

Einfluß der zyklischen mechanischen Dehnung auf humane Gefäßzellen aus der Tunica media von der Vene, Arterie und Aorta

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Dirk Neubert

Geburtsdatum / Geburtsort

13. Februar 1976 / Leipzig

angefertigt an / in:

Universität Leipzig / Medizinische Fakultät

Klinik für Herzchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. F.W. Mohr)

Betreuer:

Prof. Dr. med. Stefan Dhein

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.11.2015

Bibliographische Beschreibung

Neubert, Dirk

Einfluß der zyklischen mechanischen Dehnung auf humane Gefäßzellen aus der Tunica media von der Vene, Arterie und Aorta

Universität Leipzig, Dissertation

89 Seiten, 180 Literaturangaben, 22 Abbildungen, 12 Tabellen

Referat:

Die arteriosklerotische Gefäßerkrankung nimmt einen immer größeren Stellenwert in der medizinischen Behandlung ein. Weiterhin bestehen viele Unklarheiten über die Vorgänge in den Gefäßwänden. Es gibt nur eine kleine Zahl an Zellkulturuntersuchungen über humane Gefäßzellen. Diese Arbeit beschäftigte sich zunächst mit der Erarbeitung eines Protokolls zur Zellisolation von humanen Gefäßzellen speziell aus der Tunica media der Arterie, der Vene und der Aorta unter Verwendung der Gewebeverdauung und weniger Zellreplikationszyklen, um abnorme Zellveränderungen zu vermeiden. Im Folgenden wurden erstmalig Veränderungen der Proteinexpressionen von α -SM Aktin, Prolyl-4-Hydroxylase, Decorin und Kollagen I unter statischen Bedingungen und zyklischer mechanischer Dehnung beobachtet, um den Fragen nach Gefäßwandreaktionen zum Beispiel nach Bypassoperationen nachzukommen. Hierzu wurden die Experimente mit Hilfe einer *Flexercell strain unit* durchgeführt und die Zellkulturen unter Zellkulturbedingungen auf *Bioflex*-kollagenbeschichtete Platten einer Dehnung von 10%, 0.5 Hz, 24 und 96 Stunden ausgesetzt. Des Weiteren wurden Betrachtungen über Gefäßzellen aus aneurysmatischen Aorten durchgeführt. Die Proteinanalyse erfolgte mittels *Western Blot*.

Aus den Ergebnissen läßt sich folgern, dass eine fehlende zyklische mechanische Dehnung eine Phänotypänderung der arteriellen Gefäßzellen von kontraktilen hin zum sekretorischen und proliferativen Typ bewirkt. Konträr verhält es sich unter Vorliegen einer solchen mechanischen Dehnung wie der pulsatischen Wanddehnung. Das Verhalten der arteriellen Gefäßzellen unter reduzierter oder fehlender pulsatilem Wanddehnung könnte eine wichtige Ursache für das Auftreten einer Mediahyperplasie und folgend für die teils rasche Progredienz von Arteriosklerose darstellen. In den Gefäßzellen der Venen konnte unter Zellkulturdehnung eine starke Zunahme der extrazellulären Matrix und die Begünstigung des sekretorischen und damit proliferativen Typs beobachtet werden. Dieser Sachverhalt sollte eine Erklärung für die höhere Stenoseneigung durch Gefäßwandhyperplasie und Hypertrophie in arterialisierten Venen sein.

Es fand sich in den isolierten Zellen aus aneurysmatischen Aortenresektionen ein deutlich reduzierter Decorin Gehalt in den Zellen aus der medialen Gefäßschicht. Eine Dysbalance zwischen der Kollagenfibrillogenese und Decorin bzw. eine Progression des Decorinmangels könnte aneurysmatische Gefäßveränderungen oder Gefäßwanddissektionen durch Destabilisierung der Kollagenpolymerisation einhergehend mit Funktionsverlust der Kollagenfasern bewirken.

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. EINLEITUNG	
1.1. Gefäßaufbau und Funktion	1
1.2. Vaskuläre glatte Muskelzellen	3
1.3. Vaskuläre extrazelluläre Matrix	7
1.3.1. Strukturelle Integrität der ECM	7
1.3.2. Integrine	8
1.3.3. Kollagen	9
1.3.4. Prolyl-4-Hydroxylase	11
1.3.5. Proteoglykane und Decorin	11
1.4. Mechanische Dehnung	13
1.5. Mechanotransduktion	15
1.6. Ziel der Arbeit	17
2. MATERIAL UND GERÄTE	18
2.1. Reagenzien	18
2.2. Standardpuffer	19
2.3. Nährmedien und Substratlösungen für Zellkultur	19
2.4. Kommerzielle Assay-Systeme, Kits und Proteinmarker	19
2.5. Antikörper	20
2.6. Geräte	21
2.7. Verbrauchsmaterialien	22
2.8. Software	23
3. METHODEN	24
3.1. Herkunft des humanen Gefäßmaterials	24
3.2. Zellkultur	25
3.2.1. Präparation der Gefäße und Isolierung der Zellen mittels Kollagenaseverdau	25
3.2.2. Allgemeine Zellkultur	27
3.2.3. Zellkulturmedien	27
3.2.4. Passagieren der Zellen	27
3.2.5. Vitalitätsbestimmung und Zellzählung	28
3.2.6. Ausschluß signifikanter EC Kontaminierung	28
3.3. Zyklische mechanische Dehnung der Zellkulturen	29
3.3.1. Zellkulturen auf Bioflexmembran	29
3.3.2. Dehnungsapparatur – <i>Flexercell strain unit</i>	29
3.4. Immunhistochemie	31
3.5. Proteinanalyse	32
3.5.1. Proteinextraktion und Homogenisierung	32
3.5.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	32
3.5.3. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	32

3.5.4.	Western Blot Analyse	34
3.5.4.1.	Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran	34
3.5.4.2.	Immunoblotting	35
3.5.5.	Densitometrie	36
3.5.	Auswertung und Statistik	36
4.	ERGEBNISSE	37
4.1.	Charakterisierung der Zellkultur	38
4.1.1.	Lichtmikroskopische Darstellung	38
4.1.2.	Immunzytochemische Darstellung der Markerproteine	38
4.1.3.	Quantifizierung der Markerproteine in den Zellkulturen vor der zyklischen mechanischen Dehnung	43
4.2.	Einfluß der zyklische mechanische Dehnung auf die Synthese der Markerproteine	49
4.2.1.	Zellzahlbestimmung und Vitalitätsrate	49
4.2.2.	α -smooth muscle Aktins: Geringe Differenzen im Expressionsverhalten	49
4.2.3.	Prolyl-4-Hydroxylase: Stärkste Expression der in den Zellen aus der T. media der Vene	51
4.2.4.	Kollagen I: Steigerung der Biosynthese in allen Zellkulturen	53
4.2.5.	Decorin: Abnahme der Expression in der Zellen aus der T. media der Arterie und Zunahme in der Zellen aus der T. media der Vene.	55
5.	DISKUSSION	57
5.1.	Basale Expression der Markerproteine	60
5.2.	Zyklisch mechanische Dehnung	61
5.2.1.	Dehnungsimpuls mit unterschiedlichen Effekten auf Vene und Arterie	61
5.2.2.	Einordnung der Ergebnisse in die Literatur unter Berücksichtigung unterschiedlicher Zellkulturstimulationen.	63
5.3.	Klinische Relevanz der zyklisch mechanischen Dehnung	65
5.3.1.	Mediahyperplasie in der Gefäßwand	66
5.3.2.	Arteriosklerose, periphere arterielle Verschußkrankheit	66
5.3.3.	Stentgraft-Restenosen	67
5.3.4.	Anastomosenstenosen	67
5.3.5.	Gefäßwandrestenosen	67
5.3.6.	Venenbypassstenosen	67
5.3.7.	Shuntvenenstenosen	68
5.3.8.	Chirurgie <i>versus</i> Stenting	68
5.3.9.	Periphere Vasodilatation als PAVK-Protektion?	68
5.4.	Decorin	69
5.4.1.	Arterie versus Vene	69
5.4.2.	Aortenaneurysma	72
6.	ZUSAMMENFASSUNG	74
7.	LITERATURVERZEICHNIS	77
8.	ANHANG	86

α -SM-Aktin	<i>α-smooth muscle aktin</i>
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CABG	<i>Coronary Artery Bypass Graft</i>
DCN	Decorin
ECM	<i>Extracellular Matrix</i> (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylenediamminetetraacetat
EGF	<i>Endothelial Growth Faktor</i>
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinases</i>
FAK	<i>Fokal adhaension kinase</i>
FBS	<i>Fetale bovine serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Faktor</i>
hFGF-b	<i>human recombinant Fibroblast Growth Faktor basic</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IGF-I	<i>Insulin-like Growth Faktor</i>
kDa	kiloDalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteasen
p38	<i>protein 38 mitogen-activated protein kinase</i>
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBST	PBS+ Tween®20
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Faktor</i>
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
Rac	protein kinase B, entspricht AKT1, Unterfamilie Rho-GTPasen
Ras	<i>Proto-Onkogen Rat Sarcoma</i> , kleine GTP-ase
Rho	kleine GTP-ase
SAC	<i>Stretch Activated Ion Channel</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMC	<i>Smooth Muscle Cells</i>
SLRP	<i>small leucine rich-repeat proteoglycan</i>

T.	Tunica , Gefäßschicht
TBS	Tris <i>Buffered Saline</i>
TBST	TBS + Tween®20
TEMED	<i>N,N,N',N'</i>-Tetramethyldiamin
TGF- β 1	<i>Tumor Growth Faktor – β 1</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
SV-SMCs	<i>Saphena Vena – Smooth Muscle Cells</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vs.	<i>versus</i>
VSMC	<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i> (glatten Gefäßmuskelzellen)

1. Einleitung

Die atherosklerotisch-kardiovaskulären Erkrankungen sind die häufigste Ursache von Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt [2]. Der Begriff Atherosklerose besteht aus den griechischen abgeleiteten Bestandteilen *Athaera* (Grütze), *Oma* (Masse) und *skleros* (hart). Atherosklerose ist zudem die zugrunde liegende Pathologie in einer überwiegenden Anzahl von peripheren Gefäßerkrankungen. Die allgemein akzeptierten Theorien der Atherogenese beinhalten die endotheliale Dysfunktion, die abnormale Lipid-Retention, den oxidativen Stress, Inflammation sowie die Dysregulation der Zellphänotypänderung und der extrazellulären Matrix. Trotz intensiver Forschung sind viele Aspekte dieser komplexen Krankheit nicht endgültig geklärt [3].

Eine wesentliche Rolle nehmen bei vaskulären Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Atherosklerose, Gefäßaneurysmata oder –dissektionen oder bei Komplikationen wie Restenosen nach Koronarangioplastien und diverser Bypassoperationen die glatten Gefäßmuskelzellen ein [3]. Diese Zellen sind ein wichtiger Bestandteil der Arterien, Venen und kleinen Blutgefäße, den Arteriolen. Ihre Hauptfunktion ist die Erhaltung des Gefäßtonus und die Regulierung des Blutdrucks und Blutflussvolumen über koordinierte Vasokonstriktion und Vasodilatation. Zusätzlich zu ihrer Kontraktilität besitzen die Muskelzellen die Fähigkeit zur Migration, Proliferation und Produktion von extrazellulärer Matrix. Diese Eigenschaften sind essentiell für die Reaktion auf eine Beschädigung der Gefäßwand und für eine Anpassung an physiologische oder pathologische Belastungen. Aufgrund ihrer Verbindung mit den erwähnten Gefäßpathologien wurden ihre Eigenschaften intensiv studiert. Rückblickend haben die meisten Studien vaskuläre glatte Muskelzellen nicht-menschlicher Quellen verwendet. In den letzten Jahren wurde von verschiedenen Wissenschaftlern versucht, die an Tierzellen beobachteten Effekte an humanen Zellen nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit sollen weitere Erkenntnisse über humane Gefäßzellen aus der Muskelschicht (*Tunica media*) von Venen, Arterien und Aorta in Bezug auf die Expression von extrazellulärer Matrix in Abhängigkeit einer zyklischen mechanischen Dehnung gewonnen werden.

1.1. Gefäßaufbau und Funktion

Großlumige elastische Gefäße wie z.B. die Aorta oder muskuläre Arterien wie z.B. die Unterarmarterie (Radialarterie) bestehen aus drei Schichten, bekannt als *Tunicae*, welche in der Abbildung 1 schematisch dargestellt sind.

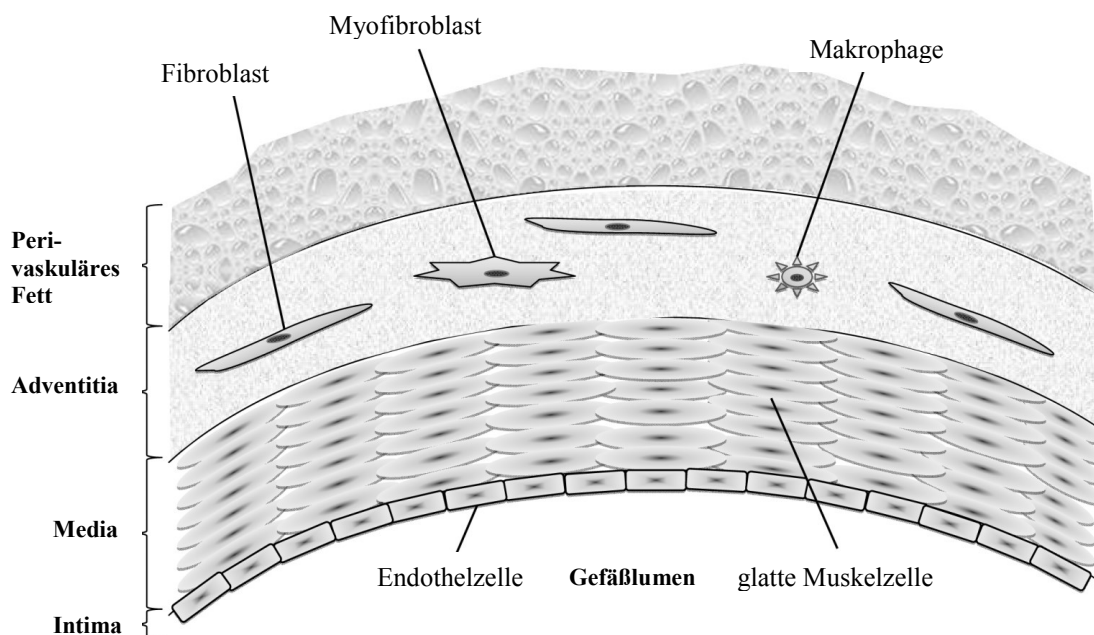


Abbildung 1. Schematischer Aufbau einer Gefäßwand (modifiziert nach [4])

Die lumenseitig innerste Schicht, die Tunica intima, besteht aus Endothelzellen, welche an einer Basalmembran haften. Diese wiederum steht in Verbindung mit dem schmalen subendothelialen Raum, in welchem sich vorrangig extrazelluläre Matrix befindet. Die Intima fungiert als eine glatte, nicht-thrombogene Oberfläche und als eine Permeabilitätsbarriere. Des Weiteren beeinflusst diese Schicht die Gerinnungs- und Entzündungsprozesse, die Angiogenese sowie die Regulation des Tonus der Gefäßmuskulatur über Substanzen wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO). Die mittlere Schicht, die Tunica media, wird hauptsächlich von in Umfangsrichtung angeordneten glatten Muskelzellen zusammengesetzt, welche in eine Kollagen-, Elastin- / Fibrillin- und Proteoglykan-reiche extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Ihre Aufgabe ist es, über den Verbund mit den Muskelzellen den Gefäßtonus zu regulieren. Die strukturelle Integrität der Media bewirkt zum einen eine nichtlineare Elastizität durch Versteifung bei steigendem Druck, um die Wand vor einem Bruch zu bewahren und zum anderen bewirkt sie einen hoch elastischen Wandeffekt. Dieser führt durch Rückfederung zur Abmilderung und Speicherung der abrupt freigesetzten Energie in der systolischen Phase und in Folge zu einer verzögerten Freisetzung während der Diastole. In den herznahen Gefäßen wird dies als Windkesselleffekt oder biologische Windkesselfunktion bezeichnet.

Die äußere Schicht, die Tunica adventitia, besteht in erster Linie aus Fibroblasten, welche in Längsrichtung innerhalb einer kollagen- und elastinhaltigen Matrix angeordnet sind. Die Adventitia stellt den Übergang von der Gefäßwand zum lockeren perivaskulären Stützgewebe dar. Sie wird durch die äußere elastische Lamina von der Media getrennt werden. Die äußere Media

und die Adventitia werden nicht per Diffusion aus dem Gefäßlumen versorgt, sondern sie besitzen ein eigenes Gefäßnetz, die *Vasa vasorum*. Hierüber können z.B. inflammatorische Zellen und deren Botenstoffe direkt in die äußere Gefäßwandschicht infiltrieren. Das perivaskuläre vegetative Nervensystem liegt dem adventitiellen Gewebe auf und besitzt Kontakt bis in die äußere Media. Ferner ist die Adventitia nicht nur ein ruhendes Übergangsgewebe, sondern ist ebenfalls aktiv am Remodeling der Gefäßwand in Antwort auf humorale und nervale Stimuli sowie nach Gefäßwandverletzung beteiligt [5].

1.2. Vaskuläre glatte Muskelzellen

Die glatte Muskulatur wird als „glatt“ bezeichnet, weil bei lichtmikroskopischer Betrachtung keine Querstreifung wie bei Skelettmuskulatur zu beobachten ist. Die vaskulären glatten Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) finden sich hauptsächlich in der Tunica media der Gefäßwände und stellen in dieser Gewebeschicht die dominante Zellart dar [6]. Verknüpft durch besondere Zellkontakte, den Desmosomen, welche die einzelnen Muskelzellen mechanisch verbinden, bilden sie mit den Fibrillen der extrazellulären Matrix ein dichtes Netzwerk. Sie sind über Nexus oder Gap Junctions elektrisch miteinander zu funktionellen Einheiten gekoppelt. Die Gefäßzellen besitzen einen Basaltonus, welcher sich aus einem spontanen myogenen Tonus sowie einem neurogenen Muskeltonus ergibt. Letzterer wird über vegetative Nervenfasern in der Tunica adventitia moduliert, der Einfluß auf die adventianahen VSMC's ausübt [6].

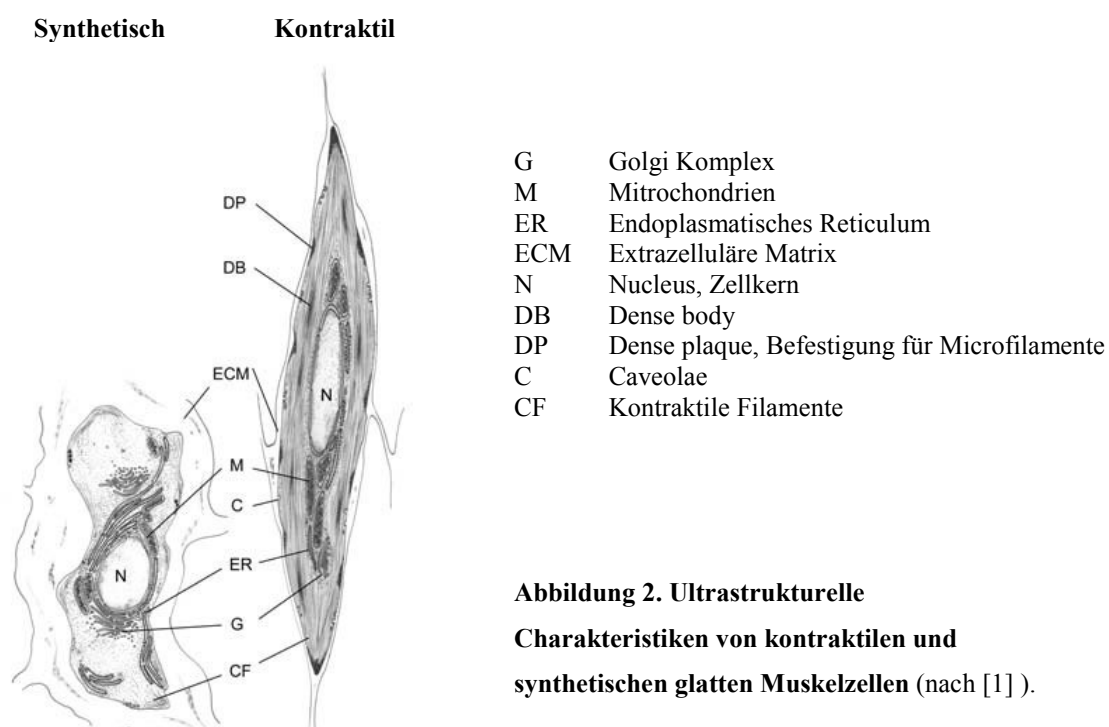
Die vaskulären glatten Muskelzellen besitzen Aktin- und Myosinfilamente sowie Intermediärfilamente aus der Gruppe der Desmine. Ein einzelnes Myosinfilament wird dabei von 2 bis 10 Aktinfilamenten zu einer Art „Bündel“ gruppiert. Die Aktin- und Intermediärfilamente befestigen sich an sogenannten „dense bodies“ (intrazelluläre Verdichtungszone) bzw. „dense plaques“ (Anhaftungsstelle an der Zellwand). In den glatten Muskelzellen ist das *smooth muscle alpha aktin* (α -SMA) die prädominante Isoform der Aktine [6,7].

Die Kontraktion einer Zelle auf Grundlage des „Querbrücken-Zyklus“ (Greifloslass-Zyklus) wird durch eine steigende intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration initiiert. Drei Mechanismen können diesen Anstieg bewirken: Die elektromechanische Kopplung führt durch Aktionspotentiale oder länger anhaltende Depolarisation der Zellmembran zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle. In der pharmakomechanischen Kopplung reagieren rezeptorgesteuerte Kalziumkanäle auf Botenstoffe wie Noradrenalin aus vegetativen Nervensystem, Acetylcholin, Angiotensin II und Histamin. Zudem können rezeptorvermittelt weitere Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Reticulum freigesetzt werden. Und drittens bewirkt die mechanische Dehnung direkt die Öffnung

dehnungsabhängiger Kalziumkanäle oder indirekt einen Kalziumeinstrom über Integrinabhängige Signalkaskaden [6]. Im Vergleich zu den quergestreiften Muskelzellen verläuft dieser „Querbrücken-Zyklus“ deutlich langsamer und energiesparender, so dass die glatten Muskelzellen für eine ausdauernde Haltefunktion geeignet sind.

Studien, insbesondere an Zellen von Nagern wie Ratten, Mäuse und Kaninchen, haben gezeigt, dass vaskuläre glatte Muskelzellen extrem veränderbar sind und eine Reihe von unterschiedlichen Morphologien und Genexpressionsprofile mit verschiedenen Zellfunktionen aufweisen. Diese „phänotypische Vielfalt“ ist offensichtlich während der Angiogenese und wiederholt sich im Verlauf einer Gefäßerkrankung [3].

In gesunden Gefäßen existieren VSMC hauptsächlich in der Media und liegen in einem kontraktilem Phänotyp vor, welcher für Wachstumsfaktoren für z.B. Migration und Proliferation kaum sensitiv ist. Allerdings sind VSMC nicht ausdifferenziert und können ihren Phänotyp abhängig von den wechselnden Anforderungen ändern. Sie weisen eine Bandbreite an Phänotypen zwischen differenziert (kontraktile) und dedifferenziert (synthetisch) auf [8,9,10,11,12,13]. In Abbildung 2 sind schematisch eine kontraktile und synthetische Zelle gegenübergestellt.



In Vivo sind sie daher in der Lage, auf Veränderungen des Umfeldes wie erhöhter Dehnungsreiz nach Angioplastie, Arterialisierung eines Venenbypasses oder Hypertonie sowie im Verlauf arteriosklerotischer oder entzündlicher Veränderungen zu dedifferenzieren, zu migrieren und proliferieren [14,15,16,17,18,19,20,21,22]. Eine gesteigerte Proliferation und Proteinsynthese sowie die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber autokrin, parakrin und endokrin sezernierten Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- β 1 und IGF-I ist charakteristischer für den sekretorischen Phänotyp [12,16,23,24,25,26].

Generell haben dedifferenzierte VSMC einen geringeren Anteil an kontraktile Proteinen, enthalten weniger Myofilamente wie Myosin, Aktin und Caldesmon, besitzen jedoch mehr synthetische Organellen wie das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien [27,28,29,30]. Durch die Ausrichtung der intrazellulären Filamente bekommt der kontraktile Zelltyp sein spindelförmiges Aussehen.

In Abbildung 3 sind die Expressionsunterschiede einiger Gene abhängig vom Phänotyp glatter Muskelzellen schematische dargestellt. So findet sich z.B. die muskuläre Isoform des Caldesmon (*h-caldesmon*) in der differenzierten, kontraktile Zelle. Im synthetischen Zelltyp wurde eine andere weniger aktive Isoform, das *l-caldesmon*, gefunden. Caldesmon ist ein intrazelluläres Protein im Myosinkopf von glatten Muskelzellen und verhindert die Assoziation von Aktin und Myosin. Steigt die intrazelluläre Konzentration von Kalzium an, so bildet sich ein Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex, welcher Caldesmon bindet und so aus dem Myosinkopf verdrängt. Die Zellkontraktion wird ausgelöst. Ein anderes Beispiel für den synthetischen Zelltyp ist die verstärkte Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen oder Metalloproteasen (MMP).

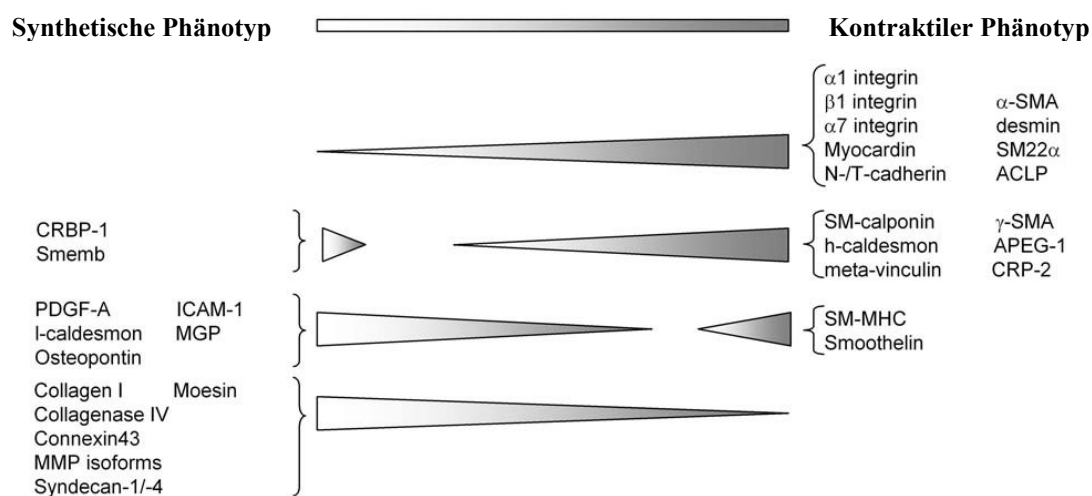


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Expressionsunterschiede einiger Gene abhängig vom Phänotyp einer glatten Muskelzelle (nach [1]).

Es ist im Allgemeinen anerkannt, dass nach einer Schädigung der Intima die Endothelzellen, Thrombozyten und inflammatorische Zellen Mediatoren wie Wachstumsfaktoren freisetzen. Diese induzieren eine Änderung des Phänotyps von glatten Muskelzellen vom kontraktilen in den synthetischen Zustand und folgend eine gesteigerte Produktion von extrazellulärer Matrix sowie eine gesteigerte Proliferation und Migration der Zellen aus der Media in die Intima [31]. Die Faktoren, die zum Übergang von kontraktile zu sekretorisch führen können, sind in Abbildung 4 schematisch zusammengefaßt. Hierzu gehören z.B. die parakrinen Wachstumsfaktoren, die Stickstoffmonoxidproduktion (NO) der Endothelzellen aufgrund Scherspannungen oder die mechanische Dehnung der glatten Muskelzellen, welche über den mechanischen Zug der extrazellulären Matrix vermittelt werden kann.

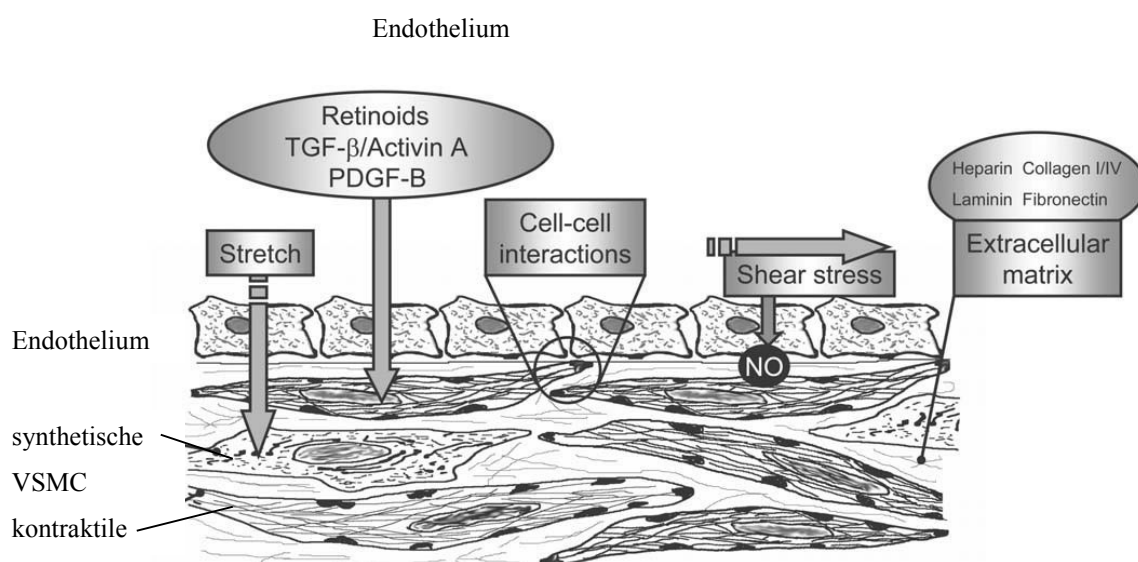


Abbildung 4. Darstellung verschiedener Faktoren, welche Einfluß auf die SMC Entwicklung, Differenzierung und Phänotypmodulation haben (nach [1]).

Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass VSMC mit gesteigerter synthetischer Aktivität in intimaler Hyperplasie wie auch in fortgeschrittener arteriosklerotischer Läsion lokalisiert sind. Dies deutet darauf hin, dass die synthetischen VSMC für die Produktion der extrazellulären Matrix verantwortlich sind [32]. Eine gesteigerte Proliferation und Proteinsynthese sowie die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber autokrin, parakrin und endokrin sezernierten Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF-β 1 und IGF-I ist charakteristisch für den sekretorischen Phänotyp [12,16,23,24,25,26].

1.3. Die vaskuläre extrazelluläre Matrix

1.3.1. Strukturelle Integrität der extrazellulären Matrix

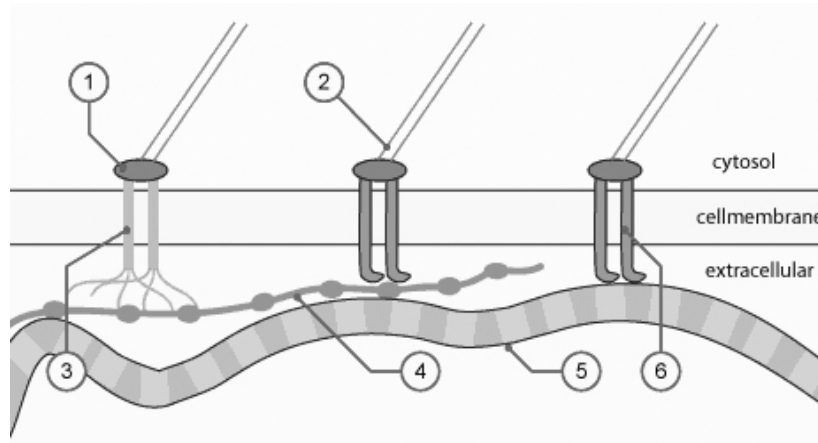
Die vaskuläre extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) bietet die unmittelbare Umgebung für verschiedene Zelltypen in der Gefäßwand. Aufgrund ihrer Nähe und komplexen Struktur spielen verschiedene Komponenten der ECM eine wichtige und aktive Rolle in der Migration, der Proliferation und der Apoptose von endothelialen und entzündlichen Zellen sowie von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC).

Zusammen mit den Zellen stellt die Matrix das organische Gewebe dar. Hauptbestandteile der ECM sind unterschiedliche Moleküle wie die Strukturproteine (z.B. Kollagene I / III und Elastin), die Adhäsionsproteine (z.B. Fibronectin und Laminin) und die Proteoglykane. Letztere sind Molekülkomplexe aus Kohlenhydraten (ca 95%) und Proteinen (5%). Die Hyaluronsäure bildet hierbei das Gerüst, an welchem Seitenketten aus Glykosaminoglykanen angelagert sind. Deren starke negative Ladung bedingt eine hohe Wasserbindung und damit den raumfüllenden Effekt. Die vaskulären glatten Muskelzellen sind in die ECM eingebettet und für deren Synthese und Organisation sowohl während der Angiogenese als auch im ausdifferenzierten Gefäß verantwortlich. Das Kollagen in der Arterienwand hat beispielsweise eine Halbwertszeit von 60-70 Tagen [33]. Neben der Synthese dieser Komponenten sind die VSMC auch für den Abbau der Matrix verantwortlich. Darin involviert sind eine Vielzahl von Enzymen, bekannt als Matrix-Metalloproteinasen (MMP), zu denen Kollagenasen, Gelatinasen, Stromolysine, Metalloelastase und Membrantyp-Matrixmetalloproteinasen (MT-MMP) gehören, welche von den VSMC synthetisiert und sezerniert werden [34]. Der Auf- und Abbau der ECM unterliegt einem sensiblen Gleichgewicht, welches z.B. bei aneurysmatischen Erkrankungen gestört ist. Dieser Einfluß auf die Zusammensetzung der ECM befähigt die VSMC, auf Veränderungen in der Gefäßwand wie durch Verletzungen, Entzündungen oder Ablagerungen adäquat zu reagieren [32,35]. Die MMP's können wiederum durch gewebeständige TIMP's gehemmt werden. Somit ergibt sich ein komplexes Netz von Regulationsmöglichkeiten [36].

Die ECM hat neben ihrer Stützfunktion auch die Aufgabe, die einzelnen Zellen voneinander abzugrenzen. Über ihre Adhäsionen mit den Zellen werden diese ebenso mechanisch miteinander verbunden. Indem sie die benachbarten vaskulären glatten Muskelzellen physikalisch verkettet, sichert die extrazelluläre Matrix die strukturelle Integrität der Media. Die Bindung erfolgt über ECM-Rezeptoren an der Zelloberfläche und kommt entweder direkt durch Interaktion des Rezeptors mit bestimmten ECM-Komponenten (z.B. Integrinen, fokalen Adhäsionen) oder durch Vermittlung zwischengeschalteter Adhäsionsproteine (z. Bsp. Fibronectin, Laminin) zustande [37,38,39,40,41].

Diese Zell-Matrix-Verbindungen dienen der mechanischen Verankerung der Zellen, siehe dazu Abbildung 5.

Im Folgenden soll auf einzelne Komponenten der ECM genauer eingegangen werden.



- | | |
|------------------|--|
| 1 Adapterprotein | 4 Fibronectin |
| 2 Aktinfilamente | 5 Kollagenfibrille |
| 3 Syndecan | 6 Integrine mit einer α - und β - Kette |

Abbildung 5. Schematische Darstellung der Zell-Matrix-Verbindung (nach [42]).

1.3.2. Integrine

Der Kontakt des Zytoskeletts mit den Proteinen der ECM wird in der Gefäßwand hauptsächlich über transmembranäre Integrine vermittelt. Sie sind somit wichtiger Bestandteil der Mechanotransduktion. Integrine sind Heterodimere und setzen sich jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen. Diese Untereinheiten liegen in ca. 30 verschiedenen Isoformen vor, die sich in ihrer Bindungsfähigkeit zu ECM-Proteinen unterscheiden. Die β -Untereinheit ist auf der intrazellulären Seite über Adapterprotein (z.B. Talin, α -Aktinin, Filamin und Vinculin) an Aktinfilamente gekoppelt. In dieser adhärennten Zone finden sich ferner viele signalübertragende Kinasen wie FAK oder Tyrosinkinase Src, auf welche im Folgenden im Kapitel 1.5 noch näher eingegangen wird [43].

Die Integrine dienen nicht nur als eine mechanische Verbindung zwischen Extrazellulärmatrix und Zytoskelett. Es wurden hochspezifische Funktionen für zahlreiche der Integrinkombinationen gefunden. Hierzu zählen die Regulation von Zellzyklus und Apoptose, Tumorwachstum, Zellmigration, Regulation von Ionenkanälen, bis zum „inside-out signaling“ mit Modellierung von Extrazellulärmatrixproteinen sowie der Interaktion mit Matrixmetalloproteinasen [40,44,45,46,47]. Diese bidirektionale Signalübertragung der Integrine ist an der Übersetzung von

Signalen von der Extrazellulärmatrix ins Zellinnere („outside-in signaling“) und an den Rückkopplungsprozessen des Zellinneren an die Extrazellulärmatrix beteiligt („inside-out signaling“) [48].

Im Gegensatz zum Zell-ECM-Kontakt wird der mechanische Zell-Zell-Kontakt über einen weiteren Vertreter der transmembranären Adhäsionsproteine, dem Cadherin, vermittelt. Dieses ist vorrangig in den Desmosomen lokalisiert.

1.3.3. Kollagen

Seinen Namen erhielt das Kollagen (aus dem Griechischen: *Leim erzeugend*) ursprünglich aufgrund seiner früheren Nutzung als Knochenleim im Holzhandwerk. In der mittleren Gefäßwand laufen die kollagenen Fasern in einem flachen Winkel zu den Muskelzellen und sind hauptsächlich parallel zum Gefäßumfang angeordnet.

Kollagen besteht aus einzelnen, langen Proteinketten (α -Ketten), die eine linksgängige Helix ausbilden. Jeweils drei dieser Helices sind dann in einer rechtsgängigen Superhelix arrangiert, welche untereinander durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Die α -Ketten weisen dabei große Domänen auf, die aus repetitiven Sequenzen bestehen. Hierbei ist jede dritte Aminosäure das Glycin. Durch die stete Wiederholung dieser Sequenzmotive wird die Rotation und Rigidität der α -Ketten verursacht [49]. Kollagenfasern besitzen durch die dichte Wicklung eine enorme Zugfestigkeit und sind kaum dehnbar.

Es gibt verschiedene Kollagentypen, die sich alle in der Struktur ihrer Molekülkette, die sich zu Tropokollagen zusammenlagern, unterscheiden. Zurzeit sind 28 verschiedene Kollagentypen bekannt (Typ I bis XXVIII) sowie mindestens zehn weitere Proteine mit kollagenähnlichen Domänen [50,51]. Die untenstehende Tabelle 1 zeigt einige der Kollagentypen in Abhängigkeit ihrer polymerisierten Form.

Die wichtigsten Kollagentypen sind Typ I bis Typ IV. Neben den fibrillenbildenden Kollagenen (z.B. Kollagen Typ I), die sich durch eine große, ununterbrochene tripelhelicale Domäne auszeichnen, existieren zum Beispiel auch nicht-fibrillenbildende Kollagene (z.B. Kollagen Typ IV), welche im Bereich der Tripelhelix durch globuläre Domänen unterbrochen sind [52]. Die Kollagenfibrillen, insbesondere Typ I, werden in allen Gefäßschichten vor allem um die glatten Muskelzellen der Media gefunden [53]. Histologisch wurde in der T. adventitia vorzugsweise das Kollagen III und in der T. media das Kollagen I nachgewiesen [54]. Das Vorkommen von Kollagen in Gefäßwänden wird jedoch unterschiedlich angegeben. Vielerorts wird unspezifisch das Kollagen III benannt. Dieses findet sich jedoch hauptsächlich in retikulären Fasern und wird auch als Retikulin bezeichnet. Der funktionelle Aspekt bei Retikulin ist im Gegensatz zu den zugfesten anderen Kollagenen wie Typ I das Erreichen einer geweblichen Verformbarkeit. Somit ist die Dehnungsbeanspruchung weniger ein Induktor für die Synthese dieser Kollagen III Faser.

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression von Kollagen I und ihre Abhängigkeit von mechanischer Dehnung untersucht. Histologisch wurde in der T. adventitia vorzugsweise das Kollagen III und in der T. media das Kollagen I nachgewiesen [54]. Das Vorkommen von Kollagen in Gefäßwänden wird jedoch unterschiedlich angegeben. Vielerorts wird unspezifisch das Kollagen III benannt. Dieses findet sich jedoch hauptsächlich in retikulären Fasern und wird auch als Retikulin bezeichnet. Der funktionelle Aspekt bei Retikulin ist im Gegensatz zu den zugfesten anderen Kollagenen wie Typ I das Erreichen einer geweblichen Verformbarkeit. Somit ist die Dehnungsbeanspruchung weniger ein Induktor für die Synthese dieser Kollagen III Faser. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Expression von Kollagen I und ihre Abhängigkeit von mechanischer Dehnung untersucht.

Das Kollagen I besteht aus zwei Alpha-1-Ketten und einer Alpha-2-Kette, welche zusammen in einer Triple-Helix aufgewickelt sind [55]. Die Kollagensynthese und die Akkumulation sind entscheidende Aspekte der physiologischen Gefäßrekonstruktion bzw. des Gefäßremodelings [56]. Andererseits kann die übermäßige Akkumulation von interstitiellen Kollagenen mit vaskulären Erkrankungen assoziiert sein [57].

Tabelle 1. Kollagenarten.

Art	Typ	Vorkommen
Fibrilläre Kollagene	I	Knochen, Haut, Gefäße, Sehnen, Organe
	II	Knorpel, Bandscheiben
	III	Haut, Haare, Gefäße, Muskulatur
	V	interstitielles Bindegewebe
	XI	Knorpel
Netzbildende Kollagene	IV	Basalmembran
Fibrillenassoziierte Kollagene	IX	Knorpel
	XII	embryonal
	XIV	Nerv
Perlschnurartige Kollagene	VI	Bindegewebe
Verankerungsfibrillen	VII	Basalmembran, Stroma
Kollagen mit Transmembrandomänen	XIII	Knorpel
	XVII,	
	XXIII,	
	XXV	

1.3.4. Prolyl-4-Hydroxylase

Die Prolyl-4-Hydroxylase (Procollagenprolin-Dioxygenase, Kollagen-P4H o. C-P4H) katalysiert im endoplasmatischen Retikulum einer Zelle die Bildung von 4-Hydroxyprolin in Kollagenfibrillen [58,59]. Da diese Aminosäurereste für die Stabilität der Tripelhelix unerlässlich sind, spielt das Enzym eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Kollagen [52,58]. Die Hydroxylase ist ein α_2 -, β_2 - Tetramer, welches aus zwei verschiedenen Monomeren besteht, der α - und β -Untereinheiten [60]. Die Monomere selbst sind enzymatisch inaktiv. Die synthetisierte α -Untereinheit wird sofort für die Bildung des aktiven Enzyms verwendet, während die β -Untereinheit eher im Überschuß synthetisiert und intrazellulär angehäuft wird. Ob diese β -Untereinheit andere Funktionen besitzt oder mit anderen Proteinen interagiert, ist noch unklar. Offensichtlich besteht eine Kausalität zwischen der β -Untereinheit und der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) [58,59,60,61]. PDI ist ein Enzym im endoplasmatischen Retikulum, welches die Bildung und Trennung von Disulfidbindungen zwischen Cysteinresten innerhalb von Proteinen katalysiert und damit die korrekte Proteinfaltung unterstützt [62,63].

Weitere Vertreter der P4H Familie sind zum Beispiel die HIF-P4Hs. Diese hydroxylieren Prolin in der α -Untereinheit von Hypoxie-induzierbarem Transkriptionsfaktor (HIF), ein Hauptregulator der Hypoxie-induzierbaren Gene und steuert seine Stabilität in einer sauerstoffabhängigen Weise [64]. Auch diese bestehen aus Untereinheiten, treten in Isoenzymen auf und haben enzymatischen Einfluß auf die Hydroxylierung von Kollagen. Die Spezifität der P4H und deren Wechselwirkung untereinander sind noch unklar. Alle P4Hs erfordern Fe^{2+} , 2-Oxoglutarat, O_2 und Ascorbat. C-P4Hs werden unter anderem als attraktive Ziele für pharmakologische Hemmung übermäßiger Kollagenakkumulation bei fibrotischen Erkrankungen und schweren Narben angesehen [64].

1.3.5. Proteoglykane und Decorin

Die Rolle von Proteoglykanen wird in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in der Gefäßwand zunehmend anerkannt. So ist in den artherosklerotischen Plaques die Lipid-Retention im subendothelialen Raum abhängig von der Interaktion von Lipiden mit dem Glycosaminoglykanketten von Proteoglykanen [65]. Die Proteoglykan-Superfamilie enthält mehr als 30 gut charakterisierte Moleküle [66]. Ein typisches Proteoglykan ist aus einem Proteinmolekül (*core*-Protein) mit einer variierenden Zahl von kovalent gebundenen Glycosaminoglykanketten von unterschiedlichen Längen zusammengesetzt [66,67]. Die Fibroblasten und vaskulären glatten Muskelzellen synthetisieren sowohl die Glycosaminoglykanketten als auch die *core*-Proteine. Diese werden durch Exozytose sezerniert, so dass sie sich im extrazellulären Raum zu Proteoglykanen zusammenfügen können und für den Hydratationszustand verantwortlich sind. Aufgrund ihrer stark hydrophilen Eigenschaften

vermögen Proteoglykane Bereiche unterschiedlicher Ladungsdichte auszubilden, weshalb sie die selektive Passage von Molekülen durch die ECM regulieren können. Proteoglykane wurden in allen drei Schichten der Gefäßwand nachgewiesen [68]. Abgesehen von ihrer Funktion bei der Lipid-Speicherung, die über Interaktion der negativ geladene Glycosaminoglycanketten mit sowohl native als auch oxidierten Low Density Lipoproteine (ox-LDL) vermittelt wird, wurden Proteoglykane identifiziert, welche eine signifikante Rolle bei In-Stent-Restenose mit Proliferation glatter Muskelzellen spielen [69].

Eine Einteilung der Proteoglykane kann hinsichtlich ihrer Lokalisation oder Größe ihres *core*-Proteins erfolgen [70]. Gemäß ihrer Lokalisation finden sich Zell-assoziierte und Matrix-assoziierte Proteoglykane. Eine weitere Gruppierung der Matrix-assoziierten Proteoglykane ist in große und kleine Proteoglykane, abhängig von der Größe ihres *core*-Proteins. Zu den großen Proteoglykanen gehören das in der Basalmembran lokalisierte Perlecan, sowie Agrin und die Hyaluronsäure-bindenden PGs Aggrecan und Versican. Die kleinen Proteoglykane mit Leucinreichen Wiederholungsmotiven (*small leucine rich-repeat proteoglycans*, SLRPs), zu denen auch Decorin gehört, stellen die größte Gruppe der Matrix-assoziierten Proteoglykane dar. Eine wichtige Rolle von Decorin in der Pathogenese von Atherosklerose nativer und transplantierte Gefäße wurde von Yamakawa et al. beschrieben [71]. Die SLRPs verleihen dem *core*-Protein eine Ribonuclease-Inhibitor ähnelnde hufeisenförmige Tertiärstruktur, die ein ideales Strukturmotiv darzustellen scheint, um Protein-Protein-Interaktion zu vermitteln [72].

Decorin (DCN) besteht aus einem ca. 38 kDa großen *core*-Protein und mindestens einer kovalent gebundener Glykosaminoglykane-Kette (ca.15-56 kDa) [67,73]. Funktionell dient Decorin als Verbindungsanker zwischen zwei parallel liegenden, benachbarten Kollagenmolekülen und fördert dadurch die Stabilisierung der Kollagenfibrillen und somit die Polymerisierung des Kollagens [74,75,76,77]. Die Bezeichnung des Proteins wurde von seiner Anlagerung an die Kollagenfibrillen oder auch „Dekoration“ der Fibrillen geprägt. Es bindet über das *core*-Protein (Decoron) an Kollagenfibrillen. Ein Decoron interagiert mit vier bis sechs Kollagenmolekülen. Die Bindungsspezifität beruht auf einer großen Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen [78].

Das Decorin ist zwar ubiquitär, jedoch aufgrund seiner Zusammensetzung der GAG-Kette gewebespezifisch. In Blutgefäßen findet sich Decorin hauptsächlich in der Adventitia, ebenso in geringeren Mengen in den anderen Schichten [79,80]. In der Atherosklerose reichert sich Decorin in den neovaskulierten Plaques sowie in den Läsionen an, welche mit abgeschiedenen Lipoproteinen oder mit Kollagenfibrillen assoziiert sind [79,81,82,83]. Solche Befunde lassen vermuten, dass Decorin sowohl eine Rolle bei der Lipid-Retention als auch in der Fibrose und in der Revaskularisierung atherosklerotischer Läsionen spielen könnte [84,85].

Es gibt einige Hinweise darauf, dass die DCN-Induktion mit einer inflammatorischer Angiogenese, d.h. mit einer entzündlich bedingten Gefäßneubildung, einhergeht [86,87]. Dem Decorin wird eine inhibierende Wirkung auf die Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Kollagensynthese über die Bindung von Wachstumsfaktoren zugeschrieben [88,89,90,91,92,93]. Es vermittelt seine regulatorischen Effekte entweder direkt über die Hochregulation der Cyclin-abhängigen Kinase-Hemmstoffen (CKI) [88,94] oder durch ihre Fähigkeit zur Interaktion mit Wachstumsfaktoren wie PDGF [90,95] und TGF- β [88,96]. Die Decorinsynthese selbst wird wiederum über die PDGF und TGF- β 1-Expression beeinflusst [97].

1.4. Mechanische Dehnung

Jede Pulsquelle entsprechend einer vom Herzen kommenden Druckwelle deformiert *in vivo* vaskuläre glatte Muskelzellen. Die Arterienwand wird hierdurch um ca. 5-10% gedehnt. Eine Dehnung bis zu 25 % ist während einer physiologischen Anpassung möglich [98]. Oberhalb von etwa 25% werden die Muskelzellen zu einer Hypertrophie und Hyperplasie induziert, welche zu einer Lumenreduktion und folglich zu einem kontinuierlich erhöhten peripheren Gefäßwiderstand führt [99]. Die vaskulären glatten Muskelzellen in Arterien sind bedingt durch den Blutdruck einer zyklischen mechanischen Dehnung ausgesetzt. Anders ist es in den Venen, dem Niedrigdruckkreislauf und in den Kapillaren. Die herznahen Venen haben einen leicht schwankenden Druck von ca. 0-12 mmHg, bei tiefer Inspiration und plötzlicher Lageveränderung des Körpers auch im negativen Bereich. Arterien dagegen haben sehr schwankende Druckverhältnisse, je nach Belastungsintensität des Körpers und abhängig von der Phase der Herzaktion von diastolisch ca. 50-90 mmHg, bis systolisch ca. 120-200 mmHg (Hg-Hydrargyrum, Quecksilbersäule in mm). Die Anpassung an die unterschiedlichen Druckverhältnisse erfolgte überwiegend über die Tunica media [6].

Die vaskulären glatten Muskelzellen unterliegen weniger dem absoluten Druckniveau, sondern vorrangig einem mechanischen Dehnungsstress bzw. einer dehnungsinduzierten Zellspannung. Eine Zelle ist ein flüssigkeitsgefülltes Kompartiment und ist somit nicht kompressibel, d.h., eine Druckänderung würde nur eine Änderung der Zellform, nicht jedoch des Volumens bewirken. Die Änderung der Zellform ist Abhängig von Kraftvektor und Druckdifferenz. Ein relativ konstanter oder statischer Druck wie zum Beispiel der Luftdruck oder ebenso der intraluminale vaskuläre Druck bewirken keine nennenswerte Reaktion der Zellen. Wichtig ist der Druckgradient, welcher auf die Zelle einwirkt und eine resultierende Zelldehnung, die sogenannte dehnungsinduzierte Zellspannung bedingt. Daher ist es unerheblich, ob ein Niederdruck- oder Hochdrucksystem besteht.

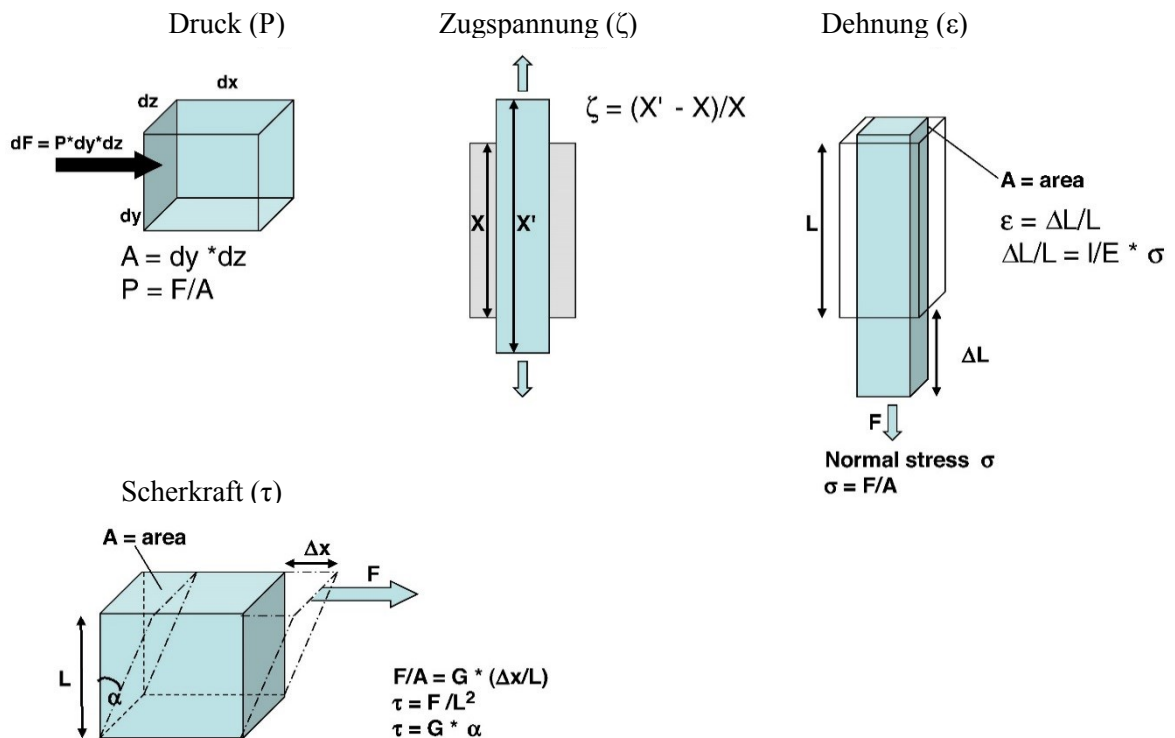


Abbildung 6. Darstellung einiger mechanischer Kräfte (dx dy dz Achsen, L Länge, Δ rel. Veränderung, A Fläche, F Kraft, X initiale Länge, X' finale Länge, E elastischer Modulus, G shear modulus oder modulus of rigidity (nach [100]))

Um diesen Effekt einer dehnungsinduzierten Zellspannung *in vitro* zu simulieren, wird häufig das Modell der Dehnung von auf einer Silikonmembran kultivierten Zellen verwendet (siehe Kap. 3.3.). Unter Verwendung einer *Flexercell strain unit* verursacht die Einwirkung der radialen Zugkraft auf die Zellkultur von peripher nach zentral eine unidirektionale Längenänderung der Zellen in Richtung des Kraftvektors, es kommt zu einer Zelldehnung, *stretch* (ϵ). Dazu ergibt sich eine inverse Änderung der Zellbreite senkrecht zur Zugachse. Dieser ist jedoch ein zirkumferentieller Kraftvektor entgegengesetzt. Dieser entsteht durch Zunahme des Umfangs der gedehnten kreisförmigen Fläche und steht senkrecht zum radialen Kraftvektor. Dieser Vektor wirkt bidirektional an einer Zelle und entspricht der Zugspannung *strain* (ζ). Somit simuliert die *Flexercell strain unit* eine biaxiale Krafteinwirkung auf die membranadhärenten Zellen. In Abbildung 6 sind verschiedene mechanische Kräfte dargestellt, welche auf eine Zelle einwirken können.

In vivo beeinflussen im geringeren Maße weitere mechanische Kräfte die mediale Gefäßwand. Diese sind zu Beispiel der direkte Druck (P) auf eine Ebene. Eine andere Situation tritt auf, wenn die Kraft in einer tangentialen oder nahezu parallelen Achse zu der Oberfläche des Körpers wirkt,

die zu einer Scherkraft (Schubspannung) (τ) führt. Diese Kraft wirkt hauptsächlich an Intima und ist unter anderem für artherosklerotische Prädilektionsstellen im Gefäßsystem verantwortlich.

1.5. Mechanotransduktion

Verschiedene Studien zeigen, dass Veränderungen von extrazellulärer Matrix sowie der Zellstoffwechsel, Wachstum, Proliferation die DNA-Synthese und Genexpression von vaskulären glatten Muskelzellen auch auf mechanisch induzierte Vorgänge zurückzuführen sind [101]. Der zugrundeliegende Mechanismus, welcher mechanische Ereignisse in physiologische Antworten übersetzt, ist die Mechanotransduktion.

Die Wahrnehmung von mechanischen Kräften erfolgt über mechanosensitive Strukturen wie (a) dehnungsinduzierte Ionenkanäle (*SAC-stretch activated ion channel*), über (b) Aktivierung der eng mit dem Zytoskelett und fokalen Adhäsionen (*dense plaques*) verbundenen intrazellulären Enzyme, wie z.B. über die *focal adhesion Kinase* (FAK) und (c) über die Oberflächenrezeptoren und Transmembranproteine, wie z.B. Integrine, über welche die Zellen mit der extrazellulären Matrix verbunden sind [100].

In der Signalweiterleitung, der sogenannten Signaltransduktion, spielen G-Proteine und Tyrosinkinase eine wichtige Rolle [102]. Sie besetzen eine Schlüsselposition zwischen den Rezeptoren und den sekundären Botenstoffen, dem sogenannten *Second-Messenger-System*. Eine weitere Reaktion auf mechanische Kräfte wird über parakrine Stimulation induziert. Ein besonderer Vertreter ist das Stickstoffmonoxid aus den Endothelzellen, welches in den glatten Muskelzellen über den Botenstoff cGMP eine Entspannung bewirkt. Parakrine Effekte werden auch von Wachstumsfaktoren wie PDGF, VEGF oder TGF- β sowie von Angiotensin II hervorgerufen und haben somit einen modulierenden Einfluß auf die dehnungsinduzierte Antwort. Die Wachstumsfaktoren binden an Tyrosinkinase-rezeptoren, integrale Membranproteine, deren ligandeninduzierte Dimerisierung zu Phosphorylierung der assoziierten Kinasen sowie des Rezeptors selbst führt und damit eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst. Angiotensin II wirkt über G-Protein vermittelte Signaltransduktion.

In Abbildung 7 ist die Aktivierung einer solchen Signalkaskade am Beispiel der Integrin-vermittelten Mechanotransduktion dargestellt.

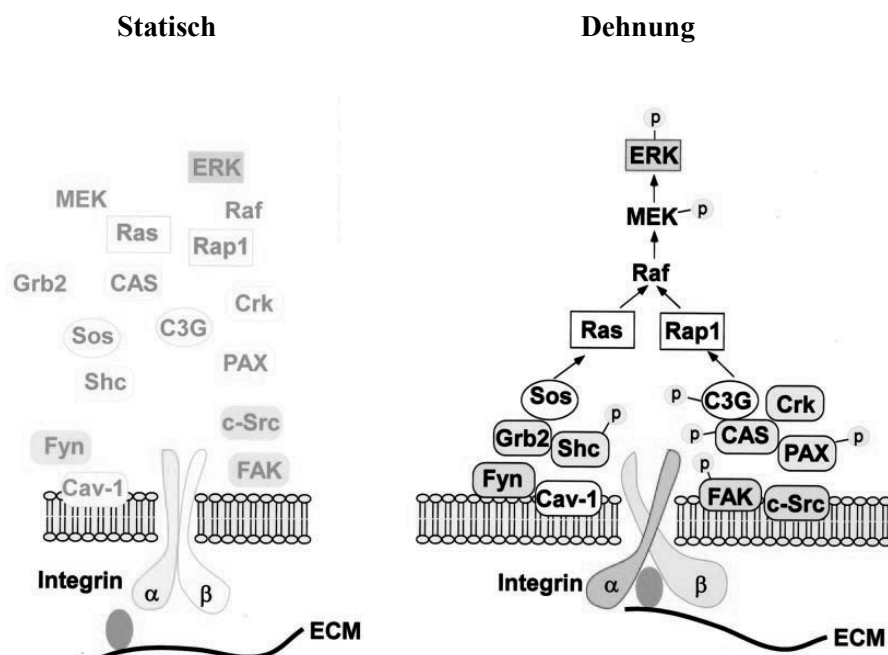


Abbildung 7. Die Integrin-vermittelte Mechanotransduktion beinhaltet multiple Kinasen (z.B. FAK, c-Src, Fyn), Adaptormoleküle (z.B. CAS, Shc), Guanin-nukleotid Austauschfaktoren (GEF wie z.B. C3G, Sos) und kleine GTPasen (z.B. Rap1, Ras), welche zur Aktivierung von MAPK (z.B. ERK) führen. Unter statischen Bedingungen befinden sich die mechanosensitiven Integrine in inaktiver Anordnung, die Signalmoleküle sind nicht phosphoryliert bzw. nicht zu Signalkomplexen vereinigt. Eine Dehnung der SMC vermittelt die Aktivierung der α - und β - Integrin-untereinheiten zu einer erhöhten Affinität für Proteine der extrazellulären Matrix. Zudem werden die FAK/c-Src und Cav-1/Fyn Signalwege aktiviert. Beide vereinigen sich in Höhe der Raf-MEK-ERK-Kaskade (nach [103]).

Während einer mechanischen Dehnung kann hierdurch die Bewegung der extrazellulären Matrix von den vaskulären glatten Muskelzellen wahrgenommen werden. Diese Lageänderung wird über die Zelloberflächenproteine direkt oder über dehnungsinduzierte Ionenkanäle der Zellwand (SAC) indirekt in den Intrazellularraum übertragen, welche die weitere intrazelluläre Signaltransduktion über Enzyme wie z.B. AKT, MEK, ERK, Rho, Ras, Rac aktivieren [100,104].

1.6. Ziel der Arbeit

In der Bypasschirurgie ist ein wesentlicher limitierender Faktor für einen langfristigen Erfolg der Revaskularisation mittels Venentransplantat die starke Gefäßwandhyperplasie, welche zu Gefäßverengungen oder zu kompletten Verschlüssen der Transplantate führen kann. Zahlreiche Studien konnten *in vitro* in statischen Zellkulturen eine erhöhte Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen aus der Vene gegenüber Zellen aus der Arterie belegen. Eine Untersuchung dieser Zellen unter Annäherung physiologischer Bedingungen mittels Verwendung einer apparativen zyklischen mechanischen Dehnung wurde bisher nicht erbracht. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, Unterschiede anhand der Markerproteine Kollagen I, Decorin, Prolyl-4-Hydroxylase und α -smooth muscle Aktin aus venösen und arteriellen Gefäßmuskelzellen in Abhängigkeit von zyklischer mechanischer Dehnung aufzuzeigen.

Des Weiteren werden Zellen aus der medialen und der adventitiellen Schicht aneurysmatischer Aorten mit eingeschlossen, um einen Teil zur Grundlagenforschung über Aneurysmen beizutragen und zudem vergleichende Zellen zur Arterie und Vene zu gewinnen.

Ein besonderes Ziel dieser Arbeit besteht darin, durch einen schonenden Gewebeverdaue eine Zellzahl pro Kultur von mindesten 10^5 Zellen zugewinnen, um eine stärkere Phänotypänderung der Zellen im Replikationszyklus einer Kultur zu vermeiden.

2. Material und Geräte

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Alle Arbeiten wurden mit sterilen Pipettenspitzen in autoklavierten Gefäßen durchgeführt. Als Wasser wurde voll entsalztes Aqua dest. aus einer Filteranlage mit Ionenaustauschsäule (Millipore) verwendet. Alle angewandten Chemikalien wurden nach den jeweiligen aktuellen Vorschriften des Herstellers behandelt und entsorgt. Beim Arbeiten mit biologischem Zellmaterial der Sicherheitsstufe 1 wurden ebenfalls die aktuellen Vorschriften eingehalten.

Nicht aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden über folgende Firmen bezogen: Becton Dickinson, Sigma, Invitrogen, J.T. Baker, Serva, Merck oder Roth. Spezielle Chemikalien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2. Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
Bovines Serumalbumin (A9418) <i>cell culture tested</i>	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (A3059)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fluoreszenz Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Fetal Kälber Serum (S 0115)	Biochrom, Berlin
Uptilight HRP KP99619A-A/B	Uptima interchim, Montlucon, Frankreich
Kollagenase, CLS II	Biochrom AG, Berlin

2.2. Standardpuffer

Tabelle 3. Zusammensetzung von Standardpuffern

Puffer	Zusammensetzung
1x PBS	137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 6.4 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; 1.47 mM KH ₂ HPO ₄ ; pH 7.4
1x TBS	30 mM TrisHCl pH 7.6; 150 mM NaCl
TBST	1x TBS; 0.1% v/v Tween®20

2.3. Nährmedien und Substratlösungen für Zellkultur

Tabelle 4. Nährmedien und Substratlösungen

Produkt	Hersteller
M199 mit L-Glutamin und HEPES	Lonza Inc., Allendale, USA
Gentamycin 80 mg/2ml SF	ratiopharm GmbH, Ulm
Penicillin/Streptomycin für Zellkultur	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA Solution 0.05%/0.02% w/v in PBS	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt

2.4. Kommerzielle Assay-Systeme, Kits und Proteinmarker

Tabelle 5. Kommerzielle Assay-Systeme, Kits und Proteinmarker

Produkt	Hersteller
Memcode™ Reversible protein stain Kit for PVDF membrane	Thermo scientific, Rockford, USA
BCA™ Protein Assay KIT	Thermo scientific, Rockford, USA
Proteinmarker	
SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Groningen, NL
Roti®-Mark Standard	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Roti®-Mark prestained	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.5. Antikörper

Tabelle 6. Antikörper

Produkt	Hersteller
Primäre AK	
hProlyl 4-Hydroxylase β subunit MAB2701 mouse, 61 kDa	Chemicon int., Temecula, USA
alpha-sma ab32575, rabbit, 42 kDa	Abcam, Cambridge, UK
h-caldesmon MAB 3576, mouse, 150 kDa	Chemicon int., Temecula, USA
Collagen I R1038, rabbit, 220 kDa Spaltpro. 100-130	Acris Antibodies Germany, Herford
Collagen III R1040, rabbit	Acris Antibodies Germany, Herford
hBiglycan AF2667, goat, 45 kDa	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
hDecorin PC673, goat, 42-38 kDa	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Osteopontin (OPN) sc-21742, mouse, 25-75 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, USA
GAPDH 5G4, mouse, 38 kDa	HyTest, Turku Finland
Sekundäre AK	
Anti-goat HRP A5420	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Anti-mouse HRP A9044	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Anti-rabbit HRP	Sigma Aldrich, Taufkirchen
FITC F0205, swine anti-rabbit	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
FITC F4018, goat anti-mouse	Sigma Aldrich, Taufkirchen
FITC F7367, rabbit anti-goat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
TRITC T7782, goat anti-mouse	Sigma Aldrich, Taufkirchen
TRITC T7028, rabbit anti-mouse	Sigma Aldrich, Taufkirchen

2.6 Geräte

Tabelle 7. Geräte (Teil 1)

Produkt	Hersteller
37 °C-Inkubator 1000	Heidolph Instruments, Schwabach
Autoklaven	
Varioklav Dampfsterilisator Typ 25 T	H+R Labortechnik AG, Oberschleißheim
Elektrophorese- und Blotkammern	
Mini-Protean-III (TM)	Bio-RadLaboratories, München
Flexercell strain unit	Flexcell Corp., MacKeespot, USA
Kulturschrank Function line BB 16 CU	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Magnetrührer heidolph MR2002	Heidolph Instruments, Schwabach Microplate
scanning Spectrophotometer	
Lamda scan 200	MWG-Bioteck, Eurofins
Mikroskop	
Axiovert Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiocam MRc5	Zeiss, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Axiovert 25	Zeiss, Carl Zeiss AG, Oberkochen
pH-Meter Level 1	inoLab, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
Power Pack P25	Biometra, Goettingen
Blutgasanalysator ABL 700 series	Radiometer, Brønshøj, Dänemark
Scanner UMAX Powerlook 2100 XL	Techville Inc., Dallas, USA
Sonorex super RK102H	Bandelin, Berlin
Sterilbank Hera Save	Heraeus instruments, Düsseldorf
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Goettingen
Vortex Mixer VM 300	gemmy industrial corp., Taipei, Taiwan
Waage BP 210 D	Sartorius AG, Goettingen
Waage FA 3100-2	H. Faust GmbH, Meckenheim

Tabelle 7. Geräte (Teil 2)

Produkt	Hersteller
Wärmebad GFL 1083	GFL - Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Academic system	Millipore, Billerica (Massachusetts), USA
Zentrifugen centrifuge 5417 R, Biofuge stratos	Eppendorf AG, Hamburg Heraeus, Hanau
ZNE Nuggeteismaschine	Ziegra Eismaschine GmbH, Isernhagen

2.7. Verbrauchsmaterialien

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien stammten von TPP (Schweiz) oder Greiner Bio-one (Frickenhausen).

Tabelle 8. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Gelblotting Filterpapier (GB003) 0,8 mm	Whatman, GE Healthcare, USA
Roti-PVDF Membran (T830.1)	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe
Immersion Imaging Autoradiography Cassette	Carl Zeiss AG, Oberkochen rego, Augsburg
Kodak T-MAT Plus DG Film 18x24 cm	Eastman Kodak, Rochester, USA
6-well Bioflex Collagen-I-Membranen	Flexcell Corp. MacKeespot, MA, USA

2.8. Software

Tabelle 9. Software

Produkt	Hersteller
AxioVision Rel 4.6	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Adobe Photoshop 2.0	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
FX 4000 (V4.0)	Flexcell Corp., MacKeesport, MA, USA
Microsoft Excel 2003®	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Windows XP®	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Word 2003®	Microsoft Corp., Redmond, USA
Quantity one 4.4	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sigmablot 10.0	Systat Software Inc., Chicago, USA
Sigmastat 3.5	Systat Software Inc., Chicago, USA

3. Methoden

3.1. Herkunft des humanen Gefäßmaterials

Bei den Proben handelte es sich um Gefäßabschnitte von Patienten, welche in der Klinik für Herzchirurgie im Herzzentrum der Universität Leipzig operiert wurden. Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich Gefäßmaterial verwendet, welches im Rahmen der Operation präpariert und entnommen sowie nach Abschluß des medizinischen Eingriffes verworfen wurde. Es erfolgte keine aktive Entnahme von Gewebe für wissenschaftliche Zwecke. Die Patienten wurden vor dem Eingriff aufgeklärt und erteilten die Zustimmung zur weiteren wissenschaftlichen Verwendung der Proben. Das Gefäßmaterial wurde während der Operation zunächst in steriler NaCl-Lösung aufbewahrt und nach Freigabe durch den Operateur in Transportmedium überführt. Um die Vitalität der Zellen nicht zu beeinträchtigen und der übermäßigen Anreicherung von Stoffwechselendprodukten entgegenzuwirken, wurde darauf geachtet, dass die weitere Aufarbeitung zügig am selbigen Tag erfolgte.

Es wurden zur Zellisolation Gefäßabschnitte von der Aorta ascendenz, der peripheren Arteria radialis und der cruralen Vena saphena magna verwendet. Die Größe der Segmente der Aorta betragen ca. 5-7cm², die Länge der Segmente der cruralen Vena saphena magna von 15-40 mm und der Arteria radialis von 10-25 mm.

Eine entscheidende Limitierung des Probeneinschlusses bestand vorallem durch die Zellgewinnung mit mind. 10⁵ Zellen pro Gefäßprobe nach Gewebeerddau, d.h. in Zellpassage 0 (Kap. 3.2.). Hierdurch wurden mindestens die Hälfte der Patientenproben von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Es wurde Material von 6 Männer und 4 Frauen mit einem Querschnittsalter von 68 Jahren eingeschlossen. Eine Patientenselektion war mit der medizinischen Behandlungsnotwendigkeit vorausgegangen, d.h. klinisches Einschlußkriterium waren eine kardiale Arteriosklerose in 8 Fällen und ein Aneurysma der Aorta ascendens in 2 Fällen. Von 2 Patienten konnten Zellen jeweils aus der Arterie und der Vene erfolgreich kultiviert werden. Kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Zigarettenkonsum oder arterielle Hypertonie mußten der Fallzahl bedingt unberücksichtigt bleiben. Eine Charakteristik der Patienten ist in Tabelle 10 zusammengestellt. Gewebematerial von gesunden oder jungen Menschen war aus ethischen Gründen nicht verfügbar.

Transportmedium: Whittaker M199 mit L-Glutamine und Hapes und
2% Penicillin/Streptomycin
120mg/500ml Gentamycin

Tabelle 10. Patientencharakteristika

Zellgewinnung mit >10 ⁵ Zellen pro Gefäßprobe	Aorta		Arterie			Vene				
	Patientenzahl		Patientenzahl			Patientenzahl				
Patientenzahl	2		3			5				
Alter	60	69	45	68	72	45	72	79	79	71
Geschlecht w/m	m	w	m	w	m	m	w	w	m	m
Hauptdiagnose										
Aszendenzaneurysma Dia 46 mm	x	x								
Aortenklappeninsuffizienz		x								
Aortenklappenstenose	x									
KHK			x	x	x	x	x	x	x	x
Operation										
Aortaaszendenzersatz	x	x								
koronarer Bypass			x	x	x	x	x	x	x	x
Risiken/Nebenerkrankung										
Arterieller Hypertonus		x		x	x		x	x	x	x
Herzinsuffizienz		x	x			x	x	x		x
pAVK II-IV										x
Diabetes mellitus (OAD)				x	x					
Adipositas BMI >30	x		x		x	x				x
Hyperlipidämie			x		x	x	x	x		
COPD										x
Niereninsuffizienz			x			x				
Nikotinabusus					x	x		x		

3.2. Zellkultur

3.2.1. Präparation der Gefäße und Isolierung der Zellen mittels Kollagenaseverdau

Die Präparation und Isolierung der Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Bennett und Grenier. Die Aufarbeitung der Gefäße wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Sie wurden aus dem Transportmedium auf eine sterile Petrischale (Ø 94 mm) überführt und das der Gefäße teils noch aufgelagerte lockere Bindegewebe entfernt. Anschließend wurden die Gefäße längs eröffnet und das Endothel mit dem Skapell abgeschält und verworfen. Zur Eliminierung von restlichen Endothelzellen und Blutbestandteilen wurde das Gewebe mehrfach in PBS gewaschen. Es folgte die Separation der Gefäßschichten durch Abziehen der Tunica intima von der Media und anschließend der Media von der Adventitia. Die Trennung der Adventitia gelang am sichersten an der Aorta. Aufgrund der geringen Wandstärke wurde bei den Venen und Arterien

auf die genaue Präparation der Tunica media geachtet und die Gewebeanteile der Tunica adventitia präpariert und verworfen.

Nach der Zerkleinerung des Gewebes mittels Skapell auf eine Stückgröße von ca. 1-3 mm und Überführung in T75 Kulturflaschen wurde mit der Enzym-Lösung über 10 h bis 24 h bei 37 °C im Kulturschrank mit 5% CO₂ inkubiert und verdaut. Die vollständige Dispersion ist abhängig von der Stückgröße und Festigkeit, der Verdau wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und soweit möglich alle 30 min aufgeschüttelt. Ein permantes Schütteln oder die Anwendung eines Thermomixer hatten sich aufgrund von intramuralen Kalkkristallen oder Schlierenbildung der extrazellulären Matrix mit Einschluß freier Zellen nicht bewährt. Im Intervall von ca. 2-4 Stunden wurden bei lichtmikroskopisch sichtbaren freien Zellen die Enzymlösung abpipettiert und das angedaute Gewebe mit 1x PBS (Ca²⁺-frei) max. 10 ml in T75 auf einem rotierenden Schüttler (niedrige Stufe) für je 10 min. gespült. Hierdurch konnten die Zellen von den Kollagenfasern gelöst werden. Je nach Vorhandensein freier Zellen wurden die Enzymlösung oder PBS-Lösung verworfen oder in eine frische T75 überführt und mit 20 % FBS versetzt. Die Verdünnung des frischen Mediums mit der PBS-Zellsuspension war nicht nachteilig. Wichtig war jedoch eine Gesamtkonzentration von mindestens 10 % FBS. Die Zentrifugationsschritte wurden aufgrund der häufig beobachteten Zellklomeratbildung und den dadurch bedingten teils gravierenden Zellverlusten nicht durchgeführt. Die Bedingung zum Einschluß einer Probe in die Untersuchungsreihe war eine Zellzahl von mindestens 1 x 10⁵. Die Flaschen mit der Zellsuspension wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, der erste Mediumwechsel erfolgte nach 12 bis 24 Stunden. Zur Entfernung von Gewebefragmente und Fremdzellen wurde vorher mit PBS gewaschen.

Aufgrund des mehrstündigen Kollagenaseverdau wurde Kulturmedium als Trägersubstanz gewählt, die Pufferkapazität zur Vermeidung von Übersäuerung erweitert und Albumin für den kolloidosmotischen Druck zugesetzt.

Enzym-Lösung: M199
 4 mM L-Glutamine
 0.025% Gentamycin (80 mg/ml)
 2% Penicillin/Streptomycin (10000 IE / 10 mg/ml)
 6600 Units Kollagenase II auf 40 ml M199
 0.1% Hepes
 2% Albumin
 pH 7.45

3.2.2. Allgemeine Zellkultur

Voraussetzung für die erfolgreiche Zellkultivierung ist eine korrekte und sterile Arbeitsweise, um Kontaminationen der Kulturen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden.

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen auf einer sterilen Werkbank (Heraeus, Hanau) statt. Diese war mit einem vertikalen Luftfiltersystem ausgestattet. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank (Heraeus BB 16 CU) in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden im Wasserbad auf 37°C temperiert.

3.2.3. Zellkulturmedien

Als *Vollmedium* wurde das Zellkulturmedium M199 enthalten Earle's salts, Phenol Red, 4 mM L-Glutamin, 1000 mg/l Glukose und unter Zugabe von 10% fetales Kälberserum (FKS), 120 mg Gentamycin auf 500 ml sowie 2% Penicillin/Streptomycin verwendet. Aufgrund der zelltoxischen Wirkung wurde auf Amphotericin verzichtet. Die Sterilfiltration erfolgte mittels Bottle top Filter "rapid" 500 ml, 0.2 µm (TPP, Schweiz).

Die Zellen wurden mindestens dreimal wöchentlich mit frischem Medium versorgt, wobei das verbrauchte Medium vorsichtig mit geringen Sog an der Pipette abgenommen und durch 2 ml frisches Medium auf 6-well Platten oder 18 ml in T75 ersetzt wurde. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Flaschen im Lichtmikroskop betrachtet, um das Wachstum, die Form und die Anzahl der Zellen zu kontrollieren.

Startmedium war nach dem Kollagenaseverdau Vollmedium mit 20% FKS und wurde für die ersten 3 Tage verwendet.

Das *Folgemedium* entsprach dem Vollmedium mit 10% FKS und enthielt 0.4% hFGF-B (human recombinant Fibroblast Growth factor, 1 µg/ml).

Das *Ruhemedium* wurde mit nur 5% FBS versetzt [105].

3.2.4. Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden bei einer Zellkonfluenz von ca. 80% passagiert. Dabei wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen und nach Benetzung mit Trypsin-EDTA (0.05% / 0.02%; 2 ml für T75) bei Raumtemperatur inkubiert. Durch vorsichtiges Beklopfen der Kulturschale lösten sich die adhären Zellen vom Boden und konnten im Zellkulturmedium ohne FBS resuspendiert werden. Anschließend erfolgte die Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Hemozytometer) und Ausplattierung der Zellen für die Kultur mit einer Zelldichte von 10×10^3 Zellen/cm². Eine Zentrifugation wurde nicht durchgeführt, da hierbei ebenso Zellkonglomeratbildungen beobachtet wurden. Nachdem die Zellen resuspendiert worden waren, wurde das Trypsin/EDTA mit FBS-haltigen Medium geblockt.

Eine erfolgreiche Zelladhäsion mit „Zytoplasmahof“ konnte bereits nach 1 Stunde lichtmikroskopisch beobachtet werden, beginnende Zellausläufer und Zellkontakte nach 2 Stunden. Die vollständige Abflachung der Zelle ist nach ca. 24 Stunden beendet.

3.2.5. Vitalitätsbestimmung und Zellzählung

Für die Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen wurde die Trypanblau-Zellfärbung verwendet. Dieser Schritt wurde zusammen mit der Zellzählung durchgeführt. Die Zellsuspension wurde 1:5 mit Trypanblau verdünnt. Nach einer Inkubation von ca. 2 min. erfolgte die Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Alle Zellen mit blaugefärbtem Zytoplasma galten als beschädigt oder tot. Neben der Verwendung der Neubauer-Kammer wurden die Zellen in ihrer Kultur unter dem Lichtmikroskop mit Einblendung einer Raster-Okularplatte gezählt. Dieses Procedere wurde für die Beurteilung des Zellverlustes unter zyklischer mechanischer Dehnung benutzt.

Vitalitätsrate = (farblose Zellen x 100) / (farblose + gefärbte Zellen).

3.2.6. Ausschluß signifikanter EC Kontaminierung

Aufgrund der für Endothelzellen eher ungünstigen Bedingungen während der Gefäßpräparation durch Abschürfung des Endothels mit dem Skalpel, durch den Kollagenaseverdau und durch das verwendete Zellkulturedium ist eine signifikante und damit relevante Kontamination (über 5%) mit Endothelzellen unwahrscheinlich. Die Zellkulturen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch auf ihre Morphologie untersucht.

Das für Endothelzellen charakteristische kopfsteinpflasterartige Zellkulturmuster wurde wie in Abbildung 8 einmalig beobachtet. Diese Kultur wurde von den Versuchen ausgeschlossen.

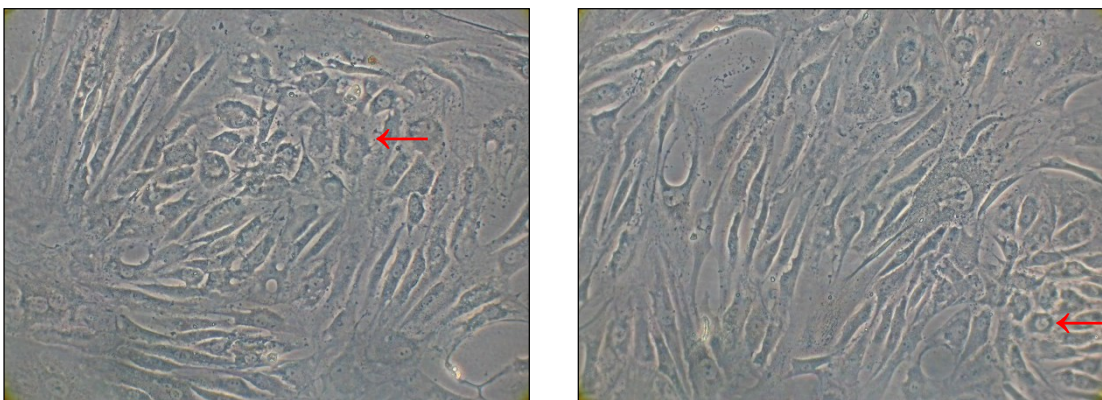


Abbildung 8: Lichtmikroskopische native Darstellung eines „pflastersteinartigen Reliefs“ einer mit Endothelzellen kontaminierten Zellkultur (Pfeil).

3.3. Zyklische mechanische Dehnung der Zellkulturen

3.3.1. Zellkultur auf Bioflexmembran

In der Passage II und III zwischen 4-8 Wochen nach primärer Aussaat (siehe KAP 4.1.2) wurden die Zellen auf Kollagen-I-beschichteten Bioflexmembranen (Flexcell Corp., MacKeespot, MA, USA) mit einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/cm² überführt und je Membran einer 6 Loch-Platte 2 ml Folgemedium hinzugegeben und alle 2-3 Tage gewechselt. Kontrolliert und dokumentiert wurden dabei die Morphologie der Zellen, die Zellzahl und der Anteil der ausgesäten Zellen, welcher auf den Bioflexmembranen angewachsen war. Unmittelbar vor und nach Dehnung wurde eine Fotodokumentation durchgeführt. Auf das Ruhemedium wurde 72 h vor der Dehnung umgestellt. Zur Vermeidung von Stressreaktionen der Zellen bei Abnahme und Zugabe des Medium erfolgte der letzte Mediumwechsel 24 h vor Dehnungsbeginn.

3.3.2. Dehnungsapparatur - *Flexercell strain unit*

Die *Flexercell strain unit* (Flexcell Corp., MacKeespot, MA, USA; Abbildung 9) ermöglicht eine definierte und kontrollierte Dehnung von Zellkulturen. Die Apparatur bestand aus einem Rechner (Flexcontrol®) und der EDV-kontrollierten Vakuumeinheit (Flexlink®), welche über luftgefüllte nicht kollabierbare Silikonschläuche mit der Grundplatte verbunden war. Auf der Grundplatte befand sich ein doppelter Boden mit Luftkanälen zu den oberen Plastikböden, welche mit Perforationen versehen waren. Hierauf wurden die Bioflexzellkulturplatten (Flexcell Corp.) aufgebracht, je well ein Luftschaft und die Dichtung erfolgte mit Gummi und Silikonmasse. Diese speziellen Platten bestanden aus sechs mit Silikonmembranen bezogenen Aussparungen (sog. *well*) mit einer Fläche von jeweils 10 cm².

Für den Dehnungsvorgang wurden die Bioflexzellkulturplatten mit einer Einfassung aus Gummi abgedichtet und in die Grundplatte eingelegt. Dabei kamen die einzelnen Silikonmembranen der Bioflexplatten auf je einem der in der Grundplatte verankerten Plastikstutzen (sog. *loading post*) zu liegen. Mit der Flexlink® wurde ein definierter Unterdruck unter den flexiblen Silikonmembranen angelegt. Dadurch wurden die flexiblen Membranen über den Plastikstutzen zirkulär nach unten Richtung Grundplatte gezogen (Abbildung 10). Die Dehnung der flexiblen Membranen wurde auf den adhäsiven Zellmonolayer übertragen. Der angelegte Unterdruck war somit proportional zum Grad der Dehnung. Die Dehnung der Zellen entsprach einer homogenen biaxialen Dehnung mit einem isotropen Charakter.

Die experimentellen Bedingungen wurden wie folgt festgelegt: 10% Elongation (**-25 kPa**); eine Frequenz von 0.5 Hz (Dehnung für 1 Sekunde gefolgt von einer Relaxation für 1 Sekunde); die Dehnung erfolgte im Kulturschrank bei 37°C mit einem CO₂-Gehalt von 5%. Die Zellkulturen

wurden über 24 Stunden und 96 Stunden ohne Mediumwechsel gedehnt, nachfolgend erfolgte die Proteinextraktion und Proteinanalyse.

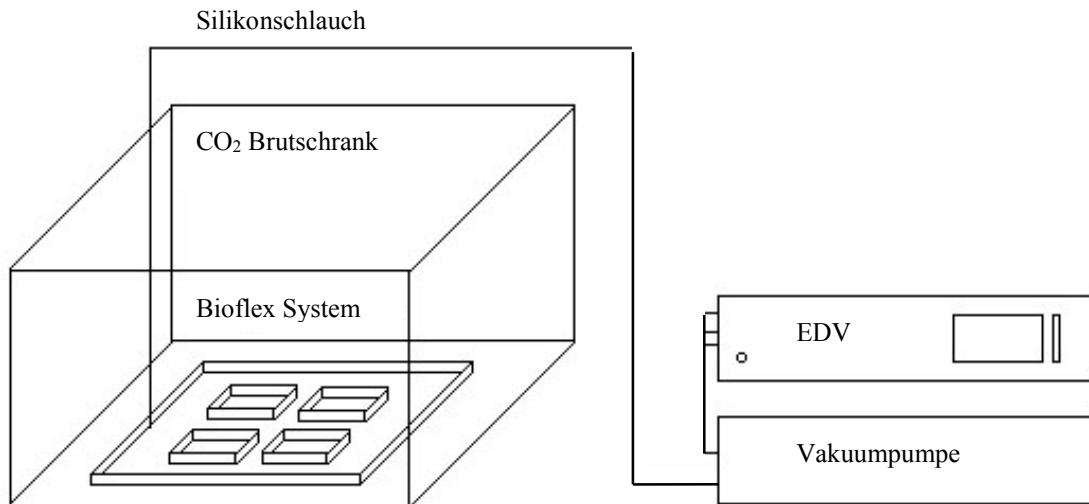


Abbildung 9. Die Flexercell strain unit. Eine EDV-kontrollierte Vakuumeinheit, an welche das im CO₂ Brutschrank befindliche Bioflex-System angeschlossen wird (modifiziert nach [105]).

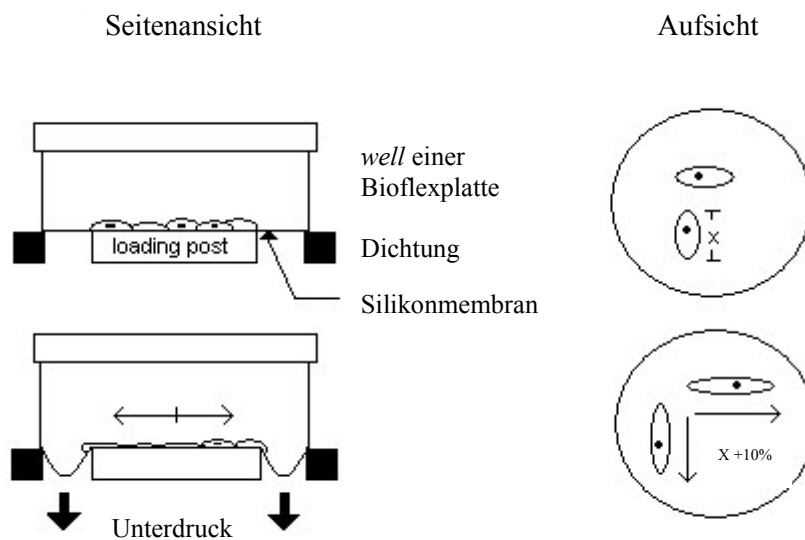


Abbildung 10. Die Bioflexzellkulturplatten in Seitenansicht und Aufsicht in Ruhe und unter Dehnung. Infolge des angelegten Unterdrucks über die Vakuumpumpe werden die flexiblen Silikonmembranen über die in der Grundplatte verankerten Plastikstutzen (sog. *loading post*) gezogen. Die auf den Silikonmembranen angewachsenen Zellen werden gleichmäßig isotrop maximal 10% mit einer Frequenz von 0.5 Hz gedehnt (modifiziert nach [105]).

3.4. Immunzytochemie

Für die immunzytochemische Analyse der statischen Kulturen wurden zunächst sterile Deckgläschen in die Kulturpetrischalen gelegt und Zellen in Suspension aufgebracht. Nach Zugabe von Vollmedium wurden die Zellen anschließend im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von mindestens 60% angezogen.

Eine Antikörper-Inkubationskammer wurde mithilfe eines Objektträgers und Aufkleben zweier Deckgläschen im Abstand von 2/3 Länge des bewachsenen Deckgläschens hergestellt. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden zunächst 15 min bei Raumtemperatur in 3-4% Formaldehyd in PBS pH 7.4 (nach Lilie) fixiert. Nach einem Waschschrift (5 min) mit eiskalter PBS wurde mit 0.25% Triton-X-100 in PBS für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschen mit PBS erfolgte das Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen mit 4% Magermilch in PBST für 30 min bei Raumtemperatur. Die Deckgläschen wurden nun mit dem Gewebe dem Objektträger zugewandt auf die befestigten Deckgläschen aufgelegt und in das sich ergebende Spatium wurde die Antikörperlösung pipettiert.

Die Zellen wurden mit dem primären Antikörper (Tabelle 11) über Nacht bei 4°C mit 1% Magermilch in PBST inkubiert. Negativkontrollen wurde lediglich mit 1% Magermilch in PBST versetzt. Am Folgetag wurde nach dem Waschen in PBS der sekundäre Antikörper (Tabelle 11) mit 1% Magermilch in PBST aufgebracht, die Inkubation erfolgte für 1 Stunde im Dunkeln. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter Vermeidung einer direkten Lichteinstrahlung durchgeführt. Nach dem Waschen in PBS folgte die Zellkerngegenfärbung mit 0.1-1 µg/ml DAPI für 1 min. Nach einem abschließenden Waschen wurde mit Fluoreszenz Mounting Medium eingedeckelt. Die Betrachtung der Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde bei 200facher und 400facher Vergrößerung vorgenommen.

Tabelle 11. Antikörper für die Immunzytochemie

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
hProlyl-4-Hydroxylase β-Subunit MAB2701 Mouse monoclonal 1:100	goat anti-mouse IgG TRITC T7782 1:100
Alpha Smooth Muscle Actin ab32575 Rabbit monoclonal 1:100	swine anti-rabbit IgG FITC F0205 1:100
Decorin pc673 Goat polyclonal 1:40	rabbit anti-goat IgG FITC F7367 1:100
Collagen I R1038 Rabbit polyclonal 1:100	swine anti-rabbit IgG FITC F0205 1:100

3.5. Proteinanalyse

3.5.1. Proteinextraktion und Homogenisierung

Wichtig für die weitere Proteinaufarbeitung war neben den intrazellulären Proteinen die Gewinnung der extrazellulären Matrixproteine. Daher wurde unter Vermeidung von Strömungen und Sogwirkung das Medium aus den Zellkulturplatten abgenommen.

Nachfolgend dem Entfernen der Waschlösung wurden 80 µl RIPA/6-well zugegeben und für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine zunächst mittels Zellschaber im Bereich der Loadingstation der Flexzellplatten gelöst und in ein 0.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellverbände weiter aufzuschließen, erfolgte eine Inkubation für 30 min auf Eis und folgend eine Ultraschallbehandlung für 3x1 min in Eiswasser. Abschließend wurden die Proben bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert und die Überstände eingefroren.

RIPA-Puffer:	50 mM Tris-HCl; pH 7.4
	1% Nonidet P 40
	0.25% Na-Deoxycholat
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 µg/ml Aprotinin in H ₂ O
	1 µg/ml Leupeptin in H ₂ O
	1 µg/ml Pepstatin in Methanol
	1 mM NaF in H ₂ O
	1 mM Na-Orthovanadat in H ₂ O
	1 mM PMSF in Ethanol

3.5.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen der Ganzzellprotein-Extrakte einschließlich extrazellulärer Matrix wurden mit dem BCATM Protein Assay KIT (Thermo scientific, Rockford, USA) anhand des Protokolls des Herstellers ermittelt.

3.5.3. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse unabhängig von ihrer Nettoladung in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel [106]. Das Natrium-Dodecylsulfat (SDS) denaturiert die Proteine, an welchen sich proportional zur Masse des Polypeptids eine bestimmte Anzahl SDS-Anionen binden [107]. Die Nettoladung des entstandenen Komplexes aus Protein und SDS übertrifft dadurch die des nativen Proteins, so dass die Trennung im elektrischen Feld überwiegend nach der Masse des Proteins erfolgt. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Komplexes im elektrischen Feld ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der molekularen

Masse des Proteins. Die Trennleistung von SDS-Gelen hängt zum einen von der Konzentration des Acrylamids, zum anderen vom Vernetzungsgrad durch Bisacrylamid ab.

Die Proteinelektrophorese wird in einer vertikalen Flachgel-Elektrophoreseapparatur (Mini-Protean-III™) durchgeführt. Um eine gute Trennleistung der Elektrophorese zu erreichen, werden die aufgetragenen Proteine in einem Sammelgel fokussiert, bevor sie in dem Trenngel separiert werden. Zu diesem Zweck wird ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet, bei dem das Sammelgel eine geringere Acrylamid-Konzentration und einen niedrigeren pH-Wert aufweist als das Trenngel. Hierbei werden die in das Gel einwandernden Glycin-Anionen des Kathodenpuffers abgebremst, da sie aufgrund des niedrigeren pH-Wertes bevorzugt als ungeladene Zwitterionen vorliegen. Zwischen den ungehindert in Richtung Anode wandernden Chlorid-Ionen des Sammelgelpuffers und den Glycin-Ionen entsteht somit eine Zone mit verminderter Leitfähigkeit und erhöhter Feldstärke, innerhalb derer die Proteinmoleküle, deren Mobilität zwischen der von Chlorid- und Glycin-Ionen liegt, zu einer schmalen Bande fokussiert werden. Beim Eintritt in das Trenngel und dem damit verbundenen pH-Sprung liegen die Glycin-Moleküle wieder bevorzugt als Anionen vor und übertreffen daher die Proteinmoleküle in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit. Die einzelnen Proteine werden bei nun konstanter Feldstärke entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Mit der Zugabe von TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) als Katalysator und APS (Ammoniumpersulfat) als Polymerisationsstarter wurde die radikalische Polymerisation in Gang gesetzt und die Lösung in die Elektrophorese-Apparatur eingefüllt. Die Polymerisation des Geles war in der Regel nach 30 Minuten abgeschlossen.

Trenngel 8%:	7.3 ml H ₂ O 3.75 ml Trenngelpuffer (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.4% w/v SDS) 4 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 100 µl 10% APS 10 µl TEMED
Sammelgel:	5.5 ml H ₂ O 1.0 ml Sammelgelpuffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% w/v SDS) 1.3 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 80 µl 10% APS 8 µl TEMED

Die Proben (Protein+RIPA-Puffer) wurden Volumenanteil 4:1 mit Laemmli-Puffer (5x) versetzt und vor dem Auftragen für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf 4°C temperiert. Die Elektrophorese wurde zunächst mit einer Spannung von 70 V begonnen, bis der Farbmarker

Bromphenolblau die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel überschritten hatte. Anschließend wurde bei einer Spannung von 110 V die Elektrophorese weitergeführt, bis der Farbmarker ca. 20 min die Unterkante des Gels überschritten hatte. Dadurch konnte eine maximale Auftrennung von ca. 30 bis 200 kDa über das gesamte Trenngel erreicht werden.

Laemmli-Puffer (1x): 250 mM Tris-HCl; pH 6.7
10% w/v SDS
0.2% β -Mercaptoethanol
10% Glycerin
0.02% Bromphenol Blau

1x Laufpuffer: 48 mM Tris-HCl; pH 8.3
385 mM Glycin
0.1% w/v SDS

3.5.4. Western Blot Analyse

Das Prinzip des *Western Blots* besteht darin, die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu transferieren und zu immobilisieren, um Proteine für Antikörper zugänglich zu machen und das entsprechende Antigen sensitiv nachzuweisen. Hier wurde das Verfahren des Wetblots angewandt.

3.5.4.1. Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran

Nach der Äquilibrierung der Materialien in gekühltem Transferpuffer wurde luftblasenfrei je ein Gel und eine PVDF-Membran zusammen mit dem Whatman®-Papier beidseits und zur Erhöhung des Anpressdruckes mit den Faser-Pads (Mini-Protean-III (TM) Bio-RadLaboratories, München) in „Sandwichttechnik“ in die Transferkassette entsprechend den Bedienungshinweisen eingelegt.

Transferpuffer: 800 ml H₂O
14.4 g Glycin
3.03 g Tris-HCl; pH 8.3
0.2 g SDS
200 ml Methanol

Der Transfer der Proteine vom Gel Richtung Anode und Membran erfolgte bei konstant 350 mA mit ca. 70-80 V für 60 Minuten.

Nach Beendigung wurden die Membranen reversibel mit Memcode™ (Reversible protein stain Kit) gefärbt, um das Transferergebnis beurteilen zu können. Zum gleichen Zweck wurde das Polyacrylamid-Gel in *Bio-Safe* Coomassie-Lösung gefärbt. Die angefärbte Membran wurde kurz

in destilliertem Wasser gespült, zur Dokumentation fotokopiert und anschließend mit dem erwähnten Kit entfärbt.

3.5.4.2. Immunoblotting

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die geblotteten Membranen für 1-2 Stunden mit 4% BSA in 1x TBST auf dem Schüttler bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde jede Membran mit 2% BSA in 1x TBST und gelösten Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (1x TBST, 10 min) erfolgte die Inkubation mit dem sekundären HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten Antikörper für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (3 x 10 min) wurden die Proteine mit Uptilight HRP (Uptima interchim) auf Röntgenfilmen mit dazugehörigen Kassetten in der Dunkelkammer detektiert. Je nach Antikörpersignal betrug die Röntgenfilmexposition 30 Sekunden bis 10 Minuten. Bei einer mehrfachen Antikörperinkubation einer Membran wurde diese nach jeweiliger Detektion mit 1xTBST (3x 10 min) gewaschen und nachfolgend erneut mit dem Antikörper gegen Proteine anderer Daltonzahl inkubiert. Auf ein „Stripping“ (mit Glycin oder NaCl) der Membran wurde zum Erhalten der Proteine verzichtet. Eine Antikörperinteraktion wurde bei den verwendeten Antikörpern nicht beobachtet. Des Weiteren wurden die Membranen horizontal unter zu Hilfenahme der Markerproteine zertrennt und die Abschnitte jeweils der Antikörperinkubation zugeführt.

Tabelle 12. Antikörper für Proteinanalyse

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
hProlyl 4-Hydroxylase β -Subunit MAB2701 Mouse monoclonal 1:2500	Rabbit anti-mouse IgG-HRP A9044 1:7500
Alpha Smooth Muscle Actin ab32575 Rabbit monoclonal 1:2000	Goat- anti rabbit IgG-HRP A9169 1:7500
Decorin pc673 Goat polyclonal 0.1 μ g/ml	Rabbit anti-goat IgG-HRP A5420 1:7500
Collagen I R1038 Rabbit polyclonal 1:200	Goat- anti rabbit IgG-HRP A9169 1:7500
GAPDH 5G4 Mouse monoclonal 1:20000	Rabbit anti-mouse IgG-HRP A9044 1:7500

3.5.5. Densitometrie

Die Densitometrie ist ein Verfahren, mit welchem die Banden auf SDS-Gelele, Röntgenfilmen, Agarosegelele und Zymogrammen gemessen und verglichen werden können. Die Schwärzung eines Röntgenfilmes entspricht dem Maß einer Proteinmenge, welche damit einer statistischen Auswertung zugänglich gemacht wird. Dazu wurden die Röntgenfilme gescannt und nachfolgend mittels der Software Quantity ONE (v4.4, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) ausgewertet. Hierbei wurden nach Markierung der Banden die Graustufungen automatisch gemessen und mit dem Hintergrundrauschen abgeglichen. Die Dichte wurde in Intensity/mm² angegeben. Durch die Normalisierung der Werte auf GAPDH ergaben sich relativen Einheiten.

3.6. Auswertung und Statistik

Um interindividuelle Schwankungen bei geringer Probenzahl und Probenmenge auszugleichen, wurden die Proben aus gleichen Gefäßschichten verschiedener Spender gepoolt. Nach der *Western Blot* Analyse erfolgte die GAPDH Korrektur. Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte±SEM errechnet. In Kap. 4.1.3 wurden zur Vergleichbarkeit die Ergebnisse aus den Zellen der T. media Aorta, T. media Vene und T. adventitia Aorta in Relation zur den Ergebnissen aus den Zellen der T. media Arterie gestellt. Daher korreliert der Wert der T. media Arterie um 1. Folgend wurden die Zellkulturenergebnisse der jeweiligen Gefäßschichten (Tunica) miteinander verglichen und faktoriell graphisch dargestellt. Die Ergebnisse der mechanischen Dehnung in Kap. 4.2. wurden in Bezug auf die statische Kontrollegruppe gesetzt, der korrigierte Wert dieser Gruppe korreliert folgend um den Faktor 1. Anschließend wurden die Zellkulturenergebnisse innerhalb der jeweiligen Tunica je nach Dehnungsdauer gegenüber der Kontrollgruppe verglichen und faktoriell graphisch dargestellt. Aufgrund der geringen Probenzahl und geringer Annahme einer Normalverteilung wurden zum Nachweis auf signifikante Unterschiede Rangsummentests ausgewählt. Zwischen zwei Gruppen wurde mit dem *Mann-Whitney-U-Test* und zwischen mehrerer Gruppen zunächst mit der *Kruskal-Wallis-Varianzanalyse* und anschließend der Gruppenvergleich als *post hoc* Test mit einer *All Pairwise Multiple Comparison Procedures*, angewandt durch die *Dunn's* Methode oder auch Bonferroni-Korrektur genannt, auf Signifikanz geprüft. Als statistisch signifikant wurde ein $p \leq 0.05$ angesehen. Höhere Signifikanzen wurden aufgrund der eingeschränkten Probenzahl nicht angenommen. Das verwendete Statistikprogramm war Sigmatat. 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, USA). Für die Erstellung von Graphiken und die Archivierung und Bearbeitung von Fotos wurde Sigmaplot 10.0. (Systat Software Inc., Chicago, USA), Adobe Photoshop 2.0 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) und AxioVision Rel 4.6 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) verwendet.

4. Ergebnisse

Es wurden primäre Zellen von Zellkulturen der Tunica media der Vena saphena magna, der Arteria radialis und der Aorta ascendenz sowie Tunica adventitia der Aorta ascendenz von verschiedenen humanen Spendern auf die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen nach mechanischer Dehnung untersucht. Das Gewebe wurde im Rahmen einer herzchirurgischer Behandlung, wie Koronarbypass oder Aortenaneurysmenersatz, entnommen.

Die fließende Veränderung des Phänotyps von Fibroblasten, Myofibroblasten, sekretorischen und kontraktile glatten Muskelzellen in einer Gefäßwand wurde bereits von Sartore beschrieben [5]. Das gleiche Phänomen mit zunehmender Dedifferenzierung der Zellen im Zellkulturmodell konnte bereits beobachten werden [108,109,110]. Um diesen Effekt nicht zu verstärken, wurden ein milder Gewebeverdau zur Zellisolation, milde Wachstumstimulation sowie niedrige Zellkulturpassagen II-III verwendet.

Um die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen zu untersuchen, wurde zum einen das Strukturprotein Kollagen I und zum anderen das Proteoglycan Decorin exemplarisch gewählt. Die Prolyl-4-Hydroxylase wurde als intrazellulärer Marker für die Frühphase der Biosynthese von Kollagen einbezogen. Das α -smooth muscle (α -SM) Aktin gilt allgemein als Marker für die VSMC und wurde als Maß für die Expression von intrazellulären kontraktile Elementen verwendet [111].

Primär bestand der Vergleich zwischen den glatten Muskelzellen aus der T. media der Arterie und Vene. Sekundär wurden die glatten Muskelzellen und fibroblastenähnlichen adventitiellen Zellen der Aorta betrachtet.

Zunächst erfolgte die Charakterisierung der Zellen anhand der gewählten Markerproteine mittels immunzytochemischer Analyse sowie mittels Westernblot-Analyse. Nachfolgend wurde das Expressionsverhalten der Proteine unter zyklisch mechanischer Dehnung ermittelt. Um interindividuelle Schwankungen bei geringer Probenzahl und Probenmenge auszugleichen, wurden die Proben aus gleichen Gefäßschichten verschiedener Spender gepoolt. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kap. 3.6. aufgeführt.

4.1. Charakterisierung der Zellkultur

4.1.1. Lichtmikroskopische Darstellung

Die bekannten Wachstumsmuster der glatten Muskelzellen und Fibroblasten konnten mehrheitlich beobachtet und dokumentiert werden. Es fanden sich fischgrätenartige Muster in den Zellkulturen aus Tunica adventitia und Tunica media der Vene. Die sogenannte „*hill and valley*“ Struktur konnte in den Kulturen Tunica media der Arterien und Aorta dargestellt werden.

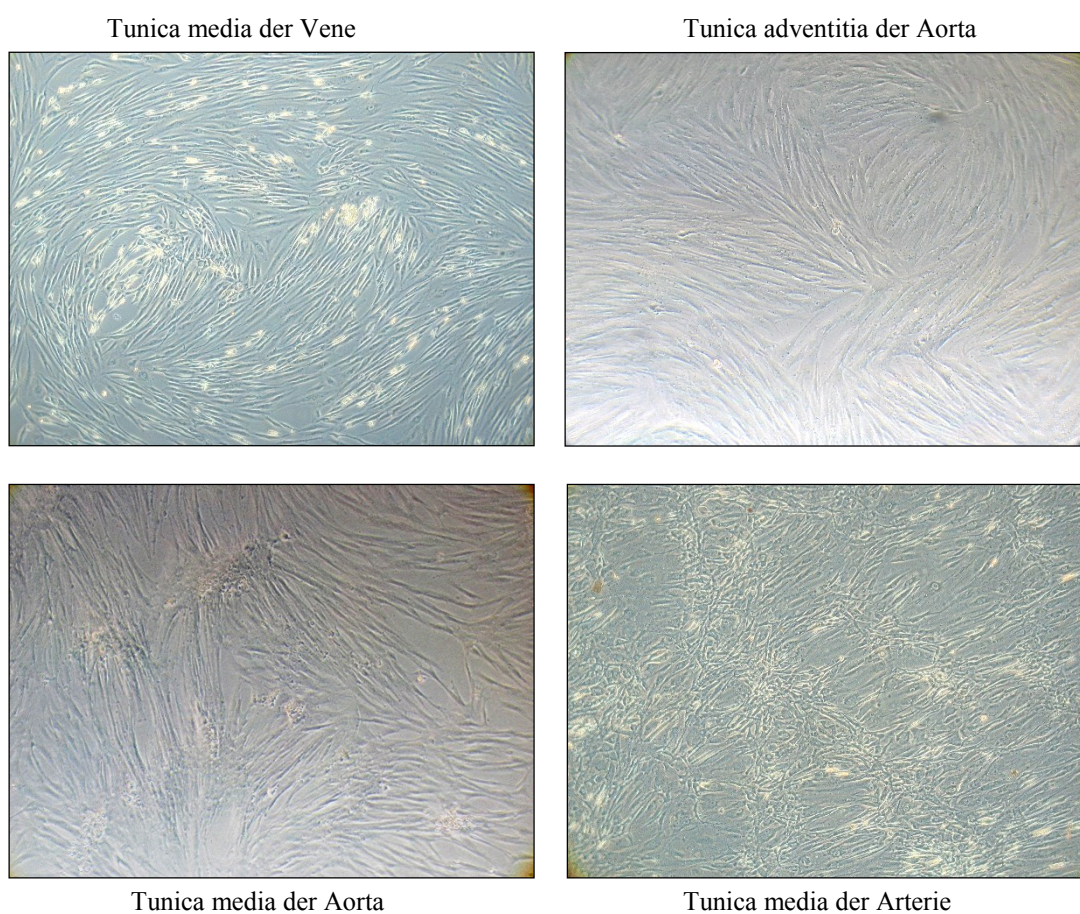


Abbildung 11. Lichtmikroskopische native Darstellung verschiedener Zellkulturen (50x, Phasenkontrastmikroskop).

4.1.2. Immunzytochemische Darstellung der Markerproteine

In Abbildung 12 wurde exemplarisch die immunzytochemische Visualisierung der vier Markerproteine α -smooth muscle Aktin, Prolyl-4-Hydroxylase, Kollagen I und Decorin dargestellt. Die β -Untereinheit der Prolyl-Hydroxylase war im gesamten zytoplasmatischen Raum angereichert und verstärkt im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat nachweisbar (Abb. 12 A).

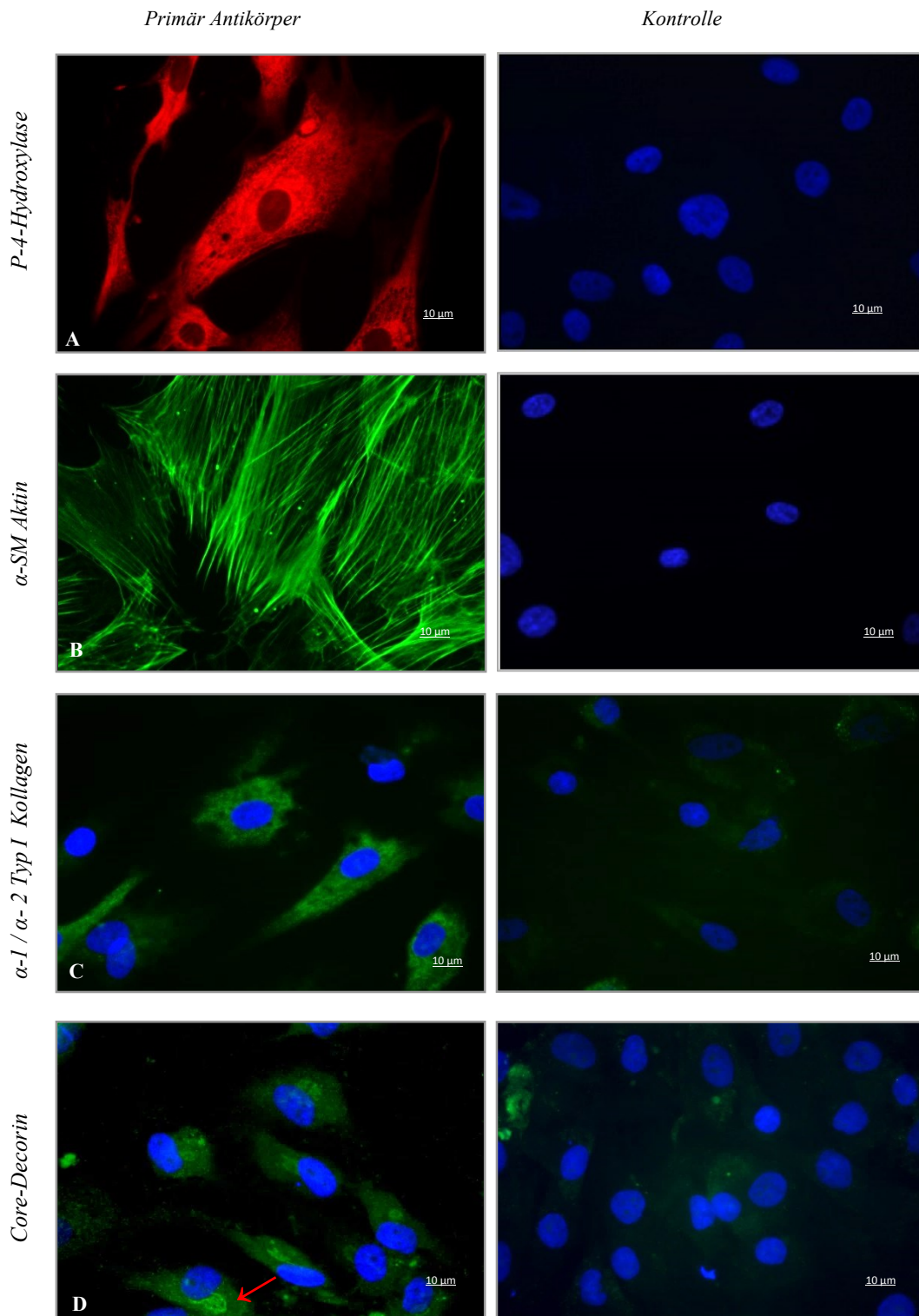


Abbildung 12. Immunfluoreszenz-Mikroskopie der Markerproteine. Links primäre und sekundärer Antikörper (FITC/TRITC), rechts nur sekundärer Antikörper als Kontrolle, Blaufärbung (DAPI) der Zellkerne, Vergrößerung 400x.

Die α -SM-Aktinfilamente bildete das bekannte intrazelluläre faserähnliche Muster (Abb. 12 B). Bezüglich des Kollagen I zeigte die Antikörperreaktion intrazellulär eine intensive granuläre Färbung, welche auf Bindungen im Golgikomplex und in den für die Exozytose bestimmten Vesikeln zurückzuführen war. Extrazellulär fand sich ein sehr schwaches retikuläres Muster (Abb.12 C). Das *core*-Decorin wurde hauptsächlich im Bereich des endoplasmatischen Retikulums vorgefunden und weniger im Bereich des Golgi-Apparates (Abb. 12 D, Pfeil rot). Des Weiteren zeigten die Vergleiche zwischen den jeweiligen Färbungen und ihren korrespondierenden Negativkontrollen ohne Primärantikörper die Spezifität der Immunzytochemien.

In der Literatur wird eine Großzahl an Markern zur Charakterisierung der Zellen beschrieben. Jedoch verwiesen Proudfoot et al. auf die Vielfalt der teils instabilen Zellmorphologien und auf das Fehlen spezifischer Marker für die unterschiedlichen Subpopulationen humaner vaskulärer glatter Muskelzellen. Solche Marker müssten aus ihrer Sicht noch klassifiziert werden [3]. Somit ist aufgrund der fließenden Übergänge zwischen den als klassifiziert bezeichneten Zelltypen wie vaskuläre glatte Muskelzellen, Myofibroblasten, Fibroblasten eine sichere Trennung der Zellen in einer Kulturpopulation nicht möglich. Des Weiteren lassen sich die Zellen auch technisch nicht sicher voneinander unterscheiden, da sie die Fähigkeit besitzen, sich bezüglich einer Vielzahl an Merkmalen ineinander transformieren zu können [5]. Daher wurde für diese Arbeit eine strenge Gewebeseparation der Tunica media bzw. Tunica adventitia vorausgesetzt und eine heterogene Zellkultur aus diesen Gefäßschichten angenommen. Für die Aufgabenstellung und Interpretation des Reaktionsvermögen von Zellen aus der Tunica media auf zyklische mechanische Dehnung sollte die Zellisolation im Bezug auf die Übertragbarkeit und Verständnis der Vorgänge *in vivo* gerecht werden.

Im Weiteren bestand die Frage nach der Veränderung der Zellen im Verlauf der Kultivierung. Hierfür wurden die Zellen mit den Markern α -smooth muscle (α -SM) Aktin und Prolyl-4-Hydroxylase zwei Wochen nach der primären Zellaussaat sowie nach weiteren vier bis sechs Wochen in zweiter Passage untersucht.

Wie in Abbildung 13 exemplarisch dargestellt, konnte beobachtet werden, dass die glatten Muskelzellen von Aorta und Arterie zunächst deutlich stärker α -SM-Aktin exprimieren. Nach weiteren 4-6 Wochen zeigte sich in der Immunzytochemie die Tendenz zur Verringerung der α -SM-Aktinexpression. Im Gegensatz dazu konnte eine Zunahme des α -SM Aktins in den Zellen aus der T. adventitia der Aorta und T. media der Vene beobachtet werden. Dieses Expressionsverhalten wurde in der Literatur unter ähnlichen Bedingungen beschrieben [5,9,10,13,112,113].

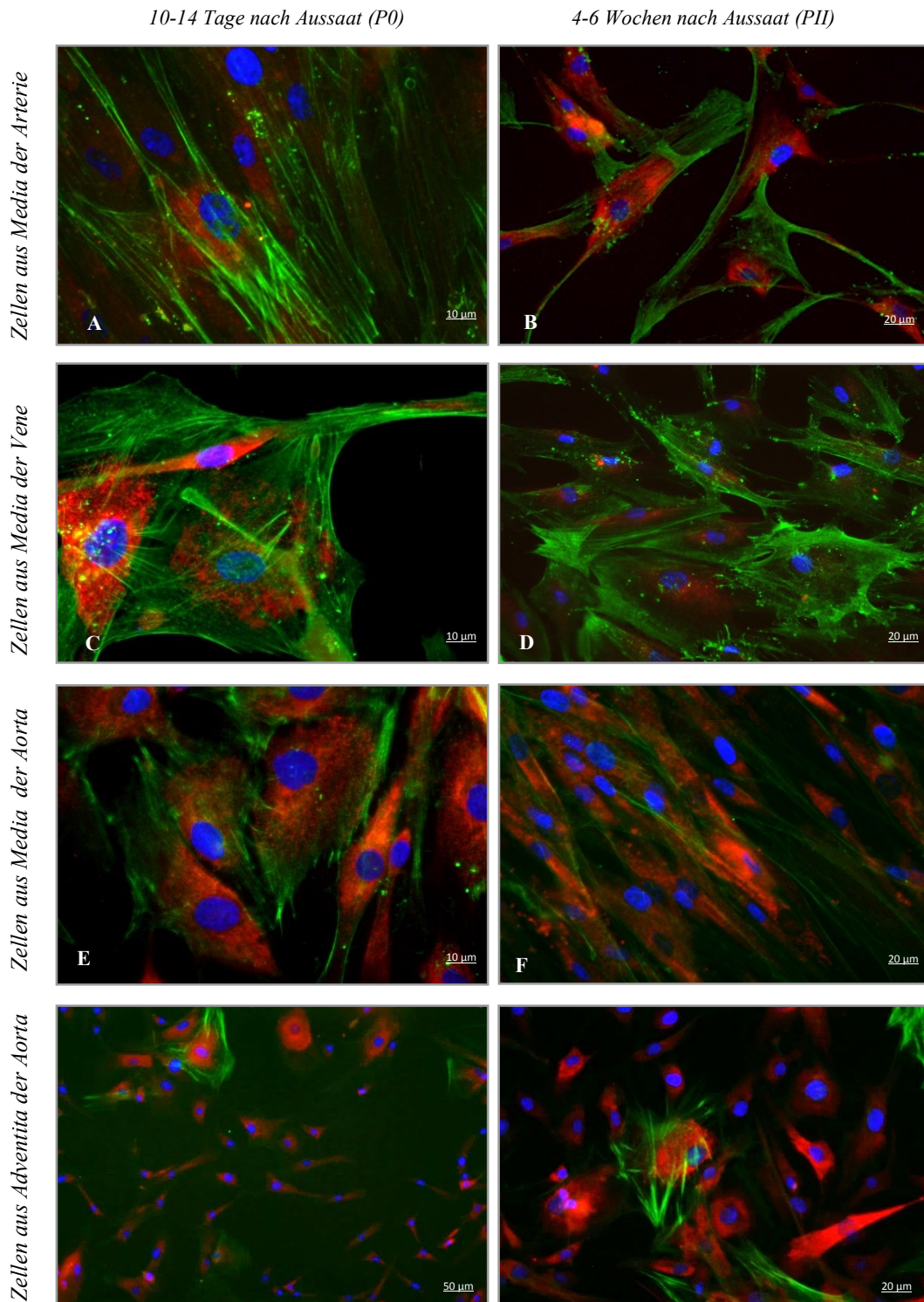


Abbildung 13. Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellkulturen aus der Tunica media der Arterie (A, B), aus der Tunica media der Vene (C, D) und Tunica media der Aorta (E, F) sowie T. adventitia der Aorta (G, H). Doppel-Antikörpermarkierung mit α -SMA (FITC, grün) und mit Prolyl-4-Hydroxylase (TRITC, rot), nach 2 Wochen in Passage 0 (A, C, E, F) und nach 6-8 Wochen (B, D, F, H) nach primärer Zellisolation in Passage II; Maß 10 μ m (400x), 20 μ m (200x), 50 μ m (100x).

Des Weiteren wurde in den Kulturen der Vene das häufigere Vorkommen von einzelnen oder in Gruppen lokalisierten, myofibroblastenähnlichen Zellen beobachtet (Abb. 14). Bezüglich der Prolyl-4-Hydroxylase konnten keine wesentlichen Veränderungen wahrgenommen werden. Aufgrund dieser Veränderungen wäre die Durchführung der Versuche nach wenigen Tagen nach Zellisolation zu empfehlen. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Gewebematerialien und begrenzten Zellzahl durch Gewebeverdau konnten die Untersuchungen nicht in Passage 0 oder I durchgeführt werden. Auf ein Auswachsen aus dem Gewebematerial wurde aufgrund einer Replikation weniger Zellen und Provozierung einer abnormen Änderung des Zellphänotyps explizit verzichtet.

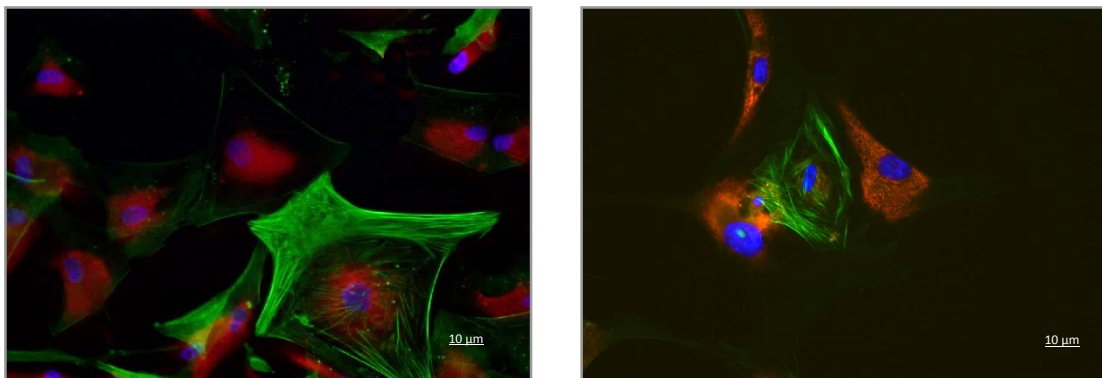


Abbildung 14. Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Myofibroblasten aus der Zellkultur der Tunica media der Vene 2 Wochen nach Zellaussaat. Doppel-Antikörpermarkierung mit α -SMA (FITC, grün) und mit Prolyl-4-Hydroxylase (TRITC, rot), Kerngegenfärbung mit DAPI (blau), Vergrößerung 400x.

4.1.3. Quantifizierung der Markerproteine in den Zellkulturen vor der zyklischen mechanischen Dehnung

In den immunzytochemischen Analysen (Kap. 4.1.2.) konnten Expressionsänderungen der Markerproteine im Verlauf einer Zellkultur beobachtet werden. Für eine bessere Interpretation der Expressionsergebnisse nach einer zyklischen mechanischen Dehnung, wie im Kap. 3 dargelegt, erschien eine weitere Quantifizierung der ausgewählten Proteine mittels Western-Blot-Analyse sinnvoll. Hierzu wurden Zelllysate von Zellkulturen unmittelbar vor der mechanischen Dehnung verwendet. Diese Proben entsprechen somit den Zellkulturkontrollen im Dehnungsversuch. Diese Quantifizierung wird in der vorliegenden Arbeit als basales oder auch statisches Expressionsprofil bezeichnet.

Wie aus der Abbildung 15 zu entnehmen, fanden sich eher geringere Abweichungen in den Expressionen von α -smooth muscle Aktin. In den glatten Muskelzellen aus der T. media von Aorta, Arterie und Vene ergaben sich nur geringe Differenzen (T. media der Aorta 1.13 ± 0.07 , der Arterie 1.00 ± 0.02 , der Vene 0.91 ± 0.03). Die Expression von α -SM-Aktin war in den aortalen glatten Muskelzellen nur ca. 13% stärker als in den arteriellen und nur 24% stärker als in den venösen Muskelzellen. In den fibroblastenähnlichen Zellen aus der T. adventitia der Aorta stellte sich die niedrigste Expression dar (T. adventitia der Aorta 0.75 ± 0.017). Bezogen auf diese adventitiellen Zellen betrug die Differenz auf die aortalen glatten Muskelzellen ca. 51 %. Der Kruskal-Wallis Test bestätigte eine signifikante Varianz der Ergebnisse, jedoch der Zwischengruppenvergleich mittels *post hoc*-Test konnte aufgrund der geringen Probenzahl keine Signifikanz errechnen.

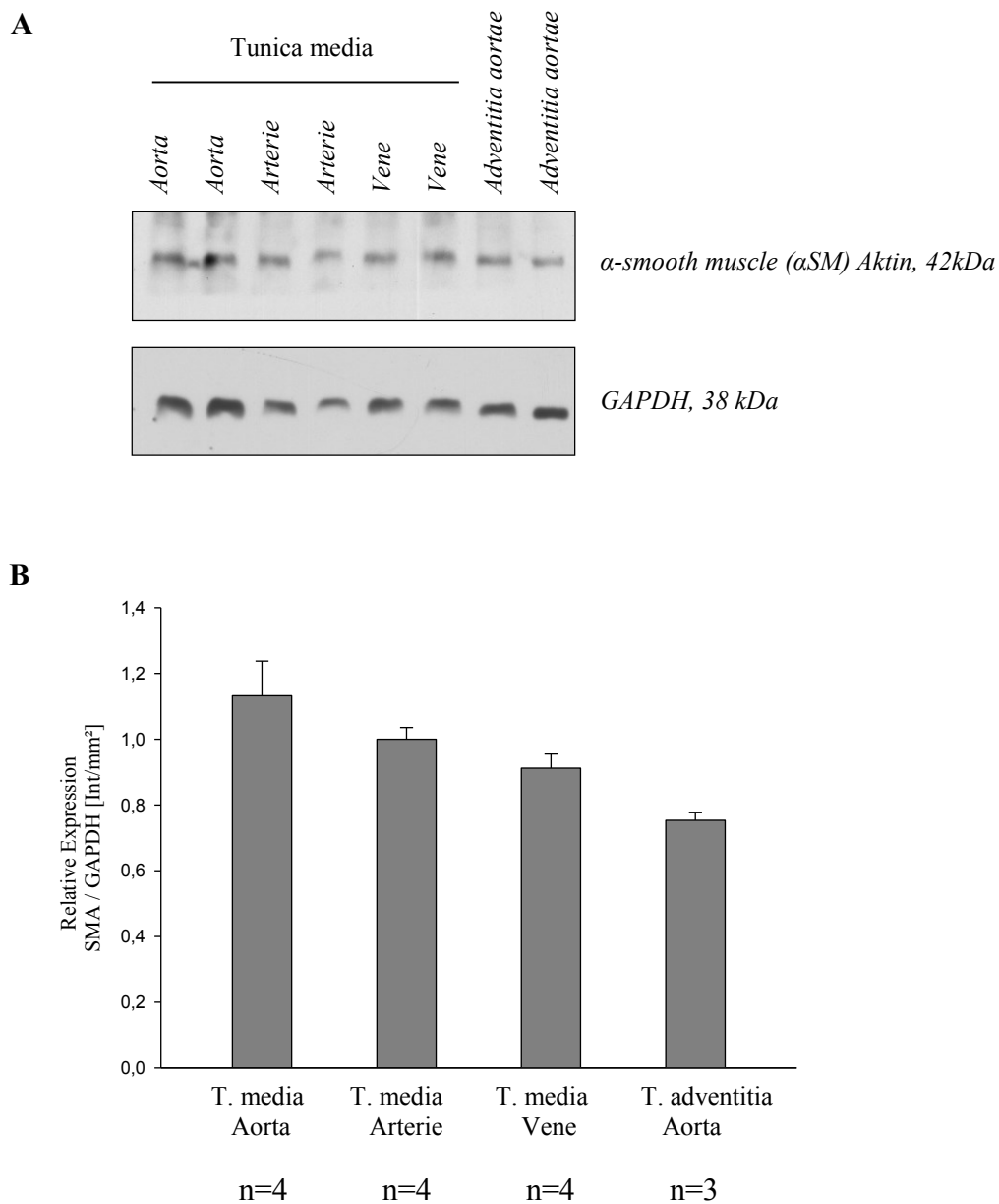


Abbildung 15. Expressionsprofil von α -smooth muscle (α -SM) Aktin aus den Zellen der Tunica media der Aorta ascendenz, der Arteria radialis und der Vena saphena magna sowie der Tunica adventitia der Aorta ascendenz. **(A)** Repräsentative Western Blot Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle. **(B)** Quantifizierung der Western Blot Analysen mittels Quantity One und Sigmapstat (n=Anzahl der Proben).

Die Prolyl-4-Hydroxylase ist ein α_2 -, β_2 - Tetramer und der Antikörper bindet an das β -Monomer. In Abbildung 16 ist das Expressionsprofil von diesem Enzym dargestellt. Es fanden sich signifikante Unterschiede mit niedrigen Expressionslevel in den glatten Muskelzellen der T. media und der T. adventitia der Aorta gegenüber erhöhten in der T. media der Vene und der Arterie (T.media der Aorta 0.77 ± 0.05 , T. adventitia der Aorta 0.62 ± 0.08 , T. media der Vene 1.12 ± 0.07 , T. media der Arterie 1.00 ± 0.03). Beachtenswert ist im Vergleich zu dem Expressionsprofil von α -SM-Aktin die wenig differenten Level von Prolyl-4-Hydroxylase in den arteriellen und venösen Zellen aus der T. media. Diese beiden Zellkulturtypen hatten im Vergleich zu den aortalen glatten Muskelzellen im Mittel eine um Faktor 1.4 stärkere Expression und zu den adventitiellen Zellen der Aorta im Mittel ein erhöhtes Level um den Faktor 1.7. Der Kruskal-Wallis Test bestätigte eine signifikante Varianz der Ergebnisse. Die statistische Relevanz des Zwischengruppenvergleiches mittels *post hoc*-Test ist in Abbildung 16 aufgetragen.

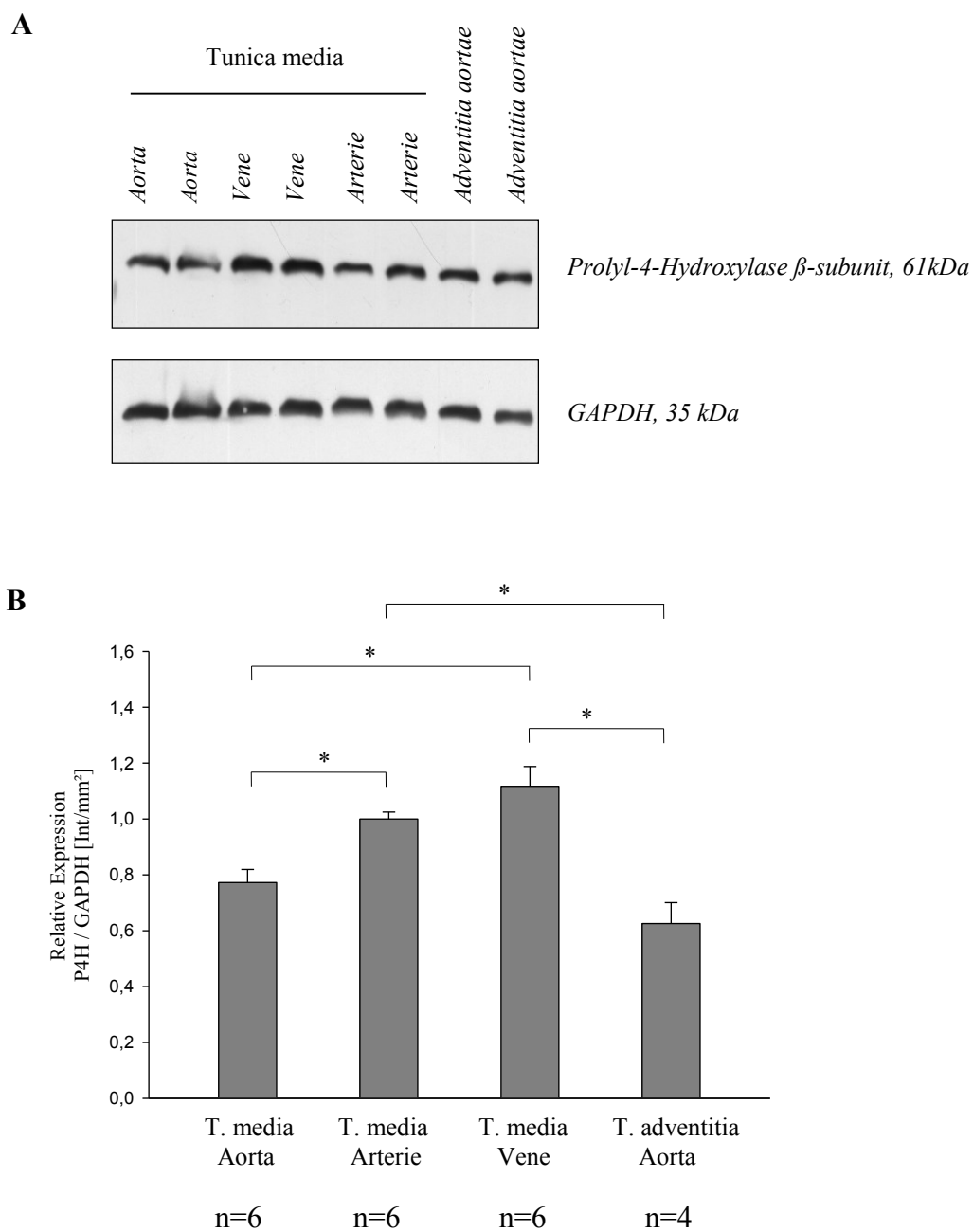


Abbildung 16. Expressionsprofil von Prolyl-4-hydroxylase (β -Monomer) aus den Zellen der Tunica media der Aorta ascendenz, der Arteria radialis und der Vena saphena magna sowie der Tunica adventitia der Aorta ascendenz. (A) Repräsentative Western Blot Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle. (B) Quantifizierung der Western Blot Analysen mittels Quantity One und Sigmastat (n=Anzahl der Proben, *p<0.05).

Decorin repräsentiert in der vorliegenden Arbeit neben Kollagen I und Prolyl-4-Hydroxylase ein weiteres Protein der extrazellulären Matrix und gehört zu der Gruppe der kleinen Matrix-assoziierten Proteoglycane, welche aus einem *core*-Protein (ca. 38 kDa) und mindestens einer kovalent gebundener Glykosaminykane-Kette (ca. 15-56 kDa) bestehen [67,73]. Der Antikörper für die Bestimmung der relativen Expression bindet an das *core*-Protein des Decorins. Das Expressionsprofil, entsprechend Abbildung 17 (Seite 47), konnte überraschend deutliche Unterschiede aufzeigen.

Die glatten Muskelzellen aus der T. media der Vene hatten die stärkste Markerexpression. Diese war im Vergleich zu den Zellen aus der T. media der Arterie signifikant um das 2.1-fache erhöht (T. media der Vene 2.13 ± 0.05 , T. media der Arterie 1.00 ± 0.01). Gegenüber den fibroblastenähnlichen adventitiellen Zellen aus der Aorta wurde das Protein in den venösen glatten Muskelzellen aus der T. media um das 1.7-fache stärker exprimiert (T. adventitia der Aorta 1.23 ± 0.02 , T. media der Vene 2.13 ± 0.05). Besonders auffällig waren in dieser Proteinanalyse die Zellkulturen der T. media der Aorta. Das Decorin konnte hier nur marginal nachgewiesen werden (T. media der Aorta 0.11 ± 0.01). Der Kruskal-Wallis Test bestätigte eine signifikante Varianz der Ergebnisse, jedoch der Zwischengruppenvergleich mittels *post hoc*-Test konnte aufgrund der geringen Probenzahl nur einen signifikanten Unterschied zwischen T. media der Vene und der Aorta errechnen.

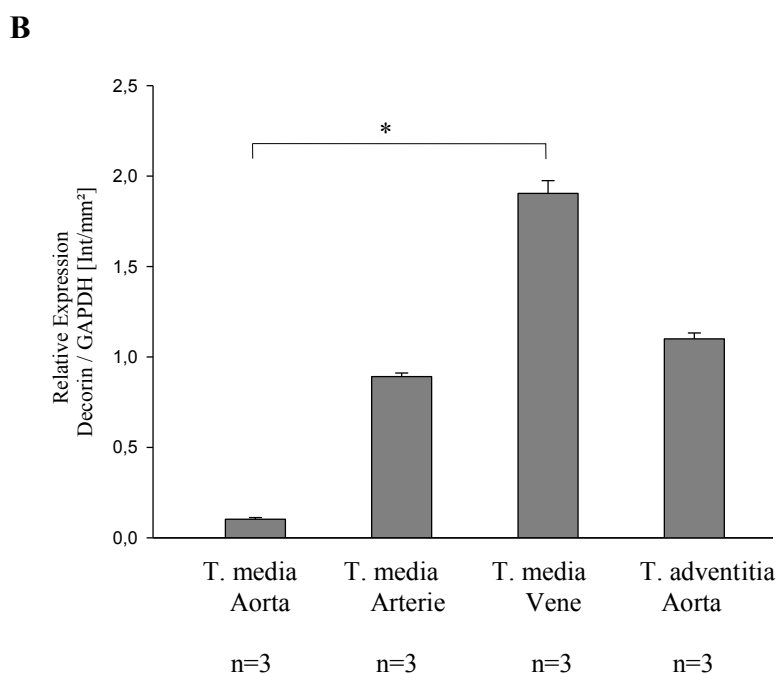
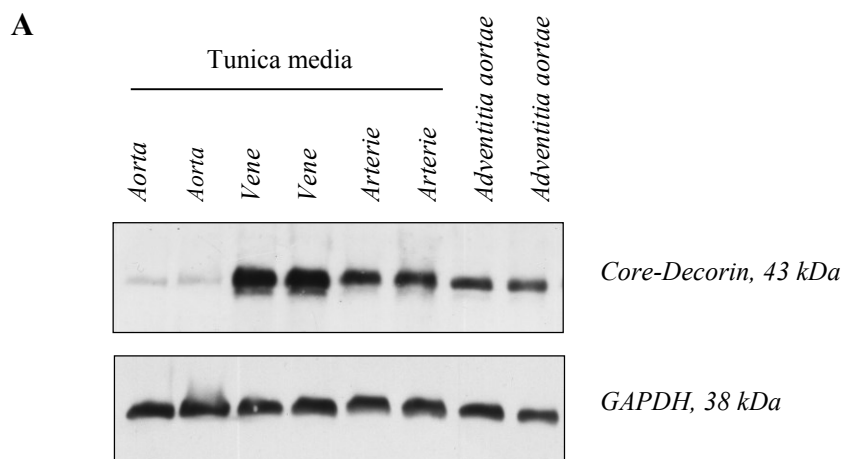


Abbildung 17. Expressionsprofil von Decorin aus den Zellen der Tunica media der Aorta ascendenz, der Arteria radialis und der Vena saphena magna sowie der Tunica adventitia der Aorta ascendenz. **(A)** Repräsentative Western Blot Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle. **(B)** Quantifizierung der Western Blot Analysen mittels Quantity One und Sigmastat (n=Anzahl der Proben, *p<0.05).

4.2. Einfluß der zyklischen mechanischen Dehnung auf die Synthese der Markerproteine

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Synthese von ausgewählten Proteinen von kultivierten humanen Gefäßmuskelzellen unter zyklisch mechanischer Zelldehnung (0.5 Hz, 10% Elongation, *Flexcell Unit*) zu untersuchen. Nachdem die basale Expression der Markerproteine aus den Zellkulturen der jeweiligen Gefäße untersucht wurde, sollen folgend die Syntheseraten dieser verschiedenen Proteine nach ihrer Dehnung im Verhältnis zur statischen Kontrollgruppe aufgezeigt werden.

4.2.1. Zellzahlbestimmung und Vitalitätsrate

Wichtig erschien während der Validierung der Zelldehnungsparameter die Zellzahl und Vitalitätsrate vor und nach 24 h Dehnung. Es ergab sich unter Verwendung der *Flexcell-Unit* Kap. 3.4. mit einem Dehnungszyklus von 1 Hz und 10 % Elongation ein Zellverlust im Bereich der Loadingstation im Mittel von 24,6 % (n=3). Dies konnte auf die steile Dehnungsamplitude und dadurch bedingte teils schwingende mechanische Irritation der Silikonmembran zurückgeführt werden, welche zu einem Ablösen der Zellen führte. Unter 0,5 Hz und 10 % Elongation wurden nur Zellverluste im Mittel von 4,2 % beobachtet (n=3). Die Vitalitätsrate nach 24 h mechanischer Dehnung mit 0,5 Hz und 10% Elongation betrug 96,3 % (n=3) im Vergleich zur ruhenden Kultur mit 98,1 %.

4.2.2. α -smooth muscle Aktins: Geringe Differenzen im Expressionsverhalten

Unter Betrachtung der in Abbildung 15 dargestellten ähnlichen Expressionslevel des α -SMA in den statischen Kulturen konnte nach zyklischer mechanischer Dehnung über 24 h, siehe Abbildung 18, in den glatten Muskelzellen der T. media der Aorta, Arterie und Vene eine analoge Steigerung um den Faktor 1.5 gefunden werden (T. media der Aorta 1.49 ± 0.06 vs. 1.00 ± 0.04 , $p < 0.05$; T. media der Arterie 1.57 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.04 , $p < 0.05$; T. media der Vene 1.68 ± 0.14 vs. 1.00 ± 0.07 , $p < 0.05$). Die Expression von α -SM-Aktin in den adventitiellen Zellen der Aorta nahm nur um das 1,2 fache zu. (T. adventitia der Aorta 1.22 ± 0.02 vs. 1.00 ± 0.01 , $p < 0.05$). Die Kulturen der glatten Muskelzellen aus der Arterie und der Vene wurden des Weiteren über 96 Stunden (s96) gedehnt. Es fand sich in der venösen Muskelzellen eine weitere deutliche Steigerung der Aktinsynthese um den Faktor 2.6 zur Kontrollgruppe und um den Faktor 1.6 zur Gruppe s24 (s96 2.65 ± 0.07 vs k 1.00 ± 0.02 , $p < 0.05$; s96 2.65 ± 0.07 vs. s24 1.68 ± 0.14 , $p < 0.05$). Dagegen konnte in der Gruppe s96 der Arterie keine weitere Zunahme zur Gruppe s24 beobachtet werden (s96 1.6 ± 0.12 vs k 1.00 ± 0.04 , $p < 0.05$).

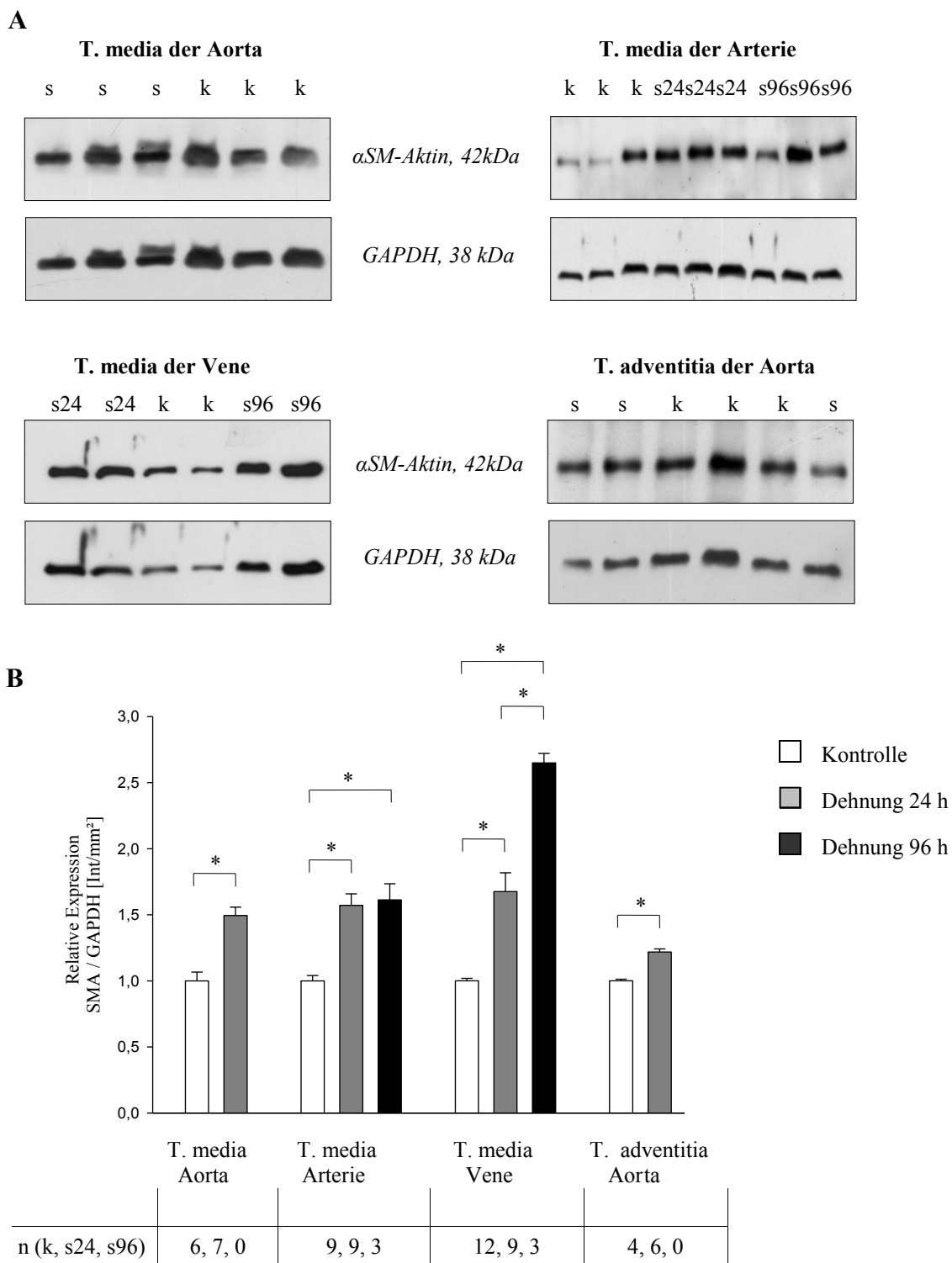


Abbildung 18. Quantifizierung von (α -SM) Aktin nach zyklischer mechanischer Dehnung aus den Zellen der Tunica media der Aorta ascendenz, der Arteria radialis und der Vena saphena magna sowie der Tunica adventitia der Aorta ascendenz. Für 96 h Protokoll bezüglich Aorta standen ungenügend Proben zur Verfügung. (A) Repräsentative Western Blot Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle (k=Kontrollen, s24= Dehnung über 24 h, s96=Dehnung über 96 h). (B) Quantifizierung der Western Blot Analysen mit Quantity One und Sigmastat (n=Anzahl der Proben; * p<0.05).

4.2.3. Prolyl-4-Hydroxylase: Stärkste Expression in den Zellen aus der T. media der Vene

Wie in Kapitel 4.1. beschrieben, wurde das Enzym Prolyl-4-Hydroxylase (P4H) als intrazellulärer Marker für die Analyse der Kollagenbiosynthese ausgewählt. Das Kollagen I selbst repräsentierte den Marker für die extrazelluläre Matrix.

Die Abbildung 19 veranschaulicht das Expressionsverhalten. Es fand sich die stärkste Proteinexpression in den venösen glatten Muskelzellen mit einer Steigerung um das 2.2-fache nach 24 Stunden Dehnung und um das 5.5-fache nach 96 Stunden im Vergleich zur statischen Kontrollgruppe (T. media der Vene s24 2.19 ± 0.12 vs. k 1.00 ± 0.03 , $p < 0.05$; s96 5.48 ± 0.53 vs. k 1.00 ± 0.03 , $p < 0.05$). Der weitere Anstieg der Expression von 24 Stunden auf 96 Stunden Dehnung war ebenfalls signifikant.

In der Zellkultur der arteriellen glatten Muskelzellen konnten nach 24 Stunden Dehnung eine Steigerung um das 1.4-fache ermittelt werden. Interessanter Weise stellte sich nach 96 Stunden kein weiterer Anstieg ein (T. media der Arterie s24 1.41 ± 0.06 vs. k 1.00 ± 0.03 , $p < 0.05$; s96 1.36 ± 0.08 vs. k 1.00 ± 0.03 , $p < 0.05$).

Die aortalen glatten Muskelzellen zeigten nach 24 Stunden hingegen nur einen geringeren Zunahme um den Faktor 1.24 (T. media der Aorta s24 1.25 ± 0.05 vs. 1.00 ± 0.01 , $p < 0.05$). Ein ähnliches Verhalten mit einem Faktor von 1.25 ließ sich in den adventitellen Zellen der Aorta nachweisen (T. adventitia der Aorta s24 1.25 ± 0.06 vs. 1.00 ± 0.04 , $p < 0.05$).

Ein Vergleich der P4H-Expressionen nach 96 h zwischen den venösen und arteriellen glatten Muskelzellen zeigt, dass die Zellen aus der T. media der Vene das β -Monomer 4-fach höher exprimieren im Gegensatz zu denen aus der T. media der Arterie.

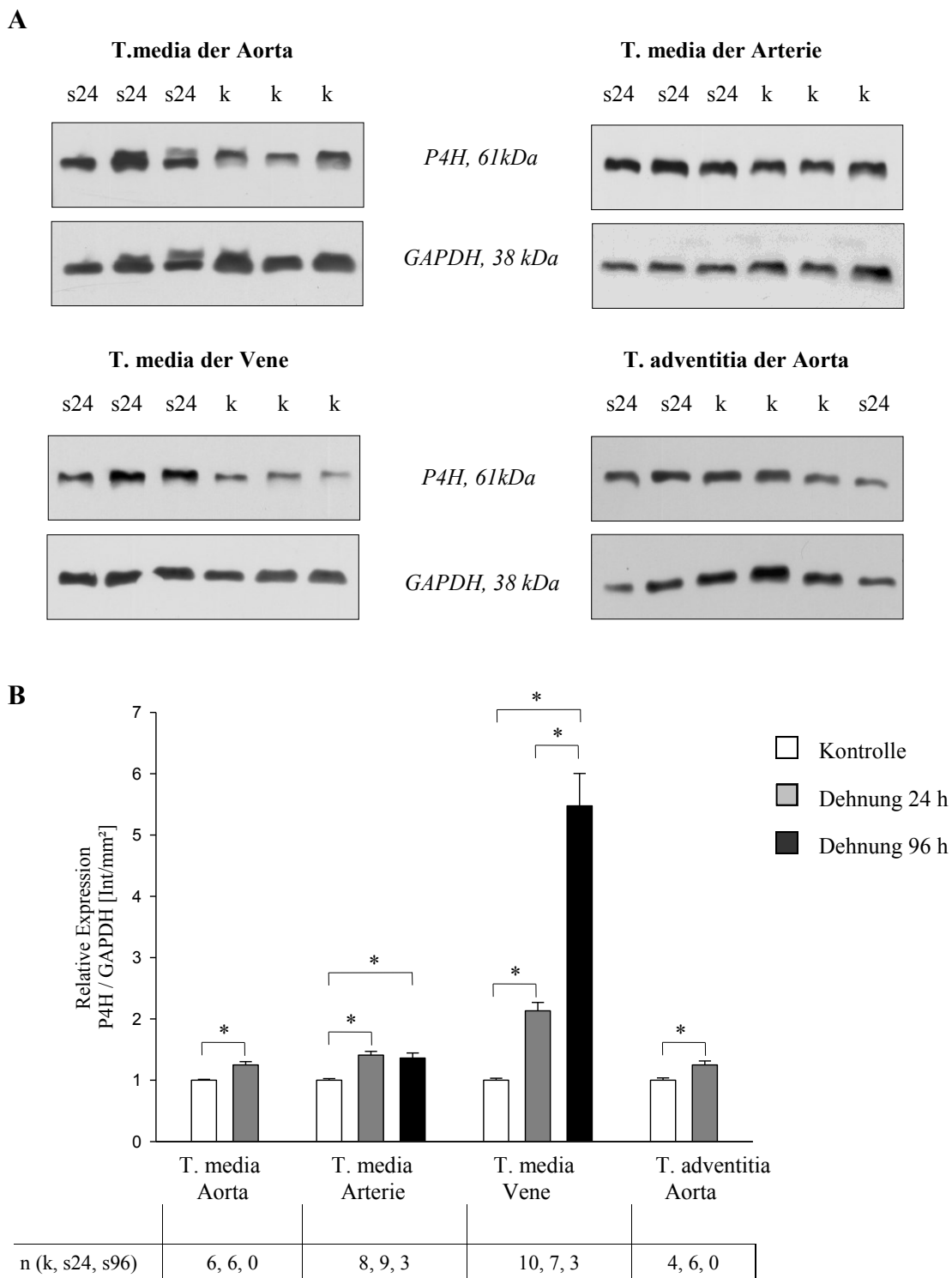


Abbildung 19. Quantifizierung von Prolyl-4-Hydroxylase (P4H) nach zyklischer mechanischer Dehnung aus den Zellen der Tunica media der Aorta ascendenz, der Arteria radialis und der Vena saphena magna sowie der Tunica adventitia der Aorta ascendenz. Für 96 h Protokoll bezüglich Aorta und Adventitia standen ungenügend Proben zur Verfügung. **(A)** Repräsentative Western Blot Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle (k=Kontrollen, s24= Dehnung über 24 h, s96=Dehnung über 96 h). **(B)** Quantifizierung der Western Blot Analysen (n=Anzahl der Proben;* p<0.05).

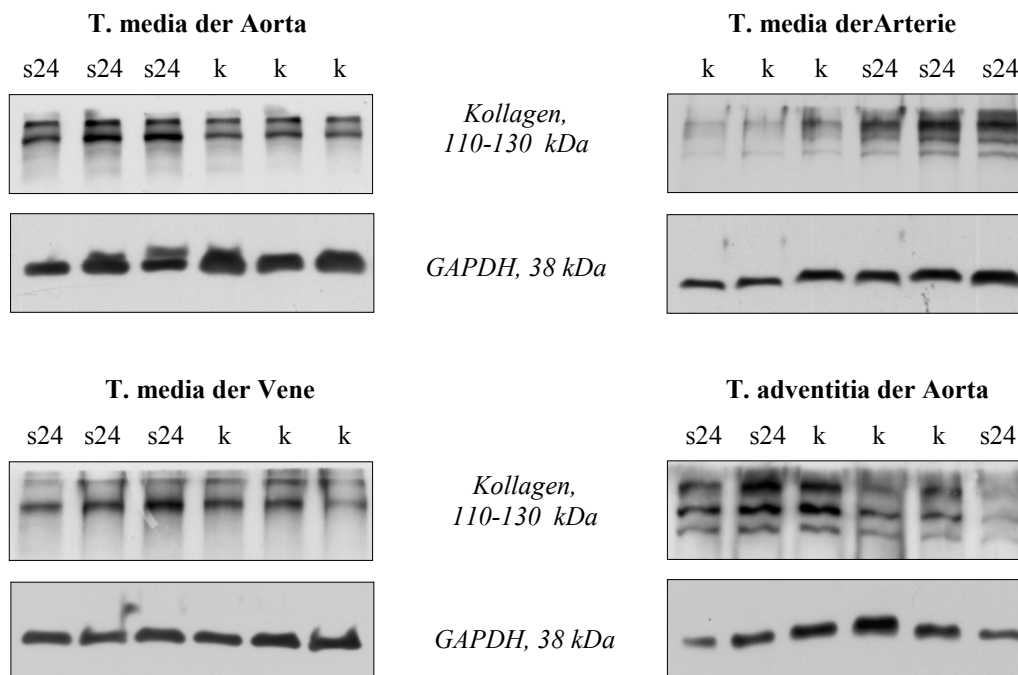
4.2.4. Kollagen I: Steigerung der Biosynthese in allen Kulturen

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von glatten Muskelzellen aus verschiedenen humanen Gefäßen auf die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen nach mechanischer Dehnung. Normale mediale glatte Muskelzellen sind von einem dichten ECM-Netzwerk der interstitiellen Kollagenfasern umgeben [114,115]. Kollagen I wurde in der vorliegenden Arbeit repräsentativ für die Matrixproteine untersucht.

Die Analyse entsprechend Abbildung 20 ergab in allen Zellkulturen einen signifikanten Anstieg nach 24 h Dehnung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Steigerungen um den Faktor 1.5 bis 1.65 konnten in den arteriellen und venösen glatten Muskelzellen sowie in den adventitiellen Zellen beobachtet werden. Die aortalen glatten Muskelzellen zeigten nur eine geringe Zunahme nach Dehnung um den Faktor 1.2 zur Kontrollgruppe (T. media der Aorta 1.25 ± 0.07 vs. 1.00 ± 0.06 , $p < 0.05$; T. media der Arterie 1.64 ± 0.07 vs. 1.00 ± 0.05 , $p < 0.05$; T. media der Vene 1.65 ± 0.13 vs. 1.00 ± 0.05 , $p < 0.05$; T. adventitia de Aorta 1.53 ± 0.13 vs. 1.00 ± 0.05 , $p < 0.05$).

Weitere Untersuchungen nach 96 Stunden Dehnung konnten aufgrund der geringen Probenmenge nicht durchgeführt werden.

A



B

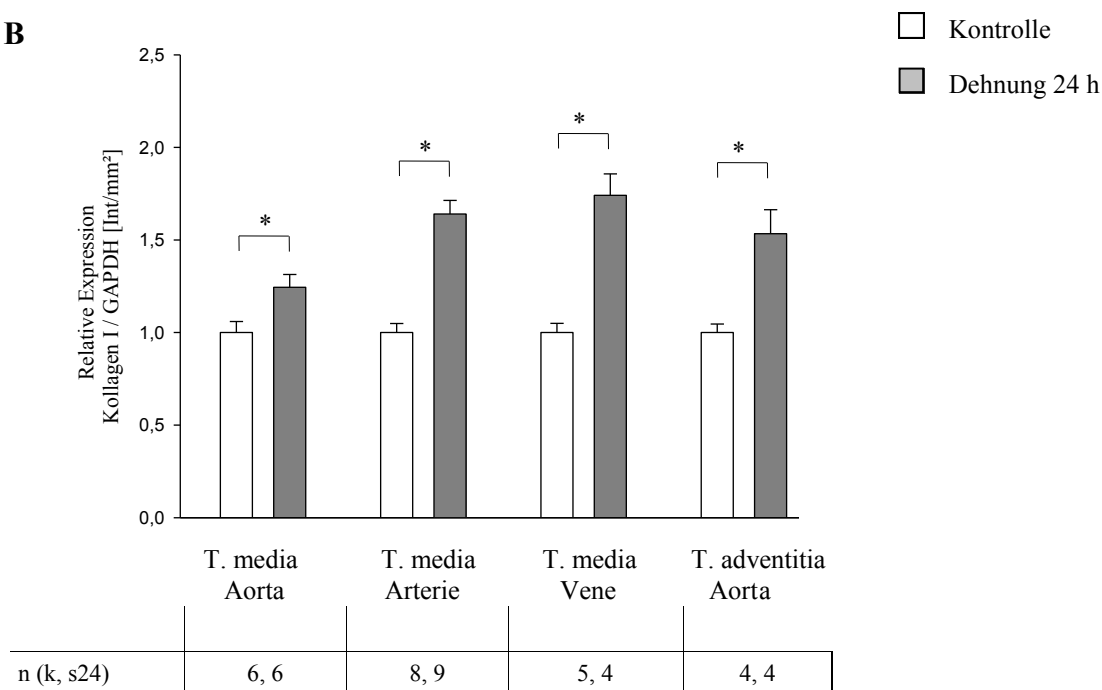


Abbildung 20. Quantifizierung von Kollagen I nach zyklischer mechanischer Dehnung aus den Zellen der Tunica media der Aorta ascendenz, der Arteria radialis und der Vena saphena magna sowie der Tunica adventitia der Aorta ascendenz. Für 96 h Protokoll standen ungenügend Proben zur Verfügung. **(A)** Repräsentative Western Blot Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle (k=Kontrollen, s24=Dehnung über 24 h). **(B)** Quantifizierung der Western Blot Analysen mit Quantity One und Sigmapstat (n=Anzahl der Proben ; * p<0.05).

4.2.5. Decorin:

Abnahme der Expression in den Zellen aus der T. media der Arterie und Zunahme in den Zellen aus der T. media der Vene.

Als weiteres Markerprotein der extrazellulären Matrix wurde das Proteoglycan Decorin gewählt, welchem ein Einfluß auf die Modulation der extrazellulären Matrix zugeschrieben wird.

Die eigenen Analysen zeigten ein unterschiedliches Verhalten zwischen den arteriellen und venösen glatten Muskelzellen (Abb. 21). In den Zellen der T. media aus der Arterie konnte keine signifikante Änderung sondern nur eine Tendenz zur sinkenden Decorinexpression nach 24 Stunden nachgewiesen werden (Arterie s24 0.82 ± 0.7 vs k 1.00 ± 0.03). Dieser Trend konnte in der Beobachtung über 96 Stunden gegenüber der statischen Kontrollgruppe bestätigt werden (Arterie s96 0.77 ± 0.08 vs. k 1.00 ± 0.03 , $p < 0.05$). Im Gegensatz dazu stieg die Decorinexpression in den venösen glatten Muskelzellen nach 24 Stunden Dehnung um 1.36-fache gegenüber ihrer Kontrollgruppe an (T. media der Vene 1.36 ± 0.06 vs. 1.00 ± 0.04 , $p < 0.05$). In den fibroblasten-ähnlichen adventitiellen Zellen fand sich ein geringerer Anstieg um den Faktor 1.22 im Vergleich zur Kontrolle (T. adventitia der Aorta 1.22 ± 0.02 vs. 1.00 ± 0.01 , $p < 0.05$). Auf dem Blot der Aorta ließ sich das Decorin, wie im Kap. 4.1.3. beschrieben, nicht ausreichend für eine Analyse nachweisen.

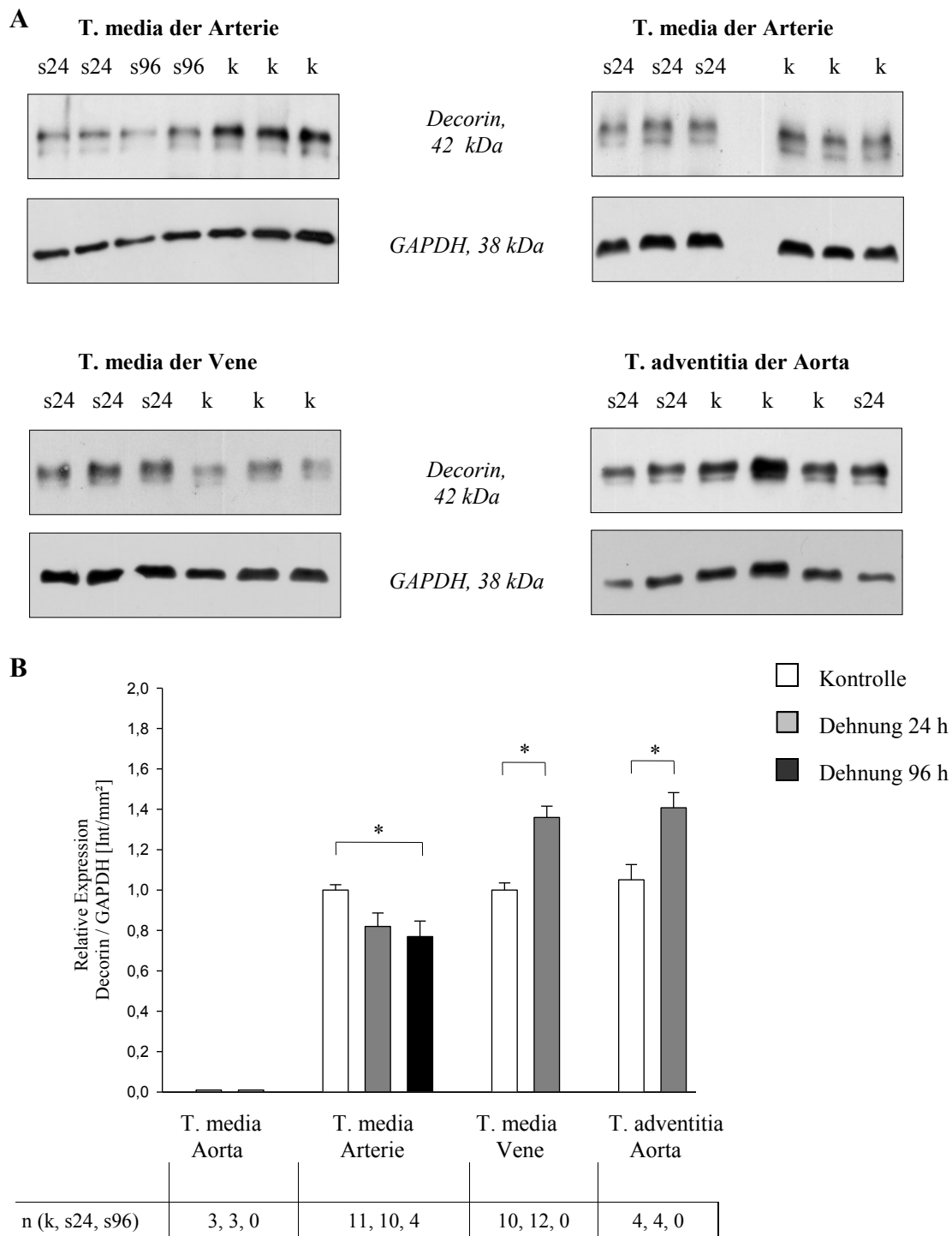


Abbildung 21. Proteinanalyse von Decorin nach Zellkulturdehnung aus den Zellen der Tunica media der Aorta ascendenz, der Arteria radialis und der Vena saphena magna sowie der Tunica adventitia der Aorta ascendenz. Für 96 h Protokoll Aorta und Vene standen ungenügend Proben zur Verfügung. **(A)** Repräsentative Western Blot Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle (k=Kontrollen, s24= Dehnung über 24 h, s96=Dehnung über 96 h). **(B)** Quantifizierung der Western Blot Analysen mit Quantity One und Sigmastat (n=Anzahl der Proben; * p<0.05).

5. Diskussion

Zu einer medizinischen Behandlung von arteriosklerotisch-stenosierte Gefäße gehört neben der konservativen und interventionellen Therapie die Bypass-Operation. Diese zählt zu den häufigsten chirurgischen Verfahren. Trotz einer bevorzugten Verwendung von arteriellen Transplantaten wird weiterhin am häufigsten die autologe Vena saphena genutzt, da diese leicht zugänglich, oft verfügbar und gering arteriosklerotisch verändert ist [116]. Die schlechte langfristige Durchgängigkeit von Venentransplantaten ist jedoch ein großes Problem. 10 Jahre nach einer kardialen Bypass-Operation sind bis zu 50% der Transplantate verschlossen und der Rest ist oft in Folge der Arterialisierung stark krankhaft verändert [117,118,119,120]. Die neointimale Hyperplasie und eine rasche Atherosklerose sind pathogenetische Grundlagen für das Scheitern der Venentransplantate [121,122,123]. Diese Hyperplasie ist eine Folge der Akkumulation von Zellen, hauptsächlich glatter Muskelzellen und Myofibroblasten sowie von extrazellulärer Matrix in der dem Lumen zugewandten Gefäßschicht. Des Weiteren ist sie der wichtigste Mechanismus bezüglich des Transplantatversagens zwischen dem 1. und 12. Monat nach der Implantation [124]. Bypassoperationen werden neben der kardiovaskulären Behandlung in der peripheren Gefäßchirurgie durchgeführt. Hierfür werden z.B. zur arteriellen Revaskularisation an der unteren Extremität langstreckige Segmente der Vena saphena magna verwendet, welche bei femorofemorale, femorocrurale oder femoropedale Bypässen den gesamten Saphenaverlauf entsprechen können. Die Langzeitergebnisse zur Offenheitsrate sind jedoch aufgrund des häufig langstreckigen Venentransplantates eher schlechter im Vergleich zur kardiovaskulären Chirurgie [125,126,127].

Ein bislang kaum untersuchter Ansatz ist der Einfluß mechanischer Zelldehnung auf die Zellbiologie venöser und arterieller glatter Muskelzellen. Mit dieser Arbeit wurde eine vergleichende Untersuchung über das dehnungsinduzierte Expressionsverhalten von α -smooth muscle Aktin, Prolyl-4-Hydroxylase, Kollagen I und Decorin in den humanen Zellen der Tunica media der Vena saphena magna und der Tunica media der Arteria radialis unter standardisierten Kulturbedingungen durchgeführt. Die Gewebematerialien stammten explizit von Spendern, welche sich im Rahmen einer arteriosklerotischen Erkrankung einer Gefäßoperation unterziehen mussten.

Weitere Erkrankungen des Gefäßsystems neben der Arteriosklerose sind aneurysmatische Gefäßveränderungen, welche krankhafte Erweiterungen bis hin zu einer Gefäßruptur darstellen. Hierzu wurden Zellen aus der Tunica media sowie Tunica adventitia der Aorta ascendens unter den gleichen Bedingungen auf das dehnungsinduzierte Expressionsverhalten der Markerproteine untersucht.

Eine große Stärke dieser Untersuchung war zum einen die Verwendung von humanen Gewebe, zum anderen die Zellisolation durch Verdau und Probeneinschluß mit mind. 1×10^5 Zellen. Somit wurde, im Gegensatz zur Methode des Zellauswachsens, die Möglichkeit einer Multiplikation nur weniger Zellen weitgehend ausgeschlossen. Dadurch wurde zum einen die Förderung einer Phänotypänderung kultivierter Zellen und zum anderen eine Begünstigung weniger replikationsfreudiger Zellarten, wie zum Beispiel Fibroblasten, vermieden. Eine Einschränkung der Untersuchung, wie in vielen anderen vorausgegangenen Publikationen ebenfalls proklamiert, ist die Phänotypisierung der Zellen. Daher wurde neben der Annahme einer Mischkultur von unterschiedlich phänotypisierten Zellen glatter Muskelzellen einschließlich Fibroblasten die strenge Selektion der Gefäßschichten während der Gefäßpräparation sowie nachfolgend standardisierte Zellbedingungen vorgenommen.

Die Experimente wurden mit einer physiologischen zyklischen mechanischen Dehnung (*Bioflex*-kollagenbeschichtete Platten, 10 % Dehnung, 0.5 Hz, 24 und 96 Stunden) durchgeführt. Diese Methode nahm folglich keine Rücksicht auf bestimmte Variablen, wie sie in der *in vivo* Situation vorliegen, wie z.B. Blutfluss, Blutdruck mit Scherwandspannung und Unterschiede in der Architektur der Venen- und Arteriewände sowie Einfluß von parakriner oder humoraler Stimulation. Letztere sind einschließlich des vegetativen perivaskulären Nervensystems wichtige Einflußgrößen in der Stimulation von adventitiellen Fibroblasten [5].

Unter Verwendung solcher kontrollierten Bedingungen konnten jedoch inhärente Unterschiede im Verhalten von glatten Muskelzellen der Tunica media der Aorta, der Arterie und Vene sowie der Tunica adventitia der Aorta hervorgehoben werden, welche folglich unabhängig von weiteren hämodynamischen Faktoren existieren. So konnte untersucht werden, ob es zellbiologische Unterschiede in der Antwort auf mechanische Dehnung zwischen Arterie und Vene gab.

Die Diskussion wurde in drei Schwerpunkte gegliedert. Begonnen wird mit der Auslegung der basalen Expression der Markerproteine, gefolgt von der Interpretation des Reaktionsverhaltens der Zellen auf zyklische mechanische Dehnung. Aufgrund der Besonderheit der Decorin-expressionen vor und nach der zyklischen mechanischen Dehnung werden die Beobachtungen in einem dritten Abschnitt separat diskutiert.

Die Zellversuchsergebnisse sind als Synopse in Abbildung 22 dargestellt und werden im Weiteren diskutiert.

Zellkulturen		Statisch	zyklische Dehnung	
			24 h	96 h
T. media Arterie	SMA	+	↑	~
	P4H	++	↑	~
	DCN	+	~	↓
	Kollagen		↑	
T. media Vene	SMA	+	↑	↑↑
	P4H	+++	↑↑	↑↑↑
	DCN	+++	↑	
	Kollagen		↑	
T. media Aorta	SMA	++	↑	
	P4H	+	~	
	DCN	Ø	Ø	
	Kollagen		~	

Abbildung 22. Schematische Darstellung der Ergebnisse aus statischen und gedehnten Zellkulturen. Probenaufarbeitung erfolgte mittels Western Blot Analyse. Relative Proteinmengenangabe in statischer ZK mit „+“, Maß der Proteinsteigerung in gedehnter ZK mit „↑“ oder „↓“; „~“ indifferent; „Ø“ nicht nachweisbar.

Einführend können folgende Interpretationen benannt werden. Es konnte eine deutliche Steigerung der α -smooth muscle Aktin, Prolyl-4-Hydroxylase, Kollagen I und Decorin in den venösen glatten Muskelzellen gegenüber den arteriellen Zellen aufgezeigt werden. Somit könnte die erhöhte synthetische Aktivität dieser venösen Zellen zu einer erhöhten Disposition für Intimahyperplasie von Saphenavenen-Transplantate *in vivo* beitragen. Zudem konnte im Vergleich der ruhenden sowie gedehnten Zellkulturen der arteriellen glatten Muskelzellen eine Ursache für die Progredienz einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) und Restenosen dargelegt werden. In der T. media der Arterie wurde konträr zur Literatur eine geringere Decorinexpression im Gegensatz zu der Vene nachgewiesen. Des Weiteren fanden sich in den aneurysmatischen Aortenresektionen ein deutlicher Decorinmangel in den Zellen aus der T. media und eine geringe synthetische Aktivität von Kollagen I in den Zellen aus der T. adventitia. Möglicherweise spielt der Mangel an Decorin eine Rolle in der Bildung von Aortenaneurysmen und weiterführend von aneurysmatischen Erkrankungen im gesamten Gefäßsystem.

5.1. Basale Expression der Markerproteine

Die Charakterisierung der Zellkulturen unter statischen Kulturbedingungen wird in der vorliegenden Arbeit anhand der basalen Expressionsprofile der Markerproteine vermittelt. Im Allgemeinen erfahren die Gefäßzellen während der Zellisolation und der Zellkultur eine Verschiebung hin zum synthetischen Zelltyp und können nach Wiederherstellung der allseitigen Zell-Zellkontakten und Wiederherstellung des physiologischen Mileau bzw. Bedingungen wieder in den Phänotyp zurückkehren, welcher vor der Zellkultur *in vivo* bestand [3,5,9,10,11,128]. In der eigenen immunzytochemischen Betrachtung ca. 10 Tage und folgend sechs Wochen nach Zellisolation aus den Gefäßen konnte dieser Effekt der Verschiebung hin zum sekretorischen Typ vor allem anhand der α -SM Aktinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 13). Besonders deutlich konnte eine Abnahme der Aktinproteine in den Kulturen der Zellen aus der Tunica media der Arterie und Aorta beobachtet werden. In den Zellen aus der T. media der Vene und adventitiellen Zellen der Aorta fand sich eine andere Reaktion der α -SM Aktinexpression. Hier konnte unter Zellkulturbedingungen eine Zunahme dieser Aktinproteine fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Ein ähnliches Verhalten wurde in der Literatur über fibroblastenähnlichen Zellen beschrieben [5,129,130]. Bei diesen Zellen bewirken *ex vivo* Bedingungen und Verwendung von Zellkultursubstrat eine Stimulation mit Änderung des Phänotyps hin zu myofibroblastenähnlichen Zellen. So ergäbe sich bezüglich adventitieller Zellen aus immunzytochemischer Betrachtung unter Zellkulturbedingungen eine Annäherung der phänotypischen Eigenschaften in Richtung Gefäßmuskelzellen aus der Tunica media.

Dieser Effekt konnte in der eigenen Proteinanalyse fundiert werden. Für das α -SM Aktin konnte eine unerwartet geringe Diskrepanz der Expression zwischen den verschiedenen Zellkulturen aus Aorta, Arterie und Vene von maximal 34 % ermittelt werden (Abbildung 15). Die geringste Expression fand sich in den adventitiellen Zellen. In der Literatur wurden solche Proteinexpressionen *in vitro* mit Abnahme der kontraktilen Elemente wie α -SM Aktin, h-Caldesmon, Calponin und *myosin heavy chain* in Gefäßmuskelzellen mehrfach beschrieben [5,9,10,13,112,113]. An vaskulären glatten Muskelzellen aus der Aorta von Kaninchen und Ratten wurde von verschiedenen Autoren nachgewiesen, dass bei fehlender zyklischer mechanischer Dehnung eine deutliche Abnahme der Markerproteine des kontraktilen Phänotyps wie h-Caldesmon, Calponin und *smooth muscle myosin heavy chain* Isoformen beobachtet wurde [9,10,131]. Dies korreliert mit dem Verlust der Kontraktionsfähigkeit der vaskulären glatten Muskelzellen und könnte im Sinne einer Modulation des Phänotyps vom kontraktilen zum synthetischen zu werten sein. Unter zyklischer mechanischer Dehnung (Flexcell, bis 15% Dehnung, bis 8 Tage) war wiederum eine drastische Steigerung in der Expression der

Markerproteine des kontraktiven Phänotyps wie am Beispiel h-Caldesmon und *smooth muscle myosin heavy chain* Isoformen nachzuweisen [9,10,131].

Die Proteinanalyse des Markerproteins Prolyl-4-Hydroxylase konnte unter statischen Zellkulturbedingungen sehr ähnliche Expressionslevel in den venösen und arteriellen glatten Muskelzellen aufzeigen. Diese Ergebnisse der basalen Expressionsprofile könnten auf eine Ähnlichkeit in der basalen synthetischen Aktivität hinweisen, d.h., Gefäßzellen aus der T. media gleichen sich in ihrem Phänotyp unter standardisierten Bedingungen ohne Einwirken mechanischer Stimuli an.

Im Gegensatz zu den Gefäßzellen aus der Vene und Arterie fanden sich in den Zellen der T.adventitia der Aorta signifikant niedrigere P4H-Expressionen. Unter der Annahme fibroblastenähnlicher Zellen in der Adventitia sollten höhere Expressionen erwartet werden. Die geringe Expression von Prolyl-4-Hydroxylase der adventitiellen Zellen gegenüber den venösen und arteriellen glatten Muskelzellen könnte auf einen Umstand zurückzuführen sein, welcher von Suh et al. beschrieben wurde [132]. Sie postulierten, dass die adventitiellen Zellen von thorakalen Aortenaneurysmen und Aortendissektionen eine abnormale Funktion aufweisen würden. Diese Abnormalität der Zellen könnte eine Dysbalance zwischen der Produktion und Abbau von extrazellulärer Matrix bewirken und zu einem gestörten Remodeling der Gefäßwand führen [132]. Eine andere Erklärung könnte auch auf die erhöhte synthetische Aktivität des synthetischen Phänotyps der glatten Muskelzellen zurückzuführen sein.

5.2. Zyklisch mechanische Dehnung

5.2.1. Dehnungsimpuls mit unterschiedlichen Effekten auf Vene und Arterie

Um die Expressionsmuster nach zyklischer mechanischer Dehnung im weiteren Kontext intensiver diskutieren zu können, sollte auf das Proliferationsverhalten von Gefäßzellen aus vorausgegangenen Publikationen eingegangen werden. Für die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen ist eine Modulation vom kontraktiven zum sekretorischen Phänotyp erforderlich [11]. Diese Modulation ist unter anderem mit der Synthese zahlreicher Proteine der extrazellulären Matrix wie Tenascin, Collagen Typ I und IV, Fibronectin und Proteoglykanen assoziiert [8,12,133,134,135,136,137]. Weitere Studien beobachteten eine Abnahme der Proliferation aortaler glatter Muskelzellen von Ratten unter dem Einfluss physiologischer zyklischer mechanischer Dehnung (Bioflex-Platten, 10 bzw. 5% Dehnung, 48 Stunden.), jedoch keine Zellablösung oder Zelltod, weder durch Nekrose oder Apoptose [138,139]. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass physiologische Dehnung die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen über einen G1-Zellzyklus-Arrest hemmt. Dieser antiproliferative Effekt steht im

direkten Kontext zu den weiteren Studien, welche eine Zunahme der Differenzierung der Zellen unter zyklischer mechanischer Dehnung und eine dadurch bedingte Abnahme der sekretorischen Eigenschaften nachweisen konnten [10,131,136]. Folglich würde ein fehlender Dehnungsimpuls eine proliferative Stimulation in den Gefäßmuskelzellen bewirken. Ballyk et al. [140] konnte hierzu *in vivo* aufzeigen, dass eine Unterdrückung der Pulsweite im arteriellen Gefäßsystem, d.h. eine fehlende Zelldehnung, zu einer Hyperplasie von Gefäßmuskelzellen und folgend zu einer Gefäßstenose arterieller Bypässe an den Nahtlinien führt.

Im Résumé finden sich in der Literatur unter zyklischer mechanischer Dehnung ein antiproliferativer Effekt auf Gefäßmuskelzellen und eine Modulation dieser Zellen hin zum kontraktilen Phänotyp [10,129,136,138,139].

Für die vorliegenden Ergebnisse lässt sich für die basalen Expressionsprofile *in vitro* ableiten, dass ein Fehlen der zyklischen mechanischen Dehnung mit einer Abnahme des antiproliferativen Effektes einhergeht. Dadurch würde eine verstärkte Phänotypänderung zum synthetischen Typ begünstigt werden. Diese Kausalität wäre neben den Zellkulturbedingungen ein weiterer Grund für die hohe sekretorische Aktivität im nachgewiesenen basalen Expressionsverhalten der glatten Muskelzellen aus der Arterie. Mit der Abnahme der intrazellulären kontraktilen Proteine und Zunahme der synthetischen Organellen in den glatten Muskelzellen wären die ähnlichen basalen Expressionsprofile der Muskelzellen aus Arterie und Vene während der Kultivierung zu erklären. Die venösen glatten Muskelzellen sind physiologisch einer deutlich geringeren mechanischen Dehnung und vor allem keiner pulsatilen Zelldehnung ausgesetzt. Das *in vivo* vorherrschende Genexpressionsprofil sollte somit weniger einem kontraktilen Phänotyp arterieller Zellen entsprechen. Daraus ließe sich im Vergleich zu den arteriellen Gefäßmuskelzellen ableiten, dass die Zellen aus der Vene auf zyklische mechanische Dehnung mit einer geringeren Differenzierung zum kontraktilen Typ und folglich mit einem geringeren antiproliferativen Verhalten reagieren würden. Dieser Effekt konnte in der aktuellen Untersuchung beobachtet werden. Die basalen Expressionsprofile waren zwischen den venösen und arteriellen glatten Muskelzellen sehr ähnlich (Abbildung 16,17,18). Es fand sich jedoch in den Zellkulturen aus der Arterie nach zyklischer mechanischer Dehnung über 96 Stunden keine weitere Zunahme der Proteinexpression vor allem von Prolyl-4-Hydroxyprolin und Decorin (Abbildung 18,19,21). Dieser Effekt könnte auf die Abnahme der sekretorischen Aktivität zurückzuführen sein. Andererseits stellte sich in den venösen Gefäßmuskelzellen ein deutlicher Anstieg der Proteinexpression nach 24h sowie ein weiterer Anstieg nach 96 h Stunden Zelldehnung ein, allen voran die 6-fach erhöhte Expression der Prolyl-4-Hydroxylase. Dieses Verhalten könnte auf eine geringere Proliferationshemmung und dadurch geringere oder fehlende Abnahme der sekretorischen Aktivität innerhalb der untersuchten Zeitspanne zu deuten sein. Diese geringe Proliferationshemmung wäre auf die

geringe pulsatile Vorprägung der venösen glatten Muskelzellen *in vivo* und damit einhergehend unterschiedliche Genexpressionsprofile gegenüber den Zellen in Arterien zurückzuführen.

Dieser antiproliferative Effekt auf arterielle Gefäßmuskelzellen erklärt möglicherweise die deutlichen Abweichungen der Ergebnisse unter zyklisch mechanischer Zelldehnung zwischen den Zellen aus der Arterie *versus* Vene. Für weitere Untersuchungen diesbezüglich wäre unter anderem die Bestimmung des Proliferationsmarkers Ki-67 und der direkte quantitative Vergleich der Proteinexpressionen nach Zelldehnung zwischen Arterie und Vene interessant.

5.2.2. Einordnung der Ergebnisse in die Literatur unter Berücksichtigung unterschiedlicher Zellkulturstimulationen.

In der Literatur fand sich eine interessante Studie über humane Gefäßzellen von Turner et al., welche die glatten Muskelzellen aus der Arteria mammaria interna und der Vena saphena magna jeweils vom selben Spender miteinander verglichen [141]. Ausgangspunkt war hierbei die Frage nach Unterschieden in der Zellmigration und Proliferation bezogen auf die hohe Hyperplasie- und Verschlußrate von venösen Bypässen in der herzchirurgischen Revaskularisation. Sie fanden *in vitro* nach Auswachsen der Zellen aus dem Gewebe in einem Zeitraum von 7 Tagen eine doppelt höhere Proliferationsrate der venösen Zellen. Diesen Effekt hatten sie unter verschiedenen Zellkulturbedingungen mit 10% FBS sowie mit Wachstumsfaktoren (PDGF-BB oder bFGF mit 0.4% or 1% FBS) anhand der Zellzahl und im Western Blot anhand der phosphorylierten p44/42-MAPK nachweisen können. Das Migrationsverhalten hatten Turner et al. mit einem modifizierten Boyden Chamber Assay studiert und ebenfalls eine höhere Migrationsrate bei den venösen glatten Muskelzellen darlegen können. Weitere ähnliche Ergebnisse konnten an humanen glatten Muskelzellen und an Gefäßzellen von Kaninchen gefunden werden [95,142].

Eine andere Arbeit von Mekontso-Dessap et al. [143] fand über die Methode der L-(4-3H(N)) Proline-Inkorporation ähnliche Ergebnisse zum Proliferationsverhalten humaner venöser glatter Muskelzellen. Auch hier wurde zunächst, wie allgemein üblich, eine Synchronisation der Zellen über eine Wachstumsarretierung durch Kulturmedium mit geringsten Zusätzen von FBS von 0 und 0.2 % über 24-48 h vorgenommen. In der hier vorliegenden Untersuchung wurde explizit auf eine Wachstumsarretierung verzichtet, da dieser Mangel an FBS einschließlich seiner Wachstumsfaktoren extreme Bedingungen für die Zellen darstellen, so dass die folgende Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Serum einen starken stimulierenden Effekt haben, welcher den synthetischen Zelltyp begünstigen würde.

Die eigenen Ergebnisse ohne wesentliche Änderung der Kulturbedingungen über die vorausgegangenen 30 Tage zeigen, dass in der statischen Zellkultur anhand der Expression von α -SMA und Prolyl-4-Hydroxylase keine relevanten Unterschiede zwischen den venösen glatten Muskelzellen und den arteriellen beobachtet werden konnte. Wie bereits ausgeführt, verhält es

sich nach zyklisch mechanischer Dehnung anders. Hierbei gab es deutliche Anstiege in den Proteinexpressionen der venösen glatten Muskelzellen.

Im Gegensatz zu Turner et al. wurde in einer anderen Studie unter statischen Zellkulturbedingungen eine gesteigerte Migration von humanen arteriellen glatten Muskelzellen gegenüber venösen Gefäßzellen beschrieben [141,144]. Die arteriellen Muskelzellen stammten aus Knie – und Unterschenkelarterien mit ausgeprägten arteriosklerotischen Läsionen, die venösen glatten Muskelzellen jedoch aus nicht krankhaft veränderter *Vena Saphena magna*. Dieses Migrationsverhalten steht im Kontext zu den allgemeinen Vorstellungen über die Pathologie der Arteriosklerose mit einer Änderung des Phänotyps von glatten Muskelzellen hin zu einem sekretorischen und proliferativen Typ [145,146]. Die Zellen aus arteriosklerotischen Läsionen wären denen unter statischen Zellkulturbedingungen, wie in vorliegender Untersuchung, in ihrem Phänotyp ähnlich und können sich folglich in ihrem Proliferations-, Migrations- und Proteinexpressionsverhalten entsprechen.

Mehrere Studien untersuchten ebenfalls das Syntheseverhalten des extrazellulären Matrixproteins Kollagen. So wurde unter anderem über die Aufnahme von radioaktiv markierten Prolin über 48 Stunden nach vorausgegangener Wachstumsarretierung humane Gefäßmuskelzellen der Arteria radialis, Arteria thoracica interna und Vena saphena magna verglichen [143]. Das Wachstumsmedium hatte zudem eine variable FBS Konzentration von entweder 0.5%, 5% oder 10%. Insgesamt fanden sie zwischen den Zellen sowie zwischen den FBS Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede in der Kollagensyntheserate. Die eigene Untersuchung unter Verwendung von Kulturmedium mit 5% FBS konnte nach 24 Stunden zyklischer mechanischer Dehnung eine gesteigerte Kollagenexpression um ca. 60% in den venösen und arteriellen glatten Muskelzellen sowie in adventitiellen Zellen nachweisen (Abbildung 21). Eine geringere Zunahme mit nur 25% zeigte sich in den aortalen Muskelzellen. Diese Ergebnisse können durch die Betrachtung des Frühmarkers der Kollagensynthese, der Prolyl-4-Hydroxylase, bestätigt werden. So fand sich in den venösen Gefäßzellen nach 24 Stunden Dehnung eine 2-fache Steigerung der Proteinexpression, jedoch nach 96 Stunden eine deutliche Zunahme der Expression bis zum 6-fachen der Kontrollgruppe (Abbildung 19).

Andere Studien konnten nach zyklisch mechanischer Dehnung (1 Hz, Elongation von 10% auf 16%) mittels *Flexcell-Unit* bei venösen Gefäßmuskelzellen ähnliche Ergebnisse mit einer Steigerung der Kollagensynthese nach 96 Stunden um ca. 30% nachweisen [147]. Eine vierfach erhöhte Kollagensynthese in venösen glatten Muskelzellen im Vergleich zu den arteriellen konnte auch Wong et al. an Halsadern von Kaninchen darstellen. Hierbei wurde zunächst über 24 Stunden eine Wachstumsarretierung durchgeführt und anschließend der Zellkultur über 6 Stunden neben Vollmedium radioaktiv markiertes Prolin zugesetzt. Diese Daten nach nur 6 Stunden

beruhen möglicherweise auf unterschiedliche Reaktionszeiten sowie Herkunft der verwendeten Zellen.

In diesem Zusammenhang muß auf wesentliche Unterschiede zwischen den Venen aus Tiermodellen wie mit Ratten, Kaninchen sowie Schweinen und humaner *Vena saphena* eingegangen werden. Interessant sind die Druckverhältnisse in den humanen herzfernen Beinvenen. Hier wirkt der hydrostatische Druck, welcher durch segmental angeordnete Venenklappen etwas vermindert wird [148]. Des Weiteren besteht ein Unterschied zwischen den außerhalb der Unter- und Oberschenkel faszie gelegenen Unterhautvenen wie die lange und kurze Saphenavene und den zwischen den Muskel befindlichen tiefen Venen, einschließlich der tiefen Halsvenen. Die Muskeln haben eine bedeutende Stütz- und Pumpfunktion hinsichtlich der tiefen Venen. Die Gewebefaszien und Muskeln üben einen permanenten Druck auf die Gefäßwand aus, welcher dem intraluminalen Druck entgegengerichtet ist. Anders verhält es sich bei den Saphenavenen. Diese sind nicht von einem stützenden Gewebe umgeben. Sie müssen durch ihre Wandbeschaffenheit dem hydrostatischen bzw. intraluminalen Druck standhalten. Daher ist die humane Tunica media kräftiger im Vergleich mit einer tiefliegenden Vene oder herznahen Vene wie der Halsvene (Carotisvene) [149,150,151,152]. Diese Vorprägung der Vena saphena begünstigt den Einsatz im klinischen Alltag für arterialisierte Venentransplantate. Diesem Sachverhalt wurden auch vorgenannten Publikationen über humanen Gefäßzellen gerecht [141,143]. Im speziellen wären weitere Arbeiten mit dem Vergleich der verschiedenen Venenabschnitte sowohl human als auch animal sinnvoll.

5.3. Klinische Relevanz der zyklisch mechanischen Dehnung

In der vorliegenden Studie konnte erstmalig an humanen Gefäßzellen aus der Tunica media der A. radialis und Vena saphena magna die Expressionlevel von α -smooth muscle Aktin, Prolyl-4-Hydroxylase und Kollagen I unter statischen und gedehnten Zellkulturbedingungen nachgewiesen werden. Aus der vorausgegangenen Diskussion lässt sich schließen, dass eine fehlende zyklisch mechanische Dehnung eine Phänotypänderung der arteriellen Gefäßzellen von kontraktilen hin zum sekretorischen und proliferativen Typ bewirkt. Konträr verhält es sich unter Vorliegen einer zyklischen mechanischen Dehnung wie der pulsatischen Wanddehnung. Hierbei wird in den arteriellen Gefäßzellen der kontraktile Phänotyp ausgebildet.

5.3.1. Mediahyperplasie in der Gefäßwand

Sehr häufig wird in der Literatur von einer Bypass- oder Gefäßstenose durch intimale Hyperplasie, d. h. Zellzahlzunahme in der T. intima (Kap. 1.1.), beschrieben. Diese Hyperplasie wurde in zahlreichen Arbeiten vor allem der Endothelveränderung zugeschrieben. Jedoch zeigte diese vorliegende Zellkulturuntersuchung ein hohes Potential einer möglichen Hyperplasie ausgehend von der T. media. So könnte der im Rahmen gefäßchirurgischer Ausschälplastiken beobachtete krankhaft veränderte Intima-Mediakomplex einhergehend mit einer degenerierten Lamina elastica interna eine gemeinsame Veränderung darstellen. Weitere Arbeiten vermuteten eine Zellmigration adventitieller fibroblastenartiger Zellen durch die Zellwandschichten bis in die Intima am Beispiel einer Sympathektomie[5,128]. Hierbei wurden Zellphänotypen ähnlich Myofibroblasten oder eben wie in Kap. 5.1. diskutierten Phänotypänderungen und Zellmigration der glatten Muskelzellen in der Mediaschicht beschrieben. Möglicherweise sind jedoch eher diese sekretorischen und proliferativen Phänotypen der Mediazellen an den intimalen fibrotischen Prozessen beteiligt.

5.3.2. Arteriosklerose, periphere arterielle Verschlusskrankheit

Das Verhalten der arteriellen Gefäßzellen unter reduzierter oder fehlender pulsatilem Wanddehnung könnte eine wichtige Ursache für die Progredienz von arteriosklerotischen Wandveränderungen sein. Die erkrankten Gefäßwände sind gekennzeichnet von einer Gewebezunahme der extrazellulären Matrix, genannt Gefäßwandhypertrophie, von einer Vermehrung der Zellen, genannt Gefäßwandhyperplasie, sowie hierdurch bedingter Gefäßlumeneinengung. Im Weiteren werden sie vor allem durch Plaques eingesteift, welche die Wandelastizität und Zelldehnung reduzieren und verhindern. Ein weiterer Effekt an bestehenden Gefäßverengungen, den Stenosen, ist das Wirken des Strömungsgesetzes von Bernoulli und Venturi. Hierdurch stellt sich an den Stenosen eine Flußbeschleunigung mit gleichzeitiger Abnahme des hydrostatischen Drucks auf die Gefäßwand ein. Diese genannten Prozesse haben eine Reduktion der pulsatilen Dehnung der Gefäßwand einhergehend mit einer Reduktion der zyklischen mechanischen Zelldehnung zur Folge, welche wiederum eine Modulation des Phänotyps der glatten Muskelzellen mit Verschiebung zum sekretorischen Typ bewirkt. Somit wird eine Hyperplasie und Hypertrophie mit dadurch bedingter Zunahme der Stenose begünstigt, sogar beschleunigt, so dass hierdurch der im klinischen Alltag beobachtete teils rapide Krankheitsprogress erklärt werden könnte.

Wichtig erscheint des Weiteren der Einfluß der unterschiedlichen Veränderungen in der Gefäßwand wie Hardplaquestenosen, atheromatöse, hyperproliferative, hypoplastische und auch entzündliche Veränderungen, welche unterschiedliche Zellreaktionen bewirken können. Hierzu wären weitere Untersuchungen hilfreich.

5.3.3. Stentgraft-Restenosen

Des Weiteren könnte der Effekt der abnehmenden Wandelastizität mit der Folge der Begünstigung einer Wandhyperplasie und Hypertrophie die hohen Restenoseraten nach Gefäßinterventionen mit Einbringen von Stentgrafts erklären. Diese besitzen selbst eine radial wirkende Eigenspannung, wodurch die Wandelastizität herabgesetzt wird und somit die zyklisch mechanische Dehnung der Wand im Bereich des Stents beeinträchtigt werden sollte. Diese In-stent-Restenosen stellen eine große Herausforderung dar. Daher kommt der Restenoseprophylaxe zunehmend eine besondere Bedeutung zu. Neuerdings werden lokale Medikamentenapplikationen mittels *drug eluting ballon* oder *drug eluting stent* verwendet, um die Zellproliferation zu hemmen [153,154,155,156,157,158]. Weitere neueste Verfahren sind die Anwendung resorbierbarer Stentmaterialien. Hierzu gab es erste Ergebnisse für die Koronarangioplastie auf dem Linc 2014 [159].

5.3.4. Anastomosenstenosen

Ebenso gilt dieser Effekt in Anastomosenregionen insbesondere an den Nahtreihen, wie von Ballyk et al. beschrieben [140]. Hier könnte postuliert werden, dass durch den Zug der Naht und dadurch bedingte Krafteinwirkung auf die Gefäßwand im Bereich der Nahtlinie die Wandelastizität deutlich herabgesetzt wird und somit die zyklisch mechanischen Dehnung der Gefäßzellen beeinträchtigt sein sollte.

5.3.5. Gefäßwandrestenosen

Fibrotische hyperproliferative Gefäßwandstenosen, gerne als intimal Hyperplasie bezeichnet, sind gegenüber chirurgischen und interventionellen (kathetergestützten) Verfahren sehr resistent. Sie führen meist zu Restenosen, wie in einer Vielzahl an Arbeiten beschrieben (siehe Kap. 5.3.3.). Unter Berücksichtigung der vorausgegangenen Diskussion, wäre der progrediente Stenoseprozess gut vereinbar mit der Hypothese, dass die sekretorischen und proliferativen Phänotypen der Mediazellen, phänotypisch ähnlich den Myofibroblasten, in einer versteifenden fibrotischen Wandschicht an der Wandhypertrophie und -hyperplasie beteiligt sind. Somit würde der fibrotische Prozess durch Reduktion der pulsatischen mechanischen Zellstimulation den Prozess beschleunigen.

5.3.6. Venenbypassstenosen

Im Bezug auf die Verwendung von autologen Bypassmaterial wie A. radialis und Vena saphena magna konnten die Ergebnisse vor allem von Turner et al. bestätigt werden. Erstmalig wurden jedoch in der vorliegenden Studie diesbezüglich humane Gefäßzellen aus der Tunica media der A. radialis und Vena saphena magna isoliert und unter Verwendung der *Flexercell strain unit*

(Flexcell Corp., MacKeesport, MA, USA; Abbildung 9) einer zyklisch mechanischen Dehnung ausgesetzt. In den Gefäßzellen der Venen konnte unter pulsatiler Dehnung eine starke Zunahme der extrazellulären Matrix und die Begünstigung des sekretorischen und damit proliferativen Typs beobachtet werden. Dieser Sachverhalt sollte eine Erklärung für die höhere Stenoseneigung durch Gefäßwandhyperplasie und Hypertrophie in arterialisierten Venen sein. Zurückzuführen ist dieser Umstand möglicherweise auf die vorhergehende geringe bzw. fehlende pulsatile mechanische Dehnung in vivo. Bezogen auf die Zellebene würde dies eine geringere Mechanotransduktion bedeuten, so dass die daran beteiligten Proteine im geringeren Maße exprimiert worden wären. Der beschriebene antiproliferative Effekt einer zyklischen mechanischen Dehnung würde somit einen geringeren Einfluß entfalten können. Dieser Sachverhalt könnte eine wichtige Komponente zur Klärung der erhöhten Disposition für die Sklerosierung von Saphenavenen-Transplantate in vivo sein.

5.3.7. Shuntvenenstenosen

Auch im Bezug auf arterialisierte Shuntvenen für den Zugang für die Nierenersatztherapie, der sogenannten Hämodialyse, kann dieser Effekt bei erhöhten pulsatilen Fluß beziehungsweise dadurch erhöhter Gefäßwanddehnung eine Begünstigung der Wandsklerose bewirken. Dieses Phänomen wird im klinischen Alltag bei Vorliegen eines harten pulsatilen Flußes im Gegensatz zum erwünschten Schwirren beobachtet [160,161].

5.3.8. Chirurgie versus Stenting

Die Gefäßausschälplastik wie die z.B. Carotis-Endarteriektomie hat nach Jahren weiterhin sehr geringe Restenoserraten [162]. Aufgrund der beschriebenen Gefäßwandreaktion auf Stentgraft wären chirurgische Ausschälplastiken bei jüngeren Patienten mit höherer Lebenserwartung gegenüber einer Behandlung mit Stentmaterialien zu empfehlen. Dies sollte auch für periphere Gefäße gelten. Insgesamt ist eine Vergleichbarkeit aufgrund der heterogenen Daten und unterschiedlichen Studiendesign bezogen auf eine mehrjährige Beobachtungszeit aktuell erschwert. Neuerdings werden minimalinvasiv endoluminal Atheroektomiekateter angewandt, um hyperplastische und sklerotische Wandmaterialien abzutragen. Die Prognosen solcher Verfahren bezüglich Restenosen sind noch unklar [159].

5.3.9. Periphere Vasodilatation als PAVK-Protektion?

Ein erhöhter Gefäßwandtonus sollte die Wandelastizität negativ beeinflussen. Somit würde die resultierende Tendenz zur Wandstarre eine geringere mechanische Zelldehnung bewirken, welche wiederum eine Phänotypänderung der Gefäßmuskelzellen in der Tunica media vom kontraktiven

hin zum sekretorischen und proliferativen Typ verursacht. Um diesen Mechanismus zu nihilieren, wäre eine Induktion der peripheren Vasotonusabnahme und Vasodilatation erforderlich.

In diesem Kontext wären Beobachtungen zu protektiven Massnahmen wie auch medikamentöse Behandlungen im frühen Stadium der pAVK oder bei familiärer Disposition sinnvoll. Eine medikamentöse Reduktion des peripheren Gefäßtonus würde zum Beispiel durch periphere Vasodilatoren, vermittelt durch Alpha-1 Blocker oder Calciumantagonisten vom Nifedipintyp, erreicht werden.

Die Darlegungen sind Interpretationen der eigenen Daten. Um weiteres Potential bezüglich einer Änderung des Behandlungskonzeptes oder Material zu schöpfen, bedarf es weiterführender Arbeiten.

5.4. Decorin

5.4.1. Arterie versus Vene

Interessante Ergebnisse fanden sich auch in der Untersuchung des Decorins. Dieses kleine Leucin-reiches Proteoglykan von etwa 100 kDa mit einem 40-kDa-Kernprotein dient als Verbindungsanker zwischen zwei parallel liegenden, benachbarten Kollagenmolekülen, welcher zur Stabilisierung der Kollagenfibrillen führt [77]. Decorin beeinflusst die Funktionen von vaskulären glatten Muskelzellen und die Änderung der Akkumulation von Proteinen in der extrazellulären Matrix [39]. Die Ansammlung von subendothelialen Proteoglykanen ist ein charakteristisches Merkmal der intimalen Hyperplasie, der Restenose-Läsionen und der Entwicklung von Läsionen der primären Arteriosklerose [163,164].

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten an Zellkulturen von Tieren die hemmende Wirkung des Decorins auf Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Kollagensynthese von Gefäßmuskelzellen [88,90,95]. Hierzu wurde z.B. die Bindung von Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF- β an Decorin nachgewiesen. Diese sind bedeutende Wachstumsfaktoren, welche in die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen und deren Synthese von extrazellulärer Matrix involviert sind [165,166]. Andererseits konnten experimentell nach Überexpression von Decorin in arteriellen Rattenzellen eine Stimulation der Kollagen-I-Synthese und erhöhte Kontraktion eines Kollagengels beobachtet werden [26,39].

Des Weiteren wurde eine Bindungsfähigkeit von Decorin gegenüber Hydroxyapatit nachgewiesen [24,31]. Die Mineralisierung des Knochens erfordert unter anderem eine extrazelluläre Matrix mit Kollagen Typ-1. In Verkalkungen arteriosklerotischer Plaques und in *in*

in vitro-Modellen von Gefäßverkalkung ist das Auftreten einer Mineralisierung in Verbindung mit Kollagen Typ 1 bekannt [15,18].

Neben den genannten inhibierenden Eigenschaften konnte Wong et al. in den Arterien der Halsschlagadern von Kaninchen eine höhere Expression von Decorin nachweisen als in den gleichnamigen Venen [95]. Aus ihren Ergebnissen folgerten sie, dass der durch Decorin vermittelte inhibitorische Effekt auf Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Kollagensynthese von venösen glatten Muskelzellen geringer wäre im Vergleich zu den arteriellen Zellen. Daraus entwickelten sie die Annahme, dass hierdurch die venösen glatten Muskelzellen der Venentransplantate anfälliger für die Entwicklung von Hyperplasie und arteriosklerotischen Läsionen seien. Eine andere Arbeitsgruppe konnte belegen, dass eine Überexpression von Decorin nach Verletzung an einer Arterie die intimale Hyperplasie und Kollagensynthese reduzierte. Eine wichtige Limitation dieser Aussagen war jedoch durch die Verwendung von Kaninchen sowie deren Zellkulturmodelle von arteriellen und venösen Karotiden gegeben [90].

Im Gegensatz hierzu fand sich in der eigenen Analyse der statischen Zellkulturen aus den Zellen der T. media der Arteria radialis eine deutlich geringere Decorinexpression im Vergleich zu der doppelt erhöhten in den Zellen der T. media aus der Vena saphena magna (Abbildung 17). Unter zyklisch mechanischer Dehnung konnte in den glatten Muskelzellen der Arterie definitiv kein Anstieg, sondern eher eine Tendenz zu einer geringeren Decorinexpression nach 24 h sowie nach 96 h beobachtet werden (Abbildung 22). Konträr hierzu stellten sich die Ergebnisse unter zyklisch mechanischer Dehnung von den Gefäßmuskelzellen der Vene dar. Hier fand sich ein dehnungsinduzierter Anstieg um den Faktor 1.4 nach 24 Stunden.

Bevor mögliche Gründe der Varianz der Decorinexpressionen diskutiert werden, soll eine viel zitierte Untersuchung der Arbeitsgruppe um Merrilees et al. [68] vorgestellt werden. Diese konnte immunhistochemisch Unterschiede im Verteilungsmuster von den intimalen Proteoglycanen Versican, Biglycan und Decorin in den meist verwendeten humanen Gefäßbypässen wie Saphenavene, Thorakal- und Radialarterie im Vergleich zur Koronararterie darlegen. Diese Arbeit von Merrilees et al. beinhaltet jedoch nur den Vergleich innerhalb der subendothelialen/intimalen Gefäßschicht. Bezüglich der immunhistochemischen Analyse von Decorin fanden sie ähnliche Verteilungsmuster in der Koronararterie, Radialarterie und Saphenavene. Die geringsten Intensitäten im subendothelialen Raum im Vergleich zum Intima-Media-Komplex wurden in den Thorakalarterien beobachtet, welche wiederum die geringste Tendenz zur intimalen Hyperplasie besitzen sollen. Orientiert man sich an der Immunofluoreszenz-Intensität der Färbungen, wäre in der Tunica intima plus media der Vene, lt. Ergebnissen von Merrilees, eine höhere Decorinkonzentration vorhanden im Vergleich zur Radialarterie. Ein relatives Expressionsniveau zueinander konnte jedoch nicht bestimmt werden.

In der eigenen Arbeit konnten erstmalig Unterschiede anhand der relativen Expressionslevel an statischen und zyklisch gedehnten Zellkulturen von Gefäßmuskelzellen aus der Tunica media dargelegt werden. Hierbei fand sich im basalen Expressionsprofil in der Saphenavene ein signifikant höheres Expressionsniveau gegenüber der Radialarterie. Diese Gegebenheit wurde noch verstärkt durch die zyklisch mechanische Dehnung. Folglich ließe sich in Übereinstimmung mit der Arbeit von Merrilees et al. [68] ableiten, dass in humanen Zellen der Tunica media von Venen die Fähigkeit zur Expression von Decorin gegenüber den Zellen aus der Tunica media von Arterien deutlich überwiegt. Weitere Arbeiten mit immunhistochemischen Nachweis über die Decorinverteilung in nativen Gefäßwänden wären hilfreich. Wie im speziellen im Kapitel 5.3.2. ausgeführt, dient Decorin funktionell als Verbindungsanker zwischen den Kollagenmolekülen und fördert somit die Polymerisierung des Kollagens [77]. Somit würde eine erhöhte Synthese von extrazellulärer Matrix am Beispiel von Kollagen und Kollagenvorläufer Prolyl-4-Hydroxylase coexistent mit einer Steigerung der Decorinexpression sein. Dieses Phänomen konnte anhand der Zellkulturen der Vene aufgezeigt werden. Unter Achtung der Ergebnisse von Wong et al. [95] wäre der Decorin vermittelte inhibitorische Effekt auf Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Kollagensynthese im Bezug auf die Zellkulturen der Tunica media von Venen im Versuchszeitraum schwächer als der stimulierende Reiz. Möglicherweise ist Decorin ein Bestandteil der negativen Rückkopplung der Kollagensynthese. Im aktuellen Versuchsaufbau hatte jedoch der pulsatile Stimulus dieser negativen Rückkopplung deutlich überwogen. Anders stellte sich dieser Sachverhalt an den Zellen der Tunica media von Arterien dar. Hier wirkte, wie in Kapitel 5.2.1. diskutiert, der inhibierende Effekt der zyklischen Zelldehnung mit Phänotypänderung zum kontraktilen Typ, so dass weder eine Steigerung der Synthese von Kollagen noch von Decorin nachgewiesen werden konnte.

Ein möglicher Grund der Varianz der Ergebnisse könnte neben der Herkunft des Materials, human oder animal, in der Untersuchungsmethode sowie in der Antikörperreaktion zukommen. Verfügbare monoclonale Antikörper gegen Decorin können in spezifisch an das Proteoglycan bindende und direkt an das Kernprotein bindende Antikörper untergliedert werden [167,168]. Wong et al. untersuchte die inhibierende Wirkung von Decorin unter Verwendung des 100 kDa Monomers. Eigene Analysen erfolgten mit Antikörpern gegen das Kernprotein des Decorin. Des Weiteren konnten verschiedene Monomere, Dimere und Oligomere in verschiedenen Geweben gefunden werden [169,170]. So fanden Franch et al. [97] ein porcines arterienspezifisches MM1 Antigen in der Kern-Region des Decorins. Dieses Antigen wird in kleinen und großen Arterien, jedoch nicht in Venen ausgebildet.

Wong et al. gelang in vitro der Nachweis für einen inhibitorischen Effekt des Decorins auf die DNA- und die Kollagensynthese [95]. Jedoch wurden zum einen gegenüber den humanen

Gefäßen zartwandige Kaninchenhalsgefäße und zum anderen im Medium gelöstes Decorin verwendet. Ob diese Konzentrationen physiologisch sind, ist ungewiß. Ranjzad et al. relativierten indessen die inhibitorische Wirkung des Decorins in Bezug auf die intimale Hyperplasie in arterialisierten Venentransplantaten und schrieben diese eher dem Proteoglycan Fibromodulin zu, weshalb hierzu weitere Studien geplant wurden [124].

Ein wichtiger Aspekt in der Diskussion über die Vergleichbarkeit der Zellkulturen besteht in der Herkunft von Proben. Die eigenen Proben stammten nicht von gesunden Probanden, sondern von arteriosklerotisch erkrankten Patienten, welche aufgrund dieser Erkrankung einer herzchirurgischen Behandlung bedurften. Die Zellen von Wong et al. entstammen von Kaninchen ohne Nachweis einer Gefäßerkrankung [95]. Da das Erkrankungsspektrum der Gefäße sehr vielseitig ist, wie aneurysmatische, ulcero-atheromathöse, sklerotische oder entzündliche Veränderungen mit teils gemischten Erkrankungstyp, ist der Nachweis einer Proteinkonstellation nicht sicher auf verschiedene Menschen übertragbar. Diese Arbeit verfolgte ebenso wie z.B. Turner et al. den Nachweis von zellulären Unterschieden in den herzchirurgisch verwendeten Gefäßabschnitten mittels Proben genau von diesen zu behandelnden Patientenkollektiv [141]. Somit wären die hiesigen Ergebnisse vor allem auf ein arteriosklerotisch erkranktes Patientenkollektiv zu übertragen. In Bezug hierzu konnte eine vermehrte Decorinexpression in den statischen ebenso in den gedehnten humanen Zellkulturen der Tunica media der Saphenave im Vergleich zur Radialarterie nachgewiesen werden. Die Steigerung der Decorinexpression in den Zellen der Tunica media der Saphenave unter zyklischer mechanischer Dehnung ist am ehesten auf die Synthesesteigerung der extrazellulären Matrixproteine zurückzuführen. Eine spezielle Kausalität des Decorins in Bezug auf zyklisch mechanische Dehnung konnte nicht hergeleitet werden.

5.4.2. Aortenaneurysma

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit einem direkten Vergleich zwischen den aortalen, venösen sowie arteriellen Muskelzellen müssen aufgrund ihrer Herkunft etwas relativiert werden. Die venösen und arteriellen Gefäßmuskelzellen stammen von einem arteriosklerotisch erkrankten Patientenkollektiv, in welchen die Gefäßmuskelzellen vermehrt im synthetischen Phänotyp vorliegen [171,172]. Bei den aortalen Muskelzellen handelte es sich um Zellen aus der Tunica media der Aorta ascendens mit aneurysmatischer Erkrankung, welche während eines Aortenklappenersatzes simultan reseziert und mittels Prothesenmaterial ersetzt wurde.

Die Degeneration von Kollagen und Elastin in der medialen Gefäßwand sowie das abnormale Verhalten der glatten aortalen Muskelzellen prägen die architektonischen Anomalien, welche bei aneurysmatisch erkrankten Aorten beobachtet werden konnten [173,174].

Die vorliegenden Ergebnisse mit den geringeren Expressionen von Kollagen I und Prolyl-4-Hydroxylase in den aortalen adventitiellen Zellen und aortalen Muskelzellen gegenüber den venösen und arteriellen glatten Muskelzellen stehen im Kontext zu verschiedenen Studien über Aortenaneurysmen [175]. Sie fanden eine abnormale Funktion der adventitiellen Zellen sowie der glatten Muskelzellen mit kompromittierter Produktion von extrazellulärer Matrix sowie eine Dysbalance in der Proteaseaktivität mit erhöhten kollagenolytischen und elastolytischen Aktivität in der medialen Aortenwand.

Eine interessante Beobachtung gelang in der vorliegenden Untersuchung über die Decorinexpression. Im Vergleich zu den Zellkulturen der Tunica media der Saphenavene und Radialarterie sowie im Vergleich zu den Zellen aus der aortalen Tunica adventitia konnte in den aortalen Gefäßmuskelzellen aus der Tunica media nur eine sehr geringe Menge an Decorin nachgewiesen werden. Einige Krankheiten wie z.B. bestimmte Formen der *Osteogenesis imperfecta* oder des Marfan-Syndroms mit ähnlichen aneurysmatischen Befunden sind ebenfalls mit dem Verlust oder der drastischen Verringerung der Decorinsynthese assoziiert [176,177].

Funktionell dient Decorin als Verbindungsanker zwischen den Kollagenmolekülen und fördert somit die Polymerisierung des Kollagens [77]. Sollte Decorin fehlen, würde somit das Kollagen und die extrazelluläre Matrix eine geringere Festigkeit besitzen. Die Bindung der Kollagenfibrillen über verschiedene Integrine bewirkt eine Modulation des Zellphänotyps [178]. Während polymerisiertes Kollagen das Zellwachstum hemmt und den kontraktilen Phänotyp glatter Muskelzellen fördert, reduziert monomerisches Kollagen die intrazelluläre Expression kontraktiler Proteine [179,180].

Unter der weiteren Annahme der Wachstumsfaktoren bindenden oder inhibierenden Eigenschaften des Decorins würde eine pathologische Reduktion des Decorins die synthetische Aktivität der Zellen begünstigen und eine Verschiebung vom kontraktilen hin zum synthetischen Phänotyp bewirken [88,90,95]. Diese Veränderungen stören die Integrität der Aortenwand und können zu aneurysmatischen Veränderungen führen. Ebenso könnte diese Dysbalance zwischen Decorin und Kollagen mit Auftreten qualitativ minderwertigen monomerischen Kollagen eine Ursache für Gefäßdissektionen begünstigen. Hierzu bedarf es noch weitere Untersuchungen, speziell an Gefäßproben mit Wanddissektionen.

6. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

Einfluß der zyklischen mechanischen Dehnung auf humane Gefäßzellen aus der Tunica media von der Vene, Arterie und Aorta

eingereicht von:

Dirk Neubert

angefertigt an / in:

Universität Leipzig / Medizinische Fakultät

Klinik für Herzchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. F.W. Mohr)

betreut von:

Prof. Dr. med. Stefan Dhein

01/2015

Die arteriosklerotische Gefäßerkrankung nimmt einen immer größeren Stellenwert in der medizinischen Behandlung ein. Weiterhin bestehen viele Unklarheiten über die Vorgänge in den Gefäßwänden. Es gibt nur eine kleine Zahl an Zellkulturuntersuchungen über Zellen aus humanen adulten Gefäßen. Diese Arbeit beschäftigte sich zunächst mit der Erarbeitung eines Protokolls zur Zellisolation von humanen Gefäßzellen speziell aus der Tunica media der Arterie, der Vene und der Aorta. Hierbei wurde unter Verwendung einer schonenden Gewebeverdauung Proben mit einer Zellzahl nach primärer Aussaat von mind. 1×10^5 Zellen eingeschlossen, um höhere Zellkulturpassagen und damit häufigere Zellreplikationszyklen mit abnormen Zellveränderungen zu vermeiden. Im Folgenden wurden erstmalig Veränderungen der Proteinexpressionen von α -SM Aktin, Prolyl-4-Hydroxylase, Decorin und Kollagen I unter statischen Bedingungen und zyklischer mechanischer Dehnung beobachtet, um den Fragen nach Gefäßwandreaktionen zum Beispiel nach Bypassoperationen nachzukommen. Hierzu wurden die Experimente mit Hilfe einer *Flexercell strain unit* durchgeführt und die Zellkulturen unter Zellkulturbedingungen auf *Bioflex*-kollagenbeschichtete Platten einer Dehnung von 10%, 0,5 Hz, 24 und 96 Stunden

ausgesetzt. Des Weiteren wurden Betrachtungen über Gefäßzellen aus aneurysmatischen Aorten durchgeführt. Die Proteinanalyse erfolgte mittels Western Blot.

Aus den Ergebnissen läßt sich folgern, dass eine fehlende zyklisch mechanische Dehnung eine Phänotypänderung der arteriellen Gefäßzellen aus der Tunica media von kontraktilen hin zum sekretorischen und proliferativen Typ bewirkt. Konträr verhält es sich unter Vorliegen einer zyklischen mechanischen Dehnung wie der pulsatilen Wanddehnung. Hierbei wird in den arteriellen Gefäßzellen der kontraktile Phänotyp ausgebildet. Mit der Annahme, dass Gefäßmuskelzellen in statischen Zellkulturen wie auch in arteriosklerotischen Plaques in einem synthetischen, proliferativen Phänotyp vorliegen, ließe sich aus den vorliegenden Ergebnissen ableiten, dass bei fortschreitender Arteriosklerose einhergehend mit der Abnahme der Wandelastizität und dadurch reduzierter pulsatiler Stimuli eine zunehmende Zellproliferation und Synthese von extrazellulärer Matrix zu erwarten wären, welche folgend stenotische Gefäßveränderungen begünstigen würden. Hiermit wäre ein Grund für die Progredienz der Arteriosklerose gegeben. Des Weiteren wäre auch ein Zusammenhang zur in vivo beobachteten pathologischen Wandveränderung des Intima-Mediakomplexes gegenüber der in der Literatur oft beschriebenen intimalen Hyperplasie gegeben. So würde nicht nur der intimale Gefäßanteil, sondern auch die in den Arterien kräftige Tunica media im Sinne einer pathologischen Mediahyperplasie und Hypertrophie eine stenosierende Wandveränderung bewirken.

In diesem Kontext begünstigen möglicherweise die medizinischen minimalinvasiven Behandlungen mit Stentgraftmaterialien die Gefäßwandhyperplasie mit Ausbildung von Restenosen. In der Herz- und Gefäßchirurgie häufig beobachtete Stenosierungen im Bereich der Gefäßnaht könnten durch den Verlust der Wandelastizität im Bereich der Nahtlinie und dadurch Beeinträchtigung der zyklisch mechanischen Dehnung der Gefäßzellen erklärt werden.

In den Gefäßzellen der Venen konnte unter pulsatiler Dehnung eine starke Zunahme der extrazellulären Matrix und die Begünstigung des sekretorischen und damit proliferativen Typs beobachtet werden. Dieser Sachverhalt sollte eine Erklärung für die höhere Stenoseneigung durch Gefäßwandhyperplasie und Hypertrophie in arterialisierten Venen sein. Zurückzuführen ist dieser Umstand möglicherweise auf die vorhergehende geringe bzw. fehlende pulsatile mechanische Dehnung in vivo. Bezogen auf die Zellebene würde dies eine geringere Mechanotransduktion bedeuten, so dass die daran beteiligten Proteine im geringeren Maße exprimiert worden wären. Der beschriebene antiproliferative Effekt einer zyklischen mechanischen Dehnung würde somit einen geringeren Einfluß entfalten können. Dieser Sachverhalt könnte eine wichtige Komponente zur Klärung der erhöhten Disposition für die Sklerosierung von Saphenavenen-Transplantate in vivo sein.

Der regulatorische Einfluß des pulsatilen Stimulus findet im Zusammenhang mit dem Verständnis des humanen Gefäßsystems und dessen Erkrankungen einschließlich der Reaktion in vivo auf medizinische Eingriffe noch wenig Anerkennung. Hierzu bedarf es noch weitere Studien. Unter Annahme einer geringeren Gefäßwandelastizität bei erhöhten Gefäßwandtonus wäre in diesem Kontext Beobachtungen zu prodektiven Massnahmen wie auch medikamentöse Behandlungen im frühen Stadium der pAVK wie zum Beispiel durch Abnahme des peripheren Gefäßtonus mit peripheren Vasodilatoren sinnvoll.

In den Zellkulturen der Gefäßzellen aus der Radialarterie aus arteriosklerotischen Patientenkollektiv konnte konträr zu literarischen Angaben eine geringere Decorinexpression im Vergleich zu den Zellen aus der Saphenavene nachgewiesen werden. Dieser Umstand ist möglicher Weise zum einen auf die Verwendung humaner adulter Gefäßzellen arteriosklerotisch erkrankter Patienten und zum anderen dem Decorinnachweis ausschließlich aus Zellen der T. media zurückzuführen. Unter Berücksichtigung der funktionellen Eigenschaften des Decorins mit Stabilisierung der Polymerisation des Kollagens zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der Decorinexpression und Kollagensynthese.

Es fand sich in den isolierten Zellen aus aneurysmatischen Aortenresektionen ein deutlich reduzierter Decoringehalt in den Zellen aus der medialen Gefäßschicht. Eine Dysbalance zwischen der Kollagenfibrillogenese und Decorin bzw. eine Progression des Decorinmangels könnte aneurysmatische Gefäßveränderungen oder Gefäßwanddissektionen durch Destabilisierung der Kollagenpolymerisation einhergehend mit Funktionsverlust der Kollagenfasern bewirken.

Im Allgemeinen bedarf es mehr wissenschaftliche Arbeiten mit humanen Gefäßmaterial von verschiedenen Patientenkollektiven, um dezitierte Aussagen über angeborene und erworbene humane Gefäßveränderungen erstellen und folgend medizinische Behandlungsoptionen ableiten zu können.

7. Literaturverzeichnis

- [1] S.S. Rensen, P.A. Doevendans, G.J. van Eys, Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity, *Neth Heart J* 15 (2007) 100-108.
- [2] V.L. Roger, A.S. Go, D.M. Lloyd-Jones, R.J. Adams, J.D. Berry, T.M. Brown, M.R. Carnethon, S. Dai, G. de Simone, E.S. Ford, C.S. Fox, H.J. Fullerton, C. Gillespie, K.J. Greenlund, S.M. Hailpern, J.A. Heit, P.M. Ho, V.J. Howard, B.M. Kissela, S.J. Kittner, D.T. Lackland, J.H. Lichtman, L.D. Lisabeth, D.M. Makuc, G.M. Marcus, A. Marelli, D.B. Matchar, M.M. McDermott, J.B. Meigs, C.S. Moy, D. Mozaffarian, M.E. Mussolino, G. Nichol, N.P. Paynter, W.D. Rosamond, P.D. Sorlie, R.S. Stafford, T.N. Turan, M.B. Turner, N.D. Wong, J. Wylie-Rosett, Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association, *Circulation* 123 (2011) e18-e209.
- [3] D. Proudfoot, C. Shanahan, Human vascular smooth muscle cell culture, *Methods Mol Biol* 806 (2012) 251-263.
- [4] H. Di Wang, M.T. Ratsep, A. Chapman, R. Boyd, Adventitial fibroblasts in vascular structure and function: the role of oxidative stress and beyond, *Can J Physiol Pharmacol* 88 (2010) 177-186.
- [5] S. Sartore, A. Chiavegato, E. Faggin, R. Franch, M. Puato, S. Ausoni, P. Pauletto, Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant, *Circ Res* 89 (2001) 1111-1121.
- [6] R. Schmidt, F. Lang, G. Thews, *Physiologie des Menschen*, 2005.
- [7] B.J. Perrin, J.M. Ervasti, The actin gene family: function follows isoform, *Cytoskeleton (Hoboken)* 67 (2010) 630-634.
- [8] A.H. Ang, G. Tachas, J.H. Campbell, J.F. Bateman, G.R. Campbell, Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype, *Biochem J* 265 (1990) 461-469.
- [9] K.G. Birukov, M.G. Frid, J.D. Rogers, V.P. Shirinsky, V.E. Koteliansky, J.H. Campbell, G.R. Campbell, Synthesis and expression of smooth muscle phenotype markers in primary culture of rabbit aortic smooth muscle cells: influence of seeding density and media and relation to cell contractility, *Exp Cell Res* 204 (1993) 46-53.
- [10] K.G. Birukov, V.P. Shirinsky, O.V. Stepanova, V.A. Tkachuk, A.W. Hahn, T.J. Resink, V.N. Smirnov, Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells, *Mol Cell Biochem* 144 (1995) 131-139.
- [11] G.R. Campbell, J.H. Campbell, Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis, *Exp Mol Pathol* 42 (1985) 139-162.
- [12] U. Hedin, J. Holm, G.K. Hansson, Induction of tenascin in rat arterial injury. Relationship to altered smooth muscle cell phenotype, *Am J Pathol* 139 (1991) 649-656.
- [13] Y. Okada, S. Katsuda, Y. Matsui, H. Watanabe, I. Nakanishi, Collagen synthesis by cultured arterial smooth muscle cells during spontaneous phenotypic modulation, *Acta Pathol Jpn* 40 (1990) 157-164.
- [14] S.M. Dethlefsen, D. Shepro, P.A. D'Amore, Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro, *J Vasc Res* 33 (1996) 405-413.
- [15] Y. Hu, L. Cheng, B.W. Hochleitner, Q. Xu, Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcription factor in rat carotid arteries after balloon injury, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997) 2808-2816.
- [16] R. Ross, The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* 362 (1993) 801-809.
- [17] G.D. Saul, Arterial stress from intraluminal pressure modified by tissue pressure offers a complete explanation for the distribution of atherosclerosis, *Med Hypotheses* 52 (1999) 349-351.

- [18] P.R. Standley, T.J. Obards, C.L. Martina, Cyclic stretch regulates autocrine IGF-I in vascular smooth muscle cells: implications in vascular hyperplasia, *Am J Physiol* 276 (1999) E697-705.
- [19] O. Traub, B.C. Berk, Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (1998) 677-685.
- [20] Q. Xu, T.W. Fawcett, M. Gorospe, K.Z. Guyton, Y. Liu, N.J. Holbrook, Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 during acute hypertension, *Hypertension* 30 (1997) 106-111.
- [21] Q. Xu, Y. Liu, M. Gorospe, R. Udelsman, N.J. Holbrook, Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall, *J Clin Invest* 97 (1996) 508-514.
- [22] Y. Zou, Y. Hu, B. Metzler, Q. Xu, Signal transduction in arteriosclerosis: mechanical stress-activated MAP kinases in vascular smooth muscle cells (review), *Int J Mol Med* 1 (1998) 827-834.
- [23] A.W. Clowes, M.M. Clowes, J. Fingerle, M.A. Reidy, Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. V. Role of acute distension in the induction of smooth muscle proliferation, *Lab Invest* 60 (1989) 360-364.
- [24] A.W. Clowes, M.A. Reidy, M.M. Clowes, Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium, *Lab Invest* 49 (1983) 327-333.
- [25] J.M. Pyles, K.L. March, M. Franklin, K. Mehdi, R.L. Wilensky, L.P. Adam, Activation of MAP kinase in vivo follows balloon overstretch injury of porcine coronary and carotid arteries, *Circ Res* 81 (1997) 904-910.
- [26] M.A. Reidy, Neointimal proliferation: the role of basic FGF on vascular smooth muscle cell proliferation, *Thromb Haemost* 70 (1993) 172-176.
- [27] G.K. Hansson, L. Jonasson, J. Holm, L. Claesson-Welsh, Class II MHC antigen expression in the atherosclerotic plaque: smooth muscle cells express HLA-DR, HLA-DQ and the invariant gamma chain, *Clin Exp Immunol* 64 (1986) 261-268.
- [28] L. Jonasson, J. Holm, O. Skalli, G. Gabbiani, G.K. Hansson, Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis, *J Clin Invest* 76 (1985) 125-131.
- [29] S.M. Schwartz, G.R. Campbell, J.H. Campbell, Replication of smooth muscle cells in vascular disease, *Circ Res* 58 (1986) 427-444.
- [30] S.M. Schwartz, D. deBlois, E.R. O'Brien, The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis, *Circ Res* 77 (1995) 445-465.
- [31] A.I. Willis, D. Pierre-Paul, B.E. Sumpio, V. Gahtan, Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications, *Vasc Endovascular Surg* 38 (2004) 11-23.
- [32] C.M. Shanahan, P.L. Weissberg, Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18 (1998) 333-338.
- [33] R. Nissen, G.J. Cardinale, S. Udenfriend, Increased turnover of arterial collagen in hypertensive rats, *Proc Natl Acad Sci U S A* 75 (1978) 451-453.
- [34] G. Bou-Gharios, M. Ponticos, V. Rajkumar, D. Abraham, Extra-cellular matrix in vascular networks, *Cell Prolif* 37 (2004) 207-220.
- [35] J.E. Hungerford, C.D. Little, Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall, *J Vasc Res* 36 (1999) 2-27.
- [36] K. Brew, D. Dinakarandian, H. Nagase, Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function, *Biochim Biophys Acta* 1477 (2000) 267-283.
- [37] A. Shrivastava, C. Radziejewski, E. Campbell, L. Kovac, M. McGlynn, T.E. Ryan, S. Davis, M.P. Goldfarb, D.J. Glass, G. Lemke, G.D. Yancopoulos, An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors, *Mol Cell* 1 (1997) 25-34.
- [38] W. Vogel, G.D. Gish, F. Alves, T. Pawson, The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen, *Mol Cell* 1 (1997) 13-23.

- [39] A. Woods, R.L. Longley, S. Tumova, J.R. Couchman, Syndecan-4 binding to the high affinity heparin-binding domain of fibronectin drives focal adhesion formation in fibroblasts, *Arch Biochem Biophys* 374 (2000) 66-72.
- [40] J.E. Schwarzbauer, J.L. Sechler, Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly, *Curr Opin Cell Biol* 11 (1999) 622-627.
- [41] M.D. Schaller, Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase, *Biochim Biophys Acta* 1540 (2001) 1-21.
- [42] G.B.S. B, Das Bindegewebe, in: F.d.s. Université de Fribourg, Département de médecine, Unité d'Anatomie (Ed.), 2007.
- [43] E. Zamir, B. Geiger, Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions, *J Cell Sci* 114 (2001) 3583-3590.
- [44] N. Boudreau, M.J. Bissell, Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells, *Curr Opin Cell Biol* 10 (1998) 640-646.
- [45] P.C. Brooks, S. Silletti, T.L. von Schalscha, M. Friedlander, D.A. Cheresh, Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity, *Cell* 92 (1998) 391-400.
- [46] P.C. Brooks, S. Stromblad, L.C. Sanders, T.L. von Schalscha, R.T. Aimes, W.G. Stetler-Stevenson, J.P. Quigley, D.A. Cheresh, Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3, *Cell* 85 (1996) 683-693.
- [47] M. Xia, S.P. Sreedharan, P. Dazin, C.H. Damsky, E.J. Goetzl, Integrin-dependent role of human T cell matrix metalloproteinase activity in chemotaxis through a model basement membrane, *J Cell Biochem* 61 (1996) 452-458.
- [48] F.G. Giancotti, E. Ruoslahti, Integrin signaling, *Science* 285 (1999) 1028-1032.
- [49] A. Rich, F.H. Crick, The molecular structure of collagen, *J Mol Biol* 3 (1961) 483-506.
- [50] H. Leonardt, *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*, Thieme 8. Auflage (1990).
- [51] R. Lüllmann-Rauch, *Histologie*, Georg Thieme Verlag 3. Auflage (2009).
- [52] D.J. Prockop, K.I. Kivirikko, Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy, *Annu Rev Biochem* 64 (1995) 403-434.
- [53] J.E. Wagenseil, R.P. Mecham, Vascular extracellular matrix and arterial mechanics, *Physiol Rev* 89 (2009) 957-989.
- [54] J. Carneiro, *Histologie*, Springer 6. Auflage (2005).
- [55] J. Myllyharju, K.I. Kivirikko, Collagens and collagen-related diseases, *Ann Med* 33 (2001) 7-21.
- [56] C. Li, W.J. Cantor, N. Nili, R. Robinson, L. Fenkell, Y.L. Tran, H.A. Whittingham, W. Tsui, A.N. Cheema, J.D. Sparkes, K. Pritzker, D.E. Levy, B.H. Strauss, Arterial repair after stenting and the effects of GM6001, a matrix metalloproteinase inhibitor, *J Am Coll Cardiol* 39 (2002) 1852-1858.
- [57] H.D. Intengan, E.L. Schiffrin, Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis, *Hypertension* 38 (2001) 581-587.
- [58] T. Pihlajaniemi, R. Myllyla, K.I. Kivirikko, Prolyl 4-hydroxylase and its role in collagen synthesis, *J Hepatol* 13 Suppl 3 (1991) S2-7.
- [59] S. Kellokumpu, M. Suokas, L. Risteli, R. Myllyla, Protein disulfide isomerase and newly synthesized procollagen chains form higher-order structures in the lumen of the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem* 272 (1997) 2770-2777.
- [60] K.I. Kivirikko, R. Myllyla, Post-translational processing of procollagens, *Ann N Y Acad Sci* 460 (1985) 187-201.
- [61] T. Pihlajaniemi, T. Helaakoski, K. Tasanen, R. Myllyla, M.L. Huhtala, J. Koivu, K.I. Kivirikko, Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase. This subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene, *EMBO J* 6 (1987) 643-649.
- [62] C.W. Gruber, M. Cemazar, B. Heras, J.L. Martin, D.J. Craik, Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding, *Trends Biochem Sci* 31 (2006) 455-464.

- [63] B. Wilkinson, H.F. Gilbert, Protein disulfide isomerase, *Biochim Biophys Acta* 1699 (2004) 35-44.
- [64] J. Myllyharju, Prolyl 4-hydroxylases, key enzymes in the synthesis of collagens and regulation of the response to hypoxia, and their roles as treatment targets, *Ann Med* 40 (2008) 402-417.
- [65] K.J. Williams, I. Tabas, The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (1995) 551-561.
- [66] R.V. Iozzo, Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function, *Annu Rev Biochem* 67 (1998) 609-652.
- [67] J. Moses, A. Oldberg, F. Cheng, L.A. Fransson, Biosynthesis of the proteoglycan decorin--transient 2-phosphorylation of xylose during formation of the trisaccharide linkage region, *Eur J Biochem* 248 (1997) 521-526.
- [68] M.J. Merrilees, B. Beaumont, L.J. Scott, Comparison of deposits of versican, biglycan and decorin in saphenous vein and internal thoracic, radial and coronary arteries: correlation to patency, *Coron Artery Dis* 12 (2001) 7-16.
- [69] S. Singla, C. Hu, A. Mizeracki, J.L. Mehta, Decorin in atherosclerosis, *Ther Adv Cardiovasc Dis* 5 (2011) 305-314.
- [70] E. Schonherr, H.J. Hausser, Extracellular matrix and cytokines: a functional unit, *Dev Immunol* 7 (2000) 89-101.
- [71] T. Yamakawa, H.Z. Bai, J. Masuda, Y. Sawa, R. Shirakura, J. Ogata, H. Matsuda, Differential expression of proteoglycans biglycan and decorin during neointima formation after stent implantation in normal and atherosclerotic rabbit aortas, *Atherosclerosis* 152 (2000) 287-297.
- [72] A.M. Hocking, T. Shinomura, D.J. McQuillan, Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix, *Matrix Biol* 17 (1998) 1-19.
- [73] L.A. Fransson, M. Belting, M. Jonsson, K. Mani, J. Moses, A. Oldberg, Biosynthesis of decorin and glypican, *Matrix Biol* 19 (2000) 367-376.
- [74] D.J. Bidanset, R. LeBaron, L. Rosenberg, J.E. Murphy-Ullrich, M. Hook, Regulation of cell substrate adhesion: effects of small galactosaminoglycan-containing proteoglycans, *J Cell Biol* 118 (1992) 1523-1531.
- [75] D.R. Keene, J.D. San Antonio, R. Mayne, D.J. McQuillan, G. Sarris, S.A. Santoro, R.V. Iozzo, Decorin binds near the C terminus of type I collagen, *J Biol Chem* 275 (2000) 21801-21804.
- [76] H. Kresse, C. Liszio, E. Schonherr, L.W. Fisher, Critical role of glutamate in a central leucine-rich repeat of decorin for interaction with type I collagen, *J Biol Chem* 272 (1997) 18404-18410.
- [77] J.E. Scott, Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen, *Biochemistry* 35 (1996) 8795-8799.
- [78] J.P. Orgel, A. Eid, O. Antipova, J. Bella, J.E. Scott, Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding, *PLoS One* 4 (2009) e7028.
- [79] H. Lin, J.E. Wilson, C.R. Roberts, K.J. Horley, G.L. Winters, M.R. Costanzo, B.M. McManus, Biglycan, decorin, and versican protein expression patterns in coronary arteriopathy of human cardiac allograft: distinctness as compared to native atherosclerosis, *J Heart Lung Transplant* 15 (1996) 1233-1247.
- [80] H. Ungefroren, S. Ergun, N.B. Krull, A.F. Holstein, Expression of the small proteoglycans biglycan and decorin in the adult human testis, *Biol Reprod* 52 (1995) 1095-1105.
- [81] S.P. Evanko, E.W. Raines, R. Ross, L.I. Gold, T.N. Wight, Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta, *Am J Pathol* 152 (1998) 533-546.
- [82] B. Radhakrishnamurthy, R.E. Tracy, E.R. Dalferes, Jr., G.S. Berenson, Proteoglycans in human coronary arteriosclerotic lesions, *Exp Mol Pathol* 65 (1998) 1-8.

- [83] R. Riessen, J.M. Isner, E. Blessing, C. Loushin, S. Nikol, T.N. Wight, Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries, *Am J Pathol* 144 (1994) 962-974.
- [84] P.T. Kovanen, M.O. Pentikainen, Decorin links low-density lipoproteins (LDL) to collagen: a novel mechanism for retention of LDL in the atherosclerotic plaque, *Trends Cardiovasc Med* 9 (1999) 86-91.
- [85] M.O. Pentikainen, K. Oorni, R. Lassila, P.T. Kovanen, The proteoglycan decorin links low density lipoproteins with collagen type I, *J Biol Chem* 272 (1997) 7633-7638.
- [86] H. Kresse, H. Hausser, E. Schonherr, Small proteoglycans, *Experientia* 49 (1993) 403-416.
- [87] L. Nelimarkka, H. Salminen, T. Kuopio, S. Nikkari, T. Ekfors, J. Laine, L. Pelliniemi, H. Jarvelainen, Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis, *Am J Pathol* 158 (2001) 345-353.
- [88] J.W. Fischer, M.G. Kinsella, B. Levkau, A.W. Clowes, T.N. Wight, Retroviral overexpression of decorin differentially affects the response of arterial smooth muscle cells to growth factors, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 (2001) 777-784.
- [89] R.V. Iozzo, The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32 (1997) 141-174.
- [90] N. Nili, A.N. Cheema, F.J. Giordano, A.W. Barolet, S. Babaei, R. Hickey, M.R. Eskandarian, M. Smeets, J. Butany, G. Pasterkamp, B.H. Strauss, Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function: potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty, *Am J Pathol* 163 (2003) 869-878.
- [91] C.C. Reed, R.V. Iozzo, The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis, *Glycoconj J* 19 (2002) 249-255.
- [92] E. Schonherr, C. Sunderkotter, R.V. Iozzo, L. Schaefer, Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system, *J Biol Chem* 280 (2005) 15767-15772.
- [93] Y. Yamaguchi, D.M. Mann, E. Ruoslahti, Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin, *Nature* 346 (1990) 281-284.
- [94] A. De Luca, M. Santra, A. Baldi, A. Giordano, R.V. Iozzo, Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases, *J Biol Chem* 271 (1996) 18961-18965.
- [95] A.P. Wong, N. Nili, B.H. Strauss, In vitro differences between venous and arterial-derived smooth muscle cells: potential modulatory role of decorin, *Cardiovasc Res* 65 (2005) 702-710.
- [96] W.A. Border, N.A. Noble, T. Yamamoto, J.R. Harper, Y. Yamaguchi, M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease, *Nature* 360 (1992) 361-364.
- [97] R. Franch, A. Chiavegato, M. Maraschin, S. Candeo, S. Ausoni, A. Villa, G. Gerosa, L. Gasparotto, P. Parnigotto, S. Sartore, Differential availability/processing of decorin precursor in arterial and venous smooth muscle cells, *J Anat* 209 (2006) 271-287.
- [98] G. Osol, Mechanotransduction by vascular smooth muscle, *J Vasc Res* 32 (1995) 275-292.
- [99] C.J. Molloy, D.S. Taylor, J.E. Pawlowski, Novel cardiovascular actions of the activins, *J Endocrinol* 161 (1999) 179-185.
- [100] A. Salameh, S. Dhein, Effects of mechanical forces and stretch on intercellular gap junction coupling, *Biochim Biophys Acta* (2012).
- [101] A.L. Berrier, K.M. Yamada, Cell-matrix adhesion, *J Cell Physiol* 213 (2007) 565-573.
- [102] E.A. Clark, W.G. King, J.S. Brugge, M. Symons, R.O. Hynes, Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases, *J Cell Biol* 142 (1998) 573-586.
- [103] J.Y. Shyy, S. Chien, Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress, *Circ Res* 91 (2002) 769-775.
- [104] A.J. Halayko, G.L. Stelmack, The association of caveolae, actin, and the dystrophin-glycoprotein complex: a role in smooth muscle phenotype and function?, *Can J Physiol Pharmacol* 83 (2005) 877-891.

- [105] T. Gradistanac, Einfluß mechanischer Dehnung auf das wachstum vaskulärer glatter Muskelzellen des Menschen, Dissertation, Martin-Luther-Universität zu Halle-Wittenberg (2007).
- [106] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [107] H. Rehm, *Der Experimentator: Proteinbiochemie.*, 2. Auflage. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag. (1997).
- [108] M.G. Frid, E.C. Dempsey, A.G. Durmowicz, K.R. Stenmark, Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997) 1203-1209.
- [109] M.L. Bochaton-Piallat, P. Ropraz, F. Gabbiani, G. Gabbiani, Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (1996) 815-820.
- [110] P.C. Dartsch, H.D. Weiss, E. Betz, Human vascular smooth muscle cells in culture: growth characteristics and protein pattern by use of serum-free media supplements, *Eur J Cell Biol* 51 (1990) 285-294.
- [111] O. Skalli, P. Ropraz, A. Trzeciak, G. Benzonana, D. Gillessen, G. Gabbiani, A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation, *J Cell Biol* 103 (1986) 2787-2796.
- [112] E. Arciniegas, A.B. Sutton, T.D. Allen, A.M. Schor, Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro, *J Cell Sci* 103 (Pt 2) (1992) 521-529.
- [113] Y. Shi, J.E. O'Brien, Jr., A. Fard, A. Zalewski, Transforming growth factor-beta 1 expression and myofibroblast formation during arterial repair, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16 (1996) 1298-1305.
- [114] K.G. McCullagh, V.C. Duance, K.A. Bishop, The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta, *J Pathol* 130 (1980) 45-55.
- [115] B. Voss, J. Rauterberg, Localization of collagen types I, III, IV and V, fibronectin and laminin in human arteries by the indirect immunofluorescence method, *Pathol Res Pract* 181 (1986) 568-575.
- [116] R.G. Favaloro, Critical analysis of coronary artery bypass graft surgery: a 30-year journey, *J Am Coll Cardiol* 31 (1998) 1B-63B.
- [117] J.G. Motwani, E.J. Topol, Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention, *Circulation* 97 (1998) 916-931.
- [118] G.M. Fitzgibbon, H.P. Kafka, A.J. Leach, W.J. Keon, G.D. Hooper, J.R. Burton, Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years, *J Am Coll Cardiol* 28 (1996) 616-626.
- [119] J.H. Shuhaiber, A.N. Evans, M.G. Massad, A.S. Geha, Mechanisms and future directions for prevention of vein graft failure in coronary bypass surgery, *Eur J Cardiothorac Surg* 22 (2002) 387-396.
- [120] S. Deb, E.A. Cohen, S.K. Singh, D. Une, A. Laupacis, S.E. Fremes, Radial Artery and Saphenous Vein Patency More Than 5 Years After Coronary Artery Bypass Surgery: Results From RAPS (Radial Artery Patency Study), *J Am Coll Cardiol* 60 (2012) 28-35.
- [121] J.L. Cox, D.A. Chiasson, A.I. Gotlieb, Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries, *Prog Cardiovasc Dis* 34 (1991) 45-68.
- [122] A.J. Bryan, G.D. Angelini, The biology of saphenous vein graft occlusion: etiology and strategies for prevention, *Curr Opin Cardiol* 9 (1994) 641-649.
- [123] K.B. Davis, B. Chaitman, T. Ryan, V. Bittner, J.W. Kennedy, Comparison of 15-year survival for men and women after initial medical or surgical treatment for coronary artery disease: a CASS registry study. Coronary Artery Surgery Study, *J Am Coll Cardiol* 25 (1995) 1000-1009.

- [124] P. Ranjzad, H.K. Salem, P.A. Kingston, Adenovirus-mediated gene transfer of fibromodulin inhibits neointimal hyperplasia in an organ culture model of human saphenous vein graft disease, *Gene Ther* 16 (2009) 1154-1162.
- [125] J.T. McPhee, N.R. Barshes, C.K. Ozaki, L.L. Nguyen, M. Belkin, Optimal conduit choice in the absence of single-segment great saphenous vein for below-knee popliteal bypass, *J Vasc Surg* 55 (2012) 1008-1014.
- [126] F.C. Brochado-Neto, M.V. Cury, S.S. Bonadiman, M.F. Matiello, S.R. Tiozzi, M.R. Godoy, K. Nakano, R. Sacilotto, Vein bypasses to branches of pedal arteries, *J Vasc Surg* 55 (2012) 746-752.
- [127] E. Arvela, M. Venermo, M. Soderstrom, A. Alback, M. Lepantalo, Outcome of infrainguinal single-segment great saphenous vein bypass for critical limb ischemia is superior to alternative autologous vein bypass, especially in patients with high operative risk, *Ann Vasc Surg* 26 (2012) 396-403.
- [128] K. Kacem, R. Sercombe, Similar pathological effects of sympathectomy and hypercholesterolemia on arterial smooth muscle cells and fibroblasts, *Acta Histochem* 110 (2008) 302-313.
- [129] Y. Hu, Q. Xu, Adventitial biology: differentiation and function, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 (2011) 1523-1529.
- [130] K. Kacem, R. Sercombe, Differing influence of sympathectomy on smooth muscle cells and fibroblasts in cerebral and peripheral muscular arteries, *Auton Neurosci* 124 (2006) 38-48.
- [131] P. Reusch, H. Wagdy, R. Reusch, E. Wilson, H.E. Ives, Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells, *Circ Res* 79 (1996) 1046-1053.
- [132] J.H. Suh, J.S. Yoon, H.W. Kim, K.H. Jo, Adventitial fibroblast abnormality in thoracic aortic aneurysms and aortic dissections, *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 44 (2011) 406-412.
- [133] V. Asundi, K. Cowan, D. Matzura, W. Wagner, K.L. Dreher, Characterization of extracellular matrix proteoglycan transcripts expressed by vascular smooth muscle cells, *Eur J Cell Biol* 52 (1990) 98-104.
- [134] D.J. Carey, Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors, *Biochem J* 327 (Pt 1) (1997) 1-16.
- [135] N. Clausell, S. Molossi, M. Rabinovitch, Increased interleukin-1 beta and fibronectin expression are early features of the development of the postcardiac transplant coronary arteriopathy in piglets, *Am J Pathol* 142 (1993) 1772-1786.
- [136] P.R. Kollros, S.R. Bates, M.B. Mathews, A.L. Horwitz, S. Glagov, Cyclic AMP inhibits increased collagen production by cyclically stretched smooth muscle cells, *Lab Invest* 56 (1987) 410-417.
- [137] K.D. O'Brien, M.D. Allen, T.O. McDonald, A. Chait, J.M. Harlan, D. Fishbein, J. McCarty, M. Ferguson, K. Hudkins, C.D. Benjamin, et al., Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis, *J Clin Invest* 92 (1993) 945-951.
- [138] G.B. Chapman, W. Durante, J.D. Hellums, A.I. Schafer, Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278 (2000) H748-754.
- [139] A. Hipper, G. Isenberg, Cyclic mechanical strain decreases the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells, *Pflugers Arch* 440 (2000) 19-27.
- [140] P.D. Ballyk, C. Walsh, J. Butany, M. Ojha, Compliance mismatch may promote graft-artery intimal hyperplasia by altering suture-line stresses, *J Biomech* 31 (1998) 229-237.
- [141] N.A. Turner, S. Ho, P. Warburton, D.J. O'Regan, K.E. Porter, Smooth muscle cells cultured from human saphenous vein exhibit increased proliferation, invasion, and mitogen-activated protein kinase activation in vitro compared with paired internal mammary artery cells, *J Vasc Surg* 45 (2007) 1022-1028.
- [142] Z. Yang, B.S. Oemar, T. Carrel, B. Kipfer, F. Julmy, T.F. Luscher, Different proliferative properties of smooth muscle cells of human arterial and venous bypass vessels: role of

- PDGF receptors, mitogen-activated protein kinase, and cyclin-dependent kinase inhibitors, *Circulation* 97 (1998) 181-187.
- [143] A. Mekontso-Dessap, M. Kirsch, C. Guignambert, P. Zadigue, S. Adnot, D. Loisançe, S. Eddahibi, Vascular-wall remodeling of 3 human bypass vessels: organ culture and smooth muscle cell properties, *J Thorac Cardiovasc Surg* 131 (2006) 651-658.
- [144] P.L. Faries, D.I. Rohan, M.C. Wyers, M.L. Marin, L.H. Hollier, W.C. Quist, F.W. LoGerfo, Vascular smooth muscle cells derived from atherosclerotic human arteries exhibit greater adhesion, migration, and proliferation than venous cells, *J Surg Res* 104 (2002) 22-28.
- [145] M. Aikawa, H. Yamaguchi, Y. Yazaki, R. Nagai, Smooth muscle phenotypes in developing and atherosclerotic human arteries demonstrated by myosin expression, *J Atheroscler Thromb* 2 (1995) 14-23.
- [146] A.M. Zanellato, A.C. Borriore, M. Tonello, G. Scannapieco, P. Pauletto, S. Sartore, Myosin isoform expression and smooth muscle cell heterogeneity in normal and atherosclerotic rabbit aorta, *Arteriosclerosis* 10 (1990) 996-1009.
- [147] C.J. O'Callaghan, B. Williams, Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1), *Hypertension* 36 (2000) 319-324.
- [148] W. Hach, *VenenChirurgie - Leitfaden für Gefäßchirurgen, Angiologen, Dermatologen und Phlebologen*, 2007.
- [149] M.P. Goldmann, *Sclerotherapy Treatment of Varicose and Teleangiectatic Leg Veins*, 2. Auflage, St. Louis, Baltimore, Boston u.a. 1995, S.34-47, 52, 53, 60-63, 86, 87, 102, (1995).
- [150] R. Neumann, Histologie der Vena saphena magna unter dem Gesichtswinkel der Architektur-Pathologie, *Virchows Arch. path. Anat.*, 299, S. 479-512, (1937).
- [151] A.v. Kügelgen, Über das Verhältnis von Ringmuskulatur und Innendruck in menschlichen großen Venen, *Zeitschrift für Zellforschung* 43(1955), S. 168-183.
- [152] H.J. Bouissou, M. , Vein morphology, in: *Phlebology* (1988)3, Suppl. 1, S. 1-11.
- [153] S.H. Duda, M. Bosiers, J. Lammer, D. Scheinert, T. Zeller, V. Oliva, A. Tielbeek, J. Anderson, B. Wiesinger, G. Tepe, A. Lansky, M.R. Jaff, C. Mudde, H. Tielemans, J.P. Beregi, Drug-eluting and bare nitinol stents for the treatment of atherosclerotic lesions in the superficial femoral artery: long-term results from the SIROCCO trial, *J Endovasc Ther* 13 (2006) 701-710.
- [154] G. Tepe, T. Zeller, T. Albrecht, S. Heller, U. Schwarzwaldner, J.P. Beregi, C.D. Claussen, A. Oldenburg, B. Scheller, U. Speck, Local delivery of paclitaxel to inhibit restenosis during angioplasty of the leg, *N Engl J Med* 358 (2008) 689-699.
- [155] T. Zeller, M.D. Dake, G. Tepe, K. Brechtel, E. Noory, U. Beschorner, P.L. Kultgen, A. Rastan, Treatment of femoropopliteal in-stent restenosis with paclitaxel-eluting stents, *JACC Cardiovasc Interv* 6 (2013) 274-281.
- [156] M. Bosiers, P. Peeters, J. Tessarek, K. Deloose, S. Strickler, The Zilver(R) PTX(R) Single Arm Study: 12-month results from the TASC C/D lesion subgroup, *J Cardiovasc Surg (Torino)* 54 (2013) 115-122.
- [157] D. Scheinert, S. Duda, T. Zeller, H. Krankenberg, J. Ricke, M. Bosiers, G. Tepe, S. Naisbitt, K. Rosenfield, The LEVANT I (Lutonix paclitaxel-coated balloon for the prevention of femoropopliteal restenosis) trial for femoropopliteal revascularization: first-in-human randomized trial of low-dose drug-coated balloon versus uncoated balloon angioplasty, *JACC Cardiovasc Interv* 7 (2014) 10-19.
- [158] A. Lupi, A. Rognoni, G.G. Secco, I. Porto, F. Nardi, M. Lazzerio, L. Rossi, R. Parisi, R. Fattori, G. Genoni, R. Rosso, P.R. Stella, I. Sheiban, L. Bolognese, F. Liistro, A.S. Bongo, P. Agostoni, Drug eluting balloon versus drug eluting stent in percutaneous coronary interventions: insights from a meta-analysis of 1462 patients, *Int J Cardiol* 168 (2013) 4608-4616.
- [159] *Angioupdate, Handbuch für GEFÄSSMEDIZIN 2014*, Kap. 13, S.21, (2014).
- [160] M.K. W Hepp, K Konner, *Dialyseshunts*, Steinkopff Verlag 2. Auflage (2009).
- [161] H. Scholz, *AV-Shuntchirurgie*, Springer Verlag (2012).

- [162] E. Ballotta, A Toniato, G Da Giaio et al., Durability of eversion carotid endarterectomy, *J Vasc Surg* 2014 59:1274-1281 (2014).
- [163] H.C. Stary, The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life, *Eur Heart J* 11 Suppl E (1990) 3-19.
- [164] T.N. Wight, The extracellular matrix and atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol* 6 (1995) 326-334.
- [165] E.P. Amento, N. Ehsani, H. Palmer, P. Libby, Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells, *Arterioscler Thromb* 11 (1991) 1223-1230.
- [166] A. Jawien, D.F. Bowen-Pope, V. Lindner, S.M. Schwartz, A.W. Clowes, Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty, *J Clin Invest* 89 (1992) 507-511.
- [167] H. Sawada, T. Shinomura, K. Kimata, J. Takeuchi, T. Tsuji, H. Watanabe, Characterization of an anti-decorin monoclonal antibody, and its utility, *J Biochem* 132 (2002) 997-1002.
- [168] P.G. Scott, C.M. Dodd, G.A. Pringle, Mapping the locations of the epitopes of five monoclonal antibodies to the core protein of dermatan sulfate proteoglycan II (decorin), *J Biol Chem* 268 (1993) 11558-11564.
- [169] R.S. Sawhney, T.M. Hering, L.J. Sandell, Biosynthesis of small proteoglycan II (decorin) by chondrocytes and evidence for a procure protein, *J Biol Chem* 266 (1991) 9231-9240.
- [170] P.G. Scott, J.G. Grossmann, C.M. Dodd, J.K. Sheehan, P.N. Bishop, Light and X-ray scattering show decorin to be a dimer in solution, *J Biol Chem* 278 (2003) 18353-18359.
- [171] M. Clarke, M. Bennett, The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability, *Am J Nephrol* 26 (2006) 531-535.
- [172] A.W. Orr, N.E. Hastings, B.R. Blackman, B.R. Wamhoff, Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis, *J Vasc Res* 47 (2010) 168-180.
- [173] S. Menashi, J.S. Campa, R.M. Greenhalgh, J.T. Powell, Collagen in abdominal aortic aneurysm: typing, content, and degradation, *J Vasc Surg* 6 (1987) 578-582.
- [174] J.V. White, K. Haas, S. Phillips, A.J. Comerota, Adventitial elastolysis is a primary event in aneurysm formation, *J Vasc Surg* 17 (1993) 371-380; discussion 380-371.
- [175] S. Saito, N. Zempo, A. Yamashita, H. Takenaka, K. Fujioka, K. Esato, Matrix metalloproteinase expressions in arteriosclerotic aneurysmal disease, *Vasc Endovascular Surg* 36 (2002) 1-7.
- [176] K.M. Dyne, M. Valli, A. Forlino, M. Mottes, H. Kresse, G. Cetta, Deficient expression of the small proteoglycan decorin in a case of severe/lethal osteogenesis imperfecta, *Am J Med Genet* 63 (1996) 161-166.
- [177] L. Pulkkinen, K. Kainulainen, T. Krusius, P. Makinen, J. Schollin, K.H. Gustavsson, L. Peltonen, Deficient expression of the gene coding for decorin in a lethal form of Marfan syndrome, *J Biol Chem* 265 (1990) 17780-17785.
- [178] A.W. Orr, M.Y. Lee, J.A. Lemmon, A. Yurdagul, Jr., M.F. Gomez, P.D. Bortz, B.R. Wamhoff, Molecular mechanisms of collagen isotype-specific modulation of smooth muscle cell phenotype, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (2009) 225-231.
- [179] H. Koyama, E.W. Raines, K.E. Bornfeldt, J.M. Roberts, R. Ross, Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors, *Cell* 87 (1996) 1069-1078.
- [180] M. Yamamoto, K. Yamamoto, T. Noumura, Type I collagen promotes modulation of cultured rabbit arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype, *Exp Cell Res* 204 (1993) 121-129.

8. Anhang

Lebenslauf

Aufgrund datenrechtlichen Bestimmungen ist der Lebenslauf in der Onlineversion der Dissertation nicht verfügbar.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den 02.01.2015

Dirk Neubert

Danksagung

Für die Betreuung während der Datensammlung und Auswertung möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. med. Stefan Dhein und Dr. rer. nat. Sandy Salisch bedanken. Prof. Dr. med. F. W. Mohr danke ich für die Überlassung des Laborarbeitsplatzes.

Meiner Ehefrau bin ich für ihre Nachsicht, Unnachgiebigkeit und Motivation sehr dankbar.