sup>. Diese Beobachtung konnten die Arbeitsgruppen von Samaras<sup>75</sup> und Shi<sup>68</sup> dahingehend belegen, dass CARP die Durchblutungsrate infolge erhöhter Infiltration und Migration von vaskulären Endothelzellen und endothelialen Vorläuferzellen erhöht und so der Zellapoptose als Folge oxidativen Stresses oder Absenkung physiologischer Parameter (wie etwa des Glukosegehalts) entgegenwirkt<sup>68, 75</sup>.

PCR-Untersuchungen in Studien zur Arteriogenese als auch zur Wundheilung ergaben, dass CARP während der ersten Stunden hochreguliert wird. Boengler et al.<sup>69</sup> bestimmten so im ischämischen Hinterlaufmodell des Kaninchens und der Maus

die Expression der CARP mRNA während der frühen Arteriogenese nach 6, 12 und 24 Stunden bestehender Okklusion. Im Kaninchenmodell ergab sich nach 6 Stunden eine Erhöhung der CARP mRNA in den Kollateralgefäßen um 230 %, nach 12 Stunden eine Erhöhung um 260 % und nach 24 Stunden eine Erhöhung um 330 % verglichen mit der nicht operierten Kontrollgruppe. Im Mausmodell konnte nach 12 Stunden eine Steigerung der Expression von 180 % nachgewiesen werden<sup>69</sup>. Bezüglich der Aktivität von CARP während der Wundheilung konnte Shi et al.<sup>68</sup> bereits nach einer Stunde einen deutlichen Anstieg der CARP mRNA in der subkutanen Skelettmuskulatur und in den die Dermis versorgenden Blutgefäßen nachweisen. Nach 24 Stunden erreichte das CARP seine maximale Expression, um dann bis zu 14 Tagen nach der Verletzung 24- bis 35-fach höhere Werte zu erreichen als die intakte Haut. Weiterführend untersuchten Shi et al.<sup>68</sup> den Einfluss eines adenoviralen Genkonstruktes, welches zu einer CARP-Überexpression in der entsprechenden Region führte. Diese CARP-Überexpression beeinflusste die Neovaskularisation und die Durchblutungsrate im traumatisierten Gewebereich maßgeblich<sup>68</sup>.

## **2.4 Gentherapie – Einsatz viraler Vektoren**

Obwohl die medikamentelle, interventionelle und chirurgische Therapie in den letzten 25 Jahren weiter entwickelt wurde, sind vor allem die ersten beiden Therapieformen oft nur vorübergehend wirksam. Zudem erfordern manche chirurgische Eingriffe eine lebenslange medikamentelle Therapie. Die Gentherapie stellt deshalb einen weiterführenden, viel versprechenden Ansatzpunkt für eine effektive Therapie verschiedener Erkrankungen dar. Allerdings kennzeichnet die Gentherapie eine gewisse Instabilität, weshalb diese Methode eine zielgerichtete Feinabstimmung der einzelnen Komponenten auf Ebene der molekularen Grundlagen benötigt<sup>78</sup>.

In der Vergangenheit scheiterte die Idee des gezielten Gentransfers zunächst an der Schwierigkeit, das therapeutische Gen durch die Zellmembran hindurch bis in den Nukleus zu transportieren. Schließlich machte sich die Wissenschaft die seit Jahrmillionen äußerst effiziente Penetration von Viren in die Wirtszelle zu Nutze. Seither wurden verschiedene Viren als geeignete Vektoren zum Gentransfer ermittelt. Das kardiovaskuläre System betreffend werden vor allem Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Retroviren eingesetzt<sup>79</sup>. Allerdings ist der medizinische Einsatz von viralen Vektoren nicht unproblematisch. So bauen manche Viren ihr

Genmaterial an beliebiger Stelle in die Chromosomen der befallenen Zellen ein, was ungewollte Schäden verursachen kann. Andere Viren dagegen bleiben episomal und haben damit nur eine begrenzte Wirkdauer. Ferner bestehen Bedenken, dass sich abgeschwächte Viren im Körper unerwünscht verändern und dann wieder Krankheiten auslösen könnten. Eine weitere Einschränkung bedeuten zudem mögliche Immunreaktionen, die sich gegen das Trägervirus aufbauen und es selbst oder die von ihm infizierten Zellen unter Umständen zerstören, ehe die Therapie überhaupt greifen kann. Aus den genannten Gründen sind Forscher schon seit langem bestrebt, ein therapeutisches Gen ohne infektiöse Agenzien zu transferieren. Nichtvirale Verfahren könnten sich dafür besonders gut eignen, weil hiermit Immunreaktionen vermieden werden können. Im Gegensatz zu Viren hat der Einsatz nackter DNA keinen Proteinmantel. Aus diesem Grund können sie sich nicht frei von Zelle zu Zelle bewegen und sich in die Chromosomen integrieren. Dadurch verursacht die nackte DNA auch keine Antigen-Antikörper-Reaktionen oder eine genetische Interaktion im Zielgewebe. Die ersten intravasalen und intramuskulären Applikationen von nackter DNA wurden erfolgreich eingesetzt<sup>80</sup>. Ein weiterer nichtviraler Gentransfer ist der Einsatz von Plasmiden. Plasmide sind kleine autonom replizierende DNA-Moleküle, die extrachromosomal in Bakterienzellen vorkommen. Ihnen wird das zu transferierende Gen eingefügt. Bisher ist dieses Verfahren nur bei Zellen in Zellkultur etabliert, da hier die Zellen als sogenannte Monolayer gut zugänglich sind. Je nach Zelltyp wird für den Transfer das Plasmid in einem Liposom verpackt, welches dann mittels Endozytose in die Zielzelle gelangt. Alternativ wird die DNA durch Elektroporation transferiert. Hierfür werden die zu transfizierenden Zellen mit der einzufügenden DNA in Suspension einem Spannungsfeld ausgesetzt. Durch kurzzeitig entstehende Öffnungen in der Plasmamembran kann Plasmid-DNA in die Zellen gelangen. Hierbei können transiente Transfektionen von bis zu 90 % erreicht werden<sup>78</sup>.

#### **2.4.1 Gentransfer mittels rekombinantem Adenovirus Typ 5.1**

In dieser Studie wurden replikationsdefiziente Adenoviren Typ 5 (Ad.5) der ersten Generation als Vektor für den Gentransfer von CARP eingesetzt. Adenoviren zeichnen sich durch einen hocheffizienten Gentransfer, dies sowohl in vitro als auch in vivo Modellen, und einer hohen Expression des Transgens aus.

Die wichtigsten humanen sowie bei fast allen Haussäugetieren vorkommenden Adenoviren gehören zum Genus der Mastadenoviren. Das icosaedrische Kapsid hat einen Durchmesser von 70 bis 90 nm und besteht aus 252 Kapsomeren, welche sich aus 240 Hexameren und 12 Pentameren zusammensetzen. An den Pentameren sitzen die spikebildenden Fiberproteine, die an die Zelloberfläche der Wirtszelle binden und das Virus per Endozytose internalisieren (Abb. 2.4).

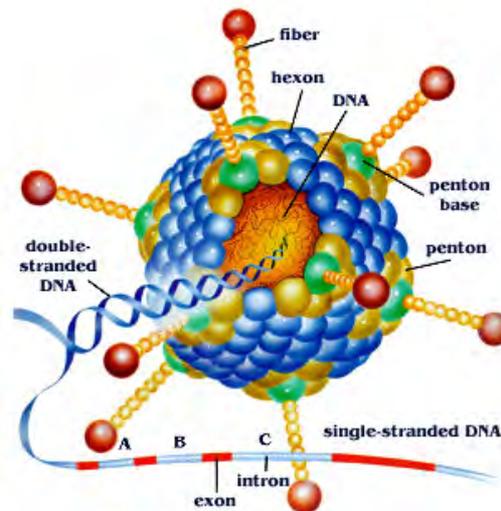


Abb. 2.4: Schematischer Aufbau des Adenovirus<sup>81</sup>.

Nach Verschmelzung des Endosoms mit dem Lysosom kommt es zu einem Abfall des pH-Werts, der einen im Adenovirus noch nicht genau definierten Mechanismus einleitet und zur Ruptur der Endolysosomenmembran führt. Schließlich ist den Viren jetzt der Übertritt in das Zytosol der Zelle ermöglicht. Das Virus bindet nun an Kernporenkomplexe und entlässt hierüber seine DNA in den Nukleus.

Das Adenovirus besitzt eine doppelsträngige lineare DNA mit einer Länge von 32 bis 36 kb (Ad.5 hat eine DNA-Länge von 36 kb). Funktionell wird das Genom in sich zwei überlappende Regionen gegliedert – eine frühe Region, die bis zum Einsetzen der viralen Replikation transkribiert wird, und eine späte Region, die ca. sieben Stunden nach der frühen Region ihre Genexpression startet. Die frühen Regionen unterteilt man in eine E1A/ B, E2A/ B, E3 und E4 Region. Mit Ausnahme der E2A/ B Region besitzt jede dieser frühen Regionen eigene Promotoren, während die späten L1-L5 Regionen vom major-late-Promotor reguliert werden. Die Produkte der E1 Gene sind verantwortlich für die produktive Infektion humaner Zellen und an der Initiation der Transformation beteiligt. Die E2 Gene codieren für Proteine, die für die virale Replikation verantwortlich sind – sie bilden die DNA-Polymerase. Die E3 Region

moduliert die Infektionsabwehr des Wirts, indem sie für ein Protein codiert, welches den MHC-Transport (major-histocompatibility complex) an die Plasmamembran blockiert und ein weiteres Protein bildet, das die Lyse der adenovirusinfizierten Zellen durch TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) inhibiert. Insgesamt ist die E3 Region jedoch nicht für die Virusreplikation essentiell. Letztendlich schaltet die E4 Region die Gene der späten Regionen ein, welche für Proteine der Virusstruktur und deren Aufbau codieren<sup>81, 82</sup>.

In der vorliegenden Studie wurde als Gentransfersystem das Adenovirus Typ 5 eingesetzt. Es gehört zur Gruppe C und besitzt keine Onkogenität für Nagetiere. Da die Verpackungskapazität des adenoviralen Genoms nur 105 % der natürlichen Länge beträgt und damit nur 1,8 bis 2 kb an Fremd-DNA aufnehmen könnte, werden Deletionsmutanten verwendet, um größere DNA-Fragmente einzubringen. In dieser Studie kamen replikationsdefekte Ad.5-Deletionsmutanten der ersten Generation zum Einsatz. Die Deletion der E1 und E3 Region bietet somit Platz für die Verpackung von 7 bis 8 kbp transgener DNA. Um die Replikation des Gens sicherzustellen, das für den therapeutischen Faktor codiert, werden bestimmte Promotoren (in dieser Studie der Cytomegalievirus (CMV)-Promotor) vor dieses Gen geschaltet.

Die rekombinanten, replikationsdefekten Ad.5 können sowohl in vivo als auch in vitro Zellen erfolgreich infizieren und ihr Transgen in die Wirtszelle einführen. Sofern die Zelle den Replikationsdefekt in der E1 Region nicht komplementiert, kommt es zu keiner Reproduktion von Virionen und so zu keiner progredienten Infektion. Dies stellt ein gewisses Maß an Regulierbarkeit und Sicherheit des Gentransfers in den Organismus dar<sup>83, 84</sup>.

### **3 Material und Methoden**

Soweit es in der Ausführung nicht gesondert erwähnt wird, wurden alle verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien in p.A.-Qualität, d.h. von höchstem Reinheitsgrad, bezogen. Die Auflistung der im Einzelnen verwendeten Chemikalien erfolgt unter den jeweiligen Abschnitten und wird im Anhang nochmals speziell aufgeführt.

#### **3.1 Tiermodell zur Induktion einer chronischen Ischämie im Maushinterbein**

Zur Induktion einer regionalen chronischen Ischämie in der Hintergliedmaße wurde ein in vivo-Modell an der Maus durchgeführt. Die rechte Arteria femoralis wurde an anästhesierten Mäusen nach einem Hautschnitt freipräpariert und durch eine Ligatur akut unterbunden. Prä und post operationem sowie am 3., 7., 14. und 21. Tag wurden die Gliedmaßen hämodynamisch mittels Laser-Doppler-Imaging (siehe Seite 34, Kapitel 3.2.1) untersucht. Am 21. Tag erfolgte dann die Perfusionsfixation der Mäuse mit pFA. Zur morphometrischen Untersuchung wurden die Musculi adductores präpariert.

Die Studie des hier beschriebenen experimentellen Tierversuches, das Tierversuchsmodell sowie die Versuchsdurchführung erfolgten nach Prüfung und Genehmigung (Genehmigungsnummer: B2/ 162 – Gentherapie und Arteriogenese) des bioethischen Komitees des Veterinärdezernates des Regierungspräsidiums Darmstadt. Alle Tiere wurden unter tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. Jahrgang 1998 Teil I, Nr. 30, S. 1106ff) ordnungsgemäß untergebracht und behandelt. Die Versuche erfolgten unter Aufsicht des Leiters des Tierversuchsvorhabens, Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Schaper, und nach Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten und Tierstalleiter, Prof. Dr. med. vet. F. Pierau. Den Leitsätzen der GV-SOLAS wurde Folge geleistet.

### **3.1.1 Material**

#### **3.1.1.1 Versuchstiere**

Für das Versuchsvorhaben wurden spezifische pathogenfreie, maskuline BALB/cAnNCrIBR Mäuse mit einem Körpergewicht von 21 bis 24 Gramm durch Charles River bezogen. Dieser Mausstamm zeichnet sich durch eine geringe Revaskularisation in der ischämischen Hintergliedmaße aus, aufgrund nicht so gut ausgebildeter Kollateralgefäße<sup>31</sup> und eignet sich daher bestens für die Untersuchung von arteriogenen Faktoren, die in dieser Studie mittels Gentransfer eingebracht wurden. Es wurden maximal fünf Tiere in Käfigen gehalten und mit Wasser und einem Alleinfuttermittel (Altromin®) ad libidum versorgt.

#### **3.1.1.2 Medikamente**

- § Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10 %, Medistar GmbH, Holzwickede)
- § Xylazinhydrochlorid (Xylazin® 2 %, Medistar GmbH, Holzwickede)
- § Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Braun (B. Braun AG Petzold GmbH, Melsungen)
- § Dexpanthenol (Bepanthen® Augensalbe, Roche, Grenzach-Wyhlen)

### **3.1.2 Methoden**

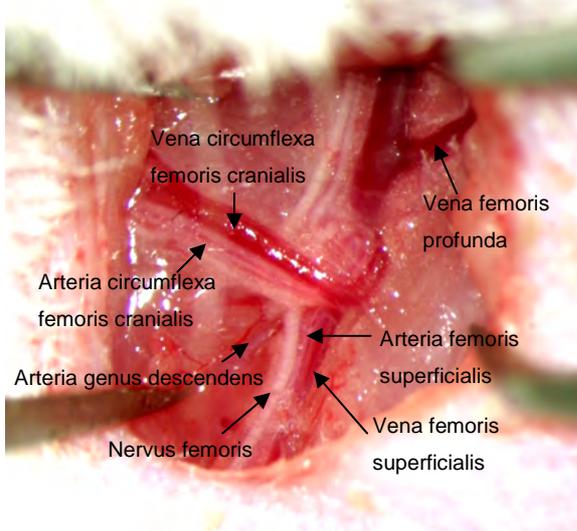
#### **3.1.2.1 Narkose**

Die Analgesie und Anästhesie der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Gabe von 100 mg Ketaminhydrochlorid und 5 mg Xylacinhydrochlorid pro kg Körpermasse. Bei Bedarf wurden 10 % der Initialdosis ebenfalls intraperitoneal appliziert (um diese geringe Dosis besser injizieren zu können, wurde das Ketamin-Xylacin-Gemisch 1:1 mit NaCl verdünnt). Um einer Hornhautschädigung durch Austrocknung während des Narkosestadiums vorzubeugen, wurde bilateral die Cornea mit Dexpanthenol-Salbe bedeckt.

#### **3.1.2.2 Operationstechnik**

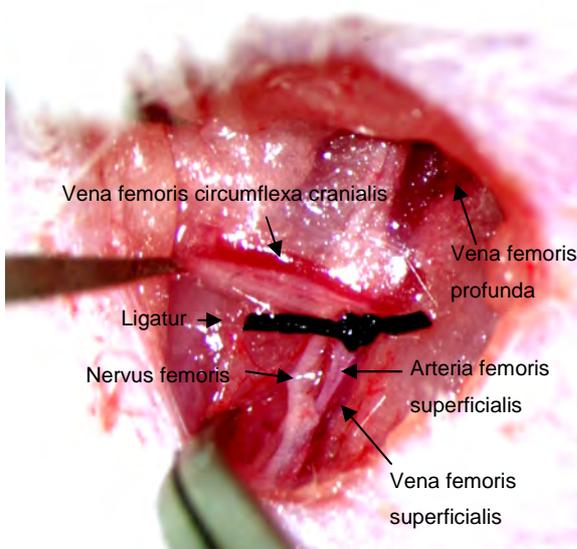
Vor Operationsdurchführung wurde den Mäusen der rechte mediale Oberschenkelbereich enthaart und desinfiziert. Unter sterilen Kautelen gemäß den

GV-SOLAS-Richtlinien wurde mit einer Schere eine Hautinzision im mittleren Innen Oberschenkelbereich durchgeführt und die A. femoralis superficialis aus ihrem Fett- und Bindegewebe mit Pinzetten freipräpariert. Im Bereich zwischen den Abzweigungen der Arteria femoris profunda und der Arteria genu descendens wurde die Femoralarterie mit einem 6-0 nicht-resorbierbaren Seidenfaden akut unterbunden (Abb. 3.1.A und B). Diese Verlegung des Gefäßes führte zu einer akuten chronischen Ischämie der Maushintergliedmaße. Die Haut wurde ebenfalls mit einem 6-0 nicht-resorbierbaren Seidenfaden durch Knopfhefte verschlossen.



*Abb. 3.1.A:*

*Aufsicht auf das Operationsfeld nach Präparation der anatomischen Strukturen.*



*Abb. 3.1.B:*

*Aufsicht auf das Operationsfeld nach durchgeführter Ligatur der Arteria femoralis superficialis.*

*Abb. 3.1.A und B: Topographische Darstellung der anatomischen Strukturen in situ.*

### **3.1.2.3 Bewertung der Bewegungsaktivität**

Zur Beurteilung der funktionellen Bewegungsaktivität wurde ein Scoring-System verwendet. Hierzu wurde die Belastung der okkludierten Gliedmaße jeder Maus in vier Kategorien eingeteilt:

- § Kategorie 1: - keine Belastung der Gliedmaße mit Femoralokklusion
- § Kategorie 2: - leichte Belastung der Gliedmaße mit Femoralokklusion
- § Kategorie 3: - fast uneingeschränkte Belastung der Gliedmaße mit Femoralokklusion, jedoch ohne vollständige Zehenspreizung
- § Kategorie 4: - uneingeschränkte Belastung

Die Beurteilung der Bewegungsaktivität wurde ab dem 3. Tag post operationem vor jeder Anästhesie zur Bewertung der Blutflussmessung durchgeführt.

## **3.2 Hämodynamische Auswertung in vivo und Bestimmung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins**

### **3.2.1 Relative Blutflussmessung in vivo mittels Laser-Doppler-Imaging**

Die relative Blutflussmessung in der Hintergliedmaße der Maus wurde mit einem Laser-Doppler-Imager (Model MLDI 5063, von Moor Instruments; Devon, UK) gemessen, der die Erythrozytenbewegung erkennt und quantifiziert. Der Laser-Doppler sendet ein Doppelsignal aus, das an bewegten Partikeln – in diesem Fall an den Erythrozyten – reflektiert wird und ein Streulicht erzeugt, welches dann von einem Photodetektor erfasst wird und mit Hilfe einer Signalverarbeitungseinheit die Dopplerfrequenz und somit die Strömungsgeschwindigkeit ermittelt. Das Gerät verfügt über eine Auflösung von 256 x 256 Pixel und eine Scan-Geschwindigkeit von 4 ms/ Pixel auf einer Fläche von 1,7 x 3 cm (Abb. 3.2).

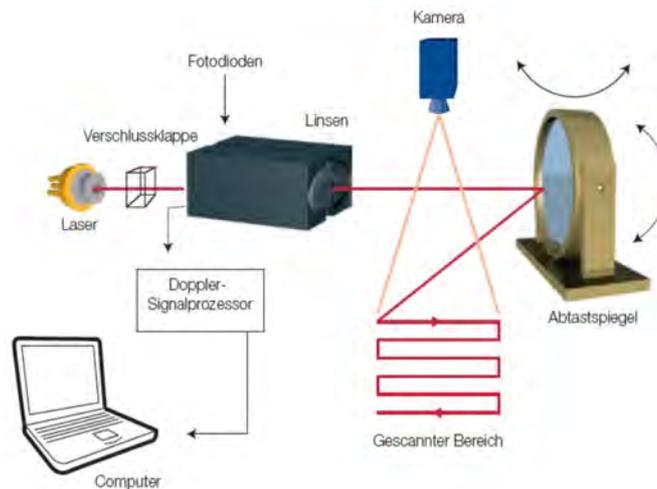


Abb. 3.2: Aufbau und Funktion eines Laser-Doppler-Imagers<sup>85</sup>.

Die Mäuse wurden wie zur Okklusionsoperation mit Ketamin und Xylazin anästhesiert (siehe Seite 32, Kapitel 3.1.2.1) und für 5 min in eine auf 37 °C temperierte Wärmekammer gelegt, um so die anästhesieinduzierte Thermoreduktion mit einhergehender Vasokonstriktion zu kompensieren. Die Messungen wurden prä operationem, unmittelbar post operationem, sowie am 3., 7., 14. und 21. Tag post operationem durchgeführt. Die Messwerte der okkludierten rechten Gliedmaße wurden dann mit der linken, nicht okkludierten Gliedmaße verglichen (R/L-Quotient). Um ausschließlich die Hämodynamik zu ermitteln, wurde vor Versuchsbeginn eine Maus des Stammes zur Hintergrund-Bestimmung getötet und mit dem Laser-Doppler vermessen, um die Gewebereflexion herauszurechnen. Der hier erhaltene Wert wurde dann von der in vivo Messung subtrahiert.

### 3.2.2 Sauerstoffsättigung des Hämoglobins

Die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins wurde mit einem AbTisSpec Spektrometer (Absorption-Tissue-Spectrometry, LEA Medizintechnik GmbH, Gießen), der einen Wellenlängenbereich von 500 bis 620 nm aufweist, bestimmt. Das ausgesendete Weißlicht dringt durch das Gewebe und wird vom Hämoglobin spektral verändert, wobei das Licht die Farbe des Blutes annimmt. Entsprechend der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins besitzt das Blut eine andere Farbe. Vollständig sauerstoffgesättigtes Blut stellt sich im Hämoglobinfarbspektrum hellrot dar und ungesättigtes Blut ist dunkelrot bzw. violett gefärbt. Das so veränderte Farbspektrum spiegelt auf diese Weise die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins wieder. Zur

Messung wurde ein zirkulärer Messfühler auf der Pfote der Maus platziert. Die Sauerstoffsättigung wurde ebenfalls in der Wärmekammer nach jeder Laser-Doppler-Messung durchgeführt und das Rechts-Links-Verhältnis berechnet und statistisch ausgewertet.

### **3.3 Viraler Gentransfer des Wachstumsfaktors CARP**

#### **3.3.1 Infektion mit CARP in vitro**

##### **3.3.1.1 Proteinbiochemie**

Bevor die Infektion in vivo durchgeführt werden konnte, musste das Adenovirus als Vektor und die so vermittelte Expression des CARP mittels Elektrophorese überprüft werden. Hierzu wurden Endothelzellen von humanen Umbilikalvenen (human umbilical vene endothelial cells = HUVECs) mit Ad.5.1-CARP-GFP infiziert und für drei Tage im Brutschrank mit 5 % CO<sub>2</sub>/ Luft-Gemisch bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden täglich mit einem Fluoreszenzmikroskop überprüft, welches die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) visualisierte. Nach drei Tagen waren über 50 % der Zellen positiv (siehe Seite 50, Abb. 4.1). Da das GFP durch den gleichen Promotor wie das CARP exprimiert wird, musste dieses auch in entsprechender Quantität vorliegen.

##### **3.3.1.1.1 Bearbeitung des Probenmaterials**

###### **3.3.1.1.1.1 Material**

- § Ad.5.1-CARP-GFP 4 x 10<sup>9</sup> pFU/ ml (im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt von Oliver Zolk, Universität Erlangen)
- § Ad.5.1-eGFP 4 x 10<sup>9</sup> pFU/ ml
- § Transfizierte HUVECs mit Ad.5.1-CARP-GFP
- § Trypsin
- § FCS

### 3.3.1.1.1.2 Methode

Es wurden infizierte und nicht infizierte HUVECs in Endothelzellmedium im Brutschrank mit einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % bei 37 °C inkubiert. Um die HUVECs von der Wandung der Zellkulturflaschen zu lösen, wurde Trypsin verwendet. Waren alle Zellen abgelöst, musste das Enzym Trypsin mit FCS inhibiert werden, da es sonst zur Zellverdauung gekommen wäre. Anschließend wurden die im Endothelzellmedium schwimmenden HUVECs 5 min bei Raumtemperatur und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Zellpellet in kleinen Mengen Medium resuspendiert, dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zusätzlich mit einem Ultraschallstab zerstört, um das Protein freizusetzen. Nach erneuter Zentrifugation wurden der Überstand und der partikuläre Anteil bei -80 °C eingefroren.

### 3.3.1.1.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Testsystem der Firma Pierce verwendet. Hierbei reagiert das Detektionsreagenz Bicinchoninsäure (BCA) sehr empfindlich und selektiv auf Cu<sup>2+</sup>, welches mit Proteinen in alkalischem Medium die bekannte Biuretreaktion eingeht. Der entstehende Cu-Protein-Komplex bildet mit BCS ein violette Reaktionsprodukt mit einem UV-Absorptionsmaximum bei 562 nm. Mit Hilfe eines Spektrometers wird die Menge an Protein in wässriger Lösung bestimmt.

#### 3.3.1.1.2.1 Material

Reagenz A: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA (Pierce-Proteinbestimmungs-kit mit Färbereagenz) und Natriumtartrat in 0,2N NaOH

Reagenz B: 4 %ige Kupfersulfatlösung

Arbeitslösung: Kurz vor der Proteinbestimmung wurden Reagenz A und B im Verhältnis 50:1 gemischt

### 3.3.1.1.2.2 Methode

Das tiefgefrorene Probenmaterial wurde aufgetaut, mit 2 ml der Arbeitslösung gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Zimmertemperatur wieder erreicht war, wurde mit einem Spektrometer bei 562 nm die Proteinkonzentration bestimmt. Eine Standardkurve wurde durch Anwendung von BSA-Standards mit Proteinkonzentrationen von 100 bis 2000 µg/ml erstellt.

### 3.3.1.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### 3.3.1.1.3.1 Material

Folgende Substanzen wurden von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen: Ammoniumpersulfat (APS), BSA, Dithiothreitol (DTT), Laemmli-Puffer (Biorad, Frankfurt), Ponceau-Färbereagenz, TEMED, Tris/ HCl

#### Elektrophorese-Puffer und Gele:

SDS-Probenpuffer reduzierend/ nicht reduzierend

2,50 ml	1,25 M Tris/HCl pH 6,8
5,00 ml	Glycerin
10,00 ml	SDS 10%
0,77 g	DTT (für reduzierenden Puffer)
Spatelspitze	Bromphenolblau

Sammelgelpuffer ad 100 ml

0,5 M	Tris/ HCl pH 6,8 → 6,055 g
10 %	SDS → 4 ml

Trenngelpuffer ad 100 ml

1,5 M	Tris/ HCl pH 8,8 → 18,165 g
10 %	SDS → 4 ml

## Trenngel 12 %

3,75 ml	Trenngelpuffer
6,00 ml	Acrylamid 30 %
5,25 ml	H <sub>2</sub> O
200 µl	APS 10 %
20 µl	TEMED

## Sammelgel 5 %

2,50 ml	Sammelgelpuffer
1,65 ml	Acrylamid 30 %
5,70 ml	H <sub>2</sub> O
200 µl	APS 10 %
20 µl	TEMED

## Elektrophorese-Laufpuffer

400 mM	=	288,00 g	Glycin
50 mM	=	60,40 g	Tris
0,2 %	=	20,00 g	SDS

**3.3.1.1.3.2 Methode**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in einer eindimensionalen, diskontinuierlichen Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970). Die verwendeten Gele bestanden aus einem unteren 12 %igen Trenngel und einem darüber liegenden 5 %igen Sammelgel.

Die Überstands- und partikuläre Probe wurden im Verhältnis 1:2 sowohl mit dem reduzierenden als auch dem nicht reduzierenden Probenpuffer verdünnt. Die Protein-Puffer-Gemische wurden für 5 min bei 95 °C im Wasserbad denaturiert. Bei dieser Reaktion wurden die Eigenladungen der Proteine durch den Zusatz des anionischen Detergenz SDS überdeckt, so dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstanden. Das reduzierende Agens DTT im Probenpuffer gehört zu den niedermolekularen Thiolen. Es bewirkt eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Polypeptidketten und ermöglicht dadurch die elektrophoretische Auftrennung von Proteinuntereinheiten. SDS und DTT führten so zu einer Linearisierung der

Proteine, wodurch ihre Laufeigenschaft im elektrischen Feld nur von der Molekülgröße abhängig war.

Die proteinhaltigen Proben wurden für 60 min mit einer variablen Spannung (Einstellung bei 300 V) und einer Stromstärke von 120 mA aufgetrennt und durch Färbung mittels Coomassie-Brilliant-Blau sichtbar gemacht. Die relativen Molekularmassen konnten mit Hilfe des „Prestained SDS-PAGE Standard Marker“ näherungsweise im Bereich von 20 kDa, 28,8 kDa, 34,3 kDa, 50 kDa, 77 kDa und 103 kDa berechnet werden.

#### **3.3.1.1.4 Western Blot Verfahren**

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach dem Verfahren nach Towbin elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um anschließend immunologisch nachgewiesen zu werden.

##### **3.3.1.1.4.1 Material**

Filterpapier, Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia biotech), Wet-Blot-Apparatur (Biorad)

##### Transferpuffer ad 4 l H<sub>2</sub>O

9,70 g	Tris
45,00 g	Glycin
800,00 ml	Methanol

##### **3.3.1.1.4.2 Methode**

Zur Durchführung des elektrophoretischen Transfers wurde der Wet-Blot ausgeführt. Das Protein wird aufgrund des großen Puffervolumens nur geringfügig erwärmt. Als Pufferreservoir wurden in Transferpuffer getränkte Filterpapiere und Schwämme verwendet. Die Kammer wurde von der Anode ausgehend in folgender Reihenfolge bestückt: ein mit Transferpuffer getränkter Schwamm, drei Lagen getränktes Filterpapier, dann die Nitrozellulosemembran und das Gel. Über das Gel wurden wiederum drei Lagen Filterpapier und abschließend ein Schwamm gepackt. Bei der Bestückung des Filterpapiers war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen

zwischen den einzelnen Blättern bildeten. Diese wurden durch vorsichtiges Darüberstreichen mit einem Glasstäbchen entfernt.

Der Elektrotransfer erfolgte schließlich bei einer konstanten Spannung von 120 mA über zwei Stunden. Einer eventuellen Überhitzung der Membranen und des Puffers wurde durch eine konstante Kühlung im Eisbad entgegengewirkt.

### **3.3.1.1.5 Ponceaufärbung**

#### **3.3.1.1.5.1 Material**

Ponceau S-Lösung (Sigma, Deisenhofen)

#### TBS-Puffer 10x pH 7,4

0,5 M	Tris
1,0 M	NaCl

#### **3.3.1.1.5.2 Methode**

Der Proteinnachweis im Western-Blot-Verfahren wurde mit dem Farbstoff Poceau S überprüft. Hierbei handelt es sich um eine reversible Anfärbung der Nitrocellulosemembran. Nach einminütiger Färbezeit wurde so lange mit Aqua dest. gewaschen, bis sich die rotgefärbten Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Durch mehrmaliges Waschen mit TBS-Puffer wurde die Membran wieder entfärbt.

### **3.3.1.1.6 Immunologische Proteindetektion**

#### **3.3.1.1.6.1 Material**

Magermilchpulver (Blockreagenz), polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen CARP (Primärantikörper), POD-Antikörper, gerichtet gegen IgG im Kaninchen (POD-markierter Sekundärantikörper), ECL-Detektions-Reagenz 1 und 2 (Amersham Pharmacia biotech)

TBS 10x pH 7,4

0,5 M	Tris
1,0 M	NaCl

TBST 10x pH 7,4

0,5 M	Tris
1,0 M	NaCl
0,05 % (v/v)	Tween 20

Magermilchlösung: 5 % Magermilchpulver in TBST

ECL-Western-Blot-Detektions-Reagenz 1 und 2: Gemisch 1:1

**3.3.1.1.6.2 Methode**

Vor Beginn der Nachweisreaktion musste die Nitrocellulosemembran nach dem Elektrotransfer der Proteine in einer Magermilchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt werden. Dabei werden hydrophobe Bindungsstellen der Membran abgesättigt, um falsch positive Hintergrundsignale der Nachweisreagenzien zu verhindern. Die Membran wurde für 20 Minuten in TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde diese mit dem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen CARP in einer Verdünnung von 1:1000, in Magermilchlösung bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für zehn Minuten in TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper POD-anti-rabbit-IgG wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend sechsmal für je zehn Minuten in TBST gewaschen. Das nachzuweisende Protein wird mittels Enzym-Markierung detektiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase reagiert unter Verwendung des ECL Western-Blot-Detektionsreagenz 1 und 2 in einer Chemilumineszenzreaktion, bei der blaues Licht durch eine HRP-katalysierte Oxidation von Luminol entsteht. Die Membran wurde eine Minute mit dem ECL-Kit inkubiert, ohne Luftblasen und Flüssigkeit in Folie gelegt und in eine Filmkassette mit blaulichtsensitivem Film verbracht. Anschließend wurde der Röntgenfilm zur Darstellung der Banden entwickelt.

### **3.3.2 Infektion mit CARP in vivo**

#### **3.3.2.1 Material**

- § Ad.5.1-CARP-GFP  $4 \times 10^9$  pFU/ ml (im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt von Oliver Zolk, Universität Erlangen)
- § Ad.5.1-GFP  $4 \times 10^9$  pFU/ ml
- § spezifische pathogenfreie, maskuline BALB/ cAnNCrIBR Mäuse mit einem Körpergewicht von 21 bis 24 Gramm (Charles River)

#### **3.3.2.2 Methode**

Die Infektion des Adenovirus erfolgte 24 Stunden vor Verlegung der rechten A. femoralis. Das Virus wurde auf Eis aufgetaut und in einer Menge von 50 µl in eine sterile Insulinspritze aufgezogen. Die Vorbereitung und Durchführung der Hautinzision erfolgte wie auf Seite 32, Kapitel 3.1.2.2 beschrieben. Die Adduktoren-muskulatur und der Verlauf der Kollateralgefäße wurden dargestellt (Abb. 3.3). Unter mikroskopischer Kontrolle erfolgte die Applikation von je 10 µl Virus an fünf Stellen in die Adduktoren-muskulatur nahe der Kollateralen (Abb. 3.4). Es wurde insgesamt eine Menge von  $2 \times 10^8$  pFU/ Muskel injiziert. Bei der Applikation des Virus war beim Einstich der Kanüle eine stärkere Traumatisierung der Muskelfaszie zu vermeiden, da hierbei eine zu große Menge an Virus hätte herauslaufen und so eine ausreichende Infektion nicht hätte gewährleistet werden können. Die Hautinzision wurde mit 6-0 nicht-resorbierbarem Seidenfaden mit Knopfheften verschlossen. Am nächsten Tag erfolgte die Okklusion der A. femoralis wie auf Seite 32, Kapitel 3.1.2.2 beschrieben sowie die hämodynamische Auswertung und Bestimmung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins (siehe Seite 34, Kapitel 3.2).

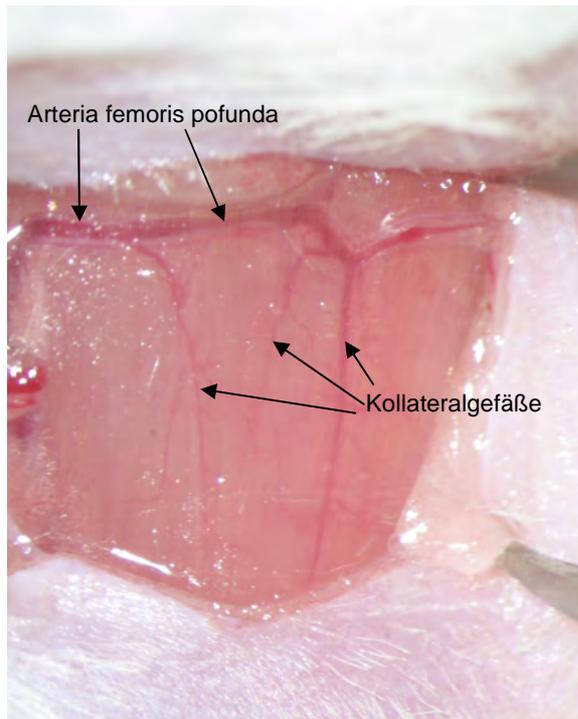


Abb. 3.3: Darstellung der Kollateralgefäße im Maushinterlauf.

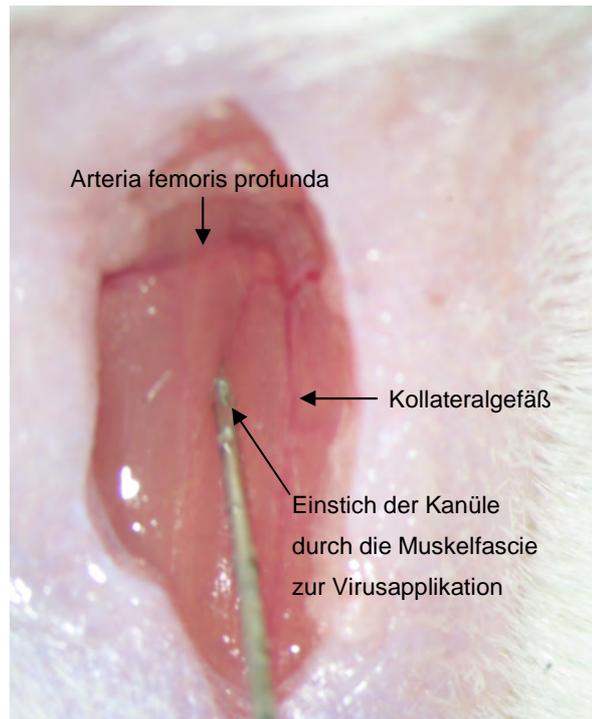


Abb. 3.4: Intramuskuläre Virusapplikation im Bereich der Kollateralgefäße.

### 3.4 Gewinnung und Aufarbeitung der Adduktorenmuskulatur

#### 3.4.1 Perfusionsfixation

##### 3.4.1.1 Material

Butterfly (0,8 x 20 mm), Infusionsschlauch, Dreiwegehahn

#### Medikamente

- § Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10 %, Medistar GmbH, Holzwickede)
- § Xylazinhydrochlorid (Xylazin® 2 %, Medistar GmbH, Holzwickede)
- § Heparin-Natrium (Liquemin® N 25000, Roche, Grenzach-Wyhlen)

#### Dilatationspuffer

1 x	PBS
0,5 %	Albumin (BSA, Sigma, Deisenhofen)
0,1 %	Adenosin

Paraformaldehyd 4 %

1 l	1x PBS
40,00 g	pFA
2-3 Plätzchen	Na-Hydroxid

**3.4.1.2 Methode**

Am 21. Tag post operationem erfolgte nach Überprüfung der Hämodynamik und der Sauerstoffsättigung (siehe Seite 34, Kapitel 3.2) die Perfusionsfixation.

Die Einleitung der Narkose erfolgte wie auf Seite 32, Kapitel 3.1.2.1 beschrieben. Um einer Koagulation des Blutes vorzubeugen, wurden 500 IE Heparin intraperitoneal injiziert. Nach der Euthanasie der Maus wurde diese in der Linea alba vom Xiphoid des Sternums bis zum Becken eröffnet. Das Diaphragma wurde an den Rippenbögen zur Einsicht in den Thorax inzidiert und entfernt. Um die Aorta in ihrem Verlauf in toto darzustellen, wurden die Rippenbögen durchtrennt und das Sternum zur besseren Aufsicht entfernt. Die Aorta abdominalis konnte so gut aus ihrem Fettgewebe präpariert und dargestellt werden. Zum Kanülieren der Aorta wurde ein präparierter Butterfly verwendet. Dem Butterfly wurde die Nadelspitze entfernt und mit einer Zange die scharfen Bruchkanten abgerundet, damit die Gefäßwand der Aorta abdominalis beim Kanülieren nicht verletzt wurde. Um den Abfluss der Perfusionslösung zu gewährleisten, wurde die Vena cava caudalis inzidiert.

Die Perfusionsfixation erfolgte unter konstanten Druckverhältnissen von 100 mm Hg. Hierzu wurde der Dilatationspuffer und das pFA in einer Höhe von einem Meter über der Maus platziert. Bei der Verwendung der Infusionsschläuche war auf eine sorgfältige Entfernung von Luftblasen zu achten, da diese leicht zu einer Luftembolie und somit nur zu einer unzureichenden Dilatation und Fixation des Gewebes geführt hätten.

Um das Gefäßsystem der Maus zu spülen und zu dilatieren, wurde für acht Minuten mit einem Dilatationspuffer perfundiert. Das zur Herstellung verwendete PBS diente als Puffersubstanz, das BSA zur Gewebestabilisierung, um ein Angreifen von Proteasen zu verhindern und das Adenosin zur Vasodilatation. Anschließend wurde das dilatierte Gefäßsystem mit 2 %igem pFA für zehn Minuten fixiert. Der Erfolg der Fixation wurde am Aushärtungsgrad der Organe und der Muskeln überprüft.

### **3.4.2 Entnahme und Lagerung der Adduktorenmuskulatur**

#### **3.4.2.1 Material**

Zucker (Südzucker), Tissue Tek® (O.T.C. Compound 4583, Fa. Miles), Kork, Methylbutan, flüssiger Stickstoff

#### **3.4.2.2 Methode**

Zur morphometrischen Auswertung wurden die fixierten Mm. adductores sowohl aus der ligierten als auch aus der unligierten Gliedmaße herauspräpariert. Die Muskelbäuche wurden sofort für 30 Minuten in eine 10 %ige und anschließend über Nacht in eine 25 %ige Saccharoselösung zur Dehydratation verbracht. Am folgenden Tag wurde das Gewebe mit Tissue Tek® im Faserlängsverlauf mit der A. profunda femoris als Basis auf Kork aufgeblickt. Die mit Gewebekleber überzogenen Muskelproben wurden für einige Sekunden in stickstoffgekühltes Methylbutan (-160 °C) verbracht, um eine Blasenbildung des Tissue Tek® zu verhindern. Danach wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff (-195 °C) schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bis zur Auswertung bei -80 °C.

### **3.5 Morphometrische Auswertung**

#### **3.5.1 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Für die Morphometrie wurden mit einem CM 3000 Kryostaten der Firma Leica 6 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Die bei -80 °C gelagerten Muskelproben sind mit Tissue Tek® auf Probenhalter im Innenraum des Kryostaten (-26 °C) aufgeblickt worden. Nach ca. fünf Minuten Aufwärmzeit konnte das Gewebe geschnitten werden. Es wurden je neun Schnitte aus einer distalen, einer mittleren und einer proximalen Ebene der Muskulatur gewonnen. Die Schnitte wurden auf beschichteten Objektträgern, die bei Raumtemperatur gelagert wurden, aufgefangen, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bis zur Färbung in PBS-Lösung im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.5.2 Kapillarfärbung

#### 3.5.2.1 Material

##### PBS 10x ad 2 Liter Aqua dest. pH 7,2

160,00 g	NaCl
4,00 g	KCl
4,00 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
58,00 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2xH <sub>2</sub> O

##### Glycin-BSA-Block

50,00 ml	PBS
0,4 %	Glycin
0,2 %	BSA

- § Monoklonaler Anti-Alpha-Smooth-Muscle Actin, FITC Conjugate (Sigma, Deisenhofen) verdünnt 1:500 in PBS
- § Lectin gewonnen aus *Bandeiraea simplicifolia*, TRITC Conjugate (Sigma, Deisenhofen) verdünnt 1:30 in PBS
- § DAPI Nucleic Acid Stain (Molecular Probes) verdünnt 1:1000 in PBS

#### 3.5.2.2 Methode

Die in PBS-Lösung gelagerten Schnitte mussten zur Vermeidung einer unspezifischen Färbung vor der eigentlichen Kapillarfärbung geblockt werden. Hierzu wurde eine Glycin-BSA-Blocklösung verwendet, die unspezifische Antigenstrukturen bindet und so eine gezielte Färbung von entsprechender Qualität ermöglicht. Die Objektträger wurden aus der PBS-gefüllten Objektträgerhalterung genommen und gründlich abgetrocknet, ohne dabei die Schnitte austrocknen zu lassen. Die Blocklösung wurde sofort auf die Gewebeschnitte pipettiert, die Objektträger in eine Feuchtkammer verbracht und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Glycin-BSA-Blocklösung gründlich abgeschüttelt und abgetrocknet, um den Antikörper alpha-Smooth-Muscle-Actin in einer Verdünnung von 1:500 aufzutragen. Dieser monoklonale Antikörper bindet an Aktinfilamente glatter Muskelzellen und färbt diese über die konjugierte grün-fluoreszierende Substanz Fluoreszeinisothiocyanat (FITC). Die Objektträger wurden für eine Stunde

in einer Feuchtkammer bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Der Waschvorgang musste sehr gründlich ausgeführt werden, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Im nächsten Schritt wurde Lectin in einer Verdünnung von 1:30 aufpipettiert und erneut in der Feuchtkammer bei 37 °C im Brutschrank für 45 Minuten inkubiert. Lectin war in diesem Fall an den rot-fluoreszierenden Farbstoff Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) konjugiert und bindet an Lektinrezeptoren von Endothelzellen. Auch hier wurde nach der Inkubationszeit dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen und die Schnitte ordentlich abgetrocknet. Im letzten Färbeschritt wurde DAPI in einer Verdünnung 1:1000 aufgetragen und für 10 Minuten in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA eingesetzt wird. Der Waschvorgang erfolgte auch hier wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Objektträger sofort in Mowiol® eingedeckelt und unter einem Tuch zum Trocknen aufgereiht. Die Muskelschnitte durften jetzt nur noch dunkel gelagert werden, da es sonst zu einem Fluoreszenzverlust hätte kommen können. Die gefärbten Schnitte wurden in Kassetten im Kühlschrank bei einer Temperatur von 4 °C bis zur mikroskopischen Auswertung aufbewahrt.

### **3.5.3 Auswertung der Gefäßdurchmesser und der Wanddicke**

Mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Leica wurden die Kollateralgefäße fotografiert und eingescannt. Die Vermessung der Gefäßdurchmesser erfolgte mit der ImageJ 1.32j Software. Aus den hier ermittelten Daten wurde die Wanddicke berechnet.

### **3.6 Auswertung und Statistik**

Alle Daten wurden mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Corporation) aufbereitet, ausgewertet und grafisch dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung abgebildet.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde mit Hilfe von SPSS 10.0 eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Zum multiplen Vergleich zweier Gruppen wurde als post-hoc Test der Bonferroni-Test gewählt. Der t-Test wurde

außerdem bei gepaarten Stichproben durchgeführt. Ein Ergebnis galt als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  betrug.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Infektion von HUVECs und der Adduktorenmuskulatur im Mausmodell mit Ad.5.1-CARP-GFP zur Überprüfung des adenoviralen Vektors

Bevor der Gentransfer in vivo durchgeführt werden konnte, musste die sichere Übertragung des Transgens in die Zelle gewährleistet sein. Die Überprüfung der Vektorfunktion von Ad.5.1-CARP-GFP erfolgte mittels kultivierter HUVECs (n = 3). Über drei Tage wurde die Zellinfektion mit einem Fluoreszenzmikroskop anhand der GFP-Expression verfolgt. Die Expression des GFP wurde durch den gleichen Promotor gestartet wie die des CARP, so dass die Expressionsrate von CARP analog der grünen Fluoreszenz der erfolgreich infizierten HUVECs sein musste. Am dritten Tag zeigten bereits mehr als die Hälfte der Zellen eine grüne Fluoreszenz (Abb. 4.1).

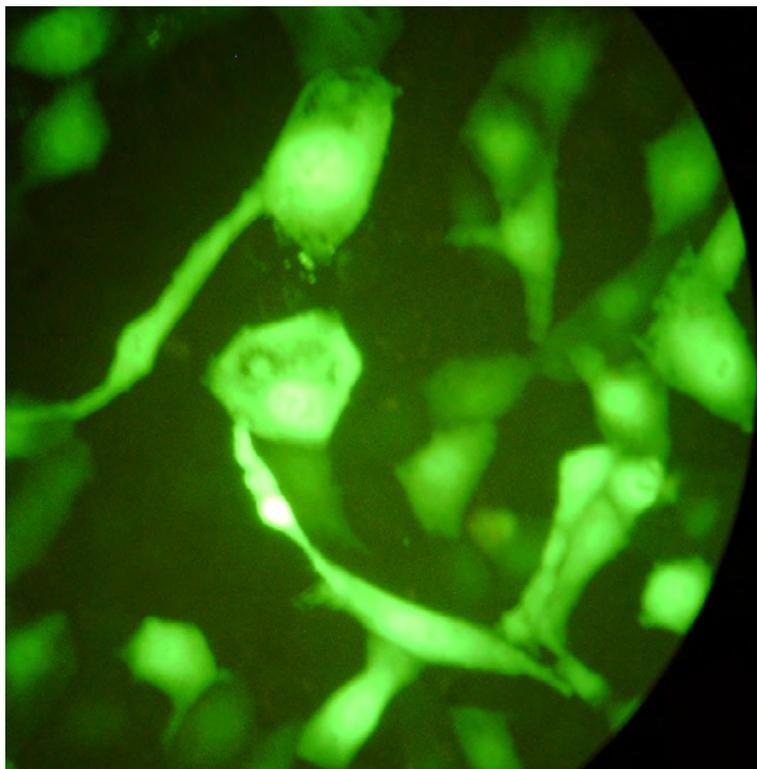


Abb. 4.1: Grün fluoreszierende HUVECs nach dreitägiger Infektion mit Ad.5.1-CARP-GFP.

Die erfolgreiche CARP-Expression untersuchten wir mit den infizierten HUVECs im Western-Blot-Verfahren unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen. Um eine eventuelle Freisetzung des Genprodukts auch im Zellüberstand nachweisen

zu können, wurden nicht nur die Zellen, sondern auch der Zellüberstand auf CARP getestet. Im nicht reduzierten Teil konnte das CARP in den infizierten HUVECs mit einer deutlichen Bande bei 36 kDa nachgewiesen werden, während im reduzierten Versuchsansatz das CARP zusätzlich, wenn auch nur mit einer schwachen Bande, im Zellüberstand detektiert wurde (Abb. 4.2).

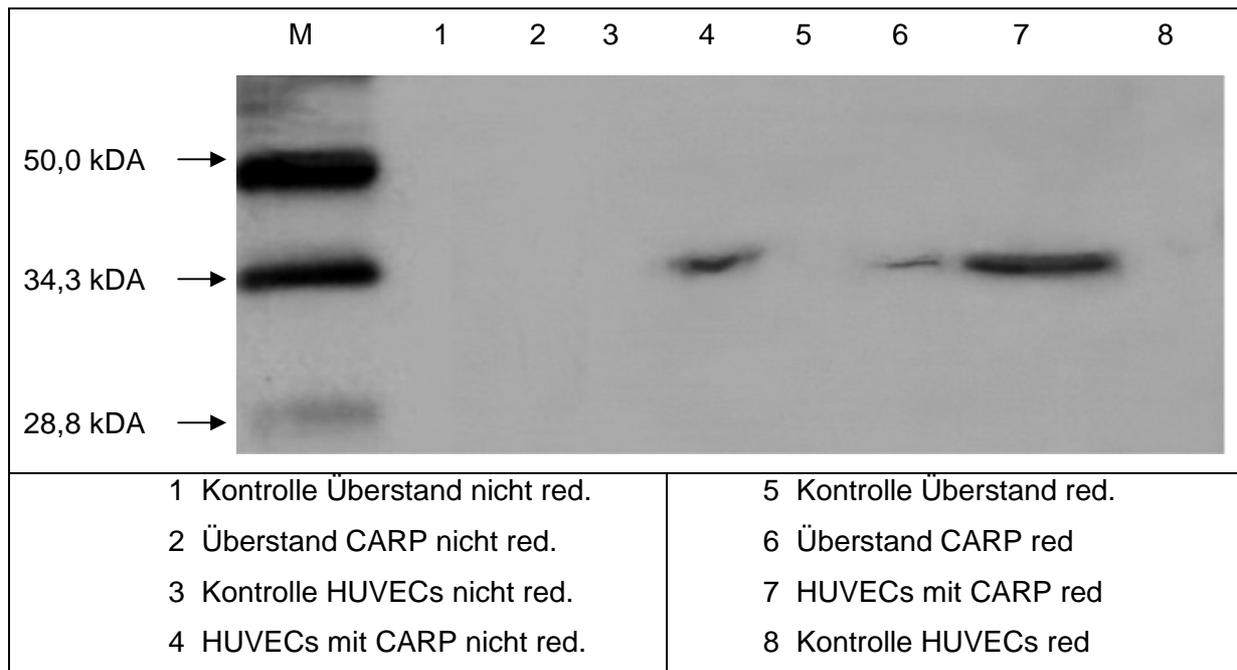


Abb. 4.2: Die Detektion des CARP-Gens zeigt eine deutliche Bande der HUVECs sowohl unter reduzierenden (7) als auch nicht reduzierenden (4) Bedingungen. Der Überstand (6) weist eine schwache Bande unter reduzierenden Bedingungen auf. M bezeichnet den „Prestained SDS-PAGE Standard Marker“

Um nun auch einem erfolgreichen Gentransfer in vivo gewiss zu sein, wurden bei 8 Tieren die Adduktorenmuskeln nahe der Kollateralgefäße mit Ad.5.1-CARP-GFP infiziert und je 2 Tiere nach 2, 4, 7 und 21 Tagen auf eine grüne Fluoreszenz infolge GFP-Expression in histologischen Gefrierschnitten überprüft. Die Tiere erfuhren keine Okklusion der Femoralarterie. Am 2. und 4. Tag konnte eine deutliche grüne Fluoreszenz der Adduktorenmuskulatur festgestellt werden (Abb. 4.3, Abb. 4.4), am 7. Tag zeigte sich sogar eine deutliche Präsenz des Genkonstrukts in der Gefäßwand (Abb. 4.5). 21 Tage nach Injektion des Genkonstrukts konnte keine Fluoreszenz mehr festgestellt werden.

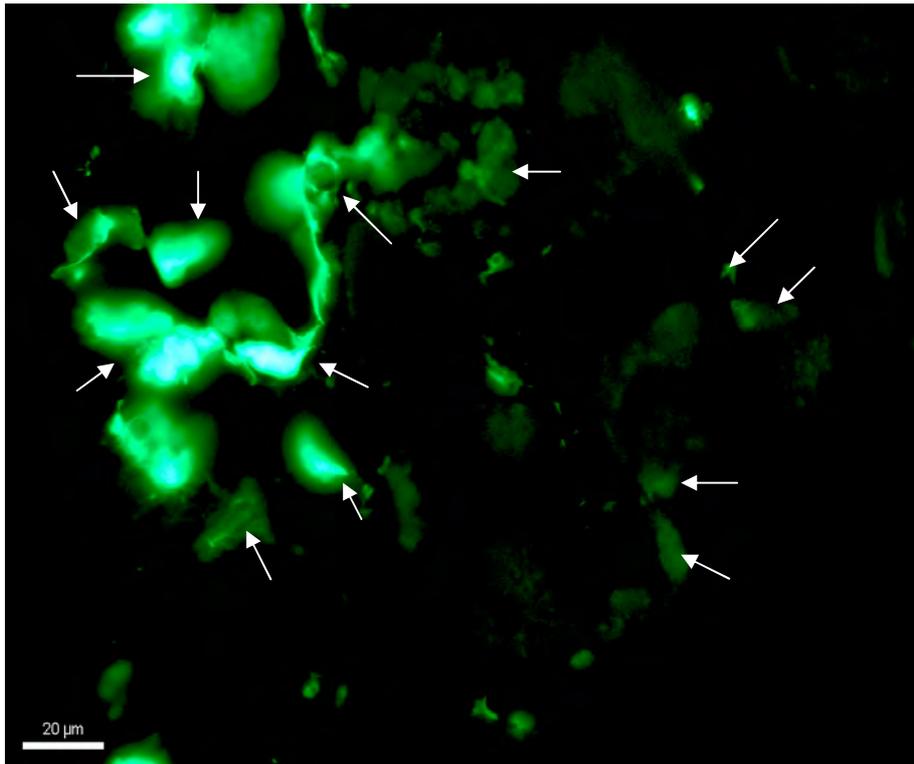


Abb. 4.3: Histologischer Schnitt des rechten Adduktorenmuskels ohne Okklusion nach zweitägiger Infektion mit Ad5.1-CARP-GFP. Die deutliche Grünfluoreszenz des GFP bezeichnet den erfolgreichen Gentransfer innerhalb von Muskelfasern (Pfeile).

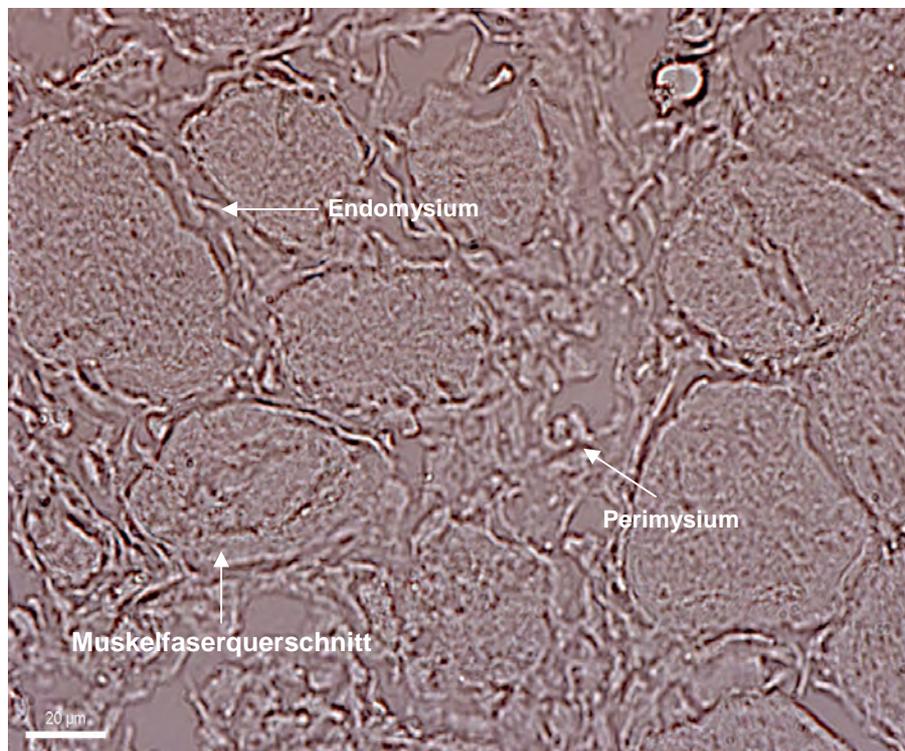
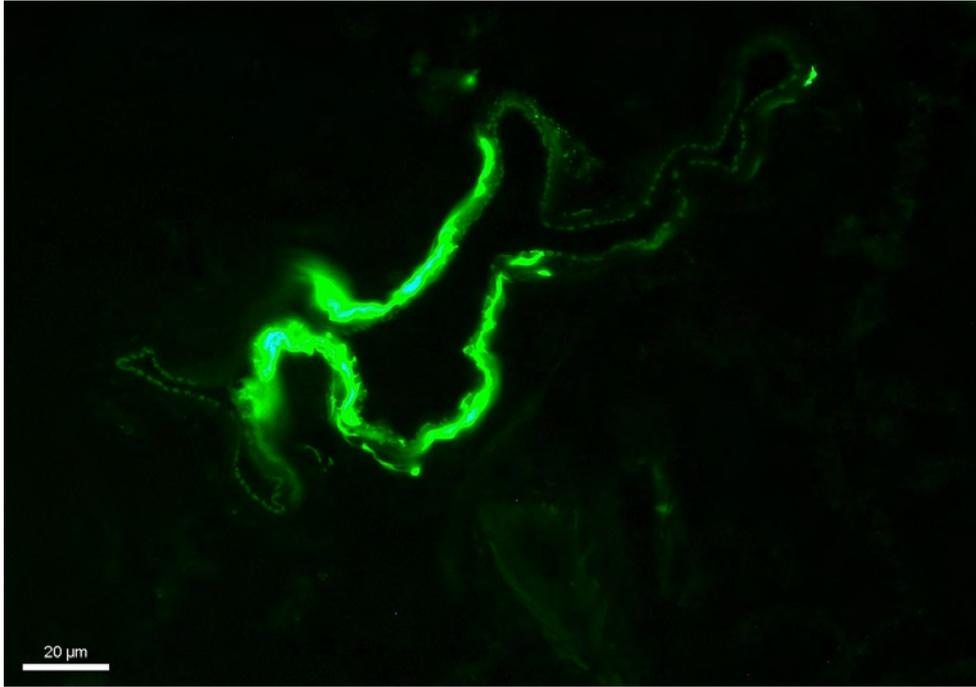


Abb. 4.4: Selber Bildausschnitt wie in Abb. 4.3 mit dem Lichtmikroskop zur Überprüfung der erfolgreichen Infektion betrachtet. Die Aufnahme zeigt Querschnitte gestreifter Muskelfasern, die von Bindegewebe (Endomysium und Perimysium) ummantelt werden.



*Abb. 4.5: Histologischer Schnitt des rechten Adduktorenmuskels ohne Okklusion nach siebentägiger Infektion mit Ad.5.1-CARP-GFP. Es ist eine deutliche Präsenz des Genkonstrukts in der Gefäßwand anhand der Fluoreszenz von GFP zu erkennen.*

## 4.2 Infektion der Adduktorenmuskulatur mit Ad.5.1-CARP-GFP

### 4.2.1 Hämodynamische Auswertung und Sauerstoffsättigung des Hämoglobins im Maushinterlauf nach Gentransfer mit Ad.5.1-CARP-GFP

In der ersten Versuchsreihe wurde 4 Tieren das Ad.5.1-CARP-GFP direkt bei Durchführung der Okklusionsoperation intramuskulär injiziert. Die LDI-Messung (Abb. 4.6) und die Sauerstoffsättigung sowie die Bewegungsaktivität wurde über 21 Tage gemessen und mit einer Kontrollgruppe (n = 4), welche sterile NaCl-Lösung appliziert bekam, verglichen (R/L-Quotient). Die Messdaten zeigten jedoch kein beschleunigtes Kollateralgefäßwachstum. Der Versuch wurde zwei Mal wiederholt.

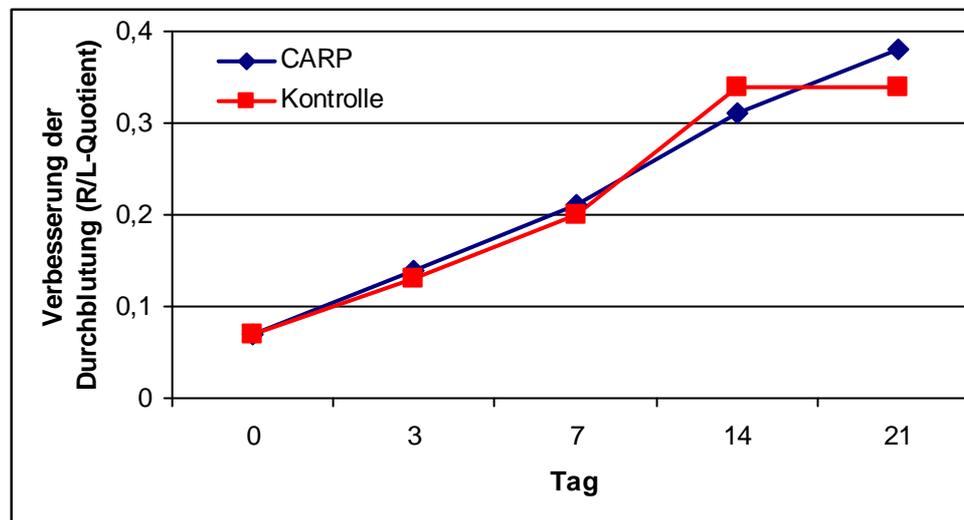


Abb. 4.6: LDI-Messung der ersten Versuchsreihe. Die intramuskuläre Genapplikation mit Ad.5.1-CARP-GFP (n = 8) erfolgte unmittelbar nach Okklusion der Femoralarterie. Die Kontrollgruppe (n = 8) wurde mit steriler NaCl-Lösung unmittelbar nach Verschluss der Femoralarterie behandelt. An keinem Messtag konnte ein signifikant höherer Blutfluss gemessen werden, der ein beschleunigtes Auswachsen der Kollateralgefäße bezeichnet hätte.

Es stellte sich daher die Frage, ob die Zeit der Expression des Transgens zu kurz bemessen war, da CARP zu den frühen Genen gehört, die während der Arteriogenese hochreguliert werden. Wir änderten das Versuchsprotokoll dahingehend, dass die Infektion der Adduktorenmuskulatur 24 Stunden vor dem Verschluss der Femoralarterie durchgeführt wurde. Der Zeitraum wurde so gewählt, da aus dem Vorversuch an kultivierten HUVECs nach drei Tagen eine über 50 %ige

Infektion der Zellen beobachtet werden konnte. Das Virus bekam somit einen zeitlichen Vorsprung, um die Expression des Transfgens effektiv einzuleiten. Drei Tage nach Verschluss der A. femoralis ergab die Messung mittels LDI keinen signifikanten Unterschied (CARP =  $0,18 \pm 0,05$  vs. Kontrolle NaCl =  $0,17 \pm 0,03$ ). Auch am siebten Tag war die Wiederherstellung der Durchblutung zwischen beiden Gruppen nicht bedeutsam unterschiedlich (CARP =  $0,26 \pm 0,08$  vs. Kontrolle NaCl =  $0,25 \pm 0,06$ ). Erst nach 14 Tagen zeigte sich eine deutlich bessere Zunahme des Blutflusses bei der Ad.5.1-CARP-GFP infizierten Gruppe (CARP =  $0,54 \pm 0,12$  vs. Kontrolle NaCl =  $0,34 \pm 0,06$ ), die höchst signifikant gegenüber der NaCl-behandelten Kontrollgruppe war. Sogar am 21. Messtag konnte eine signifikant bessere Durchblutungsrate der CARP-behandelten ( $n = 5$ ) gegenüber der NaCl-behandelten ( $n = 7$ ) Versuchsreihe notiert werden (CARP =  $0,61 \pm 0,21$  vs. Kontrolle NaCl =  $0,37 \pm 0,07$ ).

Um auszuschließen, dass die Beschleunigung des Kollateralgefäßwachstums auf eine virusbedingte Infektion und einer damit einhergehenden stärkeren inflammatorischen Reaktion zurückzuführen ist, wurde ein zweiter Versuchsdurchlauf gestartet, bei dem die Kontrollgruppe mit Ad.5.1-GFP ( $n = 8$ ) intramuskulär infiziert wurde. Die Ad.5.1-CARP-GFP-Gruppe bestand auch hier wieder aus fünf Tieren. Die GFP-infizierten Mäuse zeigten lediglich am dritten Messtag eine größere Differenz zu den NaCl-behandelten des ersten Versuchsdurchlaufs und den Ad.5.1-CARP-GFP-behandelten Tieren. Diese war jedoch nicht charakteristisch. Auch an den weiteren Messtagen konnte kein signifikanter Unterschied zur vorherigen Kontrollgruppe mit NaCl-Applikation festgestellt werden. Auch der eventuelle Einfluss der Muskeltraumatisierung auf den verbesserten Blutfluss durch die großen Applikationsvolumina an Virusflüssigkeit bzw. der entsprechenden Menge von 50  $\mu$ l an steriler NaCl-Lösung wurde mit einer dritten Versuchsgruppe verglichen. Hierbei wurden 4 Tiere mit Ad.5.1-CARP-GFP behandelt und die Kontrolltiere ( $n = 7$ ) lediglich rechtseitig okkludiert. Die Kontrolltiere zeigten drei Tage post operationem eine minimal schwächere Zunahme des Blutflusses, die jedoch nicht charakteristisch war. Die folgenden Messtage zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zu den anderen beiden Kontrollgruppen (Abb. 4.7).

Ein inflammatorischer Einfluss des Virus sowie die Bedeutung der Muskeltraumatisierung infolge der Applikationsvolumina konnten so als Wirkungsparameter bezüglich der hämodynamischen Zunahme ausgeschlossen

werden. Die erfolgreiche Expression des CARP-Gens nach Applikation des Ad.5.1-CARP-GFP war demnach allein verantwortlich für den verbesserten Blutfluss.

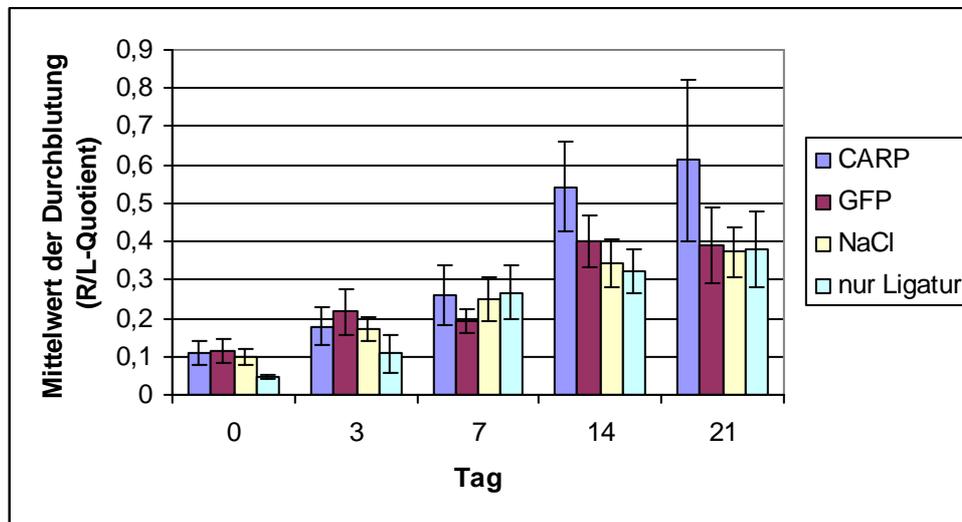


Abb. 4.7: Darstellung der mittleren Durchblutungsrate der drei Kontrollgruppen im Vergleich zu den CARP-GFP-exprimierenden Tieren. Ab dem 14. Tag zeigte sich eine charakteristisch verbesserte Durchblutung der CARP-GFP-infizierten Tiere im Vergleich zu den GFP-infizierten, NaCl-injizierten und den ausschließlich ligierten Kontrollgruppen. Die Balken markieren die jeweilige Standardabweichung.

Abschließend wurden alle drei Kontrollgruppen miteinander verglichen und deren Ergebnisse mit der Gruppe der CARP-GFP-exprimierenden Tiere in einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Test nach Bonferroni gegenübergestellt. Die Infektion mit Ad.5.1-CARP-GFP wurde insgesamt drei Mal durchgeführt in einer Gruppengröße von  $n = 5$ ,  $n = 5$  und  $n = 4$  Tieren.

Am 14. Tag wurde bei den Ad.5.1-CARP-GFP-infizierten Tieren ein verbesserter Blutfluss von  $0,54 \pm 0,12$  und bei den Kontrolltieren, die mit Ad.5.1-GFP infiziert wurden ( $n = 8$ ), ein verbesserter Blutfluss von  $0,40 \pm 0,07$ , bei den mit NaCl-behandelten Kontrolltieren ( $n = 7$ ) ein verbesserter Blutfluss von  $0,34 \pm 0,06$  und den ausschließlich ligierten Tieren ( $n = 7$ ) ein verbesserter Blutfluss von  $0,32 \pm 0,06$  festgestellt. Die Verbesserung des Blutflusses der CARP-Gruppe im Vergleich zur GFP-Kontrollgruppe war hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) und die Zunahme des Blutflusses der CARP-Gruppe zur NaCl-behandelten und zur ausschließlich ligierten Kontrollgruppe waren jeweils höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ). Die jeweiligen Kontrollgruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied zueinander. Bis zum 21. Messtag konnte der Blutfluss in allen Gruppen nur noch gering gesteigert werden

(CARP =  $0,61 \pm 0,21$  vs. GFP =  $0,39 \pm 0,10$ ; NaCl =  $0,37 \pm 0,07$ ; nur Ligatur =  $0,38 \pm 0,10$ ). Der Unterschied der Ad.5.1-CARP-GFP-infizierten Gruppe zu den Kontrollgruppen blieb jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ) (Tab. 4.1, Tab. 4.2, Abb. 4.8).

	Post op	3. Tag	7. Tag	14. Tag	21. Tag
<b>CARP</b>	$0,11 \pm 0,03$	$0,18 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,08$	$0,54 \pm 0,12$	$0,61 \pm 0,21$
<b>GFP</b>	$0,12 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,03$	$0,40 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,10$
<b>NaCl</b>	$0,10 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,06$	$0,34 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,07$
<b>Nur Ligatur</b>	$0,05 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,07$	$0,32 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,10$

Tab. 4.1: Auswertung der LDI-Messung der CARP-infizierten Mäuse und der drei Kontrollgruppen (R/L-Quotient). Nach 14 Tagen zeigte sich ein hoch signifikanter, nach 21 Tagen ein noch signifikanter Unterschied (siehe Tab. 4.2).

	14. Tag	21. Tag
<b>CARP vs. GFP</b>	$p < 0,01$	$p < 0,05$
<b>CARP vs. NaCl</b>	$p < 0,0001$	$p < 0,05$
<b>CARP vs. nur Ligatur</b>	$p < 0,0001$	$p < 0,05$
<b>GFP vs. NaCl</b>	n.s.	n.s.
<b>GFP vs. nur Ligatur</b>	n.s.	n.s.
<b>NaCl vs. nur Ligatur</b>	n.s.	n.s.

Tab. 4.2: Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Test nach Bonferroni ergab am 14. Tag post infektionem mit CARP ein hoch signifikantes Ergebnis im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Signifikanz konnte auch am 21. Tag noch belegt werden. Die drei Kontrollgruppen zeigten untereinander an keinem der beiden Messtage eine charakteristische Differenz in der Entwicklung des Blutflusses.

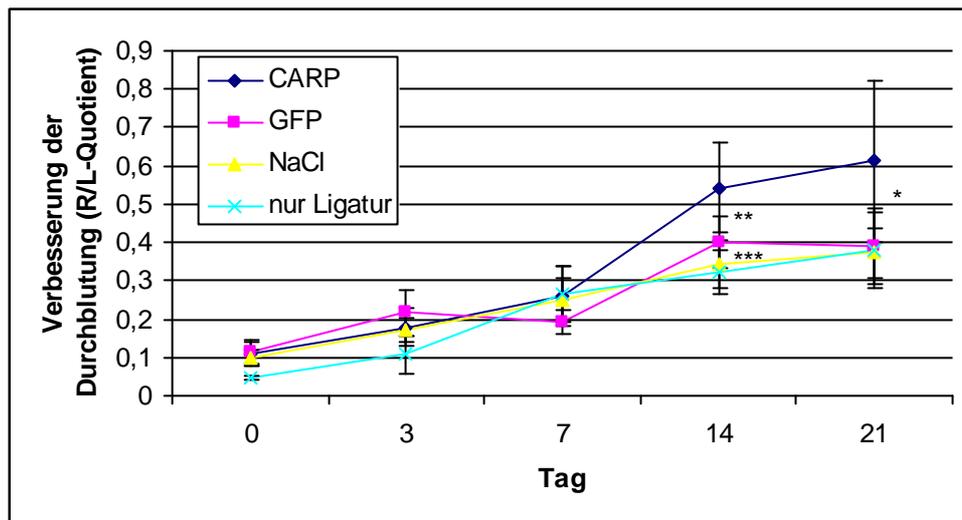
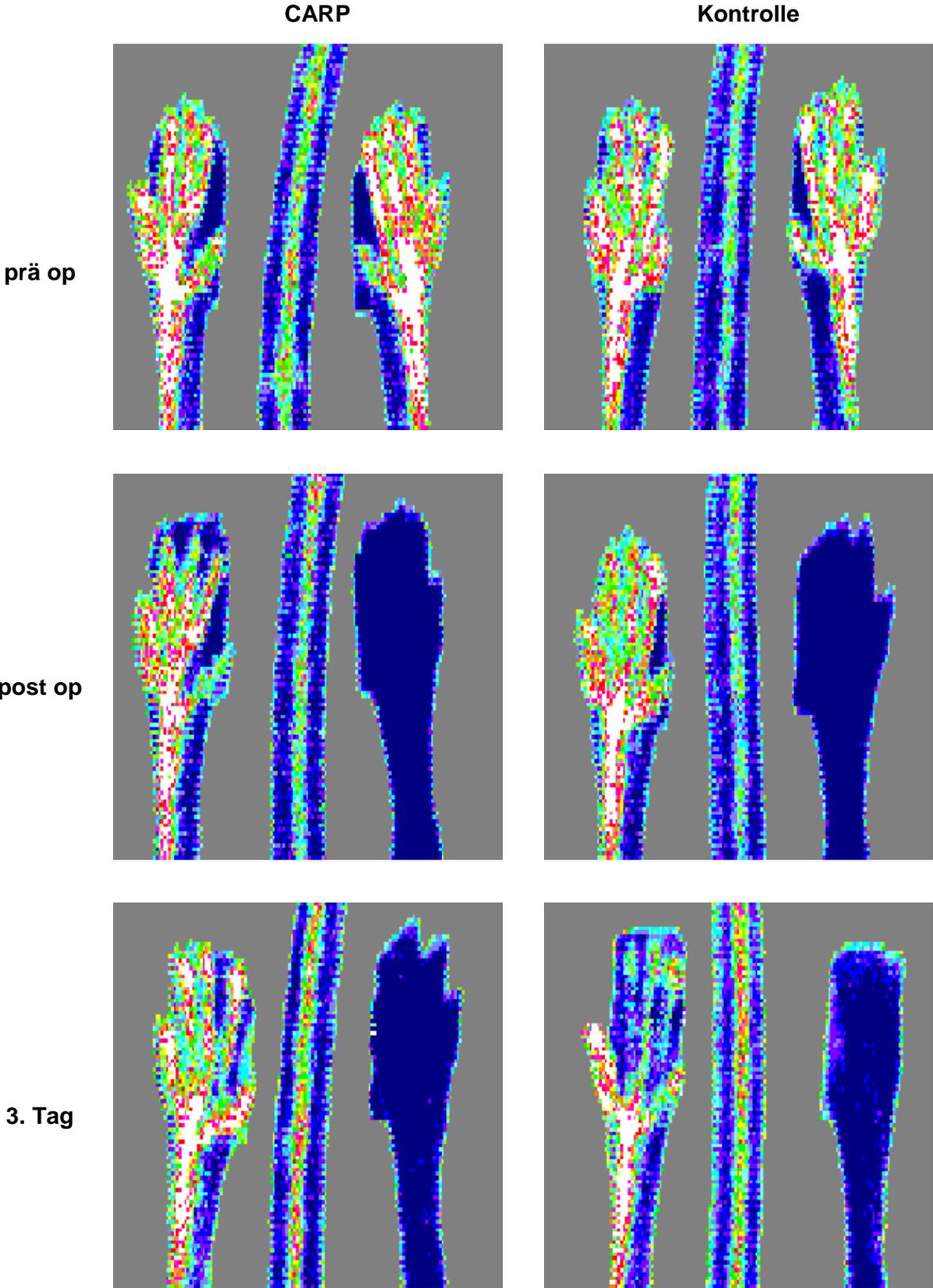


Abb. 4.8: LDI-Messung der Durchblutungsrate bei den drei Kontrollgruppen im Vergleich zur Gruppe der CARP-GFP-exprimierenden Tiere. Die Virusapplikation erfolgte 24 h vor Okklusionsoperation. Der Unterschied der CARP-GFP-infizierten ( $n = 14$ ) zur GFP-Kontrollgruppe ( $n = 8$ ) war am 14. Tag hoch signifikant  $** = p < 0,01$  und zu den NaCl-behandelten ( $n = 7$ ) und ausschließlich ligierten Kontrollgruppen ( $n = 7$ ) höchst signifikant  $*** = p < 0,0001$ . Auch am 21. Tag blieb die Signifikanz  $* = p < 0,05$  der CARP-GFP-Gruppe gegenüber den drei Kontrollgruppen erhalten. Die Kontrollgruppen wiesen untereinander zu keinem der Messtage eine charakteristische Differenz in der Entwicklung des Blutflusses auf. Die Balken markieren die jeweilige Standardabweichung.

Da die Kontrollgruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede in der Durchblutung zeigten, wurden diese nachfolgend zu einer Gruppe zusammengefasst und deren Ergebnisse mit der Gruppe der CARP-GFP-exprimierenden Tiere verglichen. Abb. 4.9 zeigt repräsentative mittels des LDI erhaltene Grafiken, die die Wiederherstellung der Durchblutung als Maß für das Kollateralgefäßwachstum zeigen.



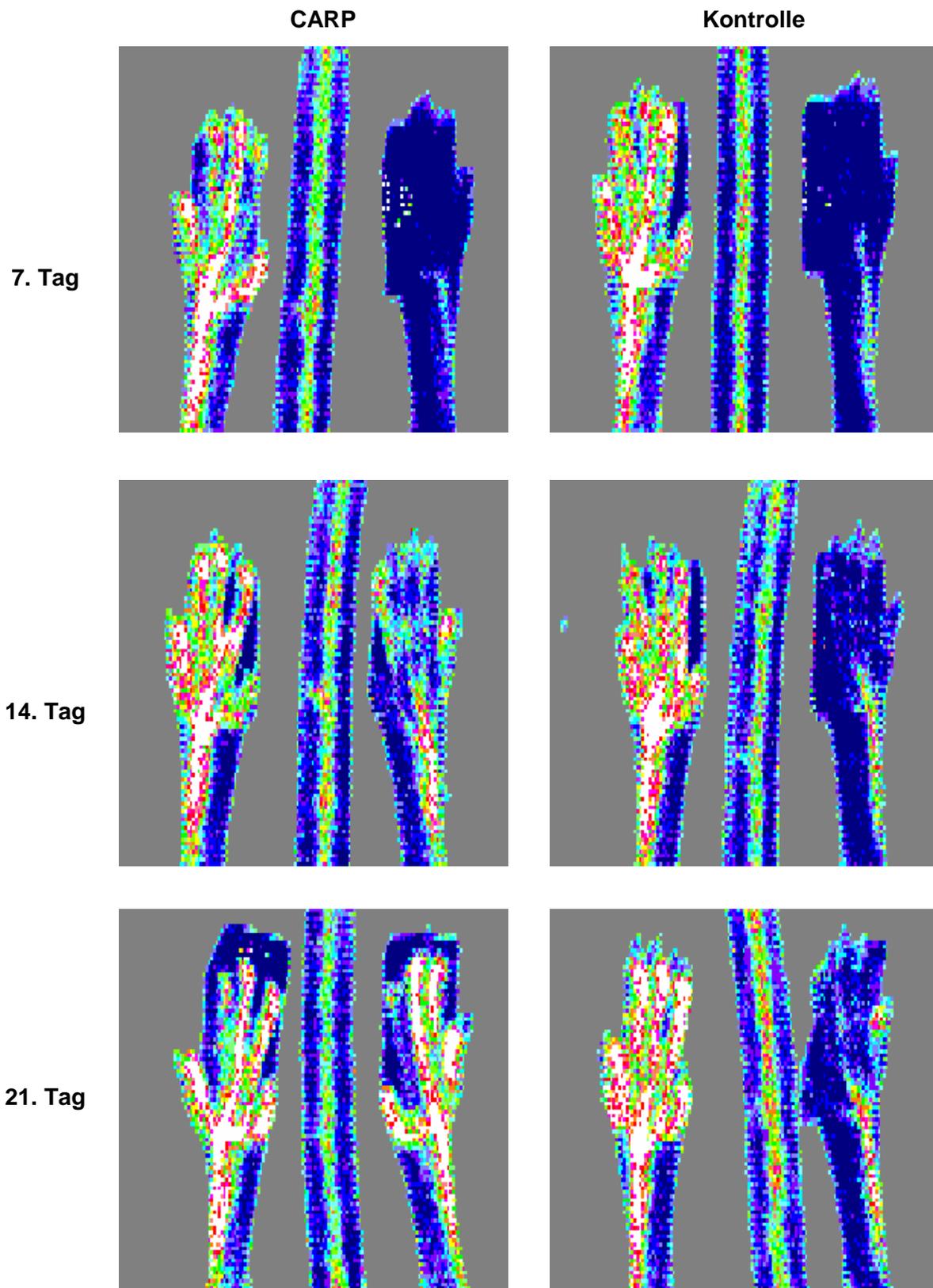


Abb. 4.9: Repräsentative Abbildungen des Laser-Doppler-Imaging der CARP-GFP-infizierten Tiere und der Kontrollgruppen prä und post op sowie am 3., 7., 14. und 21. Tag gemessen. Auch bildlich stellt sich der signifikante Unterschied des Blutflusses ab dem 14. Tag dar (blau = sehr schlechte Durchblutung; grün = leichte Durchblutung; gelb = mittlere Durchblutung; rot = gute Durchblutung; weiß = sehr gute Durchblutung).

Im Weiteren wurde untersucht, ob eine Infektion der Adduktorenmuskulatur mit Ad.5.1-CARP-GFP ohne Verschluss der A. femoralis einen Einfluss, z. B. in Form einer Gefäßdilatation, auf das nicht-okkludierte Gefäßsystem ausübt ( $n = 3$ ). Diese Form des Gentransfers verlief ohne Einwirkung auf die Hämodynamik und ohne erkennbare Änderung der Gefäßmorphologie in der histologischen Auswertung.

Die Messung der Sauerstoffsättigung zeigte in keinem der Versuche einen signifikanten Unterschied der CARP-GFP-behandelten Mäuse zu den Kontrolltieren. Die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins verlief in den CARP-GFP-behandelten Tieren nahezu konstant parallel zu den Werten der Kontrollgruppe (Abb. 4.10).

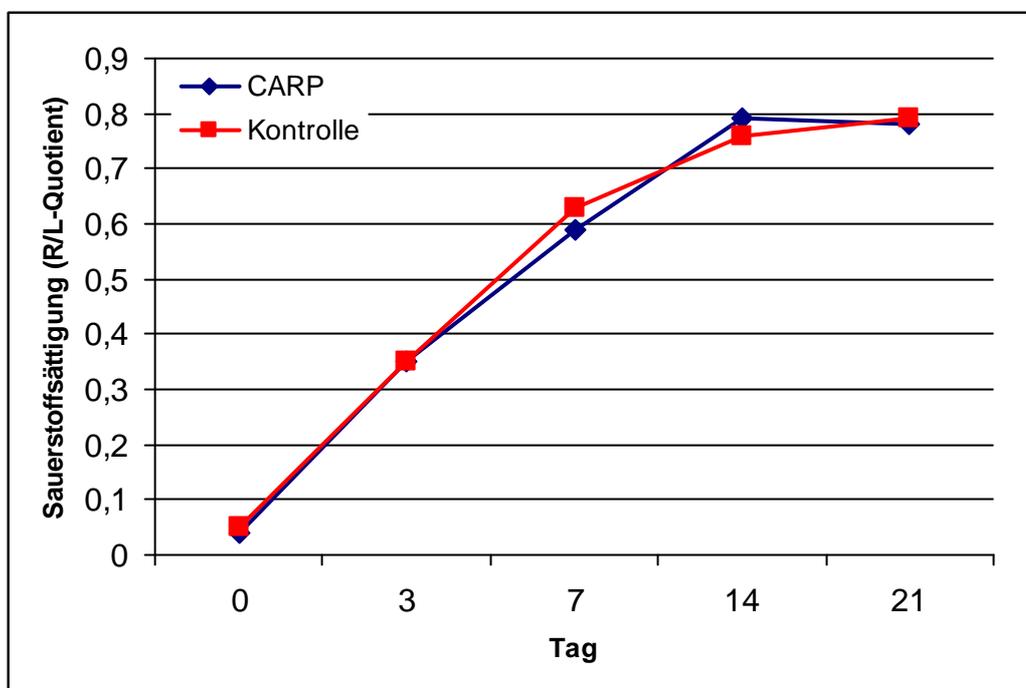


Abb. 4.10: Messung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins über 21 Tage. Es zeigte sich kein charakteristischer Unterschied zwischen den CARP-GFP-behandelten Mäusen ( $n = 14$ ) und den Kontrolltieren ( $n = 22$ ).

#### 4.2.2 Bewegungsaktivität der okkludierten Hintergliedmaße nach CARP-Genapplikation

Die Bewegungsaktivität der okkludierten Hintergliedmaße stellte einen Funktionstest dar, die vor den LDI- und Sauerstoffmessungen an den Tagen 3, 7, 14 und 21 bewertet wurde. Keines der Tiere erlitt eine Zehen- oder gar eine komplette Nekrose des Fußes. Das Experiment wurde in drei Versuchsreihen wiederholt. Die CARP-

GFP-exprimierenden Tiere zeigten eine schnellere Verbesserung der Bewegungsaktivität als die Kontrollgruppe (Tab. 4.3). Am 14. Tag ließ sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Kontrollgruppe ( $2,42 \pm 0,49$ ) und der CARP-GFP-infizierten Gruppe ( $3 \pm 0,65$ ) feststellen. Auch die Bewertung der Bewegungsaktivität am 21. Tag war in der CARP-GFP-infizierten Gruppe signifikant verbessert (CARP =  $3,64 \pm 0,48$  vs. Kontrolle =  $3,17 \pm 0,55$ ;  $p < 0,05$ ) (Abb. 4.11).

	3. Tag	7. Tag	14. Tag	21. Tag
<b>CARP</b>	$1,21 \pm 0,41$	$2,21 \pm 0,41$	$3,00 \pm 0,65$	$3,64 \pm 0,48$
<b>Kontrolle</b>	$1,08 \pm 0,28$	$2,00 \pm 0,35$	$2,42 \pm 0,49$	$3,17 \pm 0,55$
<b>T-Test</b>	n. s.	n. s.	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Tab. 4.3: Die Bewegungsaktivität der CARP-GFP-infizierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Scoring-System der Bewegungsaktivität siehe Seite 34, Kapitel 3.1.2.3). Am 14. und 21. Tag zeigten die CARP-GFP-infizierten Tiere eine signifikant bessere Bewegungsaktivität der okkludierten Gliedmaße als die Kontrolltiere ( $p < 0,05$ ).

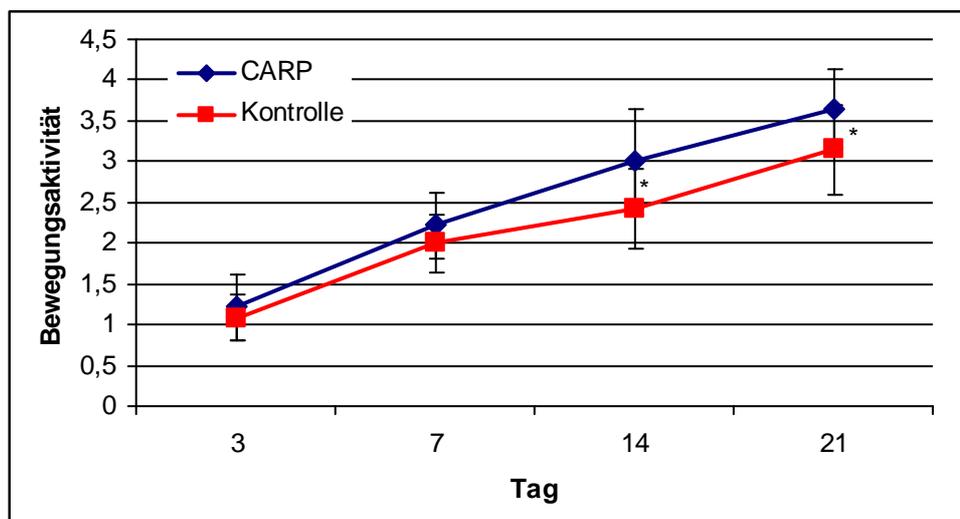


Abb. 4.11: Verlauf der Bewegungsaktivität am 3., 7., 14. und 21. Tag (Scoring-System der Bewegungsaktivität siehe Seite 34, Kapitel 3.1.2.3). Die CARP-GFP-exprimierenden Tiere ( $n = 14$ ) zeigten am 14. und 21. Tag eine signifikant bessere Bewegungsaktivität der okkludierten Gliedmaße als die Kontrolltiere ( $n = 22$ ) ( $* = p < 0,05$ ). Die Balken markieren die jeweilige Standardabweichung.

### 4.2.3 Überprüfung des Gewichts der Gastrocnemiusmuskulatur

Nach der Perfusionsfixation am 21. Tag wurde der Gastrocnemiusmuskel jeder Seite, sowohl in der CARP-GFP-infizierten Gruppe als auch bei den Kontrolltieren, präpariert und entnommen. Das durchschnittliche Gewicht wurde über den R/L-Quotienten ermittelt. Nach 21 Tagen konnte kein signifikanter Gewichtsunterschied des Gastrocnemiusmuskels der rechten okkludierten Gliedmaße der CARP-GFP-infizierten Tiere ( $n = 14$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n = 22$ ) verzeichnet werden (CARP =  $0,66 \pm 0,15$  vs. Kontrolle =  $0,62 \pm 0,15$ ) (Abb. 4.12).

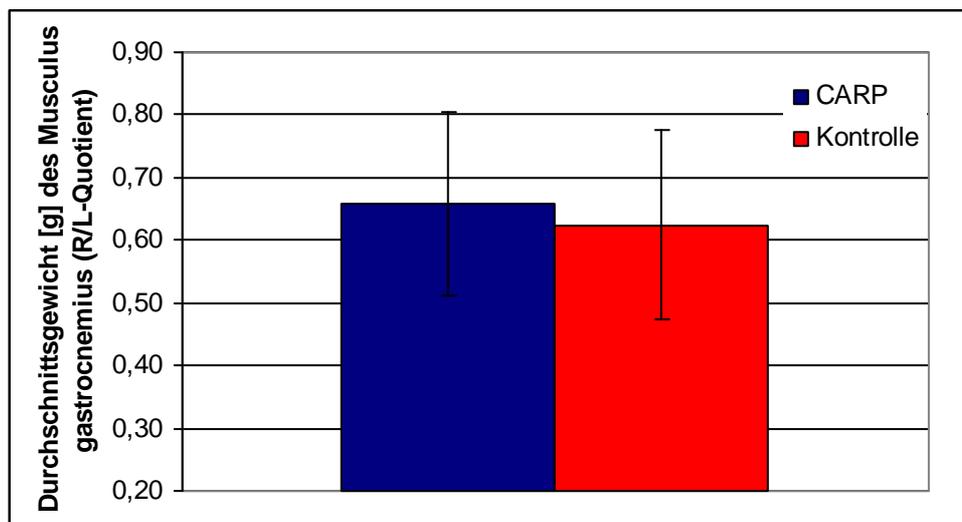


Abb. 4.12: Das Gewicht des Gastrocnemiusmuskels der rechten Gliedmaße mit Femoralokklusion der CARP-GFP-exprimierenden Gruppe ( $n = 14$ ) zeigte nach 21 Tagen keinen signifikanten Unterschied zu dem Muskelgewicht des Musculus gastrocnemius der ebenfalls rechtseitigen femoralokkludierten Gliedmaße der Kontrolltiere ( $n = 22$ ). Die Balken markieren die jeweilige Standardabweichung.

### 4.2.4 Morphometrische Auswertung der Kollateralgefäße nach CARP-GFP-Genapplikation

Am 21. Tag wurden die CARP-GFP-exprimierenden Mäuse ( $n = 14$ ) und die Kontrollgruppen ( $n = 22$ ) nach erfolgter LDI-Messung und der Dokumentation der Sauerstoffsättigung getötet und sofort perfusionsfixiert, um die Adduktorenmuskulatur zur morphometrischen Bestimmung zu gewinnen. Aus den Muskelbäuchen wurden Gefrierschnitte in drei Ebenen angefertigt, die mit monoklonalen Antikörpern, gerichtet gegen glatte Muskelzellen und Endothelzellen sowie einem Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA, inkubiert wurden. Die

Färbung der monoklonalen Antikörper erfolgte über fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sekundärantikörper. Mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Leica wurden die Kollateralgefäße fotografiert und eingescannt. Pro Ebene wurden 7 Gefrierschnitte mit im Durchschnitt 6 Kollateralgefäßen abgelichtet und vermessen. Abb. 4.13 zeigt je ein repräsentatives Mikroskopiebild einer ausgewachsenen Kollateralarterie der Kontrollgruppe und der CARP-GFP-exprimierenden Gruppe.

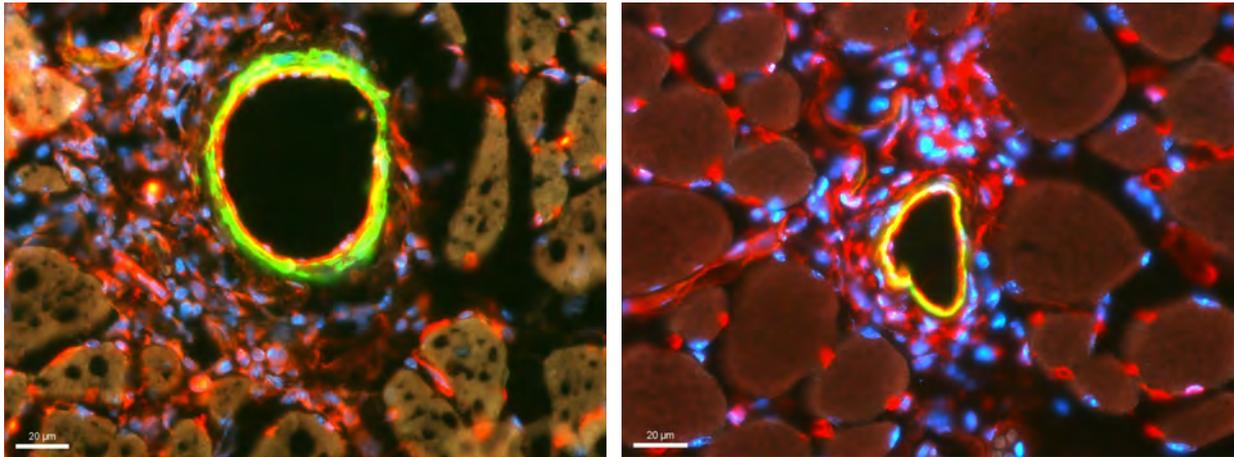


Abb. 4.13 A: Kollateralgefäß nach 21tägiger CARP-GFP-Expression.

Abb. 4.13 B: Kollateralgefäß eines Kontrolltieres nach 21 Tagen.

Abb. 4.13: Bild A zeigt repräsentativ ein Kollateralgefäß nach 21tägiger Infektion mit Ad.5.1-CARP-GFP und Bild B ein Kollateralgefäß aus der Kontrollgruppe nach Verschluss der Femoralarterie. Beide Kollateralgefäße sind von Muskelfaserquerschnitten und Kapillaren umgeben. Die grün-fluoreszierende glatte Muskulatur des in Bild A abgebildeten Gefäßes ist bereits rein optisch kräftiger ausgebildet als diese in Bild B und belegt so bereits das bessere Kollateralgefäßwachstum. Die Endothelzellschicht in beiden Kollateralgefäßen ist rot-fluoreszierend dargestellt. Ebenso sind die Endothelzellen von Kapillargefäßen in beiden Bildern rot-fluoreszierend gefärbt. Die blaue Fluoreszenz markiert DNA. Diese ist sowohl in der Endothelzellschicht und der glatten Muskulatur der Kollateralgefäße als auch perivaskulär zu finden. Sie steht für die Infiltration von Monocyten und Makrophagen<sup>66</sup>.

Schon bei der mikroskopischen Untersuchung konnte eine etwas ausgeprägtere Wanddicke in den CARP-GFP-infizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden. Bei der morphometrischen Auswertung (R/L-Quotient) wurde der visuelle Eindruck bestätigt. Die Wanddicke der CARP-GFP-exprimierenden Gruppe ( $n = 14$ ) zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zur Kontrollgruppe (CARP =  $1,21 \pm 0,12$  vs. Kontrolle =  $1,04 \pm 0,16$ ) (Abb. 4.14). Die Auswertung des

Gefäßdurchmessers der Kollateralarterien erreichte keinen charakteristischen Unterschied (CARP =  $1,66 \pm 0,31$  vs. Kontrolle =  $1,60 \pm 0,41$ ) (Abb. 4.15).

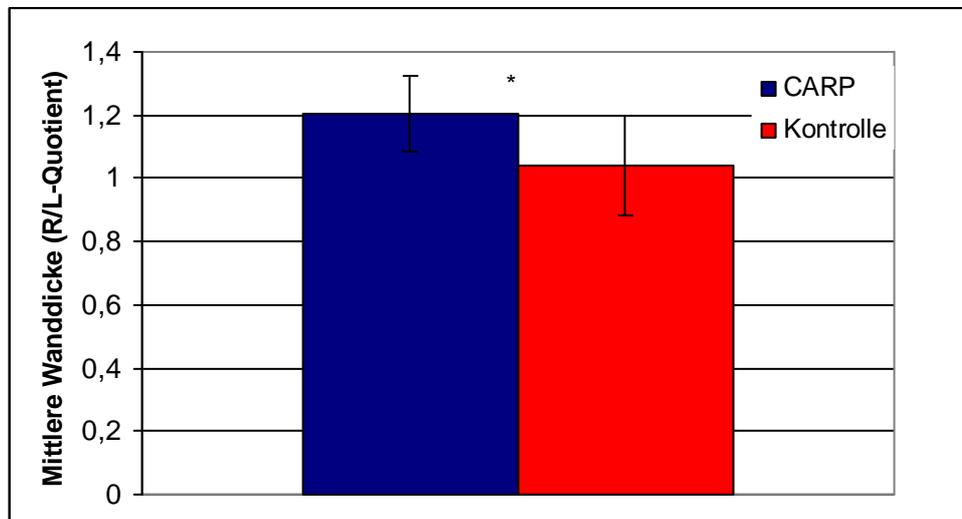


Abb. 4.14: Der Einfluss der CARP-Expression nach Gentransfer mit Ad.5.1-CARP-GFP ( $n = 14$ ) belegte in der morphometrischen Beurteilung eine signifikante Zunahme der Gefäßwanddicke im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n = 22$ ) (\* =  $p < 0,05$ ). Die Balken markieren die jeweilige Standardabweichung.

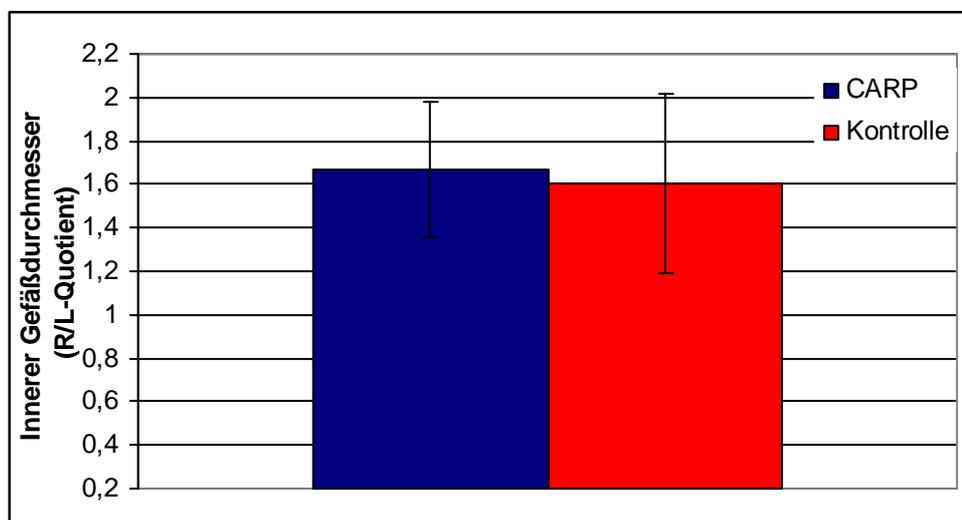


Abb. 4.15: Die Analyse des Gefäßdurchmessers zeigte in der morphometrischen Auswertung keine signifikante Veränderung durch den Einfluss des CARP-Gentransfers ( $n = 14$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $n = 22$ ). Die Balken markieren die jeweilige Standardabweichung.

## 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, unter Einsatz eines adenoviralen Vektors den Gentransfer per intramuskuläre Applikation in die Adduktorenmuskulatur im Modell des ischämischen Maushinterlaufs zu etablieren. Unter Anwendung dieser Methode sollte der Einfluss des Transkriptions-Kofaktors Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP) auf das Wachstum der Kollateralgefäße nach experimentellem Verschluss der Femoralarterie untersucht werden.

Die Quantifizierung des Kollateralgefäßwachstums erfolgte unter der Durchführung der hämodynamischen Messung und der Überprüfung der Sauerstoffsättigung in vivo sowie der morphometrischen Auswertung post mortem.

Die Studie konnte beweisen, dass der erfolgreiche Gentransfer nach intramuskulärer Infektion mit einem viralen Vektor möglich ist. Im Falle des CARP-Gentransfers konnte das Kollateralgefäßwachstum signifikant verbessert werden.

Zusammengefasst erbringt die durchgeführte Studie den Nachweis, dass die Stimulierung des Kollateralgefäßwachstums im Zuge einer Gentherapie prinzipiell möglich ist.

### 5.1 Ligatur der Femoralarterie im Mausmodell

Zur Untersuchung des Einflusses der intramuskulären adenoviralen Genapplikation wurde das Mausmodell der chronischen Ischämie der Hintergliedmaße gewählt. Für das Versuchsvorhaben wurden spezifische pathogenfreie, maskuline BALB/ c Mäuse bezogen, die sich aufgrund schwach ausgebildeter Kollateralgefäße durch eine geringere Revaskularisation dieser arterio-arteriellen Anastomosen in der ischämischen Hintergliedmaße auszeichnen und sich daher bestens für Untersuchungen auf dem Gebiet der Arteriogenese eignen<sup>31</sup>. Demnach war zu erwarten, dass diese Linie mit schwach ausgebildeten präexistenten Kollateralanastomosen eine Beschleunigung der Arteriogenese besser abbildet als eine Linie mit stärker ausgebildeten präexistenten Kollateralgefäßen, wie sie der Mausstamm C57Bl/ 6 aufweist<sup>31</sup>. Die Ligatur der Femoralarterie stellt ein etabliertes Modell zur Quantifizierung des Kollateralgefäßwachstums dar<sup>31, 86</sup>.

Das Wachstum der Kollateralgefäße nach Okklusion der Femoralarterie ist charakteristisch für die Arteriogenese. Initial wird hierbei das Blut entlang des sich aufbauenden Druckgradienten, auf Grund des fallenden Blutdruckes in der distalen

Region, über die präexistenten Kollateralgefäße umgeleitet. Das Gebiet der Kollateralgefäße befindet sich folglich weiterhin im normoxischen Bereich<sup>6</sup>. Die distalen Abschnitte der Hintergliedmaße werden auf Grund des deutlich verminderten Blutflusses hypoxisch, wodurch Angiogenesefaktoren induziert werden, die das lokale Wachstum von Kapillargefäßen in der ischämischen Region anregen<sup>87</sup>.

Das Auswachsen präexistenter Gefäße spielt vor allem bei auftretenden Gefäßverengungen lebenswichtiger Organe wie dem Herz oder dem Gehirn eine zentrale Rolle. Diese auch als Kollateralen bezeichneten Gefäßstrukturen übernehmen hierbei eine schnelle Minimalversorgung und durch anschließendes Auswachsen zu soliden Arterien auch langfristig die gesamte Versorgung des betroffenen Gewebes. Während eine höhere Anzahl von Kapillaren als Produkt der Angiogenese nicht in der Lage ist, das Perfusionsdefizit durch ein verengtes Hauptgefäß zu kompensieren, ist in den Arterien der Transport großer Mengen an Blut möglich<sup>87</sup>.

## 5.2 Viraler Gentransfer

Der Einsatz von gentherapeutischen Methoden lässt derzeit auf die Behandlung von Erbkrankheiten und erworbenen Krankheiten hoffen<sup>88</sup>. Hierbei werden sowohl virale als auch nicht-virale Vektoren in vitro und in vivo angewendet. Diese bewirken schließlich die Freisetzung von Proteinen direkt an dem Ort der gewünschten therapeutischen Wirkung. Da der Vektor bestimmte Eigenschaften wie eine hohe Transduktionseffizienz, den erfolgreichen Gentransfer in proliferativen und nicht-proliferativen Gewebestrukturen und eine langfristige Genexpression aufweisen muss, werden derzeit virale Vektoren bevorzugt verwendet. Zum Gentransfer werden rekombinante replikationsdefekte Viren eingesetzt, um eine inflammatorische oder immunologische Antwort sowie einen zytopathologischen Prozess im Zielgewebe bzw. im Zielorganismus zu minimieren oder möglichst ganz auszuschließen. Der Einsatz replikationsfähiger Viren könnte im Zielorganismus völlig außer Kontrolle geraten und auch an Dritte mit fatalen Folgen übertragen werden. Das Konzept der lokalen Gentherapie wird derzeit intensiv von verschiedenen Gruppen mit Hinblick auf die therapeutische Wirkungsweise untersucht. So konnten die ersten Erfolge in der Grundlagenforschung zur Tumorthherapie, Hämophilie und Wundheilungsstörung bei Diabetes mellitus verzeichnet werden<sup>88-92</sup>. Auch auf dem Gebiet der

ischämischen Gefäßerkrankungen, insbesondere der kardiovaskulären Erkrankungen, wird intensive gentherapeutische Forschungsarbeit geleistet.

Eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen mit arteriogenen Faktoren ist die Generierung ausreichend hoher lokaler Proteinkonzentrationen. Der therapeutische Gentransfer könnte hierbei dem Einsatz von rekombinantem Protein überlegen sein, denn die direkte Applikation von arteriogenen Faktoren birgt diverse Nachteile, wie z. B. die Notwendigkeit einer wiederholten Verabreichung, systemische Nebenwirkungen und hohe Behandlungskosten<sup>93</sup>. Außerdem dürfen Beeinträchtigungen, wie z. B. lokale Gefäßschäden durch die erfolgte Applikationsmethode, nicht unterschätzt werden. Mit Hilfe eines viralen Vektors kann die Proteinfreisetzung direkt am Ort der gewünschten therapeutischen Wirkung erfolgen und über einen bestimmten Zeitraum konstant gehalten werden.

Ende der 80er Jahre wurde der erste in vivo-Genttransfer im Schweinemodell durchgeführt, wobei ein für Beta-Galaktosidase kodierender retroviraler Vektor auf die iliofemorale Arterien übertragen wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass ein spezifischer, lokal begrenzter Gentransfer in vivo möglich ist<sup>94</sup>.

Für die Stimulation der Arteriogenese mittels Gentherapie ist die transiente Genexpression ausreichend, da das Gefäßwachstum innerhalb der ersten 14 Tage nach eingetretener Gefäßokklusion am besten aktiviert werden kann<sup>87</sup>. Eine längere Expression des Transgens könnte möglicherweise ein pathologisches Gefäßwachstum provozieren. Diese Gefahr ist besonders groß, wenn das Transkript in ektopische Gewebe gelangt oder gar im Gefäßsystem zirkuliert. Außerdem spielen der Zeitpunkt des Gentransfers und damit die Verfügbarkeit des Genprodukts eine entscheidende Rolle. Das Genprodukt muss demnach zu dem Zeitpunkt zur Verfügung stehen, an dem es im Prozessablauf während der Arteriogenese benötigt wird.

### **5.2.1 Nachweis der Expression des adenoviralen Genkonstrukts in vitro und anschließende Infektion der Adduktorenmuskulatur**

In dieser Studie wurde zur Übertragung des adenoviralen Vektors die Methode der intramuskulären Infektion entlang der Kollateralgefäße in der chronisch ischämischen Hintergliedmaße im Mausmodell gewählt. Diese Methode stellt zum einen eine minimal invasive lokale Applikation des Transgens dar und galt zum anderen der Überprüfung des Vektors in vivo. Es wurde kontrolliert, ob der Vektor zu einer

erfolgreichen Expression, zu keinen inflammatorischen oder immunologischen Prozessen im Zielgewebe führt und ob der von Boengler et al.<sup>69</sup> definierte frühe Transkriptions-Kofaktor CARP in einer Überexpression tatsächlich zu einer verbesserten Arteriogenese beitragen kann.

Initial wurden HUVECs mit dem Ad.5.1-CARP-GFP-Virus infiziert. Um einen erfolgreichen Gentransfer schnell überprüfen zu können, wurde dem Ad.5.1-CARP-Genkonstrukt ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) vorgeschaltet, das durch den gleichen Promotor wie das CARP-Gen gestartet wird. Mit hoher Wahrscheinlichkeit war zu erwarten, dass bei Nachweis der GFP-bedingten Fluoreszenz auch eine Expression von CARP stattgefunden haben muss. Somit war die Genexpression mikroskopisch einfach nachweisbar. Bereits nach 24 Stunden konnten die ersten grün fluoreszierenden Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Am dritten Tag zeigten mehr als 50 % der HUVECs eine grüne Fluoreszenz (siehe Seite 50, Abb. 4.1). Um auch einer adäquaten Expression des CARP-Gens sicher zu sein, wurde dieses im Western-Blot-Verfahren sicher detektiert. Das Virus erwies sich als funktionsfähiger Vektor. Anschließend erfolgte der Virustransfer in vivo. Das Virus wurde hierzu in die Adduktorenmuskulatur in einer Menge von 5 x 50 µl injiziert, zunächst im Vorversuch ohne Okklusion der Femoralarterie. Nach 2, 4, 7 und 21 Tagen wurde je eine Maus auf die Expression von GFP in der Adduktorenmuskulatur bzw. in der Gefäßwand untersucht. Der zweite und vierte Tag zeigten eine erfolgreiche Transfektion von Myozyten, während der siebte Tag auch eine deutliche Expression von GFP in der Kollateralgefäßwand erkennen ließ. Am 21. Tag konnte nur noch eine Eigenfluoreszenz beobachtet werden. Das Virus erwies sich demnach auch als transienter Vektor in vivo über wenigstens sieben Tage erfolgreich. Nachfolgend wurde eine Versuchsreihe mit Okklusion der Femoralarterie und direkt anschließender Virusapplikation durchgeführt. Die hämodynamischen Messungen sowie die Überprüfung der Sauerstoffsättigung und die Beurteilung der Bewegungsaktivität präsentierten an keinem der Messtage einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Es wurde an diesen Daten die Hypothese abgeleitet, dass die Expression des CARP als so genanntes „early response gene“ bei dem gewählten Injektionszeitpunkt des Virus zu spät starten könnte oder aber dass das Virus aufgrund der Femoralokklusion und der damit einhergehenden Inflammation keine ausreichende Infektion der Kollateralgefäße bewirkt haben könnte. Aus diesem Grund wurde das Experiment wiederholt, wobei die Injektion 24 Stunden vor

Femoralarterienokklusion durchgeführt wurde. Die Ergebnisse des 14. Tages zeigten einen hochsignifikanten und die des 21. Tages einen signifikanten Unterschied in der Blutflussmessung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wir konnten damit zum einen die erfolgreiche Infektion durch intramuskuläre Injektion eines adenoviralen Genkonstrukts und zum anderen eine Verbesserung der Kollateralisierung durch die Überexpression des frühen Transkriptions-Kofaktors CARP nachweisen. Das CARP stellt somit einen potentiellen Faktor zur Verbesserung der Revaskulation im ischämischen Gebiet dar.

### **5.2.2 Einfluss einer vektorinduzierten Immunreaktion auf die Arteriogenese**

Aufgrund der potentiellen Immunogenität viraler Vektoren kann deren Einsatz in vivo grundsätzlich eine Immunantwort auslösen, die Gewebeschäden und eine Abnahme der transgenen Expression bewirken könnte. Um diese inflammatorischen Prozesse zu minimieren, wurden adenovirale Vektoren konstruiert, denen bestimmte Regionen des Erbguts entfernt wurden. Doch auch diese Deletionsmutanten können noch eine Gewebetoxizität und Immunantwort provozieren. Da Adenoviren ubiquitär vorkommende humane Pathogene sind, ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass Patienten, die sich einer adenoviralen Gentherapie unterziehen müssen, bereits zirkulierende Antikörper bzw. T-Gedächtniszellen gegen diesen Vektor besitzen. So zeigen Erwachsene eine hohe Prävalenz (57 %) von neutralisierenden Antikörpern gegenüber dem Adenovirus Typ 5.1<sup>95</sup>. Dies könnte den Erfolg des Gentransfers und der Genexpression in humanen Patienten erheblich beeinträchtigen. Mit Hilfe einer neuen chemischen Technik, die in dieser Studie noch keine Anwendung gefunden hat, ist es gelungen, die Immunantwort des Organismus auf das Adenovirus sehr stark zu reduzieren. Der Einsatz synthetischer Polymere führt zur chemischen Modifikation des Adenovirus, indem sie an bestimmte Proteinstrukturen des Virus kovalent binden und so eine signifikante Reduktion der viralen Antigenität und Immunogenität herleiten<sup>83</sup>. Außerdem bewirken die hydrophilen synthetischen Polymere eine Zunahme der Löslichkeit, die die Bioaktivität des Virus in vivo positiv unterstützt. Sie bilden einen Schutz gegenüber Proteasen aus, wodurch die virale Halbwertszeit im Serum erhöht wird. Dieses Verfahren der chemischen Modifikation mit synthetischen Polymeren wurde bisher im Modell der Maus evaluiert und wird derzeit in weiteren Tiermodellen untersucht. Dies könnte eine viel versprechende

Methode für einen sichereren Gentransfer mit Hilfe eines adenoviralen Vektors sein<sup>83</sup>.

In dieser Studie wurden adenovirale Deletionsmutanten der ersten Generation eingesetzt. Ihnen wurde die E1 Region, die für die Virusreplikation notwendig ist, und die E3 Region, die das Immunsystem des Wirts moduliert, entfernt. Obwohl eine Immunantwort in dieser durchgeführten Studie nicht untersucht ist, konnte in der Kontrollgruppe, die eine Infektion mit Ad.5.1-GFP erfahren hat, insgesamt kein Einfluss auf die Arteriogenese festgestellt werden.

### **5.3 CARP Überexpression potenziert den Vorgang der Arteriogenese**

Die Mechanismen der Arteriogenese sind bis dato noch nicht vollständig entschlüsselt. Der Hauptstimulus hierfür scheint die erhöhte Schubspannung in den präexistenten Kollateralgefäßen zu sein, die eine Expression verschiedener Gene in der Gefäßwand provoziert<sup>96</sup>. In der aktivierten Gefäßwand konnten einige Transkriptionsfaktoren identifiziert werden wie z. B. Egr-1 und CARP, die an der Initiation der Arteriogenese beteiligt sind. Außerdem werden diverse Adhäsionsmoleküle verstärkt präsentiert, die unter anderem zur Bindung von Monozyten führen, welche anschließend in die Gefäßwand einwandern und hier unterschiedliche Zytokine freisetzen, die das Gefäßwachstum weiter stimulieren<sup>7</sup>.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des frühen arteriogenen Transkriptions-Kofaktors CARP auf die Arteriogenese im Maushinterlaufmodell untersucht und mittels hämodynamischer Messung und Überprüfung der Sauerstoffsättigung in vivo sowie in postmortaler morphometrischer Auswertung quantifiziert. Unter Verwendung eines intramuskulär injizierten adenoviralen Vektors wurde das CARP-Gen in den Gefäßwänden der präformierten Kollateralgefäße überexprimiert.

Die Arteriogenese konnte unter dem Einfluss von CARP deutlich verstärkt werden. In der hämodynamischen Untersuchung (n=14) wurde ab dem 14. Tag eine bessere Durchblutung erreicht als in den drei Kontrollgruppen. Die erste Kontrollgruppe wurde mit Ad.5.1-GFP (n=8) infiziert, die zweite Kontrollgruppe erhielt eine intramuskuläre Injektion mit steriler NaCl-Lösung (n=7) und die dritte Gruppe wurde nur der Okklusionsoperation unterzogen (n=7). Die Messdaten zeigten am 14. Tag nach Anwendung der ANOVA- Analyse mit post-hoc Test nach Bonferroni eine hohe Signifikanz von  $p < 0,01$  im Falle von CARP vs. GFP (CARP =  $0,54 \pm 0,12$  vs. GFP =

0,40 ± 0,07) und eine höchste Signifikanz von  $p < 0,0001$  im Falle von CARP vs. NaCl (CARP = 0,54 ± 0,12 vs. NaCl = 0,34 ± 0,06) und CARP vs. der ausschließlich ligierten Kontrollgruppe (CARP = 0,54 ± 0,12 vs. nur Ligatur = 0,32 ± 0,06). Am 21. Tag konnten die CARP-exprimierenden Tiere noch eine Signifikanz von  $p < 0,05$  zu den jeweils einzelnen Kontrollgruppen aufrechterhalten (CARP = 0,61 ± 0,21 vs. GFP = 0,39 ± 0,10; NaCl = 0,37 ± 0,07; nur Ligatur = 0,38 ± 0,10).

Der adenovirale Gentransfer erfolgte 24 Stunden vor der Femoralokklusion. Um einen eventuellen Einfluss des Vektors zu überprüfen, wurden acht Kontrolltiere mit Ad.5.1-GFP ebenfalls 24 Stunden vor der Okklusion intramuskulär infiziert. In einem weiteren Kontrollansatz wurden sieben Tieren die gleiche Volumenmenge, wie zuvor bei den mit Ad.5.1-behandelten Tieren, an steriler NaCl-Lösung intramuskulär injiziert, um eine mögliche Beteiligung der Muskeltraumatisierung und der damit verbundenen Inflammation an der Arteriogenese auszuschließen. Schließlich wurde eine dritte Kontrollgruppe (n=7) nur mit der Femoralokklusion behandelt, um die beiden erst genannten Kontrollgruppen objektiv miteinander vergleichen zu können. Die drei Kontrollgruppen zeigten untereinander an allen Messtagen keinen signifikanten Unterschied in der Zunahme der Durchblutung. Aufgrund dessen wurden alle Kontrolltiere zu einer Gruppe zusammengefasst, da sie sowohl einzeln als auch in der Summe einen repräsentativen Vergleich zu den CARP-infizierten Tieren erlaubten.

Die Untersuchung der Sauerstoffsättigung der distalen Gliedmaße präsentierte keinen signifikanten Unterschied der CARP-behandelten Tiere zu den Kontrolltieren. Anatomisch gesehen verbinden die Kollateralgefäße nach Okklusion der Femoralarterie die Arteria femoris profunda mit der distal gelegenen Arteria saphena und gewährleisten so eine Minimalversorgung der distalen ischämischen Gliedmaße mit Blut<sup>31</sup>. Die bestehende Hypoxie des distalen Bereichs provoziert schließlich die Angiogenese, welche durch den Transkriptionsfaktor hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) verstärkt wird. HIF-1 aktiviert die Transkription verschiedener Gene, wie z. B. VEGF, das den stärksten angiogenen Faktor darstellt<sup>25, 97</sup>. Scholz et al.<sup>31</sup> konnte in seiner Studie belegen, dass es ausschließlich in der Gastrocnemiusmuskulatur und nicht im proximalen normoxischen Bereich der okkludierten Gliedmaße zu einer

Zunahme der Kapillardichte kommt und diese so in Verbindung mit dem Auswachsen der Kollateralgefäße zu einer schnellen Erholung der Sauerstoffversorgung beiträgt.

Trotz der sehr guten Entwicklung des Blutflusses ab dem 14. Tag in der Versuchsgruppe und der ab diesem Messtag signifikant besseren Bewegungsaktivität konnte bei der Gewichtsüberprüfung der Gastrocnemiusmuskulatur aus der rechten okkludierten Hintergliedmaße kein signifikanter Unterschied im Vergleich zum Gewicht der Gastrocnemiusmuskulatur der Kontrolltiere festgestellt werden. Scholz et al.<sup>31</sup> fand in seiner Studie heraus, dass im Besonderen der hier untersuchte Mausstamm BALB/ c durch die in der distalen Gliedmaße hervorgerufenen Ischämie mit einem deutlichen Abfall an ATP reagiert. Die durch die Ischämie hervorgerufene Hypoxie führt zur Erschöpfung des zellulären Sauerstoffs und damit zum Wechsel der aeroben zur anaeroben Synthese von ATP<sup>26</sup>. Die anaerobe Synthese von ATP ist jedoch nicht ausreichend und ermöglicht der Zelle nur ein kurzzeitiges Überleben. Schließlich führt der ATP-Mangel zu einem Versagen der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe. Die Zelle reagiert hierauf mit einer Zellschwellung (hydropische Degeneration), die zu fokalen Nekrosen oder gar zum Gewebeverlust ganzer Organstrukturen führen kann. Wird der Zelle wieder in ausreichender Menge Sauerstoff zugeführt, kann sie repariert werden, aber auch Degenerationserscheinungen aufweisen, die zu einer Funktionseinschränkung führen. Geschädigte Zellen können sich den neuen Gegebenheiten in Form von Hyperplasie, Hypertrophie oder Atrophie anpassen<sup>26</sup>. Die hier vorliegende Muskelatrophie kann zum einen auf eine mangelnde Versorgung mit Nährstoffen und Blut (Inanitionsatrophie) bezogen werden und zum anderen auf die reduzierte funktionelle Belastung der okkludierten Gliedmaße (Inaktivitätsatrophie) zurückgeführt werden<sup>26</sup>.

Die Untersuchung der morphometrischen Entwicklung nach dem Einsatz von CARP zeigte eine signifikante Zunahme der Gefäßwanddicke (CARP = 1,21 ± 0,12 vs. Kontrolle = 1,04 ± 0,16; p < 0,05), jedoch keinen charakteristischen Unterschied des Gefäßdurchmessers zu den Kontrolltieren. Es ist anzunehmen, dass der Zeitraum für das Auswachsen der Gefäße nicht ausgereicht hat. Wie die in vivo Messungen belegen, kam es erst ab dem 14. Tag zu einem deutlichen Durchblutungsanstieg, so dass zu vermuten ist, dass auch erst hier die arteriogenen Prozesse in größerem Maße zum Tragen kamen. Da die der Arteriogenese angehörigen Ab-, Um- und

Aufbaumechanismen jedoch parallel ablaufen, hat das Gefäßsystem vermutlich schon die Remodelierung der Gefäßwand begonnen, um den veränderten Druckverhältnissen adäquat entgegenwirken zu können und um so größere Mengen an Blut in die distale Region zu leiten, ohne eine schon ersichtliche Änderung im Gefäßdurchmesser aufzuweisen.

In in vitro Untersuchungen mit cos1-Zellen kam es nach einer Überexpression mit CARP zu einer Induktion des Akutphaseproteins Egr-1 (early growth response-1 = frühe Wachstumsreaktion 1), welches zuvor im Hinterlaufmodell der Maus nach Zunahme des FSS zusammen mit CARP über ein SSRE hochreguliert wurde<sup>69</sup>. Die Zunahme der Schubspannung führt also vorwiegend über Transkriptionsfaktoren zur Genexpression. Die Hochregulation des Transkriptions-Kofaktors CARP stimuliert die Expression des Transkriptionsfaktors Egr-1 und dieser aktiviert wiederum die Expression von TGF- $\beta_1$ , bFGF, PDGF-A und B, uPA und TF (tissue factor). All diese Gene beinhalten eine so genannte Egr-1-Bindungstelle (EBS) und sind an den Umbauprozessen der Arteriogenese aktiv beteiligt<sup>98</sup>. Wie wichtig die Induktion des Egr-1-Gens ist, zeigte eine Studie mit Egr-1-Knockout Mäusen, die ein deutlich geringeres Auswachsen der Kollateralgefäße ergab als die Gruppe der Wildtyp-Mäuse<sup>99</sup>. In einem weiteren Versuch erhielten Ratten eine Iliofemoralligatur mit anschließender adenoviraler Egr-Infektion der Adduktorenmuskulatur. Die durch den Gentransfer hervorgerufene Überexpression von Egr-1 führte zu einer verbesserten Kollateralisierung<sup>99</sup>. Die in dieser Studie durch den adenoviralen Gentransfer provozierte Überexpression von CARP hat demnach anscheinend ebenfalls zu einer Hochregulation von Egr-1 geführt und so einen gesteigerten arteriogenen Effekt beeinflusst.

TGF- $\beta_1$  wird während des Kollateralgefäßwachstums unter anderem durch die Wirkung von Egr-1 als Transkriptionsfaktor deutlich exprimiert und übt dabei Einfluss auf Monozyten bzw. Makrophagen und auf den Zellzyklus von glatten Muskelzellen und deren Differenzierung aus. Die exogene Applikation von TGF- $\beta_1$  im Kaninchenmodell zeigte zudem eine Zunahme der kollateralen Konduktanz und der Kollateralgefäßanzahl. Außerdem kam es zu einer stärkeren Expression von Mac-1-Rezeptoren und einer damit verbundenen stärkeren endothelialen Adhäsion und Transmigration der Monozyten<sup>59</sup>. Den Studien von Boengler et al.<sup>69</sup> zufolge führte die Infusion von TGF- $\beta_1$  im Kaninchenmodell zu einer Hochregulation der CARP-mRNA.

CARP scheint also ein Zielgen von TGF- $\beta_1$  während der frühen Arteriogenese zu sein. Die folgende in vitro Untersuchung mit c2/c2 Zellen zeigte, dass TGF- $\beta_1$  die Induktion des CARP über SMAD-Proteine bewirkt, die an den CARP-Promotor binden und über die stressabhängige mitogen-aktivierte Proteinkinase/ p38 eingeleitet wird<sup>69, 75</sup>. Die SMAD-Proteine werden in drei Gruppen unterteilt. Initial kommt es hierbei zur Phosphorylierung von SMAD 2 und 3, die für die rezeptorvermittelte Interaktion verantwortlich sind. Diese bilden ein Heteromer mit dem folgenden Signalüberträger SMAD 4, der die Funktion eines Ko-SMADs übernimmt. Schließlich tritt dieses Konstrukt in den Zellkern über und führt zur Aktivierung der Gentranskription. Zur dritten Gruppe gehören SMAD 6 und 7, die inhibitorisch auf TGF- $\beta_1$  wirken<sup>76, 100</sup>. Die Bindung an den CARP-Promotor erfolgt ausschließlich über SMAD 3, welches an die CAGA-Region des Promotors bindet und auf diese Weise die Expression von CARP einleitet<sup>76</sup>. Diese Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass Egr-1 nach Zunahme der Schubspannung und Freisetzung des Transkriptions-Kofaktors CARP deutlich stärker exprimiert wird. Die Freisetzung von Egr-1 nimmt wiederum direkten Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta_1$ , welches sein Signal auf CARP transduziert und dieses so erneut die Möglichkeit besitzt Egr-1 hochzuregulieren. CARP ist demnach aktiv an der Initiation und Regulation des Kollateralgefäßwachstums beteiligt. Die hier durchgeführte Studie konnte mit Hilfe der Überexpression von CARP die Transkription von Egr-1 triggern und so direkten Einfluss auf die Expression von TGF- $\beta_1$  nehmen, welches wiederum die weitere Expression von CARP positiv beeinflusst. Letztendlich kommt dieser regulative Kreislauf mit der Reduktion der Schubspannung auf die Gefäßwand zum Abbruch.

## 6 Zusammenfassung

Herz-Kreislaufkrankungen stellen die am häufigsten tödlich verlaufenden Krankheiten in Industrienationen dar. Trotz der vielfältigen und kostenintensiven chirurgischen Präventionsmaßnahmen existiert ein hohes postoperatives Rezidivrisiko. Außerdem besteht für viele Patienten z. B. aufgrund vorliegender multipler Gefäßerkrankungen keine Möglichkeit für einen operativen Eingriff. Deshalb sind neue therapeutische Ansätze notwendig. Große Hoffnung wird hier in die exogene Stimulierung endogener Gefäßanpassungsprozesse durch Wachstumsfaktoren gesetzt. Hierdurch soll das Wachstum von Gefäßen induziert werden, die die Verschlussstelle umgehen. Dieser Vorgang geschieht durch das Wachstum prä-existenter arterio-arteriolarer Verbindungen zu großen Kollateralarterien und wird als Arteriogenese bezeichnet.

Im Rahmen des Kollateralgefäßwachstums wurde die Notwendigkeit der Hochregulation von Transkriptionsfaktoren als Stimulus für die Arteriogenese diskutiert. So konnte eine deutliche Hochregulation des Transkriptions-Kofaktors CARP als einer der frühen Faktoren im Prozess der Arteriogenese nachgewiesen werden, der maßgeblich an der Induktion von Egr-1 beteiligt ist – ein Transkriptionsfaktor, der die Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen initiiert<sup>69</sup>.

In dieser Dissertation wurde der Einfluss der intramuskulären Infektion von Ad.5.1-CARP-GFP auf die Arteriogenese im Modell der ischämischen Hintergliedmaße der Maus untersucht. Zur quantitativen Analyse des Kollateralgefäßwachstums wurde *in vivo* die hämodynamische Entwicklung und der Grad der Sauerstoffsättigung im distalen Bereich der Hintergliedmaße gemessen und eine postmortale morphometrische Auswertung der ausgewachsenen Kollateralgefäße durchgeführt.

Die Ergebnisse des Experimentes zeigten, dass eine erfolgreiche Infektion der Kollateralgefäße per intramuskuläre Injektion möglich ist und sogar im Falle des Transkriptions-Kofaktors CARP die Arteriogenese stimuliert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier angewandte Methode des intramuskulären viralen Gentransfers mit Ad.5.1-CARP-GFP ein geeignetes Instrument zur Stimulation des Kollateralgefäßwachstums im Modell des ischämischen Maushinterlaufs darstellt und damit auch ein gutes therapeutisches Potential bei ischämischen Gefäßerkrankungen auf dem Gebiet der humanen Gentherapie beinhaltet.

## 7 Summary

Obstructive vessel diseases are known to be the most frequent cause of early death in Western societies. Despite the availability of numerous expensive surgical interventions post-operative relapses remain high. Furthermore, a marked number of patients are excluded from surgical interventions due to suffering from severe coronary and peripheral vascular diseases. Exogenous stimulation of an endogenous vascular adaptation process by specific growth factors has been considered to be an effective strategy for future treatments. Such therapeutic approaches target on stimulating adaptive vessel growth substituting for occluded arteries. This process is called arteriogenesis. It describes the growth of pre-existent arterio-arteriolar connections to large arteries.

Focussing on mechanisms of collateral artery growth has been discussed that an up-regulation of transcription factors might be stimuli. In this context it has been shown that for the transcription-cofactor CARP is up regulated during early phases of arteriogenesis, which consecutively induces expression of the transcription factor Egr-1. This, in turn, initiates expression of various growth factors and cytokines.

In the present study the influence of Ad.5.1-CARP-GFP on arteriogenesis, administered by local, intramuscular injections, was investigated in the ischemic mouse hind limb model. For the *in vivo* determination of collateral vessel growth hemodynamic development and rate of oxygen saturation were measured. In addition, morphometric analyses were conducted post mortem.

Data from this study show that intramuscular injections of adenoviral vectors lead to sufficient infection of the tissue. When Ad.5.1-CARP-GFP was used to induce CARP-expression in muscle tissue surrounding collaterals, a significant increase in collateral growth was detected.

In summary data from this study indicate that the applied method of intramuscular viral gene transfer is a qualified tool to stimulate collateral artery growth in the ischemic mouse hind limb model. Therefore stimulation of collateral growth via CARP-gene transfer can be considered as a promising approach treating ischemic vascular diseases in humans.

## **8 Anhang**

### **8.1 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel**

- § Adenosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- § Aqua dest.
- § Bovines Albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- § Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck Eurolab GmbH, Frankfurt)
- § Para-Formaldehyd (pFA)

### **8.2 Medikamente**

- § Dexpanthenol (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche, Grenzach-Wyhlen)
- § Heparin-Na (Liquemin® N 25 000, Roche, Grenzach-Wyhlen)
- § Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Braun (B. Braun AG Petzold GmbH, Melsungen)
- § Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10 %, Medistar GmbH, Holzwickede)
- § Xylazinhydrochlorid (Xylazin® 2 %, Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg)

### **8.3 Operationszubehör**

- § Chirurgisches Nahtmaterial (Perma-Hand® Seide, 6–0 mit Nadel nicht resorbierbar, Ethicon GmbH, Norderstedt)
- § Chirurgisches Operationsbesteck (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg; Döll & Co Medizintechnik GmbH, Hofheim am Taunus, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen)
- § Infusionsbesteck Intrafix® Air (B. Braun Petzold GmbH, Melsungen)
- § Insulinspritzen zu 1 ml/40 I.U. (B. Braun Petzold GmbH, Melsungen)
- § Innen sterile Insulinspritzen BD Micro-Fine™ zu 0,5 ml/50 I.U. mit 0,30 x 8 mm Kanüle (BD Biosciences, Heidelberg)
- § Leukosilk® S (Beiersdorf, Hamburg)

- § Schutzhandschuhe Vasco® puderfrei (unsteril, B. Braun Petzold GmbH, Melsungen)
- § Spritzen zu 2 ml (B. Braun Petzold GmbH, Melsungen)
- § Sterican® Einmal-Injektions-Kanülen der Größen 0,90 x 40 mm und 0,45 x 25 mm (B. Braun Petzold GmbH, Melsungen)
- § Venenpunktionsbesteck 0,8 x 20 mm (Venofix®; B. Braun Petzold GmbH, Melsungen)
- § Mehrwegehahn für Infusionsbesteck Discofix® (B. Braun Petzold GmbH, Melsungen)
- § Wärmeplatte

#### **8.4 Versuchstiere**

- § Spezifische pathogenfreie, maskuline BALB/ cAnNcrIbR Mäuse mit einem Körpergewicht von 21 bis 24 Gramm (Charles River Deutschland, Sulzfeld)

#### **8.5 Hämodynamik und Sauerstoffsättigung**

- § Laser-Doppler-Imager (Model MLDI 5063, Moor Instruments, Devon, UK)
- § Spektrometer AbTisSpec (LEA Medizintechnik GmbH, Gießen)
- § Stoppuhr
- § Wärmekammer

#### **8.6 Laborzubehör**

- § Feinwaage (Sartorius AG, Göttingen)
- § Glasware von Schott (Merck Eurolab GmbH, Frankfurt)
- § Magnetrührer Ika-Combimag®RCO (Ika®-Labortechnik, Staufen i. Br.)
- § Mikrofeinwaage Sartorius BP 211 D (Sartorius AG, Göttingen)
- § Vortex-2 Genie (Scientific Industries)
- § Zentrifuge Multifuge 3 S-R

---

<b>9</b>	<b>Abkürzungen</b>
A.	Arterie
Ad	Adenovirus
APS	Ammoniumpersulfat
bFGF	basic fibroblast-growth-factor
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CARP	cardiac ankyrin repeat protein
CD	Cluster of differentiation
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
EC	Endothelzellen
EGR-1	early-growth-response-1
eNOS	endotheliale Stickoxidsynthetase
EPC	endotheliale Progenitorzellen
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast-growth-factor
FITC	Fluorescein-iso-thio-canate Isomer 1
FSS	fluid shear stress
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor
GTP	Guanosintriphosphat
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde – Society for Laboratory Animal Science
HIF-1	hypoxia inducible factor-1
Hg	Quecksilber
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish-peroxidase)
HUVEC	humane umbilical vein endothelcell
ICAM	intercellular adhesion molecule
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Körpermasse
l	Liter

---

LFA1	lymphocyte function-associated antigen
LDI	Laser-Doppler-Imaging
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MG	Molekulargewicht
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natrium-Chlorid
NO	Stickoxid
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
pFA	Paraformaldehyd
POD	Peroxidase
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMC	smooth muscle cell
SSRE	shear stress responsive element
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	tissue factor
TGF-β <sub>1</sub>	transforming-growth-factor-β <sub>1</sub>
TNF-α	tumor necrosis factor-α
TRITC	Tetramethylrhodamine-iso-thio-cyanate
uPA	urokinase Plasminogenaktivator
V.	Vene
VEGF	vascular endothelial growth factor

**10 Literaturverzeichnis**

1. Schierling W, Troidl K, Troidl C, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Eitenmüller IK. The role of angiogenic growth factors in arteriogenesis. *J Vasc Res.* 2009;46(4):365-374.
2. Löwel H. Herzinfarkt und Koronare Sterblichkeit in Süddeutschland. *Deutsches Ärzteblatt.* 10. März 2006 2006;Heft 10
3. <http://www.destatis.de>. Todesursachen: Statistisches Bundesamt Deutschland; 2007.
4. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* Feb 6 2007;115(5):e69-171.
5. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol.* 2000;190(3):338-342.
6. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation.* Jan 2003;10(1):83-97.
7. Grundmann S, Piek JJ, Pasterkamp G, Hoefer IE. Arteriogenesis: basic mechanisms and therapeutic stimulation. *Eur J Clin Invest.* Oct 2007;37(10):755-766.
8. Spalteholz W. *Die Arterien der Herzwand.* Leipzig: Hirzel; 1924.
9. Schaper W, Piek JJ, Munoz-Chapuli R, Wolf C, Ito W. Collateral circulation of the heart. In: Ware JA, Simons M, eds. *Angiogenesis and cardiovascular disease.* New York, NY., Oxford: Oxford University Press; 1999:159-198.
10. Collinson DJ, Donnelly R. Therapeutic angiogenesis in peripheral arterial disease: can biotechnology produce an effective collateral circulation? *Eur J Vasc Endovasc Surg.* Jul 2004;28(1):9-23.
11. Maseri A, Araujo L, Finocchiaro M. Collateral development and function in man. In: Schaper W, Schaper J, eds. *Collateral Circulation: Heart, Brain, Kidney, Limbs.* Boston, MA.: Kluwer Academic Publisher; 1993:381-402.
12. Schmidt R. TG. *Physiologie des Menschen.* 27 ed: Springer; 1997.
13. Bucher O. WH. *Cytologie Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.* 11 ed: Hans Huber; 1989.
14. Liebich H-G. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel.* 5 ed: Schattauer Verlag; 2009.
15. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res.* 1996;79(5):911-919.
16. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* Apr 2000;6(4):389-395.
17. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res.* Feb 16 2001;49(3):507-521.
18. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* Oct-Nov 2000;50(1-2):1-15.
19. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:73-91.
20. Drake CJ. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today.* Feb 2003;69(1):73-82.

21. Hertig A. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contr. Embryol.* 1935;25:37-81.
22. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med.* Feb 1 1971;133(2):275-288.
23. Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci.* Jun 1999;14:121-125.
24. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* Jun 5 1992;267(16):10931-10934.
25. Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med.* Jan-Mar 2006;10(1):45-55.
26. McGavin. *Pathologie der Haustiere.* 1 ed: Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München; 2009.
27. Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol.* Jan 1 2000;59(1):47-53.
28. Helisch A, Schaper W. Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription. *Z Kardiol.* 2000;89(3):239-244.
29. Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, Nagasawa H, Bosch-Marce M, Semenza GL. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* Jun 2 2006;281(22):15554-15563.
30. Yamakawa M, Liu LX, Date T, Belanger AJ, Vincent KA, Akita GY, Kuriyama T, Cheng SH, Gregory RJ, Jiang C. Hypoxia-inducible factor-1 mediates activation of cultured vascular endothelial cells by inducing multiple angiogenic factors. *Circ Res.* Oct 3 2003;93(7):664-673.
31. Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T, Schaper W. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol.* Jul 2002;34(7):775-787.
32. Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res.* Sep 3 2004;95(5):449-458.
33. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jul 1 2003;23(7):1143-1151.
34. Ingber D. In search of cellular control: signal transduction in context. *J Cell Biochem Suppl.* 1998;30-31:232-237.
35. Ingber DE. Cellular basis of mechanotransduction. *Biol Bull.* Jun 1998;194(3):323-325; discussion 325-327.
36. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* Aug 1994;94(2):885-891.
37. Buschmann IR, Hofer IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis.* Dec 2001;159(2):343-356.
38. Heil M, Schaper W. Cellular mechanisms of arteriogenesis. *Exs.* 2005(94):181-191.
39. Schaper W. *SJ. Arteriogenesis:* Kluwer Academic Publishers; 2004.
40. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res.* Mar 19 2004;94(5):671-677.

41. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 1997;80(6):829-837.
42. Khachigian LM, Anderson KR, Halnon NJ, Gimbrone MA, Jr., Resnick N, Collins T. Egr-1 is activated in endothelial cells exposed to fluid shear stress and interacts with a novel shear-stress-response element in the PDGF A-chain promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 1997;17(10):2280-2286.
43. Cai WJ, Kocsis E, Luo X, Schaper W, Schaper J. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem.* Sep 2004;264(1-2):193-200.
44. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Jan 2003;284(1):R1-12.
45. Smith RS, Jr., Lin KF, Agata J, Chao L, Chao J. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery promotes angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Aug 1 2002;22(8):1279-1285.
46. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* Oct-Nov 2000;50(1-2):139-148.
47. Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circ Res.* Aug 6 1999;85(3):247-256.
48. Guo K, Andres V, Walsh K. Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Circulation.* May 26 1998;97(20):2066-2072.
49. Gurjar MV, Sharma RV, Bhalla RC. eNOS gene transfer inhibits smooth muscle cell migration and MMP-2 and MMP-9 activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Dec 1999;19(12):2871-2877.
50. Tsao PS, Wang B, Buitrago R, Shyy JY, Cooke JP. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation.* Aug 5 1997;96(3):934-940.
51. Mees B, Wagner S, Ninci E, Tribulova S, Martin S, van Haperen R, Kostin S, Heil M, de Crom R, Schaper W. Endothelial nitric oxide synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Sep 2007;27(9):1926-1933.
52. Buckwalter JB, Curtis VC, Valic Z, Ruble SB, Clifford PS. Endogenous vascular remodeling in ischemic skeletal muscle: a role for nitric oxide. *J Appl Physiol.* Mar 2003;94(3):935-940.
53. Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL. Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Dec 2001;281(6):H2528-2538.
54. Brevetti LS, Chang DS, Tang GL, Sarkar R, Messina LM. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase increases skeletal muscle blood flow and oxygenation in severe rat hind limb ischemia. *J Vasc Surg.* Oct 2003;38(4):820-826.
55. Kosaki K, Ando J, Korenaga R, Kurokawa T, Kamiya A. Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization. *Circ Res.* Apr 20 1998;82(7):794-802.
56. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, Fuchs S. Impaired arteriogenic response to acute

- hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation*. Jul 15 2003;108(2):205-210.
57. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res*. Mar 7 2003;92(4):378-385.
  58. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. Sep 2001;188(3):359-368.
  59. van Royen N, Hoefler I, Buschmann I, Heil M, Kostin S, Deindl E, Vogel S, Korff T, Augustin H, Bode C, Piek JJ, Schaper W. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *Faseb J*. Mar 2002;16(3):432-434.
  60. Buschmann I, Heil M, Jost M, Schaper W. Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. *Microcirculation*. Jun 2003;10(3-4):371-379.
  61. van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefler I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*. Feb 16 2001;49(3):543-553.
  62. Fernig DG, Gallagher JT. Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog Growth Factor Res*. 1994;5(4):353-377.
  63. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun*. Oct 22 2000;277(2):494-498.
  64. Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, Schaper W. Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res*. Mar 21 2003;92(5):561-568.
  65. Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol*. Mar 2000;20(6):2260-2268.
  66. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch*. Mar 2000;436(3):257-270.
  67. Ziegelhoeffer T, Hoefler I, van Royen N, Buschmann I. Effective reduction in collateral artery formation through matrix metalloproteinase inhibitors. *Circulation*. 1999;100:I-705.
  68. Shi Y, Reitmaier B, Regenbogen J, Slowey RM, Opalenik SR, Wolf E, Goppelt A, Davidson JM. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is up-regulated during wound healing and induces angiogenesis in experimental granulation tissue. *Am J Pathol*. Jan 2005;166(1):303-312.
  69. Boengler K, Pipp F, Fernandez B, Ziegelhoeffer T, Schaper W, Deindl E. Arteriogenesis is associated with an induction of the cardiac ankyrin repeat protein (carp). *Cardiovasc Res*. Sep 1 2003;59(3):573-581.
  70. Kuo H, Chen J, Ruiz-Lozano P, Zou Y, Nemer M, Chien KR. Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development*. Oct 1999;126(19):4223-4234.
  71. Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE, Keddes L. A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear

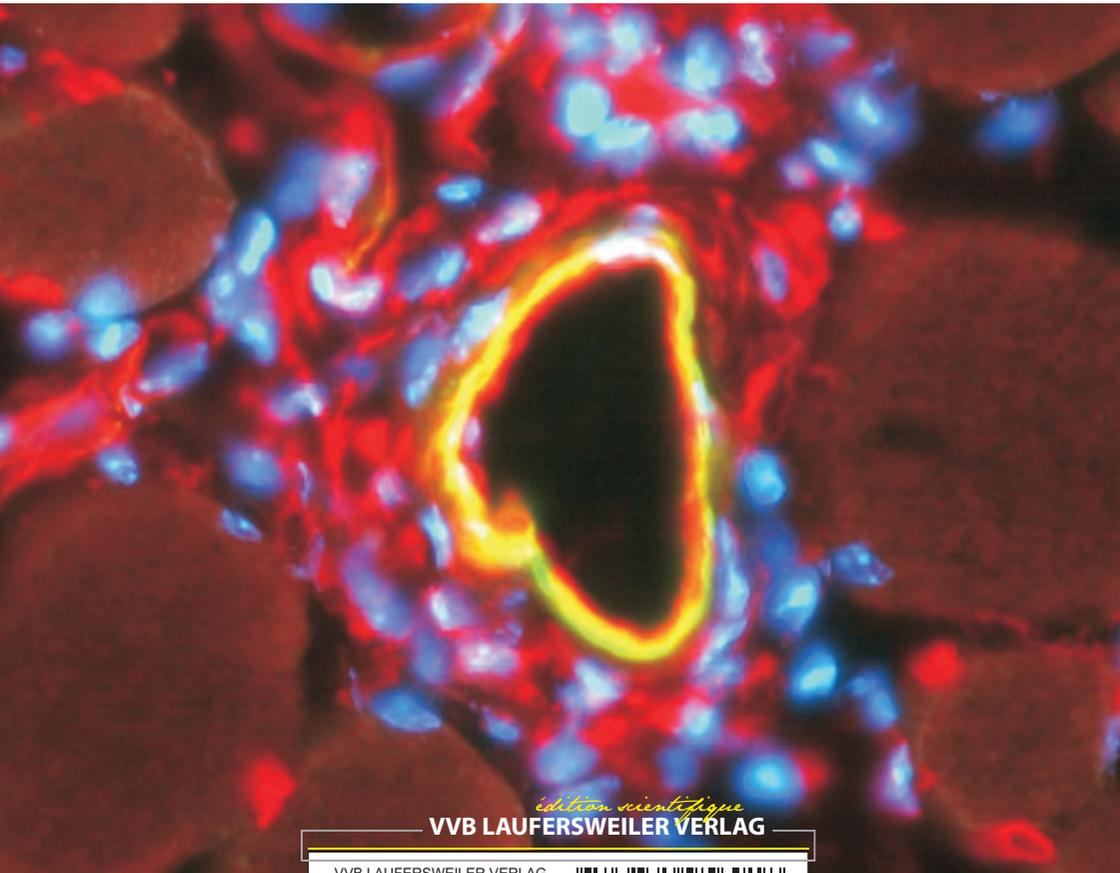
- modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem*. Sep 5 1997;272(36):22800-22808.
72. Maeda T, Sepulveda J, Chen HH, Stewart AF. Alpha(1)-adrenergic activation of the cardiac ankyrin repeat protein gene in cardiac myocytes. *Gene*. Sep 4 2002;297(1-2):1-9.
73. Zou Y, Evans S, Chen J, Kuo HC, Harvey RP, Chien KR. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development*. Feb 1997;124(4):793-804.
74. Zolk O, Marx M, Jackel E, El-Armouche A, Eschenhagen T. Beta-adrenergic stimulation induces cardiac ankyrin repeat protein expression: involvement of protein kinase A and calmodulin-dependent kinase. *Cardiovasc Res*. Sep 1 2003;59(3):563-572.
75. Samaras SE, Shi Y, Davidson JM. CARP: fishing for novel mechanisms of neovascularization. *J Investig Dermatol Symp Proc*. Sep 2006;11(1):124-131.
76. Kanai H, Tanaka T, Aihara Y, Takeda S, Kawabata M, Miyazono K, Nagai R, Kurabayashi M. Transforming growth factor-beta/Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. Jan 19 2001;88(1):30-36.
77. Han XJ, Chae JK, Lee MJ, You KR, Lee BH, Kim DG. Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in hypoxia-induced apoptosis of H9c2 cells. *J Biol Chem*. Jun 17 2005;280(24):23122-23129.
78. Ganten DuR, K. *Handbuch der Molekularen Medizin, Band 2 Tumorerkrankungen*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 1998.
79. Überla K. Viren für die Gentherapie: Ein Taxi zum Kern, bitte! *Rubin*; 2004:64-73.
80. <http://www.g-o.de/wissen-aktuell-979-2004-06-08.html>. Gentherapie mit nackter DNA. *Springer*.
81. <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/virus.html>. Gentransfer mittels rekombinantes Adenovirus Typ 5.
82. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 3 1998;95(5):2509-2514.
83. Kreppel F, Kochanek S. Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: a scientific review and technical guide. *Mol Ther*. Jan 2008;16(1):16-29.
84. Robert-Koch-Instituts Bd. Gentransfer mit Hilfe von Adenovirus Typ 5. *Bundesgesundheitsblatt*. November 2002 2002.
85. Moor-Instruments. Schematische Darstellung der Funktion eines Laser-Dopplers.
86. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Dec 2002;283(6):H2411-2419.
87. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*. 1997;273(3 Pt 2):H1255-1265.
88. Selkirk SM. Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J*. Oct 2004;80(948):560-570.
89. Herzog RW. AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle. *Methods Mol Biol*. 2004;246:179-194.

90. High K. AAV-mediated gene transfer for hemophilia. *Genet Med.* Nov-Dec 2002;4(6 Suppl):56S-61S.
91. High KA, Theodore E, Woodward Award. AAV-mediated gene transfer for hemophilia. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2003;114:337-351; discussion 351-332.
92. Keswani SG, Katz AB, Lim FY, Zoltick P, Radu A, Alaei D, Herlyn M, Crombleholme TM. Adenoviral mediated gene transfer of PDGF-B enhances wound healing in type I and type II diabetic wounds. *Wound Repair Regen.* Sep-Oct 2004;12(5):497-504.
93. Kullo IJ, Simari RD, Schwartz RS. Vascular gene transfer : from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Feb 1999;19(2):196-207.
94. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science.* Sep 14 1990;249(4974):1285-1288.
95. Schulick AH, Vassalli G, Dunn PF, Dong G, Rade JJ, Zamarron C, Dichek DA. Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J Clin Invest.* Jan 15 1997;99(2):209-219.
96. Braddock M, Schwachtgen JL, Houston P, Dickson MC, Lee MJ, Campbell CJ. Fluid Shear Stress Modulation of Gene Expression in Endothelial Cells. *News Physiol Sci.* Oct 1998;13:241-246.
97. Deindl E, Buschmann I, Hofer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res.* 2001;89(9):779-786.
98. Schwachtgen JL, Houston P, Campbell C, Sukhatme V, Braddock M. Fluid shear stress activation of egr-1 transcription in cultured human endothelial and epithelial cells is mediated via the extracellular signal-related kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Clin Invest.* Jun 1 1998;101(11):2540-2549.
99. Sarateanu CS, Retuerto MA, Beckmann JT, McGregor L, Carbray J, Patejunas G, Nayak L, Milbrandt J, Rosengart TK. An Egr-1 master switch for arteriogenesis: studies in Egr-1 homozygous negative and wild-type animals. *J Thorac Cardiovasc Surg.* Jan 2006;131(1):138-145.
100. Dabek J, Kulach A, Monastyrska-Cup B, Gasior Z. Transforming growth factor beta and cardiovascular diseases: the other facet of the 'protective cytokine'. *Pharmacol Rep.* Nov-Dec 2006;58(6):799-805.

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

- § Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Übergabe des auf Grundlagenforschung basierenden vielschichtigen Themas sowie für seine Betreuung und Unterstützung.
- § Herrn Prof. Dr. Eberhard Burkhardt für seine spontane Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität zu begleiten sowie für seine intensive Korrekturlesung, konstruktive Kritik, Tipps und aktive Hilfestellungen.
- § Herrn Dr. Matthias Heil für das unentwegte Durcharbeiten meiner Dissertation, die tiefsinnigen Diskussionen zu den aufgetretenen Fragestellungen und den sich daran anschließenden aufschlussreichen Lösungsansätze sowie die vielen, vielen Hilfestellungen in der Welt des Computers. Besonders danke ich ihm für die angenehme Arbeitsatmosphäre und seine Unterstützung während meiner Existenzgründung als selbständig praktizierende Tierärztin.
- § Herrn Dr. Tibor Ziegelhoeffer für die freundliche Anleitung im tierexperimentellen Themenbereich.
- § Frau Sandra Rühl für die Einführung in die molekularbiologischen Geheimnisse, der Herstellung verschiedener Puffer, Antikörperlösungen sowie anderer Laborzubehöre.
- § Meiner verstorbenen Kollegin Dr. med. vet. Barbara Kühnhold, die mir während meines Studiums ihr gesamtes praktisches und theoretisches Wissen vermittelte und mich ermutigte, Praxis und Dissertationsarbeit parallel zu bewältigen.
- § Meinem Ehemann Jens und meiner Familie, die mich während meines Studiums stets unterstützt haben, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mich ausdrücklich in meinem Weiterkommen bestärkt und gefördert haben.



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5601-8



9 783835 956018

© Alekss - Fotolia.com