

Aus der
I. Medizinischen Klinik
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. A. Schömig)
und dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der
Technischen Universität München
(Direktor Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)
angefertigt
unter Leitung von PD Dr. med. D. Zohlnhöfer

Vorgelegt über
das Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Molekulare Mechanismen der Neointimahyperplasie nach experimenteller
Gefäßverletzung in der Maus – Analyse des Zeitverlaufs und des Einflusses des
Rapamycinanalogons Everolimus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Pamela Frank

aus
Weißenburg

München, 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. B. Aigner

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

2 SCHRIFTTUM..... 2

2.1	KORONARE HERZKRANKHEIT (KHK).....	2
2.1.1	EPIDEMIOLOGIE.....	2
2.1.2	KLINIK.....	2
2.1.3	ÄTIOLOGIE	2
2.1.4	ATHEROSKLEROSE	3
2.1.5	THERAPIE DER KORONAREN HERZKRANKHEIT	5
2.1.5.1	Bypass-Operation.....	6
2.1.5.2	Interventionelle Verfahren	6
2.2	RESTENOSE.....	14
2.2.1	RESTENOSE NACH PTCA	14
2.2.2	IN-STENT-RESTENOSE.....	19
2.3	RAPAMYCIN	20
2.3.1	ERFORSCHUNG	20
2.3.2	WIRKUNGSMECHANISMUS	20
2.3.3	ZELLULÄRE ZIELMOLEKÜLE DES RAPAMYCIN	22
2.3.4	WIRKUNG DES RAPAMYCIN	24
2.3.4.1	Antiproliferative Wirkung auf Immunzellen.....	24
2.3.4.2	Antiproliferative Wirkung auf Nicht-Immunzellen	25
2.3.4.3	Antiproliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen	25
2.3.4.4	Anti-migratorische Wirkung	27
2.3.5	NEBENWIRKUNGEN DES RAPAMYCIN	27
2.3.6	EVEROLIMUS – EIN SYNTHETISCHES DERIVAT DES RAPAMYCIN.....	28
2.4	VERLETZUNGSINDUZIERTER NEOINTIMAHYPERPLASIE IM MAUSMODELL	29
2.5	AUFBAU VON ARTERIEN VOM MUSKULÄREN BAUTYP	31

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN..... 32

3.1	ZIELSETZUNG DES GESAMTPROjekTS.....	32
3.2	ZIELVORSTELLUNG UND AUFBAU DER EIGENEN ARBEIT	32
3.3	MATERIAL UND METHODEN	34
3.3.1	VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN	34
3.3.2	VERSUCHSPLAN UND GRUPPENEINTEILUNG.....	35
3.3.2.1	Kontroll-Gruppe.....	35
3.3.2.2	Stenose-Gruppe	35
3.3.2.3	Rapamycin-Gruppe	35
3.3.3	DAS FEMORALISVERLETZUNGSMODELL DER MAUS.....	36
3.3.3.1	Anästhesie und Operationstechnik.....	36
3.3.3.2	Postoperative Versorgung	38
3.3.4	EUTHANASIE, PERFUSION UND PROBENGEWINNUNG	38
3.3.5	PROBENAUFARBEITUNG FÜR HISTOMORPHOMETRISCHE ANALYSEN	39
3.3.5.1	Immersionsfixierung	39
3.3.5.2	Fixierung, Entwässerung und Vorparaffinierung.....	39
3.3.5.3	Einbetten in flüssiges Paraffin	40
3.3.5.4	Anfertigen der Paraffinschnitte	40
3.3.5.5	Färben der Paraffinschnitte	40
3.3.6	HISTOMORPHOMETRISCHE ANALYSE	41
3.3.7	GENEXPRESSIONSANALYSE	42

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.7.1	mRNA Isolierung.....	42
3.3.7.2	cDNA Synthese.....	43
3.3.7.3	Tailing.....	44
3.3.7.4	Amplifizierung der cDNA.....	44
3.3.7.5	Kontroll-PCR.....	45
3.3.7.6	Nichtradioaktive Genexpressionsanalyse mit Nylon Arrays.....	46
3.3.8	VERIFIZIERUNG DER GENEXPRESSIONSANALYSE MIT GENSPEZIFISCHEN PCRS.....	50
3.3.8.1	Densitometrische Ausmessung der PCRS.....	52
3.3.9	IMMUNHISTOCHEMIE.....	53
3.3.9.1	Etablierung der Antikörper.....	53
3.3.9.2	Immunhistochemische Färbung der Proben.....	54
3.3.10	STATISTISCHE BERECHNUNG UND DOKUMENTATION.....	59
3.4	ERGEBNISSE.....	60
3.4.1	ÜBERLEBENSRATE.....	60
3.4.2	ERGEBNISSE DER HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	60
3.4.3	ERGEBNISSE DER MORPHOMETRISCHEN UNTERSUCHUNGEN.....	61
3.4.3.1	Erfolgsrate.....	61
3.4.3.2	Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen im Vergleich.....	61
3.4.3.3	Vergleich der Neointimafläche und des Lumenverlustes.....	64
3.4.3.4	Vergleich der Mediafläche in Prozent und der Länge der Lamina elastica externa.....	65
3.4.4	ERGEBNISSE DER GENEXPRESSIONSANALYSE.....	66
3.4.4.1	Erfolgsrate.....	66
3.4.4.2	Regulierung der Gene der STENOSE-Gruppe.....	66
3.4.4.3	Regulierung der Gene der RAPAMYCIN-Gruppe.....	76
3.4.5	ERGEBNISSE DER GENSPEZIFISCHEN PCRS.....	83
3.4.5.1	β-Aktin-PCR.....	83
3.4.5.2	Desmin-PCR.....	84
3.4.5.3	E-Selektin-PCR.....	85
3.4.5.4	GRO1-PCR.....	86
3.4.5.5	CXCR4-PCR.....	87
3.4.5.6	CXCR3-PCR.....	88
3.4.5.7	IP-10-PCR.....	89
3.4.5.8	MMP9-PCR.....	90
3.4.5.9	Kit-oncogene-PCR.....	91
3.4.5.10	MCM-2-PCR.....	92
3.4.5.11	TMK-PCR.....	93
3.4.5.12	SDF-1-PCR.....	94
3.4.6	ERGEBNISSE DER IMMUNHISTOCHEMIE.....	96
3.4.6.1	CD31-Färbung.....	96
3.4.6.2	CD3-Färbung.....	97
3.4.6.3	CD45-Färbung.....	99
3.4.6.4	CXCR3-Färbung.....	100

4 DISKUSSION 102

4.1	DAS VERSUCHSMODELL.....	102
4.1.1	NEOINTIMAHYPERPLASIE NACH INTRALUMINALER GEFÄßVERLETZUNG DER MAUS.....	102
4.1.2	ERGEBNISSE DER MORPHOMETRISCHEN ANALYSE.....	103
4.1.2.1	Morphometrische Analyse der STENOSE-Gruppe.....	103
4.1.2.2	Morphometrische Analyse der RAPAMYCIN-Gruppe.....	104
4.1.3	ERGEBNISSE DER GENEXPRESSIONSANALYSE.....	104
4.1.3.1	Mechanismen der Neointimahyperplasie auf Genexpressionsebene im Zeitverlauf.....	105
4.1.3.2	Einfluss von Rapamycin auf die Neointimahyperplasie auf Genexpressionsebene.....	108
4.1.3.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	110

INHALTSVERZEICHNIS

5 ZUSAMMENFASSUNG.....	112
6 SUMMARY.....	114
7 LITERATURVERZEICHNIS	116
8 TABELLENVERZEICHNIS	136
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	138
10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	140
11 ANHANG	144
12 DANKSAGUNG	150
13 LEBENSLAUF	151

1 EINLEITUNG

Die Einführung der interventionellen Kardiologie als Methode zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit (KHK) führte in den achtziger Jahren zu einem großen Fortschritt. Die perkutane transluminale Koronarangioplastie und die Stentimplantation verdrängten die weitaus invasivere Bypasschirurgie als Methode der Wahl.

Das schwerwiegendste Problem der interventionellen Kardiologie stellt die Restenose dar.

Zwar konnte die Stentimplantation die Restenoserate vermindern, sie bleibt aber dennoch mit 22 bis 32 % (FISHMAN et al. 1994, SERRUYS et al. 1994) hoch und führt jährlich zu immensen Kosten.

Pathophysiologische Prozesse wie die Thrombusformation, die Inflammation, eine Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen und das Remodeling der Gefäßwand werden diskutiert an dem Prozess der Restenose in verschiedenem Maße teilzuhaben.

Unlängst zeigte das Makrolidantibiotikum Rapamycin einen Durchbruch auf dem Gebiet der Restenosebekämpfung. In verschiedenen humanmedizinischen Studien bewirkte der Rapamycin-beschichtete Stent eine signifikante Reduzierung der Restenoserate. Rapamycin zeigt *in vitro* und *in vivo* sowohl antiinflammatorische, antiproliferative, als auch anti-migratorische Wirkungen. Man vermutet, dass die positive Wirkung des Rapamycin damit zusammenhängt, dass es nicht, wie viele andere erfolglos angewandte Medikamente, nur an einem einzelnen Angriffspunkt im Prozess der Restenose ansetzt.

Die molekularen Mechanismen, die zur Bildung der Restenose beitragen und wie diese durch Rapamycin verändert werden, sind bis jetzt noch weitgehend unverstanden.

Das Ziel dieser Arbeit ist einerseits die Untersuchung der molekularen Mechanismen im Zeitverlauf der Restenosebildung auf Genexpressionsebene und andererseits die Untersuchung der Veränderung des Genexpressionsmusters durch die Einwirkung des Rapamycin.

Die Stenose wird durch ein Femoralisverletzungsmodell bei der Maus induziert. Zur systemischen Verabreichung wird eine orale Lösung des Rapamycinanalogons SDZ RAD bzw. Everolimus verwendet.

Parallel zur Genexpressionsanalyse wird eine histomorphometrische Untersuchung durchgeführt. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse werden durch genspezifische PCRs und auf immunhistochemischer Ebene verifiziert.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Koronare Herzkrankheit (KHK)

2.1.1 Epidemiologie

Die KHK stellt mit 22 % weltweit die häufigste Todesursache der westlichen Welt dar (BÜTTMANN et al. 2001). Laut der American Heart Association starben 2001 allein in den USA 502,189 Menschen infolge der KHK.

2.1.2 Klinik

Klinisch versteht man unter dem Begriff der "koronaren Herzkrankheit" eine mangelhafte Blut- bzw. Sauerstoffversorgung des Myokards aufgrund einer stenosierenden Erkrankung der Herzkranzgefäße. Bei einer Stenose von 90 % des Lumens unter Ruhebedingungen und mehr als 75 % bei „Arbeitsbedingungen“ (z. B. bei körperlicher Anstrengung), ist mit einer unzureichenden Blutversorgung des Myokards zu rechnen (BÜTTMANN et al. 2001).

Die KHK manifestiert sich in 55 % der Fälle als stabile oder instabile Angina pectoris, in ca. 25 % der Fälle in Form eines Myokardinfarktes und in ca. 20 % der Fälle in Form eines plötzlichen Herztodes. Daneben kommen noch Rhythmusstörungen oder akute oder chronische Herzinsuffizienzen vor. Es gibt aber auch einen klinisch stummen Verlauf (BÜTTMANN et al. 2001). Die KHK ist die häufigste zum Tode führende Organerkrankung (RIEDE et al. 1999/2001).

Betroffen sind vorwiegend Männer (Verhältnis Männer/Frauen: 2/1 bis 3/1) im Alter zwischen 55 und 60 Jahren und Frauen zwischen 65 und 75 Jahren (RIEDE et al. 1999/2001).

2.1.3 Ätiologie

Die Stenose der Koronararterien ist in mehr als 90 % der Fälle auf atherosklerotische Läsionen der großen extramuralen Koronararterien zurückzuführen (BÜTTMANN et al. 2001).

Neben der Atherosklerose kommen noch weitere Ursachen für eine Stenose der Koronargefäße in Frage, wie z. B. Spasmen, Thromben und sehr selten koronare Emboli (SELWYN und BRAUNWALD 1998).

2.1.4 Atherosklerose

„Atherosklerose“ leitet sich aus dem Griechischen „athere“ = „Haferschleim“ entsprechend der Anhäufung von Lipiden und „sclerosis“ = „Härten“ entsprechend dem Dicker bzw. Kompakter werden der Intima ab (LIBBY 1998).

Laut World Health Organisation (WHO) ist die Atherosklerose eine „variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ (zitiert nach ROESSNER et al. 2001).

Die Atherosklerose kann an einem Gefäß einerseits eine Veränderung in Form eines sog. „Atheroms“ hervorrufen bei dem eine stenosierende Läsion vorliegt, die zur Durchflussverminderung oder zum Arterienverschluss führen kann. Andererseits kann sie aber auch das Gefäß in Form einer Ektasie oder einem Aneurysma verändern, bei denen eine Ausdehnung des Gefäßdurchmessers erfolgt. Letzteres wird häufig in der Aorta beobachtet (LIBBY 1998).

Grundsätzlich entsteht die Atherosklerose in großen elastischen und mittleren muskulären Arterien und führt im zu versorgenden Gebiet zur Ischämie (ROSS 1999). Tabelle 1 zeigt die häufigsten Vorkommen atherosklerotischer Veränderungen und ihre klinische Symptomatik.

Tabelle 1: Vorkommen atherosklerotischer Veränderungen und ihre klinische Symptomatik
(nach LIBBY 1998, RIEDE et al. 1999/2001, ROESSNER et al. 2001).

Stenose Lokalisation	Prädilektionsstellen	Ischämiegebiet	Symptome
Koronargefäße	Proximale LAD = Ramus interventricularis anterior	Herz	Angina pectoris, Myokardinfarkt
Arterien des Zentralnervensystems	Bifurcation der A. carotis com.	Gehirn	Schlaganfall
Aorta, Becken-, Beinarterien	A. iliaca com., A. iliaca ext., A. femoralis sup., Unterschenkel-, Fußarterien	Extremitäten	Intermittierende Lahmheit, Gangrän
Splanchnicus-Zirkulation, Aorta	Bauchaorta, distal des Abgangs der Nierenarterie	Mesenterium, Darm	Mesenterialinfarkt, „bowel infarction“
Nierenarterie	Proximale A. renalis	Niere	Hypertonie

Als Risikofaktoren für die Atherosklerose werden hauptsächlich Hyperlipidämie, Hypertonie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus angesehen, aber auch Adipositas, Stress, Bewegungsmangel und genetische Faktoren spielen eine Rolle (ROESSNER et al. 2001).

Morphologisch unterscheidet man verschiedene Stadien der atherosklerotischen Läsion: die frühe Läsion, die als Lipidflecken oder „fatty streaks“ beschrieben werden, die weiter fortgeschrittene Läsion als fibröse Plaque und letztendlich die komplexe Läsion (ROESSNER et al. 2001).

Die Pathophysiologie der Atherosklerose ist komplex und noch nicht vollständig geklärt. ROSS und GLOMSET (1973) formulieren sie als „response-to-injury-hypothesis“. Anfangs stellte die Endotheldendotation den ersten Schritt dar. In neueren Studien wird die Endotheldysfunktion als initiales Ereignis in der Pathogenese der Atherosklerose angesehen. Mögliche Ursachen der Endotheldysfunktion sind ein erhöhter LDL (low-density-lipoprotein)-Spiegel und modifiziertes LDL, sowie freie Radikale, die durch Rauchen oder Erkrankungen wie Hypertension, Diabetes mellitus und Infektionen und auch durch genetische Veränderungen und erhöhte Plasma- Homocysteinkonzentrationen freigesetzt werden (ROSS 1999).

Durch die Endotheldysfunktion kommt es zu einem Austritt von Lipoproteinen v. a. von LDL durch das Endothel. Lipoproteine transportieren Lipide wie Cholesterol und Triglyceride gebunden an Proteine und Phospholipide, um sie im Blut löslich zu machen. Dadurch kommt

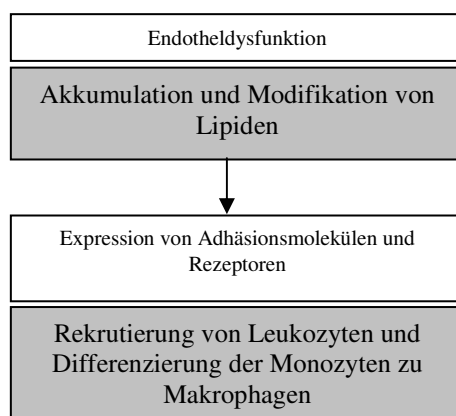
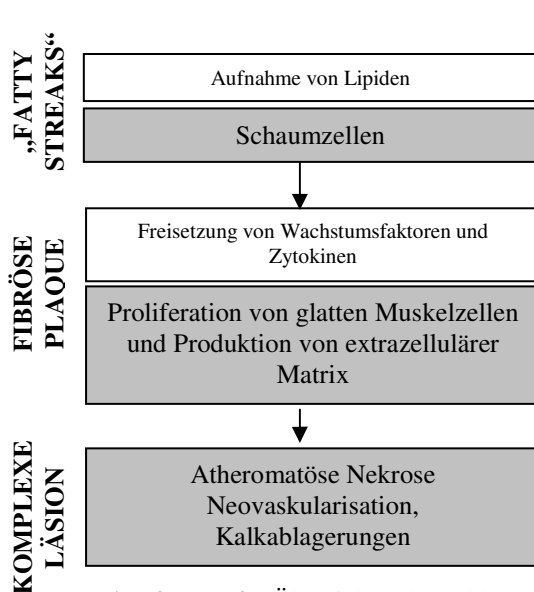


Abbildung 1: Übersicht Atherosklerose (1)
(nach LIBBY 1998).

es zu einer lokalen Ansammlung in der Intima. Hier wird das LDL dann chemisch modifiziert, am bedeutendsten ist hierbei die Oxidation, aber auch die nichtenzymatische Glykosylierung. Sowohl das oxidierte, als auch das glykosylierte LDL tragen in der späteren Entwicklung der Läsion zu vielen zellulären Ereignissen bei (LIBBY 1998).

Der zweite Schritt in der Entwicklung der „fatty streaks“ ist die Leukozyten-Rekrutierung v. a. die von Monozyten und Lymphozyten. Dies geschieht über eine Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen, wie z. B. P-Selektin,

intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1). Eingewandert in die Intima differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen



und werden durch die Endocytose von Lipoproteinpartikeln schließlich zu lipid-beladenen Schaumzellen. Die Phagozyten setzen Zytokine frei, die die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Produktion von extrazellulärer Matrix stimuliert. Die Anhäufung von glatten Muskelzellen und von extrazellulärer Matrix lassen die fibröse Plaque entstehen (LIBBY 1998).

Abbildung 2: Übersicht Atherosklerose (2)
(nach LIBBY 1998).

Bei weiterem Fortschreiten der Läsion kommt, es zum Absterben von Schaumzellen, wodurch der sog. lipidreiche nekrotische Kern entsteht. Außerdem können Neovaskularisationen und Einlagerung von Kalzium und kalziumbindenden Proteinen, z. B. Osteocalcin und Osteopontin, entstehen. Man spricht jetzt von einer komplexen Läsion (LIBBY 1998).

2.1.5 Therapie der koronaren Herzkrankheit

Die KHK wird einerseits konservativ medikamentös, aber auch durch direkte Eingriffe zur koronaren Revaskularisation therapiert. Die medikamentöse Therapie basiert einerseits auf einer Verminderung des myokardialen Sauerstoffbedarfs durch eine Verminderung der Herzfrequenz und der Myokardkontraktilität und einer Reduzierung der myokardialen Wandspannung und andererseits auf einer Verbesserung der Sauerstoffzufuhr zum Myokard durch eine koronare Vasodilatation und einer Erhöhung des Blutflusses. Die größte Rolle spielen dabei Nitrate, β -Rezeptor-Blocker und Calciumantagonisten (SELWYN und BRAUNWALD 1998). Diese konservative Therapie einer angiographisch nachgewiesenen KHK kommt heute nur noch bei ca. jedem siebten Patienten zum Zuge, während die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) bei zwei von drei Patienten eingesetzt wird (DELACRETAZ und MEIER 1998).

Bei den Eingriffen zur koronaren Revaskularisation steht die Bypass-Operation den neueren katheter-basierten Techniken der interventionellen Kardiologie gegenüber (BAIM und GROSSMAN 1998).

2.1.5.1 Bypass-Operation

In Deutschland werden jährlich 50 000 Bypass-Operationen durchgeführt, in Europa 1999 210 000 (ROTTER et al. 2003), in den USA jährlich über eine halbe Million (LOWE et al. 2002).

Bei der Bypass-Operation wird die Stenose, entweder durch eine Anastomose von einer oder von beiden A. mammae internae (IMA) zur Koronararterie distal der Stenose oder durch eine Verbindung zwischen der Aorta und der Koronararterie über ein Stück einer Vene, meist der V. saphena, überbrückt (SELWYN und BRAUNWALD 1998).

Die ersten A. mammae-Anastomosen wurden 1963 bis 1966 von KOLESSOV durchgeführt. Der endgültige Durchbruch der direkten Revaskularisationsmethode gelang erst 1969/70 durch FAVALORO (1969) in Cleveland und JOHNSON und LEPLEY (1970) in Milwaukee (zitiert nach SCHMUZIGER 1989).

Ein Verschluss der Venentransplantate ist im ersten Jahr nach dem Eingriff in 10 bis 20 % der Fälle zu beobachten (SELWYN und BRAUNWALD 1998). Nach zehn Jahren liegt die Restenosierungsrate beim Venenbypass bei 50 %, beim IMA-Bypass nur bei 10 %.

Die Bypass-Operation war vor der Einführung der PTCA das Standardverfahren zur chirurgischen Intervention bei der KHK. Mittlerweile wird sie wegen ihrer Invasivität und der höheren Kosten weitgehend von der PTCA verdrängt. Lediglich bei Stenosen der A. coronaria sinistra und bei Mehrgefäßstenosen mit einer Beeinträchtigung der Funktion des linken Ventrikels, ist die PTCA kontraindiziert und noch immer die Bypass-Operation als Mittel der Wahl anzusehen (BAIM und GROSSMAN 1998).

2.1.5.2 Interventionelle Verfahren

Die Standardmethode, die PTCA, wird immer mehr durch das Stentverfahren ergänzt und ersetzt. Alternative neuere Techniken sind die Atherektomie und die Laserbehandlung (ROTTER et al. 2003). Weltweit werden jährlich ca. 1,5 Millionen perkutane transluminale Revaskularisationen durchgeführt, die Mehrzahl davon sind PTCA mit oder ohne Stenting

(BENNETT und O'SULLIVAN 2001). 1999 wurden in Europa 452 019 PTCA's vorgenommen. Die höchste absolute Zahl wurde in Deutschland mit 166 511 erreicht, das entspricht 2 081 PTCA's pro 1 Million Einwohner (ROTTER et al. 2003).

Wie die Anzahl der PTCA, ist auch die der durchgeführten Stentimplantationen in Europa gestiegen. 1999 wurden 313 000 Eingriffe, 31 % mehr als 1998, vorgenommen. Auch hier erreichte Deutschland die höchste absolute Zahl mit 94 443 Eingriffen 1999 (ROTTER et al. 2003). Das mittlere Verhältnis von Stenting zu PTCA war 1999 in Europa 0,67.

Der Einsatz von alternativen Methoden, wie direkte Atherektomie, Rotablator, Laser-Katheter oder -Draht, Brachytherapie oder Clot Catcher Remover wurden nur in 5 984 Fällen angewandt und nehmen damit im Vergleich zu 1997 ab (ROTTER et al. 2003).

Atherektomie, Laserangioplastie

Die Atherektomie erreicht eine Revaskularisation durch das Abtragen des Plaquematerials. Man unterscheidet die direkte Atherektomie und die Rotationsatherektomie. Bei der direkten Atherektomie werden über einen Katheter Teile der atherosklerotischen Plaque abgetragen und aufgesaugt. Die rotierende Atherektomie zerkleinert mit einer Diamantfräse das stenosierende Material in pulverförmige ca. 5 bis 25 µm große Teile, die über die Mikrozirkulation abgeschwemmt werden (BAIM und GROSSMAN 1998). KOVACH et al. (1993) konnten zeigen, dass die Rotationsatherektomie eine Lumenvergrößerung durch selektive Ablation von harter, v. a. kalzifizierter atherosklerotischer Plaque bewirkt. Dabei entstehen nur geringe Gewebsverletzungen und selten Gefäßausdehnungen.

Bei der Laserangioplastie bedient man sich der photochemischen, photothermischen und photomechanischen Effekte des Lasers (BAIM und GROSSMAN 1998). Die Ausweitung des Gefäßdurchmessers wird zu 24 % durch die Ablation von Gewebe und zu 76 % durch mechanische Gefäßerweiterung erreicht. Die häufigste Anwendung findet die Laserangioplastie bei tubulären, kalzifizierten, totalen, subtotalen und ostialen Stenosen (MINTZ et al. 1995).

Perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA)

Die erste erfolgreiche perkutane transluminale Koronarangioplastie wurde 1977 von GRÜNTZIG in Zürich durchgeführt (GRÜNTZIG 1978). GRÜNTZIG leitete die Technik von der durch DOTTER und JUDKINS (1964) eingeführten transluminalen Angioplastie zur Behandlung atherosklerotischer Obstruktionen der Femoralarterie ab. Durch eine zunehmende

Verbesserung der Instrumente und der Technik hat sich die PTCA als Methode zur koronaren Revaskularisierung bewährt und stellt heute eine bedeutsame Therapieform in der Behandlung der symptomatischen KHK dar.

Indikationen für eine PTCA sind das Vorliegen einer symptomatischen KHK (v. a. Angina pectoris), ausgehend von einer Stenose eines oder zweier Gefäße, die für den Ballonkatheter zugänglich sind. Mittlerweile können auch kalzifizierte Stenosen oder Totalverschlüsse dilatiert werden (BAIM und GROSSMAN 1998).

Der Zugang erfolgt unter Lokalanästhesie in der Leiste über die A. femoralis oder in der Achsel über die A. brachialis. Ein Führungskatheter wird zum Koronarostium der betroffenen Koronararterie vorgeschoben. Über den Führungskatheter wird ein Ballonkatheter mit Führungsdraht eingeführt. Der Führungsdraht wird durch die Stenose hindurch bis in die Gefäßperipherie vorgeschoben, um darüber den Ballonkatheter soweit vorzuführen bis der Ballon in der Stenose zu liegen kommt. Die Dilatationszeit und der Dilatationsdruck des Ballons richten sich nach der Beschaffenheit der Stenose. Die Dilatation erfolgt so, dass sich der Ballon voll entfaltet, sie ist ausreichend, wenn die akute Restenose (Recoil) nach der Dilatation weniger als 50 % des Gefäßdurchmessers beträgt (GRÜNTZIG 1978, GRÜNTZIG et al. 1979, PETERSEN 1991).

Die Erfolgsrate der PTCA (eine Stenose auf über 50 % des angrenzenden Gefäßdurchmessers ohne Komplikation zu dilatieren) übertrifft 90 % (BAIM und GROSSMAN 1998).

Durch das Dilatieren des Ballons kommt es an der Stelle der Stenose einerseits zu einer Kompression der atherosklerotischen Plaque und zur Dehnung der Gefäßwand, aber auch zu Einrissen der Plaque und der inneren Gefäßwand (Intima) (SANBORN et al. 1983, WALLER 1985).

Weitere Komplikationen, wie Spasmen und eine Thrombenbildung, werden durch die routinemäßige Gabe von Vasodilatoren (Nitraten), Antikoagulantien (Heparin) und Plättchenaggregationshemmern (ASS) weitgehend verhindert (BAIM und GROSSMAN 1998).

In Europa blieben Komplikationen bei der PTCA, wie der akute Herzinfarkt mit 1,2 % und Todesfälle mit 0,5 % in den letzten acht Jahren zahlenmäßig konstant, der Einsatz einer Notfallbypassoperation nahm von 1,2 % 1992 auf 0,3 % 1999 ab (ROTTER et al. 2003).

Nach wie vor ist die Eingefäßerkrankung die häufigste Indikation zur PTCA mit mindestens 80 % in Europa (WINDECKER et al. 1998).

Beim Abheilen dieser Gefäßwandverletzungen kommt es bei etwa 20 bis 35 % der Patienten innerhalb der ersten 2 bis 4 Monate zu einer Restenosierung des Gefäßes (KALTENBACH et al. 1985, HORT und VOGELSANG 1986, GRÜNTZIG et al. 1987). Die Restenose (= „Recurrence of stenosis“, Wiederkehr der Stenose) ist eine chronische Verengung des Gefäßes (WALLER 1989). Bei Mehrgefäßerkrankungen wächst das Restenosierisiko mit der Anzahl der dilatierten Gefäße (LE FEUVRE et al. 1993). POPMA et al. (1991) beschreibt in seiner Studie eine Restenoserate von 30 - 50 %.

Stenting

Schon 1987 erkannten SIGWART et al., dass der Einsatz einer Koronarendoprothese (Stent) bei wiederholter Restenosierung möglicherweise hilfreich wäre. Eine intravaskuläre mechanische Stütze (Stent), bestehend aus einem selbstexpandierenden Netzwerk aus rostfreiem Stahl, wurde entwickelt, um den akuten Verschluss eines Gefäßes und die Restenose nach PTCA zu verhindern (SIGWART et al. 1987).

Der Stent glättet Kluften und Dissektionen, die durch die Angioplastie entstanden sind und optimiert so das initiale Ergebnis der Angioplastie, indem es den akuten Gefäßverschluss verhindert (SIGWART et al. 1988).

Stenting ist heute eines der verbreitetsten und anerkanntesten Verfahren die Restenoserate zu reduzieren (AL SUWAIDI et al. 2000).

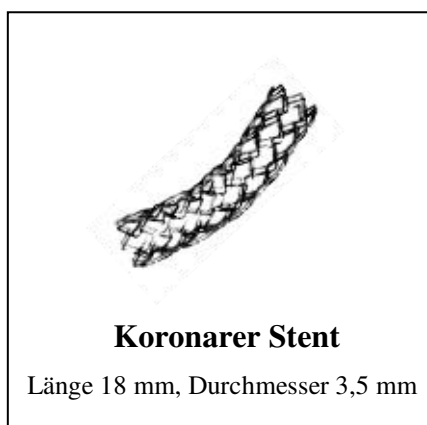
Die BENESTENT- bzw. die STRESS-Studie zeigten eine signifikante Reduzierung der Restenoserate nach dem Einbringen eines Stents in *de novo* Läsionen mit 32 % bzw. 22 % in der Stent-Gruppe gegenüber 42 % bzw. 32 % in der PTCA-Gruppe (FISCHMAN et al. 1994, SERRUYS et al. 1994). Außerdem fanden sie in der Stent-Gruppe mit 96 % eine höhere Erfolgsrate als nach Ballonangioplastie mit 90 % (FISCHMAN et al. 1994). Das Risiko von vaskulären Komplikationen war in der Stent-Gruppe signifikant höher (13,5 % gegenüber 3,1 %) (SERRUYS et al. 1994), wegen der Notwendigkeit der strengen antikoagulatorischen Therapie bei der Stentimplantation (SIGWART et al. 1988). Damit verbunden konnte auch eine signifikant verlängerte mittlere Krankenhausaufenthaltsdauer in der Stent-Gruppe (8,5 gegenüber 3,1 Tagen) beobachtet werden (SERRUYS et al. 1994). Eine kombinierte Antiplättchenaggregations-Therapie mit Ticlopidine und Acetylsalicylsäure (ASS) konnte

nach Stentimplantation die Inzidenz von hämorrhagischen und vaskulären Komplikationen, im speziellen die Inzidenz einer thrombotischen Okklusion des gestenteten Gefäßes, im Gegensatz zu einer konventionellen antikoagulatorischen Therapie mit ASS, Heparin und einem Kumarinderivat reduzieren (SCHÖMIG et al. 1996).

Die Stentimplantation erfolgt nach dem Prinzip der PTCA. Zwei verschiedene Expansionsprinzipien werden verwendet: die Ballon-Expansion und die Eigen-Expansion (REGAR et al. 2001). Für das Einbringen eines Stents durch Ballonexpansion wird der kollabierte Stent über einen ungeblähten Ballon gezogen. Über einen Führungskatheter wird der Stent innerhalb der Engstelle positioniert. Durch das Aufblähen des Ballons wird der Stent ausgedehnt (ROUBIN et al. 1990). Bei selbstexpandierenden Stents wird der Stent über einem Katheter in seinem kollabierten Zustand durch eine Membran gehalten. Die Expansion des Stents erfolgt durch das Entfernen der Membran (SIGWART et al. 1988). Der Stent verbleibt als Gerüst im Gefäß.

Stents werden auch in anderen Gefäßen verwendet, z. B. in der A. iliaca, der A. renalis, der Aorta, der A. brachycephalica, der A. carotis, der A. femoralis, A. poplitea oder in transjugular eingebrachten intrahepatischen portosystemischen Shunts (OESTERLE et al. 1998). Daneben sind Stents auch klinisch im Einsatz als Gallengangs-, Ösophagus- und Tracheastents.

Stents



Stents unterscheiden sich im Design, dem Material und der Oberfläche. Es existieren fünf verschiedene Stenttypen: tubuläre, ringförmige, spiralförmige, netzförmige und das sog. „multi-Design“. Das Material und die Oberfläche der Stents rufen eine unterschiedliche humorale und zelluläre Gefäßantwort hervor, welche die In-Stent-Restenoserate und die Thrombogenität verändern. Metalle, Metalllegierungen und Polymere kommen zum Einsatz (REGAR et al. 2001).

Abbildung 3: Koronarer Stent
(nach DANGAS und KUEPPER 2002).

Die physikalischen Eigenschaften beeinflussen den Grad der Gefäßverletzung und die körpereigene Antwort darauf. Eine Verminderung der Stentstrebenzwischenräume kann den Gefäßverletzungsgrad, die Thrombosegefahr und die Neointimahyperplasie verringern (ROGERS und EDELMAN 1995). Eine ungleichmäßige Stent-Expansion erhöht den Grad der Gefäßverletzung und den der In-Stent-Restenose (CARTER et al. 1999).

Beschichtete Stents

Die Ummantelung der Stents mit Polymeren (Phosphorylcholine, Fibrin, etc.), Medikamenten (Heparin) und anorganischen Stoffen (Gold) konnte in einigen Fällen die subakute Stentthromboserate reduzieren, aber keine deutliche Verringerung der In-Stent-Restenoserate erreichen. Da die subakute Stentthromboserate aber bei modernen Stents ohnehin sehr niedrig liegt, gewann die Ummantelung als Vehikel für eine lokale Medikamentenzufuhr an Bedeutung (REGAR et al. 2001).

Der Medikamenten-beschichtete Stent weist mehrere Vorteile auf. Einerseits ist eine Applikation des Medikamentes gezielt an den Ort und zum Zeitpunkt der Verletzung gegeben. Andererseits kann durch die lokale Applikation ein höherer Gewebespiegel als bei einer systemischen Applikation erzielt werden. Die systemische Freisetzung ist sehr gering, womit die Toxizität und die Nebenwirkungen des Medikamentes stark minimiert werden (REGAR et al. 2001).

Verschiedene Medikamente stehen als Kandidaten zum Einsatz in beschichteten Stents zur Verfügung (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Kandidaten für die Anwendung in beschichteten Stents (nach REGAR et al. 2001).

Gruppe	Vertreter
Antineoplastika	Paclitaxel (Taxol TM), Taxolderivate, Aktinomycin D, Vincristin
Antithrombotika	Hirudin, Iloprost, Heparin
Immunsuppressiva	Sirolimus (Rapamycin TM), Tranilast, Dexamethason, FK 506
Kollagensynthetase Inhibitoren	Halofuginon, Propylhydroxylase, C-Proteinaseinhibitor, Metalloproteinaseinhibitor
Weitere	Angiopeptin V, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Von den verschiedenen untersuchten Medikamenten zeigten Rapamycin und Paclitaxel in klinischen Studien die besten Ergebnisse (DRACHMAN 2002).

Rapamycin-beschichtete Stents

Der Rapamycin-beschichtete BXTM-VELOCITY-Stent (Cordis, Warren, USA) besteht aus medizinischem, rostfreiem 316LS Stahl. Die Ummantelung setzt sich aus 30 % Rapamycin in einem Polymergemisch von Polyethylenevinylacetat (PEVA) und Polybutylmethacrylat (PBMA) 50: 50 zusammen. Insgesamt enthält der Stent 140 µg/cm² Rapamycin (REGAR et al. 2001).

In klinischen Studien wurden zwei Stents mit einer unterschiedlichen Freisetzungsrate des Rapamycin getestet:

Schnelle Medikamentenabgabe (FR = fast release): Das Medikament ist nach 15 Tagen komplett abgegeben.

Langsame Medikamentenabgabe (SR = slow release): Das Medikament ist nach 28 Tagen komplett abgegeben.

Systemische Blutspiegel, die durch den Rapamycin-beschichteten Stent erreicht werden, haben ihren Peak eine Stunde nach der Implantation mit 2,6 ± 0,7 ng/mL FR und 0,9 ± 0,2 ng/mL SR. Nach 72 Stunden fallen sie unter die untere Quantifizierungsgrenze (0,4 ng/mL). Im Vergleich zu den Blutspiegeln (8 - 17 ng/mL), die bei der chronischen Applikation bei Transplantationen erreicht werden, sind die durch den Rapamycin-beschichteten Stent erreichten Peaks vernachlässigbar (SOUSA et al. 2001).

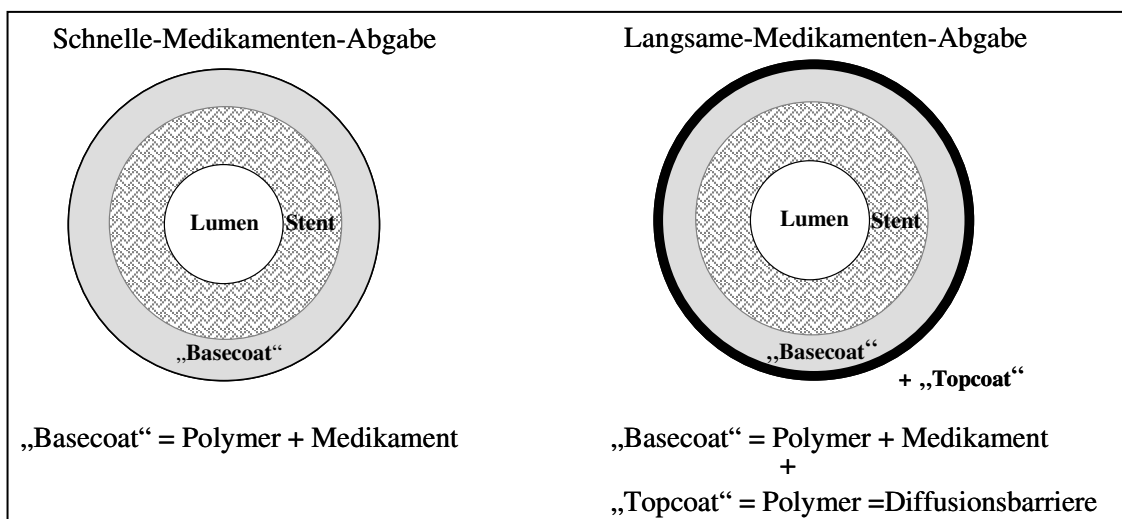


Abbildung 4: Aufbau beschichteter Stents (nach REGAR et al. 2001).

In mehreren Studien zeigte der Rapamycin-beschichtete Stent eine signifikante Reduzierung der Restenoserate (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: Erste Studien mit dem Rapamycin-beschichteten Stent.

	Restenoserate nach Intervention			
	6 Monate	8 Monate	12 Monate	24 Monate
SOUSA et al. 2001/2003 • erste Humanstudie • Rapamycin-beschichteter BX TM VELOCITY Stent • de novo Läsionen	—	—	0 % (n = 45, 15 FR, 30 SR)	0 % (n = 30, 15 FR, 15 SR)
RAVEL-Studie (MORICE et al. 2002) • BX TM VELOCITY Stent vs. Rapamycin-beschichteter BX TM VELOCITY Stent (140 µg/cm ²) • randomisierte doppel-blind Studie • de novo Läsionen	0 % Rapa (n = 120) 27 % Stent (n = 118)	—	—	—
SIRIUS-Studie (HOLMES et al. 2004) • BX TM VELOCITY Stent vs. Rapamycin-beschichteter BX TM VELOCITY Stent (109 µg/cm ²) • randomisierte doppel-blind Studie • de novo Läsionen • komplexe Läsionen • Patienten mit höherem Restenoserisiko	—	3 % Rapa (n = 533) 35 % Stent (n = 525)	—	—

Stent = BXTM VELOCITY Stent

Rapa = Rapamycin-beschichteter BXTM VELOCITY Stent

n = Anzahl der Probanden

FR = fast release

SR = slow release

Der Rapamycin-beschichtete Stent gilt als einer der größten Durchbrüche der interventionellen Kardiologie (INDOLFI et al. 2003). Dennoch sind weitere Studien, v. a. Langzeitstudien, Studien in kleinen Gefäßen, Studien bei Mehrgefäßerkrankungen, etc. nötig, um den klinischen Nutzen des Stents wirklich ermitteln zu können. Im April 2002 wurde der Rapamycin-beschichtete Stent für den Gebrauch in Europa zugelassen. Der größte Nachteil der Medikamenten-beschichteten Stents sind ihre Kosten. Es wird geschätzt, dass diese das 2 bis 3fache der konventionellen Stents kosten. Die Kosten bei Mehrgefäßerkrankungen übersteigen sogar die für Bypass-Operationen (FAXON 2002).

2.2 Restenose

In den USA werden jährlich ca. 1,6 Milliarden \$ für die Behandlung der koronaren Restenose ausgegeben (TOPOL et al. 1993). Eine Behandlung, die das Restenoserisiko um 25 % reduziert, würde 1 400 \$ und eine Reduzierung um 33 % sogar 2 000 \$ pro Patient einsparen (CALIFF 1995).

2.2.1 Restenose nach PTCA

Es besteht keine übereinstimmende Meinung zu einer angebrachten und exakten Definition der Restenose. TEIRSTEIN et al. (2000) definierten die Restenose allgemein als „loss of gain“, den Verlust des durch die zuvor durchgeführte PTCA gewonnenen initialen Lumenzuwachses.

Nach den beiden am häufigsten verwendeten binären angiographischen Definitionen liegt eine Restenose vor, wenn ein Lumenverlust von $\geq 50\%$ der ursprünglichen durch die Angioplastie erreichten Zunahme des Gefäßdurchmessers besteht bzw. eine Stenose von über 50 % bei einer nachfolgenden Angiographie vorliegt (BENNETT und O'SULLIVAN 2001).

Die Pathophysiologie der Restenose ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Folgende Mechanismen werden diskutiert zur Restenose nach einer PTCA beizutragen:

- Der *elastische Recoil* des Gefäßes,
- die *Plättchenaggregation und Thrombusbildung*,
- die *Inflammation*,
- die *Neointimaformation* aufgrund von *Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen* und der *Produktion von extrazellulärer Matrix*,
- das *negative Remodeling* des Gefäßes.

Die Restenose ist „als arterieller Heilungsprozess nach Verletzung durch die transluminale Koronarrevaskularisation“ zu verstehen (SCHWARTZ 1994).

In histologischen Studien von Arterien nach PTCA beim Menschen fanden NOBUYOSHI et al. (1991) in 30 von 34 Läsionen (88 %) nach Angioplastie Risse in der Intima, Media und Adventitia.

Die elastischen Fasern der Gefäßwand reagieren auf die Dehnung durch die Balloninflation innerhalb von wenigen Sekunden bzw. Minuten mit einem Zurückschnellen, dem so genannten *elastischen Recoil*. RENSING et al. (1991) berichteten von einem Lumenverlust

von bis zu 50 % der maximal erreichbaren Fläche direkt nach der Ballondeflation. Biegungsreiche Läsionen und Läsionen mit einer großen Masse an atherosklerotischen Plaques zeigten weniger elastischen Recoil, es treten häufiger Dissektionen in diesen Läsionen auf (ELLIS et al. 1988).

Durch die Endotheldenudation und die Dissektion der Media werden subintimale Bestandteile wie Kollagen, von Willebrandfaktor, Fibronektin und Laminin exponiert und führen zur Adhäsion und Aggregation von Plättchen (DAVIES und HAGEN 1993). Bindung von Fibrinogen führt zur Quervernetzung. Sowohl die Plättchen, als auch die *Thrombusformation* sind in den Prozess der Restenose verwickelt (CHESEBRO et al. 1987, HARKER 1987, HERAS et al. 1989, IP et al. 1990). STEELE et al. (1985) beobachteten im Ballonangioplastiemodell beim Schwein, in Regionen mit Verletzung der Media, eine deutliche Plättchenablagerung und Thrombose. Regionen mit einer oberflächlichen Verletzung bedeckte eine ein- bis zweischichtige Lage von Plättchen. Sieben Tage nachdem eine Reendothelialisierung eingetreten war, konnte in tiefen Verletzungen ein muraler Thrombus mit beginnender Organisation gesehen werden. In den oberflächlichen Verletzungen war praktisch keine Plättchendeponition mehr vorhanden (STEELE et al. 1985).

Der Grad der Verletzung spielt eine wichtige Rolle im Prozess der Neointimaformation. IP et al. (1990) klassifizierten den Schweregrad der Verletzung wie folgt:

- Typ I: funktionelle Änderung der Endothelzellen,
- Typ II: Endotheldenudation und intimale Schädigung,
- Typ III: Endotheldenudation und Schädigung der Intima und der Media.

Bei der mechanischen Verletzung und nach einer PTCA kommt es meist zu einer Schädigung vom Typ II/III mit einer starken Plättchenaggregation (IP et al. 1990).

Die Arbeitsgruppe um ROSS beschreibt die Plättchenadhäsion, Degranulation und die damit verbundene Anhäufung von Wachstumsfaktoren als Stimulus für die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen (STEMERMAN und ROSS 1972, ROSS 1981).

Dagegen konnten FINGERLE et al. (1989) im Tiermodell zeigen, dass die Abwesenheit von Plättchen weder den Zeitpunkt noch das Ausmaß der Proliferation von glatten Muskelzellen (SMC) der Media nach Ballonkatheter-Verletzung beeinflusste. In den thrombozytopenischen Ratten beobachteten sie eine verringerte Größe der intimalen Läsion. Sie folgerten, dass

Plättchen eine weniger wichtige Rolle bei der Proliferation innerhalb der Media spielen, sondern wichtiger für die Migration der glatten Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC) in die Intima sind (FINGERLE et al. 1989).

Neuere Studien untermauern eine wichtige Rolle der *Inflammation* während der Neointimaformation. Die PTCA ruft eine akute inflammatorische Antwort hervor. Im Menschen erfolgt 15 Minuten nach der PTCA ein Anstieg an Neutrophilen-, Monozyten- und Plättchenadhäsionsmolekülen (SERRANO et al. 1997). INOUE et al. (2000) konnten ebenfalls einen Anstieg des transkardialen Gradienten des Neutrophilenadhäsionsmoleküls CD11b messen, zeigten aber zusätzlich noch eine Korrelation zwischen dem transkardialen Gradienten von CD11b 48 Stunden nach Ballonangioplastie und dem späten Lumenverlust. Es scheint, dass die Progression der Neointimahyperplasie mit der Aktivierung von Neutrophilen in Zusammenhang steht (INOUE et al. 2000).

Im Tiermodell sahen WILENSKY et al. (1995) eine Anhäufung von Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten im Bereich des muralen Thrombus bis fünf Tage nach der Intervention. Im Gegensatz dazu konnten WELT et al. (2000) nur eine frühe Infiltration von Neutrophilen in der Media beobachten. Die Applikation eines Antikörpers gegen das β_2 -Integrin Mac-1 (Oberflächenrezeptor zur Leukozytenrekrutierung) reduzierte die Infiltration der Neutrophilen und die Proliferation der Mediazellen (WELT et al. 2000), sowie die Neointimafläche (ROGERS et al. 1998). Inflammatorische Zellen sind wichtige Mediatoren im Prozess der Restenose nach Gefäßverletzung (WELT et al. 2000).

Wie die Plättchendeponierung, ist auch die Adhäsion von Neutrophilen durch den Schweregrad der Verletzung beeinflusst und nach tiefer Gefäßverletzung verstärkt (MERHI et al. 1995).

Den Mechanismus der *Proliferation von glatten Muskelzellen* beschreiben CLOWES et al. (1983a) in ihrem Ratten-Ballonangioplastie-Modell. Die Verletzung führte wie bereits oben beschrieben zur Endotheldenudation und zur Schädigung der Media (CLOWES et al. 1983b). 30 bis 40 % der glatten Muskelzellen der Media (CLOWES und CLOWES 1986) begannen 24 Stunden nach der Verletzung, mit einem Maximum nach 48 Stunden, zu proliferieren. In der Intima war eine Proliferation nach vier Tagen, mit einem Maximum nach sieben Tagen, zu beobachten (CLOWES et al. 1983b).

Diese zeitliche Verschiebung begründeten CLOWES et al. (1983b), wie auch schon HASSLER (1970), mit der *Migration der Mediazellen* in die Intima. Nach zwei Wochen ist das Wachstum der Intima auf die Synthese und Deposition von extrazellulärer Matrix

zurückzuführen, die Zahl der glatten Muskelzellen bleibt konstant (CLOWES et al. 1983a). Die extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagen, Elastin und Proteoglykan (NIKKARI et al. 1994).

Nach ca. drei Monaten stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Proliferation der glatten Muskelzellen und der Produktion von extrazellulärer Matrix ein. Die Intima setzt sich jetzt zu 20 % aus glatten Muskelzellen und zu 80 % aus extrazellulärer Matrix zusammen (CLOWES 1983a).

NOBUYOSHI et al. (1991) fanden beim Menschen elf Tage nach der PTCA zum ersten Mal das Auftreten von intimaler Proliferation von glatten Muskelzellen. Es ließen sich histologische Unterschiede zwischen den frühen und späten Läsionen erkennen. Bis sechs Monate nach der PTCA fanden sich glatte Muskelzellen vom synthetischen Typ, später glatte Muskelzellen vom kontraktiven Typ (NOBUYOSHI et al. 1991).

In Verbindung mit der Veränderung des Phänotyps der glatten Muskelzellen, kam es zur Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. In der frühen Phase war reichlich extrazelluläre Matrix hauptsächlich bestehend aus Proteoglykanen vorhanden. Später ist weniger extrazelluläre Matrix zu finden, die dann vorwiegend aus Kollagen besteht (NOBUYOSHI et al. 1991).

Als eines der Auslöser für die initiale proliferative Antwort beschreiben CLOWES et al. (1989) die Endotheldenudation, wodurch die Barrierefunktion und die regulatorischen Eigenschaften, u. a. die Inhibierung der Proliferation glatter Muskelzellen, wegfallen (DAVIES und HAGEN 1993, SCOTT-BURDEN und VANHOUTTE 1993). Außerdem spielt die Schädigung von glatten Muskelzellen der Media mit der Freisetzung intrazellulärer Mitogene eine Rolle (CLOWES et al. 1989).

Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie z. B. basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) freigesetzt von SMC, Plättchen, Endothelzellen und inflammatorischen Zellen werden diskutiert an der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen teilzuhaben (MAJESKY et al. 1991, LINDNER und REIDY 1991, JAWIEN et al. 1992, KOYAMA et al. 1994)

PDGF und TGF- β konnten *in vitro*, sowohl die Proteinsynthese, als auch die mRNA-Expression von interstitiellem Kollagen I und III in humanen SMC stimulieren (AMENTO et al. 1991), was dafür spricht, dass Zytokine nicht nur einen Einfluss auf die Proliferation und Migration von SMC haben, sondern auch auf die Produktion der extrazellulären Matrix.

Das Ausmaß der intimalen Proliferation nach PTCA war in Läsionen mit Riss in der Media oder Adventia signifikant größer, verglichen mit Läsionen ohne Riss oder lediglich einem Riss der Intima (NOBUYOSHI et al. 1991).

Auch SANGIORGI et al. (1999) zeigten eine Korrelation zwischen der Länge der Unterbrechung der Lamina elastica interna (IEL) und der Neointimafläche.

In den letzten Jahren wurde eine Beteiligung von hämatopoietischen Progenitorzellen des Knochenmarks an der Neointimaformation nach einer Verletzung gezeigt (HAN et al. 2001, SATA et al. 2002).

Die Neointimabildung und *das negative Remodeling* werden als die wichtigsten Ereignisse der Restenose angesehen. Studien im Tiermodell (STEELE et al. 1985, MULLER et al. 1992) und im Menschen (AUSTIN et al. 1985, NOBUYOSHI et al. 1991) unterstellten, dass es zur Restenose nach Angioplastie allein durch die exzessive Neointimahyperplasie kommt.

Kürzlich zeigten verschiedene Studien, dass das negative Remodeling des Gefäßes zum Lumenverlust stärker beiträgt als die Intimahyperplasie (MINTZ et al. 1996a, KIMURA et al. 1997, SANGIORGI et al. 1999, INDOLFI et al. 2003). Als Remodeling bezeichnet man allgemein die Veränderung des Gefäßumfangs über einen bestimmten Zeitraum. Sie wird über die Fläche, die durch die Lamina elastica externa (EEL) umschrieben wird, bemessen. Man unterscheidet positives Remodeling in Form einer Gefäßausdehnung nach außen und negatives Remodeling als Schrumpfung des Gefäßes (SCHWARTZ 1998). Die Abnahme der EEL-Fläche zeigte sich als ein spätes Ereignis zwischen ein und sechs Monaten nach der Angioplastie (KIMURA et al. 1995). Die Mechanismen des Remodelings sind wenig bekannt. Zellproliferation, -apoptose, Migration und Veränderungen der extrazellulären Matrix tragen dazu bei (SCHWARTZ 1998). Die Beteiligung der Adventitia in Form einer durch die Verletzung ausgelösten Fibrose mit einer Kontraktion, die zur Kompression des Gefäßes führt, wird diskutiert (SCOTT et al. 1996, SHI et al. 1996).

MINTZ et al. (1996a) beobachteten in 73 % der Fälle nach PTCA beim Menschen, dass die Lumenabnahme auf eine Abnahme der EEL-Fläche zurückzuführen war und nur in 27 % der Fälle auf einer Zunahme der Fläche der Plaque und der Media. Sowohl positives (in 22 % der Fälle), als auch negatives Remodeling lagen vor. Die Läsionen mit positivem Remodeling wiesen mit 26 % eine erheblich geringere Restenoserate als die mit negativem Remodeling mit 62 % auf. Restenotische Läsionen hatten im Gegensatz zu nicht restenotischen Läsionen

eine wesentlich größere Abnahme in der EEL-Fläche und in der Lumenfläche (MINTZ et al. 1996a).

2.2.2 In-Stent-Restenose

Es wird geschätzt, dass die In-Stent-Restenose (ISR) 1999 in den USA bei 150 000 Patienten aufgetreten ist (AL SUWAIDI et al. 2000).

Das Einbringen eines Stents als Gefäßstütze verhindert den elastischen Recoil und das negative Remodeling des Gefäßes. Dadurch kann ein wesentlich größerer initialer Lumengewinn erreicht werden (FISCHMAN et al. 1994, SERRUYS et al. 1994).

Die Hyperplasie der Intima ist der vorherrschende Mechanismus der In-Stent-Restenose (MINTZ et al. 1996b, OESTERLE et al. 1998). Die neointimale Hyperplasie im Stent besteht hauptsächlich aus proliferierenden, glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix (KOMATSU et al. 1998, FARB et al. 1999) und ist von der Neointima nach Ballonangioplastie nicht wesentlich zu unterscheiden (OESTERLE et al. 1998). Die neointimale Proliferation im Stent ist größer als die nach der PTCA (FISCHMAN et al. 1994, SERRUYS et al. 1994, FARB et al. 1999).

Bald nach der Stentimplantation ist eine Anhäufung von Plättchen und Fibrin im Bereich der Stentstreben zu beobachten (KOMATSU et al. 1998, FARB et al. 1999). KOMATSU et al. (1998) vermuten, dass die Organisation des muralen Thrombus in der Pathogenese der ISR eine Rolle spielt.

Wie schon KORNOWSKI et al. (1998) im Tiermodell gezeigt haben, fanden FARB et al. (1999, 2002a) auch beim Menschen eine Verbindung zwischen dem Grad der Mediaverletzung, der Inflammation und der Neointimaproliferation. Eine höhere Zelldichte an inflammatorischen Zellen war mit einer stärkeren Neointimaproliferation verbunden. Die erhöhte Zelldichte korrelierte mit dem Grad der Mediaverletzung, entsprechend war eine stärkere Mediadisektion auch mit einer größeren Neointimaformation verbunden.

Eine Mediaverletzung trat in ca. 30 % der Fälle an den Stentstreben auf (FARB et al. 1999).

Im Gegensatz zur PTCA kommt es nach einem Stenteinsatz zu einer akuten inflammatorischen Reaktion mit Neutrophilen, aber auch zu einer chronischen inflammatorischen Reaktion, die reich an Monozyten/Makrophagen ist (FARB et al. 1999).

2.3 Rapamycin

2.3.1 Erforschung

Das Makrolidantibiotikum Rapamycin wurde 1975 in einer Bodenprobe von den Osterinseln als ein natürliches Fermentationsprodukt des Bakterienstammes *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Es wurde nach seinem Fundort „Rapa Nui“, den Osterinseln, benannt (VEZINA et al. 1975).

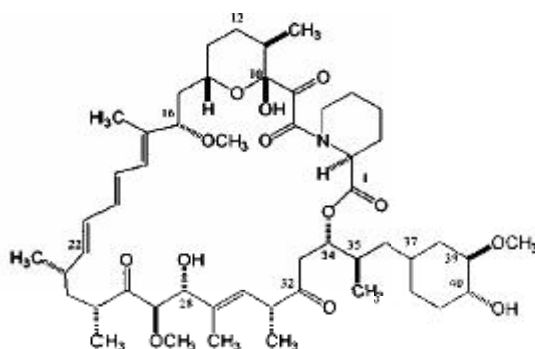


Abbildung 5: Strukturformel von Rapamycin = Sirolimus.

Es ist ein lipophiles makrozyklisches Lakton, das als weißer, kristalliner Feststoff mit einem Schmelzbereich zwischen 183 °C und 185 °C vorliegt (SEHGAL 2003).

Rapamycin zeichnete sich ursprünglich durch seine antimykotische Wirkung, besonders durch eine potente Antikandida-Aktivität, aus (VEZINA et al. 1975).

Nachfolgende Studien konnten antitumoröse/antiproliferative und immunsuppressive Eigenschaften aufdecken (SEHGAL 2003).

Vor allem der einzigartige Wirkungsmechanismus und die bemerkenswerte Unterdrückung der Abstoßungsreaktion bei Transplantationen im Tiermodell machte es für die klinische Anwendung interessant (SEHGAL 2003). Es wurde 1999 von der U.S. Food and Drug Administration als Immunsuppressivum zur Prophylaxe der akuten Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantationen zugelassen (MARX und MARKS 2001).

2.3.2 Wirkungsmechanismus

Rapamycin gehört neben Cyclosporin A und Tacrolimus (FK 506) zur Gruppe der makrozyklischen Immunsuppressiva. Die makrozyklischen Immunsuppressiva binden an spezifische intrazelluläre Bindungs-Proteine, die Immunophiline. Diese funktionieren als cis/trans Peptidylprolylisomerasen (PPIase). Rapamycin und FK 506 sind strukturell sehr

ähnlich. Sie interagieren beide mit den so genannten FK Bindungs-Protein-Familie (FKBPs), wovon FK 506 bindendes Protein 12 (FKBP 12) der bedeutendste Vertreter ist.

Die Bindung der Medikamente an die Immunophiline inhibiert deren PPIase-Aktivität. Die Bildung dieses Medikamenten/Immunophilin-Komplexes ist essentiell für die immunsuppressive Wirkung der Medikamente, die Hemmung der PPIase-Aktivität ist förderlich, aber nicht essentiell (BIERER et al. 1990, SCHREIBER 1991).

Der Rapamycin/FKBP 12-Komplex bindet an das spezifische Zielprotein mammalian Target of Rapamycin (mTOR), weitere synonym verwendete Bezeichnungen sind FRAP, RAFT1 und RAPT1. mTOR ist ein Mediator der G₁-Progression des Zellzyklus (HEITMAN et al. 1991, BROWN et al. 1994).

Cytokin- oder wachstumsfaktorinduzierte Signale verursachen die Autophosphorylierung und Aktivierung von mTOR. Die Aktivierung von mTOR wird durch die Bindung des Rapamycin/FKBP 12-Komplexes verhindert (BROWN et al. 1994).

Rapamycin hemmt den Zellzyklus in der mittleren G₁-Phase (TERADA et al. 1993).

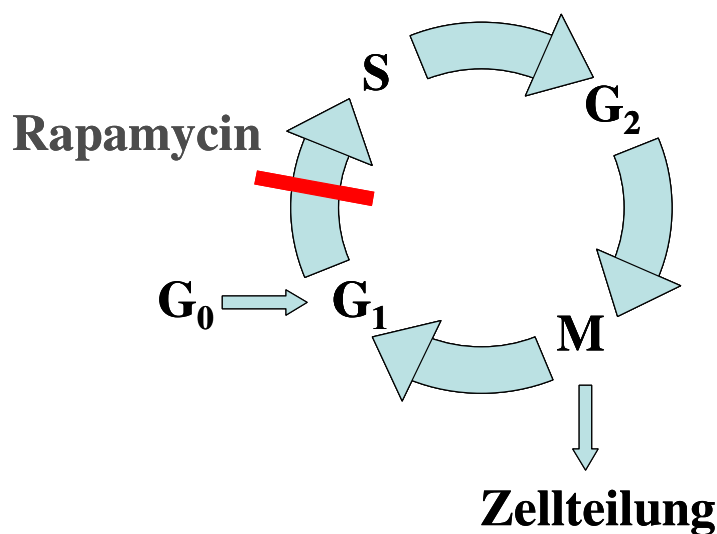


Abbildung 6: Hemmung des Zellzyklus durch Rapamycin (nach BRAUN-DULLAEUS et al. 1998).
| Blockierung. G₀-Phase = Ruhephase, G₁- und G₂-Phase = metabolisch aktive Phasen (Proteinsynthese, Ergänzung des Tubulinpools, RNA-Produktion), M- oder Mitose-Phase = Zellteilung, S- oder Synthese-Phase = DNA-Replikation.

2.3.3 Zelluläre Zielmoleküle des Rapamycin

Die Blockierung von mTOR durch den Rapamycin/FKBP12-Komplex inhibiert die mTOR-vermittelten Signaltransduktionswege (SEHGAL 2003).

mTOR reguliert die p70^{S6}-Kinase in vivo (BROWN et al 1994).

1. Rapamycin unterdrückt selektiv die Translation von mRNAs, die einen Polypyrimidin-Teil (5'TOP) enthalten, durch die Inhibierung der p70^{S6}-Kinase (JEFFERIES et al. 1997).

Die p70^{S6}-Kinase aktiviert das S6 Protein der ribosomalen 40S Untereinheit durch Phosphorylierung. Dies führt zu einer erhöhten Translation von mRNA-Transkripten, die einen Polypyrimidin-Teil (5'TOP) enthalten, wie z. B. ribosomale Proteine, eEF-1 α und der eEF-2–Elongationsfaktor für die Proteinsynthese (JEFFERIES et al. 1994, JEFFERIES et al. 1997).

2. Rapamycin beeinflusst die CREB/ATF Aktivität

Die p70^{S6}-Kinase mediiert die Aktivierung von CREM τ , einem Transkriptionsfaktor der CREB/ATF (cAMP-response-element-binding)-Familie. CREM τ trägt zu einer cAMP-induzierten Transkription von sog. „late genes“ und zur Transkription von proliferating-nuclear-cell-antigen (PNCA) bei (FEUERSTEIN et al. 1995, FEUERSTEIN et al. 1996, JAVIER et al. 1997, SEHGAL 2003). PNCA ist ein Zellzyklusregulator, der notwendig ist, um von der G₁-Phase in die S-Phase zu kommen (JAVIER et al. 1997).

3. Rapamycin blockiert die Phosphorylierung des 4E-BP1 (BERETTA et al. 1996).

Das aktivierte mTOR phosphoryliert das eIF-4E binding protein (4E-BP1) und reduziert damit seine Affinität zu dem mRNA 5'cap-binding protein eIF-4E. Dadurch wird die cap-abhängige Translationsinhibierung unterbrochen (GRAVES et al. 1995, BERETTA et al. 1996, BRUNN et al. 1997) und es kommt zur Translation von einigen spezifischen mRNAs, die für das Zellwachstum und -proliferation verantwortlich sind. Die Inhibierung von eIF-4E verlangsamt die Zellproliferation (DE BENNEDETI et al. 1991) und resultiert in einem frühen G₁-Arrest in der Hefe (BRENNER et al. 1988).

4. Rapamycin verhindert in T-Zellen die CD28 medierte Degradation von I κ B α und damit die Translokation von CD28-response-element-binding-factor (c-Re1) in den Nukleus.

Ohne Kostimulation über CD28 liegt das Regulatorprotein I κ B α im Zytoplasma als Komplex mit dem Transkriptionsfaktor c-Re1 vor. Kostimulation führt zur Degradation von

I κ B α und der Translokation von c-Rel in den Nukleus, was die Transkription von einigen Genen, wie Lymphokin-Genen z. B. IL-2, Interferon γ , induziert (LAI und TAN 1994).

5. Rapamycin verhindert die Aktivierung von Cyclin/Cdk-Komplexen, wie Cyclin E/Cdk2 der späten G₁-Phase des Zellzyklus, indem es die Herunterregulierung des Cyclininhibitors p27^{kip1} blockiert.

Cyclin/Cdk-Komplexe sind Proteinkomplexe, die die Progression des Zellzyklus kontrollieren (CORDON-CADO 1995). Die Kinaseaktivität der Cyclin/Cdk-Komplexe wird durch die entsprechenden Inhibitoren CdkI (p16, p21, p27^{kip}) reguliert (NOURSE et al. 1994). Erst bei einer Konzentrationserniedrigung des Cyclininhibitors wird der Cyclin E/Cdk2-Komplex aktiviert und kann funktionieren. Der Cyclin E/Cdk2-Komplex ist für den Eintritt in die S-Phase verantwortlich. Die Blockierung kann nicht durch FK 506 erreicht werden, was dafür spricht, dass es ein mTOR-abhängiges Ereignis ist (NOURSE et al. 1994).

Weiterhin konnten FLANAGAN und CRABTREE (1993) zeigen, dass Rapamycin die Expression von p34^{cdc2} blockiert, was mit dem Verlust des Eintritts in die S-Phase korreliert ist.

Infolge der Hemmung der Cyclin/Cdk-Komplexe kommt es zu einer Blockierung von sogenannten „downstream“ Ereignissen. Das Tumorsuppressor Retinoblastomprotein pRb ist ein Ziel der enzymatisch aktiven Cyclin/Cdk-Komplexe (CORDON-CADO 1995). Es erfolgt eine reduzierte Hyperphosphorylierung von pRb. Eine Hypophosphorylierung von pRb unterdrückt die Progression von der G₁-Phase in die S-Phase (MIHARA et al. 1989).

Zielmoleküle von pRb sind Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Die Bindung von pRb an E2F verhindert deren Transkriptionsaktivität. Durch Rapamycin wird die Dissoziation des pRb/E2F-Komplexes blockiert, was zu einer Abnahme der Synthese von Zellzyklusproteinen, die am G₁/S-Phasen Übergang beteiligt sind, wie cdc2 und Cyclin A, führt (CORDON-CADO 1995, POON et al. 1996, SEHGAL 2003).

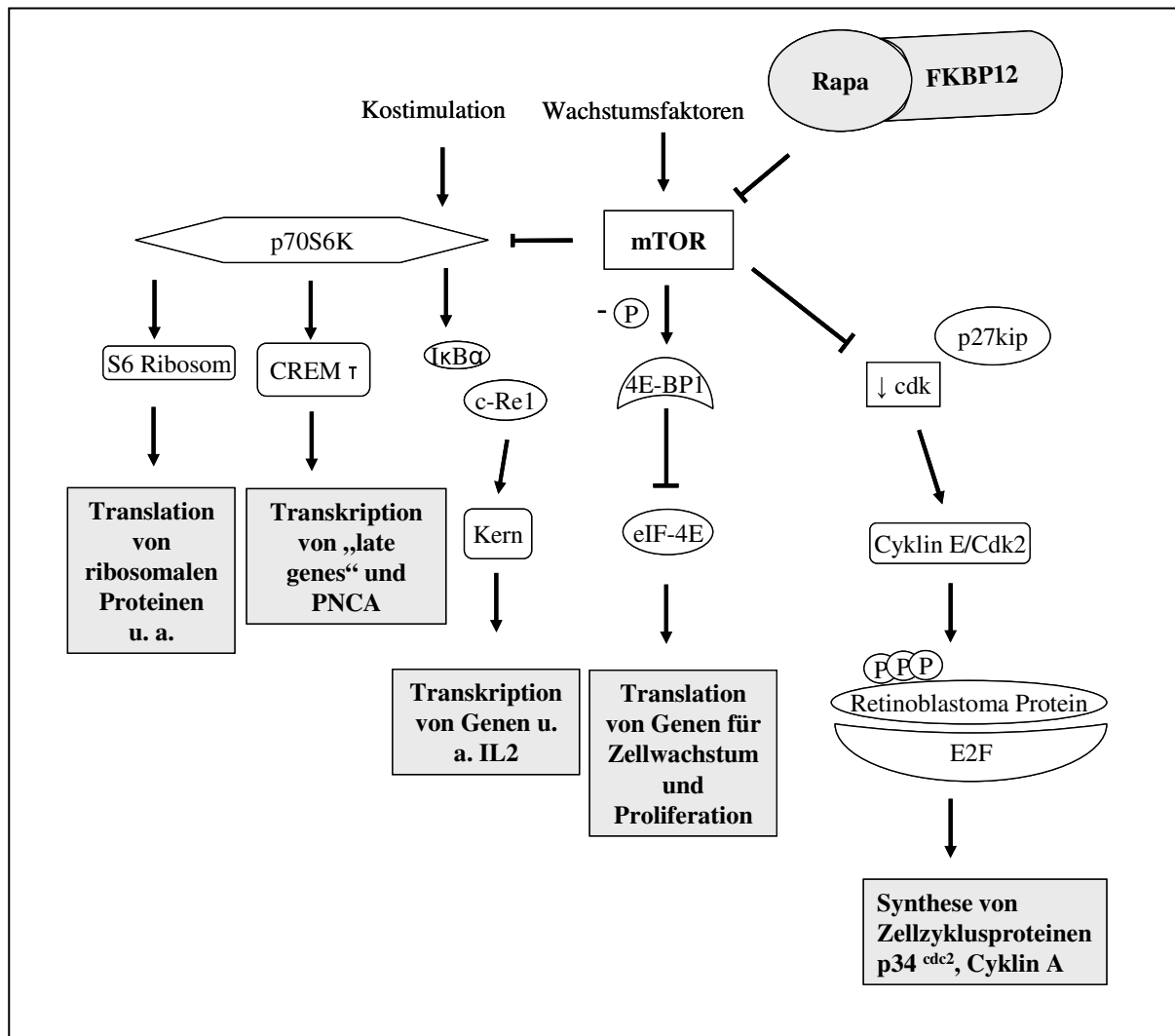


Abbildung 7: Einfluss von Rapamycin auf biochemische Ereignisse (nach SEHGAL 2003).

→ Aktivierung, ↓ Reduzierung, ⊥ Hemmung

2.3.4 Wirkung des Rapamycin

Experimentelle Daten legen nahe, dass die Inhibierung der Zellzyklusprogression mit Rapamycin eine effektive Strategie sein könnte, um Restenose zu vermeiden.

Es scheint, dass ein Zellzyklusarrest außer der Proliferation, auch Prozesse wie die Zellmigration, die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, die Thrombusformation und die Modulation von extrazellulärer Matrix beeinflussen könnte (BRAUN-DULLAEUS et al. 1998).

2.3.4.1 Antiproliferative Wirkung auf Immunzellen

In vitro konnte Rapamycin die durch Mitogene, Alloantigene, Lymphokine, Phorbolster und Kalziumionophore induzierte Proliferation von murinen, porcinen und humanen

T-Lymphozyten hemmen (DUMONT et al. 1990a, KAHAN 1991, KAY et al. 1991). KAY et al. (1991) zeigten eine entsprechende Hemmung auch bei B-Lymphozyten.

Rapamycin inhibiert, im Gegensatz zu Cyclosporin A und FK 506, einen späten calciumunabhängigen Signalweg in der T-Zell-Aktivierungskaskade (LIU et al. 1992). Es beeinflusst die Antwort der T-Zellen auf wachstumsfördernde Lymphokine, wie z.B. IL-2. DUMONT et al. (1990a) und SEHGAL und BANSBACH (1993) konnten zeigen, dass Rapamycin die Proliferation von Lymphozyten auch noch hemmen konnte, wenn es erst 12 Stunden nach dem Stimulationsbeginn dazugegeben wurde.

Die immunsuppressiven Eigenschaften des Rapamycin resultieren also aus einer Blockierung der körpereigenen Immunantwort durch die Hemmung der B- und T-Zellaktivität in der G₁-Phase des Zellzyklus (TERADA et al. 1993, SEHGAL 2003). Auch die Hemmung der Differenzierung und Proliferation von B-Zellen trägt wahrscheinlich zu den immunregulativen Effekten von Rapamycin bei (SEHGAL 2003).

Im Tiermodell konnte Rapamycin die Arteriopathie nach Allograft-Transplantation inhibieren und zeigte dabei eine reduzierte Infiltration von T-Zellen und Makrophagen (GREGORY et al. 1993). Auch nach der Implantation eines Rapamycin-beschichteten Stents beim Schwein konnte eine deutliche Reduzierung der Streben-assoziierten Inflammation (SUZUKI et al. 2001) beobachtet werden.

2.3.4.2 Antiproliferative Wirkung auf Nicht-Immunzellen

In mehreren Studien zeigte Rapamycin auch auf Nicht-Immunzellen eine antiproliferative Wirkung. Ein Einfluss auf die Proliferation von bovinen aortalen Endothelzellen, humanen Umbilikalvenenendothelzellen, von 3T3-Maus-Fibroblasten (AKSELBAND et al. 1991), Hepatozyten (Ratten) (FRANCAVILLA et al. 1992) und die Wachstumsfaktor-stimulierte Proliferation von humanen Fibroblasten (NAIR et al. 1997) wurde gezeigt.

2.3.4.3 Antiproliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen

Rapamycin inhibierte *in vitro* die Proliferation von Ratten- und humanen vaskulären glatten Muskelzellen. Ein Überschuss eines Tacrolimusanalogons konnte die antiproliferative Wirkung des Rapamycin durch eine kompetitive Hemmung am FKBP-12 Rezeptor aufheben, was dafür spricht, dass auch in Nicht-Immunzellen die Wirkung des Rapamycin über den FKBP-12 Rezeptor abläuft (MARX et al. 1995). In humaner Neointima konnte eine Hochregulierung von FKBP-12 auf mRNA- und Proteinebene gefunden werden

(ZOHLNHÖFER et al. 2001a). Das interzelluläre Zielmolekül des Rapamycin/FKBP 12-Komplexes, mTOR-Protein, konnte in Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Koronararterien (CASMCs) der Media von nicht-atherosklerösen Arterien und in neointimalen CASMCs und T-Lymphozyten von restenotischen Arterien gefunden werden. In der humanen Neointima war mTOR in den Kern verlagert und zeigte eine stärkere Phosphorylierung in CASMCs und T-Lymphozyten, was für eine Aktivierung von mTOR während der Neointimaformation spricht (ZOHLNHÖFER et al. 2004).

MARX et al. (1995) fanden außerdem eine reduzierte Phosphorylierung von pRb am G₁/S-Phasen Übergang in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) durch Rapamycin. In CASMCs konnte eine Unterdrückung der Expression von E2F-1 und pRb/E2F-1-assoziierten Genen, wie Cyclin D3, durch Rapamycin gefunden werden (ZOHLNHÖFER et al. 2004).

Auch *in vivo* konnte eine Inhibierung der Phosphorylierung von pRb durch Rapamycin beobachtet werden. Sowohl GALLO et al. (1999) nach PTCA beim Schwein, als auch SUZUKI et al. (2001) beim Einsatz eines Rapamycin-beschichteten Stents beim Schwein, fanden neben einer reduzierten neointimalen Hyperplasie, eine reduzierte Phosphorylierung von pRb durch Rapamycin. In CASMCs humaner Neointima waren Zielmoleküle des pRb, wie E2F-1 und Cyclin D3 hochreguliert (ZOHLNHÖFER et al. 2001b).

Daneben sahen GALLO et al. (1999) einen deutlichen Anstieg von p27^{kip1} in der Gefäßwand. Antikörper gegen p27^{kip1} eliminierten die inhibitorische Aktivität in Rapamycin behandelten Zellen. Dies ließ vermuten, dass der erhöhte p27^{kip1}-Spiegel für die Inhibierung der Proliferation durch Rapamycin verantwortlich ist (NOURSE et al. 1994).

ROQUE et al. (2001) untersuchten den Einfluss von p27^{kip1} im Mausmodell. Rapamycin konnte, sowohl in Wildtyp-Mäusen, als auch in p27^{kip1}-knockout-Mäusen die intimale Fläche nach Femoralisverletzung signifikant reduzieren. Auch die Proliferation von Aorten-SMCs von Wildtyp- und p27^{kip1}-knockout-Mäusen wurde durch Rapamycin gehemmt. Der inhibitorische Effekt des Rapamycin kann somit auch über einen p27^{kip1} unabhängigen Mechanismus ablaufen (ROQUE et al. 2001)

In vaskulären glatten Muskelzellen konnte Rapamycin außerdem die Phosphorylierung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 4E-binding protein inhibieren (GRAVES et al. 1995).

Rapamycin hebt sich dadurch von anderen Medikamenten ab, dass es mehrere Regulatoren der Zellzyklusprogression in VSMC hemmt. Die Eigenschaft *in vitro* die Proliferation von

VSMCs von Ratten und Menschen und *in vivo* von Schweinen zu hemmen, legt nahe, dass seine Wirkung nicht Spezies-spezifisch ist. Die Tatsache, dass Rapamycin über die Inhibierung von Zellzykluskinasen und der Phosphorylation von pRb in die Proliferation von glatten Muskelzellen eingreift, lässt darauf schließen, dass seine Wirkung unabhängig vom Stimulus, der die Proliferation der glatten Muskelzellen auslöst, ist. Deshalb ist es sehr wirksam beim Einsatz gegen Post-PTCA-Restenose (MARX et al. 1995).

2.3.4.4 Anti-migratorische Wirkung

Rapamycin hemmt *in vitro* die Migration von Ratten- und humanen glatten Muskelzellen. *In vivo* dauerte der inhibitorische Effekt des Rapamycin auf die Migration von porcinen SMC über zwei Wochen nach Absetzen der Rapamycin-Exposition an (POON et al. 1996). Durch einen Überschuss an Tacrolimus konnte der anti-migratorische Effekt des Rapamycin kompetitiv gehemmt werden, was wiederum dafür spricht, dass auch die migratorische Wirkung des Rapamycin über den FKBP 12-Rezeptor abläuft (POON et al. 1996, SUN et al. 2001).

SUN et al. (2001) beobachteten *in vitro* und *in vivo* eine Inhibierung der Migration von Wildtyp- und p27^{kip1}-knockout-SMCs durch Rapamycin von hoher Konzentration, bei niederen Konzentrationen dagegen war keine Hemmung der Migration bei p27^{kip1}-knockout-SMCs zu sehen. SUN et al. (2001) sprechen von einem p27^{kip1} abhängigen und unabhängigen Weg, der die anti-migratorische Wirkung des Rapamycin mediiert.

2.3.5 Nebenwirkungen des Rapamycin

Rapamycin zeigt weniger schwerwiegende Nebenwirkungen als die beiden anderen Vertreter der makrozyklischen Immunsuppressiva. Unter anderem werden eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, erhöhte Lipid- und Cholesterolspiegel, Thrombozytopenie, ein erniedrigter Hämoglobinspiegel, Hypertension, Hautausschlag, Akne, Diarrhoe, Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel beobachtet. Rapamycin ist im Gegensatz zu Cyclosporin A und Tacrolimus nicht nierentoxisch (SAUNDERS et al. 2001). Die Nierentoxizität wurde in verschiedenen Tiermodellen getestet. Ratten zeigten weder bei einer Dosierung von 1,5 mg/kg i.p. (WHITING et al. 1991), noch bei 10 mg/kg per os für 14 Tage (DI JOSEPH et al. 1992) signifikante renale Dysfunktionen. Auch bei Mäusen (DIJOSEPH und SEHGAL 1993), Hasen (FRYER et al. 1993), Schweinen (ALMOND et al. 1993, GRANGER et al. 1995) und Primaten (WANG et al. 1991) wurden nur geringe bzw. keine Effekte auf renale Parameter

beobachtet. Mäuse, die mit 6 mg/kg/d i.p. behandelt wurden, zeigten keine Anzeichen von Nieren-, Herz- oder Leberschäden, die zelluläre Knochenmarkszusammensetzung war normal (MORRIS 1992).

Bei Hunden wurde eine schwere gastrointestinale Toxizität mit Schleimhautnekrosen und submukosalen Vaskulitiden (COLLIER et al. 1990, OCHIAI et al. 1993) festgestellt. Vaskulitiden wurden auch bei Pavianen beobachtet (COLLIER et al. 1991).

2.3.6 Everolimus – ein synthetisches Derivat des Rapamycin

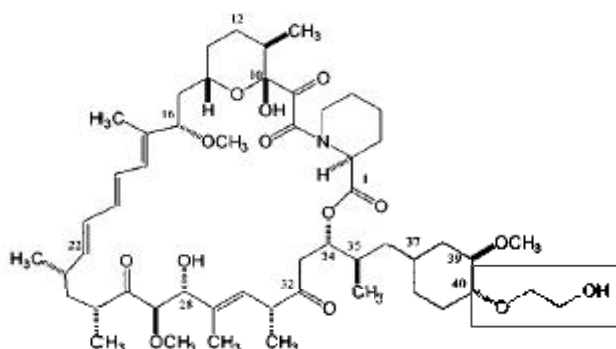


Abbildung 8: Strukturformel SDZ RAD = Everolimus.

Everolimus, SDZ RAD oder 40-O-(2-hydroxy)ethylrapamycin ist ein synthetisches Derivat des Rapamycin. Es wurde zur oralen Applikation entwickelt. Die Herstellung einer oralen Lösung des Rapamycin mit zufriedenstellender Stabilität, Bioverfügbarkeit und Zuverlässigkeit gestaltete sich sehr schwierig (YATSCOFF et al. 1995, SCHULER et al. 1997). Die meisten Arbeiten mit Rapamycin erfolgten über eine parenterale Applikation. Nur in wenigen Studien wurde es oral verabreicht, wobei einige von sehr großen individuellen Unterschieden in den pharmakokinetischen Parametern berichteten (KAHAN et al. 1995). Die 2-Hydroxy-Ethyl-Gruppe in Position 40 erhöht die Polarität des Moleküls, was die Bioverfügbarkeit des Derivates im Gegensatz zu Rapamycin signifikant verbessert (SCHULER et al. 1997, CROWE et al. 1999).

SDZ RAD bindet ebenfalls mit hoher Affinität an den FKBP12 Rezeptor (SCHULER et al. 1997, SEDRANI et al. 1998), was als Voraussetzung für die inhibitorische Aktivität der Immunsuppressiva der Rapamycinklasse angesehen wird (DUMONT et al. 1990b). Seine Bindung an den FKBP12 Rezeptor ist, gegenüber der des Rapamycin, dreifach verringert. Wie bei Rapamycin, kommt es auch durch SDZ RAD zu einer Hemmung der p70^{S6}-Kinase (SCHULER et al. 1997). In zahlreichen Studien konnten SCHULER et al. (1997) zeigen, dass

SDZ RAD *in vitro* und *in vivo* die gleichen Eigenschaften wie Rapamycin besitzt. *In vitro* hemmt SDZ RAD, wie Rapamycin, die wachstumsfaktorinduzierte Proliferation von B-Hybridoma Zellen bzw. VSMCs (SCHULER et al. 1997). Außerdem inhibiert SDZ RAD die Proliferation von antigenspezifischen humanen T-Zellklonen. Auch BÖHLER et al. (1998) fanden eine Hemmung der T-Zellproliferation durch SDZ RAD *in vitro* und *in vivo*. Die immunsuppressive Eigenschaft bestätigte sich auch *in vivo* in verschiedenen Allotransplantationsmodellen. Trotz einer leicht geringeren *in vitro* Aktivität, ist die Wirksamkeit nach oraler Gabe mindestens der des Rapamycin nach oraler Applikation gleichwertig. Die Diskrepanz zwischen der *in vitro* und *in vivo* Wirksamkeit erklärt man sich durch die günstigeren pharmakokinetischen Eigenschaften des SDZ RAD *in vivo* (SCHULER et al. 1997).

In vivo wurde von FARB et al. (2002b) gezeigt, dass eine orale Gabe von Everolimus die neointimale Hyperplasie nach Stentimplantation in der A. iliaca im Kaninchen signifikant hemmen konnte.

2.4 Verletzungsinduzierte Neointimahyperplasie im Mausmodell

Die Maus als Versuchstier zeichnet sich durch mehrere für die Forschung wichtige Eigenschaften aus (MULLER et al. 1992). Die Kosten für Haltung und Fütterung sind gering, der Fortpflanzungszyklus und damit der Generationswechsel sind kurz, so dass das Tier schnell zur Verfügung steht. Die Maus ist robust und unkompliziert im Umgang.

Ein weiterer Vorteil ist das gut charakterisierte und relativ leicht zu manipulierende Genom der Maus, wodurch sie als transgene Maus für viele verschiedene genetische Modelle zur Verfügung steht. Spezifische Gene können überexprimiert, mutiert oder deletiert werden, so dass die Möglichkeit besteht einzelne Faktoren zu untersuchen, die möglicherweise im Prozess der Restenose wichtig sind (FUSTER et al. 1998).

Die grundlegende morphologische Struktur von Arterien der Säugetiere scheint in allen Spezies sehr ähnlich zu sein (MULLER et al. 1992). Mittlere und kleinere Arterien, wie die Koronararterien und die A. femoralis, sind vom muskulären Bautyp (siehe 2.5, Seite 31). Die Antwort auf die Verletzung scheint unterschiedlich in Arterien vom muskulären bzw. elastischen Typ (MULLER et al. 1992). Arterien vom muskulären Typ haben mehr glatte Muskelzellen als die vom elastischen Typ, was möglicherweise mit einer stärkeren Neointimaformation verbunden ist (KANTOR et al. 1999).

In verschiedenen Tiermodellen zeigte sich der 129/Sv-Inzuchtstamm als empfänglich für eine Neointimahyperplasie (SATA et al. 2000, SMYTH et al. 2001, KUHEL et al. 2002).

SATA et al. beschrieben 2000 ein neues Mausmodell, das der Ballonangioplastie ähnelt.

Es ist das erste Modell, in dem ein rapides Einsetzen von Apoptose der Mediazellen und eine reproduzierbare Neointimahyperplasie aus glatten Muskelzellen nach transluminaler mechanischer Gefäßverletzung zu beobachten ist (SATA et al. 2000).

Es wurde dem Carotis-Modell der Ratte (CLOWES et al. 1983a) entsprechend entwickelt. Wegen der geringen Größe der A. femoralis der Maus, ist das Einbringen eines Ballons in die Arterie nicht möglich.

Das intraluminale Einführen eines Drahtes führt zur Überexpansion der A. femoralis und zur Endotheldenudation. Nach wenigen Stunden kommt es zum rapiden Einsetzen von Apoptose der Mediazellen, wie es auch in anderen Tiermodellen mit Ballonangioplastie (PERLMAN et al. 1997) berichtet wurde.

Nach sieben Tagen ist eine schmale Neointimaformation zu erkennen, die bis drei bzw. vier Wochen nach der Verletzung fortschreitet. Die Neointima besteht ausschließlich aus α -Aktin positiven glatten Muskelzellen. Makrophagen wurden in der Adventitia und gelegentlich in der Intima beobachtet. Innerhalb von vier Wochen fand eine komplette Reendothelialisierung statt (SATA et al. 2000).

Das Modell von SATA et al. (2000) unterscheidet sich von anderen Restenosemodellen: Einerseits wird in diesem Modell der Blutfluss nach der Verletzung wiederhergestellt (KUMAR und LINDNER 1997, ROQUE et al. 2000), andererseits konnte eine reproduzierbare Neointimahyperplasie in mehreren Inzuchtstämmen mit verschiedenen genetischen Backgrounds (CARMELIET et al. 1998, KUHEL et al. 2002) induziert werden.

Die oberflächliche Lage der A. femoralis ermöglicht einen leichten und schnellen Zugang zum Gefäß, was nach MULLER et al. (1992) ein wichtiger Gesichtspunkt in der Wahl des Tiermodells ist.

Das Modell eignet sich für Studien der Pathophysiologie der Postangioplastie-Restenose und kann zum genetischen Verständnis der molekularen Signalwege der Restenose nach Angioplastie genutzt werden (SATA et al. 2000).

2.5 Aufbau von Arterien vom muskulären Bautyp

Die mittleren und kleinen Arterien des großen Kreislaufes sind vom muskulären Bautyp und zeigen einen charakteristischen klaren Schichtenaufbau der Wand (HEES 1992):

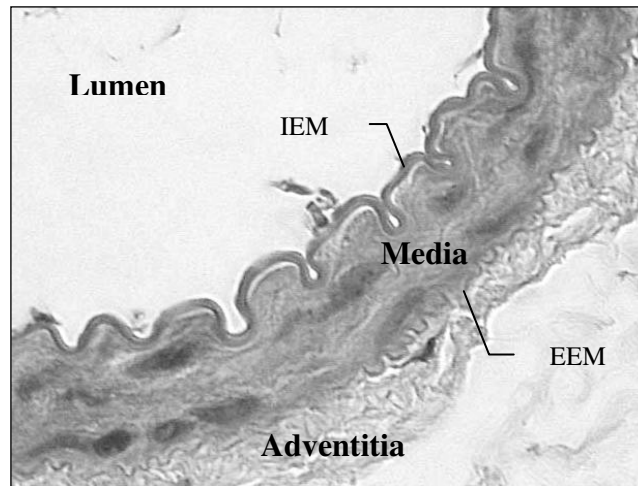


Abbildung 9: Aufbau einer Arterie vom muskulären Typ (nach HEES 1992).

- Tunica Intima: Endothel: Einschichtiges Plattenepithel
Lamina propria intima: Bindegewebe mit Kollagenen und elastischen Fasern.
- Tunica Media: Membrana elastica interna (IEM/IEL): Ringförmig angeordnete glatte Muskelzellen, dazwischen wenig Bindegewebe.
Membrana elastica externa (EEM/EEL): (in kleineren Arterien nur sehr schwach oder fehlend)
- Tunica Adventitia: Faseriges Bindegewebe: Kollagen, elastische Fasern.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzung des Gesamtprojekts

Das Ziel des Gesamtprojektes ist es, die komplexe Pathophysiologie der Restenose näher verstehen zu können und auf molekularer Ebene therapeutische Ansätze zur Reduzierung der Restenose aufdecken zu können. Das Gesamtprojekt setzt sich aus vier verschiedenen Einzelprojekten zusammen. Jedes Projekt für sich soll einen weiteren Schritt zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Restenose beitragen. Am Ende steht das Zusammensetzen der Einzelergebnisse der verschiedenen Projekte.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Einzelergebnisse wurde in diesem Projekt und in dem parallel laufenden Projekt zur Untersuchung des Einflusses des Tyrosinkinaseinhibitors STI 571 auf den Zeitverlauf der Koronarrestenose (SEYBOTH in Vorb.) dieselbe KONTROLL- und STENOSE-Gruppe verwendet. Zur Verifizierung der Wirkung der Medikamente werden vergleichende morphometrische und histologische Untersuchungen zwischen den Medikamenten-behandelten Gruppen und der STENOSE-Gruppe angefertigt. Auf molekular-biologischer Ebene ablaufende Mechanismen werden in der Genexpressionsanalyse untersucht. Um die Ergebnisse der Genexpressionsebene weiter zu validieren werden genspezifische PCRs angefertigt. Auf Proteinebene erfolgt die Darstellung interessanter Moleküle durch immunhistochemische Färbungen.

3.2 Zielvorstellung und Aufbau der eigenen Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Neointimaformation im zeitlichen Verlauf und unter dem Einfluss des Makrolidantibiotikums Rapamycin zu untersuchen. Die Entstehung der Restenose ist multifaktoriell und nur unzureichend geklärt. Durch eine breit gefächerte Analyse der Expression einer Vielzahl von Genen sollen verschiedene Mechanismen, die in die Entstehung der Neointima hineinspielen, zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Geschehen untersucht werden. Der Rapamycin-beschichtete Stent zeigte in ersten humanmedizinischen Studien eine signifikante Reduzierung der Restenoserate. Rapamycin weist antiproliferative, anti-migratorische und antiinflammatorische Eigenschaften auf. Die Ergebnisse der unbehandelten Gruppe werden mit dem Genexpressionsmuster Rapamycin-behandelter Gruppen verglichen, um mögliche Zielmoleküle in dem Wirkungsmechanismus des Rapamycin aufzudecken.

Der Restenosevorgang wird in einem Drahtverletzungsmodell bei der Maus in der A. femoralis experimentell erzeugt. Zu den Zeitpunkten 3, 7 und 14 Tagen wird eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Der Erfolg des Rapamycin-beschichteten Stents, bei dem

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

eine Medikamentenabgabe maximal 28 Tage beträgt, aber auch andere in der Literatur beschriebene Versuche zeigen, dass die Inhibierung der Neointimahyperplasie auf Effekten basiert, die unmittelbar nach der mechanischen Verletzung auftreten (UCHIMURA et al. 2004). Deshalb soll das Augenmerk bei der Untersuchung der Wirkung des Rapamycin auf Genexpressionsebene auf einen frühen Zeitpunkt, 3 Tage nach der Verletzung, im Verlauf der Neointimabildung gelegt werden.

Zur Verifizierung der Daten werden genspezifische PCRs von bereits in der Literatur beschriebenen Genen, als auch von neuen interessanten Genen durchgeführt.

Zur Validierung des Modells werden die Gefäße der unbehandelten und der behandelten Tiere morphometrisch untersucht.

3.3 Material und Methoden

3.3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere werden 43 weibliche und 48 männliche Inzucht-Mäuse des Stammes 129S1/SvIMJ (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) und Tiere aus eigener Nachzucht zwischen 20 und 35 g verwendet. Die Mäuse werden in Makrolonkäfigen des Typs III bzw. IV, zu maximal acht bzw. fünfzehn Tieren, auf Fasereinstreu (Altromin GmbH & Co KG, Lage-Lippe) gehalten. Die Raumtemperatur liegt zwischen 19 bis 24 °C und die Luftfeuchtigkeit wird bei 55 % \pm 5 % konstant gehalten. Das Beleuchtungsregime sorgt für einen zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus, in der Hellphase werden ca. 60 Lux im Käfig erreicht. Wasser und Futter (Altromin-Haltungsfutter Maus/Ratte, Altromin GmbH & Co KG, Lage-Lippe) stehen ad libitum zur Verfügung.

Im Sterilraum erfolgt eine eigene Nachzucht des Stammes. Die Zuchttiere werden hier in Filterkäfigen gehalten, Futter, Wasser und Einstreu werden vor der Anwendung sterilisiert. Die Jungen werden nach 3 bis 4 Wochen abgesetzt.

Zur Gesundheitskontrolle werden regelmäßig serologische, bakteriologische und parasitologische Untersuchungen durchgeführt.

Die Zucht und Aufstallung der Mäuse, sowie die Operationen und die Organentnahmen, erfolgen im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München.

Die histologische Aufarbeitung der Proben wird im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München, die Genexpressionsanalyse und PCR-Verifizierung werden am Deutschen Herzzentrum in der Abteilung für Experimentelle Erwachsenenkardiologie der Technischen Universität durchgeführt.

Das Tierversuchsvorhaben ist von der Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25. Mai 1998 genehmigt.

3.3.2 Versuchsplan und Gruppeneinteilung

3.3.2.1 Kontroll-Gruppe

Die KONTROLL-Gruppe (KO) setzt sich aus unoperierten Gefäßen unbehandelter Mäuse zusammen. Sie dient sowohl bei der Genexpressionsanalyse, als auch bei der morphometrischen Untersuchung als Null- bzw. Ausgangspunkt und stellt eine interne Kontrolle da.

3.3.2.2 Stenose-Gruppe

Die STENOSE-Gruppe (ST) unterteilt sich in vier Untergruppen (3d_{ST}-Gruppe, 7d_{ST}-Gruppe, 14d_{ST}-Gruppe, 28d_{ST}-Gruppe), die die verschiedenen Zeitpunkte der Probenentnahme widerspiegeln.

Die Tiere werden einer bilateralen Gefäßverletzung der A. femoralis unterzogen und jeweils 3, 7, 14 oder 28 Tage nach dem Eingriff euthanasiert.

Zur histomorphometrischen Analyse wird das Gefäß nach der Entnahme in Formalin fixiert und für die Genexpressionsanalyse in flüssigem Stickstoff unverzüglich nach der Entnahme schockgefroren und asserviert. Die in den unterschiedlichen Gruppen vorgenommenen Untersuchungen sind Tabelle 4 (siehe Seite 36) zu entnehmen.

3.3.2.3 Rapamycin-Gruppe

In der RAPAMYCIN-Gruppe (RA) erhalten die Tiere drei Tage vor der Operation eine Initialdosis von 10 mg/kg/d des Rapamycinanalogons Everolimus (2%ige Lösung, Novartis[®], Novartis Pharma, Basel, Schweiz) oral über eine Fütterungskanüle („single use sterile gavage feeding needles“, Fine Science Tools, Heidelberg). Ab dem Tag der Gefäßverletzung bis zur Opferung wird mit einer Erhaltungsdosis von 5 mg/kg/d fortgefahren.

Die Verabreichung des Medikamentes drei Tage vor dem Eingriff erfolgt in Anlehnung an GREGORY et al. (1994), die im Rattenmodell bei einer Verabreichung des Medikamentes drei Tage vor der Ballonangioplastie im Vergleich zu einer Gabe am Tag des operativen Eingriffes eine weitaus stärkere Inhibierung der Neointimahyperplasie beobachteten (GREGORY et al. 1994).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Wie die STENOSE-Gruppe unterteilt sich auch die RAPAMYCIN-Gruppe in die vier Untergruppen (3d_{RA}-Gruppe, 7d_{RA}-Gruppe, 14d_{RA}-Gruppe, 28d_{RA}-Gruppe) entsprechend den Zeitpunkten der Probenentnahme.

Die Behandlung der Gefäße erfolgt wie in der STENOSE-Gruppe; Tabelle 4 zeigt die unterschiedlichen Analysen in den Untergruppen.

Tabelle 4: Versuchsplan und Gruppeneinteilung.

		TAGE p. int.	KONTROLL-GRUPPE (KO) n=9	STENOSE-GRUPPE (ST) n=50	RAPAMYCIN-GRUPPE (RA) n=36
		-3	M/GA/IHC	-	OA
		0		FV	FV
UNTER-GRUPPEN		3 d		GA / IHC	GA / IHC
		7 d		M / GA / IHC	M / IHC
		14 d		M / GA / IHC	M / IHC
		28 d		M	M

p. int. = post interventionem

FV = Femoralisverletzung

M = Morphometrie

n = Tierzahl

OA = Beginn der oralen Applikation

GA = Genexpressionsanalyse

IHC = Immunhistochemie

3.3.3 Das Femoralisverletzungsmodell der Maus

3.3.3.1 Anästhesie und Operationstechnik

Die Mäuse werden in einer Ganzkörperkammer, die an ein Inhalationsgerät mit halbgeschlossenem System (MDS Matrix Medical Inc., Völker GmbH, Kaltenkirchen, Flowmeter: Matrix Medical Inc., Verdampfer: Ohmeda Isotec 3, BOC Health Care England) angeschlossen ist, mit einer Konzentration von 5 % Isofluran (Forene[®], Abbott, Billingstadt, Schweden) und 1000 ml O₂/min narkotisiert. Nach dem Verlust des Stellreflexes nimmt man die Mäuse aus der Ganzkörperkammer und steckt sie mit der Nasenspitze in die Kopfkammer, wo die Inhalationsanästhesie mit 1,8 bis 2,2 % Isofluran und 300 bis 400 ml O₂/min durchgeführt wird. Eine Analgesie während der Operation wird mit Fentanyl (0,05 mg/kg, FENTANYL[®] CuraMED, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) durch intraperitoneale Injektion gewährleistet. Das Tier wird an der Innenseite der Oberschenkel und am Bauch beidseits mit Enthaarungscreme (Pilca, GlaxoSmithKline, Bühl) enthaart und desinfiziert (Cutasept F[®], Bode, Hamburg). Die Fixation erfolgt an beiden Hintergliedmaßen in

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Rückenlage, auf einer durch ein steriles Tuch abgedeckten Wärmematte (siehe Abbildung 10). Die Augen werden mit Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Roche Consumer Health, Eppstein) vor dem Austrocknen geschützt.

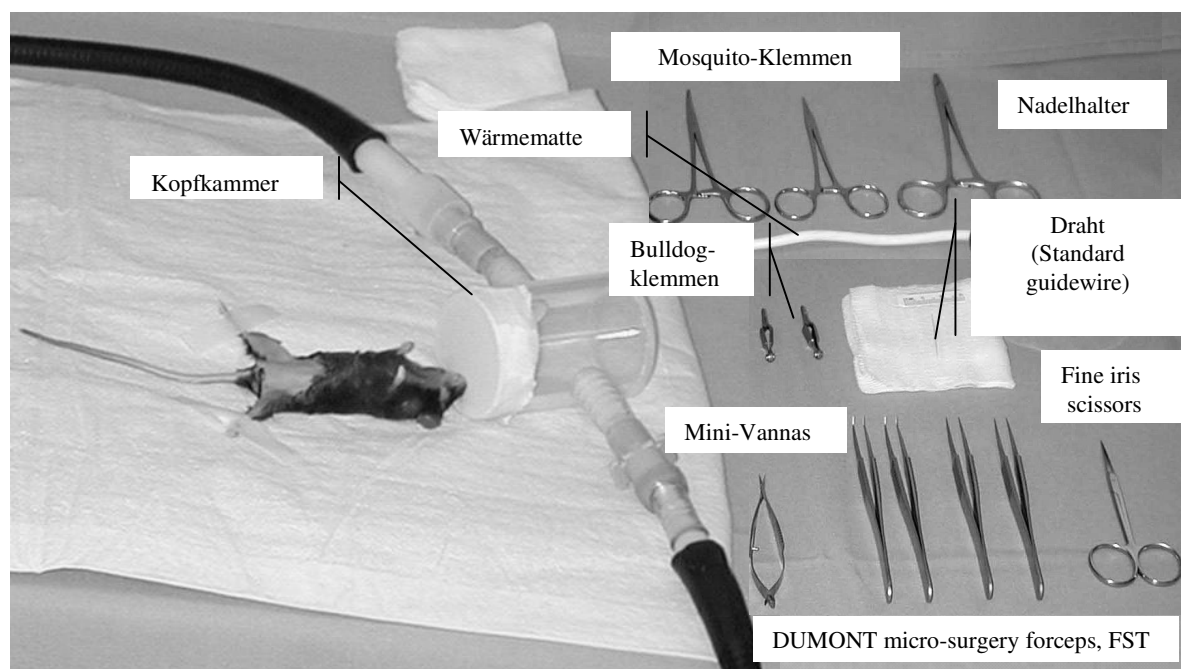


Abbildung 10: Ansicht des Operationsfeldes.

Die Maus ist in Rückenlage gelagert, die Innenseite der Oberschenkel und der Bauch sind enthaart. Unter dem Abdecktuch befindet sich die Wärmematte. Die Inhalationsanästhesie wird über eine Kopfkammer aufrechterhalten. Das mikrochirurgische Besteck und der Draht liegen bereit.

Vor dem Hautschnitt wird der Zwischenzehenreflex überprüft, um die chirurgische Toleranz zu gewährleisten. Der Hautschnitt erfolgt median am Innenschenkel, etwas oberhalb der Leiste bis unterhalb des Kniegelenks. Nach dem Anschlingen der Wundränder (USP 6/0 Resolon®, Resorba, Nürnberg) liegen A., V. und N. femoralis frei. Die gesamte Operation erfolgt unter einem Mikroskop (Carl Zeiss Deutschland) mit mikrochirurgischen Instrumenten (FST, Heidelberg). Der Nerv wird von der Arterie abpräpariert und die A. und V. femoralis distal und proximal des in Höhe des Kniegelenkes abzweigenden Muskelastes angeschlungen (USP 5/0 Vicryl®, Norderstedt). Aus der Tiefe präpariert man sich den Muskelast frei und ligiert diesen distal permanent (USP 8/0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt). Nun werden A. und V. femoralis temporär abgebunden und der Muskelast mit einer Gefäßschere („Mini Vannas“, FST, Heidelberg) eröffnet. Über den Seitenast schiebt man den Draht („standard guidewire“ für Herzkatheter, Durchmesser: 0,014 inch) ca. 5 mm unter Lösen der proximalen, temporären Ligatur vor und belässt ihn für eine Minute. Nach Zurückziehen des Drahtes wird der Seitenast auch proximal permanent ligiert (USP 8/0 Vicryl®, Ethicon, Norderstedt) und der Blutfluss in der A. und V. femoralis wiederhergestellt.

Abbildung 11 zeigt die anatomische Lage und das operative Vorgehen. Abschließend erfolgt der Wundverschluss mit U-Heften (USP 6/0 Resolon[®], Resorba, Nürnberg).

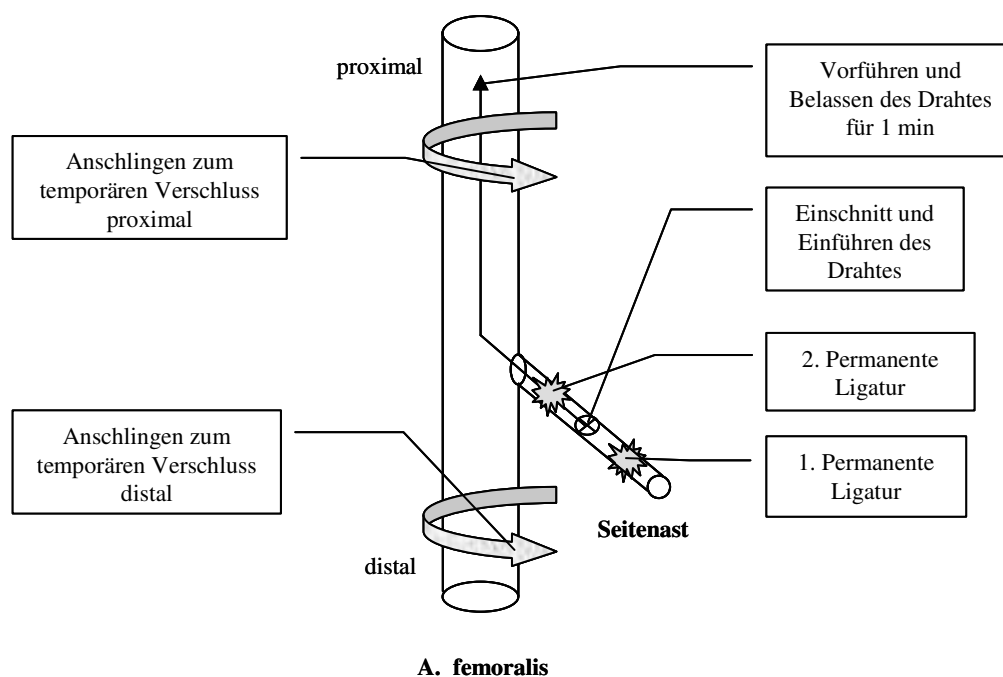


Abbildung 11: Schematische Darstellung des operativen Eingriffes.

3.3.3.2 Postoperative Versorgung

Da die Schmerzen nach dem Eingriff als gering einzustufen sind, wird zur postoperativen Analgesie einmalig Metamizol-Natrium (Novaminsulfon-ratiopharm[®]-Tropfen, Ratiopharm, Ulm) oral verabreicht. Das Allgemeinbefinden der Tiere und die Wunde werden in regelmäßigen Abständen kontrolliert.

3.3.4 Euthanasie, Perfusion und Probengewinnung

Zur Euthanasie werden die Mäuse durch Inhalationsanästhesie in einer Ganzkörperkammer tief narkotisiert bis Reflexlosigkeit eintritt und durch eine Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Anschließend werden die Tiere rasch thorakotomiert, entblutet und mit eiskalter Ringer-Lösung (Ringer-Lösung Delta Select, Delta Select GmbH, Pfullingen) perfundiert. Die Tiere sind dabei auf Eis gelagert. Dieses Vorgehen ist entscheidend, um postmortal ablaufende Reaktionen zu stoppen und so optimale Bedingungen der Gefäße für die spätere Genexpressionsanalyse zu gewährleisten.

Die Thorakotomie erfolgt in Rückenlage. Nach dem Hautschnitt auf Höhe des Sternums entlang des Rippenbogens, werden die Rippen im Bereich der Knochen-Knorpel-Grenze durchtrennt und mit einer Klemme am Sternum nach oben geklappt. Zur Perfusion wird das rechte Herzhorn mit einem Scherenschlag eröffnet, in den linken Ventrikel mit einer Kanüle eingestochen und mit ca. 15 ml eiskalter Ringer-Lösung gespült bis die Leber blutleer ist.

Das Bein wird parallel zur Operationswunde eröffnet und die A. femoralis von der V. femoralis, dem N. femoralis und Bindegewebe freipräpariert. Man entnimmt ca. 5 mm des Gefäßes, ausgehend von der Einmündung des Seitenastes. Das Belassen der proximalen Ligatur des Seitenastes an der Probe, schafft einen fixen Anfangspunkt für die histomorphometrische Untersuchung. Zur Genexpressionsanalyse wird das Gefäß in ein CryoRöhrchen (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für histomorphometrische Analysen erfolgt eine Fixierung des Gefäßes in 6%igem Formalin. Dazu legt man das Gefäß gestreckt auf ein Filterpapier auf, um ein Abknicken und Absinken auf den Boden zu verhindern.

3.3.5 Probenaufarbeitung für histomorphometrische Analysen

3.3.5.1 Immersionsfixierung

Nach der Entnahme verbleibt das Gefäß für ca. 24 Stunden zur Immersionsfixierung in der 6%igen Formalinlösung. Dann wird es in eine Plastikkassette für den Einbettautomat überführt.

3.3.5.2 Fixierung, Entwässerung und Vorparaffinierung

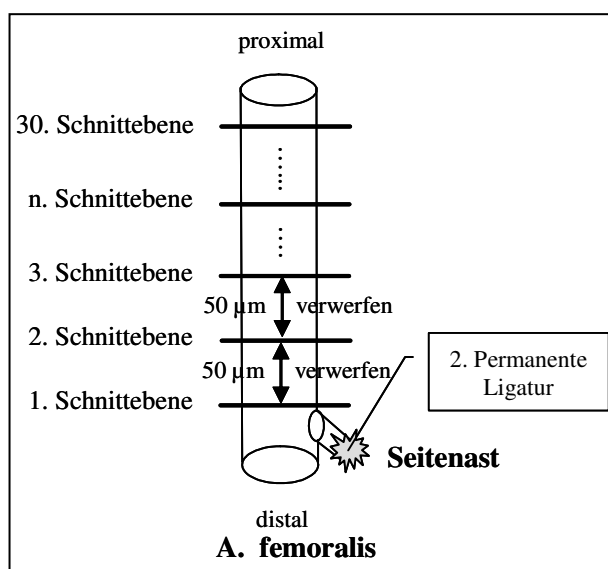
Über Nacht werden in dem Einbettautomaten (Shandon Pathcentre[®], Thermo Electron GmbH Deutschland) nacheinander folgende Schritte durchlaufen: Fixierung in 4%igem Formalin (ca. 2 h), stufenweise Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe 70%iges Ethanol/ 96%iges Ethanol/ 100%iges Isopropanol (insgesamt ca. 5,5 h), Verdrängung des Alkohols mit Xylol (ca. 2 h), Vorparaffinierung in Paraffinbädern mit 4%igem Formalin (ca. 2 h). Bis zum Einbetten in flüssiges Paraffin verbleibt die Probe bei 60 °C im Brutschrank.

3.3.5.3 Einbetten in flüssiges Paraffin

Das Einbetten in flüssiges Paraffin (Temperatur ca. 60 °C) und Härten der Paraffinblöcke erfolgt an einem Paraffinspendeautomaten (TBS Paraffin Embedding System: Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit, Medite Medizintechnik, Burgdorf). Das Gefäß wird gestreckt und senkrecht mit dem Knoten der proximalen Ligatur nach unten eingebettet.

3.3.5.4 Anfertigen der Paraffinschnitte

Am Rotationsmikrotom (Mikrom HM 335 E, Mikrom GmbH, Walldorf) werden 2 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Das Strecken der Schnitte erfolgt im „Paraffin Streckbad“ (TFB 35, Medite Medizintechnik, Burgdorf).



Es werden je Gefäß 20 Schnittebenen im Abstand von 50 µm angefertigt. Der Ausgangspunkt ist oberhalb der proximalen Ligatur des Seitenastes. Je Schnittebene werden zwei Objektträger (Menzel, Menzel Gläser Deutschland) mit je drei Schnitten gefertigt.

Abbildung 12: Anfertigen der histologischen Schnitte.

Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgt für 20 Minuten bei ca. 60 °C in den Brutschrank.

3.3.5.5 Färben der Paraffinschnitte

Die Färbung der Schnitte erfolgt im Färbeautomaten (Tissue Strainer TST 30, Medite Medizintechnik, Burgdorf). Als Standardfärbung wird eine Hämatoxylin-Eosinfärbung (H.E.) angefertigt. Zur besseren Darstellung der kollagenen Fasern, der Lamina elastica externa und -interna der Gefäßwand, wird zusätzlich noch eine Bindegewebsfärbung mit Elastica-van-Gieson-Färbung (E.-v.-G.) durchgeführt. Pro Schnittebene wird ein Objektträger E.-v.-G., der andere H.E. gefärbt.

3.3.6 Histomorphometrische Analyse

Histomorphometrisch ausgewertet werden Tiere der KONTROLL-Gruppe, die 7d_{ST}-, 14d_{ST}-, 28d_{ST}-, 7d_{RA}-, 14d_{RA}- und 28d_{RA}-Gruppe. Pro Präparat wird je ein E.-v.-G. Schnitt pro Schnittebene mit einem Mikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Carl Zeiss Deutschland) computer-gestützt über AxioVision 2.0 (Zeiss, Carl Zeiss Vision GmbH Deutschland) fotografiert und digital abgespeichert. Mit der ScionImagebeta 4.0 (Scion Corporation, Maryland, USA) Software werden die Schnittbilder ausgemessen.

Folgende Parameter werden gemessen:

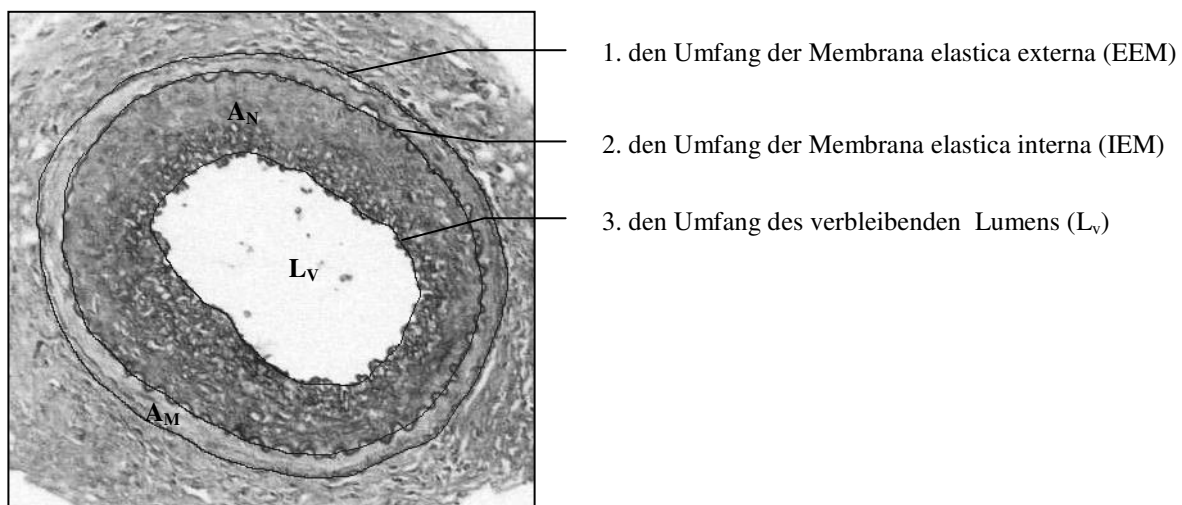


Abbildung 13: Morphometrische Ausmessungen.
A. femoralis, E.-v.-G., nach Gefäßverletzung.

Das ScionImagebeta 4.0 Programm berechnet den Umfang [in μm].

Daraus bestimmt man:

1. die Fläche der Neointima A_N [in μm^2]
2. die Fläche der Media A_M [in μm^2]
3. den Lumenverlust in %
4. die Mediafläche in % Gefäßdurchmesser

3.3.7 Genexpressionsanalyse

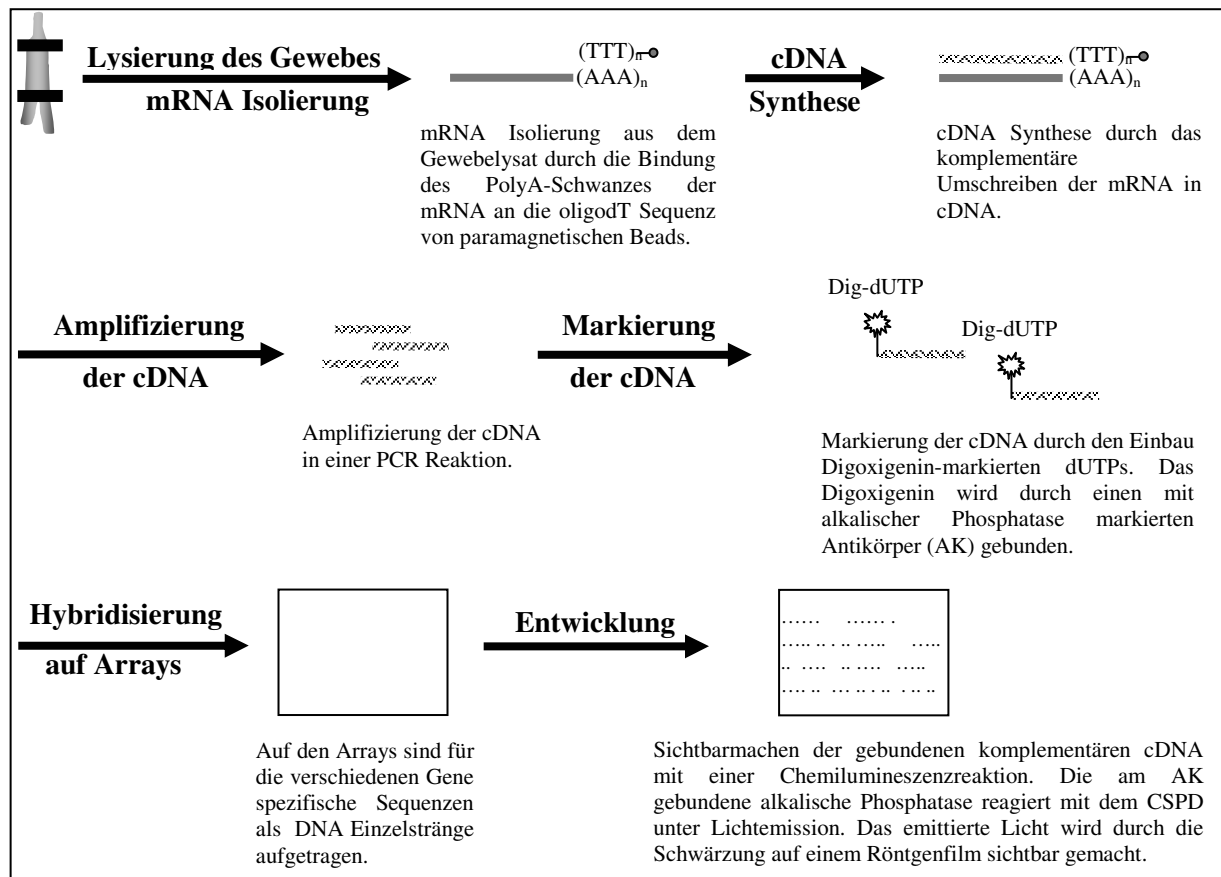


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Abläufe bei der Genexpressionsanalyse.

3.3.7.1 mRNA Isolierung

Die Arterie wird in 1000 µl Lysis Binding Buffer (siehe Tabelle 5) mit einer sterilen Kanüle in kleinste Teile zerschnitten und unter wiederholtem Mischen lysiert. Zur Isolierung der mRNA gibt man 50 µl paramagnetische oligo-dT₁₅ Beads zum Zelllysat zu, welche vorher mit Waschpuffer A (siehe Tabelle 5) äquilibriert wurden. Die mRNA kann über ihren Polyadenylatschwanz an den oligo-dT Schwanz der Beads binden. Die Suspension inkubiert 30 Minuten bei 4 °C unter Rotation im Hybridisierungsofen (Duo Therm Hybridisierungsofen OV5, Biometra, Göttingen) in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg). Danach überführt man das Eppendorf Reaktionsgefäß in den Magneten (MPC Magnetic Particel Concentrater, Dynal, Oslo, Norwegen). Der Magnet zieht die paramagnetischen Beads mit der gebundenen mRNA an. Das ermöglicht ein einfaches Abnehmen und Entfernen des Überstandes. Dann wäscht man die Beads nacheinander im Magneten mit 80 µl des Waschpuffers Igepal (WPI) (siehe Tabelle 5) und 80 µl des Waschpuffers Tween (WPT) (siehe Tabelle 5), der Überstand wird jeweils verworfen. Nach dem Resuspendieren der Beads

in 80 µl WPI erfolgt ein Überführen in ein PCR Tube 0,2 ml (Kisker, Steinfurt). Der Überstand wird über den Magneten abgenommen, um letzte Spuren von Lithiumdodecylsulfat und genomischer DNA zu entfernen.

Tabelle 5: Lösungen für die mRNA Isolierung.

<p><u>Lysis Binding Buffer</u></p> <p>100 mM TRIS/HCl pH 7,5 500 mM LiCl 10 mM EDTA pH 8,0 1 % LiDS 5 mM DTT</p>	<p><u>Waschpuffer A</u></p> <p>100 mM TRIS/HCl pH 7,5 150 mM LiCl 1 mM EDTA pH 8,0 0,1 % LiDS</p>
<p><u>Waschpuffer Igepal (WPI)</u></p> <p>50 mM TRIS/HCl pH 8,0 75 mM KCl 10 mM DTT 0,25 % Igepal</p>	<p><u>Waschpuffer Tween (WPT)</u></p> <p>50 mM TRIS/HCl pH 8,0 75 mM KCl 10 mM DTT 0,5 % Tween 20</p>

3.3.7.2 cDNA Synthese

Die an den Beads gebundene mRNA wird mit 10 µl cDNA-Synthese Puffer L1-Mix (siehe Tabelle 6) resuspendiert. Nach einer Annealingzeit (Zeit zur Bindung des Primers) von fünf Minuten bei Raumtemperatur, wird der cDNA-Synthese Puffer L2-Mix (siehe Tabelle 6) zugegeben. Die cDNA Synthese findet bei 44 °C für 45 Minuten unter Rollen im Hybridisierungssofen statt. Die isolierte mRNA wird dabei mit einer RNase-H defizienten reversen Transkriptase (Superscript II) in Gegenwart von den Nucleotiden dATP, dGTP, dCTP, dTTP und des CFL5C-Primers in cDNA umgeschrieben.

CFL5C-Primer: 5'-(CCC)₅GTCTAGA(NNN)₂-3'

Der CFL5C-Primer ist ein modifizierter „Random-Hexamer“-Primer, d. h. ein Gemisch aller möglichen Hexanucleotide mit einer definierten 5' Sequenz. Dadurch werden statistisch alle Targetsequenzen abgedeckt und die Hybridisierung kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Man erhält kurze Fragmente unterschiedlicher Länge, auch aus dem 5' Bereich der cDNA. Außerdem erlaubt es der Primer eine Primerbindungsstelle (CCC)₅ am 5' Ende der cDNA einzubauen. Die reverse Transkriptase H⁻ synthetisiert die cDNA durch eine Verlängerung des Primers, baut aber das entstehende RNA/DNA Hybrid aufgrund der fehlenden RNase H-Aktivität nicht ab.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 6: Lösungen für die cDNA Synthese.

cDNA-Synthese Puffer L1-Mix	1X [in µl]	cDNA-Synthese Puffer L2-Mix	1X [in µl]
5 x First Strand Buffer	2	5 x First Strand Buffer	2
0,1 M DTT	1	0,1 M DTT	1
10 % Igepal	0,5	10 mM dNTP	1
166 µM CFL5C	6	H ₂ O	5
H ₂ O	0,5	Superscript II TM RNAse H ⁻ RT	1

3.3.7.3 Tailing

Unter Tailing versteht man das Markieren der cDNA durch ein matrizenunabhängiges Anheften von dNTPs an das 3' Ende durch das Enzym Terminale Desoxynucleotidtransferase.

Nach Abnahme des Überstandes, bleibt die synthetisierte cDNA über die mRNA an den Beads gebunden. Man wäscht nochmals mit 80 µl Tailing-Waschpuffer (TWP) (siehe Tabelle 7), um nicht verbrauchte Reagenzien zu entfernen. Die Beads werden in 10 µl Tailing-Mix (siehe Tabelle 7) resuspendiert und mit 40 µl Mineralöl überschichtet. Die Denaturierung der cDNA-mRNA-Hybride erfolgt vier Minuten bei 94 °C im vorgeheizten Thermocycler (MultiCycler PTC 200, MJ Research, Biozym, Hess Oldendorf) mit anschließender Kühlung auf Eis. Die Beads inkubieren bei 37 °C für 24 Minuten nach der Zugabe von 10 U terminaler Desoxynucleotidtransferase TdT. Die terminale Desoxynucleotidtransferase fügt einen etwa 20 bp langen dGTP Strang an das 3' Ende der cDNA an. Danach wird das Enzym bei 70 °C sechs Minuten inaktiviert.

Tabelle 7: Lösungen für das Tailing.

Tailing-Waschpuffer (TWP)	Tailing-Mix	1X [in µl]
50 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,0	25 mM MgCl ₂	1,6
1 mM DTT	1mM DTT	1
0,25 % Igepal	2 mM dGTP	1
	200 mM KH ₂ PO ₄	0,5
	H ₂ O	5,9

3.3.7.4 Amplifizierung der cDNA

Die Amplifizierung der cDNA erfolgt durch den CP2 Primer.

CP2 Primer: 5'TCA GAA TTC ATG (CCC)₅-3'

Der CP2 Primer bindet über seinen (CCC)₅ Strang an den im Tailingschritt eingebauten dGTP Schwanz der cDNA.

Zu den Beads werden 35 µl PCR M1-Mix (siehe Tabelle 8) zugegeben. Die Suspension wird im Thermocycler auf 78 °C erwärmt, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

(= Hot-Start-PCR). Nach Erreichen der 78 °C werden 4,75 µl PCR M2-Mix (siehe Tabelle 8) zugegeben. Die PCR Reaktion läuft im Thermocycler (MultiCycler PTC 200, MJ Research, Biozym, Hess Oldendorf) mit folgenden Parametern ab:

Hot Start:	78 °C für 30 sec
19 Reaktionszyklen mit jeweils	
Denaturierung:	94 °C für 15 sec
Annealing:	65 °C für 30 sec
Elongation:	68 °C für 2 min
20 Reaktionszyklen mit jeweils	
Denaturierung:	94 °C für 15 sec
Annealing:	65 °C für 30 sec
Elongation:	68 °C für 2min 30 sec + 10 sec/Zyklus
Finale Extension:	68 °C für 7 min

Tabelle 8: Lösungen zur cDNA Amplifizierung.

<u>PCR M1-Mix</u>	<u>1X [in µl]</u>	<u>PCR M2-Mix</u>	<u>1X [in µl]</u>
Puffer 1	4	24 µM CP2 Primer	2,5
Formamid 20 % (v/v)	7,5	10 mM dNTP	1,75
H ₂ O	24	DNA Pol Mix (3,5 U/µl)	1,5

3.3.7.5 Kontroll-PCR

Zur Überprüfung der erfolgreichen Umschreibung der mRNA in cDNA, werden genspezifische PCRs mit den Primern für die Housekeeping-Gene β -Aktin und den Elongationsfaktor 1 α (EF-1 α) durchgeführt.

β -Aktin: 5'GCTCGGTCAGGATCTTCATGAGG3'

5'ACCTTCAACACCCCAGCCATG3'

EF-1 α : 5'TTTCAGTTTGTCTAAGACCCAGGC3'

5'CTCACATCAACATCGTCGTAATCG3'

Ein 1:10 verdünnter Aliquot der cDNA-Lösung wird mit 24 µl des PCR Master-Mixes (siehe Tabelle 9) angesetzt. Der Thermocycler (MultiCycler PTC 200, MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf) muss für β -Aktin und EF-1 α auf folgende PCR-Parameter eingestellt werden:

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Initiale Denaturierung: 94 °C für 1 min
39 Reaktionszyklen mit jeweils
Denaturierung: 94 °C für 15 sec
Annealing: 55 °C für 15 sec
Elongation: 72 °C für 15 sec
Finale Extension: 72 °C für 2 min

Tabelle 9: Ansatz für die Kontroll-PCR.

PCR Master-Mix	1X [in µl]
PCR Puffer 10x	2,50
dNTPs 2mM	2,50
Primer 3'	0,50
Primer 5'	0,50
Taq DNA Polymerase (5u/µl)	0,15
H ₂ O	18,85

Die PCR-Produkte werden in einem 2%igen Agarosegel (2 g Agarose auf 100 ml 1 x TAE Trisacetat-EDTA-Puffer (siehe Tabelle 10)), welches 8 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) enthält, elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Als Größenstandard läuft ein Marker (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (siehe Tabelle 10)) auf dem Gel mit.

Tabelle 10: Puffer und Marker für die Gelelektrophorese.

50 x TAE Puffer	Gene Ruler™ DNA Ladder Mix
242 g TRIS	Gene Ruler™ DNA Ladder Mix
57,1 ml Eisessig	100 µl Loading Dye 6x
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0	300 µl H ₂ O
Ad 1000 ml H ₂ O	

Die cDNA wird bei -20 °C gelagert.

3.3.7.6 Nichtradioaktive Genexpressionsanalyse mit Nylon Arrays

Für die Genexpressionsanalyse werden je Probe zwei Nylon Arrays „Filter“, Mouse 1.2 und Mouse 1.2II der Firma Clontech (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA), mit insgesamt 2352 unterschiedlichen Genen analysiert.

Prähybridisieren der Filter

In Weithals-Hybridisierungsflaschen (Biometra, Göttingen) werden die Filter über Nacht in der Gegenwart von 50 µg/ml genomischer Escherichia coli DNA (1 µg/µl) in sechs Millilitern Dig-Easy-Hyb Hybridisierungslösung (siehe Tabelle 11) bei 44 °C unter Rollen im Hybridisierungssofen inkubiert. Die E. coli DNA wird zuvor durch DNase I in Fragmente von 500 - 1000 bp verdaut und dient zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen.

Tabelle 11: Lösung für das Prähybridisieren.

<u>Dig-Easy-Hyb Hybridisierungslösung</u>
Dig-Easy Hyb Granules
64 ml H ₂ O

Dig-11-dUTP-Markierung der cDNA

Digoxigenin-11-dUTP wird in einer PCR-Reaktion in die cDNA eingebaut. Die 1:10 verdünnte cDNA-Lösung wird mit dem Dig-Master-Mix der neben den vier Nucleotiden dATP, dGTP, dCTP und dTTP, noch Dig-11-markiertes dUTP enthält, entsprechend dem angegeben Schema (siehe Tabelle 12) versetzt und in einer PCR im Thermocycler (MultiCycler PTC 200, MJ Research, Biozym, Hess Oldendorf) mit folgenden Bedingungen reamplifiziert:

Initiale Denaturierung:	94 °C für 2 min
15 Reaktionszyklen mit jeweils	
Denaturierung:	94 °C für 15 sec
Annealing:	63 °C für 15 sec
Elongation:	68 °C für 2 min
10 Reaktionszyklen mit jeweils	
Denaturierung:	94 °C für 15 sec
Annealing/Elongation:	68 °C für 3 min + 5 sec/Zyklus
Finale Extension:	68 °C für 7 min

Tabelle 12: Lösungen für das Dig-dUTP Markieren der cDNA.

<u>Dig-Master-Mix</u>	<u>1X [in µl]</u>	<u>1/7 dNTP Mix</u>
Puffer 1	5,0	8,3 mM dTTP
Formamid 20 % (v/v)	7,5	10 mM dATP
CP2 24 mM	5,0	10 mM dGTP
1/7 dNTP Mix	1,75	10 mM dCTP
Dig-dUTP 1 mM	2,5	
DNA Pol Mix (3,5 U/µl)	0,75	
H ₂ O	27,5	
DNA	1,0	

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Der Erfolg der Amplifizierung wird mit dem Nucleic acid dot Metric kitTM (Geno Technology Inc., St Louis, MO, USA) überprüft.

Hybridisierung

50 µl der gelabelten cDNA werden mit 50µl Herring sperm DNA (10 mg/ml) versetzt, zehn Minuten bei 95 °C denaturiert und umgehend zu der vorgewärmten Prähybridisierungslösung (Temperatur = 44 °C) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt bei 44 °C für 48 Stunden unter Rotation im Hybridisierungssofen.

Waschen der Filter

Das Waschen der Filter erfolgt unter hochstringenten Bedingungen. Eine wichtige Rolle dabei spielt die Temperatur und das Erniedrigen der Salzkonzentration auf eine geringe Ionenstärke (0,1 x SSC). Dadurch werden alle nicht spezifisch gebundenen cDNA Fragmente vom Filter entfernt.

Die Waschlösungen werden auf 68 °C erwärmt. Nach dem Abgießen der Hybridisierungslösung werden die Filter erst kurz in 2 x SSC / 0,1 % SDS, dann kurz in 1 x SSC / 0,1 % SDS in den Weithals-Hybridisierungsflaschen geschwenkt. Danach werden sie im Hybridisierungssofen bei 68 °C für 15 Minuten mit 0,5 x SSC / 0,1 % SDS und zweimal für 30 Minuten mit 0,1 x SSC / 0,1 % SDS gerollt.

Bei Raumtemperatur werden die Filter dann kurz im Dig-Waschpuffer I (siehe Tabelle 13) gewaschen, bevor sie für 30 Minuten zum Blocken in Dig-Waschpuffer I + 1 % Blocking Reagent geschüttelt werden. Nach der Zugabe von anti-Digoxigenin-AP (alkalische Phosphatase)-Antikörper (1:10000) wird nochmals für 30 Minuten inkubiert. Das anti-Digoxigenin-AP-Antikörper-Konjugat bindet an das, in die cDNA eingebaute, Dig-11-dUTP. Anschließend wird bei Raumtemperatur für zweimal 15 Minuten in Dig-Waschpuffer II (siehe Tabelle 13) geschüttelt, um ungebundenen Antikörper zu entfernen.

Tabelle 13: Puffer für das Waschen der Filter.

<u>Dig-Waschpuffer I</u>	<u>Dig-Waschpuffer II</u>
100 mM Maleinsäure	100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl	150 mM NaCl
	0,3 % Tween 20

Entwickeln der Filter

Für die Chemilumineszenzreaktion wird das Substrat CSPD 1:100 mit dem Dig-Waschpuffer III verdünnt und die Filter kurz im Dig-Waschpuffer III (siehe Tabelle 14) äquilibriert.

Die Filter werden von Pufferresten befreit und mit je 800 µl des Chemilumineszenzsubstrates in einer Schlauchfolie (Diagonal, Münster) fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen des überschüssigen Chemilumineszenzsubstrates werden die Filter nochmals in der Folie für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wird ein Röntgenfilm Bio Max ML (Kodak, Amersham Bioscience, Freiburg) für 30 Minuten exponiert und entwickelt.

Das CSPD ist ein Chemilumineszenzsubstrat der alkalischen Phosphatase. Bei Kontakt mit dem anti-Digoxigenin-AP-Antikörper-Konjugat kommt es zur Dephosphorylierung des CSPDs. Das CSPD zerfällt unter Lichtemission, die dann die Schwärzung des Röntgenfilms hervorruft.

Tabelle 14: Puffer für das Entwickeln der Filter.

Dig-Waschpuffer III
20 mM Tris/HCl
100 mM NaCl

Strippen der Filter

Um die Filter zu einer weiteren Hybridisierung verwenden zu können, muss die gebundenen cDNA entfernt werden. Dazu werden die Filter nach dem Entwickeln in eine Schale mit 37 °C warmer 0,2 M NaOH / 0,1 SDS Lösung überführt. Bei 37 °C werden diese im Hybridisierungsofen für zweimal 15 Minuten geschüttelt. Anschließend werden die Filter mit Wasser bis zum Erreichen des pH 7,0 gespült.

Die Filter werden in 2 x SSC bei 4 °C gelagert.

Auswertung der Filme

Die entwickelten Röntgenfilme werden mit einem Durchlichtscanner (Image Scanner, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) eingescannt und mit der Array Vision™ Software 6.0 (Imaging Research Inc., Ontario, Kanada) ausgewertet. Dazu wird der Grauwert des Hintergrunds von den Schwärzungswerten der spezifischen Signale abgezogen. Um eine Vergleichbarkeit der Filter zu gewährleisten, werden die Schwärzungswerte der spezifischen Signale auf die Signale der Housekeeping-Gene (HK) 1, 4 und 7, die auf allen Filtern

vorhanden sind, normalisiert. Der Mittelwert der Signale der HK wird als „1“ gesetzt, der Wert des Hintergrundes „0“. Die Software bestimmt für jeden Schwärzungswert eine Zahl entsprechend dem Schwärzungsgrad, umso niedriger die Schwärzung, umso niedriger der nominale Wert.

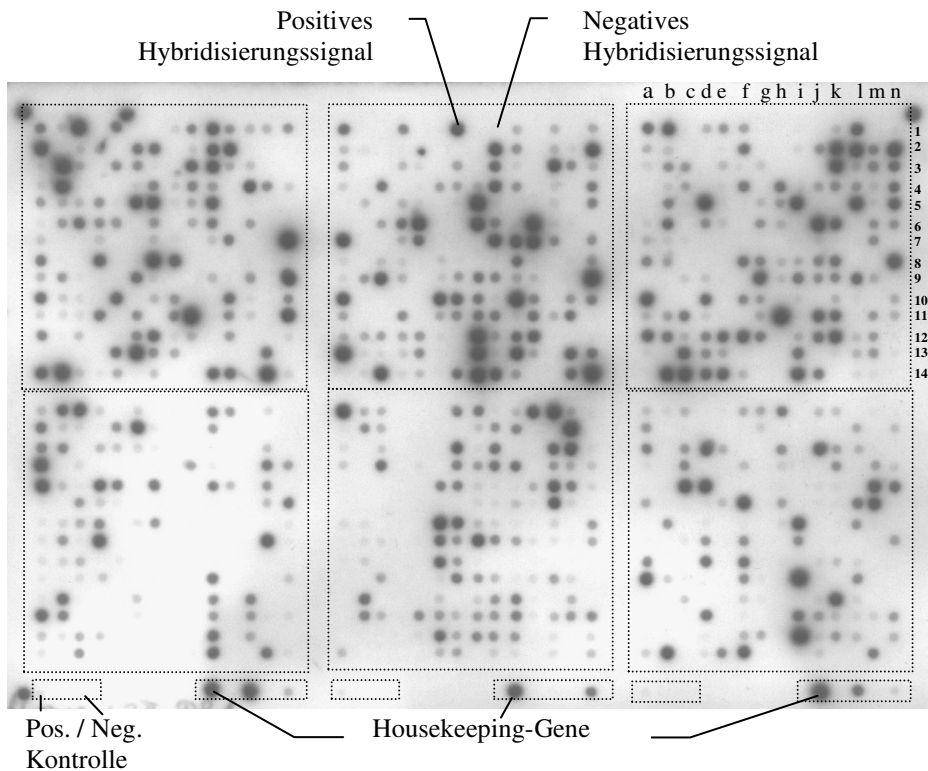


Abbildung 15: Nylon cDNA-Microarray.

In den sechs Quadranten sind je 14 x 14 spezifische Gensonden aufgetragen. Die dreimal drei Housekeeping-Gene und jeweils eine positiv und eine negativ Kontrolle sind in einer Reihe unterhalb aufgetragen. Die Schwärzung des Dots (Kreis) entspricht einem positivem Hybridisierungssignal, das Ausbleiben der Schwärzung einem negativen. Die Stärke der Expression wird von dem Schwärzungsgrad des Dots widerspiegelt.

3.3.8 Verifizierung der Genexpressionsanalyse mit genspezifischen PCRs

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse werden mit genspezifischen PCRs validiert. Dazu entwirft man entsprechend den auf den Filtern aufgetragenen Sequenzen mit Hilfe der VectorNTI Software (InforMax Inc., Frederick, MD USA) genspezifische Primer. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten werden diese, in einer PCR-Reaktion nach unten angegebenem Schema (Tabelle 15), auf die Expression des Housekeeping-Gens β -Aktin normalisiert. Als Template verwendet man eine 1:50 Verdünnung der cDNA.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

β -Aktin-Maus-Primer:

5'-GCT CGG TCA GGA TCT TCA TGA GG-3'

5'-ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG-3'

Initiale Denaturierung: 94 °C für 1 min

30 Reaktionszyklen mit jeweils

Denaturierung: 94 °C für 10 sec

Annealing: 55 °C für 30 sec

Elongation: 72 °C für 30 sec

Finale Extension: 72 °C für 2 min

Tabelle 15: Lösungen für die PCR.

<u>PCR Master-Mix</u>	<u>1X [in μl]</u>	<u>PCR Master-Mix+DMSO</u>	<u>1X [in μl]</u>
PCR Puffer 10x	2,50	PCR Puffer 10x	2,50
dNTPs 2 mM	2,50	dNTPs 2 mM	2,50
Primer 5' 10 μ M	0,50	Primer 5' 10 μ M	0,50
Primer 3' 10 μ M	0,50	Primer 3' 10 μ M	0,50
Taq DNA Polymerase (5 u/ μ l)	0,15	Taq DNA Polymerase (5 u/ μ l)	0,15
H ₂ O	18,85	DMSO ad 4 %	1,0
		H ₂ O	18,85

Mit der für den jeweiligen Primer geeigneten Annealingtemperatur (T_A) und Zyklenzahl (Z_p) werden Gen-PCRs angefertigt. Die Primer sind in Tabelle 16 angegeben. Bei einem GC-Gehalt des Primers > 55 wird der Ansatz mit DMSO versetzt, um die Denaturierung der DNA zu erleichtern (siehe Tabelle 15 und Tabelle 16).

Als Template werden die in der β -Aktin-PCR ermittelten Probenmengen der 1:50 verdünnten cDNA verwendet. Der Thermocycler (MultiCycler PTC 200, MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf) wird wie folgt programmiert:

Initiale Denaturierung: 94 °C für 1 min

Z_p Reaktionszyklen mit jeweils

Denaturierung: 94 °C für 10 sec

Annealing: T_A °C für 30 sec

Elongation: 72 °C für 30 sec

Finale Extension: 72 °C für 2 min

Die PCR Produkte werden in einem 2%igem Agarosegel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Als Größenstandard läuft ein Marker (Gene RulerTM DNA Ladder Mix) auf dem Gel mit (siehe 3.3.7.5).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 16: PCR-Maus-Primer-Sequenzen. T_A = Annealingtemperatur in °C, Z_p = Zyklenzahl des Primers.

Maus-Primer	Sequenz	DMSO	T_A	Z_p
CXCR3	5'-CCA CAA TGG AAG AGT TAA CAC CAG C-3' 5'-AGC CTG AAC TTT GAC AGA ACC TTC C-3'	Nein	61	35
CXCR4	5'-GAT GAT GAT GCA GTA ACA GGA GAG G-3' 5'-ATA CCT GAC TTC ATC TTT GCC GAC G-3'	Nein	62	30
Desmin	5'-GCC AAG TTG TTC TCT GCT TCT TCT C-3' 5'-CGA GCT CTA CGA GGA GGA GAT GC-3'	Ja	61	45
E-Selektin	5'-AGA AAG TGC AAC TAC CAA GGG ACG-3' 5'-GGA AAG ATG AAC ATG AGC TGC AGC-3'	Nein	52	40
GRO-1	5'-TTG TCA GAA GCC AGC GTT CA-3' 5'-CAT AGC CAC ACT CAA GAA TGG TCG-3'	Nein	55	25
IP-10	5'-CAG TAC AGA GCT AGG ACA GCC ATC C-3' 5'-TCT TCT GAA AGG TGA CCA GCC G-3'	Nein	56	30
Kit-oncogene	5'- TTG GAA AGG TGC AAG AGT GTA GC-3' 5'-ATA AAG GGT TCA GTG TGT TAC GTG G-3'	Nein	53	25
MCM-2	5'-TCA AAG CGG GAA ATG ATG GG-3' 5'-GAA CAG CAA AGC ATC TCC ATC TCC-3'	Nein	58	30
MMP9	5'-TCA AAG CGG GAA ATG ATG GG-3' 5'-GAA CAG CAA AGC ATC TCC ATC TCC-3'	Ja	57	30
SDF-1	5'-TGG AAA GTC CTT TGG GCT GT-3' 5'-CAA CGT CAA GCA TCT GAA AAT CC-3'	Nein	55	25
Thymidylatkinase	5'-AAA AGT GTG CAT GTT ACA ACC GG-3' 5'-CGA AAG ATC AAC GGA AAT CGG-3'	Nein	58	25

3.3.8.1 Densitometrische Ausmessung der PCRs

Die densitometrische Ausmessung der PCR-Banden erfolgt mit der Array Vision TM Software 6.0 (Imaging Research Inc., Ontario, Kanada). Dazu wird der Grauwert des Hintergrunds von den Schwärzungswerten der spezifischen Signale abgezogen.

Es wird die relative Expression im Bezug auf die Expressionswerte der β -Aktin-PCR, die 100 % gesetzt wurden, angegeben.

3.3.9 Immunhistochemie

Zur Untersuchung der De- bzw. Reendothelialisierung und verschiedener inflammatorischer Prozesse auf Proteinebene werden immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern CD31, CD3, CD45 und CXCR3 vorgenommen.

3.3.9.1 Etablierung der Antikörper

Vor der eigentlichen Färbung der Proben erfolgt eine Etablierung der Antikörper mit Positivkontrollen. Als Positivkontrolle dient ein Multi-Tissue-Block mit verschiedenen Organen, wie Leber, Niere, Milz, Darm, Zunge, Haut und Lunge einer unbehandelten Maus.

Tabelle 17: Etablierung der Antikörper. Auflistung der etablierten Verdünnungen der Primärantikörper, Sekundärantikörper und Antigendemaskierungsmethode.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Antigendemaskierung
CD3 (Serotec)	1:400	Anti rat 1:50	Schnellkochtopf
CD45 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)	1:200	Anti rat 1:50	Schnellkochtopf
CD31 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)	1:200	Anti goat 1:100	Schnellkochtopf
CXCR3 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)	1:100	Anti goat 1:100	Schnellkochtopf

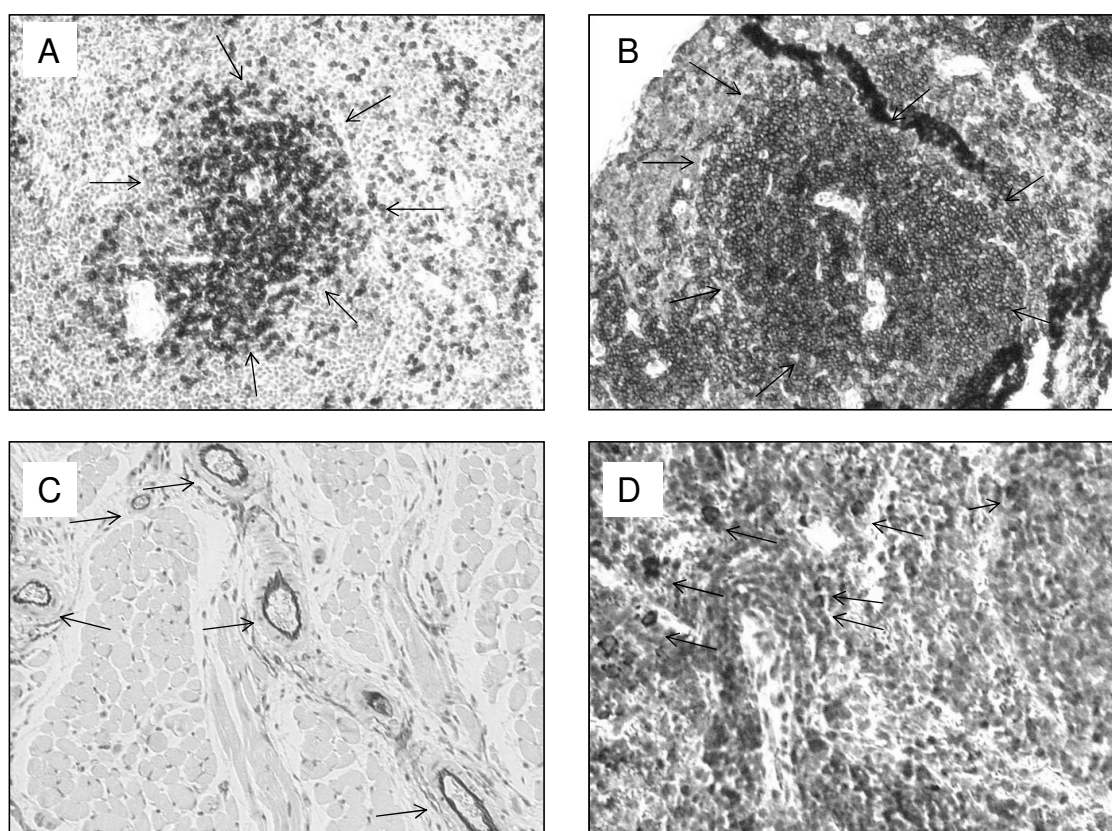


Abbildung 16: Etablierung der Antikörper CD3, CD45, CD31 und CXCR3.

A) Milz, Objektiv 10fach. Pfeile grenzen um die Zentralarteriole angeordnete CD3-positive T-Zellen (braun) ein.
 B) Milz, Objektiv 10fach. Pfeile grenzen die um die Zentralarteriolen angeordneten CD45-positiven Zellen (braun) ein.

C) Haut, Objektiv 100fach. Pfeile zeigen die CD31-positive Endothelauskleidung (braun) kleiner Hautgefäße.

D) Milz, Objektiv 100fach. Pfeile zeigen vereinzelte CXCR3-positive Zellen.

3.3.9.2 Immunhistochemische Färbung der Proben

Vorbehandlung/Trocknung

Die Paraffinschnitte werden auf silanisierte Objektträger (SuperFrost Plus®, Menzel Gläser Deutschland, Braunschweig) mit einer Bastellklebermischung (siehe Tabelle 18) aufgetragen, um ein Ablösen zu verhindern. Zum Trocknen legt man die Schnitte über Nacht bei ca. 60 °C in den Brutschrank.

Tabelle 18: Kleber-Mischung zum Aufkleben der Paraffinschnitte.

<u>Bastellkleber-Mischung:</u>	
Pritt®-Bastellkleber	1 Teil
Poly-L-Lysine-Lösung	1 Teil

Entparaffinierung

Die Entparaffinierung erfolgt in einer absteigenden Alkoholreihe:

2 x 10 Minuten Xylol → 2 x 5 Minuten Isopropylalkohol → 5 Minuten Ethanol 96 % →
5 Minuten Ethanol 70 % → 5 Minuten H₂O.

Hitzenaturierte Antigendemaskierung im Schnellkochtopf

Um durch das Formalin entstehende Aldehydvernetzungen zu lösen, führt man eine hitzenaturierte Antigendemaskierung im Schnellkochtopf durch. Dabei werden die Schnitte für sieben Minuten unter Druck im Schnellkochtopf in zwei Liter Citratpuffer (siehe Tabelle 19) gekocht. Anschließend wird dreimal mit einer 1:10 verdünnten Trispufferlösung (siehe Tabelle 19) gewaschen.

Tabelle 19: Lösungen zur Hitzenaturierung.

<u>Citratpuffer:</u> 10 mM, pH 6,0	<u>Tris-Stammlösung</u> pH 7,6
2,1 g Citronensäure-Monohydrat	60,5 g Tris
In 1000 ml H ₂ O	In 1000 ml H ₂ O
	90 g NaCl

Blockierung von endogenen Enzymen

Vorhandene endogene Enzyme werden mit einer 3 %igen Wasserstoffperoxidlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, um falsch positive Ergebnisse und eine

Hintergrundfärbung zu verhindern. Danach wäscht man die Schnitte in dem für den Färbeautomaten vorgesehenen Puffer für 15 Minuten.

Immunhistochemische Färbung nach der Labeled Strept-Avidin-Biotin-Methode

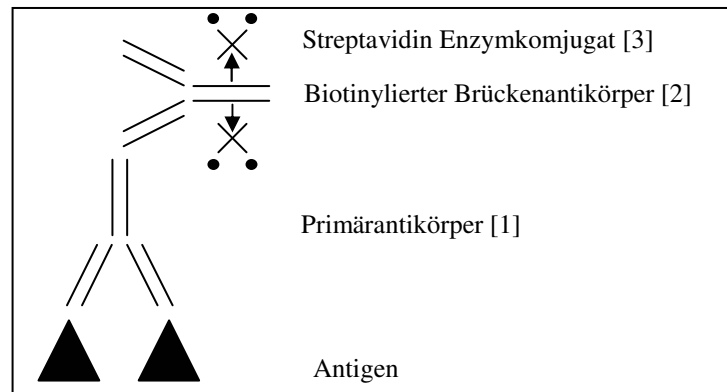


Abbildung 17: Prinzip der LSAB-Methode (nach NOLL und SCHAUB-KUHLEN 2000).

Die eigentliche Färbung erfolgt nach der Labeled-Strept-Avidin-Biotin-Methode. Das Prinzip dieser Methode wird in Abbildung 17 aufgezeigt. Eine Bindung des zu detektierenden Antigens findet über den sogenannten Primärantikörper [1] statt. Der Sekundärantikörper oder Brückenantikörper wird so gewählt, dass er spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet ist [2]. Als Sekundärantikörper wird stets ein biotinylierter Antikörper verwendet. Biotin bindet Streptavidin spezifisch. Um eine sichtbare Farbreaktion zu bekommen, gibt man ein Streptavidin-Peroxidase-konjugat zu [3]. Das Substrat 3,3 Diaminobenzidin (DAB) wird durch die Peroxidase am Streptavidin umgesetzt, es kommt zu einer braunen Farbreaktion.

Die Färbung erfolgt im Färbeautomat „Dako autostainer“ (DakoCytomation GmbH, Hamburg). Folgende Schritte werden programmiert:

- Inkubation für 30 Minuten mit dem Primär-Antikörper [1]
- Inkubation für 30 Minuten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper [2]
- Inkubation für 25 Minuten mit dem Streptavidin-Enzymkonjugat [3]
- Färbung für 2 x 5 Minuten nach der DAB-Methode (DakoCytomation, Hamburg)
- Kerngegenfärbung mit Mayers-Hämalaun.

Entwässerung und Haltbarmachung

In einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die Schnitte entwässert und in Xylol haltbar gemacht:

2 x 2 Minuten Ethanol 70 % → 2 x 2 Minuten Ethanol 96 % → 3 x 2 Minuten Isopropylalkohol → 4 x 2 Minuten Xylol.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 20: Alphabetische Auflistung der verwendeten Reagenzien.

20 x SSC = 3,0 M NaCl + 0,3 M NaCitrat	Invitrogen, Karlsruhe
5 x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
6 x Loading Dye	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Agarose (Seakem LE)	Biozym, Hess Oldendorf
AK-Diluent (Antibody Diluent, Chem Mate™)	Dako Cytomation, Hamburg
Anti-Dig-AP-Antikörper-Konjugat 150 U (Dig Luminescent Detection Kit)	Roche, Mannheim
Blocking Reagent (Dig Luminescent Detection Kit)	Roche, Mannheim
CFL5C-Primer	Metabion, Martinsried
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
CP2 Primer	Metabion, Martinsried
CSPD (Dig Luminescent Detection Kit)	Roche, Mannheim
dATP 100 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
dCTP 100 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
DAB (ChemMate™)	Dako Cytomation, Hamburg
Deoxyribonucleic acid Typ VIII from Escherichia coli strain B	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DEPC = Diethyl Pyrocarbonate	Sigma Aldrich, Taufkirchen
dGTP 100 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Diaminobenzidin (DAB, ChemMate™)	Dako Cytomation, Hamburg
Dig Easy Hyb Granules	Roche, Mannheim
Digoxigenin-11-dUTP alkali labile 125 mmolar	Roche, Mannheim
DMSO	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DNA Pol Mix Expand long template PCR system (3,5 U/μl)	Roche, Mannheim
DNase I 100 u/μl	Roche, Mannheim
dNTP 10 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
dNTP 2 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
DTT = Dithiothreitol	Invitrogen, Karlsruhe
dTTP 100 mM	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Dynabeads Oligo(dT) ₂₅ (3,3x10 ⁸ beads/ml)	Dynal Biotech, Hamburg
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen
EF-1α-Primer (sense und antisense)	Metabion, Martinsried
Eisessig = Essigsäure 100%	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon Rot
H ₂ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt
HCl	Roth, Karlsruhe
Herring sperm DNA	Invitrogen, Karlsruhe
HRP-Substrat-Puffer (HRP Substrate Buffer, ChemMate™)	Dako Cytomation, Hamburg
Igepal CA 630	Sigma Aldrich, Taufkirchen
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Laurylsulfate = LiDS	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Lithium Chloride 8 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Lysispuffer	Dynal Biotech, Hamburg

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Qiagen, Hilden
Mineralöl	Sigma Aldrich, Taufkirchen
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaOH	Roth, Karlsruhe
PCR Puffer 10 x	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Poly-L-Lysine-Lösung	Sigma diagnostics, St. Louis
Pritt-Bastellkleber	Henkel, Düsseldorf
Protease	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Puffer 1 Expand long template PCR system	Roche, Mannheim
Ringer-Lösung Delta Select	Delta Select GmbH, Pfullingen
Streptavidin-Peroxidase (HRP, Chem Mate™)	Dako Cytomation, Hamburg
Superscript II™ RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Terminale Desoxynucleotidtransferase, TdT	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Tris	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trisacetat-EDTA Puffer, TAE	Roth, Karlsruhe
Tween = Polyethylen-sorbitan monolaureat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
β-Aktin-Primer (sense und antisense)	Metabion, Martinsried

3.3.10 Statistische Berechnung und Dokumentation

Um aus den 2352 analysierten Genen die differentiell regulierten Gene herauszufiltern werden folgende Parameter bestimmt: der Median des Genexpressionsniveaus je Gruppe, die Differenz der Mediane aller Gruppen, der Quotient der Mediane aller Gruppen und das Signifikanzniveau.

Entsprechend den unten angegebenen Kriterien werden dann die Gene sortiert:

1. Signifikanz: $p > 0,05$
2. Differenz der Mediane: $(- 0,1) \geq x \leq (+ 0,1)$
3. Quotient der Mediane: $0,4 \geq x \leq 2,5$

Zur statistischen Analyse wird SPSS 11.0 bzw. 11.5 (SPSS11.0 für Windows, SPSS Inc. Chicago, USA) verwendet.

Die Daten der Genexpressionsanalyse der STENOSE-Gruppe sind mit dem Kruskal Wallis-Test statistisch ausgewertet. Die RAPMAYCIN-Gruppe wird im Mann-Whitney-U-Test statistisch mit der 3 d-STENOSE-Gruppe verglichen.

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede der morphometrischen Daten kommen die Varianzanalyse ANOVA und der t-Test zur Anwendung.

Die Analyse der densitometrischen Daten der PCR erfolgt mittels der Varianzanalyse ANOVA mit einem Faktor, als Post-hoc Test wird der LSD (least significant difference)-Test benutzt. Alle Tests werden zweiseitig durchgeführt.

Innerhalb der einzelnen Untergruppen werden aus den Einzelwerten die Mittelwerte (MW, arithmetisches Mittel), die Standardabweichung (STABW) und der Standardfehler (SE) ermittelt. Als statistisch signifikant wird eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ festgelegt.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Überlebensrate

Zwei Tiere der STENOSE-Gruppe sind verstorben. Ein Tier zeigte während der Narkoseeinleitung Schnappatmung, was zum Kreislaufversagen und zum Exitus letalis führte. Bei dem zweiten Tier kam es während des operativen Eingriffes zu einer Verletzung einer Vene und zum Abbruch der Operation. Es ergibt sich eine Überlebensrate von 98 %.

3.4.2 Ergebnisse der histologische Untersuchungen

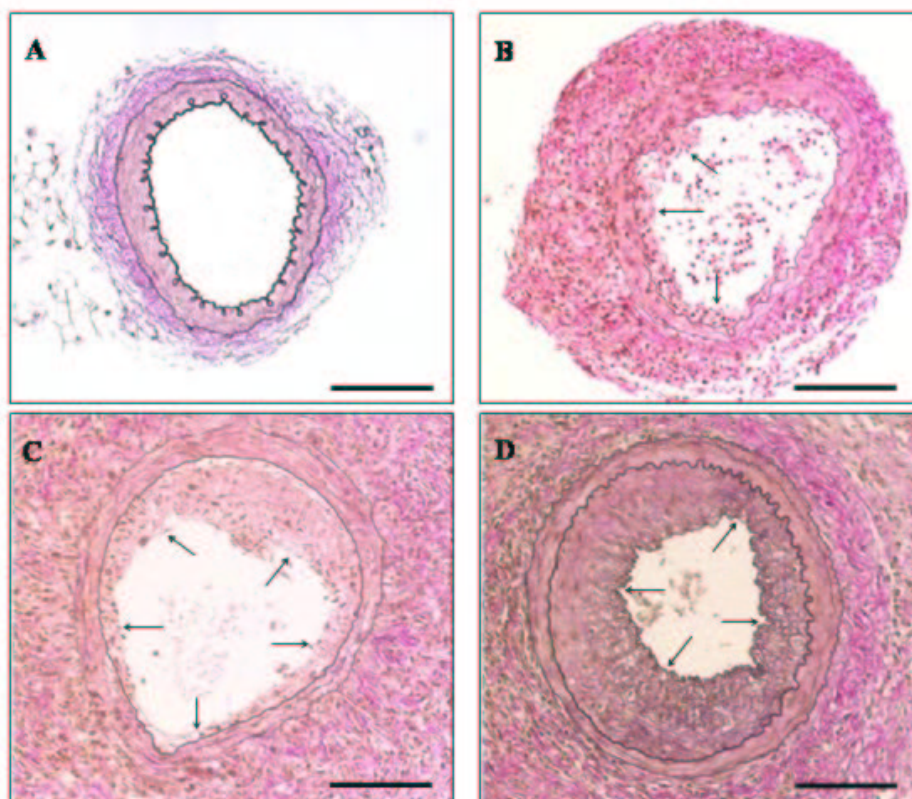


Abbildung 18: Histologische Schnitte im Zeitverlauf. E.-v.-G.-Färbung. Balken = 100 µm.

Die Pfeile markieren die Neointima.

A) unverletztes Gefäß

C) Gefäß 14 Tage nach Verletzung

B) Gefäß 7 Tage nach Verletzung

D) Gefäß 28 Tage nach Verletzung

Abbildung 18 zeigt jeweils einen repräsentativen Schnitt einer unoperierten Kontrolle (A), ein Gefäß 7 (B), 14 (C) und 28 Tage (D) nach der Verletzung. Bereits 7 Tage nach Gefäßverletzung ist eine erste Neointimabildung zu sehen. In dem Untersuchungszeitraum von 7 bis 28 Tagen nach Gefäßverletzung beobachtet man eine Zunahme der Neointimahyperplasie, eine zunehmende Organisation und ein kompakter werden der Neointima. Zum Zeitpunkt 7 Tage liegt eine eher unstrukturierte, sehr zellreiche neointimale

Schicht mit vielen Entzündungszellen vor. 14 Tage nach dem Eingriff sinkt der Zellgehalt und der Fasergehalt steigt. 28 Tage nach Gefäßverletzung findet man eine strukturierte und kompakte Neointimaschicht, die sehr faserhaltig, zellarm und arm an Entzündungszellen ist.

3.4.3 Ergebnisse der morphometrischen Untersuchungen

3.4.3.1 Erfolgsrate

In der 28d_{ST}-Gruppe wurden 10 Arterien und in der 7d_{ST}-Gruppe 7 Arterien für die Morphometrie entnommen und ausgewertet. Die 14d_{ST}-Gruppe besteht aus 8 Arterien, wovon eine wegen eines Thrombus nicht in die Auswertung eingegangen ist. Um das Ergebnis der 28d_{RA}-Gruppe (7 Tiere) zu untermauern, wurde die Gruppe auf 14 Tiere erweitert. Zwei Arterien konnten nicht in die Auswertung genommen werden, da eines während des Schneidens zerstört wurde, das andere Gefäß konnte wegen einer kompletten Ablösung der Neointima post mortem nicht ausgemessen werden. In die 7d_{RA}- und 14d_{RA}-Gruppe gingen die 5 bzw. 10 vorhandenen Gefäße in die Auswertung ein. Es zeigt sich, dass in 2,3 % der Fälle ein Thrombus auftritt.

3.4.3.2 Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen im Vergleich

A

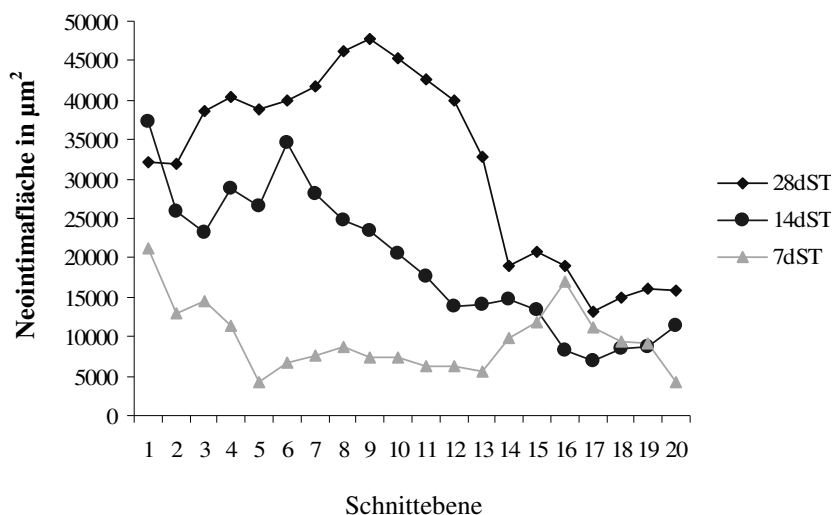


Abbildung 19: Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen (1). A) Vergleich der Zeitpunkte in der STENOSE-Gruppe (Tabelle 21).

7d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 7 Tagen,

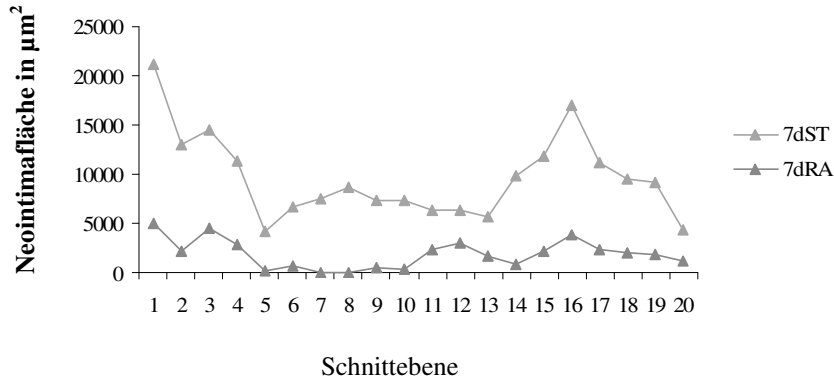
14d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 14 Tagen

28d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 28 Tagen.

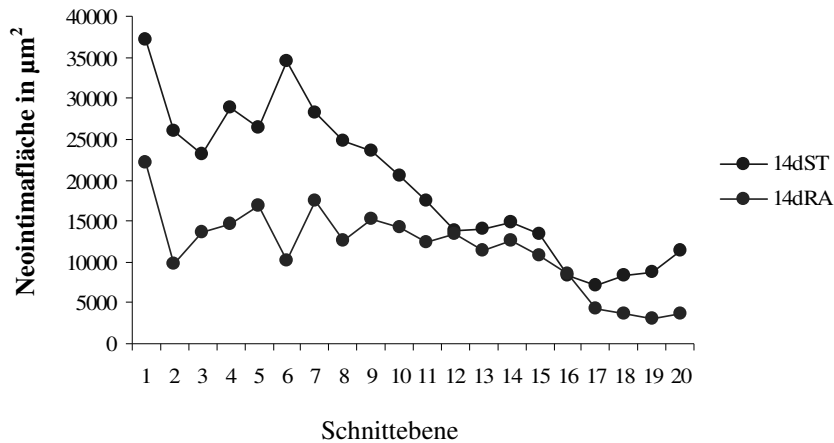
EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Der Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen zeigt eine deutliche Zunahme der Neointimafläche mit der Zeit in den ersten 12 bis 14 Schnittebenen. Ab dem 12. bzw. 14. Schnitt ist nur noch eine sehr geringe Neointimafläche vorhanden und man kann keinen Unterschied mehr zwischen den verschiedenen Gruppen feststellen.

B



C



D

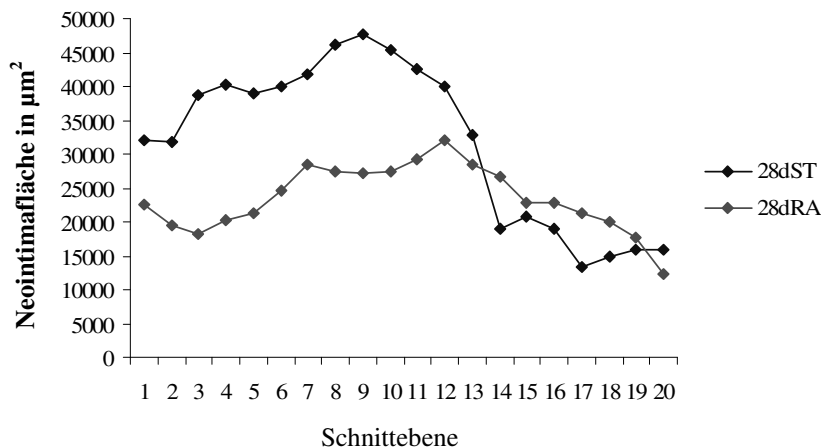


Abbildung 20: Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen (2). B) Vergleich der STENOSE-Gruppe mit der RAPAMYCIN-Gruppe zum Zeitpunkt 7 Tage C) Vergleich der STENOSE-Gruppe mit der RAPAMYCIN-Gruppe zum Zeitpunkt 14 Tage D) Vergleich der STENOSE-Gruppe mit der RAPAMYCIN-Gruppe zum Zeitpunkt 28 Tage (Tabelle 21).

7d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 7 Tagen,
28d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 28 Tagen,
14d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 14 Tagen,

14d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 14 Tagen,
7d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 7 Tagen,
28d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 28 Tagen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 21: Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen in μm^2 (Mittelwert \pm Standardfehler).

Tiergruppe Schnittebene	7 d _{ST}	14 d _{ST}	28 d _{ST}	7 d _{RA}	14 d _{RA}	28 d _{RA}
1	21216,47 \pm 2268,52	37253,49 \pm 2908,33	32107,27 \pm 2457,74	5059,88 \pm 754,79	22117,21 \pm 1484,86	22688,86 \pm 880,89
2	12996,81 \pm 1429,42	25984,18 \pm 3309,69	31903,20 \pm 2040,58	2148,06 \pm 415,43	9780,92 \pm 661,73	19450,62 \pm 740,84
3	14547,57 \pm 1296,88	23208,91 \pm 2775,75	38635,79 \pm 2128,54	4482,88 \pm 1354,52	13566,87 \pm 1035,55	18283,78 \pm 879,69
4	11280,43 \pm 1112,88	28833,77 \pm 3241,87	40301,06 \pm 2012,98	2888,70 \pm 912,07	14642,62 \pm 1125,03	20247,43 \pm 785,58
5	4177,43 \pm 691,25	26481,85 \pm 2200,29	38857,77 \pm 1696,60	100,94 \pm 45,14	16763,02 \pm 1865,86	21168,12 \pm 714,84
6	6596,40 \pm 920,36	34591,98 \pm 3124,30	39946,31 \pm 1903,07	695,03 \pm 310,82	10069,31 \pm 1291,72	24643,12 \pm 609,43
7	7534,57 \pm 1464,07	28232,59 \pm 3114,97	41810,34 \pm 1797,94	0,00 \pm 0,00	17560,80 \pm 1732,70	28548,81 \pm 659,82
8	8733,29 \pm 1196,24	24769,63 \pm 3636,35	46173,48 \pm 1987,92	62,28 \pm 27,85	12509,22 \pm 896,00	27474,40 \pm 759,24
9	7359,61 \pm 1247,03	23513,38 \pm 3756,88	47676,37 \pm 2214,30	578,24 \pm 258,60	15165,62 \pm 1327,91	27184,53 \pm 618,37
10	7330,16 \pm 1552,60	20499,44 \pm 3705,20	45293,46 \pm 2078,90	346,59 \pm 155,00	14147,32 \pm 1083,48	27389,27 \pm 1007,15
11	6258,24 \pm 1201,59	17534,41 \pm 3439,63	42632,99 \pm 2577,98	2416,18 \pm 683,59	12384,37 \pm 1050,27	29348,09 \pm 1058,39
12	6308,21 \pm 1414,23	13769,44 \pm 2607,36	40021,58 \pm 2924,92	3014,36 \pm 791,52	13363,41 \pm 1300,13	31964,33 \pm 1197,56
13	5690,55 \pm 1077,47	14101,84 \pm 2343,67	32849,86 \pm 2908,06	1715,28 \pm 330,38	11286,45 \pm 1617,61	28463,27 \pm 1139,84
14	9762,60 \pm 1726,44	14791,17 \pm 2312,22	19056,21 \pm 2154,19	752,23 \pm 213,39	12643,57 \pm 1362,45	26737,51 \pm 962,98
15	11759,28 \pm 1302,18	13350,50 \pm 2333,11	20666,09 \pm 2474,26	2202,70 \pm 409,88	10720,66 \pm 1220,79	22741,76 \pm 962,24
16	17033,64 \pm 2437,54	8285,66 \pm 1502,96	18971,41 \pm 2585,82	3782,69 \pm 670,61	8527,39 \pm 1015,03	22890,22 \pm 1084,32
17	11239,39 \pm 1244,00	7019,98 \pm 1335,81	13212,28 \pm 1511,24	2335,16 \pm 334,62	4285,22 \pm 534,06	21396,99 \pm 1328,90
18	9424,78 \pm 1738,99	8425,16 \pm 1657,23	14922,64 \pm 1725,58	2008,07 \pm 458,53	3628,33 \pm 417,63	19929,31 \pm 1379,17
19	9099,63 \pm 1842,10	8703,43 \pm 1578,21	15985,45 \pm 2221,46	1866,03 \pm 507,09	3131,44 \pm 416,50	17783,35 \pm 1466,14
20	4280,37 \pm 702,75	11444,39 \pm 1955,78	15795,15 \pm 2458,42	1135,12 \pm 229,48	3660,14 \pm 453,97	12230,26 \pm 1007,52

7d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 7 Tagen,
 28d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 28 Tagen,
 14d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 14 Tagen,

14d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 14 Tagen,
 7d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 7 Tagen,
 28d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 28 Tagen.

Zu den drei Zeitpunkten sieht man eine deutlich geringere Neointimafläche der RAPAMYCIN-Gruppe im Vergleich zur STENOSE-Gruppe. Auch hier lässt sich nach 14 und 28 Tagen, wie in Abbildung 19 die Tendenz erkennen, dass ab der 12. bzw. 14. Schnittebene eine Abnahme der Neointimafläche vorliegt. Außerdem ist ab hier kein Unterschied mehr zwischen der Neointimafläche der STENOSE-Gruppe und der RAPAMYCIN-Gruppe zu erkennen.

Zur Auswertung der folgenden morphometrischen Parameter wurde deshalb der Mittelwert über die ersten 10 Schnittebenen gewählt.

3.4.3.3 Vergleich der Neointimafläche und des Lumenverlustes

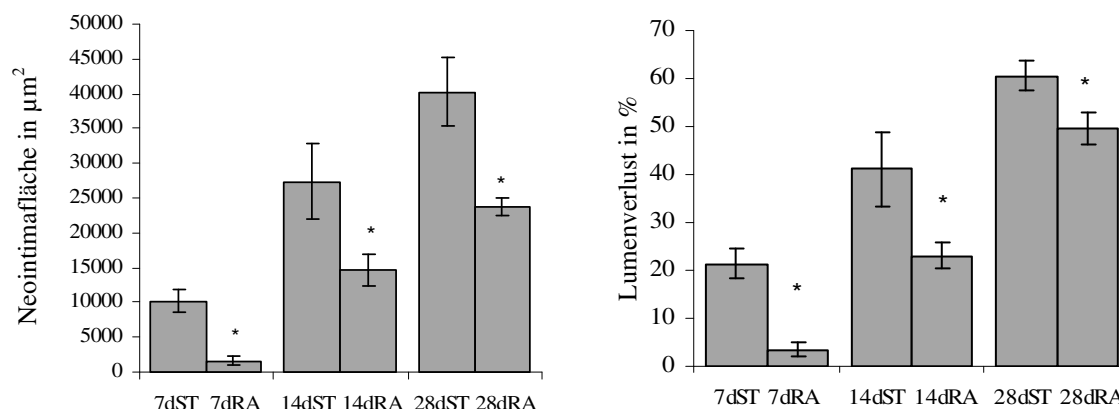


Abbildung 21: Vergleich der Neointimafläche und des Lumenverlustes der STENOSE-Gruppe und der RAPAMYCIN-Gruppe Tabelle 22. * = signifikant im Vergleich zur STENOSE-Gruppe

7d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 7 Tagen

28d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 28 Tagen

14d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 14 Tagen

14d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 14 Tagen

7d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 7 Tagen

28d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 28 Tagen.

Tabelle 22: Neointimafläche in µm² und Lumenverlust in %.

Neointimafläche in µm ²				Lumenverlust in %			
Tiergruppe	n	MW±SE	Sig.	Tiergruppe	n	MW±SE	Sig.
7 d _{ST}	7	10177,27±1656,36	7d _{ST} -7d _{RA} 7d _{ST} -14d _{ST} 7d _{ST} -28d _{ST}	7 d _{ST}	7	21,41±3,09	7d _{ST} -7d _{RA} 7d _{ST} -14d _{ST} 7d _{ST} -28d _{ST}
14 d _{ST}	7	27336,92±5414,07	14d _{ST} -14d _{RA}	14 d _{ST}	7	41,16±7,65	14d _{ST} -28d _{ST}
28 d _{ST}	10	40270,51±4976,07	28d _{ST} -28d _{RA}	28 d _{ST}	10	60,48±3,10	28d _{ST} -28d _{RA}
7 d _{RA}	5	1636,26±695,73	7d _{RA} -14d _{RA}	7 d _{RA}	5	3,41±1,41	7d _{RA} -28d _{RA} 7d _{RA} -14d _{RA}
14 d _{RA}	10	14632,29±2255,74	14d _{RA} -28d _{RA}	14 d _{RA}	10	22,94±2,72	14d _{ST} -14d _{RA}
28 d _{RA}	12	23707,89±1255,49	28d _{RA} -7d _{RA}	28 d _{RA}	12	49,58±3,54	14d _{RA} -28d _{RA}

MW= arithmetisches Mittel über 10 Schnittebenen, SE= Standardfehler, n= Tierzahl pro Gruppe,

Sig.= Signifikanz,

7d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 7 Tagen

28d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 28 Tagen

14d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 14 Tagen

14d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 14 Tagen

7d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 7 Tagen

28d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 28 Tagen.

Sowohl der Lumenverlust, als auch die Neointimafläche ist in der RAPAMYCIN-Gruppe zu allen drei Zeitpunkten signifikant reduziert. Schon nach einer Woche ist in der STENOSE-Gruppe eine deutliche Neointimabildung zu sehen mit einem mittleren Lumenverlust von 21,41±3,09 %, während in der RAPAMYCIN-Gruppe erst ein mittlerer Lumenverlust von

3,41±1,41 % vorliegt. Der mittlere Lumenverlust nach 4 Wochen beträgt in der STENOSE-Gruppe 60,48±3,10 % und unterscheidet sich signifikant von der RAPAMYCIN-Gruppe mit 49,58±3,54 %.

3.4.3.4 Vergleich der Mediafläche in Prozent und der Länge der Lamina elastica externa

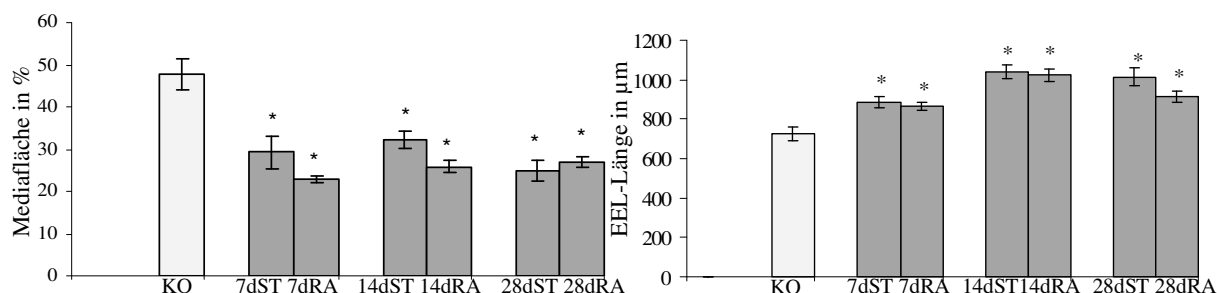


Abbildung 22: Vergleich der Mediafläche in % und der EEL-Länge der KONTROLL-Gruppe, der STENOSE-Gruppe und der RAPAMYCIN-Gruppe (Tabelle 23). * = signifikant im Vergleich zur KONTROLL-Gruppe
 EEL= Lamina elastica externa
 14d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 14 Tagen
 7d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 7 Tagen
 28d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 28 Tagen
 7d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 7 Tagen
 28d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 28 Tagen
 14d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 14 Tagen
 KO= KONTROLL-Gruppe

Tabelle 23: Mediafläche in Prozent Gefäßdurchmesser und Länge der Lamina elastica externa in µm.

Mediafläche in Prozent				Länge der Lamina elastica externa in µm			
Tiergruppe	n	MW±SE	Sig.	Tiergruppe	n	MW±SE	Sig.
KO	4	47,69±3,68	14d _{ST} -KO	KO	4	723,37±34,23	-
7 d _{ST}	7	29,18±3,84	7d _{ST} -KO	7 d _{ST}	7	885,96±28,85	7d _{ST} -KO 7d _{ST} -14d _{ST}
14 d _{ST}	7	32,17±1,93	14d _{ST} -14d _{RA}	14 d _{ST}	7	1040,45±35,06	14d _{ST} -KO
28 d _{ST}	10	24,99±2,51	28d _{ST} -KO	28 d _{ST}	10	1014,38±45,65	28d _{ST} -KO 7d _{ST} -28d _{ST}
7 d _{RA}	5	22,88±0,77	7d _{RA} -KO	7 d _{RA}	5	865,29±17,88	7d _{RA} -KO 7d _{RA} -14d _{RA}
14 d _{RA}	10	25,80±1,37	14d _{RA} -KO	14 d _{RA}	10	1024,77±30,82	14d _{RA} -KO 14d _{RA} -28d _{RA}
28 d _{RA}	12	27,03±1,30	28d _{RA} -KO	28 d _{RA}	12	914,07±27,46	28d _{RA} -KO

MW= arithmetisches Mittel über 10 Schnittebenen, SE= Standardfehler, n= Tierzahl pro Gruppe, Sig.= Signifikanz,
 KO= KONTROLL-Gruppe
 14d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 14 Tagen
 7d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 7 Tagen
 28d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 28 Tagen
 7d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 7 Tagen
 28d_{ST}= STENOSE-Gruppe nach 28 Tagen
 14d_{RA}= RAPAMYCIN-Gruppe nach 14 Tagen

Die Mediafläche in Prozent des Gefäßdurchmessers nimmt im Verhältnis zur Kontrolle in allen Gruppen nach der Gefäßverletzung signifikant ab. Parallel zur Abnahme der

Mediafläche kann man eine signifikante Zunahme der EEL-Länge nach der Gefäßverletzung beobachten.

3.4.4 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

3.4.4.1 Erfolgsrate

Die Erfolgsrate der Genexpressionsanalyse in den verschiedenen Gruppen lag zwischen 33 % und 67 % und spiegelt damit bereits bekannte Ergebnisse wieder. In die Auswertung gingen jeweils fünf Gefäße pro Gruppe (KO, 3d_{ST}, 7d_{ST}, 14d_{ST}, 3d_{RA}) ein.

3.4.4.2 Regulierung der Gene der STENOSE-Gruppe

Übersicht

Die Genexpressionsanalyse in der STENOSE-Gruppe zeigt eine differentielle Regulierung von 298 der untersuchten 2352 Gene. Im Verhältnis zur unoperierten KONTROLL-Gruppe ist eine Hochregulierung der Expression eines Großteils der Gene (59 %) zu beobachten. Dagegen sind nur 25 % der Gene herunterreguliert. Bei 15 % der Gene kann keine einheitliche Regulierung festgestellt werden, sie werden im Folgenden als „schwankende Gene“ bezeichnet (siehe Abbildung 23).

Abbildung 23 und Abbildung 24 spiegeln das Expressionsprofil der differentiell regulierten Gene im Zeitverlauf im Verhältnis zur KONTROLL-Gruppe wieder. In der Gruppe der hochregulierten Gene zeigt sich überwiegend eine frühe Regulierung, während in der Gruppe der herunterregulierten Gene hauptsächlich eine Regulierung zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

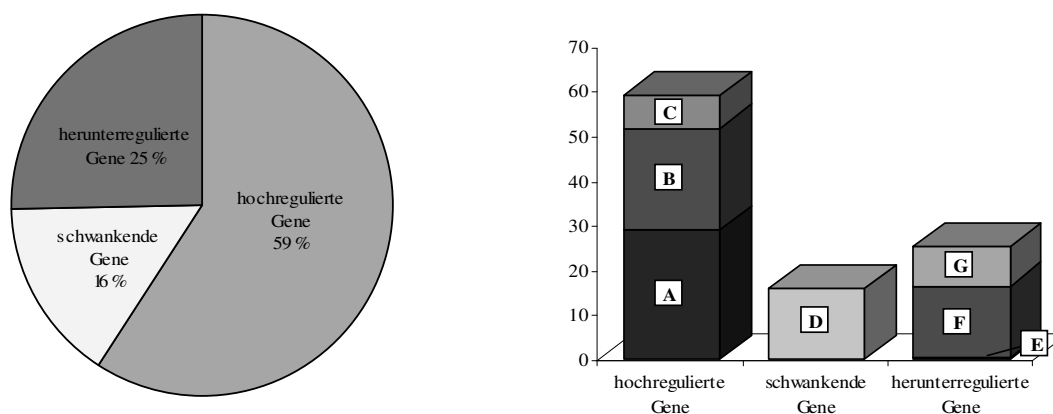


Abbildung 23: Regulierung der Gene der STENOSE-Gruppe (1) (Tabelle 24).

Abbildung 24: Regulierung der Gene der STENOSE-Gruppe (2) (Tabelle 24).

A: Gene, deren Expression nach 3, 7 und 14 Tagen den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle übersteigen.

B: Gene, deren Expression nur nach 3 Tagen und nach 3 und 7 Tagen den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle übersteigen.

C: Gene, deren Expression nur nach 7 Tagen bzw. nach 7 und 14 Tagen den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle übersteigen.

D: Gene, deren Expression keine eindeutige Regulierung aufweisen.

E: Gene, deren Expression nur nach 3 Tagen bzw. nach 3 und 7 Tagen unter den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle fallen.

F: Gene, deren Expression nur nach 7 Tagen bzw. nach 7 und 14 Tagen unter den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle fallen.

G: Gene, deren Expression nach 3, 7 und 14 Tagen unter den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle fallen.

Tabelle 24: Regulierung der Gene der STENOSE-Gruppe.

	Hochregulierte Gene			Schwankende Gene	Herunterregulierte Gene		
	A	B	C	D	E	F	G
Anzahl der Gene in %	59,06			15,77	25,17		
	28,86	22,82	7,38	15,77	0,34	16,11	8,72
Absolute Zahl der Gene	176			47	75		
	86	68	22	47	1	48	26

A: Gene, deren Expression nach 3, 7 und 14 Tagen den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle übersteigen.

B: Gene, deren Expression nur nach 3 Tagen und nach 3 und 7 Tagen den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle übersteigen.

C: Gene, deren Expression nur nach 7 Tagen bzw. nach 7 und 14 Tagen den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle übersteigen.

D: Gene, deren Expression keine eindeutige Regulierung aufweisen.

E: Gene, deren Expression nur nach 3 Tagen bzw. nach 3 und 7 Tagen unter den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle fallen.

F: Gene, deren Expression nur nach 7 Tagen bzw. nach 7 und 14 Tagen unter den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle fallen.

G: Gene, deren Expression nach 3, 7 und 14 Tagen unter den Ausgangswert der unoperierten Kontrolle fallen.

Die 298 differentiell regulierten Gene werden entsprechend ihrer Funktion in vier Gruppen eingeteilt. Die Gruppen werden nach den verschiedenen, während der Neointimabildung wichtigen Mechanismen ausgewählt:

- Proliferations-assoziierte Gene
- Inflammations-assoziierte Gene
- Zelladhäsions-, Zytoskelett- und extrazelluläre Matrix-assoziierte Gene
- Andere Gene

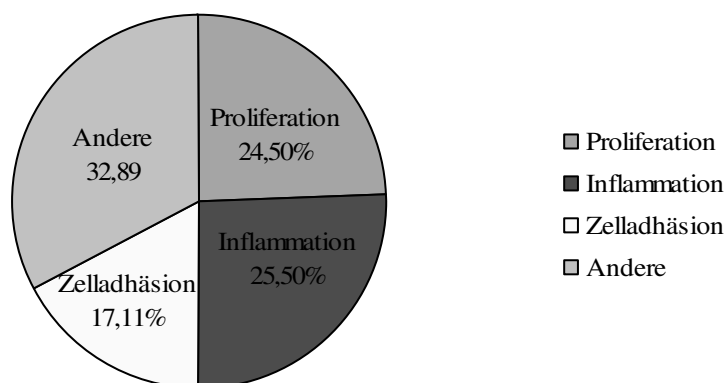


Abbildung 25: Clustering der Gene der STENOSE-Gruppe (Tabelle 25).

Tabelle 25: Clustering der Gene der STENOSE-Gruppe.

	Proliferation	Inflammation	Zelladhäsion	Andere
Anzahl der Gene in %	24,50	25,50	17,11	32,89
Absolute Zahl der Gene	73	76	51	98

Das Clustern der Gene innerhalb der vier Gruppen zeigt, dass ca. 25 % der Gene ihre Funktion im Bereich der Proliferation haben, ca. 26 % im Bereich der Inflammation und ca. 17 % der Zelladhäsion, dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix zuzusprechen sind. 45 (15 %) von den 298 differentiell regulierten Genen sind bereits in der Literatur im Zusammenhang mit Neointima beschrieben.

Im Folgenden wird in den Abbildungen zum besseren Verständnis ein charakteristischer Ausschnitt der regulierten Gene dargestellt. Eine Tabelle der gesamten 298 regulierten ist im Anhang aufgelistet.

Housekeeping-Gene

Die Expression der drei zur Normalisierung verwendeten Housekeeping-Gene war in allen Gruppen konstant.

Tabelle 26: Expression der Housekeeping Gene.

	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
HOUSEKEEPING-GENE					
actin, beta, cytoplasmic	0,048				
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,403				
ubiquitin B	0,069				

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der unoperierten Kontrolle (n=5), der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5), der 7 d_{ST}-Gruppe (n=5), und der 14 d_{ST}-Gruppe (n=5), dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:



p= Signifikanz.

Proliferations- und Apoptose-assoziierte Gene

Tabelle 27: Regulierung von Proliferations- und Apoptose-assoziierten Genen im Zeitverlauf.

	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
PROLIFERATION UND APOPTOSE					
abl proto-oncogene	0,032				
* early growth response 1	0,027				
insulin-like growth factor binding protein 2	0,033				
* cyclin-dependent kinase 4, cdk 4	0,014				
* mitogen activated protein kinase 3, ERK1	0,014				
platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	0,011				
kit oncogene	0,012				
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha GADD45A	0,011				
cell division cycle 45 homolog (S. cerevisiae)-like	0,023				
vascular endothelial growth factor C	0,029				
carbonic anhydrase 3	0,004				
cell division cycle 25 homolog B (S. cerevisiae)	0,042				
cell division cycle 71 homolog (S. cerevisiae)-like 1	0,013				
DNA primase, p49 subunit	0,010				
DNA primase, p58 subunit	0,011				
MyoD family inhibitor	0,025				
pleiotrophin	0,032				
thrombopoietin	0,007				
thymidylate kinase	0,002				
c-fos induced growth factor	0,035				
transcription factor E2a	0,009				
growth differentiation factor 10, bone morphogenic protein	0,008				
* Eph receptor B2	0,021				
Janus kinase 3	0,012				
serine/threonine kinase 5	0,005				
cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	0,003				
secreted apoptosis-related protein 1 (SARP1)	0,010				
cyclin B2	0,010				
* fos-like antigen 1	0,007				
mini chromosome maintenance deficient 5 (S. cerevisiae), cdc46	0,016				
ligase I, DNA, ATP-dependent	0,008				
transcription factor E3	0,005				
transcription factor EC	0,039				
nerve growth factor, beta	0,036				
hemopoietic cell kinase	0,011				
Bcl-associated death promoter	0,004				
* cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	0,019				
* latent transforming growth factor beta binding protein 2	0,020				
serine/threonine kinase 6	0,007				
* interferon regulatory factor 1	0,014				
* insulin-like growth factor 1, IGF1	0,018				

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der unoperierten Kontrolle (n=5), der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5), der 7 d_{ST}-Gruppe (n=5), und der 14 d_{ST}-Gruppe (n=5) normalisiert auf das mRNA-Expressionniveau der drei Housekeeping-Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:



p= Signifikanz

* im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur bereits beschriebenes Gen

In der Gruppe der Proliferations- und Apoptose-assoziierten Gene finden sich Transkriptionsfaktoren, den Zellzyklus-regulierende Gene und im Zusammenhang mit dem Zellwachstumstehende Gene. Außerdem beobachtet man Gene, die im Prozess der Apoptose reguliert werden, aber auch anti-apoptische und antiproliferative Gene.

Durch die Gefäßverletzung kommt es zu einer erhöhten Expression von Transkriptionsfaktoren, wie IRF-1, fos-like-antigen-1, transcription-factor-E2a, transcription-factor-E3 und transcription-factor-EC. Als mit dem Zellzyklus in Verbindung stehende Gene zeigen sich reguliert: abl-protooncogene, alpha-GADD45A, cdc-46, cdk4, cyclin-B2, DNA-Primase, early-growth-response-1, ERK1, IRF-1 und p21. Außerdem sieht man eine Induktion der Expression von Genen, wie der carbonic-anhydrase-3, dem Eph-receptor-B2, dem fos-induced-growth-factor, dem insulin-like-growth-factor-1, dem kit-oncogene und dem VEGF-C, die mit der Proliferation von glatten Muskelzellen zusammenhängen.

Neben den Proliferations-fördernden Genen sind auch Gene hochreguliert, die Apoptose medieren bzw. während der Apoptose reguliert werden, wie Bcl-associated-death-promoter, hemopoietic-cell-kinase, und secreted-apoptosis-related-protein-1 (SARP1).

Bereits im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur beschriebene Gene sind: early-growth-response-1, cdk4, IRF-1, p21, ERK1, Eph-receptor-B2, fos-like-antigen-1, IGF-1 und latent-transforming-growth-factor-beta-binding-protein-2.

Inflammations-assoziierte Gene

Tabelle 28: Regulierung von Inflammations-assoziierten Genen im Zeitverlauf.

	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
INFLAMMATION					
CD34 antigen	0,019				
coagulation factor III, tissue factor	0,020				
CD8 antigen, alpha chain	0,026				
CD86 antigen	0,032				
cytokine inducible SH2-containing protein 1, SOCS1	0,032				
chemokine (C-X-C) receptor 2	0,032				
colony stimulating factor 3 (granulocyte)	0,046				
chemokine (C-X-C) receptor 3	0,007				
oncostatin M	0,007				
* CD 40, tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	0,032				
* interleukin 1 beta	0,002				
small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 10	0,019				
small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 9	0,006				
arachidonate 5-lipoxygenase	0,041				
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1, Par2	0,029				
chemokine (C-X3-C) receptor 1	0,033				
chemokine (C-C) receptor 9	0,013				
complement component factor h	0,011				
folliculin	0,013				
adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1	0,038				
alpha-2-HS-glycoprotein, Fetuin	0,008				
chaperonin subunit 6a (zeta)	0,046				
complement component 5 receptor 1 (C5R1), C5A ligand	0,034				
interleukin 10 receptor, alpha	0,034				
interleukin 10 receptor, beta	0,046				
small inducible cytokine A4 MIP1 beta , CCL4	0,018				
CD37 antigen, leucocyte surface antigen	0,005				
* chemokine (C-X-C) receptor 4	0,022				
colony stimulating factor 1 receptor	0,008				
* protein tyrosine phosphatase, receptor type, C, CD45	0,016				
* colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	0,020				
* CD100	0,047				
GRO1 oncogene, CXCL1	0,010				
small inducible cytokine subfamily, member 2	0,009				
serum amyloid A 3	0,019				
complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	0,010				
* CD68 antigen, macrophage antigen cd 68	0,006				
small inducible cytokine A7, CCL7, MCP3	0,027				
lipocalin 2	0,016				
lipopolysaccharide binding protein	0,030				
platelet-activating factor receptor	0,029				
cytokine inducible SH2-containing protein 3, SOCS3	0,025				
* CD14 antigen, monocyte differentiation antigen	0,006				
chemokine orphan receptor 1	0,036				

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der unoperierten Kontrolle (n=5), der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5), der 7 d_{ST}-Gruppe (n=5), und der 14 d_{ST}-Gruppe (n=5) normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der drei Housekeeping-Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:



p= Signifikanz

* im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur bereits beschriebenes Gen

In der Gruppe der Inflammations-assoziierten Gene finden sich Oberflächenantigene inflammatorischer Zellen, Zytokine, Chemokinrezeptoren und ihre Liganden. Allgemein sind Gene enthalten, die eine Rolle während inflammatorischer Reaktionen spielen oder im Zusammenhang mit diesen stehen. Außerdem wurden der Gruppe Gene zugeordnet, die im Zusammenhang mit der Komplementkaskade oder der Gerinnungskaskade stehen. Oberflächenantigene inflammatorischer Zellen, wie CD45, das Monozytenantigen CD14, das T-Zelloberflächenantigen CD8, CD18, CD37 auf Leukozyten und CD86 auf B-Zellen, zeigen eine Hochregulierung der Expression nach Gefäßverletzung, was für eine Rekrutierung von Entzündungszellen spricht. Auch CD34, ein Marker für hämatopoetischen Vorläuferzellen, zeigt eine Regulierung. Neben der Adhäsion der Entzündungszellen trägt noch die Chemotaxis zur Rekrutierung bei. Die Induktion einer Vielzahl von Chemokinrezeptoren und ihrer Liganden konnte beobachtet werden, CXCR3 mit den Liganden IP10 und MIG, CXCR2 und GRO1, CXCR4, CX3CR1, CCR9, CCL2 und CCL7. Zytokine wie IL1 β und GCSF3 wurden ebenfalls reguliert. IL1 β , CD45, CD68 und CD14 sind bereits bekannte im Pathomechanismus der Neointima regulierte Gene.

Zelladhäsions-, Zytoskelett- und extrazellulärer Matrix-assoziierte Gene

Tabelle 29: Regulierung von Zelladhäsions-, Zytoskelett- und extrazellulärer Matrix-assoziierten Genen im Zeitverlauf.

	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
ZELLADHÄSION, ZYTOSKELETT UND EZM					
cadherin 6, K-Cadherin	0,032	■			
laminin, beta 2	0,029				■
* desmin	0,019	■	■		■
lysyl oxidase	0,007			■	■
matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	0,024	■			■
* integrin alpha L (Cd11a)	0,032			■	
endothelin 3	0,013		■		
LIM-domain containing, protein kinase	0,043				
gap junction membrane channel protein beta 3	0,023		■		
* matrix metalloproteinase 11, stromelysin 3	0,007		■		
fibulin 1	0,008		■		
* integrin alpha M (Cd11b), MAC-1alpha	0,027		■	■	
* interleukin 6	0,007		■	■	■
* CD44 antigen, phagocytic glycoprotein I (PGP1)	0,022		■	■	■
* selectin, endothelial cell	0,027		■	■	
thrombospondin 2	0,029				
embryonal Fyn-associated substrate	0,014		■		
* integrin beta 2 (Cd18)	0,024		■	■	■
* selectin, platelet (p-selectin) ligand	0,005		■	■	■
* matrix metalloproteinase 9	0,043		■		
* secreted phosphoprotein 1, osteopontin	0,014		■		
* tissue inhibitor of metalloproteinase	0,016		■		
* selectin, platelet	0,014	■	■	■	
* versican, chondroitin sulfate proteoglycan 2	0,010		■	■	■

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der unoperierten Kontrolle (n=5), der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5), der 7 d_{ST}-Gruppe (n=5), und der 14 d_{ST}-Gruppe (n=5) normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der drei Housekeeping-Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:



p= Signifikanz

* im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur bereits beschriebenes Gen

Die Gruppe der Zelladhäsions-, Zytoskelett- und extrazellulärer Matrix-assoziierten Gene setzt sich einerseits aus Genen zusammen wie Oberflächenantigene zur Zelladhäsion, andererseits finden sich das Zytoskeletts bzw. das Zytoskelett-regulierende Gene, die unter anderem die Zellmobilität beeinflussen. Außerdem setzt sich diese Gruppe aus Bestandteilen der extrazellulären Matrix und Genen zusammen, die an den Bau- und Umbauprozessen der extrazellulären Matrix teilnehmen.

Adhäsionsmoleküle, wie CD11a, CD11b, CD18, CD44, P-Selektin und E-Selektin werden nach Verletzung induziert. Matrix-Metalloproteinasen, die durch Degradation der extrazellulären Matrix zum Remodeling, zur Wundheilung und Angiogenese beitragen, wie

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

MMP9, MMP11 und MMP14 zeigen eine erhöhte Expression im Prozess der Neointimabildung. Eine Regulierung der Gene Desmin, CD11a, CD11b, CD18, E-Selektin, P-Selektin, Selektin-P-ligand, CD44, Interleukin-6, MMP9, MMP11, TIMP, Osteopontin und Versican während der Neointimabildung wurde bereits in der Literatur beschrieben.

Andere Gene

Tabelle 30: Regulierung anderer Gene im Zeitverlauf.

	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
ANDERE					
natriuretic peptide receptor 1	0,043				
* proprotein convertase subtilisin/kexin type 5, PC5	0,023				
uridine phosphorylase	0,015				
phospholipid transfer protein	0,011				

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der unoperierten Kontrolle (n=5), der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5), der 7 d_{ST}-Gruppe (n=5), und der 14 d_{ST}-Gruppe (n=5) normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der drei Housekeeping-Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:

< 0,05
 0,05-0,2
 0,2-0,4
 0,4-0,8
 >0,8

p= Signifikanz

* im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur bereits beschriebenes Gen

Viele Gene dieser Gruppen sind Enzyme. Es finden sich aber auch Gene deren Funktion noch nicht bekannt ist. Enzymatische Aktivität besitzen die uridine-phosphorylase und das proprotein-convertase-subtilisin/kexin-type-5 Gen. Auch hier ist der Großteil der Gene durch die Drahtverletzung hochreguliert.

3.4.4.3 Regulierung der Gene der RAPAMYCIN-Gruppe

Übersicht

Bei dem Vergleich der 3d_{ST}-Gruppe mit der 3d_{RA}-Gruppe ergeben sich 66 differentiell regulierte Gene. 89 % der Gene wurden herunterreguliert, bei lediglich 11 % der Gene ist durch die Rapamycingabe eine Hochregulierung zu beobachten. Es finden sich 31 (47 %) der Gene wieder, die auch in der STENOSE-Gruppe differentiell reguliert sind.

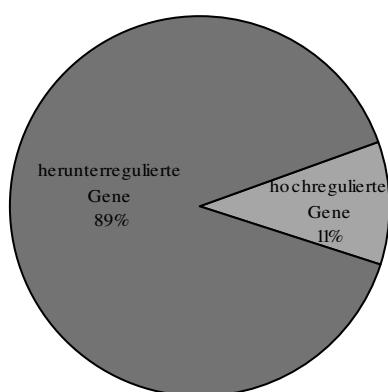


Abbildung 26: Regulierung der Gene der 3d_{ST}-Gruppe im Vergleich mit der 3d_{RA}-Gruppe (Tabelle 31).

Tabelle 31: Regulierung der Gene der 3d_{ST}-Gruppe im Vergleich mit der 3d_{RA}-Gruppe.

	Hochregulierte Gene	Herunterregulierte Gene
Anzahl der Gene in %	10,61	89,39
Absolute Zahl der Gene	7	59

Die 66 differentiell regulierten Gene wurden, wie die der STENOSE-Gruppe, entsprechend ihrer Funktion in die vier Gruppen eingeteilt:

- Proliferations-assoziierte Gene
- Inflammations-assoziierte Gene
- Zelladhäsions-, Zytoskelett- und extrazelluläre Matrix-assoziierte Gene
- Andere Gene

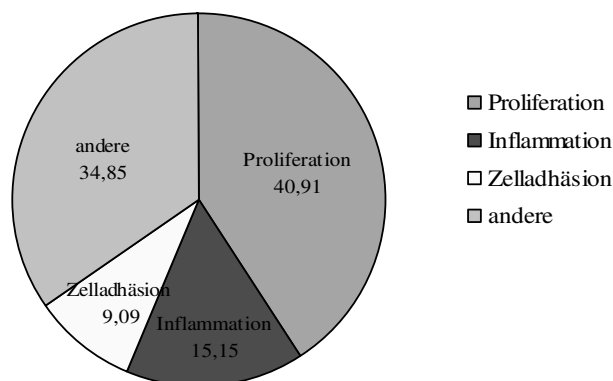


Abbildung 27: Gruppeneinteilung der durch Rapamycin differentiell regulierten Gene (Tabelle 32).

Tabelle 32: Gruppeneinteilung der durch Rapamycin differentiell regulierten Gene.

	Proliferation	Inflammation	Zelladhäsion	Andere
Anzahl der Gene in %	40,91	15,15	9,09	34,85
Absolute Zahl der Gene	27	10	6	23

Ca. 41 % der durch Rapamycin differentiell regulierten Gene haben ihre Funktion im Bereich der Proliferation. Nur 15 % sind der Inflammation und 9 % der Zelladhäsions-, dem Zytoskelett- und der extrazellulären Matrix zuordenbar. 35 % der gefundenen Gene haben andere bzw. noch unbekannte Funktionen.

Im Folgenden wird in den Abbildungen zum besseren Verständnis ein charakteristischer Ausschnitt der regulierten Gene dargestellt. Eine Tabelle der gesamten 66 regulierten ist im Anhang aufgelistet.

Housekeeping-Gene

Die Expression der drei zur Normalisierung verwendeten Housekeeping-Gene war in den beiden Gruppen konstant.

Tabelle 33: Expression der Housekeeping Gene.

HOUSEKEEPING-GENE		p	3 d _{ST}	3 d _{RA}
	actin, beta, cytoplasmic	0,155		
	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,5		
	ubiquitin B	0,5		

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5) und der 3 d_{RA}-Gruppe (n=5), dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:



p= Signifikanz

Proliferations- und Apoptose-assoziierte Gene

Tabelle 34: Regulierung von Proliferations- und Apoptose-assoziierten Genen im Vergleich der 3d-STENOSE-Gruppe und der 3d-RAPAMYCIN-Gruppe.

PROLIFERATION UND APOPTOSE		p	3 d _{ST}	3 d _{RA}
	3-phosphoglycerate dehydrogenase	0,044	■	□
#	Bcl-associated death promoter	0,018	■	□
#	cell division cycle 25 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	0,016	■	□
#	cell division cycle 71 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)-like 1	0,048	■	□
*	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	0,008	■	□
#	DNA polymerase alpha 2, 68 kDa	0,04	■	□
#	gap junction membrane channel protein beta 3	0,04	■	□
#	insulin-like growth factor binding protein 2	0,016	■	□
#	ligase I, DNA, ATP-dependent	0,008	■	□
#	nerve growth factor, beta	0,024	■	□
#, °	thymidylate kinase	0,016	■	□
#, *	Eph receptor B2	0,008	■	□
#, *, °	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	0,048	■	□
#, °	mini chromosome maintenance deficient 5 (<i>S. cerevisiae</i>)	0,016	■	□
	mini chromosome maintenance deficient 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	0,024	■	□
	activating transcription factor 3	0,029	■	□
	bone morphogenetic protein 6	0,024	■	□
*	caspase homolog, flip	0,04	■	□
	ELK1, member of ETS oncogene family	0,024	■	□
	FMS-like tyrosine kinase 1, VEGFR1	0,024	■	□
	gap junction membrane channel protein alpha 5	0,004	■	□
	thyroid autoantigen 70 kDa	0,008	■	□
	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	0,024	■	□
	uridine phosphorylase	0,008	■	□
	abl-interactor 1	0,044	■	□
#	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	0,029	■	□
#, *, °	early growth response 1	0,028	■	□
*	FBJ osteosarcoma oncogene, cfos	0,032	■	□
#	serine/threonine kinase 5	0,044	■	□
	tubulin cofactor a	0,014	■	□

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5) und der 3 d_{RA}-Gruppe (n=5), normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der drei Housekeeping-Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:



p= Signifikanz

in der STENOSE-Gruppe differentiell reguliertes Gen

* im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur bereits beschriebenes Gen

° im Zusammenhang mit Rapamycin in der Literatur bereits beschriebenes Gen

Ein Großteil der in dieser Gruppe herunterregulierten Gene spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus, wie cell-division-cycle-25-homolog-B, cell-division-cycle-71 homolog-like-1, p57, ligase-I, DNA-polymerase-alpha-2, thymidylatkinase, p21, MCM2 und MCM5. Auch einige Apoptose-assoziierte Gene, wie der Bcl-associated-death-promoter und caspase-homolog zeigen eine verminderte Expression in der 3d_{RA}-Gruppe. Der Einfluss von

Rapamycin auf die Expression von early-growth-response-1 und einigen Vertretern der MCM-Familie wurde in der Literatur bereits aufgezeigt (BRUEMMER et al. 2003).

Inflammations-assoziierte Gene

Tabelle 35: Regulierung von Inflammations-assoziierten Genen im Vergleich der 3d-STENOSE-Gruppe und der 3d-RAPAMYCIN-Gruppe.

		p	3 d _{ST}	3 d _{RA}
INFLAMMATION				
#	alpha-2-HS-glycoprotein	0,018		
#,*	chemokine (C-X-C) receptor 4	0,008		
#	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	0,008		
*	plasminogen activator, tissue	0,008		
#,*	CD100	0,044		
	chemokine (C-C) receptor 2, MCP1-R	0,029		
	small inducible cytokine A9	0,016		

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5) und der 3 d_{RA}-Gruppe (n=5), normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der drei Housekeeping-Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:

< 0,05
 0,05-0,2
 0,2-0,4
 0,4-0,8
 >0,8

p= Signifikanz

in der STENOSE-Gruppe differentiell reguliertes Gen




* im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur bereits beschriebenes Gen

° im Zusammenhang mit Rapamycin in der Literatur bereits beschriebenes Gen

Nur ein sehr geringer Anteil Inflammations-assoziiierter Gene zeigt sich durch Rapamycin reguliert. Der Großteil der inflammatorischen Gene ist auch in der STENOSE-Gruppe differentiell reguliert. Reguliert zeigen sich unter anderem das alpha-2-HS-glycoprotein und Chemokine, wie small-inducible-cytokine-A9, bzw. deren Rezeptoren MCP1-R und CXCR4.

Zelladhäsions-, Zytoskelett- und extrazelluläre Matrix-assoziierte Gene

Tabelle 36: Regulierung von Zelladhäsions-, Zytoskelett- und extrazellulärer Matrix-assoziierten Genen im Vergleich der 3d-STENOSE-Gruppe und der 3d-RAPAMYCIN-Gruppe.

		p	3 d _{ST}	3 d _{RA}
ZELLADHÄSION, ZYTOSKELETT UND EZM				
#, *, °	selectin, endothelial cell	0,014		
*	thrombomodulin	0,048		
	ephrin B1	0,048		

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5) und der 3 d_{RA}-Gruppe (n=5), normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der drei Housekeeping-Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:



p= Signifikanz

in der STENOSE-Gruppe differentiell reguliertes Gen

* im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur bereits beschriebenes Gen

° im Zusammenhang mit Rapamycin in der Literatur bereits beschriebenes Gen

Es finden sich hier einige für die Zelladhäsion verantwortliche Gene, wie E-Selektin und Thrombomodulin, herunterreguliert. Die Herunterregulierung von E-Selektin durch Rapamycin wurde in der Literatur bereits beschrieben (CHARREAU et al. 2000). Auch eine Rolle des Endothelzelloberflächenantigen Thrombomodulin während der Neointimabildung ist bekannt (WAUGH et al. 2000).

Andere Gene

Tabelle 37: Regulierung anderer Gene im Vergleich der 3d-STENOSE-Gruppe und der 3d-RAPAMYCIN-Gruppe.

		p	3 d _{ST}	3 d _{RA}
ANDERE				
°	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	0,018	■	□
	cathepsin C	0,024	■	□
	frizzled homolog 8 (Drosophila)	0,004	■	□
*	manic fringe homolog (Drosophila)	0,016	■	□
	natriuretic peptide receptor 1	0,04	■	□
	radical fringe gene homolog, (Drosophila)	0,004	■	□
	snail homolog, (Drosophila)	0,04	■	□
	zinc finger protein 144, mel 18	0,048	■	□
°	phospholipase C, beta 3	0,008	■	■
	carbonic anhydrase 4	0,029	□	■
	fibroblast inducible secreted protein	0,04	□	■
	mesenchyme homeobox 2	0,048	□	■

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5) und der 3 d_{RA}-Gruppe (n=5), normalisiert auf das mRNA-Expressionsniveau der drei Housekeeping-Gene, dargestellt als farbiger Wert entsprechend der unten angegebenen Skala:



p= Signifikanz

in der STENOSE-Gruppe differentiell reguliertes Gen

* im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur bereits beschriebenes Gen

° im Zusammenhang mit Rapamycin in der Literatur bereits beschriebenes Gen

Neben der Regulierung von Genen mit enzymatischer Aktivität, wie carbonic-anhydrase-4 und Phospholipase-C-beta-3, findet sich eine Herunterregulierung der fringe-Gene: manic-fringe und radical-fringe, die den Notch-Signaltransduktionsweg aktivieren. Die Expression von manic-fringe ist auch in humaner Neointima erhöht (ZOHLNHÖFER et al. 2001b) Außerdem zeigt sich auch eine Beeinflussung des frizzled-homologs Genes und des snail-homologs Genes.

3.4.5 Ergebnisse der genspezifischen PCRs

Die genspezifischen PCRs werden mit den Proben aus der Genexpressionsanalyse, d.h. fünf Gefäße der KONTROLL-Gruppe (unoperierte Kontrolle), je fünf der drei Untergruppen der STENOSE-Gruppe (3d_{ST}, 7d_{ST}, 14d_{ST}) und fünf Gefäße in der RAPAMYCIN-Gruppe (3d_{RA}) in einer 1:50 Verdünnung durchgeführt.

3.4.5.1 β -Aktin-PCR

β -Aktin-PCR-STENOSE-Gruppe

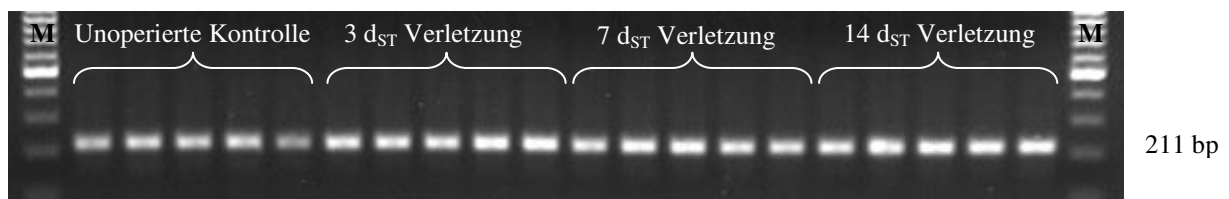


Abbildung 28: β -Aktin-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

β -Aktin-PCR-RAPAMYCIN-Gruppe

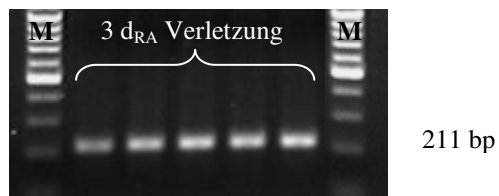


Abbildung 29: β -Aktin-PCR Ergebnisse der RAPAMYCIN-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

Abbildung 28 und Abbildung 29 zeigen die Normalisierung der Proben auf das Housekeeping-Gen β -Aktin.

3.4.5.2 Desmin-PCR

Desmin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts. Wie in der Genexpressionsanalyse zeigt sich auch in der PCR eine signifikante Herunterregulierung von Desmin nach Verletzung im Vergleich zur unoperierten Kontrolle. Die Herunterregulierung in der Neointima ist bereits in der Literatur beschrieben, auch ZOHLNHÖFER et al. (2001b) können eine Herunterregulierung in humaner In-Stent-Neointima zeigen.

Desmin-PCR-STENOSE-Gruppe



Abbildung 30: Desmin-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

Desmin-Densitometrie der STENOSE-Gruppe

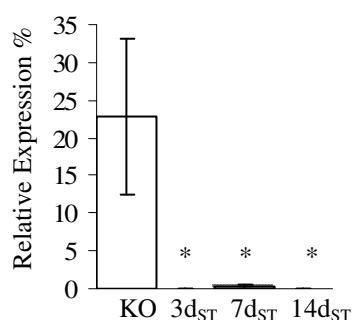


Abbildung 31: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der Desmin-PCR der STENOSE-Gruppe (Tabelle 38). * = signifikant im Vergleich zur KONTROLL-Gruppe.

Tabelle 38: Desmin-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
KO	5	22,82	10,24	
3d _{ST}	5	0,00	0,00	3d _{ST} -KO
7d _{ST}	5	0,21	0,21	7d _{ST} -KO
14d _{ST}	5	0,00	0,00	14d _{ST} -KO

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.3 E-Selektin-PCR

E-Selektin oder endothelial-leukocyte-adhesion-molecule-1 ist verantwortlich für die Akkumulation von Leukozyten an den Ort der Entzündung, indem es die Adhäsion der Zellen an die Gefäßwand vermittelt. Man kann eine starke Expression 3, 7 und 14 Tage nach Verletzung im Gegensatz zur unoperierten Kontrolle beobachten. Die Rapamycin-behandelte Gruppe zeigt im Verhältnis zur operierten Gruppe eine geringere Expression drei Tage nach Verletzung.

E-Selektin-PCR-STENOSE-Gruppe

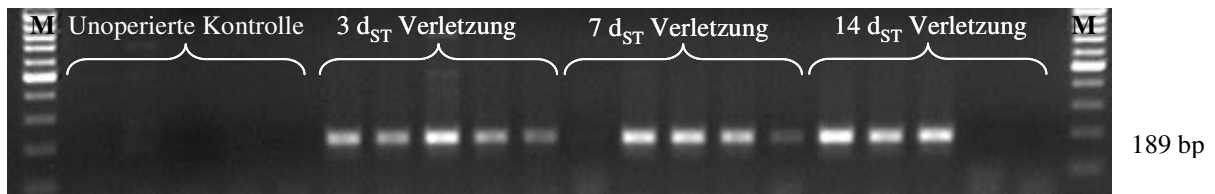


Abbildung 32: E-Selektin-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe. Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

E-Selektin-PCR-RAPAMYCIN-Gruppe

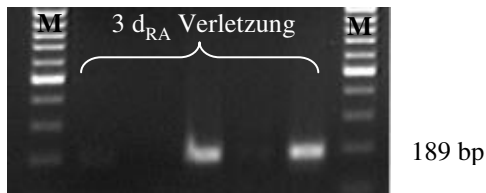


Abbildung 33: E-Selektin-PCR Ergebnisse der RAPAMYCIN-Gruppe. Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

E-Selektin-Densitometrie der STENOSE-Gruppe

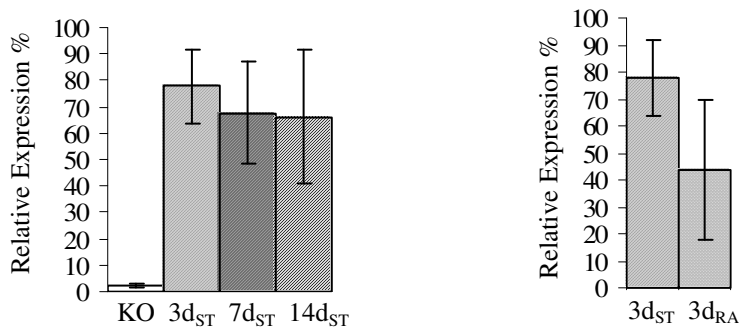


Abbildung 34: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der E-Selektin-PCR der STENOSE-Gruppe und der 3 d_{ST}-Gruppe im Vergleich zur 3 d_{RA}-Gruppe (Tabelle 39).

Tabelle 39: E-Selektin-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
KO	5	1,99	0,82	-
3d _{ST}	5	77,88	13,93	-
7d _{ST}	5	67,52	19,24	-
14d _{ST}	5	66,25	25,69	-
3d _{RA}	5	43,53	11,55	-

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.4 GRO1-PCR

GRO1 bzw. alpha (CXCL1) ist ein Chemokin und spielt eine wesentliche Rolle während der inflammatorischen Antwort. Die PCR zeigt eine Induktion von GRO1 nach Gefäßverletzung. Nach 7 und 14 Tagen lässt sich im Vergleich zur KONTROLL-Gruppe eine signifikante Erhöhung der Expression beobachten.

GRO1-PCR-STENOSE-Gruppe



Abbildung 35: GRO1-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

GRO1-Densitometrie der STENOSE-Gruppe

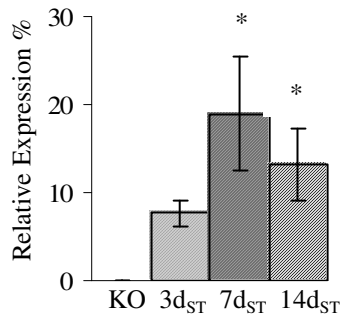


Abbildung 36: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der GRO1-PCR der STENOSE-Gruppe (Tabelle 40). *= signifikant im Vergleich zur KONTROLL-Gruppe.

Tabelle 40: GRO1-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
KO	5	0,00	0,00	KO-7d _{ST}
3d _{ST}	5	7,65	1,48	3d _{ST} -14d _{ST}
7d _{ST}	5	18,93	6,50	7d _{ST} -3d _{ST}
14d _{ST}	5	13,22	4,14	KO-14d _{ST}

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.5 CXCR4-PCR

Der Chemokinrezeptor CXCR4 spielt eine Rolle während der Inflammation und der Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen. Es zeigt sich eine signifikante Induktion der Expression 3, 7 und 14 Tagen nach der Gefäßverletzung. In der Rapamycin-behandelten Gruppe dagegen ist, im Vergleich zur STENOSE-Gruppe, die Expression drei Tage nach der Verletzung signifikant reduziert.

CXCR4-PCR-STENOSE-Gruppe

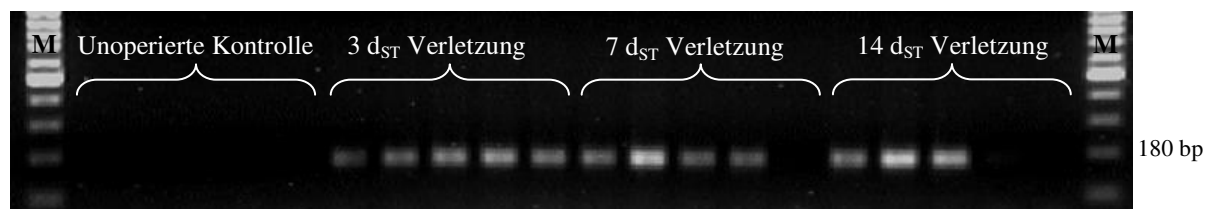


Abbildung 37: CXCR4-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

CXCR4-PCR-RAPAMYCIN-Gruppe



Abbildung 38: CXCR4-PCR Ergebnisse der RAPAMYCIN-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

CXCR4-Densitometrie der STENOSE-Gruppe und der RAPAMYCIN-Gruppe

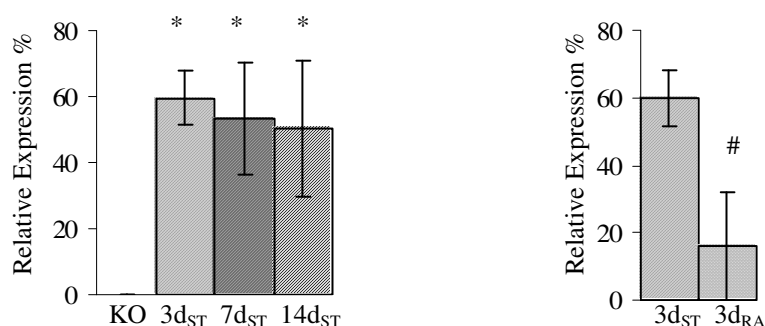


Abbildung 39: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der CXCR4-PCR der STENOSE-Gruppe und der 3 d_{ST}-Gruppe im Vergleich zur 3 d_{RA}-Gruppe (Tabelle 41). * = signifikant im Vergleich zur KONTROLL-Gruppe, # = signifikant im Vergleich zur 3 d_{ST}-Gruppe.

Tabelle 41: CXCR4-PCR

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
KO	5	0,00	0,00	
3d _{ST}	5	59,68	8,26	3 d _{ST} -KO
7d _{ST}	5	53,44	16,97	7 d _{ST} -KO
14d _{ST}	5	50,39	20,60	14 d _{ST} -KO
3d _{RA}	5	15,87	15,87	3 d _{RA} -3 d _{ST}

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.6 CXCR3-PCR

CXCR3 ist der Rezeptor für die Chemokine IP-10 und MIG, die besonders chemotaktisch für aktivierte Lymphozyten sind. Außerdem wird eine Beteiligung von CXCR3-IP-10 und CXCR3-MIG an der Rekrutierung und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen diskutiert (JINQUAN et al. 2000). Im Vergleich zur unoperierten Kontrolle ist eine Heraufregulierung von CXCR3 nach der Verletzung zu beobachten.

CXCR3-PCR-STENOSE-Gruppe



Abbildung 40: CXCR3-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

CXCR3-Densitometrie der STENOSE-Gruppe

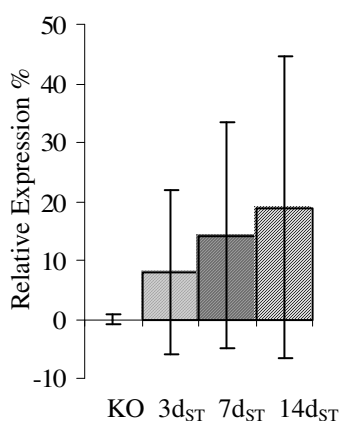


Abbildung 41: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der CXCR3-PCR der STENOSE-Gruppe (Tabelle 42).

Tabelle 42: CXCR3-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
KO	5	0,00	0,82	-
3d _{ST}	5	7,88	13,93	-
7d _{ST}	5	14,23	19,24	-
14d _{ST}	5	18,94	25,69	-

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.7 IP-10-PCR

IP-10, der Ligand von CXCR3, ist besonders chemotaktisch für aktivierte Lymphozyten. Außerdem wird eine Beteiligung von CXCR3-IP-10 an der Rekrutierung und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen diskutiert (JINQUAN et al. 2000). Wie in der Genexpressionsanalyse kann man auch in der PCR eine signifikante Hochregulierung von IP-10 7 Tage nach Verletzung beobachten.

IP10-PCR-STENOSE-Gruppe

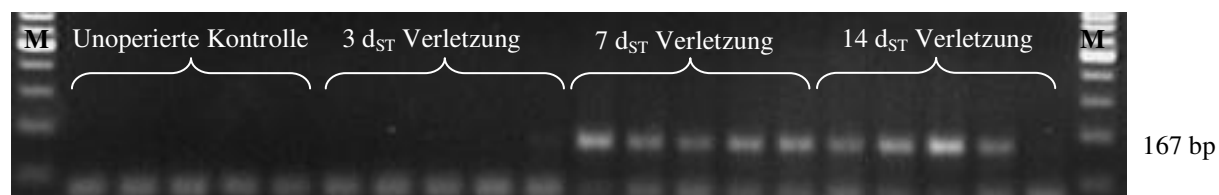


Abbildung 42: IP-10-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

IP-10-Densitometrie der STENOSE-Gruppe

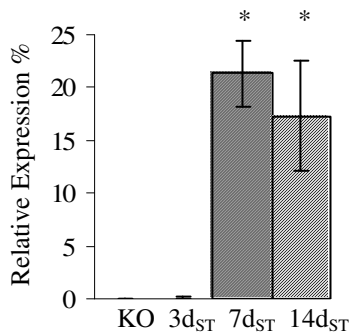


Abbildung 43: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der IP-10-PCR der STENOSE-Gruppe (Tabelle 43). *= signifikant im Vergleich zur KONTROLL-Gruppe.

Tabelle 43: IP-10-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
KO	5	0,00	0,00	KO-7d _{ST}
3d _{ST}	5	0,09	0,09	3d _{ST} -14d _{ST}
7d _{ST}	5	21,35	3,11	7d _{ST} -3d _{ST}
14d _{ST}	5	17,30	5,20	14d _{ST} -KO

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.8 MMP9-PCR

MMP9 oder Kollagenase-Typ-IV ist ein Mitglied der Zink-Metalloproteasen. Es baut Kollagene der extrazellulären Matrix ab. Matrix Metalloproteinasen spielen eine Schlüsselrolle bei der Neointimabildung nach Ballonangioplastie. Schon FELDMAN et al. (2001) zeigen eine rasche Hochregulierung von MMP9 nach Ballonangioplastie und Stentimplantation. In der PCR sieht man eine Induktion von MMP9 3 Tage nach Gefäßverletzung über den gesamten Untersuchungszeitraum. Nach 7 Tagen ist die Expression im Vergleich zur KONTROLL-Gruppe signifikant erhöht.

MMP9-PCR-STENOSE-Gruppe

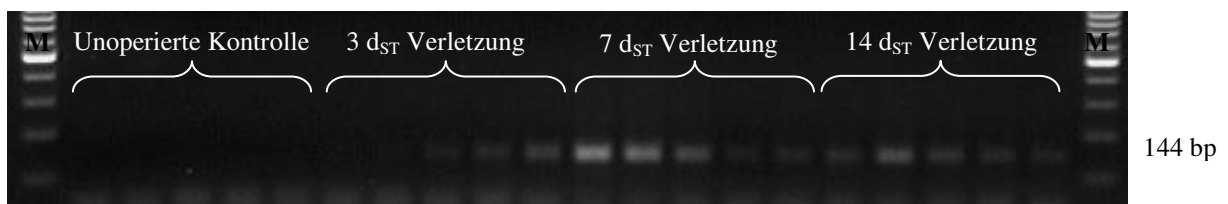


Abbildung 44: MMP9-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

MMP9-Densitometrie der STENOSE-Gruppe

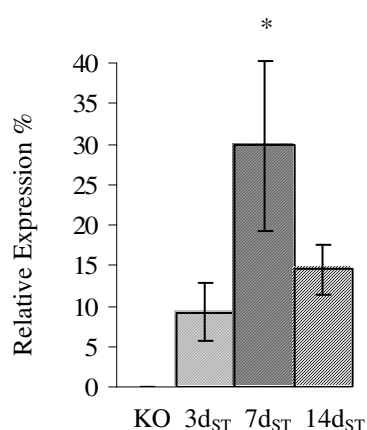


Abbildung 45: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der MMP9-PCR der STENOSE-Gruppe (Tabelle 44). *= signifikant zur KONTROLL-Gruppe.

Tabelle 44: MMP9-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
KO	5	0,00	0,00	KO-7 d _{ST}
3d _{ST}	5	9,21	3,60	3 d _{ST} -7 d _{ST}
7d _{ST}	5	29,75	10,52	7d _{ST} -14d _{ST}
14d _{ST}	5	14,55	3,09	

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.9 Kit-oncogene-PCR

Kit-oncogene ist der Rezeptor für SCF (stem cell factor). Eine Beteiligung bei der Rekrutierung von Stammzellen in Verbindung mit MMP9 wird diskutiert (HEISSIG et al. 2002). Nach 7 und 14 Tagen ist eine signifikante Hochregulierung zu beobachten.

Kit-oncogene-PCR-STENOSE-Gruppe

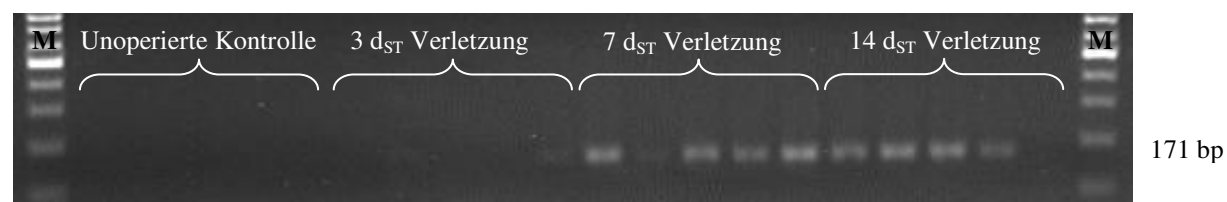


Abbildung 46: Kit-oncogene-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe. Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

Kit- oncogene-Densitometrie der STENOSE-Gruppe

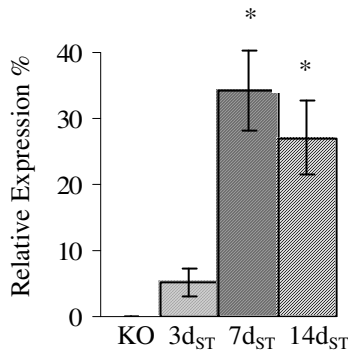


Abbildung 47: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der Kit- oncogene-PCR der STENOSE-Gruppe (Tabelle 45). *= signifikant im Vergleich zur KONTROLL-Gruppe.

Tabelle 45: Kit- oncogene-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
KO	5	0,00	0,00	KO-14d _{ST}
3d _{ST}	5	5,19	2,10	3d _{ST} -7d _{ST}
7d _{ST}	5	34,32	6,00	KO-7d _{ST}
14d _{ST}	5	27,08	5,64	14d _{ST} -3d _{ST}

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.10 MCM-2-PCR

Minichromosome maintenance Proteine sind essentielle Regulatoren der DNA Replikation. BRUEMMER et al. (2003) konnten eine Hemmung der Expression von MCM6 und MCM7 durch Rapamycin in Aorten-VSMC von Ratten beobachten. Minichromosome-maintenance-2 (MCM-2) oder cell-division-cycle-like-1 zeigt in der PCR 3 Tage nach Verletzung eine signifikante Herunterregulierung der Expression durch Rapamycin.

MCM-2-PCR- und Densitometrie der 3d-STENOSE-Gruppe und der 3d-RAPAMYCIN-Gruppe

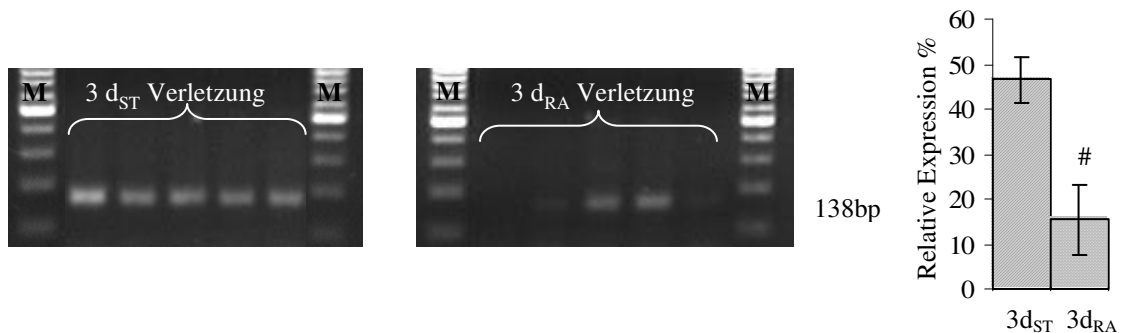


Abbildung 48: MCM-2-PCR und densitometrische Ergebnisse der 3d_{ST}-Gruppe im Vergleich zur 3d_{RA}-Gruppe (Tabelle 46). Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker, # = signifikant im Vergleich zur 3d_{ST}-Gruppe.

Tabelle 46: MCM2-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
3d _{ST}	5	46,58	5,04	3d _{ST} -3d _{RA}
3d _{RA}	5	15,38	7,70	

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.11 TMK-PCR

Die Thymidylatkinase katalysiert die Konvertierung von dTMP zu dTDP, was zur Bildung des DNA-Vorläufers dTTP führt. Die Enzymaktivität ist in schnell teilendem Gewebe erhöht. Wie in der Genexpressionsanalyse ist auch in der PCR eine signifikante Herunterregulierung der TMK Expression durch Rapamycin zu sehen.

TMK-PCR- und Densitometrie der 3d-STENOSE-Gruppe und der 3d-RAPAMYCIN-Gruppe

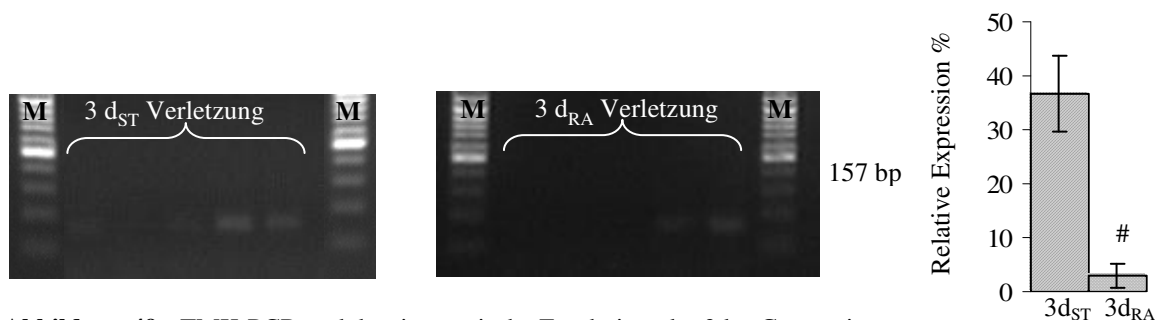


Abbildung 49: TMK-PCR und densitometrische Ergebnisse der 3d_{ST}-Gruppe im Vergleich zur 3d_{RA}-Gruppe (Tabelle 47). Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

Tabelle 47: TMK-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
3d _{ST}	5	46,58	5,04	3d _{ST} -3d _{RA}
3d _{RA}	5	15,38	7,70	

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.5.12 SDF-1-PCR

Für SDF-1, den Liganden von CXCR4 liegen keine Genexpressionsdaten vor, da SDF-1 auf den beiden Clontech Nylon-Arrays Mouse 1.2 und Mouse 1.2 II nicht aufgetragen ist. Wie bei seinem Rezeptor CXCR4 lässt sich auch bei SDF-1 eine signifikante Induktion der Expression nach 3 Tagen über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachten. SDF-1 zeigt aber, im Gegensatz zu CXCR4 keine Beeinflussung durch die Gabe von Rapamycin.

SDF-1-PCR-STENOSE-Gruppe

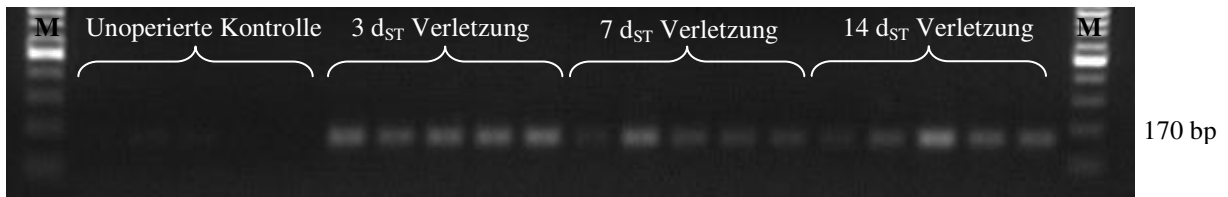


Abbildung 50: SDF-1-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

SDF-1-PCR-RAPAMYCIN-Gruppe

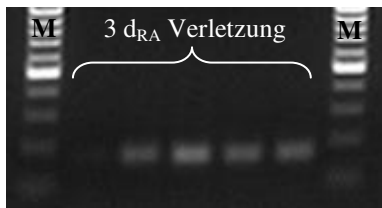


Abbildung 51: SDF-1-PCR Ergebnisse der RAPAMYCIN-Gruppe.
Ethidiumbromid-gefärbtes 2%iges Agarosegel. M= Marker.

SDF-1-Densitometrie der STENOSE-Gruppe und der RAPAMYCIN-Gruppe

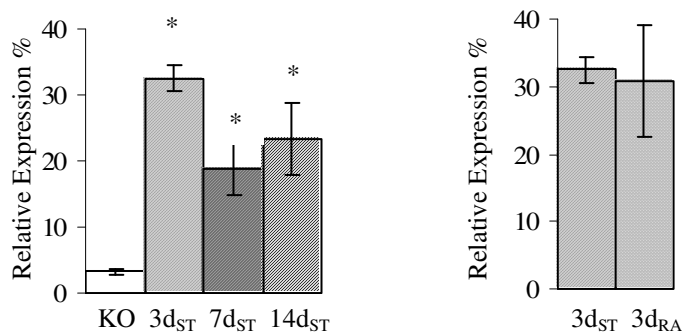


Abbildung 52: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der SDF-1-PCR der STENOSE-Gruppe und der 3 d_{ST}-Gruppe im Vergleich zur 3 d_{RA}-Gruppe (Tabelle 48). * = signifikant im Vergleich zur KONTROLL-Gruppe.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 48: SDF-1-PCR.

Gruppe	n	MW	SE	Sig.
KO	5	3,24	0,48	
3d _{ST}	5	32,47	1,98	3d _{ST} -KO
7d _{ST}	5	18,84	3,89	7d _{ST} -KO
14d _{ST}	5	23,41	5,40	14d _{ST} -KO
3d _{RA}	5	30,78	8,39	-

MW= arithmetisches Mittel, SE= Standardfehler
n= Anzahl der Proben je Gruppe, Sig.= Signifikanz.

3.4.6 Ergebnisse der Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen werden, der Genexpressionsanalyse entsprechend, je drei Gefäße der KONTROLL-Gruppe, der 3d_{ST}, 7d_{ST}, 14d_{ST} und 3d_{RA}, 7d_{RA}, 14d_{RA}-Gruppe verwendet.

3.4.6.1 CD31-Färbung

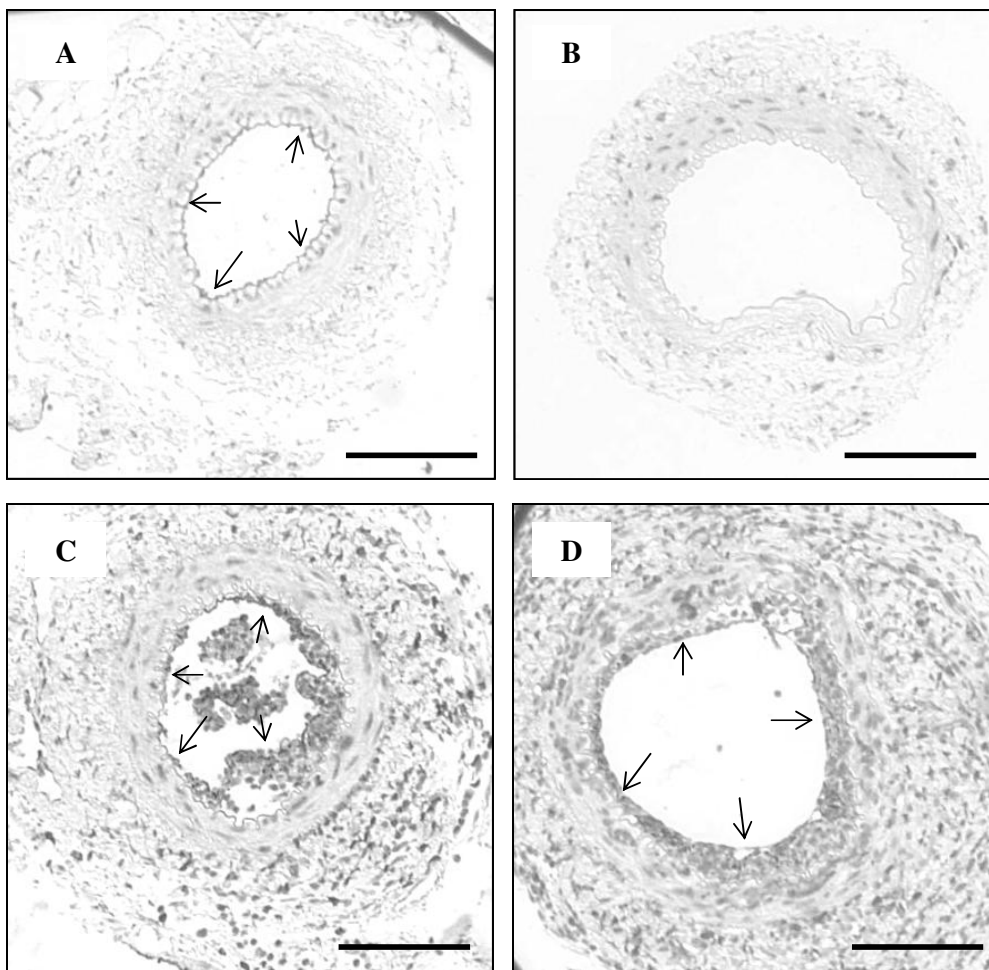


Abbildung 53: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CD31. Balken = 100 μ m
 A) unoperierte Kontrolle B) 3 Tage nach Operation C) 7 Tage nach Operation D) 14 Tage nach Operation.
 Braun: CD31-positive Zellen.

CD31 oder PECAM1 ist ein Teil der Immunglobulin (Ig) Superfamilie. Es wird auf zirkulierenden Plättchen, Monozyten, Neutrophilen und teilweise auf T-Zelluntergruppen gefunden. Außerdem ist es ein Hauptbestandteil der intrazellulären Verbindungen der Endothelzellen. In der unoperierten Kontrolle ist eine Auskleidung des Gefäßes mit Endothel zu erkennen. Durch die Operation kommt es zur Endotheldenudation, so dass 3 Tage nach Verletzung kein Endothel mehr vorhanden ist. Bereits 7 Tage nach dem Eingriff ist eine beginnende Reendothelialisierung zu beobachten.

3.4.6.2 CD3-Färbung

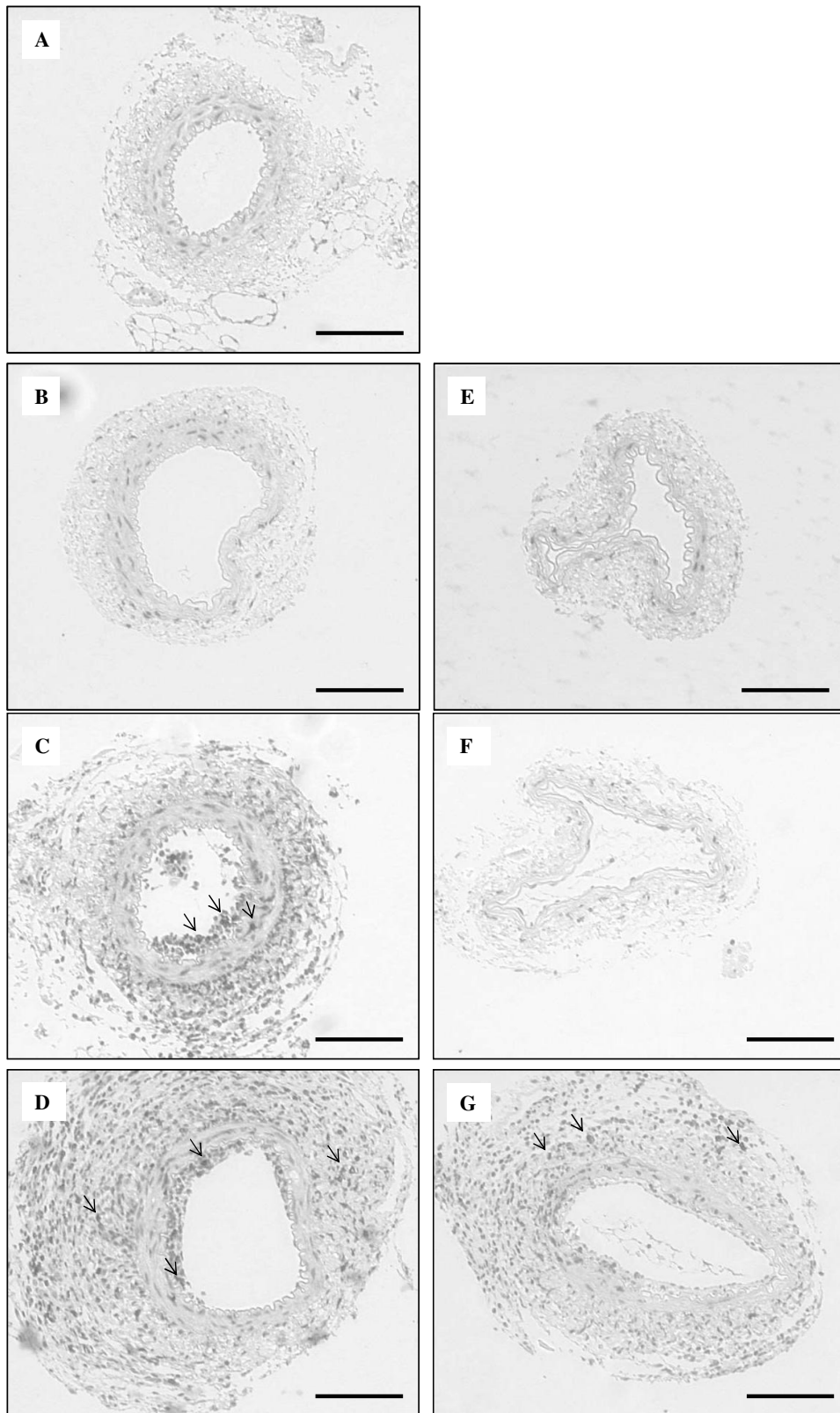


Abbildung 54: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CD3. Balken = 100 µm A) unoperierte Kontrolle B) 3 Tage nach Operation C) 7 Tage nach Operation D) 14 Tage nach Operation E) 3 Tage nach Operation plus Rapamycin F) 7 Tage nach Operation plus Rapamycin G) 14 Tage nach Operation plus Rapamycin. Braun: CD3-positive Zellen.

CD3 ist ein T-Zellantigenrezeptor. Die CD3-Färbung repräsentiert die Rekrutierung von T-Zellen. Wie zu erwarten, ist in der unoperierten Kontrolle keine Reaktion zu sehen. Auffallend ist, dass auch drei Tage nach der Verletzung noch keine T-Zellrekrutierung vorhanden ist. 7 und 14 Tage nach dem Eingriff ist eine deutliche Rekrutierung von T-Zellen zu erkennen, wobei nach 14 Tagen eine Ansammlung in der Adventitia beobachtet werden kann. In den Rapamycin-behandelten Gruppen 7 und 14 Tage nach der Verletzung ist eine deutlich geringere Rekrutierung von T-Zellen zu beobachten. Wie in der 3d_{ST}-Gruppe ist auch in der 3d_{RA}-Gruppe noch keine T-Zellansammlung festzustellen.

3.4.6.3 CD45-Färbung

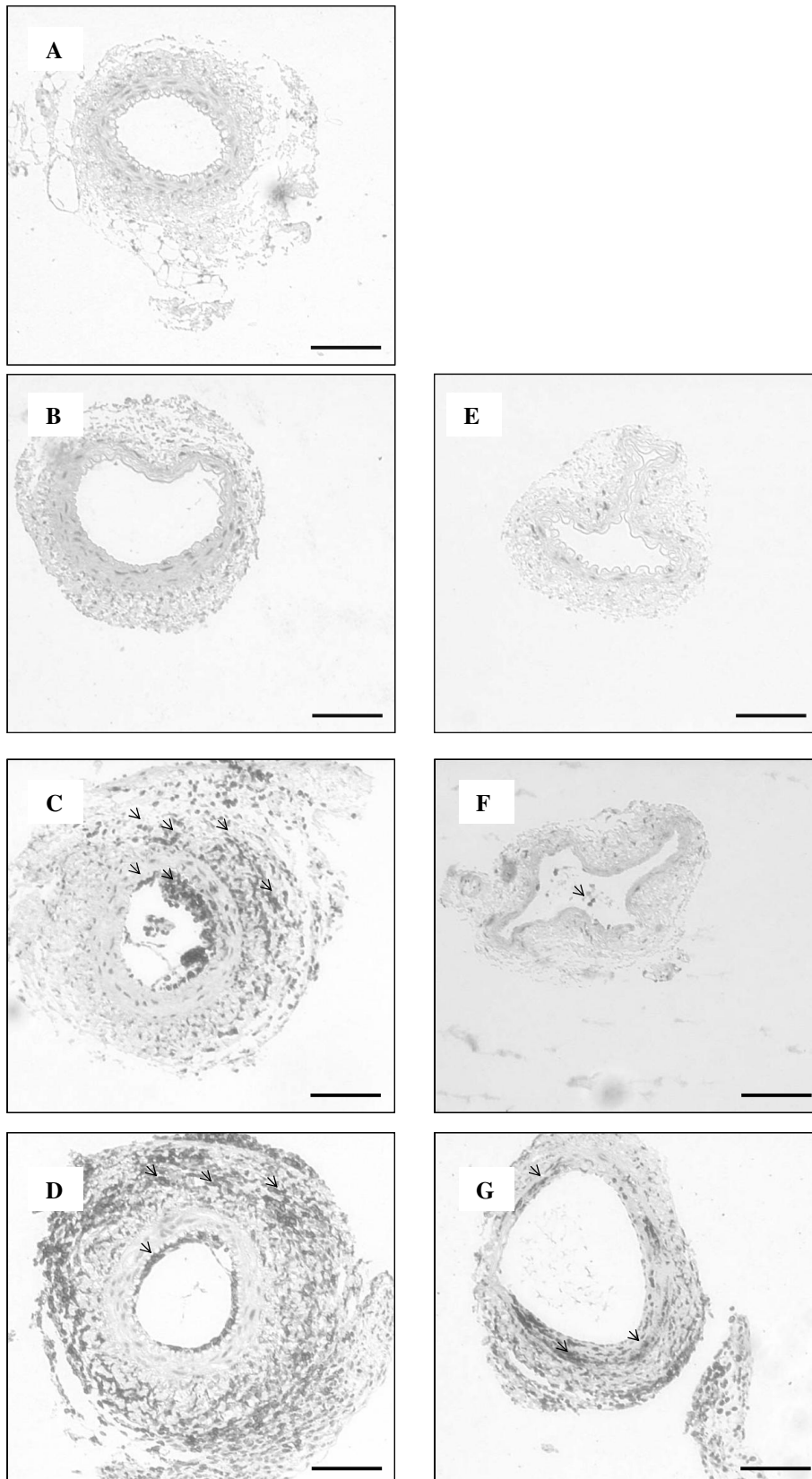


Abbildung 55: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CD45. Balken = 100 µm A) unoperierte Kontrolle B) 3 Tage nach Operation C) 7 Tage nach Operation D) 14 Tage nach Operation E) 3 Tage nach Operation plus Rapamycin F) 7 Tage nach Operation plus Rapamycin G) 14 Tage nach Operation plus Rapamycin. Braun: CD45-positive Zellen.

CD45 oder das leukocyte-common-antigen ist ein wichtiges Leukozytenoberflächenantigen. Es wird auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert, außer auf murenen roten Blutkörperchen und deren direkten Vorläufern. 3 Tage nach Verletzung ist, weder in der 3d_{ST}- noch in der 3d_{RA}-Gruppe, eine Rekrutierung von CD45-positiven Zellen zu beobachten. Nach 7 Tagen und besonders nach 14 Tagen kommt es zu einer massiven Ansammlung von CD45-positiven Zellen in der Neointima und in der Adventitia. Die Reaktion in der Adventitia ist nach 14 Tagen besonders stark. In den Rapamycin-behandelten-Gruppen ist nach 7 und 14 Tagen eine geringere Rekrutierung zu beobachten, wobei diese nach 7 Tagen noch ausgeprägter ist. Die unoperierte Kontrolle zeigt, wie für die Positivkontrolle zu erwarten ist, keine Reaktion.

3.4.6.4 CXCR3-Färbung

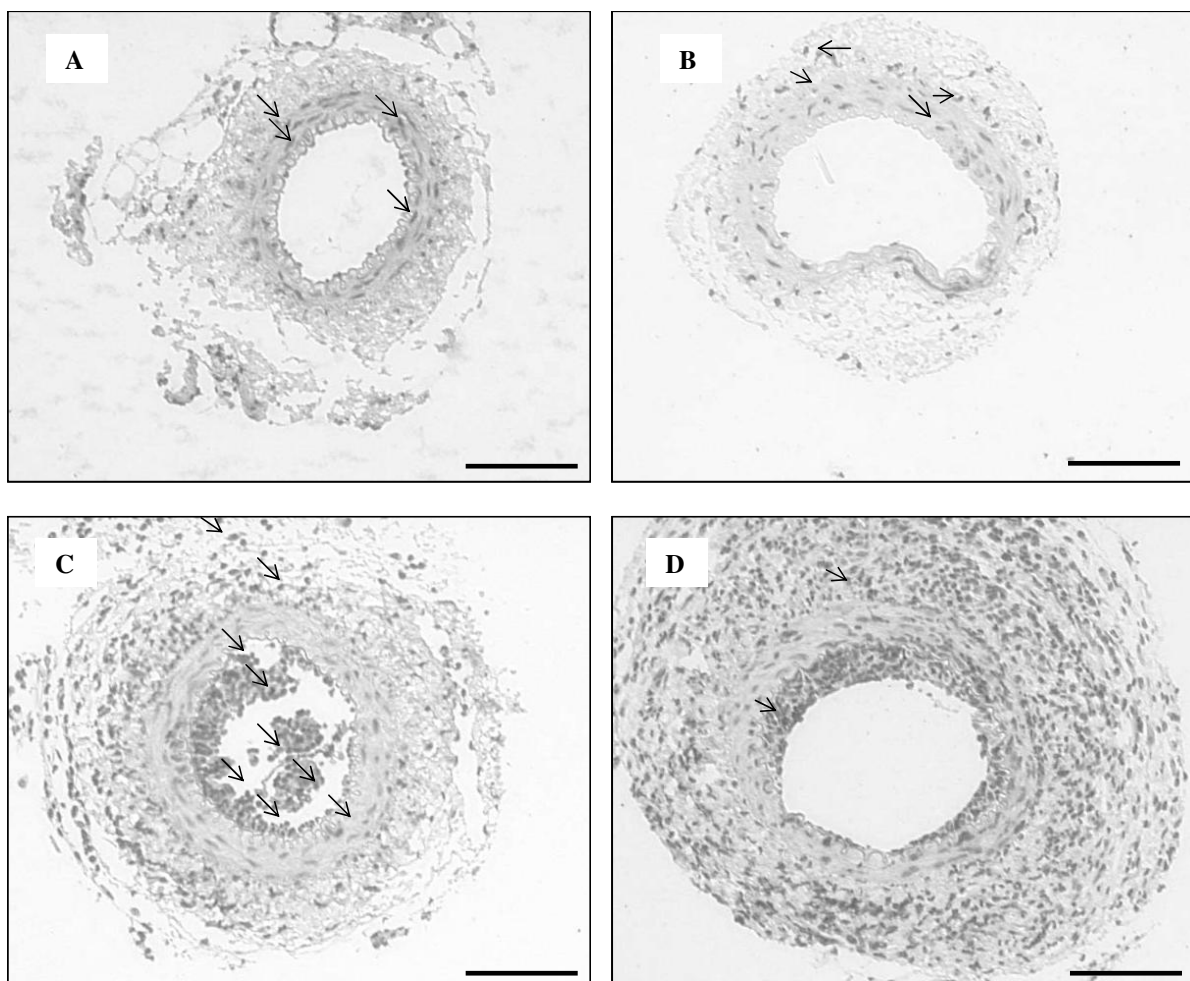


Abbildung 56: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CXCR3. Balken = 100 μ m A) unoperierte Kontrolle B) 3 Tage nach Operation C) 7 Tage nach Operation D) 14 Tage nach Operation. Braun: CXCR3-positive Zellen.

CXCR3 wird vorwiegend auf Memory- und aktivierten T-Zellen exprimiert, weiterhin wurde kürzlich eine Expression auf CD34-positiven Zellen nach Stimulation mit GM-CSF gezeigt. (JINQUAN et al. 2000). Die immunhistochemische Färbung zeigt in der KONTROLL-Gruppe CXCR3-positive Zellen überwiegend in der Media. In der 7d_{ST}-Gruppe ist eine verstärkte Ansammlung von CXCR3-positiven Zellen in der Neointima und auch der Adventitia zu beobachten.

Im Vergleich zur T-Lymphozyten spezifischen Färbung mit CD3 fällt auf, dass in der Neointima nach 7 Tagen sehr viel mehr Zellen positiv für CXCR3 sind als für CD3. Dies spricht dafür, dass ein Großteil der CXCR3-positiven Zellen nicht T-Lymphozyten, sondern Progenitorzellen entsprechen.

4 DISKUSSION

4.1 Das Versuchsmodell

4.1.1 Neointimahyperplasie nach intraluminarer Gefäßverletzung der Maus

Trotz der Anwendung neuer Methoden, wie Stenting, PTCA und Atherektomie, limitiert die Restenose den Langzeiterfolg perkutaner Interventionen.

Die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die die Gefäßantwort nach der Verletzung regulieren, ist ein wichtiges Anliegen, um geeignete Strategien zur Behandlung zu entwickeln. Die Möglichkeit des transgenen Tieres macht die Maus zu der geeignetsten Spezies zur Forschung auf molekularbiologischer Ebene (FUSTER et al. 1995).

Eine transluminale Verletzung mit einem Ballon in der Maus ist wegen der geringen Größe der Gefäße nicht möglich. Das Mausmodell von SATA et al. (2000) ähnelt der Ballon-Angioplastie und wurde entwickelt, um in genetisch modifizierten Mäusen die Post-Angioplastie-Restenose zu untersuchen. Das Einführen eines großen Drahtes führt zur Dehnung des Gefäßes und zeichnet sich durch eine reproduzierbare Bildung einer Neointimahyperplasie nach 28 Tagen aus (SATA et al. 2000). Im Gegensatz zu anderen Modellen bleibt nach der Verletzung, wie beim Menschen, der Blutfluss im Gefäß erhalten. Ein weiterer Vorteil ist, dass die A. femoralis durch ihre oberflächliche Lage leicht zugänglich ist. Die A. femoralis entspricht in ihrer morphologischen Struktur den Koronargefäßen des Menschen, beides sind Gefäße des muskulären Bautyps. Dagegen variiert die Dicke der Intima unter den verschiedenen Spezies. In kleineren Tieren ist der subendotheliale Raum zwischen dem Endothel und der Lamina elastica interna sehr eng und scheinbar azellulär (MULLER et al. 1992). Gefäße vom muskulären Bautyp zeichnen sich durch einen höheren Gehalt an glatten Muskelzellen aus und bilden mehr Neointima aus als elastische Gefäße (SCHWARTZ 1994). Man kann in diesem Modell im Vergleich zu Mausmodellen mit elastischen Gefäßen, wie der A. carotis, eine starke neointimale Proliferation beobachten. LINDNER et al. (1993) beschreiben in ihrem Karotisverletzungsmodell der Maus eine durchschnittliche intimale Fläche von $0,012 \pm 0,002 \text{ mm}^2$, während in dem angewandtem Modell von SATA et al. (2000) eine mittlere Fläche von $0,027 \pm 0,005 \text{ mm}^2$ gemessen werden kann. Dazu trägt auch der Grad der Verletzung bei. Wie bei der PTCA beobachtet man nach einer mechanischen Verletzung, wie hier in dem Drahtverletzungsmodell, eine Endotheldenudation und intimale Schädigung bzw. eine Endotheldenudation, Schädigung der Intima und der Media (IP et al. 1990). Der Grad der Verletzung korreliert mit dem Ausmaß

der neointimalen Hyperplasie. Die immunhistochemische Untersuchung auf CD31 zeigt eine völlige Endothelendotation 3 Tage nach der Drahtverletzung. Bereits nach 7 Tagen findet eine Reendothelialisierung statt.

Die erzeugte Neointima weist eine charakteristische Morphologie auf. Während man nach 7 Tagen eine sehr zellreiche, unstrukturierte Schicht mit vielen Entzündungszellen und sehr wenig Fasergehalt vorfindet, entwickelt sich bis 28 Tage nach der Verletzung eine kompakte, strukturierte und zellarme Neointima, die nur vereinzelt Entzündungszellen enthält und einen hohen Fasergehalt aufweist. Entsprechendes wurde bereits von NOBUYOSHI et al. (1991) beim Menschen beobachtet.

Der Nachteil dieses Modells ist wie bei den meisten Stenosemodellen, dass die beim Menschen zugrunde liegende atherosklerotische Erkrankung fehlt und die Verletzung im gesunden Gefäß induziert wird.

4.1.2 Ergebnisse der morphometrischen Analyse

4.1.2.1 Morphometrische Analyse der STENOSE-Gruppe

Durch das Einführen des Drahtes kommt es zu einer dauerhaften Dilatation des Gefäßes über den gesamten Untersuchungszeitraum. Gleichzeitig beobachtet man ein Dünner-werden der Media. Diese Beobachtungen werden von SATA et al. (2000) bestätigt.

In der STENOSE-Gruppe ist bereits mit 7 Tagen eine Neointimahyperplasie vorhanden, die bis 28 Tage nach dem Eingriff anwächst. Nach 28 Tagen kann man einen mittleren Lumenverlust von 61 % beobachten. Das Wachstum der neointimalen Hyperplasie ist nach drei bis vier Wochen abgeschlossen (SATA et al. 2000). Im Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen sieht man, dass nach 14 und 28 Tagen in den ersten 12 bis 14 Schnittebenen die größte Ausdehnung der Neointimahyperplasie vorhanden ist. Danach ist einerseits eine deutliche Abnahme der Neointimafläche zu beobachten und andererseits fällt auf, dass zwischen den Gruppen kein Unterschied mehr besteht. Es ist anzunehmen, dass durch die Lumenzunahme der A. femoralis aortenwärts, hier nur eine sehr geringe Verletzung gesetzt wird. Die Untersuchung des Neointimaverlaufes über die Strecke zeigt deutlich, dass die Stenose lediglich am Anfang der Verletzung gleichmäßig verläuft, weiter proximal aber abnimmt und einen einheitlichen Spiegel zwischen den Gruppen erreicht. Man sieht, dass eine genaue Charakterisierung der Stenose über das Gefäß wichtig ist, um einen repräsentativen Vergleich zu bekommen.

4.1.2.2 Morphometrische Analyse der RAPAMYCIN-Gruppe

Der Rapamycin-beschichtete Stent erwies sich als viel versprechende Therapie der neointimalen Hyperplasie nach PTCA bzw. Stentimplantation, er zeigt eine signifikante Reduzierung der Restenoserate beim Menschen (SOUSA et al. 2001, MORICE et al. 2002). Die immensen Kosten des Rapamycin-beschichteten Stents entfacht die Suche nach alternativen Möglichkeiten. Als eine der naheliegendsten wird die orale Gabe von Rapamycin nach PTCA oder Stentimplantation angesehen. Beim Kaninchen konnte die orale Gabe des Rapamycinanalogons Everolimus die Neointimabildung nach Stentimplantation hemmen (FARB et al. 2002b).

Die morphometrischen Daten zeigen eine signifikante Reduzierung der mittleren Neointimafläche und des mittleren Lumenverlustes nach der Gefäßverletzung durch die Applikation des Rapamycinanalogons Everolimus.

Betrachtet man den Verlauf der neointimalen Hyperplasie über die Gefäßlänge, fällt auf, dass sowohl nach 14 und 28 Tagen an der Schnittebene 12 bzw. 14 eine deutliche Änderung des Verlaufs stattfindet. Während am Anfang der Verletzung (Schnittebene 1 bis 11 bzw. 1 bis 13) noch ein deutlicher Unterschied zwischen den Neointimaflächen der STENOSE- und der RAPAMYCIN-Gruppe vorhanden ist, sind diese im hinteren Abschnitt der Verletzung annähernd gleich. Dieses Phänomen ist auch innerhalb der STENOSE-Gruppe zu beobachten. Durch eine stärkere Gefäßverletzung im vorderen Bereich des Gefäßes werden stärkere proliferative Reize gesetzt. Rapamycin, das auch in der Genexpression seine vorwiegende Wirkung auf proliferative Mechanismen zeigt, kann seine Wirkung in diesem Bereich stärker entfalten und die Neointimahyperplasie hemmen.

4.1.3 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Die Erfolgsrate der Genexpressionsanalyse liegt in den Gruppen zwischen 33 % und 67 %. Diese Ergebnisse konnten bereits in früheren Untersuchungen beobachtet werden. Der Grund dafür ist die hohe Instabilität der mRNA *ex vivo* gegenüber RNAsen. Eine rasche Entnahme und sofortige Überführung in flüssigen Stickstoff des Gewebes sind deshalb für die Analyse unerlässlich. Außerdem ist während der Extrahierung der mRNA auf eine strikte RNAsfreiheit der Reagenzien und Instrumente zu achten.

4.1.3.1 Mechanismen der Neointimahyperplasie auf Genexpressionsebene im Zeitverlauf

Unter den 298 differentiell regulierten Genen der STENOSE-Gruppe fand bei 76 % der Gene bereits eine Regulierung im Zeitraum zwischen 0 und 3 Tagen statt. Lediglich 24 % wurden erst später reguliert. Dies unterstreicht die in der Literatur vertretene Meinung, dass die Neointimabildung auf Effekten basiert, die unmittelbar nach der mechanischen Verletzung auftreten (UCHIMURA et al. 2004).

Die genauen molekularen Mechanismen, die zur Bildung der neointimalen Hyperplasie führen sind aber noch weitgehend unverstanden. Verschiedene Mechanismen werden postuliert an der Neointimabildung teilzuhaben: die Proliferation von glatten Muskelzellen und Synthese von extrazellulärer Matrix (CLOWES et al. 1983a), die inflammatorische Reaktion (FARB et al. 2002a) und, wie neuere Studien zeigten, auch eine Rekrutierung von Stammzellen an den Ort der Verletzung (SATA et al. 2002)

Das funktionelle Clustering ergibt 24,5 % der Gene, die im Zusammenhang mit der Proliferation stehen, 25,5 % verbunden mit Inflammation und 17,11 % die dem Bereich Zytoskelett, Zelladhäsion und extrazellulärer Matrix zuzusprechen sind. Das Ergebnis unterstreicht, dass die Inflammation neben der Proliferation eine entscheidende Rolle in der Neointimabildung einnimmt. Dies wird weiterhin durch die eigene immunhistochemische Untersuchung gezeigt. Es ist eine Ansammlung sowohl von CD3-positiven, als auch besonders von CD45-positiven Zellen 7 und 14 Tage nach der Verletzung zu beobachten. Im Unterschied zu einer Woche kann man nach zwei Wochen eine verstärkte Entzündungsreaktion im Bereich der Adventitia erkennen.

15 % der regulierten Gene sind bereits im Zusammenhang mit Neointima in der Literatur beschrieben.

Im Bereich der Inflammation bzw. Zelladhäsion beobachtet man in der eigenen Studie eine erhöhte Expression von Mac-1 (CD11b und CD18) und des small-inducible-cytokine-A7 (MCP3). Eine erhöhte Expression von Mac-1 (CD11b (integrinalphaM)/CD18), das verantwortlich für die feste Adhäsion von Leukozyten an Plättchen und Fibrinogen auf verletzter Gefäßoberfläche ist, korreliert mit dem Eintreten einer Restenose. Die Abwesenheit von Mac-1 reduziert die Leukozytenmigration in die Gefäßwand, was zu einer verminderten Leukozytenakkumulation und zu einer deutlich verringerten Neointimabildung führt (SIMON et al. 2000).

DISKUSSION

Auch MCP3 wird eine Rolle in der Pathogenese der Restenose zugesprochen. MCP3 erfährt eine Hochregulierung der Expression nach Ballonangioplastie in der Ratte (WANG et al. 2000).

Der Prozess der Restenose weist Parallelen zur Bildung atherosklerotischer Läsionen auf. Vielen Genen, die eine wichtige Rolle in der Atherosklerose spielen, konnte auch eine Funktion während dem Prozess der Restenose zugesprochen werden.

Dem Oberflächenrezeptor CD40, der vorwiegend auf B-Zellen aber auch auf Monozyten, Endothelzellen, Epithelzellen und dendritischen Zellen exprimiert wird, wird eine Rolle in atherosklerotischen Läsionen zugeschrieben. Eine Behandlung mit einem Antikörper gegen den CD40-Liganden konnte in Mäusen die Atherosklerose und den Gehalt an inflammatorischen Zellen in der Plaque verringern (MACH et al. 1998). Später wurde eine Expression von CD40 in humaner Neointima gefunden (ZOHLNHÖFER et al. 2001b). Auch von Follistatin wurde in atherosklerotischen Läsionen eine Expression gefunden (KOZAKI und OUCHI 1998). Sowohl CD40, als auch Follistatin werden nach intraarterieller Gefäßverletzung reguliert, was für eine Bedeutung im Prozess der Restenose spricht.

Im Bereich der Proliferation sieht man in der vorliegenden Arbeit eine Hochregulierung des Transkriptionsfaktors fos-like-antigen-1 und des Wachstumsfaktors insulin-like-growth-factor-1.

Eine Expression des immediate-early Gens fos-like-antigen-1 nach Ballon-Angioplastie bei der Ratte wurde von MIANO et al. (1993) beschrieben. Die Expressionskinetik von fos-like-antigen-1 *in vivo* entspricht der in Zellkultur nach einer Proliferationsstimulation. Dies legt nahe, dass *in vivo* eine Genaktivierung der glatten Muskelzellen über permeierende Wachstumsfaktoren aus dem Blut oder einer intravaskulären Freisetzung stattfindet (MIANO et al. 1993). Die Beobachtungen im vorliegenden Modell unterstützen diese Hypothese, 3 Tage nach Verletzung kann man eine deutlich erhöhte Expression des fos-like antigen-1-Gens beobachten, die abgeschwächt bis zum Ende anhält.

Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) stimuliert die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen. Eine Überexpression von IGF-1 in glatten Muskelzellen in der Maus führte zu einer verstärkten Neointimaformation durch eine erhöhte Proliferation und Migration nach intraarterieller Verletzung (ZHU et al. 2001).

Außerdem wurde *in vitro* gezeigt, dass aktivierte Plättchen die Proliferation glatter Muskelzellen unter anderem via dem platelet-activating-factor (PAF) fördern (CIRILLO et al. 1999). Wir können eine erhöhte Expression von PAF über den gesamten

Untersuchungszeitraum beobachten. Eine weitere wichtige Rolle für die Proliferation der glatten Muskelzellen könnte das Zytokin Oncostatin-M spielen. Oncostatin-M fördert *in vitro* die Fibrinogen Biosynthese und die Proliferation glatter Muskelzellen (TSAKIRIS et al. 2000). Oncostatin-M wird 7 Tage nach Verletzung hochreguliert.

Im Bereich der extrazellulären Matrix beobachtet man in der vorliegenden Studie eine Regulierung von MMP11, MMP14 und MMP9. Die Sekretion von Matrix Metalloproteinasen aus Makrophagen ist ein Schlüsselereignis im Prozess der Neointimabildung. MMPs haben Einfluss auf das physiologische und pathologische Remodeling. Eine Defizienz von MMP9 reduzierte die intimale Hyperplasie, den späten Lumenverlust und eliminierte die Korrelation zwischen der intimalen Hyperplasie und dem geometrischen Remodeling. Außerdem führte es zu einer signifikanten Akkumulation von interstitiellem Kollagen. *In vitro* Studien zeigten, dass MMP9 nicht nur zur Degradation, sondern auch zur Reorganisation der kollagenen Matrix beitragen (GALIS et al. 2002). ZOHLNHÖFER et al. (2001b) konnten schon eine erhöhte Expression von MMP9 in der humanen Neointima der In-Stent-Restenose zeigen.

GODYNA et al. (1996) stellten *in vitro* dar, dass Fibulin-1, eine Komponente der extrazellulären Matrix, die Plättchenadhäsion via Fibrinogen unterstützt und folgerten, dass es nach Gefäßverletzung die Plättchenadhäsion vorantreibt und zur Thrombusbildung führt. In der vorliegenden Studie sieht man eine deutlich erhöhte Expression von Fibulin-1 drei Tage nach Gefäßverletzung, was seine Funktion in der Plättchenadhäsion stützt und seine Rolle in der Neointimabildung belegt (GODYNA et al. 1996).

In der eigenen Studie fand man eine Hochregulierung von Zellen, die zur Rekrutierung von Stammzellen beitragen, wie CXCR4, SDF-1, CXCR3, IP10, MIG, MMP9 und c-kit.

Hämatopoetische Stammzellen und andere Stammzellen, wie kardiale, endotheliale und epitheliale Zellen, exprimieren c-kit, den Rezeptor für den stem-cell-factor (SCF), was darauf schließen lässt, dass eine gemeinsame Kaskade ihre Proliferation und Rekrutierung steuert. In Knochenmarkszellen führt die Expression von MMP9 zur Freisetzung von SCF. Knochenmarksablation induziert SDF-1, was die Expression von MMP9 erhöht und zur Freisetzung von SCF und zur Rekrutierung von c-kit-positiven Stammzellen führt (HEISSIG et al. 2002).

Es wurde gezeigt, dass SDF-1, der Ligand von CXCR4, durch eine Regulierung des neointimalen glatten Muskelzelleingehaltes eine wichtige Rolle bei der Neointimaformation nach Gefäßverletzung spielt. Dazu scheint die Rekrutierung von zirkulierenden glatten Muskelzell-Progenitorzellen durch SDF-1 beizutragen (SCHOBBER et al. 2003).

Außerdem spielt SDF-1 eine Rolle in der Mobilisierung und Rekrutierung von zirkulierenden CXCR4-exprimierenden Progenitorzellen durch Chemotaxis, Adhäsion und Aggregation. CXCR4 zeigt auf CD34-positiven Zellen eine konstante Expression. Der Chemokinrezeptor CXCR3 dagegen, der vorwiegend auf Memory- und aktivierten T-Zellen exprimiert wird, zeigt auf CD34-positiven Zellen nur eine Expression nach Stimulation mit GM-CSF. Auch seine Liganden IP10 und MIG induzieren nur eine Adhäsion und Aggregation nach einer Stimulation mit GM-CSF im Gegensatz zu SDF-1alpha. CXCR3/IP10 und CXCR3/MIG scheinen wichtig für physiologische und pathophysiologische Ereignisse der Differenzierung von CD34-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen zu sein. Diese Prozesse schließen die Transmigration, Relokalisation, Differenzierung und Reifung von CD34-positiven hämatopoetischen Progenitorzellen ein (JINQUAN et al. 2000).

Es scheint, dass CXCR4 exprimierende CD34-positive Progenitorzellen durch SDF1-alpha in der frühen Phase nach der Verletzung angezogen werden. Nach der Adhäsion über SDF1/CXCR4 könnten CXCR3/IP10 und CXCR3/MIG eine Rolle in der weiteren Differenzierung der CD34+ Vorläuferzellen spielen.

Ein weiterer Punkt der diese These stützt ist, dass auch auf immunhistochemischer Ebene eine deutliche Ansammlung von CXCR3-positiven Zellen 7 Tage nach der Gefäßverletzung in der Neointima und der Adventitia zu sehen ist. Im Vergleich zur T-Lymphozytenfärbung mit CD3 finden sich in der Neointima mehr CXCR3-positive wie CD3-positive Zellen. Dies spricht dafür, dass ein Großteil der CXCR3-positiven Zellen in der Neointima Progenitorzellen entsprechen.

Die Untersuchung von bereits beschriebenen Genen zeigt, dass das Femoralisverletzungsmodell der Maus sich sehr gut zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Neointimabildung eignet. Viele für die Neointimabildung wichtige Gene konnten verifiziert werden. Andere Gene fügen sich in die mannigfaltigen Prozesse während der Neointimabildung ein. Die Entdeckung neuer, interessanter Gene schafft neue Ansätze, um den Komplex der pathophysiologischen Vorgänge während der Restenose Schritt für Schritt verstehen zu können.

4.1.3.2 Einfluss von Rapamycin auf die Neointimahyperplasie auf Genexpressionsebene

Die Untersuchung des Einflusses von Rapamycin auf die Neointimabildung erfolgt 3 Tage nach Verletzung. Sowohl der Erfolg des Rapamycin-beschichteten Stents (SOUSA et al.

DISKUSSION

2001, MORICE et al. 2002), als auch andere Versuche in der Literatur zeigen, dass die Inhibierung der Neointimahyperplasie auf Effekten basiert, die unmittelbar nach der mechanischen Verletzung auftreten (UCHIMURA et al. 2004). Dies zeigt auch, wie bereits oben erwähnt, die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Neointimabildung auf Genexpressionsebene im Zeitverlauf, bei 76 % der regulierten Gene fand eine frühe Regulierung statt.

Auffällig ist, dass unter den 66 differentiell regulierten Genen 41 % ihre Funktion im Bereich der Proliferation haben, lediglich 15 % mit der inflammatorischen Antwort und 9 % mit der Zelladhäsion, dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix im Zusammenhang stehen. Es zeigt sich, dass der Schwerpunkt der Wirkung des Rapamycin auf den proliferativen Mechanismen basiert, was auch durch die Ergebnisse der Morphometrie belegt wird.

Man beobachtet die Regulierung vieler, den Zellzyklus-regulierender Gene, wie z.B. p21. P21 ist ein zyklinabhängiger Kinaseinhibitor (cdkI), der durch die Regulation der Zyklin-abhängigen Kinasen (cdk) an der Regulation des Zellzyklus teilnimmt. In der STENOSE-Gruppe sieht man eine Hochregulierung von p21 nach drei Tagen. Eine Hochregulierung von p21 konnte schon von BRAUN-DULLAEUS et al. (2003) in der Restenose gezeigt werden. Rapamycin hemmt den Zellzyklus in der mittleren G₁-Phase (TERADA et al. 1993). Neben der inhibitorischen Aktivität gegenüber cdk, wurde eine Rolle von p21 in der Formation, Stabilisierung und nukleären Translokation des Cyclin D1/cdk4 Komplexes gefunden. Es wurde gezeigt, dass Rapamycin den p21 Level in transformierten Maus-Fibroblasten senkt. Dies lässt vermuten, dass Rapamycin durch die Inhibierung der Expression von p21 den Auslöser der cdk Kaskade hemmt (GABEN et al. 2004). In der eigenen Arbeit kann man eine Herunterregulierung von p21 drei Tage nach Verletzung durch Rapamycin beobachten. Das spricht dafür, dass die Wirkung von Rapamycin auf die Neointimaformation über eine Hemmung des Auslösers der cdk Kaskade abläuft (GABEN et al. 2004). Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass neben p21 noch eine Herunterregulierung von p57, einem weiteren zyklinabhängigen Kinaseinhibitor (cdkI) vorliegt.

Einen weiteren Einfluss auf den Zellzyklus übt Rapamycin über die Regulation von sogenannten Minichromosome-maintenance-Proteine (MCM) aus. Man findet in der vorliegenden Studie die Expression von MCM2 und MCM5 durch Rapamycin nach 3 Tagen herunterreguliert. MCM2 spielt eine wichtige Rolle beim Einsatz der DNA Replikation und der Zellteilung. Minichromosome maintenance Proteine werden von E2F reguliert. MCM2 und MCM5 bilden einen Komplex. Frühere Studien zeigen eine Herunterregulierung der Expression von MCM6 und MCM7 in glatten Muskelzellen (BRUEMMER et al. 2003) durch

Rapamycin. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die MCM eine wichtige Rolle in den proliferativen Prozessen der Restenose bilden und einen Angriffspunkt für die antiproliferative Wirkung des Rapamycin darstellen.

Außerdem sieht man in der vorliegenden Arbeit noch eine Herunterregulierung von activating-transcription-factor-3 (ATF3) durch Rapamycin. ATF3 ist ein Mitglied der CREB-Familie. Es wird durch Stress und Wachstumsfaktoren in Säugerzellen induziert. Man glaubt, dass ATF3 eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System spielt (INOUE et al. 2004). Ein Einfluss von Rapamycin auf CREM τ , einem weiteren Transkriptionsfaktor der cAMP-response-element-binding-Familie (CREB/ATF) wurde bereits gezeigt, wodurch es zu einer Hemmung der Transkription von sog. „late genes“ kam (FEUERSTEIN et al. 1995, FEUERSTEIN et al. 1996, JAVIER et al. 1997, SEHGAL 2003).

Neben der antiproliferativen Wirkung bzw. der Hemmung des Zellzyklus scheint die Hemmung inflammatorischer Reaktionen einen geringeren, aber nicht unerheblichen Einfluss zu spielen. Dies wird auch durch die Ergebnisse der Immunhistochemie deutlich. Es kommt zu einer reduzierten Rekrutierung CD3-positiver und CD45-positiver Zellen 7 und 14 Tage nach Gefäßverletzung.

Interessanterweise findet sich unter den regulierten Genen auch CXCR4, das neben seiner Funktion als Chemokinrezeptor auch für die Rekrutierung von Stammzellen von Bedeutung ist. Es weist darauf hin, dass Rapamycin neben seinen antiproliferativen, antiinflammatorischen Eigenschaften außerdem die Stammzellrekrutierung hemmt.

4.1.3.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Studie zeigt, dass das Femoralisverletzungsmodell sich sehr gut als Restenosemodell eignet. Sowohl die morphologische, als auch immunhistochemische Untersuchungen weisen Parallelen zu den beim Menschen nach PTCA bzw. Stentimplantation ablaufenden Mechanismen auf. Weiterhin fand sich in der Genexpressionsanalyse eine Vielzahl von Genen, deren Regulation in der Neointima bereits beim Menschen beschrieben wurde.

Die in der Literatur beschriebene Hemmung der Neointimahyperplasie durch Rapamycin wird bestätigt. Die Genexpressionsanalyse der Neointimabildung im Zeitverlauf und unter dem Einfluss von Rapamycin, deckt einige sehr interessante Gene auf. Vor allem auf die Regulierung der Stammzell-assoziierten Gene CXCR4, SDF1, CXCR3, IP10 und MIG sollte in weiterführenden Untersuchungen ein Augenmerk gelegt werden, da der Einfluss der Stammzellrekrutierung auf die Neointimabildung in der Literatur noch kontrovers diskutiert

wird. Die Tatsache, dass auch Rapamycin eine Herunterregulierung von CXCR4 bewirkt, macht die Thematik der Stammzellrekrutierung bzw. deren Inhibition zu einem wichtigen Punkt im Bereich der Therapieforschung der Restenose. Weiterhin wird durch die Studie belegt, dass zur Verhinderung der neointimalen Hyperplasie nicht die Hemmung eines Moleküls bzw. Signalweges ausreicht, sondern dass ein enges Zusammenspiel verschiedenster Mechanismen vorherrscht. Dadurch lässt sich auch die einzigartige Wirkung des Rapamycin erklären. Wie auch diese Studie zeigt, wirkt Rapamycin nicht nur auf ein bestimmtes Molekül, sondern der Effekt des Rapamycin entsteht aus einem Zusammenwirken seiner antiproliferativen, antiinflammatorischen und wahrscheinlich auch durch einen Effekt auf die Rekrutierung hämatopoietischen Stammzellen. Trotzdem zeigt unsere Untersuchung auch, dass der Schwerpunkt der Wirkung des Rapamycin auf der Proliferationshemmung und speziell der Inhibierung des Zellzyklus liegt.

Für weitere Therapieansätze zur Reduzierung der Restenose muss ein Augenmerk auf Substanzen gelegt werden, die nicht nur auf ein Zielmolekül wirken. Als ein weiterer interessanter Therapieansatz sollte die Rolle der Stammzellrekrutierung näher untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Restenose stellt eines der schwerwiegendsten Probleme der interventionellen Kardiologie dar. Neben den bekannten Mechanismen der Proliferation von glatten Muskelzellen, der Produktion von extrazellulärer Matrix und der Inflammation wird in neueren Studien eine Beteiligung von hämatopoetischen Stammzellen an der Bildung der Neointimahyperplasie diskutiert. Das Makrolidantibiotikum Rapamycin hemmt die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und weist immunsuppressive Eigenschaften auf. Der Rapamycin-beschichtete Stent konnte die In-Stent-Restenose im Menschen signifikant reduzieren.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, auf Genexpressionsebene die molekularen Mechanismen, die zur Neointimabildung führen im Zeitverlauf und unter dem Einfluss des Rapamycinanalogons Everolimus zu untersuchen. Die neointimale Hyperplasie wird durch eine intraarterielle Gefäßverletzung in der Maus erzeugt.

In der Genexpressionsanalyse werden einerseits die KONTROLL-Gruppe und verletzte Gefäße nach 3, 7 und 14 Tagen untersucht. Andererseits, wird entsprechend den Erfahrungen früherer Studien, ein Vergleich der Genexpression zwischen der STENOSE-Gruppe und der RAPAMYCIN-Gruppe zu einem frühen Zeitpunkt (nach 3 Tagen) nach der Gefäßverletzung vorgenommen. Weiterhin erfolgt nach 7, 14 und 28 Tagen eine morphometrische Analyse. Die Daten der Genexpressionsanalyse werden im Anschluss durch genspezifische PCRs verifiziert. Über immunhistochemische Untersuchungen werden verschiedene nach der Verletzung induzierte Mechanismen auf Proteinebene aufgezeigt.

Die morphometrischen Daten zeigen eine deutliche Neointimabildung 28 Tage nach Gefäßverletzung. Im Zeitverlauf lässt sich eine kontinuierliche Zunahme der neointimalen Hyperplasie erkennen. Das Rapamycin reduziert die Neointimabildung signifikant.

In der Genexpressionsanalyse zeigt sich im Zeitverlauf der STENOSE-Gruppe bei einem Großteil der Gene eine Hochregulierung. Während der Neointimabildung kommt es zur Induktion einer großen Anzahl an Genen, die einerseits mit dem Prozess der Inflammation und andererseits mit dem Prozess der Proliferation assoziiert sind. Die inflammatorische Reaktion lässt sich auch in der immunhistochemischen Untersuchung mit CD3 und CD45 zeigen. Interessanterweise findet sich auch eine Regulierung von Genen, die mit der Stammzellregulierung in Zusammenhang stehen.

Bei dem Vergleich des Genexpressionsmusters drei Tage nach Verletzung mit und ohne Applikation von Rapamycin findet man hauptsächlich eine Regulierung von Proliferations-assoziierten Genen. Die überwiegende Zahl der durch Rapamycin beeinflussten Gene ist herunterreguliert.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Studie zeigt, dass im Prozess der Neointimabildung die Inflammation und die Proliferation im Mittelpunkt stehen. Eine Beteiligung von hämatopoetischen Vorläuferzellen wird bekräftigt. Für die Wirkung des Rapamycin scheint die Hemmung der proliferativen Antwort am wichtigsten zu sein. Neben seiner antiproliferativen und antiinflammatorischen Wirkung scheint Rapamycin auch über eine verminderte Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zu wirken.

Diese Arbeit identifiziert Gene, die eine wichtige Rolle in den Prozessen der Proliferation, der Inflammation und der Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen während der Neointimaformation besitzen, wie CXCR3, IP-10, MIG, p21, MCM2. Diese sollen als Forschungsgrundlage für weitere Therapieansätze zur Inhibierung der Neointimahyperplasie dienen.

6 SUMMARY

Molecular mechanisms of neointimal hyperplasia in a mouse model of vascular injury: a study of the time course and the influence of the Rapamycin analogon Everolimus

Restenosis is a major problem in interventional cardiology. Besides known mechanisms, which cause neointima hyperplasia, such as proliferation of vascular smooth muscle cells, production of extracellular matrix and inflammation, recent studies could demonstrate the participation of the recruitment of vascular progenitor cells in neointima formation. The macrolide antibiotic rapamycin inhibits proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and has immunosuppressive properties. Rapamycin-coated stents significantly reduce in-stent restenosis in human patients.

The aim of the present work is to examine molecular mechanisms of neointima formation in a time course study. In addition, the influence of rapamycin in a mouse model of vascular injury is evaluated.

Gene expression analysis is performed in the control group and 3, 7 and 14 days after having induced injury. Furthermore, 3 days after injury gene expression patterns of a rapamycin-treated group and a non-treated group is compared. Injured arteries are evaluated morphometrically after 7, 14 and 28 days. Gene specific PCRs are performed to verify the results of gene expression analysis. In addition immunohistochemistry is performed to observe gene expression alterations on a protein level.

Morphometric analysis shows a continuous neointimal growth over time and a marked neointima formation 28 days after injury. Rapamycin significantly reduces neointima formation.

Gene expression analysis demonstrates an up-regulation of a great amount of genes within the determined time frame. The type of genes induced during neointima hyperplasia is primarily associated with inflammation and proliferation. The inflammatory response can also be proved in immunohistochemical analysis with CD3 and CD45. Interestingly, alterations in gene expression which is associated with the recruitment of hemopoietic progenitor cells can also be observed.

A comparison of the gene expression patterns 3 days after injury between rapamycin-treated animals and non-treated animals demonstrates that gene expression changes occur

SUMMARY

predominantly in genes, which are associated with proliferation. While some genes undergo up-regulation most of them are downregulated during treatment with rapamycin.

The present work shows, that the processes of inflammation and proliferation in the formation of neointima hyperplasia are in the centre of attention. In addition the role of the recruitment of hemopoietic progenitor cells can be confirmed. Present data leads to the conclusion that the principle mechanism of rapamycin is the inhibition of proliferation. It further indicates that the effect of rapamycin is not only based on it's antiproliferative and anti-inflammatory properties but also on its inhibitory effect on the recruitment of hemopoietic progenitor cells.

This study identifies genes that play a pivotal role in the processes of proliferation, inflammation and the recruitment of hematopoetic progenitor cells during neointima formation, such as CXCR3, IP10, MIG, p21 und MCM2. These genes should be subject of further investigation to prevent restenosis.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AKSELBAND Y, HARDING MW, NELSON PA (1991)

Rapamycin inhibits spontaneous and fibroblast growth factor β -stimulated proliferation of endothelial cells and fibroblasts.

Transplant Proc 23, 2833-2836

AL SUWAIDI J, BERGER PB, HOLMES DR (2000)

Coronary artery stents.

J Am Coll Cardiol 28, 1828-1836

ALMOND PS, MOSS A, NAKHLEH RE, MELIN M, CHEN S, SALAZAR A, SHIRABE K, MATAS AJ (1993)

Rapamycin: immunosuppression, hyporesponsiveness, and side effects in a porcine renal allograft model.

Transplantation 56, 275-281

AMENTO EP, EHSANI N, PALMER H, LIBBY P (1991)

Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.

Arterioscler Thromb 11, 1223-1230

AMERICAN HEART ASSOCIATION (2004)

Heart disease and stroke statistics 2004 Update

AUSTIN GE, RATLIFF NB, HOLLMANN J, Tabei S, PHILLIPS DF (1985)

Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty.

J Am Coll Cardiol 6, 369-375

BAIM DS, GROSSMAN W (1998)

Coronary angioplasty and other therapeutic applications of cardiac catheterization.

In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL: Harrison's Principles of Internal Medicine. 14. Auflage, McGraw-Hill, New York, 1365-1380

BENNETT MR, O'SULLIVAN M (2001)

Mechanisms of angioplasty and restenosis: implications for design of rational therapy.

Pharmacol Therap 91, 149-166

BERETTA L, GINGRAS A-C, SVITKIN YV, HALL MN, SONENBERG N (1996)

Rapamycin blocks the Phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation.

EMBO J 15, 658-664

BIERER BE, SOMERS PK, WANDLESS TJ, BURAKOFF SJ, SCHREIBER SL (1990)

Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand.

Science 250, 556-559

LITERATURVERZEICHNIS

BÖHLER T, WAISER J, BUDDE K, LICHTER S, JAUHO A, FRITSCH L, KORN A, NEUMAYER H-H (1998)

The in vivo effect of Rapamycin derivative SDZ RAD on lymphocyte proliferation.
Transplant Proc 30, 2195-2197

BRAUN-DULLAEUS RC, MANN MJ, DZAU VJ (1998)

Cell cycle progression: new therapeutic target for vascular proliferative disease.
Circulation 98, 82-89

BRAUN-DULLAEUS RC, ZIEGLER A, BOHLE RM, BAUER E, HEIN S, TILLMANN H, HABERBOSCH W (2003)

Quantification of the cell-cycle inhibitors p27^{KIP1} and p21^{CIP1} in human atherectomy specimens: primary stenosis versus restenosis.
J Lab Clin Med 141, 179-189

BRENNER C, NAKAYAMA N, GOEBL M, TANAKA K, TOH-E A, MATSUMOTO K (1988)

Cdc 33 encodes mRNA cap-binding protein eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae*.
Mol Cell Biol 8, 3556-3559

BROWN EJ, ALBERS MW, SHIN TB, ICHIKAWA K, KEITH CT, LANE WS, SCHREIBER SL (1994)

A mammalian protein targeted by G1-arresting Rapamycin-receptor complex.
Nature 369, 756 -758

BRUEMMER D, YIN F, LIU J, KIYONO T, FLECK E, VAN HERLE AJ, LAW RE (2003)

Expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells is ERK/MAPK dependent.
Exp Cell Res 290, 28-37

BRUNN GJ, HUDSON CC, SEKULIC A, WILLIAMS JM, HOSOI H, HOUGHTON PJ, LAWRENCE JC JR, ABRAHAM RT (1997)

Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of Rapamycin.
Science 277, 99-101

BÜTTMANN BD, KIRK CJ, ROESSNER A, SCHNEIDER J (2001)

Herz.

In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg.). Pathologie. 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag München-Jena, 449-455

CALIFF RM (1995)

Restenosis: the cost to society.
Am Heart J 130, 680-684

CARMELIET P, MOONS L, COLLEN D (1998)

Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis.
Cardiovasc Res 39, 8-33

LITERATURVERZEICHNIS

CARTER AJ, SCOTT D, RAHDERT D, BAILEY L, DE VRIES J, AYERDI K, TURNLUND T, JONES R, VIRMANI R, FISHELL TA (1999)

Stent design favorably influences the vascular response in normal porcine coronary arteries.
J Invasive Cardiol 11, 127-134

CHARREAU B, GORET F, POURCEL C, SOULILLOU JP

Association of glucocorticoids and cyclosporin A or rapamycin prevents E-selectin and IL-8 expression during LPS- and TNFalpha-mediated endothelial cell activation.
Transplantation 69, 945-953

CHESEBRO JH, LAM JYT, BADIMON L, FUSTER V (1987)

Restenosis after arterial angioplasty: a hemorrheologic response to injury.
Am J Cardiol 60, 10B-16B

CIRILLO P, GOLINO P, RAGNI M, BATTAGLIA C, PACIFICO F, FORMISANO S, BUONO C, CONDRELLI M, CHIAIELLO M (1999)

Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors.
Cardiovasc Res 43, 210-218

CLOWES AW, CLOWES MM (1986)

Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. IV. Heparin inhibits rat smooth muscle mitogenesis and migration.
Circ Res 58, 839-845

CLOWES AW, CLOWES MM, FINGERLE J, REIDY MA (1989)

Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery.
J Cardiovasc Pharmacol 14, Suppl 6, 12-15

CLOWES AW, REIDY MA, CLOWES MM (1983a)

Mechanisms of stenosis after arterial injury.
Lab Invest 49, 208-215

CLOWES AW, REIDY MA, CLOWES MM (1983b)

Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium.
Lab Invest 49, 327-333

COLLIER DSJ, CALNE R, POLLARD SG, FRIEND PJ, THIRU S (1991)

Rapamycin in experimental renal allografts in primates.
Transplant Proc 23, 2246-2247

COLLIER DSJ, CALNE RY, THIRU S, LIM S, POLLARD SG, BARRON P, DA COSTA M, WHITE DJG (1990)

Rapamycin in experimental renal allografts in dogs and pigs.
Transplant Proc 22, 1674-1675

CORDON-CARDO C (1995)

Mutation of cell cycle regulators: biological and clinical implications for human neoplasia.
Am J Pathol 147, 545-560

LITERATURVERZEICHNIS

- CROWE A, BRUELISAUER A, DUERR L, GUNTZ P, LEMAIR M (1999)
Absorption and intestinal metabolism of SDZ-RAD and Rapamycin in rats.
Drug Metab Dispos 27, 627-632
- DANGAS G, KUEPPER F (2002)
Restenosis: repeat narrowing of a coronary artery.
Circulation 105, 2586-2587
- DAVIES MG, HAGEN PO (1993)
The vascular endothelium: a new horizon.
Ann Surg 218, 593-609
- DE BENEDETTI A, JOSHI-BARVE S, RINKER-SCHAEFER C, RHOADS RE (1991)
Expression of antisense RNA against initiation factor eIF-4E mRNA in HeLA cells results in lengthened cell division times, diminished translation rates, and reduced levels of both eIF-4E and the p220 component of eIF-4F.
Mol Cell Biol 11, 5435-5445
- DELACRETAZ E, MEIER B (1998)
Use of coronary angioplasty, bypass surgery, and conservative therapy for treatment of coronary artery disease over the past decade.
Europ Heart J 19, 1024-1046
- DI JOSEPH JF, SEHGAL SN (1993)
Functional and histopathologic effects of Rapamycin on mouse kidney.
Immunopharmacol Immunotoxicol 15, 45-56
- DI JOSEPH JF, SHARMA RN, CHANG JY (1992)
The effect of Rapamycin on kidney function in the Sprague-Dawley rat.
Transplantation 53, 507-513
- DOTTER CT, JUDKINS MP (1964)
Transluminal treatment of arteriosclerotic obstruction: description of a new technic and a preliminary report of its application.
Circulation 30, 654-670
- DRACHMAN DE (2002)
Clinical experience with drug-eluting stents.
Rev Cardiovasc Med 3, 31-37
- DUMONT FJ, MELINO MR, STARUCH MJ, KOPRAK SL, FISCHER PA, SIGAL NH (1990b)
The immunosuppressive macrolides FK-506 and Rapamycin act as reciprocal antagonists in murine T cells.
J Immunol 144, 1418-1424
- DUMONT FJ, STARUCH MJ, KOPRAK SL, MELINO MR, SIGAL NH (1990a)
Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and Rapamycin.
J Immunol 144, 251-258

LITERATURVERZEICHNIS

- ELLIS SG, ROUBIN GS, KING 3RD SB, DOUGLAS JS JR, WEINTRAUB WS, THOMAS RG, COX WR (1988)
Angiographic and clinical predictors of acute closure after native vessel coronary angioplasty.
Circulation 77, 372-379
- FARB A, JOHN M, ACAMPADO E, KOLODGIE FD, PRESCOTT MF, VIRMANI R (2002b)
Oral Everolimus inhibits in-stent neointimal growth.
Circulation 106, 2379-2384
- FARB A, SANGIORGI G, CARTER AJ, WALLEY VM, EDWARDS WD, SCHWARTZ RS, VIRMANI R (1999)
Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans.
Circulation 99, 44-52
- FARB A, WEBER DK, KOLODGIE FD, BURKE AP, VIRMANI R (2002a)
Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans.
Circulation 105, 2974-2980
- FAXON DP (2002)
Systemic drug therapy for restenosis: "déjà vu all over again".
Circulation 106, 2296-2298
- FELDMAN LJ, MAZIGHI M, SCHEUBLE A, DEUX JF, DE BENEDETTI E, BADIÉ-COMMANDER C, BRAMBILLA E, HENIN D, STEG PG JACOB MP (2001)
Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit.
Circulation 103, 3117-3122
- FEUERSTEIN N, FIRESTEIN R, AIYAR N, HE X, MURASKO D, CRISTOFALO V (1996)
Late induction of CREB/ATF binding and a concomitant increase in cAMP levels in T and B lymphocytes stimulated via the antigen receptor.
J Immunol 156, 4582-4593
- FEUERSTEIN N, HUANG D, HINRICHS SH, ORTEN DJ, AIYAR N, PRYSTOWSKY MB (1995)
Regulation of cAMP-responsive enhancer binding proteins during cell cycle progression in T lymphocytes stimulated by IL-2.
J Immunol 154, 68-79
- FINGERLE J, JOHNSON R, CLOWES AW, MAJESKY MW, REIDY MA (1989)
Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery.
Proc Natl Acad Sci USA 86, 8412-8416

LITERATURVERZEICHNIS

FISCHMAN DL, LEON MB, BAIM DS, SCHATZ RA, SAVAGE MP, PENN I, DETRE K, VELTRI L, RICCI D, NOBUYOSHI M, CLEMAN M, HEUSER R, ALMOND D, TEIRSTEIN PS, FISH RD, COLOMBO A, BRINKER J, MOSES J, SHAKNOVICH A, HIRSHFELD J, BAILEY S, ELLIS S, RAKE R, GOLDBERG S, GOLDBERG BS (1994)
A randomized comparison of coronary artery-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease.

N Engl J Med 331, 496-501

FLANAGAN WM, CRABTREE GR (1993)

Rapamycin inhibits p34cdc2 expression and arrests T lymphocyte proliferation at the G1/S transition.

Ann N Y Acad Sci 696, 31-37

FRANCAVILLA A, CARR BI, STARZL TE, AZZARONE A, CARRIERI G, ZENG QH (1992)

Effects of Rapamycin on cultured hepatocyte proliferation and gene expression.

Hepatology 15, 871-877

FRYER J, YATSCOFF RW, PASCOE EA, THLIVERIS J (1993)

The relationship of blood concentrations of Rapamycin and cyclosporine to suppression of allograft rejection in a rabbit heterotopic heart transplant model.

Transplantation 55, 340-345

FUSTER V, POON M, WILLERSON JT (1998)

Learning from the transgenic mouse: endothelium, adhesive molecules, and neointimal formation.

Circulation 97, 16-18

GABEN AM, SAUCIER C, BEDIN M, BARBU V, MESTER J (2004)

Rapamycin inhibits cdk4 activation, p21 (WAF1/CIP1) expression and G1-phase progression in transformed mouse fibroblasts.

Int J Cancer 108, 200-206

GALIS ZS, JOHNSON C, GODIN D, MAGID R, SHIPLEY JM, SENIOR RM, IVAN E (2002)

Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling.

Circ Res 91, 852-859

GALLO R, PADUREAN A, JAYARAMAN T, MARX S, ROQUE M, ADELMAN S, CHESEBRO J, FALLON J, FUSTER V, MARKS A, BADIMON JJ (1999)

Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle.

Circulation 99, 2164-2170

GODYNA S, DIAZ-RICART M, ARGRAVES WS (1996)

Fibulin-1 mediates platelet adhesion via a bridge of fibrinogen.

Blood, 2569-2577

LITERATURVERZEICHNIS

GRANGER DK, CROMWELL JW, CHEN SC, GOSWITZ JJ, MORROW DT, BEIERLE FA, SEHGAL SN, CANAFAX DM, MATAS AJ (1995)

Prolongation of renal allograft survival in a large animal model by oral Rapamycin monotherapy.

Transplantation 59, 183-186

GRAVES LM, BORNFELDT KE, ARGAST GM, KREBS EG, KONG X, LIN TA, LAWRENCE JC Jr (1995)

cAMP- and Rapamycin-sensitive regulation of the association of eukaryotic initiation factor 4E and the translational regulator PHAS-I in aortic smooth muscle cells.

Proc Natl Acad Sci USA 92, 7222-7226

GREGORY CR, HUIE P, BILLINGHAM ME, MORRIS RE (1993)

Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured vessels.

Transplantation 55, 1409-1418

GREGORY CR, HUANG X, PRATT RE (1994)

Treatment with Rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement.

Transplantation 59, 655-661

GRÜNTZIG AR (1978)

Transluminal dilatation of coronary artery stenosis.

Lancet 1, 263-264

GRÜNTZIG AR, KING 3RD SB, SCHLUMPF M, SIEGENTHALER W (1987)

Long term follow-up after percutaneous transluminal coronary angioplasty.

N Engl J Med 316, 1127-1132

GRÜNTZIG AR, SENNING A, SIEGENTHALER WE (1979)

Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty.

N Engl J Med 301, 61-68

HAN CI, CAMPBELL GR, CAMPBELL JH (2001)

Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation.

J Vasc Res 38, 113-119

HARKER LA (1987)

Role of platelets and thrombosis in mechanisms of acute occlusion and restenosis after angioplasty.

Am J Cardiol 60, 20B-28B

HASSLER O (1970)

The origin of the cells constituting arterial intimal thickening: an experimental autoradiographic study with the use of H³-thymidine.

Lab Invest 22, 286-293

HEES H (1992)

Kreislaufsystem.

In: Hees H und Sinowatz F(Hrsg.): Histologie- Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. 2. Auflage, Deutscher Ärzteverlag, Köln, 168

HEISSIG B, HATTORI K, DIAS S, FRIEDRICH M, FERRIS B, HACKETT NR, CRYSTAL RG, BESMER P, LYDEN D, MOORE MA, WERB Z, RAFII S (2002)
Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand.
Cell 109, 625-637

HEITMAN J, MOVVA NR, HIESTAND PC, HALL MN (1991)

FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*.

Proc Natl Acad Sci USA 88, 1948-1952

HERAS M, CHESEBRO JH, PENNY WJ, BAILEY KR, BADIMON L, FUSTER V (1989)

Effects of thrombin inhibition on the development of acute platelet-thrombus deposition during angioplasty in pigs.

Circulation 79, 657-665

HOLMES DR, LEON MB, MOSES JW, POPMA JJ, CUTLIP D, FITZGERALD PJ,

BROWN C, FISCHELL T, WONG SC, MIDEI M, SNEAD D, KUNTZ RE (2004)

Analysis of 1-year clinical outcomes in the SIRIUS trial: a randomized trial of a sirolimus-eluting stent versus a standard stent in patients at high risk for coronary restenosis.

Circulation 109, 634-640

HORT W, VOGELSANG H (1986)

Morphologische Untersuchungen nach koronarer Thrombolyse und PTCA.

Z Kardiol 75, 65-71

INDOLFI C, MONGIARDO A, CURCIO A, TORELLA D (2003)

Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents.

Trends Cardiovasc Med 13, 142-148

INOUE T, SOHMA R, MIYAZAKI T, IWASAKI Y, YAGUCHI I, MOROOKA S (2000)

Comparison of activation process of platelets and neutrophils after coronary stent implantation versus balloon angioplasty for stable angina pectoris.

Am J Cardiol 86, 1057-1062

INOUE K, ZAMA T, KAMIMOTO T, AOKI R, IKEDA Y, KIMURA H, HAGIWARA M (2004)

TNF α -induced ATF3 expression is bidirectionally regulated by the JNK and ERK pathways in vascular endothelial cells.

Genes Cells 9, 59-70

IP JH, FUSTER V, BADIMON L, BADIMON J, TAUBMAN MB, CHESEBRO JH (1990)

Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation.

J Am Coll Cardiol 15, 1667-1687

LITERATURVERZEICHNIS

- JAVIER AF, BATA-CSORGO Z, ELLIS CN, KANG S, VOORHEES JJ, COOPER KD (1997)
Rapamycin (Sirolimus) inhibits proliferating cell nuclear antigen expression and blocks cell cycle in the G₁ phase in human keratinocyte stem cells.
J Clin Invest 99, 2094-2099
- JAWIEN A, BOWEN-POPE DF, LINDNER V, SCHWARTZ SM, CLOWES AW (1992)
Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty.
J Clin Invest 89, 507-511
- JEFFERIES HBJ, FUMAGALLI S, DENNIS PB, REINHARD C, PEARSON RB, THOMAS G (1997)
Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70^{s6k}.
EMBO J 16, 3693-3704
- JEFFERIES HBJ, REINHARD C, KOZMA SC, THOMAS G (1994)
Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 4441-4445
- JINQUAN T, ANTING L, JACOBI HH, GLUE C, JING C, RYDER LP, MADSEN HO, SVEJGAARD A, SKOV PS, MALLING HJ, POULSEN LK (2000)
CXC chemokines receptor 3 expression on CD34(+) hemopoietic progenitors from human cord blood induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: chemotaxis and adhesion induced by its ligands, interferon γ -inducible protein 10 and monokine induced by interferon γ .
Blood 96, 1230-1238
- KAHAN BD, GIBBONS S, TEJPAL N, STEPKOWSKI SM, CHOU TC (1991)
Synergistic interactions of cyclosporine and Rapamycin to inhibit immune performance of normal human peripheral blood lymphocytes in vitro.
Transplantation 51, 232-239
- KAHAN BD, MURGIA MG, SLATON J, NAPOLI K (1995)
Potential applications of therapeutic drug monitoring of sirolimus immunosuppression in clinical renal transplantation.
The Drug Monit 17, 672-675
- KALTENBACH M, KOBER G, SCHERER D, VALLBRACHT C (1985)
Recurrence rate after successful coronary angioplasty.
Europ Heart J 6, 276-281
- KANTOR B, ASHAI K, HOLMES DR JR, SCHWARTZ RS (1999)
The experimental animal models for assessing treatment of restenosis.
Cardiovasc Rad Med 1, 48-54
- KAY JE, KROMWEL L, DOE SE, DENYER M (1991)
Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by Rapamycin.
Immunology 72, 544-549

KIMURA T, KABURAGI S, TAMURA T, YOKOI H, NAKAGAWA Y, YOKOI H, HAMASAKI N, NOSAKA H, NOBUYOSHI M, MINTZ GS, POPMA JJ, LEON MB (1997)
Remodeling of human coronary arteries undergoing coronary angioplasty or atherectomy.
Circulation 96, 475-483

KIMURA T, KABURAGI S, TASHIMA Y, NOBUYOSHI M, MINTZ GS, POPMA JJ (1995)
Geometric remodeling and intimal regrowth as mechanism of restenosis: observations from serial ultrasound analysis of restenosis (SURE) trial.
Circulation 92(Suppl I),I-76.

KOMATSU R, MAKIKO U, NARAKO T, KOJIMA A, BECKER AE (1998)
Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans.
Circulation 98, 224-233

KORNOWSKI R, HONG MK, TIO FO, BRAMWELL O, WO H, LEON MB (1998)
In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia.
J Am Coll Cardiol 31, 224-230

KOVACH JA, MINTZ GS, PICHARD AD, KENT KM, POPMA JJ, SATLER LF, LEON MB (1993)
Sequential intravascular ultrasound characterization of the mechanisms of rotational atherectomy and adjunct balloon angioplasty.
J Am Coll Cardiol 22: 1024-1032

KOYAMA N, HART CE, CLOWES AW (1994)
Different functions of the platelet-derived growth factor $-\alpha$ and $-\beta$ receptors for the migration and proliferation of cultured baboon smooth muscle cells.
Circ Res 75, 682-691

KOZAKI K, OUCHI Y (1998)
Activin/follistatin and atherosclerosis-a review.
J Atheroscler Thromb 5, 36-40

KUHEL DG, ZHU B, WITTE DP, HUI DY (2002)
Distinction in genetic determinants for injury-induced neointimal hyperplasia and diet-induced atherosclerosis in inbred mice.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 22, 955

KUMAR A, LINDNER V (1997)
Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 17, 2238-2244

LAI JH, TAN TH (1994)
CD28 signaling causes a sustained down-regulation of I κ B α which can be prevented by the immunosuppressant Rapamycin.
J Biol Chem 269, 30077-30080

LE FEUVRE C, BONAN R, COTE G, CREPEAU J, DE GUISE P, LESPERANCE J, THEROUX P (1993)
Five- to ten-year outcome after multivessel percutaneous transluminal coronary angioplasty.
Am J Cardiol 71, 1153-1158

LIBBY P (1998)
Atherosclerosis.
In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (Hrsg.): Harrison's Principles of Internal Medicine. 14. Auflage, McGraw-Hill, New York, 1345-1352

LINDNER V, FINGERLE J, REIDY MA (1993)
Mouse model of arterial injury.
Circ Res 73, 792-796

LINDNER V, REIDY MA (1991)
Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against fibroblast growth factor.
Proc Natl Acad Sci USA 88, 3739-3743

LIU J, ALBERS MW, WANDLESS TJ, LUAN S, ALBERG DG, BELSHAW PJ, COHEN P, MACKINTOSH C, KLEE CB, SCHREIBER SL (1992)
Inhibition of T cell signalling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of Calcineurin phosphatase activity.
Biochemistry 31, 3896-3901

LOWE HC, OESTERLE SN, BURKHOFF D (2002)
Alternatives to traditional coronary bypass surgery.
Semin Thorac Cardiovasc Surg 14, 110-118

MACH F, SCHONBECK U, SUKHOVA GK, ATKINSON E, LIBBY P (1998)
Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling.
Nature 394, 200-203

MAJESKY MW, LINDNER V, TWARDZIK DR, SCHWARTZ SM, REIDY MA (1991)
Production of transforming growth factor β 1 during repair of arterial injury.
J Clin Invest 88, 904-910

MARX SO, JAYARAMAN T, GO LO, MARKS AR (1995)
Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells.
Circ Res 76, 412-417

MARX SO, MARKS AR (2001)
Bench to bedside: the development of Rapamycin and its application to stent restenosis.
Circulation 104, 852-855

MERHI Y, GUIDOIN R, PROVOST P, LEUNG TK, LAM JY (1995)
Increase of neutrophil adhesion and vasoconstriction with platelet deposition after deep arterial injury by angioplasty.
Am Heart J 129, 445-451

LITERATURVERZEICHNIS

- MIANO JM, VLASIC N, TOTA RR, STEMERMAN MB (1993)
Localization of fos and jun proteins in rat aortic smooth muscle cells after vascular injury.
Am J Pathol 142, 715-724
- MIHARA K, CAO XR, YEN A, CHANDLER S, DRISCOLL B, MURPHREE AL, T'ANG A, FUNG YK (1989)
Cell cycle- dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product.
Science 246, 1300-1303
- MINTZ GS, KOVACH JA, JAVIER SP, PICHARD AD, KENT KM, POPMA JJ, SALTER LF, LEON MB (1995)
Mechanisms of lumen enlargement after excimer laser coronary angioplasty. An intravascular ultrasound study.
Circulation 92, 3408-3414
- MINTZ GS, POPMA JJ, HONG MK, PICHARD AD, KENT KM, SATLER LF, LEON MB (1996b)
Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis.
Am J Cardiol 78, 18-22
- MINTZ GS, POPMA JJ, PICHARD AD, KENT KM, SATLER LF, WONG SC, HONG MK, KOVACH JA, LEON MB (1996a)
Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study.
Circulation 94, 35-43
- MORICE MC, SERRUYS PW, SOUSA JE, FAJADET J, HAYASHI EB, PERIN M, COLOMBO A, SCHULER G, BARRAGAN P, GUAGLIUMI G, MOLNAR F, FALOTICO R (2002)
A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization.
N Engl J Med 346, 1773-1780
- MORRIS RE (1992)
Rapamycins: antifungal, antitumor, antiproliferative, and immunosuppressive macrolides.
Transplant Rev 6, 39-87
- MULLER DW, ELLIWS SG, TOPOL EJ (1992)
Experimental models of coronary artery restenosis.
J Am Coll Cardiol 2, 418-432
- NAIR RV, HUANG X, SHORTHOUSE R, ADAMS B, BRAZELTON T, BRAUN-DULLAEUS R, MORRIS RE (1997)
Antiproliferative effect of Rapamycin on growth factor-stimulated human adult lung fibroblasts in vitro may explain its superior efficacy for prevention and treatment of allograft obliterative airway disease in vivo.
Transplant Proc 29, 614-615
- NIKKARI ST, JARVELAINEN HT, WIGHT TN, FERGUSON M, CLOWES AW (1994)
Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury.
Am J Pathol 144, 1348-1356

LITERATURVERZEICHNIS

- NOBUYOSHI M, KIMURA T, OHISHI H, HORIUCHI H, NOSAKA H, HAMASAKI N, YOKOI H, KIM K (1991)
Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: pathologic observations in 20 Patients.
J Am Coll Cardiol 17, 433-439.
- NOLL S, SCHAUB-KUHNEN S (2000)
Praxis der Immunhistochemie.
In: Höfler H, Müller KM: 1. Auflage, Urban & Fischer Verlag München Jena.
- NOURSE J, FIRPO E, FLANAGAN WM, COATS S, POLYAK K, LEE MH, MASSAGUE J, CRABTREE GR, ROBERTS JM (1994)
Interleukin-2-mediated elimination of the p27^{kip1} cyclin- dependent kinase inhibitor prevented by Rapamycin.
Nature 372, 570-573
- OCHIAI T, GUNJI Y, NAGATA M, KOMORI A, ASANO T, ISONO K (1993)
Effects of Rapamycin in experimental organ allografting.
Transplantation 56, 15-19
- OESTERLE SN, WHITBOURN R, FITZGERALD PJ, YEUNG AC, STERZER SH, DAKE MD, YOCK PG, VIRMANI R (1998)
The stent decade: 1987 to 1997.
Am Heart J 136, 578-599
- PERLMAN H, MAILLARD L, KRASINSKI K, WALSH K (1997)
Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury.
Circulation 95, 981-987
- PETERSEN J (1991)
Percutane transluminale Coronarangioplastie.
In: Riecker G, von Arnim T (Hrsg.): Klinische Kardiologie, Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 775-779
- POON M, MARX SO, GALLO R, BADIMON JJ, TAUBMAN MB, MARKS AR (1996)
Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration.
J Clin Invest 98, 2277-2283
- POPMA JJ, CALIFF RM, TOPOL EJ (1991)
Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty.
Circulation 84, 1426-1436
- REGAR E, SIANOS G, SERRUYS PW (2001)
Stent development and local drug delivery.
B Med Bull 59, 227-248
- RENSING BJ, HERMANS WR, STRAUSS BH, SERRUYS PW (1991)
Regional differences in elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a quantitative angiographic study.
J Am Coll Cardiol 17 (6SupplB), 34B-38B

LITERATURVERZEICHNIS

- RIEDE UN, MÜNTEFERING H, DREXLER H, SCHAEFER HE (1999/2001)
Kardiovaskuläres System.
In: Riede UN und Schaefer HE (Hrsg): Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 485-494
- RIEDE UN, IHLING CH, SCHAEFER HE (1999/2001)
Arterien.
In: Riede UN und Schaefer HE (Hrsg): Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 436-459
- ROESSNER A, KIRKPATRICK CJ, SCHNEIDER J (2001)
Gefäße.
In: Böcker W, Denk H, Heitz PU (Hrsg): Pathologie. 2. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 465-479
- ROGERS C, EDELMAN ER (1995)
Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis.
Circulation 91, 2995-3001
- ROGERS C, EDELMAN ER, SIMON DI (1998)
A mAb to the β_2 -leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits.
Proc Natl Acad Sci USA 95, 1014-10139
- ROQUE M, FALLON JT, BADIMON JJ, ZHANG WX, TAUBMAN MB, REIS ED (2000)
Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 335-342
- ROQUE M, REIS ED, CORDON-CARDO C, TAUBMAN MB, FALLON JT, FUSTER V, BADIMON JJ (2001)
Effect of p27 deficiency and Rapamycin on intimal hyperplasia: in vivo and in vitro studies using a p27 knockout mouse model.
Lab Invest 81, 895-903
- ROSS R (1981)
Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components.
Arteriosclerosis 1, 293-311
- ROSS R (1999)
Atherosclerosis – an inflammatory disease.
Mechanism of disease.
N Eng J Med 340, 115-126
- ROSS R, GLOMSET JA (1973)
Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis.
Science 180, 1332-1339

- ROTTER M, PFIFFNER D, MAIER W, ZEIHNER AM, MEIER B (2003)
Interventional cardiology in Europe 1999.
Eur Heart J 24, 1164-1170
- ROUBIN GS, KING 3RD SB, DOUGLAS JS JR, LEMBO NJ, ROBINSON KA (1990)
Intracoronary stenting during percutaneous transluminal coronary angioplasty.
Circulation 81 (suppl IV), IV92-IV100
- SANBORN TA, FAXON DP, HAUDENSCHILD C, GOTTSMAN SB, RYAN TJ (1983)
The mechanism of transluminal angioplasty: evidence for formation of aneurysms in
experimental atherosclerosis.
Circulation 68, 1136-1140
- SANGIORGI G, TAYLOR AJ, FARB A, CARTER AJ, EDWARDS WD, HOLMES DR,
SCHWARTZ RS, VIRMANI R (1999)
Histopathology of postpercutaneous transluminal coronary angioplasty remodeling in human
coronary arteries.
Am Heart J 138, 681-687
- SATA M, MAEJIMA Y, ADACHI F, FUKINO K, SAIURA A, SUGIURA S, AOYAGI T,
IMAI Y, KURIHARA H, KIMURA K, OMATA M, MAKUUCHI M, HIRATA Y, NAGAI
R (2000)
A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed
by reproducible neointimal hyperplasia.
J Mol Cardiol 32, 2097-2104
- SATA M, SAIURA A, KUNISATO A, TOJO A, OKADA S, TOKUHISA T, HIRAI H,
MAKUUCHI M, HIRATA Y, NAGAI R (2002)
Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis
of atherosclerosis.
Nat Med 8, 403-409
- SAUNDERS RN, METCALFE MS, NICHOLSON ML (2001)
Rapamycin in transplantation: a review of the evidence.
Kidney Int 59, 3-16
- SCHMUZIGER M (1989)
Herzchirurgie
In Roskamm H, Reindell H (Hrsg.): Herzkrankheiten. 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin,
780-784
- SCHOBER A, KNARREN S, LIETZ M, LIN EA, WEBER C (2003)
Crucial role of stromal cell-derived factor-1 α in neointima formation after vascular injury in
apolipoprotein E-deficient mice.
Circulation 108, 2491-2497.

LITERATURVERZEICHNIS

SCHÖMIG A, NEUMANN FJ, KASTRATI A, SCHUHLEN H, BLASINI R, HADAMITZKY M, WALTER H, ZITZMAN-ROTH EM, RICHARDT G, ALT E, SCHMITT C, ULM K (1996)

A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents.

N Engl J Med 334, 1084-1089

SCHREIBER SL (1991)

Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands.

Science 251, 283-287

SCHULER W, SEDRANI R, COTTENS S, HÄBERLIN B, SCHULZ M, SCHUURMAN HJ, ZENKE G, ZERWES HG, SCHREIER MH (1997)

SDZ RAD, a new Rapamycin derivate: pharmacological properties in vitro and in vivo.

Transplantation 64, 36-42

SCHWARTZ RS (1994)

Animal models of human coronary restenosis.

In: Topol EJ (Hrsg.): Textbook of interventional cardiology. 2nd Edition, Philadelphia, PA:

W.B. Saunders, 365-381

SCHWARTZ RS (1998)

Pathophysiology of restenosis: interaction of thrombosis, hyperplasia, and/or remodeling.

Am J Cardiol 81, 14E-17E

SCOTT NA, CIPOLLA GD, ROSS CE, DUNN B, MARTIN FH, SIMONET L, WILCOX JN (1996)

Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries.

Circulation 93, 2178-2187

SCOTT-BURDEN T, VANHOUTTE PM (1993)

The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation.

Circulation 87 (SupplV), V51-V55

SEDRANI R, COTTENS S, KALLEN J, SCHULER W (1998)

Chemical modification of Rapamycin: the discovery of SDZ RAD.

Transplant Proc 30, 2192-2194

SEHGAL SN (2003)

Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action.

Transplant Proc 35 (Suppl 3A), 7S-14S

SEHGAL SN, BANSBACH CC (1993)

Rapamycin: in vitro profile of a new immunosuppressive macrolide.

Ann N Y Acad Sci 685, 58-67

SELWYN AP, BRAUNWALD E (1998)

Ischemic heart disease.

In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (Hrsg.): Harrison's Principles of Internal Medicine. 14. Auflage, McGraw-Hill, New York, 1365-1380

SERRANO CV, RAMIRES JAF, VENTURINELLI M, ARIE S, D'AMICO E, ZWEIER JL, PILEGGI F, DA LUZ PL (1997)

Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression: evidence of inflammatory response in coronary angioplasty.

J Am Coll Cardiol 29, 1276-1283

SERRUYS PW, DE JAEGER P, KIEMENEIJ F, MACAYA C, RUTSCH W, HEYNDRICKX G, EMANUELSSON H, MARCO J, LEGRAND, MATERNE P, BELARDI J, SIGWART U, COLOMBO A, GOY JJ, VAN DEN HEUVEL P, DELCAN J, MOREL M (1994)

A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease.

N Engl J Med 331, 489-495

SEYBOTH C.

Einfluß des Tyrosinkinaseinhibitors STI 571 auf den Zeitverlauf der Koronarrestenose im Mausmodell.

Med. Diss. TU München in Vorb.

SHI Y, PIENIEK M, FARD A, O'BRIEN J, MANNION JD, ZALEWSKI A (1996)

Adventitial remodeling after coronary arterial injury.

Circulation 93, 340-348

SIMON DI, DHEN Z, SEIFERT P, EDELMAN ER, BALLANTYNE CM, ROGERS C (2000)

Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty.

J Clin Invest 105, 293-300

SIGWART U, KAUFMANN U, GOY J-J, GRBIC M, GOLF S, ESSINGER A, FISCHER A, SADEGHI H, MIRKOVITCH V, KAPPENBERGER L (1988)

Prevention of coronary restenosis by stenting.

Europ Heart J 9 (Suppl C), 31-37

SIGWART U, PUEL J, MIRKOVITCH V, JOFFRE F, KAPPENBERGER L (1987)

Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty.

N Engl J Med 316, 701-706

SMYTH SS, REIS ED, ZHANG W, FALLON JT, GORDON RE, COLLIER BS (2001)

β_3 -integrin-deficient mice but not P-selectin-deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury.

Circulation 103, 2501-2507

LITERATURVERZEICHNIS

SOUSA JE, COSTA MA, ABIZAID AC, RENSING BJ, ABIZAID AS, TANAJURA LF, KOZUMA K, VAN LANGENHOVE G, SOUSA A, FALOTICO R, JAEGER J, POPMA JJ, SERRUYS PW (2001)

Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up.
Circulation 104, 2007-2011

SOUSA JE, COSTA MA, SOUSA A, AIZAID AC, SEIXAS AC, ABIZAID AS, FERES F, MATTOS LA, FALOTICO R, JAEGER J, POPMA JJ, SERRUYS PW (2003)

Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries.
Circulation 107, 381-383

STEELE PM, CHESEBRO JH, STANSON AW, HOLMES DR Jr, DEWANJEC MK, BADIMON L, FUSTER V (1985)

Balloon angioplasty: natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model.
Circ Res 57, 105-112.

STEMERMAN MB, ROSS R (1972)

Experimental arteriosclerosis: I. Fibrous plaque formation in primates, an electron microscope study.
J Exp Med 136, 769-789

SUN J, MARX SO, CHEN HJ, POON M, MARKS AR, RABBANI LE (2001)

Role for p27^{kip1} in vascular smooth muscle cell migration.
Circulation 103, 2967-2972

SUZUKI T, KOPIA G, HAYASHI SI, BAILEY LR, LLANOS G, WILENSKY R, KLUGHERZ BD, PAPANDREOU G, NARAYAN P, LEON MB, YEUNG AC, TIO F, TSAO PS, FALOTICO R, CARTER AJ (2001)

Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model.
Circulation 104, 1188-1193

TEIRSTEIN PS, MASSULLO V, JANI S, POPMA JJ, RUSSO RJ, SCHATZ RA, GUARNERI EM, STEUTERMAN S, SIRKIN K, CLOUTIER DA, LEON MB, TRIPURANENI P (2000)

Three-year clinical and angiographic follow-up after intracoronary radiation: results of a randomized clinical trial.
Circulation 101, 360-365

TERADA N, LUCAS JJ, SZEPESI A, FRANKLIN RA, DOMENICO J, GELFAND EW (1993)

Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G₁ phase of the cycle.
J Cell Physiol 154, 7-15

LITERATURVERZEICHNIS

TOPOL EJ, ELLIS SG, COSGROVE DM, BATES ER, MULLER DWM, SCHORK NJ, SCHORK MA, LOOP FD (1993)

Analysis of coronary angioplasty practice in the United States with an insurance-claims data base.

Circulation 87, 1489-1497

TSAKIRIS DA, TSCHOPL M, WOLF F, LABS KH, JAGER KA, MARBET GA (2000)

Platelets and cytokines in concert with endothelial activation in patients with peripheral arterial occlusive disease.

Blood Coagul Fibrinolys 11, 165-173

UCHIMURA N, PERERA GB, FUJITAN RM, TOBIS JM, ISHIMARU S, WILSON SE, GORDON IL (2004)

Dose-dependent Inhibition of Myointimal Hyperplasia by orally Administered Rapamycin.

Ann Vasc Surg 18, 172-177

VEZINA C, KUDELSKI A, SEHGAL SN (1975)

Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic: I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle.

J Antibiot 28, 721-726

WALLER BF (1985)

Perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA).

Herz 10, 255-268

WALLER BF (1989)

“Crackers, breakers, stretchers, drillers, scrapers, shavers, burners, welders and melters“- the future treatment of atherosclerotic coronary artery disease? A clinical-morphologic assessment.

J Am Coll Cardiol 13, 969-987

WANG X, LI X, YUE TL, OHLSTEIN EH (2000)

Expression of monocyte chemotactic protein-3 mRNA in rat vascular smooth muscle cells and in carotid artery after balloon angioplasty.

Biochem Biophys Acta 1500, 41-48

WAUGH JM, LI-HAWKINS J, YUKSEL E, KUO MD, CIFRA PN, HILFIKER PR, GESKE R, CHAWLA M, THOMAS J, SHENAI SM, DAKE MD, WOO SL (2000)

Thrombomodulin overexpression to limit neointima formation.

Circulation 102, 332-337

WELT FG, EDELMAN ER, SIMON DI, ROGERS C (2000)

Neutrophil, not macrophage, infiltration precedes neointimal thickening in balloon-injured arteries.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 20, 2553-2558

WHITING PH, WOO J, ADAM BJ, HASAN NU, DAVIDSON RJ, THOMSON AW (1991)

Toxicity of Rapamycin - a comparative and combination study with cyclosporine at immunotherapeutic dosage in the rat.

Transplantation 52, 203-208

LITERATURVERZEICHNIS

WILENSKY RL, MARCH KL, GRADUS-PIZLO I, SANDUSKY G, FINEBERG N, HATHAWAY DR (1995)
Vascular injury, repair, and restenosis after percutaneous transluminal angioplasty in the atherosclerotic rabbit.
Circulation 92, 2995-3005

WINDECKER S, MEYER BJ, BONZEL T, FABIAN J, HEYNDRICKX G, MORICE MC, MÜHLBERGER V, PISCIONE F, ROTHMAN M, WIJNS W, VAN DEN BRAND M, MEIER B (1998)
Interventional cardiology in Europe 1994.
Europ Heart J 19, 40-54

YATSCOFF RW, WANG P, CHAN K, HICKS D, ZIMMERMANN J (1995)
Rapamycin: distribution, pharmacokinetics, and therapeutic range investigations.
Therap Drug Monit 17, 666-671

ZHU B, ZHAO G, WITTE DP, HUI DY, FAGIN JA (2001)
Targeted overexpression of IGF-I in smooth muscle cells of transgenic mice enhances neointimal formation through increased proliferation and cell migration after intraarterial injury.
Endocrinology 142, 3598-3606

ZOHLNHÖFER D, KLEIN CA, RICHTER T, BRANDL R, MURR A, NÜHRENBERG T, SCHÖMIG A, BAUERLE PA, NEUMANN FJ (2001a)
Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: detection of FK506-binding protein 12 upregulation.
Circulation 103, 1396-1402

ZOHLNHÖFER D, NÜHRENBERG TG, NEUMANN FJ, RICHTER T, MAY AE, SCHMIDT R, DENKER K, CLAUSS MA, SCHÖMIG A, BAUERLE PA (2004)
Rapamycin effects transcriptional programs in smooth muscle cells controlling proliferative and inflammatory properties.
Mol Pharmacol 65, 880-889

ZOHLNHÖFER D, RICHTER T, NEUMANN FJ, NÜHRENBERG T, WESSELY R, BRANDL R, MURR A, KLEIN CA, BAUERLE PA, (2001b)
Transcriptome analysis reveals a role of interferon- γ in human neointima formation.
Mol Cell 7, 1059-1069

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Vorkommen atherosklerotischer Veränderungen und ihre klinische Symptomatik.....	3
Tabelle 2: Kandidaten für die Anwendung in beschichteten Stents	11
Tabelle 3: Erste Studien mit dem Rapamycin-beschichteten Stent	13
Tabelle 4: Versuchsplan und Gruppeneinteilung	36
Tabelle 5: Lösungen für die mRNA Isolierung	43
Tabelle 6: Lösungen für die cDNA Synthese	44
Tabelle 7: Lösungen für das Tailing.....	44
Tabelle 8: Lösungen zur cDNA Amplifizierung	45
Tabelle 9: Ansatz für die Kontroll-PCR	46
Tabelle 10: Puffer und Marker für die Gelelektrophorese.....	46
Tabelle 11: Lösung für das Prähybridisieren.....	47
Tabelle 12: Lösungen für das Dig-dUTP Markieren der cDNA	47
Tabelle 13: Puffer für das Waschen der Filter.....	48
Tabelle 14: Puffer für das Entwickeln der Filter	49
Tabelle 15: Lösungen für die PCR	51
Tabelle 16: PCR-Maus-Primer-Sequenzen	52
Tabelle 17: Etablierung der Antikörper.....	53
Tabelle 18: Kleber-Mischung zum Aufkleben der Paraffinschnitte.....	54
Tabelle 19: Lösungen zur Hitzedenaturierung	54
Tabelle 20: Alphabetische Auflistung der verwendeten Reagenzien	57
Tabelle 21: Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen in μm^2	63
Tabelle 22: Neointimafläche in μm^2 und Lumenverlust in %	64
Tabelle 23: Mediafläche in Prozent Gefäßdurchmesser und Länge der Lamina elastica externa	65
Tabelle 24: Regulierung der Gene der STENOSE-Gruppe	67
Tabelle 25: Clustering der Gene der STENOSE-Gruppe	68
Tabelle 26: Expression der Housekeeping Gene	69
Tabelle 27: Regulierung von Proliferations- und Apoptose-assoziierten Genen im Zeitverlauf.....	70
Tabelle 28: Regulierung von Inflammations-assoziierten Genen im Zeitverlauf.....	72
Tabelle 29: Regulierung von Zelladhäsions-, Zytoskelett- und extrazellulärer Matrix-assoziierten Genen im Zeitverlauf	74
Tabelle 30: Regulierung anderer Gene im Zeitverlauf	75
Tabelle 31: Regulierung der Gene der 3d _{ST} -Gruppe im Vergleich mit der 3d _{RA} -Gruppe	76
Tabelle 32: Gruppeneinteilung der durch Rapamycin differentiell regulierten Gene	77
Tabelle 33: Expression der Housekeeping Gene	78
Tabelle 34: Regulierung von Proliferations- und Apoptose-assoziierten Genen.....	79
Tabelle 35: Regulierung von Inflammations-assoziierten Genen.....	80

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 36: Regulierung von Zelladhäsions-, Zytoskelett- und extrazellulärer Matrix-assoziierten Genen	81
Tabelle 37: Regulierung anderer Gene	82
Tabelle 38: Desmin-PCR.....	84
Tabelle 39: E-Selektin-PCR	86
Tabelle 40: GRO1-PCR.....	87
Tabelle 41: CXCR4-PCR	88
Tabelle 42: CXCR3-PCR	89
Tabelle 43: IP-10-PCR	90
Tabelle 44: MMP9-PCR.....	91
Tabelle 45: Kit-oncogene-PCR	92
Tabelle 46: MCM2-PCR	93
Tabelle 47: TMK-PCR	93
Tabelle 48: SDF-1-PCR	95

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Übersicht Atherosklerose (1).....	4
Abbildung 2: Übersicht Atherosklerose (2).....	5
Abbildung 3: Koronarer Stent.....	10
Abbildung 4: Aufbau beschichteter Stents.....	12
Abbildung 5: Strukturformel von Rapamycin = Sirolimus.....	20
Abbildung 6: Hemmung des Zellzyklus durch Rapamycin.....	21
Abbildung 7: Einfluss von Rapamycin auf biochemische Ereignisse.....	24
Abbildung 8: Strukturformel SDZ RAD.....	28
Abbildung 9: Aufbau einer Arterie vom muskulären Typ.....	31
Abbildung 10: Ansicht des Operationsfeldes.....	37
Abbildung 11: Schematische Darstellung des operativen Eingriffes.....	38
Abbildung 12: Anfertigen der histologischen Schnitte.....	40
Abbildung 13: Morphometrische Ausmessungen.....	41
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Abläufe bei der Genexpressionsanalyse.....	42
Abbildung 15: Nylon cDNA-Microarray.....	50
Abbildung 16: Etablierung der Antikörper CD3, CD45, CD31 und CXCR3.....	53
Abbildung 17: Prinzip der LSAB-Methode.....	55
Abbildung 18: Histologische Schnitte im Zeitverlauf.....	60
Abbildung 19: Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen (1).....	61
Abbildung 20: Verlauf der Neointimafläche über 20 Schnittebenen (2).....	62
Abbildung 21: Vergleich der Neointimafläche und des Lumenverlustes der STENOSE-Gruppe und der RAPAMYCIN-Gruppe.....	64
Abbildung 22: Vergleich der Mediafläche in % und der EEL-Länge der KONTROLL-Gruppe, der STENOSE-Gruppe und der RAPAMYCIN-Gruppe.....	65
Abbildung 23: Regulierung der Gene der STENOSE-Gruppe (1).....	67
Abbildung 24: Regulierung der Gene der STENOSE-Gruppe (2).....	67
Abbildung 25: Clustering der Gene der STENOSE-Gruppe.....	68
Abbildung 26: Regulierung der Gene der 3d _{ST} -Gruppe im Vergleich mit der 3d _{RA} -Gruppe.....	76
Abbildung 27: Gruppeneinteilung der durch Rapamycin differentiell regulierten Gene.....	77
Abbildung 28: β-Aktin-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.....	83
Abbildung 29: β-Aktin-PCR Ergebnisse der RAPAMYCIN-Gruppe.....	83
Abbildung 30: Desmin-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.....	84
Abbildung 31: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der Desmin-PCR.....	84
Abbildung 32: E-Selektin-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.....	85
Abbildung 33: E-Selektin-PCR Ergebnisse der RAPAMYCIN-Gruppe.....	85
Abbildung 34: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der E-Selektin-PCR.....	85

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 35: GRO1-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.....	86
Abbildung 36: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der GRO1-PCR	86
Abbildung 37: CXCR4-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.	87
Abbildung 38: CXCR4-PCR Ergebnisse der RAPAMYCIN-Gruppe.....	87
Abbildung 39: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der CXCR4-PCR.....	88
Abbildung 40: CXCR3-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.	88
Abbildung 41: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der CXCR3-PCR.....	89
Abbildung 42: IP-10-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe	89
Abbildung 43: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der IP-10-PCR.....	90
Abbildung 44: MMP9-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.....	90
Abbildung 45: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der MMP9-PCR	91
Abbildung 46: Kit-oncogene-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.....	91
Abbildung 47: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der Kit-oncogene-PCR.....	92
Abbildung 48: MCM-2-PCR und densitometrische Ergebnisse	92
Abbildung 49: TMK-PCR und densitometrische Ergebnisse	93
Abbildung 50: SDF-1-PCR Ergebnisse der STENOSE-Gruppe.....	94
Abbildung 51: SDF-1-PCR Ergebnisse der RAPAMYCIN-Gruppe.	94
Abbildung 52: Ergebnisse der densitometrischen Ausmessung der SDF-1-PCR.....	94
Abbildung 53: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CD31	96
Abbildung 54: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung von CD3	97
Abbildung 55: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung CD45	99
Abbildung 56: Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung CXCR3	100

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

\$	US Dollar
%	Prozent
§	Paragraph
°C	Grad Celsius
µg/cm ²	Mikrogramm pro Quadratzentimeter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
4E-BP1	eIF-4E binding protein
A.	Arteria
AK	Antikörper
A _M	Fläche der Media
A _N	Fläche der Neointima
AP	Alkalische Phosphatase
ASS	Acetylsalicylsäure
ATF	Activating transcription factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
Bp	Basepairs = Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CABG	Coronary artery bypass grafting procedures, Bypass-Operation
cAMP	CycloAdenosinmonophosphat
CASMC	Glatte Muskelzellen der Koronararterien (Coronary artery smooth muscle cells)
CD	Cluster of differentiation
CD11b	Neutrophilenadhäsionsmolekül
Cdk	(Cyclin dependent kinase) Cyklinabhängige Kinase
cdkI	Cyclin-dependent-kinase-inhibitor, Inhibitor der cyclinabhängigen Kinase
cDNA	(Complementary) komplementäre DNA
cm ²	Quadratzentimeter
Com.	communis
CRE	cAMP-response-element
CREB	cAMP-response-element-binding
CREM τ	Transkriptionsfaktor der (cAMP-response-element-binding)-Familie
d	Tage
d.h.	das heißt
DAB	3,3 Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
E. coli	Escherichia coli
E.-v.-G.	Elastica-van-Gieson Färbung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEL	Lamina elastica externa = EEM
EEM	Membrana elastica externa = EEL
EF	Elongationsfaktor
EF-1 α	Elongationsfaktor -1 α
E2F-	Elongationsfaktoren

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

etc.	et cetera = dafür besser
ext.	externa
FGF	Fibroblast growth factor = fibroblastärer Wachstumsfaktor
FK 506	Tacrolimus
FKBP	FK bindendes Protein
FR	Fast release = schnelle Abgabe
FRAP	FKBP Rapamycin assoziiertes Protein
FST	Fine Science Tools
FV	Femoralisverletzung
g	Gramm
G ₁ -Phase	Gap-1-Phase
GA	Genexpressionsanalyse
GCSF3	granulocyte colony stimulating factor 3
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunden
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HK	Housekeeping-Gene
HRP	Horseradish (Meerrettich)-Peroxidase
ICAM-1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
IEL	Lamina elastica interna = IEM
IEM	Membrana elastica interna = IEL
IGF-1	Insulin like growth factor-1
IL-1	Interleukin-1
IL1 β	Interleukin 1 beta
IL-2	Interleukin-2
IMA	A. mammariae internae
IP	Intraperitoneal
IP 10	Interferon-gamma-inducible-protein 10
IRF-1	Interferon regulatory factor
ISR	In-Stent-Restenose
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	KONTROLL-Gruppe, unoperierte Kontrolle
LAD	Left anterior descending = Ramus interventricularis anterior
LDL	Low density lipoprotein
LiCl	Lithiumchlorid
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
LSAB	Labeled Strept-Avidin-Biotin-Methode
L _v	verbleibendes Lumen
M	Morphometrie
M	Molar
M.	Musculus
Mac-1	CD11b/CD18
MCM	Mini chromosome maintenance
MCP3	small inducible cytokine A7
mg	Milligramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mg/kg/d	Milligramm pro Kilogramm pro Tag
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIG	Monokine induced by gamma interferon
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	Messenger RNA

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

mTOR	mammalian Target of Rapamycin = Ziel von Rapamycin beim Säugetier
MW	Arithmetisches Mittel
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
neg.	Negative
NFAT	(Nuclear factor of activation of T cells) nukleären T-Zell-Aktivierungsfaktor
ng	Nanogramm
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
O ₂	Sauerstoff
O ₂ /min	Sauerstoff per Minute
OA	Orale Applikation
p	Signifikanzniveau
p. int.	post interventionem
p. m.	post mortem
PAF	platelet activating factor
PBMA	Polybutylmethacrylate
PCR	(Polymerase chain reaction) Polymeraseketten Reaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PEVA	Polyethylenevincylacetate
pH	Potentia hydrogenii
PNCA	Proliferating nuclear cell antigen
PO	Per os
PolyA	Polyadenylat
Pos.	Positiv
PPIase	Peptidylpropylisomerase
pRB	Retinoblastomprotein
PTCA	Perkutane transluminale Coronarangioplastie
p-Wert	(Probability) Irrtumswahrscheinlichkeit
p21	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
p57	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
RA	RAPAMYCIN-GRUPPE
RAFT1	Siehe mTOR
RAPT1	Siehe mTOR
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Reverse Transkriptase
SARP1	secreted apoptosis-related protein 1
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal Cell-Derived factor
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDZ RAD	= Everolimus
SE	Standardfehler
sec	Sekunden
Sig.	Signifikanz
SMC	Smooth muscle cells = glatte Muskelzellen
sog.	Sogenannt
S-Phase	Synthese-Phase
SR	Slow release =langsame Abgabe
ST	STENOSE-GRUPPE
STABW	Standardabweichung
sup.	Superficialis
T _A	Annealingtemperatur
TAE	Trisacetat-EDTA
Taq	Termus aquaticus
TdT	Terminale Desoxyribonucleotidtransferase
TGF-β	Transforming growth factor-β
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TMK	Thymidylatkinase
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	(Units) Einheiten

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

u. a.	Unter anderem
U.S.	United States
u/ μ l	Units/Mikroliter, Einheiten je Mikroliter
USA	United States of America
V.	Vena
v. a.	vor allem
v/v	Volume per volume
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-C	Vascular endothelial growth factor C
VSMC	Vascular smooth muscle cells = vaskuläre glatte Muskelzellen
WHO	World Health Organisation
WPI	Waschpuffer Igepal
WPT	Waschpuffer Tween
Z	Zyklenzahl
z. B.	zum Beispiel
Z _p	Zyklenzahl des spezifischen Primers
α	alpha
α GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible
β	beta
γ	gamma
1X	einfacher Ansatz
3d _{RA}	3 Tage RAPAMYCIN-Gruppe
3d _{ST}	3 Tage STENOSE-Gruppe
7d _{RA}	7 Tage RAPAMYCIN-Gruppe
7d _{ST}	7 Tage STENOSE-Gruppe
14d _{RA}	14 Tage RAPAMYCIN-Gruppe
14d _{ST}	14 Tage STENOSE-Gruppe
28d _{RA}	28 Tage RAPAMYCIN-Gruppe
28d _{ST}	28 Tage STENOSE-Gruppe

11 ANHANG

Tabelle 49: Alphabetische Auflistung der differentiell regulierten Gene der STENOSE-Gruppe im Zeitverlauf.

Gene	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	0,047	0,000	0,622	0,000	0,510
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B	0,021	0,280	0,000	0,010	0,000
a disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin)	0,014	0,523	0,717	0,189	0,420
a disintegrin and metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	0,006	0,428	0,798	0,155	0,509
a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, 1	0,004	0,486	0,000	0,000	0,000
abl proto-oncogene	0,032	0,461	0,000	0,000	0,000
acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	0,027	0,796	0,713	0,262	0,755
activating transcription factor 4	0,015	0,662	0,775	0,236	0,665
activin A receptor, type II-like 1	0,028	0,390	0,710	0,168	0,500
adaptor protein complex AP-1, beta 1 subunit	0,013	0,000	0,726	0,000	0,000
adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	0,043	0,000	0,369	0,000	0,203
adaptor protein complex AP-2, mu 1	0,018	0,383	0,758	0,095	0,436
adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1	0,038	0,000	0,461	0,000	0,000
adipsin	0,018	0,213	0,871	0,497	0,732
alcohol dehydrogenase 1, complex	0,025	0,134	0,644	0,000	0,000
alcohol dehydrogenase family 1, subfamily A2	0,013	0,000	0,621	0,000	0,000
alpha-2-HS-glycoprotein	0,008	0,000	0,414	0,000	0,000
alpha-spectrin 2, brain	0,047	0,533	0,595	0,127	0,000
aminolevulinic acid synthase 2, erythroid	0,01	0,000	0,360	0,000	0,000
annexin A1	0,018	0,551	0,826	0,152	0,720
annexin A8	0,032	0,000	0,129	0,000	0,248
apolipoprotein CI	0,009	0,000	0,414	0,000	0,453
apolipoprotein D	0,016	0,446	0,625	0,146	0,616
aquaporin 2	0,006	0,000	0,585	0,297	0,000
arachidonate 5-lipoxygenase	0,041	0,000	0,436	0,098	0,000
aristaless 4	0,013	0,151	0,000	0,000	0,000
Bcl-associated death promoter	0,004	0,000	0,756	0,445	0,561
BH3 interacting (with BCL2 family) domain, apoptosis agonist	0,032	0,112	0,000	0,000	0,000
bone morphogenetic protein 4	0,035	0,436	0,755	0,282	0,440
BP-3 alloantigen	0,02	0,000	0,551	0,000	0,407
bystin-like	0,037	0,000	0,421	0,000	0,000
cadherin 6	0,032	0,242	0,000	0,000	0,000
calpain 2	0,009	0,919	0,889	0,127	0,476
carbonic anhydrase 3	0,004	0,000	0,679	0,000	0,000
carboxypeptidase E	0,008	0,744	0,706	0,252	0,551
catenin beta	0,018	0,716	0,759	0,226	0,446
cathepsin K	0,009	0,382	0,858	0,000	0,851
CD 81 antigen	0,036	0,776	0,878	0,229	0,750
CD14 antigen	0,006	0,000	0,704	1,058	0,908
CD34 antigen	0,019	0,285	0,564	0,000	0,269
CD37 antigen	0,005	0,000	0,724	0,259	0,592
CD44 antigen; gp90 lymphocyte homing/adhesion receptor	0,022	0,000	0,733	0,381	0,641
CD68 antigen	0,006	0,000	0,893	0,731	0,743
CD8 antigen, alpha chain	0,026	0,000	0,000	0,131	0,000
CD86 antigen	0,032	0,000	0,000	0,148	0,000
CDC-like kinase 2	0,045	0,386	0,520	0,215	0,083
cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	0,003	0,000	0,666	0,173	0,656
cell division cycle 25 homolog B (S. cerevisiae)	0,042	0,000	0,418	0,000	0,000
cell division cycle 45 homolog (S. cerevisiae)-like	0,023	0,000	0,484	0,117	0,000
cell division cycle 71 homolog (S. cerevisiae)-like 1	0,013	0,000	0,153	0,000	0,000
cell line NK14 derived transforming oncogene	0,043	0,382	0,714	0,104	0,627
cellular retinoic acid binding protein I	0,002	0,000	0,330	0,000	0,000
cellular retinoic acid binding protein II	0,04	0,000	0,210	0,303	0,675
cellular retinoic acid binding protein II	0,004	0,000	0,065	0,429	0,330
c-fos induced growth factor	0,035	0,073	0,616	0,000	0,000
chaperonin subunit 6a (zeta)	0,046	0,000	0,512	0,000	0,000

ANHANG

Gene	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
chemokine (C-C) receptor 9	0,013	0,000	0,213	0,000	0,000
chemokine (C-X3-C) receptor 1	0,033	0,000	0,314	0,324	0,000
chemokine (C-X-C) receptor 2	0,032	0,000	0,000	0,291	0,000
chemokine (C-X-C) receptor 3	0,007	0,000	0,000	0,187	0,351
chemokine (C-X-C) receptor 4	0,022	0,000	0,458	0,213	0,372
chemokine orphan receptor 1	0,036	0,175	0,808	0,219	0,741
chloride ion current inducer protein (CLCI)	0,014	0,244	0,538	0,064	0,136
chondroitin sulfate proteoglycan 2	0,01	0,088	0,644	0,362	0,263
circadian locomoter output cycles kaput	0,016	0,398	0,597	0,000	0,000
clone IMAGE:1382982	0,028	0,000	0,513	0,000	0,443
coagulation factor II (thrombin) receptor	0,046	0,582	0,641	0,343	0,000
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	0,029	0,000	0,618	0,111	0,000
coagulation factor III	0,02	0,534	0,893	0,000	0,412
colony stimulating factor 1 receptor	0,008	0,000	0,552	0,585	0,397
colony stimulating factor 3 (granulocyte)	0,046	0,000	0,000	0,362	0,283
colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	0,02	0,000	0,500	0,358	0,444
complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	0,01	0,000	0,878	0,738	0,889
complement component 5 receptor 1 (C5R1); C5A ligand	0,034	0,000	0,433	0,134	0,184
complement component factor h	0,011	0,000	0,169	0,000	0,000
cyclin B2	0,01	0,000	0,603	0,293	0,335
cyclin-dependent kinase 4	0,014	0,244	0,687	0,181	0,593
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	0,019	0,035	0,523	0,563	0,568
cytochrome b-245, beta polypeptide	0,019	0,000	0,653	0,361	0,292
cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 2	0,043	0,000	0,000	0,506	0,363
cytochrome P450, 1b1, benz[a]anthracene inducible	0,048	0,286	0,000	0,000	0,000
cytokine inducible SH2-containing protein 1	0,032	0,000	0,000	0,181	0,048
cytokine inducible SH2-containing protein 3	0,025	0,111	0,755	0,782	0,902
delta-aminolevulinate dehydratase	0,044	0,000	0,676	0,425	0,724
desmin	0,019	0,794	0,528	0,000	0,115
discs, large homolog 4 (Drosophila)	0,022	0,501	0,000	0,303	0,000
DNA polymerase alpha 2, 68 kDa	0,033	0,000	0,540	0,000	0,370
DNA primase, p49 subunit	0,01	0,000	0,661	0,000	0,000
DNA primase, p58 subunit	0,011	0,000	0,358	0,000	0,000
dystrophia myotonica kinase, B15	0,036	0,545	0,295	0,124	0,000
early growth response 1	0,027	0,942	0,458	0,371	0,000
embryonal Fyn-associated substrate	0,014	0,000	0,672	0,354	0,532
enabled homolog (Drosophila)	0,018	0,569	0,000	0,000	0,139
endothelin 3	0,013	0,000	0,191	0,000	0,000
Eph receptor B2	0,021	0,094	0,657	0,346	0,000
epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	0,011	0,000	0,180	0,000	0,000
epoxide hydrolase 1, microsomal	0,011	0,532	0,566	0,091	0,232
estrogen receptor 1	0,047	0,000	0,242	0,000	0,000
eukaryotic translation initiation factor 2B	0,025	0,000	0,459	0,452	0,606
eukaryotic translation initiation factor 4A1	0,023	0,572	0,697	0,077	0,633
fascin homolog 1 (actin bundling protein, Strongylocentrotus purpuratus)	0,014	0,000	0,665	0,362	0,496
Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	0,045	0,000	0,869	0,894	0,912
Fc receptor, IgG, alpha chain transporter	0,011	0,502	0,831	0,299	0,741
Fc receptor, IgG, high affinity I	0,005	0,000	0,665	0,453	0,754
Fc receptor, IgG, low affinity IIb	0,008	0,000	0,801	0,869	0,679
Fc receptor, IgG, low affinity IIb	0,026	0,000	0,465	0,254	0,603
Fc receptor, IgG, low affinity III	0,004	0,000	0,728	0,493	0,741
ferrochelatase	0,042	0,547	0,717	0,208	0,699
fibulin 1	0,008	0,000	0,810	0,000	0,000
follistatin	0,013	0,000	0,516	0,000	0,000
forkhead box K1	0,034	0,345	0,000	0,198	0,000
fos-like antigen 1	0,007	0,000	0,715	0,275	0,300
fos-like antigen 2	0,033	0,470	0,000	0,647	0,000
frizzled homolog 8 (Drosophila)	0,014	0,086	0,411	0,000	0,000
fumarylacetoacetate hydrolase	0,034	0,600	0,761	0,186	0,454

ANHANG

Gene	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
galactosylceramidase	0,041	0,000	0,356	0,000	0,000
gap junction membrane channel protein beta 3	0,023	0,000	0,308	0,000	0,000
GATA-binding protein 6	0,032	0,000	0,491	0,000	0,000
Genomic DNA	0,049	0,142	0,707	0,022	0,590
glucosidase, alpha, acid	0,034	0,251	0,801	0,218	0,000
glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	0,038	0,000	0,162	0,000	0,000
G-protein coupled receptor 25	0,005	0,000	0,000	0,612	0,563
GRO1 oncogene	0,01	0,000	0,366	0,417	0,547
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	0,011	0,000	0,000	0,571	0,000
growth differentiation factor 10	0,008	0,265	0,900	0,421	0,285
guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	0,023	0,232	0,000	0,000	0,000
guanylate kinase membrane-associated inverted 1	0,013	0,169	0,000	0,000	0,000
haptoglobin	0,004	0,000	0,835	0,710	0,859
heat shock protein cognate 70	0,006	0,908	0,829	0,350	0,753
heat shock protein, 60 kDa	0,008	0,464	0,587	0,000	0,678
heat shock protein, 70 kDa 2	0,012	0,441	0,449	0,000	0,000
heat shock protein, 84 kDa 1	0,02	0,562	0,739	0,196	0,715
hemopoietic cell kinase	0,011	0,000	0,209	0,467	0,647
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	0,021	0,885	0,761	0,117	0,685
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	0,047	0,521	0,648	0,034	0,495
histidine decarboxylase cluster	0,04	0,000	0,205	0,824	0,774
histidyl tRNA synthetase	0,007	0,454	0,642	0,157	0,526
hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	0,032	0,147	0,688	0,207	0,384
insulin-like 3	0,007	0,000	0,000	0,300	0,560
insulin-like growth factor 1	0,018	0,262	0,856	0,474	0,586
insulin-like growth factor binding protein 2	0,033	0,665	0,729	0,234	0,523
integrin alpha 3 (Cd49c)	0,013	0,502	0,000	0,000	0,000
integrin alpha 8 (ITA8)	0,015	0,620	0,000	0,000	0,000
integrin alpha L (Cd11a)	0,032	0,000	0,000	0,212	0,000
integrin alpha M (Cd11b)	0,027	0,000	0,269	0,400	0,000
integrin beta 1 binding protein 1	0,037	0,278	0,324	0,005	0,317
integrin beta 2 (Cd18)	0,024	0,000	0,571	0,217	0,836
integrin beta 2 (Cd18)	0,017	0,000	0,665	0,805	0,742
integrin beta 5	0,006	0,654	0,787	0,119	0,683
integrin beta 7	0,013	0,000	0,271	0,694	0,761
interferon activated gene 204	0,006	0,000	0,543	0,000	0,493
interferon regulatory factor 1	0,014	0,203	0,763	0,532	0,814
interleukin 1 beta	0,002	0,000	0,000	0,355	0,618
interleukin 1 beta	0,009	0,000	0,000	0,299	0,584
interleukin 10 receptor, alpha	0,034	0,000	0,469	0,256	0,165
interleukin 10 receptor, beta	0,046	0,000	0,566	0,197	0,436
interleukin 2 receptor, gamma chain	0,035	0,000	0,415	0,483	0,498
interleukin 3 receptor, alpha chain	0,017	0,284	0,664	0,000	0,312
interleukin 4 receptor, alpha	0,016	0,000	0,828	0,653	0,795
interleukin 6	0,007	0,000	0,080	0,752	0,092
interleukin 6 signal transducer	0,014	0,484	0,695	0,000	0,257
interleukin 7 receptor	0,028	0,000	0,000	0,215	0,505
Janus kinase 3	0,012	0,000	0,375	0,289	0,358
kallikrein 8	0,042	0,000	0,602	0,000	0,292
kinesin heavy chain member 1B	0,039	0,078	0,000	0,320	0,000
kit oncogene	0,012	0,000	0,000	0,338	0,441
laminin, beta 2	0,029	0,306	0,000	0,000	0,000
latent transforming growth factor beta binding protein 2	0,02	0,000	0,471	0,466	0,660
leucine arylaminopeptidase 1, intestinal	0,009	0,000	0,548	0,000	0,000
leukemia inhibitory factor receptor	0,007	0,170	0,000	0,000	0,000
ligase I, DNA, ATP-dependent	0,008	0,000	0,685	0,361	0,589
LIM-domain containing, protein kinase	0,043	0,000	0,129	0,000	0,000
lipocalin 2	0,016	0,000	0,607	0,612	0,695
lipopolysaccharide binding protein	0,03	0,000	0,676	0,534	0,739

ANHANG

Gene	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
lymphoblastic leukemia	0,005	0,000	0,639	0,123	0,699
lymphocyte antigen 57	0,032	0,000	0,536	0,000	0,425
lymphoid blast crisis-like 1	0,015	0,565	0,000	0,000	0,000
lysophospholipase 1	0,006	0,000	0,429	0,000	0,000
lysosomal membrane glycoprotein 2	0,008	0,379	0,733	0,106	0,530
lysosomal-associated protein transmembrane 5	0,006	0,000	0,793	0,484	0,507
lysyl oxidase	0,007	0,770	0,756	0,054	0,381
macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin	0,007	0,000	0,548	0,000	0,650
major urinary protein 1	0,027	0,000	0,432	0,000	0,000
mannose receptor, C type 1	0,046	0,000	0,467	0,000	0,000
MAP kinase-activated protein kinase 2	0,016	0,468	0,805	0,511	0,222
matrix metalloproteinase 11	0,007	0,000	0,455	0,000	0,000
matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	0,024	0,069	0,685	0,192	0,351
matrix metalloproteinase 9	0,043	0,000	0,299	0,541	0,527
microtubule-associated protein 5	0,013	0,672	0,420	0,000	0,000
mini chromosome maintenance deficient 5 (<i>S. cerevisiae</i>)	0,016	0,000	0,467	0,375	0,377
mitogen activated protein kinase 3	0,014	0,504	0,819	0,311	0,632
Mpv17 transgene, kidney disease mutant	0,009	0,401	0,786	0,153	0,580
myeloblastosis oncogene-like 2	0,035	0,000	0,471	0,439	0,000
MyoD family inhibitor	0,025	0,000	0,405	0,000	0,000
myomesin 1	0,01	0,684	0,000	0,000	0,000
natriuretic peptide receptor 1	0,043	0,188	0,528	0,000	0,000
nerve growth factor, beta	0,036	0,000	0,160	0,450	0,461
neuropeptide Y receptor Y1	0,005	0,473	0,000	0,000	0,000
nicotinamide nucleotide transhydrogenase	0,02	0,000	0,450	0,000	0,000
Notch gene homolog 3, (<i>Drosophila</i>)	0,029	0,191	0,000	0,000	0,000
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	0,019	0,692	0,600	0,308	0,000
nuclear, factor, erythroid derived 2, like 2	0,038	0,000	0,256	0,433	0,301
oncostatin M	0,007	0,000	0,000	0,498	0,179
opioid receptor, sigma 1	0,032	0,465	0,785	0,252	0,392
ornithine decarboxylase antizyme 2	0,016	0,583	0,777	0,106	0,510
osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	0,045	0,000	0,528	0,000	0,000
osteoglycin	0,011	0,478	0,746	0,000	0,000
P lysozyme structural	0,006	0,000	0,836	0,718	0,807
paired related homeobox 2	0,011	0,000	0,613	0,379	0,317
peptidoglycan recognition protein	0,04	0,000	0,632	0,325	0,574
period homolog (<i>Drosophila</i>)	0,032	0,271	0,000	0,000	0,000
phosphodiesterase 8	0,013	0,000	0,207	0,000	0,000
phosphoglycerate kinase 1	0,024	0,834	0,859	0,302	0,861
phospholipase C, beta 3	0,019	0,230	0,470	0,119	0,100
phospholipid transfer protein	0,011	0,000	0,717	0,569	0,509
platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	0,011	0,250	0,805	0,000	0,201
platelet-activating factor receptor	0,029	0,000	0,660	0,453	0,585
pleiotrophin	0,032	0,000	0,512	0,000	0,000
poly A binding protein, cytoplasmic 1	0,027	0,643	0,729	0,257	0,589
polycystic kidney disease 1 homolog	0,009	0,610	0,658	0,169	0,405
pre B-cell leukemia transcription factor 2	0,012	0,266	0,803	0,592	0,407
preproenkephalin 2	0,007	0,000	0,743	0,186	0,238
procollagen, type V, alpha 2	0,017	0,235	0,689	0,332	0,589
procollagen, type VIII, alpha 1	0,009	0,676	0,661	0,212	0,359
programmed cell death 1	0,032	0,000	0,000	0,269	0,000
prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	0,009	0,779	0,743	0,171	0,479
promyelocytic leukemia	0,038	0,091	0,382	0,341	0,194
proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	0,023	0,000	0,605	0,174	0,064
protein kinase, mitogen-activated 8 interacting protein	0,024	0,221	0,378	0,000	0,000
protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform	0,038	0,079	0,345	0,000	0,220
protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform	0,029	0,210	0,307	0,000	0,247
protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isoform	0,04	0,000	0,468	0,468	0,136
protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	0,016	0,000	0,535	0,203	0,743
proteinase 3	0,008	0,000	0,000	0,477	0,513
Purkinje cell protein 4	0,019	0,606	0,000	0,000	0,000
RAD23a homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	0,023	0,363	0,700	0,188	0,441
radical fringe gene homolog, (<i>Drosophila</i>)	0,041	0,092	0,369	0,000	0,264
receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	0,032	0,108	0,000	0,000	0,000

ANHANG

Gene	p	KO	3 d _{ST}	7 d _{ST}	14 d _{ST}
regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein	0,048	0,204	0,647	0,000	0,000
reticuloendotheliosis oncogene	0,032	0,000	0,000	0,151	0,000
retinol binding protein 4, plasma	0,006	0,662	0,694	0,000	0,156
ribonuclease H1	0,043	0,000	0,658	0,032	0,447
ribonucleotide reductase M1	0,035	0,000	0,495	0,000	0,000
rod outer segment membrane protein 1	0,01	0,391	0,710	0,198	0,499
secreted apoptosis-related protein 1 (SARP1)	0,01	0,112	0,863	0,306	0,398
secreted phosphoprotein 1	0,014	0,000	0,468	0,762	0,447
selectin, endothelial cell	0,027	0,000	0,686	0,329	0,476
selectin, platelet	0,014	0,106	0,742	0,325	0,326
selectin, platelet (p-selectin) ligand	0,005	0,000	0,280	0,785	0,535
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), (semaphorin) 4D	0,047	0,000	0,355	0,706	0,285
serine protease inhibitor 2-2	0,024	0,182	0,784	0,472	0,769
serine/threonine kinase 5	0,005	0,000	0,747	0,139	0,073
serine/threonine kinase 6	0,007	0,000	0,697	0,474	0,730
serum amyloid A 3	0,019	0,000	0,594	0,754	0,903
seryl-aminoacyl-tRNA synthetase	0,029	0,388	0,562	0,000	0,313
short stature homeobox 2	0,018	0,256	0,129	0,000	0,000
signal sequence receptor, delta	0,018	0,145	0,745	0,449	0,662
small inducible cytokine A4	0,018	0,000	0,124	0,534	0,343
small inducible cytokine A7	0,027	0,000	0,401	0,426	0,522
small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 10	0,019	0,000	0,000	0,600	0,761
small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cys), member 9	0,006	0,000	0,000	0,611	0,723
small inducible cytokine subfamily, member 2	0,009	0,000	0,347	0,697	0,479
smoothened homolog (Drosophila)	0,006	0,408	0,750	0,000	0,447
snail homolog, (Drosophila)	0,035	0,000	0,153	0,327	0,000
solute carrier family 12, member 4	0,017	0,245	0,000	0,000	0,000
solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 2	0,027	0,000	0,395	0,000	0,316
solute carrier family 31, member 1	0,016	0,000	0,505	0,254	0,420
solute carrier family 31, member 2	0,038	0,435	0,500	0,000	0,322
sorbitol dehydrogenase 1	0,033	0,127	0,456	0,000	0,230
SRY-box containing gene 18	0,037	0,501	0,715	0,084	0,455
stem-loop binding protein	0,019	0,000	0,465	0,000	0,000
synovial sarcoma, translocated to X chromosome	0,047	0,440	0,525	0,000	0,000
T-box 2	0,004	0,484	0,000	0,000	0,000
TEA domain family member 3	0,036	0,579	0,645	0,000	0,000
thrombopoietin	0,007	0,000	0,243	0,000	0,000
thrombospondin 2	0,012	0,220	0,689	0,000	0,397
thrombospondin 2	0,029	0,013	0,592	0,213	0,566
thymidylate kinase	0,002	0,000	0,380	0,000	0,000
thymine DNA glycosylase	0,01	0,000	0,606	0,000	0,584
thymoma viral proto-oncogene	0,038	0,692	0,877	0,306	0,571
thymus cell antigen 1, theta	0,007	0,117	0,758	0,390	0,000
tissue factor pathway inhibitor	0,029	0,000	0,527	0,059	0,618
tissue inhibitor of metalloproteinase	0,016	0,000	0,868	0,831	0,901
topoisomerase (DNA) III beta	0,012	0,000	0,446	0,000	0,000
transcription factor E2a	0,009	0,273	0,763	0,288	0,310
transcription factor E3	0,005	0,000	0,658	0,256	0,481
transcription factor EC	0,039	0,000	0,410	0,237	0,660
tubulin, beta 4	0,039	0,345	0,627	0,000	0,475
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	0,032	0,000	0,000	0,298	0,552
ubiquitin c-terminal hydrolase related polypeptide	0,004	0,000	0,571	0,000	0,000
upstream transcription factor 2	0,009	0,346	0,668	0,036	0,443
uridine monophosphate synthetase	0,003	0,000	0,272	0,000	0,000
uridine phosphorylase	0,015	0,000	0,376	0,281	0,572
vascular endothelial growth factor C	0,029	0,000	0,273	0,000	0,000
vinculin	0,011	0,879	0,581	0,199	0,473
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein K (avian)	0,015	0,338	0,000	0,000	0,000
Wiskott-Aldrich syndrome protein	0,037	0,000	0,393	0,000	0,000
yes-associated protein, 65 kDa	0,043	0,330	0,423	0,119	0,483

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der unoperierten Kontrolle (n=5), der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5), der 7 d_{ST}-Gruppe (n=5), und der 14 d_{ST}-Gruppe (n=5) normalisiert auf das mRNA-Expressionslevel der drei Housekeeping-Gene. p= Signifikanz.

Tabelle 50: Alphabetische Auflistung der differentiell regulierten Gene des Vergleichs der 3d STENOSE- und der 3d RAPAMYCIN-Gruppe.

Gene	p	3 d _{ST}	3 d _{RA}
3-phosphoglycerate dehydrogenase	0,044	0,434	0,000
abl-interactor 1	0,044	0,426	0,116
activating transcription factor 3	0,029	0,645	0,000
activating transcription factor 3	0,004	0,370	0,000
adaptor protein complex AP-2, alpha 1 subunit	0,048	0,730	0,285
alpha-2-HS-glycoprotein	0,018	0,414	0,000
ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	0,018	0,526	0,000
avian erythroblastosis oncogene B 2	0,024	0,291	0,000
Bcl-associated death promoter	0,018	0,756	0,000
bone morphogenetic protein 6	0,024	0,362	0,000
carbonic anhydrase 4	0,029	0,000	0,680
caspase homolog	0,04	0,469	0,000
cathepsin C	0,024	0,654	0,000
cell division cycle 25 homolog B (S. cerevisiae)	0,016	0,308	0,000
cell division cycle 71 homolog (S. cerevisiae)-like 1	0,048	0,153	0,000
chemokine (C-C) receptor 2	0,029	0,238	0,832
chemokine (C-C) receptor 2	0,032	0,000	0,639
chemokine (C-X-C) receptor 4	0,008	0,458	0,000
chloride ion current inducer protein (CLCI)	0,016	0,538	0,104
clone IMAGE:1382982	0,048	0,513	0,000
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	0,008	0,618	0,000
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	0,048	0,523	0,000
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	0,008	0,481	0,000
DNA polymerase alpha 2, 68 kDa	0,04	0,540	0,000
dodecenoyl-Coenzyme A delta isomerase (3,2 trans-enoyl-Coenzyme A isomerase)	0,014	0,366	0,000
dual specificity phosphatase 2	0,048	0,238	0,000
early growth response 1	0,028	0,458	0,080
ELK1, member of ETS oncogene family	0,024	0,390	0,000
embryonal Fyn-associated substrate	0,048	0,672	0,261
Eph receptor B2	0,008	0,657	0,000
ephrin B1	0,048	0,426	0,995
FBJ osteosarcoma oncogene	0,032	0,453	0,066
fibroblast inducible secreted protein	0,04	0,000	0,686
FMS-like tyrosine kinase 1	0,024	0,115	0,000
follistatin	0,008	0,516	0,000
frizzled homolog 8 (Drosophila)	0,004	0,411	0,000
gap junction membrane channel protein alpha 5	0,004	0,460	0,000
gap junction membrane channel protein beta 3	0,04	0,308	0,000
insulin-like growth factor binding protein 2	0,016	0,729	0,000
lectin, galactose binding, soluble 7	0,024	0,154	0,000
ligase I, DNA, ATP-dependent	0,008	0,685	0,000
manic fringe homolog (Drosophila)	0,016	0,226	0,000
mesenchyme homeobox 2	0,048	0,000	0,187
mini chromosome maintenance deficient 2 (S. cerevisiae)	0,024	0,527	0,000
mini chromosome maintenance deficient 5 (S. cerevisiae)	0,016	0,467	0,000
natriuretic peptide receptor 1	0,04	0,528	0,000
nerve growth factor, beta	0,024	0,420	0,000
nerve growth factor, beta	0,024	0,160	0,000
nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	0,029	0,600	0,102
phospholipase C, beta 3	0,008	0,470	0,180
plasminogen activator, tissue	0,008	0,628	0,000
polycystic kidney disease 1 homolog	0,012	0,658	0,000
proliferation-associated protein 1	0,044	0,320	0,050
radical fringe gene homolog, (Drosophila)	0,004	0,369	0,000
selectin, endothelial cell	0,014	0,686	0,000
sema domain, immunoglobulin domain (Ig), (semaphorin) 4B	0,044	0,350	0,000
serine/threonine kinase 5	0,044	0,747	0,261
small inducible cytokine A9	0,016	0,000	0,518
snail homolog, (Drosophila)	0,04	0,153	0,000
thrombomodulin	0,048	0,361	0,000
thymidylate kinase	0,016	0,380	0,000
thyroid autoantigen 70 kDa	0,008	0,598	0,000
tubulin cofactor a	0,014	0,000	0,412
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	0,024	0,688	0,000
uridine phosphorylase	0,008	0,376	0,000
zinc finger protein 144	0,048	0,507	0,000

Das Expressionsmuster jedes Genes ist in einem horizontalen Balken dargestellt. Die Spalten repräsentieren den Median des mRNA-Expressionslevels der 3 d_{ST}-Gruppe (n=5), der 3 d_{RA}-Gruppe (n=5) normalisiert auf das mRNA-Expressionslevel der drei Housekeeping-Gene. p= Signifikanz.

12 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher möchte ich ganz herzlich für die Überlassung der Arbeit am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. habil. D. Zohlnhöfer für die interessante Themenstellung und intensive Betreuung bei der Durchführung des Projekts.

Genauso bedanke ich mich bei Herrn T. Nührenberg für seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt bedanke ich mich für seine Hilfsbereitschaft und der sorgfältigen Durchsicht der Dissertation.

Frau Anja Huth möchte ich meinen herzlichen Dank für ihre tatkräftige Unterstützung und gute Zusammenarbeit aussprechen.

Desgleichen möchte ich Frau C. Seyboth für die kollegiale Zusammenarbeit danken.

Am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Brandl für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, bei Herrn Dr. med. Thomas Richter und Frau Dr. med. Martina Rudelius für die kompetente fachliche Betreuung und bei Frau Renate Hegenloh für die Einarbeitung und Unterstützung bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. med. vet. F. Wegener für ihre hervorragende Einarbeitung.

Bei den Tierpflegerinnen und Tierpflegern möchte ich mich für die intensive und verantwortungsvolle Betreuung der Tiere bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir die Durchführung der Arbeit ermöglicht haben. Bei meinem Bruder und meinen Freunden möchte ich für ihr Verständnis und ihren Beistand bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

13 LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 19. April 1977

Eltern: Herr Dr. Karlheinz Frank und Frau Ursula Frank, geb. Karg

Geburtsort: Weißenburg/Bay.

Familienstand: ledig

Ausbildung:

1983 – 1986 Volksschule Weißenburg/Bay.

1987 – 1996 Werner-von-Siemens-Gymnasium Weißenburg

1996 Auszeichnung mit dem Carl-Friedrich-Martius-Umweltpreis der GSF

Allgemeine Hochschulreife

11/1996 - 02/2002 Studium der Tiermedizin an der Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und Abschluss mit dem III. Staatsexamen

03/2002 Approbation als Tierärztin

Seit 04/2002 Promotion am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München

Kollegiatin im Graduiertenkolleg 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Ludwig – Maximilians – Universität – München