

Aus dem Institut für Physiologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. W. Jelkmann

Expression des vaskulären endothelialen
Wachstumsfaktors (VEGF) nach akuter Ischämie und
transmyokardialer Laserrevaskularisation im Myokard
des Schweines

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Cathrine Helm
aus Bad Oldesloe

Lübeck 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Fandrey

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Stierle

Tag der mündlichen Prüfung: 05.01.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 05.01.2005

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Material und Methoden	13
2.1. Chemikalien	13
2.2. Versuchstiere	13
2.3. Versuchsdurchführung	13
2.4. RT-PCR-Versuche	17
2.4.1. Isolation von Gesamt-RNA mit Phenol:Chloroform:Isoamyl	17
2.4.2. Reverse Transkription	18
2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	18
2.4.4. VEGF-Primerwahl	19
2.4.5. Kompetitorsynthese	20
2.4.6. Quantitative PCR	21
2.5. Western-Blot	23
2.6. Auswertung und Statistik	25
3. Ergebnisse	26
3.1. RT-PCR-Vorgehen	26
3.1.1. VEGF-Übersichts-PCR	26
3.1.2. Spezifische PCRs der VEGF-Isoformen	27
3.1.3. Spezifische PCR von β -Aktin	28
3.1.4. Spezifische PCR von HIF-1 α	28
3.1.5. Quantitative PCR von VEGF ₁₆₄ und β -Aktin	28
3.2. Western-Blot	30
3.2.1. VEGF-Western-Blot	30
3.2.2. β -Aktin-Western-Blot	32
3.3. Identifikation der Sequenz des Exon 6 des porcinen VEGF-Genes	33
4. Diskussion	34

5. Zusammenfassung	42
Anhang: Primertabelle	44
Literaturverzeichnis	45
Abkürzungsverzeichnis	55
Veröffentlichungen	57
Danksagung	58
Lebenslauf	59

1. Einleitung

Die Koronare Herzkrankheit ist die häufigste Todesursache in den Industrieländern. Unter dem Begriff der Koronaren Herzkrankheit versteht man eine durch Einengung oder Verschluss von Herzkranzgefäßen verursachte Durchblutungsverminderung des Herzmuskels. Diese manifestiert sich meist zuerst unter Belastung, wenn in den Herzmuskelzellen ein Missverhältnis zwischen Angebot und Bedarf an Sauerstoff und Substraten entsteht. Zu den etablierten Behandlungsmethoden der KHK zählen die medikamentöse Therapie, die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und die Bypass-Operation (Coronary artery bypass grafting, CABG). Patienten mit diffuser Koronarangiopathie allerdings können häufig mit der PTCA oder der CABG nicht therapiert werden. Für diese Patientengruppe wurde vor einigen Jahren eine neue Behandlungsmethode erprobt, die transmyokardiale Laserrevaskularisation (TMLR). Dabei werden nach Thorakotomie und Perikarderöffnung mithilfe eines Lasers Kanäle von 1 mm Durchmesser in die linksventrikuläre Herzwand gesetzt.

Gedanklichen Anstoß zur TMLR gab ursprünglich das Prinzip der myokardialen Blutversorgung bei Reptilien (in einer Übersicht von Kohmoto et al. (1997) beschrieben). Bei diesen Tieren wird der Herzmuskel zum Teil durch kleine Gefäße, die sogenannten Sinusoide, direkt aus der Herzkammer mit Blut versorgt. Okada et al. (1991) folgerten daraus, dass das Blut aus der Herzkammer nach Schaffung von intramyokardialen Kanälen mittels TMLR in die Herzkranzgefäße strömen und zu einer Verbesserung der myokardialen Sauerstoffversorgung führen könnte. Diese sogenannte direct blood flow-Hypothese wurde inzwischen jedoch wieder weitgehend verlassen. Burkhoff et al. (1996) und Kohmoto et al. (1996) zeigten in ihren Studien, dass die myokardialen Laserkanäle nicht durchgängig bleiben, sondern mit Narbengewebe aufgefüllt werden.

In klinische Studien stellte sich die TMLR erfolgreich dar. So wiesen in der Studie von Cooley und Mitarbeitern (1996) die untersuchten Patienten zwölf Monate nach der TMLR eine deutliche Abnahme der pektanginösen Beschwerden auf. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Horvath et al. (1996),

deren klinische Studie einen Zeitraum von zwei Jahren umspannte. Der genaue Mechanismus der Beschwerdenreduktion nach TMLR ist bis heute Gegenstand der Forschung. Diesbezüglich favorisiert wird die These einer durch den Laserbeschuss induzierten Angiogenese mit der konsekutiven Verbesserung der regionalen Blutversorgung. Tierexperimentelle Studien von Zlotnick et al. (1996) und Fleischer et al. (1996) stützen diese These und zeigten eine Neubildung von Gefäßen im Bereich der Laserkanäle nach TMLR.

Wesentliche Fortschritte im Verständnis der Angiogenese sind durch die Arbeiten Napoleone Ferraras ermöglicht worden (Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Ferrara, 1999).

Als Angiogenese wird die von bereits vorbestehenden Gefäßen durch Endothelzellproliferation ausgehende Gefäßneubildung bezeichnet. Dieser Vorgang ist physiologisch beteiligt an der embryonalen Organentstehung, an der Wundheilung und an der Aufrechterhaltung der reproduktiven Funktionen des adulten Ovars. Darüber hinaus spielt die verstärkte Angiogenese eine Rolle bei der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen, wie beispielsweise beim Wachstum von Tumoren, bei der rheumatoiden Arthritis, bei der diabetischen Retinopathie und bei der Psoriasis.

Verschiedene Regulatoren der Angiogenese sind beschrieben worden (Ferrara, 1999). Einen proangiogenetischen Effekt haben u.a. der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor, VEGF), der saure und basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (acid- und basic Fibroblast growth factor, a-FGF und b-FGF), der Transforming Growth Factor alpha und beta (TGF- α und TGF- β), Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) (Folkman et al., 1992) und Interleukin-8 (IL-8). Als Inhibitoren der Angiogenese seien das Plasminogenfragment Angiostatin (O'Reilly et al., 1994), das Calreticulinfragment Vasostatin (Pike et al., 1998) und Thrombospondin (Dipietro, 1997) erwähnt.

Im Jahre 1983 gelangen Senger et al. die Isolation eines Proteins, das in der Haut von Meerschweinchen die Gefäßpermeabilität erhöht: der Vascular Permeability Factor (VPF). Unabhängig davon wurde 1989 von Ferrara et al.

und Plouet et al. ein endothelzellspezifisches Mitogen identifiziert, der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Weitere Untersuchungen ergaben, dass es sich bei diesen beiden Faktoren um dasselbe Protein handelte. Wegen der Eigenschaften dieses Proteins als fast ausschließlich auf Endothelzellen wirkender Faktor wurde eine weitreichende Bedeutung in der Regulation der physiologischen und pathologischen Angiogenese vermutet. In den nächsten Jahren wurden neben der mitogenen Wirkung des VEGF auf arterielles, venöses und lymphatisches Endothel u. a. ein chemotaktischer Effekt auf Monozyten und eine Funktion als sogenannter „survival factor“ für verschiedene Zelltypen gefunden (Alon et al., 1995; Gerber et al., 1998 (a); Gerber et al., 1998 (b)).

Eine Reihe von Untersuchungen lieferte die molekularbiologischen Grundlagen für das Verständnis der Regulation der Bildung von VEGF: Das humane Gen für VEGF liegt auf Chromosom 6p21.3 (Vincenti et al., 1996), die kodierende Region ist auf etwa 14 Kilobasenpaare (kB) verteilt (Houck et al., 1991). Das Gen besteht aus 8 Exons, die durch 7 Introns gegeneinander abgegrenzt sind. Durch alternatives Spleißen der Vorläufer-mRNA ergeben sich die humanen Isoformen des Proteins: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆, wobei sich die Zahlen auf die in den Isoformen enthaltenen Aminosäuren beziehen (Tischer et al., 1991). Die im humanen Organismus vorherrschende Form ist das von einer Vielzahl von Zellen gebildete VEGF₁₆₅. Es ist ein basisches, Heparin bindendes, homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa, das sezerniert wird, aber zu etwa 2/3 an die Zelloberfläche und an die extrazelluläre Matrix gebunden ist. VEGF₁₂₁ wird in vielen Zellen gebildet, ist schwach sauer und bindet nicht an Heparin, so dass es frei diffundieren kann. Es besitzt eine etwa 50- bis 100fach schwächere biologische Aktivität als VEGF₁₆₅ (Houck et al., 1992). Die Isoform VEGF₁₄₅ wird von Karzinomzellen der weiblichen Genitalorgane gebildet und, wie das VEGF₁₆₅, sezerniert und an die Extrazellulärmatrix gebunden (Poltorak et al., 1997). Seine biologischen Potenz ist geringer als die des VEGF₁₆₅. VEGF₁₈₉, ebenfalls in vielen Zellen gebildet, ist basisch, bindet mit einer größeren Affinität als VEGF₁₆₅ an Heparin und ist fast vollständig in der Extrazellulärmatrix gebunden (Park et al., 1993). Die sehr seltene Isoform VEGF₂₀₆ wird in der

Plazenta gefunden, ist basisch und bindet Heparin, so dass es ebenfalls an die extrazelluläre Matrix gebunden wird (Park et al., 1993).

Versuchsreihen mit Nagetieren haben gezeigt, dass der Aufbau des murinen VEGF-Gens große Ähnlichkeiten zum Aufbau des VEGF-Gens im humanen Organismus aufweist. Auch beim Nagetier liegt das Gen auf einem ca. 14 kB umfassenden Chromosomenabschnitt und besteht aus 8 Exons und 7 Introns. Bisher ist der Nachweis von drei murinen VEGF-Isoformen gelungen, welche weitestgehend den humanen Isoformen entsprechen, aber je eine Aminosäure weniger besitzen: VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ und VEGF₁₈₈. Die vorherrschende Isoform im murinen Myokard ist das VEGF₁₈₈ (Ladoux und Frelin, 1993). Im Herzmuskel des Schweines konnten Sharma et al. (1995) zwei VEGF-Isoformen identifizieren, die- wie beim Nagetier- je eine Aminosäure kürzer sind als das entsprechende Protein beim Menschen: VEGF₁₂₀ und VEGF₁₆₄.

Die Expression des VEGF-Gens wird sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene reguliert. Als wichtiger Regulationsfaktor hat sich in vitro und in vivo der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) erwiesen. Minchenko et al. (1994) und Hashimoto et al. (1994) zeigten, dass die VEGF-Genexpression bei sinkendem pO_2 gesteigert wird, wobei der Hypoxie-induzierbare Faktor-1 (HIF-1) als vermittelnder Transkriptionsfaktor von zentraler Bedeutung ist (Forsythe et al., 1996).

Der Zunahme an VEGF-mRNA unter Hypoxie beruht jedoch nicht nur auf einer gesteigerten Transkription des Gens, sondern zu einem nicht geringen Anteil auch auf einer vermehrten Stabilität der mRNA (Ideka et al., 1995; Levy et al., 1996). Zudem wird die VEGF-mRNA unter hypoxischen Bedingungen mit besonders hoher Effizienz translatiert, so dass trotz einer generell verminderten Proteinsynthese der Zellen große Mengen VEGF-Protein gebildet werden (Banai et al., 1994).

Verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine bewirken eine Induktion der mRNA und die Freisetzung des VEGF-Proteins. Die Wachstumsfaktoren Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Epidermal Growth Factor (EGF) und Keratinocyte Growth Factor 1 (KGF 1) steigern die VEGF-mRNA-Expression (Frank et al., 1995), EGF und TGF- β fördern zudem die

Freisetzung von VEGF-Protein aus verschiedenen Zellen in Kultur (Goldman et al., 1993). Ebenfalls an Zellkulturen konnte die Induktion der VEGF-Expression durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Interleukin-1 α (IL-1 α) gezeigt werden, was auf ein Mitwirken dieser Faktoren in der entzündlichen Angiogenese hinweist (Ben-Av et al., 1995). Interleukin-6 (IL-6) induziert die VEGF-Expression (Cohen et al., 1996), wie auch das Protein Insulin-like Growth Factor (IGF-1) (Warren et al., 1996), welches außer auf die Transkription auch auf die VEGF-mRNA-Stabilität steigernd wirkt.

Im Rahmen entzündlicher Prozesse entstehende reaktive Sauerstoffspezies, wie etwa Superoxid oder Wasserstoffperoxid, führen in vitro und in vivo zu einer dosisabhängigen Erhöhung der VEGF-mRNA. Kuroki et al. (1996) konnten zeigen, dass dieser Effekt vor allem durch die Stabilisierung der VEGF-mRNA bedingt ist. Schließlich wiesen Li et al. (1997) nach, dass eine Dehnung des linken Ventrikelmyokards einen Anstieg der VEGF-mRNA im Muskelgewebe der linken und rechten Herzkammer bewirkt.

Die Wirkung des VEGF wird durch Rezeptoren der Tyrosinkinase-Familie vermittelt, die in ruhenden wie in proliferierenden Endothelzellen vorhanden sind: Fms Like Tyrosine Kinase-1 (Flt-1, VEGFR-1) und Kinase Domain Region (KDR)Rezeptor (VEGFR-2) (Ferrara und Gerber, 2001). Die Rezeptoren enthalten je eine intrazelluläre Tyrosinkinase-region, eine transmembranäre Region und im Extrazellulärraum sieben immunoglobulinähnliche Domänen. Nach Bindung von VEGF an den Rezeptor dimerisieren zwei Rezeptoren, und in der Zelle werden nach Autophosphorylierung des Rezeptors an Tyrosinresten weitere intrazelluläre Proteine durch Tyrosin-Phosphorylierung aktiviert. Die Expression der VEGF-Rezeptoren wird ebenfalls durch Hypoxie und durch das Protein VEGF selbst induziert.

VEGF und seine Rezeptoren sind schon während der Embryogenese für die Gefäßentwicklung von größter Bedeutung. Besonders deutlich wird dies in Versuchen mit Knock-out-Mäusen, bei denen gezielt ein Allel oder beide Allele funktionslos gemacht wurden. Der sich entwickelnde Embryo besitzt dann entweder ein funktionstüchtiges und ein funktionsloses Allel (heterozygoter (+/-))

Zustand in Bezug auf VEGF) oder zwei funktionslose Allele (homozygot negativer (-/-) Zustand in Bezug auf VEGF).

Fong et al. (1995) zeigten in Tierexperimenten, dass Flt-1^{-/-} homozygote Mäuse Gefäßanomalien aufweisen und zwischen dem 8. und 10. Tag in utero sterben. In Flk-1^{-/-} homozygoten Mäuseembryonen findet keine Vaskulogenese statt, es werden keine Blutinseln ausgebildet, und auch diese Tiere versterben in utero zwischen dem 8. und 10. Tag. Wie Ferrara et al. (1996) und Carmeliet et al. (1996) nachwiesen, führt schon die Inaktivierung nur eines VEGF-Allels zum intrauterinen Tod von Mäuseembryonen zwischen dem 11. und 12. Tag. Die Embryonen sind wachstumsretardiert und haben Entwicklungsanomalien an Gehirn, Herz, Aorta und an Gefäßsystemen verschiedener Organe. In Untersuchungen mithilfe der In-situ-Hybridisierung konnte festgestellt werden, dass in den heterozygoten Mäusen durchaus VEGF-mRNA zu finden war, die Menge aber wohl für eine normale Entwicklung nicht ausreichte. Andere proangiogenetische Moleküle können den Verlust eines einzigen VEGF-Allels nicht ausgleichen. Dass der Verlust nur eines VEGF-Allels zum Tod des Embryos führt, zeigt die große Bedeutung des VEGF für die Angiogenese. Gerber et al. (1999) fanden zudem in einer Studie mit Mäusen, denen in der Postnatalperiode ein löslicher, VEGF neutralisierender Rezeptor (mFlt(1-3)-IgG) verabreicht wurde, eine erhöhte Mortalität, Wachstumseinschränkung und Beeinträchtigung der Organentwicklung sowie einen erhöhten apoptotischen Index in Endothelzellen. Diese Ergebnisse verdeutlichten zudem die Wirkung des VEGF als wichtiger „survival factor“ auch nach der Geburt.

Im Rahmen der enchondralen Ossifikation ist VEGF über die Induktion der Gefäßeinsprossung an der Regulation des Wechselspiels von Knorpelresorption und Knochenbildung beteiligt. Wie Midy et al. (1994) zeigten, bilden Osteoblasten Flt-1 und sind durch VEGF chemotaktisch beeinflussbar. Keratinozyten in der heilenden Wunde exprimieren VEGF-mRNA. VEGF ist ein wichtiger Faktor für die zyklische Gefäßneubildung in den inneren weiblichen Geschlechtsorganen der Ratte und für die Entwicklung und endokrine Funktion des Corpus luteum im Ovar von Ratte, Maus und Primaten (Phillips et al., 1990; Ravindranath et al., 1992; Cullinan-Bove et al., 1993; Shweiki et al., 1993).

VEGF spielt aber nicht nur bei physiologischen Vorgängen eine große Rolle, sondern auch im Rahmen verschiedener Erkrankungen. So findet man in den Zellen vieler Tumoren eine stark erhöhte VEGF-mRNA-Konzentration. Der Tumor selbst induziert die Aktivierung des VEGF-Promotors in den Tumorzellen und in Zellen des Gewebes, das den Tumor umgibt. Wie entscheidend der Einfluss des VEGF beim Erhalt und Wachstum von Tumoren ist, zeigen zwei Versuche mit der Verabreichung von VEGF-neutralisierenden Antikörpern. Borgström et al. (1996) fanden in ihren Studien eine Einschränkung des Tumorwachstums nach Antikörper-Gabe, Yuan und Kollegen (1996) konnten eine Permeabilitätsverminderung und Regression der Tumorgefäße nachweisen.

Im Rahmen des Diabetes mellitus und bei der Retinopathie des Frühgeborenen wird eine vermehrte Gefäßneubildung im Auge beobachtet, welche eine schwere Schädigungen des Auges durch Glaskörpereinblutungen und Retinaablösung nach sich ziehen und letztlich zu einer Erblindung führen kann. Okamoto et al. (1997) konnten im Tiermodell an transgenen Mäusen einen Zusammenhang zwischen intra- bzw. subretinaler Neovaskularisation und intraretinaler VEGF-Überexpression nachweisen. Dementsprechend bewirkte die intraokuläre Gabe eines VEGF-neutralisierenden Antikörpers in Versuchen von Adamis und Kollegen (1996) eine Hemmung der Gefäßneubildung. Die wichtige Rolle von VEGF in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis, welche mit einer Gefäßneubildung einhergeht, wurde 1994 von Koch und Mitarbeitern beschrieben.

Das Protein VEGF hat also im Rahmen der physiologischen und pathologischen Angiogenese eine entscheidende Funktion. Der eingangs erwähnte Nachweis einer Angiogenese nach TMLR beim Schwein lässt die Vermutung zu, dass die Laseranwendung Einfluss auf die Bildung von VEGF in diesem angiogenetischen Prozess haben könnte.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der TMLR auf die intramyokardiale VEGF-Expression. Die Untersuchungen wurden am porcinen Modell der akuten Myokardischämie durchgeführt. Um gezielt einen Kurzzeiteffekt der TMLR nachweisen zu können, wurde der

Observationszeitraum auf die ersten sechs Stunden nach der Laserbehandlung begrenzt. Innerhalb dieser Zeitspanne sollte untersucht werden, ob sich der intramyokardiale Gehalt an VEGF-mRNA und -Protein nach TMLR ändert und ob dabei gesundes Herzmuskelgewebe anders auf die Laserung reagiert als ischämisches Gewebe. Zudem sollte geprüft werden, ob nach TMLR der intramyokardiale pO_2 durch Reperfusion ansteigt und ob sich die Laserbehandlung auf die Vitalität der ischämischen Myozyten auswirkt.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien oder Reagenzien bei Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) im höchstmöglichen Reinheitsgrad erworben.

2.2. Versuchstiere

Nach Genehmigung durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein (Aktenzeichen: x 330a-7224/.12-6 vom 27.11.1996) wurden die Untersuchungen an insgesamt 21 etwa einjährigen Schweinen der Rasse „Deutsches veredeltes Landschwein“ durchgeführt. Die Tiere wurden im hiesigen Tierstall aufgezogen, ihr Körpergewicht betrug durchschnittlich 44,8 +/- 6,6 kg. Die Versuchsreihe stand unter der Aufsicht des Tierschutzbeauftragten der Medizinischen Universität zu Lübeck, Herrn Dr. med. vet. R. Noell.

2.3. Versuchsdurchführung

Die Operationen wurden durchgeführt von Herrn Dr. med. E.-G. Kraatz, Herrn Dr. med. M. Misfeld und Frau Dr. med. C. Schmidtke. Betreuender Anästhesist war Herr Dr. med. S. Elefteriadis.

Die Tiere wurden mit Ketamin 250 mg s.c., 2 % Rompun s.c., Midazolam 15 mg s.c. und Atropin 1 mg s.c. prämediziert. Die Einleitung der Anästhesie erfolgte durch intravenöse Bolusapplikation von je 50 mg Ketamin und Disoprivan. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie erhielten die Tiere im weiteren Verlauf eine Kombination von Isofluran 0,8 %, Ketamin 100 mg/h i.v., Disoprivan 500 mg/h i.v. und Pancuronium 8 mg/h i.v.. Die mechanische Beatmung der Tiere wurde mit dem Beatmungsgerät Sulla (Dräger, Lübeck) durchgeführt (Beatmungsparameter: $FiO_2 = 1,0$ flow 6 l/min, optimaler $pCO_2 = 38-42$ mmHg). Arterieller Blutdruck und zentraler Venendruck als hämodynamische Parameter unterlagen einer ständigen Kontrolle durch Zugänge über die Arteria femoralis und die Vena jugularis interna. Kristalloide Lösungen dienten als Volumenersatz (Ringer Lactat, Fresenius, Bad Homburg). Nach medianer Sternotomie und

Eröffnung des Herzbeutels wurde das Herz mit Thoraxspannern exponiert. Prophylaktisch wurde den Tieren 300 mg des Antiarrhythmikums Amiodaron i.v. verabreicht. Nun erfolgte die Sondenplatzierung (Clark Type, Licox, GMS, Kiel-Mielkendorf) für die Messung des pO_2 in verschiedenen Arealen des linksventrikulären Myokards unter Lagekontrolle durch direkte Echokardiographie. Das linksventrikuläre Myokard wurde in zwei Bereiche eingeteilt, in ein späteres ischämisches Infarktgebiet und ein späteres gesundes Kontrollareal (s. Abb. 2). Durch Okklusion von drei bis vier Diagonalästen des Ramus interventricularis anterior mit Hilfe von Ligaturdrähten wurde ein Infarkt erzeugt (s. Abb. 1). Das Erreichen der kompletten Ischämie in diesem Gebiet wurde durch ein Absinken des pO_2 von ursprünglich 55-65 mmHg auf Werte von 2-0 mmHg gesichert. Höchstens 8 Minuten nach der Ligatur erfolgte die TMLR mit einem CO_2 -Hochleistungslaser (PLC Medical Systems, Franklin, MA, USA). Dabei wurden sowohl in das Infarktgebiet als auch in das Kontrollareal des linksventrikulären Myokards Laserkanäle in einem Abstand von etwa 1 cm gesetzt (s. Abb.1).

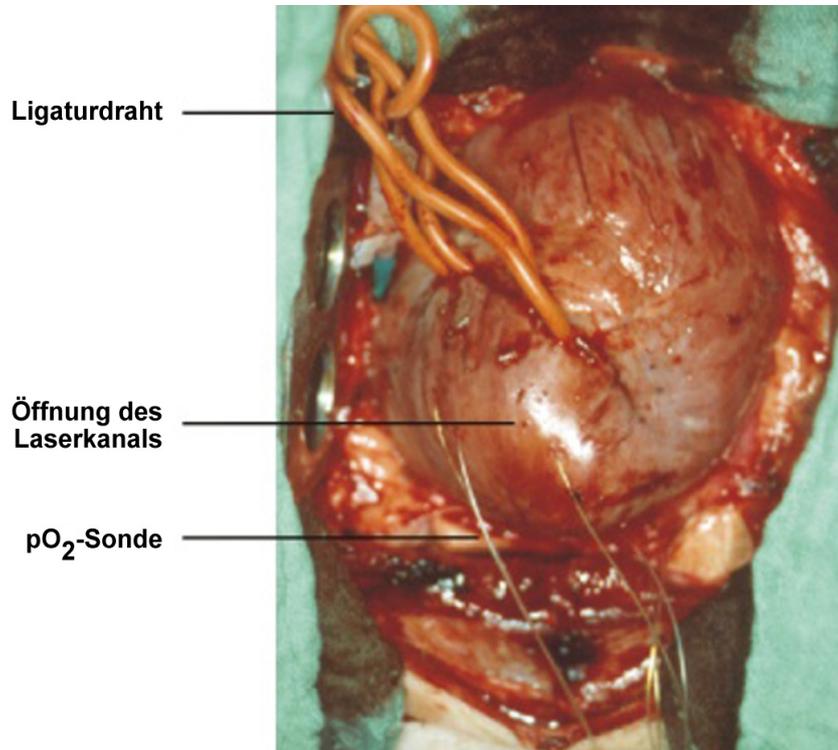


Abb. 1 : Das porcine Herz in situ während Versuchsdurchführung. Nach Sondenplatzierung zur pO_2 -Messung erfolgte die Ischämieinduktion mittels Ligaturdraht. Im Infarktgebiet sind Öffnungen der Laserkanäle sichtbar.

Es ergaben sich auf diese Weise die vier Myokardareale: nicht ischämisch/keine TMLR, nicht ischämisch/TMLR, ischämisch/keine TMLR und ischämisch/TMLR (s. Abb. 2).

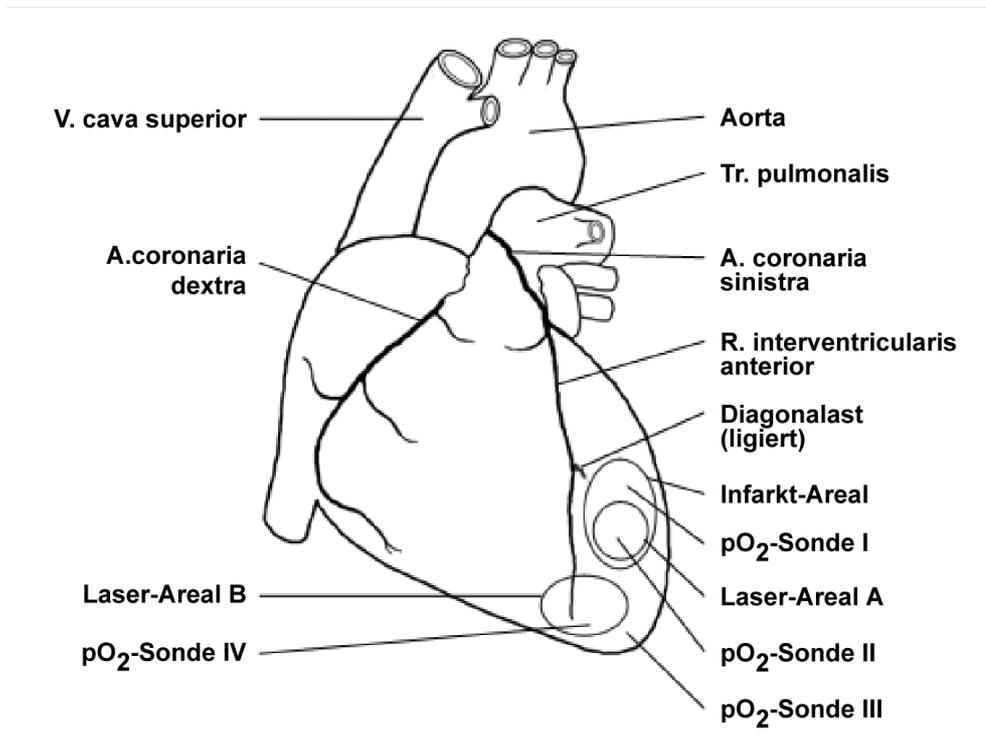


Abb. 2: Die schematische Darstellung des porcinen Herzens während der Versuchsdurchführung; Lokalisation der Biopsieareale.

Die Messung des pO_2 erfolgte in den vier Myokardarealen zunächst vor der Gefäßligatur, dann unmittelbar nach der Ligatur, zum Zeitpunkt der TMLR, 15, 30 und 60 Minuten nach TMLR, darauf stündlich bis 6 Stunden nach TMLR. Im weiteren Verlauf wurden aus allen vier Herzmuskelgebieten Gewebeproben für histologische und molekularbiologische Untersuchungen entnommen. Die Biopsatentnahme für die histologischen Untersuchungen im hiesigen Institut für Anatomie erfolgte ebenfalls zunächst vor Gefäßligatur, dann 30 Minuten nach TMLR, sowie 3 und 6 Stunden nach TMLR. Das Probenentnahmeschema für die molekularbiologischen Untersuchungen im Institut für Physiologie ist in Tab. 1 dargestellt. Sechs Stunden nach der TMLR wurden die Tiere in Narkose durch intramyokardiale Injektion von 50 ml Kaliumchloridlösung getötet.

Biopsat- nummer	Zeit nach TMLR	Ischämie	TMLR
1	vor Ischämie und TMLR	—	—
2	1 Stunde	—	—
3	1 Stunde	—	TMLR
4	1 Stunde	Ischämie	—
5	1 Stunde	Ischämie	TMLR
6	6 Stunden	—	—
7	6 Stunden	—	TMLR
8	6 Stunden	Ischämie	—
9	6 Stunden	Ischämie	TMLR

Tab. 1: Schema der Gewebeprobenentnahme für die Untersuchung des VEGF-Gehaltes

Die hier dargestellten Versuche weisen sehr kleine Fallzahlen auf (n = 5 für die Westernblot-Proteinuntersuchungen und n = 6 für die RT-PCR-Untersuchungen). Erläuternd sei angemerkt, dass es wegen des geringen Volumens der Biopsate nicht möglich war, die mRNA- und die Proteinkonzentration in ein- und derselben Probe zu bestimmen. Die Stanzengröße und die Anzahl der während der Operation entnommenen Gewebeproben waren limitiert durch die Gefahr einer zu starken Schädigung des Myokards. Es konnten also von einem Schwein nur entweder der RNA- oder der Proteingehalt bestimmt werden.

Zwei Tiere verstarben vorzeitig (eines durch maligne Hyperthermie, eines aufgrund von Herzrhythmusstörungen), und von vier Tieren waren durch den Versuchsablauf bedingt nicht alle Gewebeproben entnommen worden. Bei vier weiteren Tieren war in einigen Biopsaten die mRNA degradiert, in diesen Proben konnten keine β -Aktin-mRNA nachgewiesen werden. Von einer Auswertung der weiteren Proben dieser Tiere wurde abgesehen.

2.4. RT-PCR-Versuche

2.4.1. Isolation von Gesamt-RNA mit Phenol:Chloroform:Isoamyl

Die RNA-Extraktion erfolgte nach der sauren Phenol-Chloroform-Methode von Chomczynski und Sacchi (1987), deren Prinzip auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Zellbestandteile in organischen oder wässrigen Lösungsmitteln beruht. Die Proteine lösen sich in dem organischen Lösungsmittel Phenol, während die RNA nur in der wässrigen Phase löslich ist. Die DNA ist bei saurem pH zum Teil wegen ihrer Histonproteine ebenfalls in der organischen Phase löslich, zum Teil verbleibt sie wegen der negativen Ladung der Phosphatgruppen an der Phasengrenze zwischen wässriger und organischer Phase.

Der erste Schritt der RNA-Gewinnung bestand in der Zerkleinerung der Myokardbiopsate mit einem Gewebehomogenisator (Ultra-Turrax T25-Homogenisator, IKA®-Labortechnik, Staufen i. Br.) in 700 µl Guanidiniumthiocyanat (GTC)-Lösung (4 M GTC, 2 M Natriumacetat, β-Mercaptoethanol 0,1 vol/vol % in PBS). Durch anschließendes Zentrifugieren bei 12000 Upm (entspricht 13000 x g) für 10 Minuten bei 4 °C wurde ein Überstand gewonnen. Zu diesen 700 µl Myokardgewebehomogenisat wurden 70 µl Natriumacetatpuffer (pH 4,0), 560 µl Phenol (pH 4,3) und 280 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Fertiglösung: Phenol 50 %, Chloroform 48 %, Isoamylalkohol 2 %) hinzugegeben, das Gemisch zur Phasentrennung für 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 12000 Upm für 20 Minuten zentrifugiert (entspricht ca. 13000 x g). Die wässrige Phase wurde mit einem gleichen Volumen Isopropanol gemischt und der Ansatz für 1 Stunde bei -20 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 12000 Upm für 20 Minuten wurde das Präzipitat in 300 µl GTC und 300 µl Isopropanol abermals für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Das durch anschließende Zentrifugation bei 12000 Upm für 20 Minuten gewonnene RNA-Präzipitat wurde mit 500 µl 75 %-Ethanol für 15 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und dann für 15 Minuten bei 12000 Upm zentrifugiert. Abschließend wurde das RNA-Präzipitat in 20 µl 0,1 %-Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde durch Absorptionsmessung im Photometer (Spektrometer, SLT Labinstruments, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.4.2. Reverse Transkription

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RTase; Promega, Mannheim) wurde eine der mRNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Der Gesamt-RNA (1 µg) aus dem Myokardbiopsat wurden 2,5 µg Oligo-Desoxythymidin (Oligo-dT; MWG-Biotech, Ebersberg) als Startermoleküle hinzugefügt, und sie wurde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 14,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 15 Minuten auf 68 °C erwärmt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzufalten, und danach für 15 Minuten auf Eis gestellt, so dass eine erneute Bildung der Sekundärstruktur verhindert wurde. Während des Abkühlens lagerten sich die Oligo-dT-Moleküle an die mRNA. Nach Zugabe des Probenansatzes (5 µl RT-Puffer (MWG-Biotech, Ebersberg), 5 µl desoxy-Nukleotidtriphosphat-Basen (dNTP; TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japan) und 0,5 µl RT) wurde das Gemisch in einem Thermocycler (DNA Thermal Cycler, PE Biosystems, Foster City, California, USA) zunächst für 45 Minuten bei 42 °C, dann für 45 Minuten bei 52 °C zur DNA-Synthese inkubiert. Die Reaktion wurde durch ein zehninütiges Aufkochen der Proben beendet.

Um eine Kontamination des Reaktionsgemisches mit genomischer DNA, DNA aus vorhergehenden PCRs oder Plasmid-DNA auszuschließen, wurde bei allen Experimenten eine Negativkontrolle ohne zugesetzte RNA mitgeführt.

2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes unter Einwirkung einer hitzestabilen Polymerase. Das zu amplifizierende DNA-Fragment wird durch zwei Primerbindungsstellen festgelegt. Der auf diese Weise eingegrenzte Bereich wird im Laufe der PCR exponentiell vervielfältigt. In jeder PCR wurden 0,2 mM eines jeden dNTP-Nukleotids als DNA-Bausteine, MgCl₂ 1,5 mM (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe), 10x PCR-Puffer 5 µl (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe), Taq-Polymerase 5 U (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe), 0,4 mM eines jeden Primers (MWG-Biotech, Ebersberg) und 1 µl cDNA-Lösung eingesetzt. Der Ansatz wurde durch Zugabe von Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht und mit 3 Tropfen Öl überschichtet, um eine Verdunstung während der PCR zu vermeiden. Nach einem einmaligen Erhitzen für 3 Minuten auf 94 °C zur Denaturierung erfolgten die Zyklen der PCR-Amplifikation (TRIO-

Thermoblock, Biometra, Göttingen): Im ersten Schritt eines Zyklus wurde der Ansatz für 1 Minute auf 92 °C erwärmt, so dass sich die doppelsträngige DNA in Einzelstränge trennte. Die Temperatur wurde nun für eine Zeitspanne von 90 Sekunden auf die sogenannte Annealing-Temperatur gesenkt, die Primermoleküle lagerten sich den komplementären DNA-Abschnitten an. Dabei war die Annealing-Temperatur für jedes Primerpaar spezifisch (s. Tabelle im Anhang). Anschließend wurde der Ansatz für 3 Minuten auf 72 °C, die optimale Reaktionstemperatur der Polymerase, erhitzt. Nach 30-37 Zyklen bildete ein einzelner Elongationsschritt bei einer Temperatur von 72 °C für 7 Minuten den Abschluss der Amplifikation.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 2 %-Agarosegel (2 g Agarose (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe)/100 ml Trisacetat- Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Puffer, TAE-Puffer: 1 M Trisbase, 0,5 M EDTA in A. bidest.) und Anfärbung mit Ethidiumbromid (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) wurden die PCR-Fragmente unter UV-Licht gemeinsam mit einem in der Elektrophorese mitgeführten 100 bp-DNA-Standard (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) sichtbar gemacht und fotografiert (Transilluminator E.A.S.Y. 429K, Herolab, Wiesloch).

Zur Kontrolle der RNA-Qualität und um RNA-Konzentrationsschwankungen auszuschließen wurde neben der VEGF-mRNA auch die mRNA für β -Aktin amplifiziert. Die β -Aktin-mRNA eignet sich gut als Kontrolle, da sie das Transkript eines weitgehend konstant exprimierten sogenannten Housekeeping-Gens ist.

2.4.4. VEGF-Primerwahl

Die durch alternatives Spleißen aus einem gemeinsamen Vorläufer entstandenen Isoformen der VEGF-mRNA im Myokardgewebe enthalten, bis auf das VEGF₁₈₈ und VEGF₂₀₅, nicht alle Exons des VEGF-Gens. Dem VEGF₁₂₀ fehlen die Exons 6 und 7, der VEGF₁₆₄-Isoform fehlt das Exon 6 (s. Abb. 3). Will man in einer PCR nur eine bestimmte Isoform exponentiell vervielfältigen, wählt man den reversen Primer so, dass er an eine Basenabfolge bindet, welche nur in der gesuchten Isoform zu finden ist, wie etwa die aneinandergrenzenden Abschnitte zweier Exons, die einzig in der gesuchten Isoform in dieser Konstellation vorliegen. Für die Primerwahl wurden die bekannten Sequenzen

des porcinen VEGF genutzt. Lagen bezüglich einer VEGF-Isoform noch keine Sequenzierungsergebnisse vor, so wurde die entsprechende bekannte Sequenz des humanen VEGF verwendet.

Die Primer-Tabelle ist im Anhang angefügt.

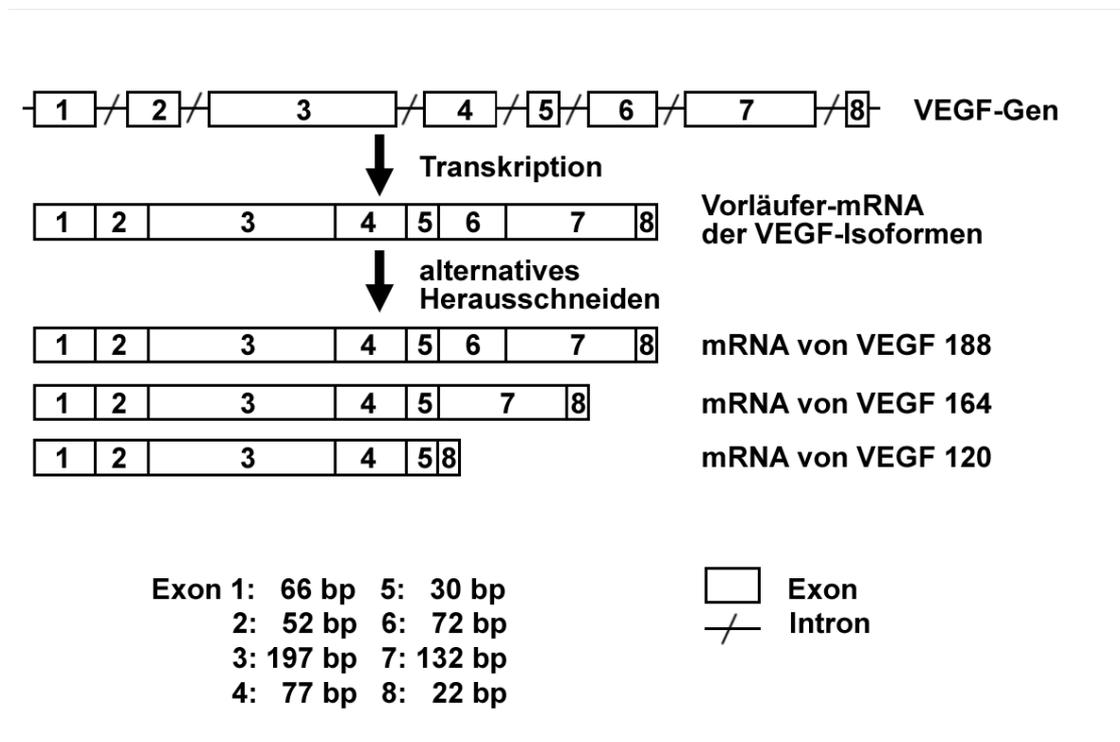


Abb. 3: VEGF-Gen, Transkription und alternatives Spleißen. Die Entstehung der VEGF-Isoformen durch alternatives Herausschneiden aus der Vorläufer-mRNA: VEGF₁₆₄ fehlt Exon 6, VEGF₁₂₀ fehlen Exon 6 und 7, und VEGF₁₈₈ und VEGF₂₀₅ unterscheiden sich in ihrer Länge um 17 Aminosäuren, die VEGF₂₀₅ mehr besitzt und die in einem zusätzlichen Exon kodiert sind.

2.4.5. Kompetitorsynthese

Ein Kompetitor ist ein DNA-Fragment beliebiger Basensequenz, das dieselben Primerbindungsstellen besitzt wie das zu quantifizierende DNA-Fragment und dessen Länge zwar nicht der des DNA-Fragments entspricht, aber nicht wesentlich größer oder kleiner ist. Die Herstellung des Kompetitors erfolgte durch eine PCR, in welcher 10 pg eines neutralen DNA-Fragmentes (INOS-Fragment (Induzierbare Stickstoff-Synthetase), Länge 580 bp; Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg), sowie zwei zusammengesetzte Primer verwendet wurden (5'VEGF comp, bzw. 5'β-Aktin comp als Forward-Primer und 3'VEGF₁₆₄ comp, bzw. 3'β-Aktin comp als reverse Primer). Die

Basenabfolge dieser Primer war zu einer Hälfte den Basen komplementär, die den späteren Kompetitor-Bereich auf dem Clontech-Fragment eingrenzen, und zur anderen Hälfte war sie den späteren Primerbindungsstellen komplementär. Der zwischen diesen Primerbindungsstellen liegende DNA-Abschnitt wurde vervielfältigt und wies am 5'- und 3'-Ende die zukünftigen, für die VEGF-Isoform spezifischen Primerbindungsstellen auf.

Die PCR bestand aus 30 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 60 °C (VEGF-Kompetitor), bzw. 59 °C (β -Aktin-Kompetitor). Die erwarteten Fragmentlängen von 367 bp für den VEGF-Kompetitor und 262 bp für den β -Aktin-Kompetitor wurden bestätigt durch elektrophoretische Auftrennung auf einem 2 %igem Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Aus PCR-Ansätzen, die nach Elektrophorese unter UV-Licht starke Signale aufwiesen, wurde das Kompetitor-Fragment mit Hilfe des Wizard PCR Purification Preps-Systems (Promega, Mannheim) wie vom Hersteller empfohlen gewonnen.

2.4.6. Quantitative PCR

Das Prinzip der quantitativen PCR beruht auf der Tatsache, dass von zwei DNA-Fragmenten mit gleichen Primerbindungsstellen in demselben PCR-Ansatz dasjenige stärker amplifiziert wird, welches in höherer Ausgangskonzentration vorliegt. Über eine Verdünnungsreihe, deren Lösungen das Kompetitor-DNA-Fragment in bekannter Konzentration enthalten, kann man Rückschlüsse auf die unbekannte Konzentration des gesuchten Proben-DNA-Fragments ziehen (Fandrey und Bunn, 1993). Die PCR-Fragmente werden anschließend durch Elektrophorese auf dem Agarosegel aufgetrennt, und man erkennt, dass die Bande des Kompetitorprodukts (Fragmentlängen: 367 bp für den VEGF₁₆₄-Kompetitor bzw. 262 bp für den β -Aktin-Kompetitor) zunächst stärker ist als die PCR-Produkte der Proben-DNA. Entsprechend der absteigenden Konzentration der Kompetitor-DNA wird diese Bande jedoch immer schwächer, während die Bande der Proben-DNA an Intensität zunimmt, bis Proben-DNA- und Kompetitor-DNA-Bande gleich stark sind. Hier entsprechen sich die Konzentration des Kompetitors und der Proben-DNA (s. Abb. 4 und Abb. 5).

Die quantitative PCR wurde unter denselben Bedingungen wie die oben beschriebene PCR durchgeführt. Zusätzlich zu 1 µl cDNA enthielt der Ansatz für die quantitative PCR 1 µl der Kompetitor-DNA in bekannter Konzentration.

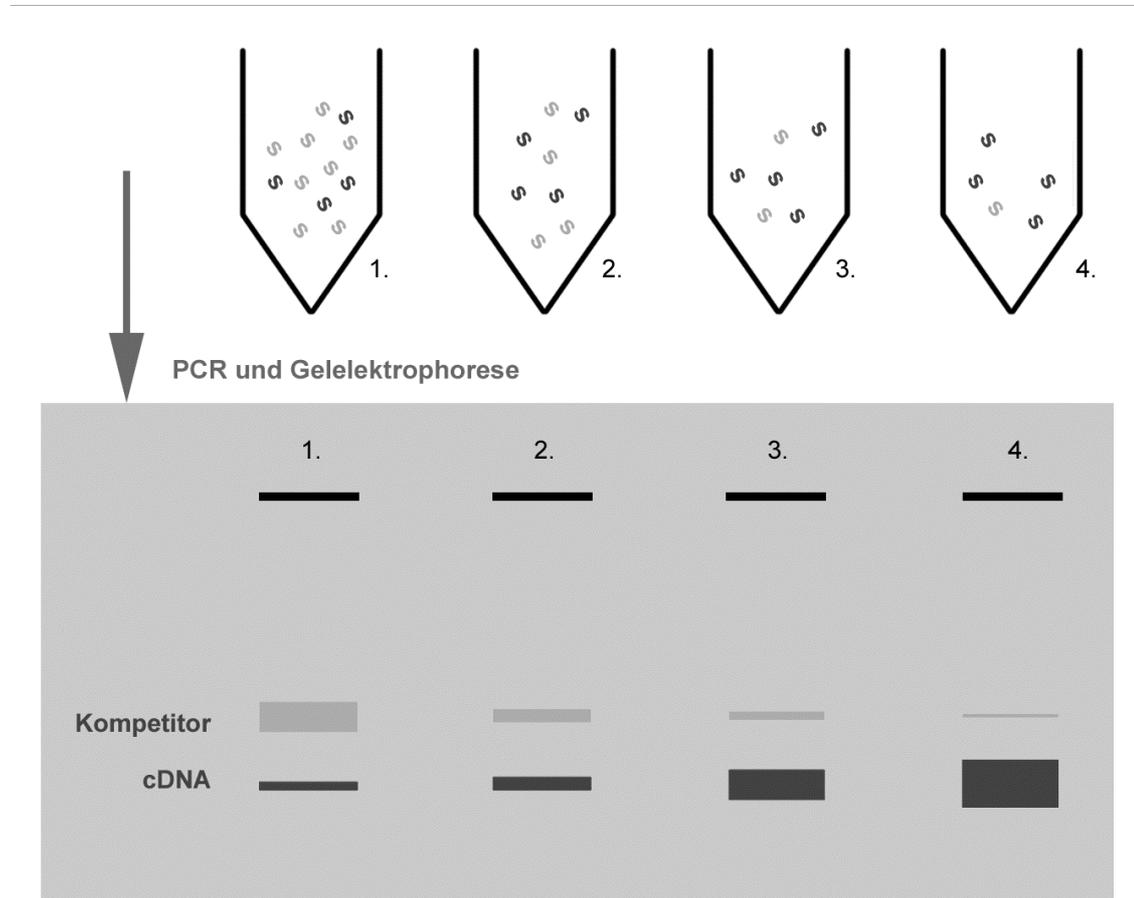


Abb. 4: Das Prinzip der quantitativen PCR. Von der VEGF-cDNA (Proben-DNA, dunkelgrau dargestellt) ist in jedem Ansatz die gleiche Menge vorhanden, die Kompetitor-DNA (hellgrau dargestellt) wird in einer 2:1-Verdünnungsreihe eingesetzt. In Ansatz 2 entsprechen sich die Konzentrationen an VEGF-cDNA und an Kompetitor-DNA, beide Fragmente werden gleichermaßen vervielfältigt und ergeben bei der Gelelektrophorese gleich starke Banden.

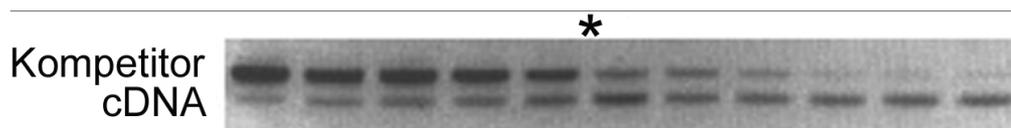


Abb. 5: Das Ergebnis einer quantitativen PCR. Die obere Bande zeigt die Kompetitorverdünnungsreihe in absteigender Konzentration. Die untere Bande repräsentiert die DNA, deren Konzentration es herauszufinden gilt. Bei der Markierung (*) entsprechen sich die Konzentrationen von Kompetitor- und Proben-DNA vor Beginn der PCR.

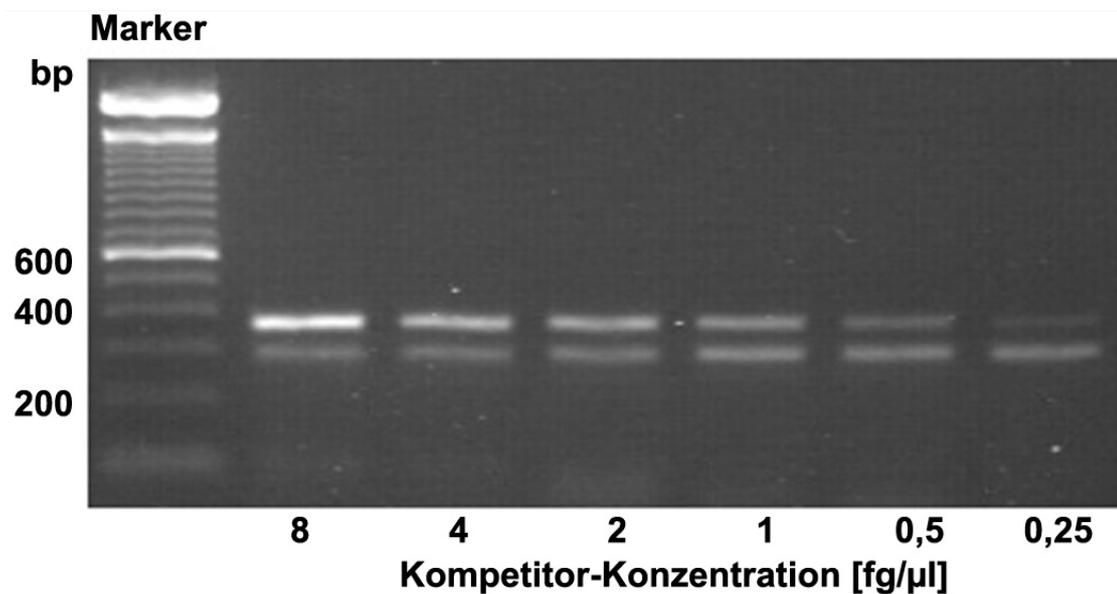


Abb. 6: Die Bestimmung des VEGF₁₆₄-cDNA-Gehalts durch quantitative PCR. Die obere Bande ist die des Kompetitorfragments (Länge 367 bp), die untere ist die VEGF₁₆₄-Bande (Fragmentlänge 289 bp).

2.5. Western-Blot

Beim Western-Blot, einer Methode zum semiquantitativen Proteinnachweis, wird ein Proteingemisch auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und das gesuchte Protein mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers und eines entsprechenden Detektionssystems nachgewiesen.

Zur Proteingewinnung aus den Myokardproben wurden die Biopsate in einen Lysepuffer (Glycerol 10 %, Sodiumdilaurylsulfat (SDS) 5 %, Dithiothreitol (DTT) 0,5 %, 1 M Trisbase, Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin (jeweils 100 μg/ml), Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) 1 %, 8 M Harnstoff in A. bidest.) überführt und mit dem Gewebehomogenisator zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenisat auf Eis gelagert und bei 3500 Upm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (entspricht 4500 x g), um den Überstand von Geweberesten zu trennen. Der so gewonnene Überstand wurde nun zur Verbesserung der Proteinfällung fünfmal für 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Sonifier B-12 Ultraschallgerät, Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA). Die anschließende Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte im Spektrometer (SLT Labinstruments, Crailsheim) mit der Methode nach Bradford (Biorad,

München) bei einer Wellenlänge von 594 nm. Durch Zugabe des entsprechenden Volumens an Lysepuffer wurde daraufhin in allen Homogenisaten eine gleiche Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. 50 µl des Homogenisats wurden mit dem gleichem Volumen des Probenpuffers (0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), Glycerol 20 %, 10 % SDS in A. bidest., 0,5 % Bromphenolblau 5 %, Mercaptoethanol 5 %, 1 M DTT in A. bidest.) vermischt, für 10 Minuten auf 100°C erhitzt und auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel durch Anlegen einer Spannung von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt (Elektrodenpuffer: 1 M Trisbase, Glycin 6,6 %, 20 % SDS in A. bidest.; pH 8,3). Dabei wurde zusätzlich als Standardmarker ein Gemisch von Proteinen bekannter molekularer Massen (Full Range Rainbow Marker, Amersham, Braunschweig) mitgeführt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine von dem Gel elektrophoretisch (Trans-Blot SD Blotmaschine, Biorad, München) auf eine eiweißaffine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL-Nitrocellulosemembran, Amersham, Braunschweig) übertragen (Blotpuffer: Trisbase 1 M, Glycin 0,3 %, Methanol 19,7 %, in A. bidest.). Nach 30minütigem Spülen der Membran mit Waschpuffer (Na_2HPO_4 8,5 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 3 mM, mit H_3PO_4 auf pH 7,3 eingestellt), der alle 10 Minuten gewechselt wurde, erfolgte die Anfärbung der an die Membran gebundenen Proteine mit Ponceau-S-Lösung zur Kontrolle einer gleichmäßigen und vollständigen Übertragung. Nun wurde die Membran für 30 Minuten mit dem Waschpuffer gespült und dann in Trockenmilchlösung (5 % Trockenmilch in PBS) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Proteine der Trockenmilch banden an die noch nicht besetzten Stellen der Membran, so dass der Antikörper selbst nicht unspezifisch an der Membran haften konnte. Am folgenden Tag wurde die Membran abermals für 30 Minuten gespült und für 90 Minuten bei Raumtemperatur in einer Lösung inkubiert, die einen Antikörper gegen das gesuchte Protein enthielt. Nach 30minütigem Waschen wurde die Membran in einer weiteren, den zweiten Antikörper enthaltenden Lösung für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundär-Antikörper war gegen das Fc-Fragment des Primär-Antikörpers gerichtet und mit einem Enzym, der Meerrettich-Peroxidase, verbunden. Die Membran wurde wieder für 30 Minuten gespült und anschließend für 1 Minute mit Enhanced Chemoluminescence (ECL-)-Lösung (Amersham, Braunschweig) überschichtet, die den Stoff Luminol

enthielt. Unter Einwirkung der Meerrettich-Peroxidase wurde Wasserstoffperoxid verbraucht, gleichzeitig wurde Luminol in sein Aminophthalat-Ion überführt. Dieses Ion besaß lumineszierende Eigenschaften, die zur Detektion des gesuchten Proteins mittels Röntgenfilm genutzt wurden. Über die Intensität der Banden konnten Rückschlüsse auf die Mengenverhältnisse des Proteins in verschiedenen Proben gezogen werden. Für die VEGF-Detektion wurde als Primär-Antikörper ein polyklonaler Antikörper vom Kaninchen (Anti-hVEGF; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg; 1:100 in PBS verdünnt) und als sekundärer Antikörper der Anti-rabbit HRP (Dianova, Hamburg; 1:30000 in PBS) verwendet. Die β -Aktin-Detektion erfolgte mit dem Primär-Antikörper Anti- β -Aktin von der Ziege (Santa Cruz Biotechnology; 1:200 in PBS verdünnt) und als Sekundär-Antikörper der Anti-goat HRP (Chemicon, Temecula, USA; 1:5000 in PBS verdünnt).

2.6. Auswertung und Statistik

Die RT-PCR-Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardfehler angegeben. Zur Abschätzung der Signifikanz der RNA- und Proteinkonzentrationsunterschiede wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse mit dem Random-Faktor „Tiernummer“ und den festen Faktoren Ischämie (ja/nein), Laser (ja/nein), Zeit (1 h/6 h) durchgeführt. Die Quotienten VEGF-Konzentration/ β -Aktin-Konzentration aus den PCR-Versuchen wurden nach logarithmischer Transformation berechnet. $P < 0,05$ wurde als signifikant befunden. Da beim Western-Blot als semiquantitativem Verfahren zum Proteinnachweis die Bandenstärke keine uneingeschränkte Aussage über die Proteinmenge in einer Probe erlaubt, wurde hier– wie beim Western-Blot üblich– eine Trendbeschreibung durchgeführt. Dazu wurden die Blots von mir und einer weiteren, nicht mit Details des Versuchsablaufs vertrauten Person beurteilt hinsichtlich der Stärke der einzelnen Banden a) im Vergleich zur Referenzbande und b) im Vergleich untereinander: Ischämie/keine Ischämie, TMLR/keine TMLR und Bandenstärke nach einer Stunde/nach sechs Stunden.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit ist es mir trotz des komplexen Versuchsaufbaus und der komplizierten Methodik gelungen, intakte RNA und Proteine zu isolieren und Genexpression qualitativ und quantitativ nachzuweisen.

3.1. RT-PCR-Vorgehen

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die mRNA von VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ und VEGF₁₈₈ im porcinen Myokard dargestellt.

Zudem konnte die mRNA des konstitutiv gebildeten Proteins β -Aktin und des Transkriptionsfaktors HIF-1 α nachgewiesen werden.

Weiterhin erfolgte die Herstellung der in der quantitativen PCR eingesetzten Kompetitoren in einer qualitativen PCR.

Durch quantitative PCR ließen sich Aussagen über den VEGF- und β -Aktin-mRNA-Gehalt im Myokard treffen.

3.1.1. VEGF-Übersichts-PCR

In einer Übersichts-PCR wurde die mRNA der verschiedenen VEGF-Isoformen im porcinen Myokard dargestellt. Es zeigte sich die Bande des VEGF₁₈₈ bei etwa 500 bp (errechnete Fragmentlänge: 502 bp), die stärkste Bande des VEGF₁₆₄ bei etwa 430 bp (errechnete Länge: 430 bp) und die schwache Bande des VEGF₁₂₀ bei ungefähr 300 bp (errechnete Länge: 298 bp) (s. Abb. 7).

Wie in der Einleitung erwähnt, ist in der Literatur der Nachweis der drei Isoformen VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ und VEGF₁₈₈ im murinen Myokard beschrieben (Ladoux und Frelin, 1993). Die Isoform VEGF₁₈₈ wird im Nagetierherzen am stärksten exprimiert. In Anlehnung an das murine Tiermodell ging ich vorerst davon aus, eine entsprechende Konstellation der exprimierten VEGF-Isoformen auch im porcinen Myokard vorzufinden. Es war daher zunächst geplant, den Schwerpunkt der Untersuchungen auf die VEGF₁₈₈-Isoform zu legen. In diesem Zusammenhang gelang mir die Sequenzierung des Exon 6 des porcinen VEGF-Gens (s. Abschnitt 3.3.). Im Verlauf der Arbeit wurde jedoch deutlich, dass im Gegensatz zum murinen Herzen- im porcinen Myokard die Isoform VEGF₁₆₄

vorherrschend ist (s. Abb. 7). Dieses Ergebnis war unerwartet und bislang in der Literatur nicht beschrieben. Der neuen Erkenntnis entsprechend lag der Schwerpunkt der folgenden Untersuchungen auf der Isoform VEGF₁₆₄.

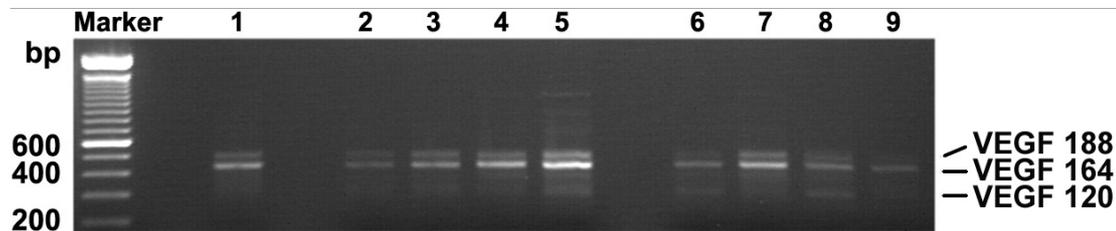


Abb. 7: Die Darstellung der VEGF-mRNA-Isoformen durch PCR. Die oberste Bande entspricht der VEGF₁₈₈-cDNA, die folgende und stärkste Bande repräsentiert die VEGF₁₆₄-cDNA, die unterste und schwächste Bande die VEGF₁₂₀-cDNA.

Probenbezeichnung:

Probe 1: Referenz; Probe 2: keine Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 3: keine Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 4: Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 5: Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 6: keine Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 7: keine Ischämie + TMLR, nach 6 Std.; Probe 8: Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 9: Ischämie + TMLR, nach 6 Std.

3.1.2. Spezifische PCRs der VEGF-Isoformen

In verschiedenen, für die jeweilige VEGF-Isoform spezifischen RT-PCRs konnte das Ergebnis der Übersichts-PCR bestätigt werden. In den spezifischen PCRs für VEGF₁₂₀, VEGF₁₆₄ und VEGF₁₈₈ wurde je eine Bande der erwarteten Länge nachgewiesen. Beispielhaft wird in Abb. 8 der cDNA-Nachweis von VEGF₁₆₄ im porcinen Myokard gezeigt.

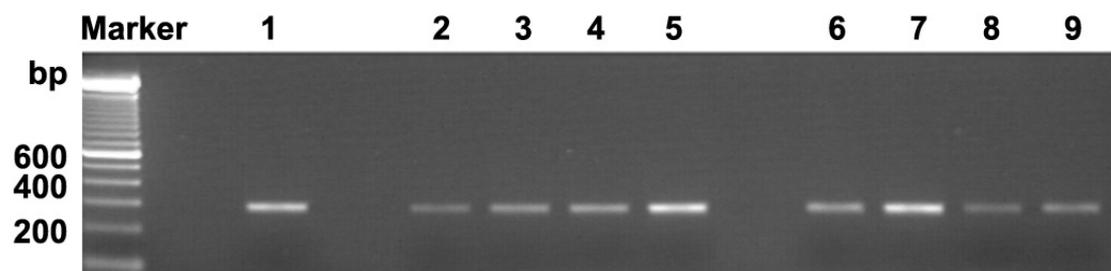


Abb. 8: Der spezifische Nachweis von VEGF₁₆₄-cDNA durch PCR. Die Bande der VEGF₁₆₄-cDNA liegt bei etwa 300 bp (Länge des Fragments: 289 bp).

Probenbezeichnung:

Probe 1: Referenz; Probe 2: keine Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 3: keine Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 4: Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 5: Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 6: keine Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 7: keine Ischämie + TMLR, nach 6 Std.; Probe 8: Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 9: Ischämie + TMLR, nach 6 Std.

3.1.3. Spezifische PCR von β -Aktin

Die cDNA des konstitutiv exprimierten Gens für β -Aktin wurde in spezifischen PCRs qualitativ nachgewiesen. Als PCR-Produkt zeigte sich eine Bande der erwarteten Länge (362 bp) (s. Abb. 9).

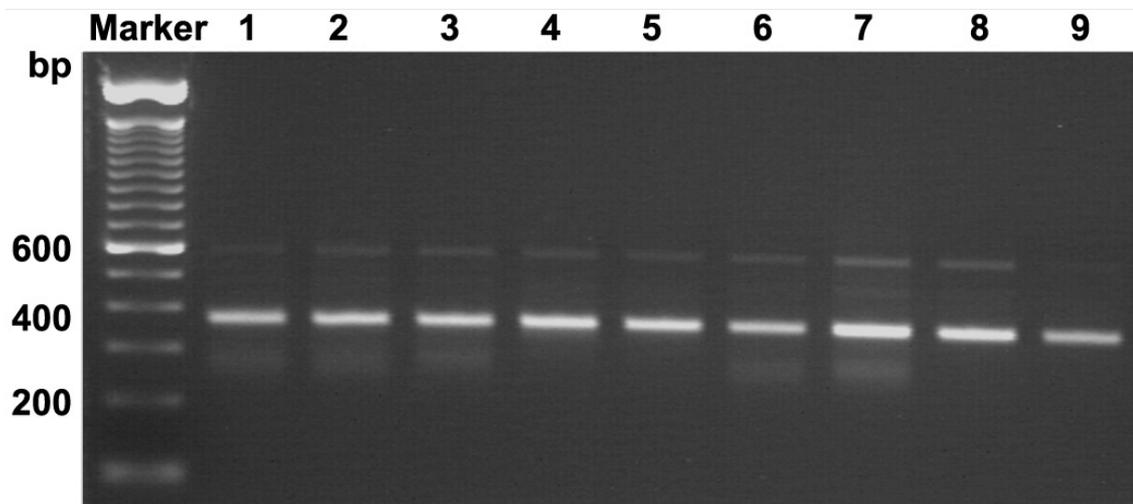


Abb. 9: Der spezifische Nachweis von β -Aktin-cDNA durch PCR. Die Bande der β -Aktin-cDNA liegt zwischen 300 und 400 bp (Länge des Fragments: 362 bp).

Probenbezeichnung:

Probe 1: Referenz; Probe 2: keine Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 3: keine Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 4: Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 5: Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 6: keine Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 7: keine Ischämie + TMLR, nach 6 Std.; Probe 8: Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 9: Ischämie + TMLR, nach 6 Std.

3.1.4. Spezifische PCR von HIF-1 α

In der qualitativen PCR gelang die Darstellung der cDNA des VEGF-Trankriptionsfaktors HIF-1 α . Das Signal war jedoch sehr schwach. Zu Operationsbeginn und 1 Stunde nach TMLR ließ sich in allen vier Myokardarealen HIF-1 α -mRNA nachweisen. Sechs Stunden nach TMLR fand sich nur im nicht ischämischen Gewebe HIF-1 α -mRNA, nicht aber im Ischämiegebiet.

3.1.5. Quantitative PCR von VEGF₁₆₄ und β -Aktin

Der mRNA-Gehalt von VEGF₁₆₄ und β -Aktin wurde in kompetitiven PCRs quantitativ untersucht. Zur Normierung wurden alle Werte für die VEGF₁₆₄-mRNA zum entsprechenden Gehalt des β -Aktin in Bezug gesetzt (s. Abb. 10).

Eine Stunde nach TMLR war sowohl im gelaserten als auch im nicht gelaserten Gewebe des Infarktareals und des Kontrollgebietes ein Anstieg des VEGF-mRNA-Gehalts nachzuweisen. Es zeigten sich dabei deutlich höhere Werte in den Ischämiearealen -gelasert und nicht gelasert- als in den Nicht-Ischämiearealen -gelasert und nicht gelasert- ($P < 0,001$ nach logarithmischer Transformation).

Sechs Stunden nach TMLR war der VEGF-mRNA-Gehalt im Vergleich mit den Ein-Stunden-Werten in allen vier Arealen signifikant angestiegen ($P < 0,01$ nach logarithmischer Transformation). Auch sechs Stunden nach TMLR wurde ein deutlich höherer VEGF-mRNA-Gehalt im ischämischen Myokard -gelasert und nicht gelasert- gefunden als in den nicht ischämischen Kontrollarealen -gelasert und nicht gelasert- ($P < 0,001$ nach logarithmischer Transformation). Ein signifikanter Einfluss der TMLR auf den VEGF-mRNA-Gehalt konnte weder eine Stunde noch sechs Stunden nach TMLR festgestellt werden.

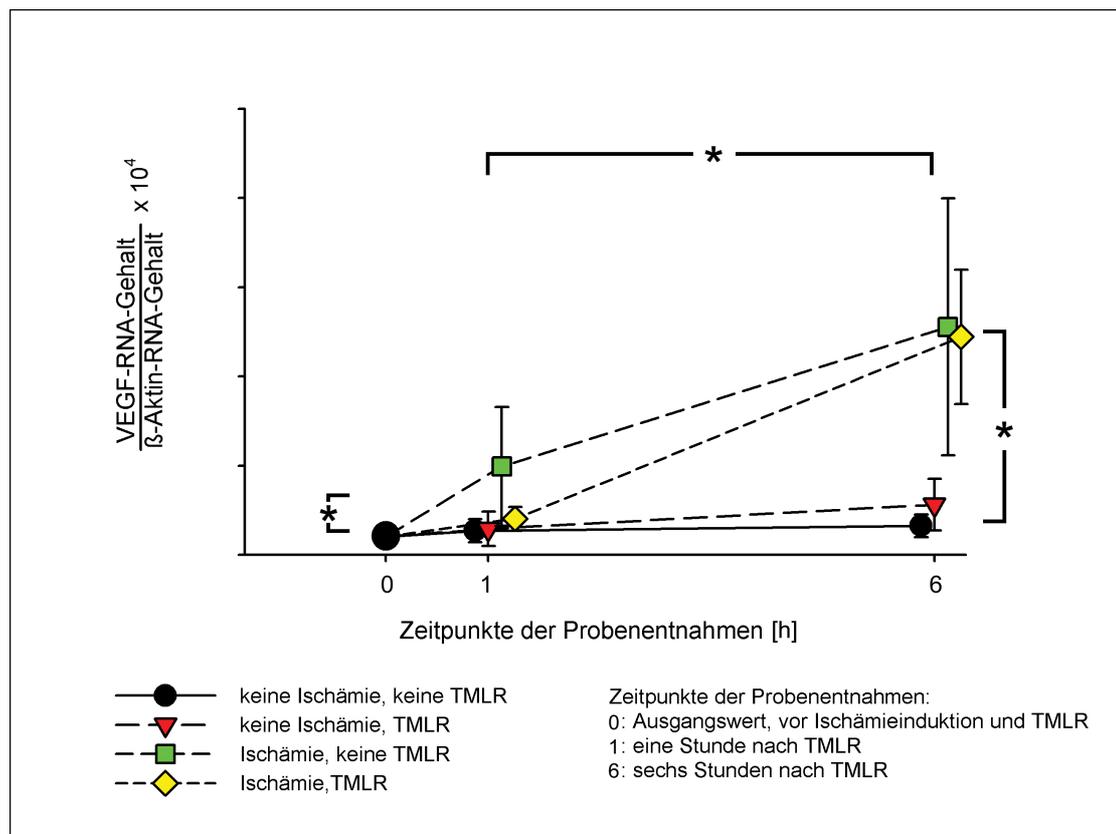


Abb. 10: Die grafische Darstellung der PCR-Werte $VEGF_{164}$ -mRNA/ β -Aktin-mRNA. Gezeigt sind die Mittelwerte der Quotienten von $VEGF_{164}/\beta$ -Aktin $\cdot 10000$ mit Standardfehler ($n = 6$). * kennzeichnet signifikant voneinander verschiedene Werte.

3.2. Western-Blot

Mit der Western-Blot-Methode wurde VEGF- und β -Aktin-Protein im Myokard semiquantitativ dargestellt.

3.2.1. VEGF-Western-Blot

Mit dem oben beschriebenen Western-Blot-Verfahren wurde der Gehalt an VEGF-Protein im Myokard von fünf Schweinen semiquantitativ bestimmt. Alle fünf Schweine wiesen in der vor Infarktinduktion entnommenen Referenzprobe die niedrigste Menge an VEGF-Protein auf. Nach der ersten Stunde war der Proteingehalt also in allen vier Proben im Vergleich zur Referenz angestiegen. Dabei zeigten die beiden Proben aus dem Infarktgebiet mehr Protein als die beiden aus dem gesunden Gewebe (bei 4 von 5 Schweinen). Innerhalb des Ischämiegebiets und des gesunden Herzens wiesen die Proben ohne und mit TMLR gleichstarke Banden auf (bei 3 von 5 Schweinen). Die TMLR hatte hier also keinen messbaren Einfluss auf den VEGF-Proteingehalt.

Nach sechs Stunden war die Proteinmenge im gesunden Gewebe weiter gestiegen, während der Proteingehalt im Infarktgebiet wieder abgefallen war (bei 3 von 5 Schweinen). Das Proteinmengenverhältnis hatte sich umgekehrt: Die beiden Proben aus dem gesunden Myokard übertrafen nun die Proben aus den Infarktgebieten an Proteinmenge (bei 3 von 5 Schweinen). Der VEGF-Proteingehalt im Infarktgewebe sank jedoch nicht auf den Ausgangswert ab, sondern war noch immer deutlich erhöht (5 von 5 Schweinen).

Auch nach sechs Stunden war kein Einfluss der TMLR auf den VEGF-Gehalt festzustellen (gleichstarke Banden innerhalb der Ischämie- bzw. der gesunden Gebiete bei 3 von 5 Schweinen).

Zusammenfassend ließ sich die Aussage treffen, dass der VEGF-Gehalt unbeeinflusst von der TMLR blieb, wohingegen die Ischämie wie erwartet deutliche Auswirkung hatte.

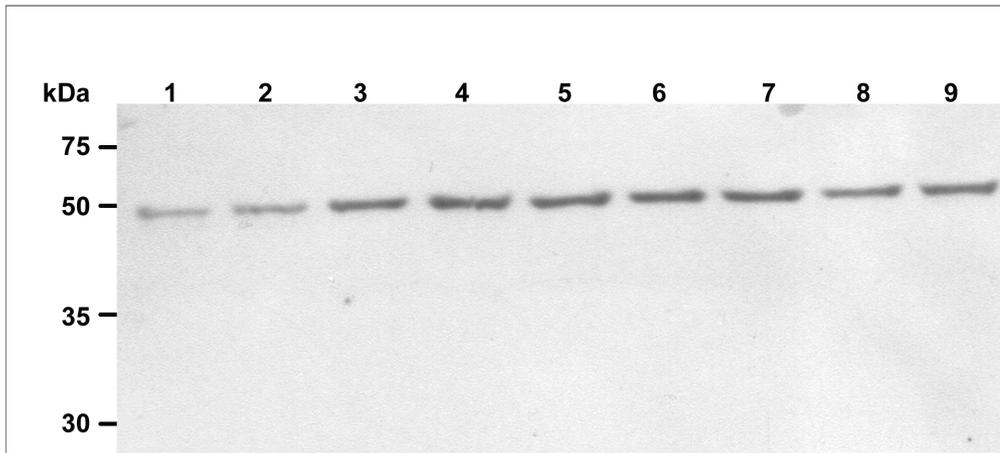


Abb. 11 a

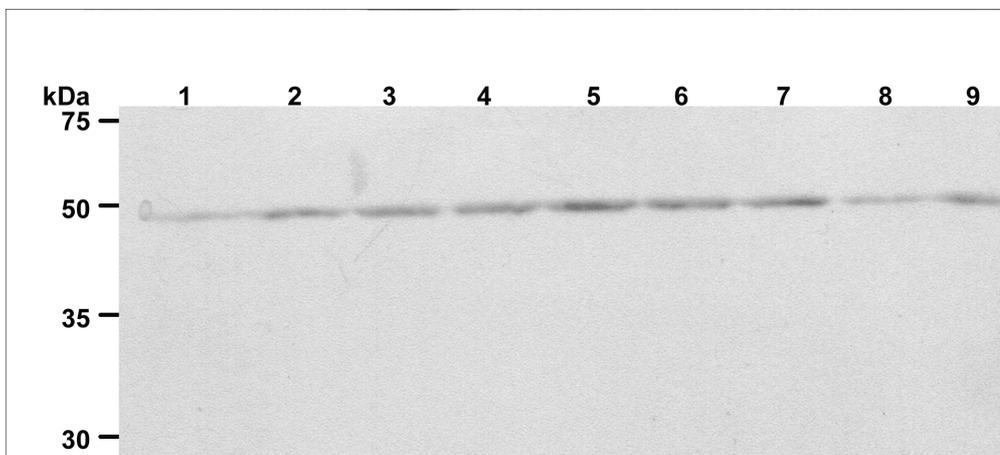


Abb. 11b

Abb. 11a/11b: Der semiquantitative Nachweis von VEGF-Protein durch einen Western-Blot. Das VEGF-Dimer ließ sich etwas unterhalb von 50 kDa detektieren. ($n = 5$).

Probenbezeichnung:

Probe 1: Referenz; Probe 2: keine Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 3: keine Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 4: Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 5: Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 6: keine Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 7: keine Ischämie + TMLR, nach 6 Std.; Probe 8: Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 9: Ischämie + TMLR, nach 6 Std.

3.2.2. β -Aktin-Western-Blot

Zur Kontrolle des gleichmäßigen Ladens der Proteinproben in das SDS-Polyacrylamid-Gel und des gleichmäßigen Transfers der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte die Darstellung des konstant gebildeten Proteins β -Aktin durch einen Western-Blot (s. Abb. 12).

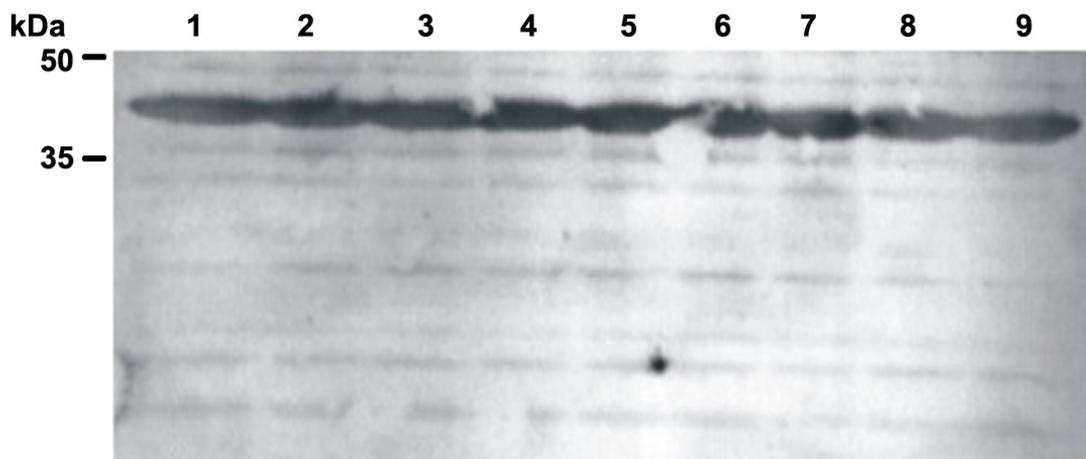


Abb. 12: Der semiquantitative Nachweis von β -Aktin-Protein durch die Western-Blot-Methode. Die Bande des β -Aktins zeigt sich bei etwa 40 kDa (erwartet ca. 42 kDa).

Probenbezeichnung:

Probe 1: Referenz; Probe 2: keine Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 3: keine Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 4: Ischämie, keine TMLR, nach 1 Std.; Probe 5: Ischämie + TMLR, nach 1 Std.; Probe 6: keine Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 7: keine Ischämie + TMLR, nach 6 Std.; Probe 8: Ischämie, keine TMLR, nach 6 Std.; Probe 9: Ischämie + TMLR, nach 6 Std.

3.3. Identifikation der Sequenz des Exon 6 des porcinen VEGF-Genes

Wie in Abschnitt 3.1.1. erwähnt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Sequenz des porcinen VEGF₁₈₈ erstmalig identifiziert. Dazu wurden die Proben, die in der spezifischen PCR für VEGF₁₈₈ besonders starke Signale gaben, gepoolt. Die cDNA wurde mit Hilfe des Wizard PCR Preps Purification System aus dem PCR-Ansatz isoliert und bei Sequence Laboratories, Göttingen sequenziert. Da das Exon 6 nur in der VEGF₁₈₉- bzw. VEGF₁₈₈-Isoform exprimiert wird, ist die Sequenz unter dem Namen Sus scrofa vascular endothelial growth factor 189 (VEGF) mRNA beim National Center for Biotechnology Information NCBI am Locus AF041084 eingetragen. Ein Vergleich des Sequenzierungsergebnisses mit der bekannten Sequenz des humanen Exon 6 ergab eine 95%ige Homologie beider DNAs.

porcin	1	AAAATCAGTT	CGAGGAAAGG	GAAAGGGGCA	AAAAAGAAAG
human	1	AAAATCAGTT	CGAGGAAAGG	GAAAGGGGCA	AAAACGAAAG
porcin	41	CGCAAGAAAT	CCCGGTATAA	ACCCTGGAGC	GT
human	41	CGCAAGAAAT	CCCGGTATAA	GTCCTGGAGC	GT

Abb. 13: Die porcine und die humane Sequenz des Exon 6 von VEGF in der Gegenüberstellung.

4. Diskussion

Die TMLR ist eine neue Behandlungsmethode der KHK und wird erfolgreich angewendet, wie eingangs beschriebene klinische Studien belegen (Cooley et al., 1996; Horvath et al., 1996).

Studien jüngerer Datums kommen zu ähnlichen Ergebnissen. Frazier und Kollegen (1999) verzeichneten bei 75 % ihrer Studienpatienten mit vorbestehender schwerer Angina pectoris 1 Jahr nach TMLR ein Absinken der Angina-Klasse um zwei Stufen und eine Erhöhung der Lebensqualität (Klassifikation der belastungsabhängigen Angina pectoris nach der Canadian Cardiovascular Society, s. Tabelle 2). In der Studie von Lutter et al. (2000) zeigten die Patienten schon direkt nach der TMLR, sowie 6 und 12 Monate später eine signifikante Verbesserung der Angina-Klasse und der Leistungsfähigkeit auf dem Ergometer. Horvath et al. (2001) beobachteten die Langzeiteffekte der TMLR über einen Zeitraum von fünf Jahren. Sie stellten eine persistierende Verbesserung der Angina-Klasse fest (von durchschnittlich 3,7 auf 1,6 nach fünf Jahren).

Der genaue Wirkmechanismus der TMLR ist noch nicht bekannt. Mittlerweile geht man davon aus, dass die Beschwerdereduktion am ehesten auf einer laserinduzierten Angiogenese beruht, die zu einer verbesserten myokardialen Sauerstoffversorgung führt.

Grad	Definition
I	Keine Angina bei normaler Belastung, Beschwerden bei sehr starker oder andauernder Belastung
II	Angina mit mäßiggradiger Beeinträchtigung normaler Tätigkeiten
III	Angina mit deutlicher Einschränkung der Leistungsfähigkeit
IV	Angina mit erheblicher Einschränkung der Leistungsfähigkeit, Beschwerden in Ruhe

Tab. 2: CCS-Klassifikation der belastungsabhängigen Angina pectoris (Einteilung der Canadian Cardiovascular Society)

Wie in der Einleitung ausgeführt, spielt das Protein VEGF eine Schlüsselrolle im Rahmen der Angiogenese. In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen

der TMLR auf den Gehalt an VEGF-mRNA und -Proteins im akuten Ischämiemodell beim Schwein untersucht. Zudem erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung des myokardialen Sauerstoffpartialdruckes und eine mehrmalige Biopsatentnahme aus dem Herzmuskel zur elektronenmikroskopischen Untersuchung. In Ergänzung zu vorbeschriebenen Langzeitmodellen (s.u.) richteten sich die hier vorgestellten Untersuchungen auf myokardiale Veränderungen innerhalb der ersten sechs Stunden nach TMLR.

Ausgehend von den bekannten Regulationsmechanismen der VEGF-Bildung erwartete ich im Infarktgebiet eine hypoxieinduzierte Zunahme von VEGF-mRNA und -Protein nach der Gefäßligatur. Nach der TMLR rechnete ich mit einer Verbesserung der intramyokardialen Sauerstoffversorgung im Infarktgebiet durch Reperfusion und infolge dessen mit einem Wiederabfall der VEGF-Spiegel. Die durchgeführten pO_2 -Messungen haben aber ergeben, dass in dem hier dargestellten Modell innerhalb der ersten sechs Stunden der pO_2 durch TMLR nicht wieder angehoben wird (s.u.). In diesem Fall wäre bei einem konstant niedrigem pO_2 ein weiterhin hoher VEGF-Gehalt zu erwarten. In Bezug auf den VEGF-Spiegel im gesunden Herzgewebe waren prinzipiell zwei Möglichkeiten denkbar: 1. Es wird ein gleichbleibender, von der Infarzierung einer anderen Herzmuskelregion unbeeinflusster VEGF-Gehalt gemessen, oder 2. es kommt zu einem Anstieg der VEGF-Spiegel, hervorgerufen etwa durch diffundierbare oder via Blutstrom an das vitale Myokard herangetragene VEGF-induzierende Faktoren aus dem Infarktgebiet. Von großem Interesse war auch die Reaktion des nicht ischämischen Myokards auf die Laserbehandlung. Da es nach Laserbehandlung zu einer Entzündungsreaktion im betroffenen Gewebe kommt (Fleischer et al., 1996) und die im Rahmen inflammatorischer Prozesse freigesetzten Proteine IL-1 α und IL-6 (Cohen et al., 1996), sowie das Prostaglandin PG E₂ als VEGF-Induktoren wirken (Ben-Av et al., 1995), hielt ich einen VEGF-Anstieg im gesunden, gelaserten Myokard für möglich.

Nach Analyse der pO_2 -Aufzeichnung, der elektronenmikroskopischen Bilder und des myokardialen VEGF-Gehaltes stimmten einige Ergebnisse der hier

vorgestellten Versuchsreihe mit der Literatur überein, andere waren überraschend und unvorhergesehen.

Die Auswertung der myokardialen pO_2 -Aufzeichnung durch die kardiochirurgischen Kollegen ergab keinen positiven Einfluss der TMLR auf die myokardiale Sauerstoffversorgung innerhalb der ersten sechs Stunden (Soweit nicht veröffentlicht (Misfeld et al., 1998), wurden die pO_2 -Werte freundlicherweise überlassen von Frau Miriam Pilgrim, Doktorandin der Klinik für Herzchirurgie der Universität zu Lübeck).

Unmittelbar vor der Gefäßligatur lag der intramyokardiale pO_2 zwischen 55 und 65 mmHg. Nach Unterbindung der LAD-Seitenäste sank der pO_2 im Infarktgebiet innerhalb von 15 Minuten auf Werte von 0 bis 2 mmHg, wodurch die Suffizienz dieser Methode zur Infarktinduktion verdeutlicht wurde. Nach TMLR stieg der pO_2 im Infarktgebiet nicht wieder an, sondern blieb über die restliche Versuchsdauer auf dem Niveau von 0 bis 2 mmHg.

Im nicht ischämischen Myokard sank der pO_2 nach der Laserbehandlung auf Werte von etwa 45 mmHg und lag für die weitere Versuchsdauer statistisch signifikant stets 10 bis 20 mmHg niedriger als der pO_2 im nicht gelaserten Referenzgebiet.

Eine mögliche Erklärung für den nach TMLR beobachteten pO_2 -Abfall im nicht ischämischen, gelaserten Myokard ist der durch die Laserung gesteigerte Verbrauch von Sauerstoff im Gewebe, möglicherweise unter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Für diese These sprechen die Ergebnisse von Callaghan et al. (1996), in deren Studien die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in hämatopoetischen Zellen im Anschluss an eine Laserbehandlung nachgewiesen werden konnte. Denkbar ist auch, dass es durch die Laserung zu einer lokalen Ödembildung kommt, welche die Perfusion vermindert.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden im hiesigen Institut für Anatomie durchgeführt. Die Ergebnisse der histologischen Auswertung sind publiziert (Misfeld et al., 1998).

Für die histologische Untersuchung wurden Gewebeproben nach dem in Tab. 3 abgebildeten Schema entnommen:

Entnahmezeitpunkt	unbehandelt (Referenz)	Ischämie allein	Ischämie und TMLR
vor Ischämieinduktion	X		
30 Min. nach Ischämie- induktion		X	X
3 Std. nach Ischämie- induktion		X	X
6 Std. nach Ischämie- induktion		X	X

Tab. 3: Schema der Probenentnahme für die elektronenmikroskopische Untersuchung

In der Biopsatuntersuchung zeigten sich schon 30 Minuten nach Ischämieinduktion im Infarktgebiet mit TMLR und ohne TMLR ultrastrukturelle Veränderungen der irreversiblen Myokardschädigung, wie sie für die akute Ischämie typisch sind (s. Abb. 14). Diese Veränderungen waren sechs Stunden nach Ischämiebeginn noch stärker ausgeprägt, wobei gelasertes und unbehandeltes Gewebe gleichermaßen betroffen waren. Die Myozyten wurden durch den Sauerstoffmangel irreversibel geschädigt, und ihre Vitalität wurde in den ersten sechs Stunden nach Ischämieinduktion nicht durch die Laserung beeinflusst.

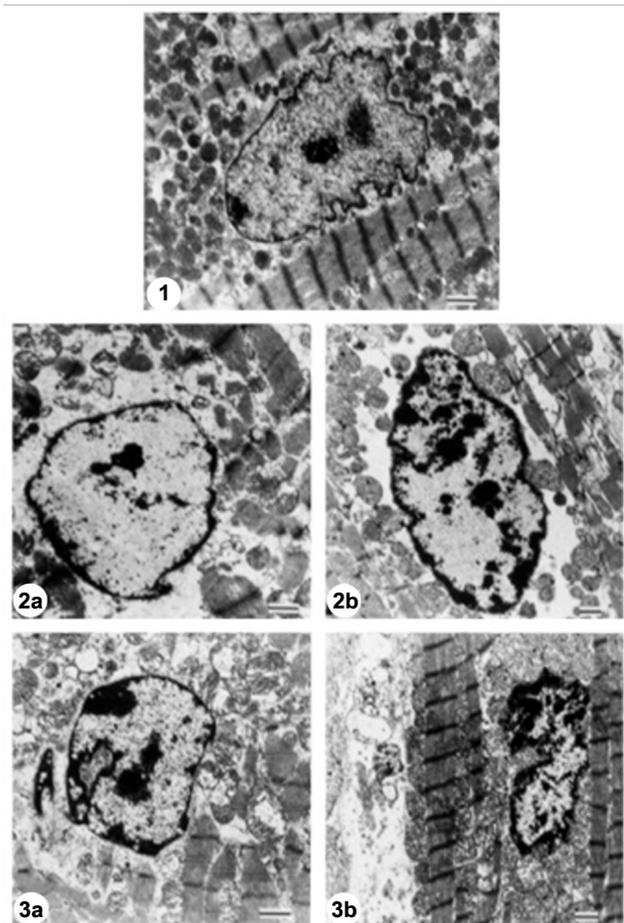


Abb. 14: Die ultrastrukturellen Veränderungen im porcinen Myokard nach Ischämie und TMLR. Skala = 1 μm . (Eigene Darstellung in Anlehnung an Eur J Card Thorac Surg 13: Misfeld M, Szabo K, Kraatz EG, Großherr M, Schmidtke C, Pilgrim M, Kühnel W, Sievers HH: Electron-microscopic findings after transmyocardial laser revascularization in an acute ischemic pig model. S.398-403 (1998). Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.) Bild 1: Vitales Myokard zu Versuchsbeginn. Bild 2a: 30 Minuten nach Ischämieinduktion (ohne TMLR) sieht man typische Ischämiezeichen, wie Margination der Chromatingranula und Zerstörung der Christae in den Mitochondrien. Bild 2b: Sechs Stunden nach Ischämieinduktion (ohne TMLR) sind die vorher beschriebenen Ischämiezeichen stärker ausgeprägt, die Myofibrillen sind in der Höhe der Z-Streifen rupturiert, zwischen ihnen finden sich Lipidtröpfchen. Bild 3a: 30 Minuten nach Ischämieinduktion und TMLR sieht man die unvollständige Chromatingranulamargination. Die Christae der Mitochondrien sind relativ intakt. Bild 3b: Sechs Stunden nach Ischämieinduktion und TMLR zeigen sich die Margination und Verplumpung der Chromatingranula wesentlich deutlicher. Die Christae der Mitochondrien sind zerstört und die Myofibrillen in Höhe der Z-Streifen rupturiert.

Die Untersuchung des VEGF-mRNA und -Proteingehaltes im Institut für Physiologie ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen gelasertem und nicht gelasertem Myokard, wie Abb. 10 und Abb. 11a/b verdeutlichen. Aus Abb. 10 geht hervor, dass auch im Myokard des Schweins bei akuter Ischämie die VEGF-Expression zunimmt. Mit dem gelungenen Nachweis der Änderung des

VEGF-Gehaltes war zudem die Eignung der hier zur VEGF-Detektion angewendeten Methoden belegt.

Der nach einer Stunde im Infarktgebiet beobachtete Anstieg der VEGF-mRNA und des VEGF-Proteins lässt sich auf die ischämieinduzierte Steigerung der Transkription und möglicherweise auch der Translation, sowie auf die höhere Stabilität der mRNA unter hypoxischen Bedingungen zurückführen (Ideka et al., 1995; Levy et al., 1996). Sechs Stunden nach TMLR war der mRNA-Spiegel weiter signifikant gestiegen, während der Proteingehalt wieder stark abgenommen hatte. Dieses Phänomen lässt sich begründen mit einer längeren Halbwertszeit der mRNA als der des Proteins unter Ischämie. Es ist zudem denkbar, dass das ischämische Myokard nicht mehr genügend Energie für die Translation besaß, während die Transkription noch ablaufen konnte.

Im gesunden Gewebe war eine Stunde nach TMLR sowohl der VEGF-mRNA-Spiegel wie auch der Proteingehalt angestiegen. Es ist möglich, dass dieser Anstieg durch eine VEGF-Induzierung durch diffundierbare Faktoren aus dem Infarktgebiet bewirkt wurde. Nach sechs Stunden war sowohl der mRNA-, wie auch der Proteinspiegel weiter gestiegen (mRNA-Anstieg signifikant), wobei es keinen Unterschied zwischen gelasertem und unbehandeltem Myokard gab. Als mögliche Erklärung sei die Transkriptions- und Translationssteigerung durch Faktoren aus dem Ischämiegebiet angeführt und eventuell auch eine erhöhte mRNA-Stabilität. Auch bedacht werden muss in diesem Zusammenhang die von Li et al. (1997) beschriebene Expressionssteigerung von VEGF durch Änderung der Herzwanddehnung, wie sie im Rahmen eines Infarkts vorkommen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sprechen gegen die direct blood flow-Hypothese der myokardialen Reperfusion via Laserkanal nach TMLR. Darin stimmen die hier dargestellten Ergebnisse mit der Literatur überein, in welcher eine Vernarbung der Laserkanäle nach TMLR beschrieben ist. Neben den bereits in der Einleitung erwähnten Studien von Burkhoff et al. (1996) und Kohmoto et al. (1996) wiesen Mueller und Kollegen (1998) einen Monat nach TMLR Remnants, d.h. mit Bindegewebe aufgefüllte Reststrukturen der Laserkanäle, im porcinen Myokard nach. Chu et al. (1999) beschrieben schon eine Woche nach TMLR vernarbte Laserkanäle im Schweinemyokard.

Beim Vergleich der hier vorgestellten Ergebnisse mit anderen porcinen TMLR-Studien stellt man fest, dass in der Literatur bislang nahezu ausschließlich Modelle von chronischer Ischämie und längerem Zeitraum nach Laserung beschrieben sind. Diese Studien zeigen mehrheitlich einen proangiogenetischen Effekt der TMLR.

Fleischer et al. (1996) fanden in ihrer o.g. Studie einen Monat nach TMLR deutliche Anzeichen von Angiogenese im gelaserten Gewebe.

Dementsprechend wiesen Fuchs und Kollegen (2002) eine bzw. zwei Wochen nach TMLR im chronisch ischämischen Schweineherzen einen Anstieg des VEGF-Spiegels im gelaserten Ischämiegewebe im Vergleich zum nicht gelaserten ischämischen Gewebe nach. Die Gefäßdichte änderte sich innerhalb der ersten beiden Wochen nicht. Erst 4 Wochen nach TMLR sah man einen signifikanten Anstieg der Gefäßdichte im gelaserten ischämischen Areal.

Hinsichtlich des proangiogenetischen Effektes der TMLR stellten Horvath et al. (1999) in ihrer Studie einen Unterschied zwischen ischämischem und nicht ischämischen Gewebe nach TMLR fest. Sie beschrieben im porcinen chronisch ischämischen Myokard sechs Wochen nach TMLR einen signifikant höheren Anstieg der Gefäßdichte im gelaserten ischämischen Myokard als im nicht gelaserten Ischämieareal und als im gelaserten und nicht gelaserten vitalen Myokard. Der Gehalt an VEGF-mRNA war im gelaserten Ischämieareal signifikant höher als in den drei anderen Arealen.

Die vorliegenden Untersuchungen am Modell der akuten Ischämie zeigten innerhalb der ersten sechs Stunden nach TMLR keine Auswirkung auf VEGF-mRNA- und -Proteingehalt. Ischämisches und nicht ischämisches Myokard unterschieden sich dabei nicht in ihrer Reaktion auf die Laserung. Es konnte innerhalb der ersten sechs Stunden weder eine positive Auswirkung der TMLR auf den myokardialen Sauerstoffpartialdruck, noch ein therapeutischer Effekt auf die ultrastrukturellen Zellveränderungen der ischämischen Myozyten nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass der Einfluss der TMLR auf das Myokard erst später deutlich wird.

Ein weiteres wichtiges und unerwartetes Ergebnis der vorliegenden Arbeit war die Erkenntnis, dass die VEGF₁₆₄-Isoform im porcinen Myokard vorherrschend ist. Die myokardiale Konstellation der VEGF-Isoformen beim Schwein weicht also von der bei den Nagern beschriebenen ab (dort ist VEGF₁₈₈ im Herzmuskel dominant) (Ladoux und Frelin, 1993) und entspricht der Konstellation im humanen Myokard (Torry et al., 1995). Damit scheint das Schwein für weiterführende Studien trotz des erheblichen methodischen Mehraufwandes als Versuchstier besser geeignet zu sein.

Nach Abschluss meiner Untersuchungen beschrieben Sato et al. (2001) in einer Studie am porcinen Tiermodell eine neue Methode zur Steigerung des intramyokardialen VEGF-Gehaltes und damit letztlich zur Verbesserung der Myokardperfusion: Nach intrakoronarer Gabe von VEGF-Protein konnten sie eine vermehrte Kollateralenbildung und eine verbesserte Durchblutung des chronisch ischämischen Myokards nachweisen.

Eine weitere neue Methode der VEGF-Verabreichung ist der intramyokardiale VEGF-Gentransfer mittels Plasmid. Den Erfolg dieser Vorgehensweise beschrieben Nikol und Laguens in ihren tierexperimentellen Studien an Schweinen. Sie beobachteten nach intramyokardialem VEGF-Gentransfer eine Erhöhung der myokardialen Kollateralendichte (Nikol et al., 2002), bzw. eine Steigerung des mitotischen Index der Kardiomyozyten (Laguens et al., 2002). Erste klinische Studien mit VEGF-Gentransfer scheinen erfolgversprechend: Nach der Behandlung zeigten die Patienten einen stärkeren Rückgang der Angina pectoris-Symptomatik als nach Verabreichung eines Placebo (Merkle et al., 2003).

In jüngeren tierexperimentellen Untersuchungen wurden die TMLR und die VEGF-Gentherapie kombiniert angewendet. Ramsey-Semmelweis et al. (2002) konnten im porcinen Myokardareal, das sowohl mit TMLR als auch mit VEGF-Gentransfer behandelt worden war, eine höhere Anzahl an Gefäßen nachweisen als im mit TMLR allein behandelten Myokard. Ebenfalls am porcinen Herzen fanden Heilmann et al. (2003) eine Verbesserung der Myokardperfusion nach TMLR und VEGF-Gentherapie. Ob diese Kombinationstherapie auch beim Menschen erfolgreich angewendet werden kann, ist jedoch noch nicht erwiesen.

5. Zusammenfassung

Zur Behandlung der Koronaren Herzkrankheit als der häufigsten Todesursache in den Industrienationen wird seit einigen Jahren neben der medikamentösen Therapie und der Bypass-Operation die Transmyokardiale Laserrevaskularisation (TMLR) angewendet. In tierexperimentellen Studien konnte nach TMLR eine verstärkte Gefäßneubildung (Angiogenese) in dem die Laserkanäle umgebenden Myokard nachgewiesen werden. Der Zusammenhang zwischen Laserung und Angiogenese wurde Gegenstand der Forschung.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen der TMLR auf den Gehalt des proangiogenetischen, ischämieinduzierbaren Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktoren (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) im akut ischämischen Schweineherzen. Innerhalb der ersten sechs Stunden nach Ischämieinduktion und TMLR wurde der Gehalt an VEGF-mRNA und Protein in unbehandeltem Myokard, sowie in gelasertem und nicht gelasertem ischämischen und nicht ischämischen Gewebe bestimmt. Zudem wurde der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in den verschiedenen Myokardregionen kontinuierlich aufgezeichnet, die Auswertung der pO_2 -Messungen erfolgte durch die Klinik für Herzchirurgie. Zur Untersuchung am Institut für Anatomie wurden im Verlauf Myokardbiopsate entnommen. Am Institut für Physiologie wurde der Gehalt an VEGF-mRNA und –Protein mittels RT-PCR und Westernblot ermittelt. Erwartungsgemäß wurde eine VEGF-Induktion durch den Ischämieereiz im Infarktgebiet gefunden. Für die Laserbehandlung selbst konnte innerhalb der ersten sechs Stunden kein Effekt auf die VEGF-Bildung nachgewiesen werden. Im Einklang mit diesen Ergebnissen zeigten auch die pO_2 -Messungen und die elektronenmikroskopische Gewebeuntersuchungen keine positive Wirkung der TMLR innerhalb der ersten sechs Stunden. In verschiedenen Tierstudien, die einen längeren Zeitraum umfassen, wurde nach TMLR ein erhöhter VEGF-Gehalt gefunden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die VEGF-steigernde Wirkung der Laserbehandlung kein Kurzeiteffekt ist, sondern erst zu einem späteren Zeitpunkt nachweisbar eintritt.

Zudem ist in den hier dargestellten Untersuchungen erstmalig die Sequenzierung des Exon 6 des VEGF-Genes gelungen, wodurch ein Vergleich der porcinen Sequenz mit der humanen möglich wird. Die beiden Exon 6-Sequenzen weisen eine Homologie von 95 % auf.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die Erkenntnis, dass von den VEGF-Isoformen das Protein VEGF₁₆₄ im Schweineherzen dominant ist. Somit entspricht die Konstellation der VEGF-Isoformen im porcinen Myokard der im humanen Herzgewebe und weicht von der vorbeschriebenen Konstellation im murinen Myokard ab.

In der jüngsten Zeit hat sich das Spektrum der KHK-Behandlungsmethoden um einige interessante Verfahren erweitert. Zu diesen neuen Therapiemethoden gehören die intrakoronare Verabreichung von rekombinantem VEGF-Protein und die intrakoronare VEGF-Gentherapie mittels Plasmid. Tierexperimentelle Studien belegen die erfolgreiche Kombination von TMLR und VEGF-Gentransfer, so dass die Anwendbarkeit dieser Kombinationstherapie beim Menschen überprüfenswert erscheint.

Anhang: Primertabelle

	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Exon	Ann.-T (°C)	Zyklen	Prod.-Länge
VEGF						
	5'VEGF	CAG CTA CTG CCG TCC AAT CG	3			
Übersicht	3'VEGF	TCA CCG CCT CGG CTT GT	8	62°C	34	V ₁₈₈ : 502 bp V ₁₆₄ : 430 bp V ₁₂₀ : 298 bp
VEGF ₁₂₀	3'VEGF120	CGG CTT GTC ACA T [^] TT TTC TTG C	8 [^] 5	64°C	34	289 bp
VEGF ₁₆₄	3'VEGF164	AGG CCC ACA GGG A [^] TT TTC TTG	7 [^] 5	64°C	34	289 bp
VEGF ₁₈₈	3'VEGF188	CCC ACA GGG A [^] AC GCT CC	7 [^] 6	55°C	37	364 bp
β-Aktin						
	5'β-Aktin	GAA GAG CTA CGA GCT GCC		58°C	32	
	3'β-Aktin	TGA TCC ACA TCT GCT GGA		58°C	32	362 bp
Kompetitorsynthese						
VEGF ₁₆₄ -Komp	5'VEGF comp	CAG CTA CTG CCG TCC AAT CG / T <i>GTT ATA CAG GGA GAT GAA A</i>		60°C	30	
	3'VEGF164 comp	AGG CCC ACA GGG ATT TTC TTG / <i>ATT TGA TTC TGG ACC ATG GG</i>		60°C	30	367 bp
β -Aktin-Komp	5'β-Aktin comp	GAA GAG CTA CGA GCT GCC / <i>GCA GAT GAG TAT CTT GTC CC</i>		59°C	30	
	3'β-Aktin comp	TGA TCC ACA TCT GCT GGA / <i>ATT TGA TTC TGG ACC ATG GG</i>		59°C	30	262 bp
HIF-1α						
	5'HIF-1α	GTC GGA CAG CCT CAC CAA ACA G		58°C	35	
	3'HIF-1α	TAG GTA GTG AGC CAC CAG TGT CC		58°C	35	542 bp

[^] kennzeichnet die Exongrenze

Kursiv gedruckt: Primerabschnitt, der an das INOS-Fragment bindet

Literaturverzeichnis

Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, D'Amore PA, Miller JW: Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 114, 66-71 (1996)

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E: Vascular endothelial growth factor acts as survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1, 1024-1028 (1995)

Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovich G, Keshet E: Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischemia: Implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res* 28, 1176-1179 (1994)

Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T: Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts. *FEBS Lett* 372, 83-87 (1995)

Borgström P, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara N: Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor antibody: Novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res* 56, 4032-4039 (1996)

Burkhoff D, Fisher PE, Apfelbaum M, Kohmoto T, DeRosa CM, Smith CR: Histologic appearance of transmural laser channels after 4½ weeks. *Ann Thorac Surg*, 61, 1532-1534 (1996)

Callaghan GA, Riordan C, Gilmore WS, McIntyre IA, Allen JM, Hannigan BM: Reactive oxygen species inducible by low-intensity laser irradiation alter DNA synthesis in haematopoietic cell line U937. *Lasers Surg Med* 19, 201-106 (1996)

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439 (1996)

Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159 (1987)

Chu VF, Giaid A, Kuang JQ, McGinn AN, Li CM, Pelletier MP, Chiu RC: Thoracic Surgery Association Award. Angiogenesis in transmyocardial revascularization: comparison of laser versus mechanical punctures. *Ann Thorac Surg* 68, 301-307 (1999)

Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ: Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271, 736-741 (1996)

Cooley DA, Frazier OH, Kadipasaoglu KA, Lindenmeir MH, Pehlivanoglu S, Kolff JW, Wilansky S, Moore WH: Transmyocardial laser revascularization: Clinical experience with twelve-month follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg* 111, 791-799 (1996)

Cullinan-Bove K, Koos RD: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: Rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 133, 829-837 (1993)

Dipietro LA: Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. In: Rosen E, Goldberg ID: *Regulation of Angiogenesis*, 295-314, Springer, Berlin (1997)

Fandrey J, Bunn HF: In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 81, 617-623 (1993)

Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161, 851-858 (1989)

Ferrara N, Carver Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell Braxton L, Hillan KJ, Moore MW: Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442 (1996)

Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18, 4-25 (1997)

Ferrara N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77, 527-543 (1999)

Ferrara N, Gerber HP: The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 106, 148-156 (2001)

Fleischer KJ, Goldschmidt-Clermont PJ, Fonger JD, Hutchins GM, Hruban RH, Baumgartner WA: One-month histologic response of transmural laser channels with molecular intervention. *Ann Thorac Surg* 62, 1051-1058 (1996)

Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267, 10931-10934 (1992)

Fong GH, Rossant J, Gertstein M, Breitman ML: Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70 (1995)

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-4613 (1996)

Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalg DG, Werner S: Regulation of VEGF expression in cultured keratinocytes. Implication for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 270, 12607-12613 (1995)

Frazier OH, March RJ, Horvath KA: Transmyocardial revascularization with a carbon dioxide laser in patients with end-stage coronary artery disease. *N Engl J Med* 341, 1021-1028 (1999)

Fuchs S, Baffour R, Vodovotz Y, Shou M, Stabile E, Tio FO, Leon MB, Kornowski R: Laser myocardial revascularization modulates expression of angiogenic, neuronal, and inflammatory cytokines in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J Card Surg* 17, 413-424 (2002)

Gerber HP, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 273, 13313-13316 (1998) (a)

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N: VEGF regulates endothelial cell survival by the PI3-kinase/Akt signal transduction pathway: Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273, 30336-30343 (1998) (b)

Gerber HP, Hillian KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller G-A, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N: VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126, 1149-1159 (1999)

Goldman C, Kim J, Wonf W-L, King V, Brock T, Gillespie Y: Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by malignant glioma cells: A model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* 4, 121-133 (1993)

Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y: Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol* 267, H1948-H1954 (1994)

Heilmann CA, Attmann T, von Samson P, Göbel H, Marmé D, Beyersdorf F, Lutter G: Transmyocardial laser revascularization combined with vascular endothelial growth factor 121 (VEGF 121) gene therapy for chronic myocardial ischemia- do the effects really add up? *Eur J Cardiothorac Surg* 23, 74-80 (2003)

Horvath KA, Mannting F, Cummings N, Shernan SK, Cohn LH: Transmyocardial laser revascularization: Operative techniques and clinical results at two years. *J Thorac Cardiovasc Surg* 111, 1047-1053 (1996)

Horvath KA, Chiu E, Maun DC, Lomasney JW, Greene R, Pearce WH, Fullerton DA: Up-regulation of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis after transmyocardial laser revascularization. *Ann Thorac Surg* 68, 825-829 (1999)

Horvath KA, Aranki SF, Cohn LH, March RJ, Frazier OH, Kadipasaoglu KA, Boyce SW, Lytle BW, Landolfo KP, Lowe JE, Hattler B, Griffith BP, Lansing AM: Sustained angina relief 5 years after transmyocardial laser revascularization with a CO₂ laser. *Circulation* 104, 181-184 (2001)

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5, 1806-1814 (1991)

Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267, 26031-26037 (1992)

Ideka E, Achen MG, Breier G, Risau W: Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 270, 19761-19766 (1995)

Koch AE, Harlow L, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong W-L, Pope RM, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 152, 4149-4156 (1994)

Kohmoto T, Fisher PE, Gu A, Zhu SM, Yano OJ, Spotnitz HM, Smith CR, Burkhoff D: Does blood flow through holmium:YAG transmyocardial laser channels? *Ann Thorac Surg* 61, 861-868 (1996)

Kohmoto T, Argenziano M, Yamamoto N, Vliet KA, Gu A, DeRosa CM, Fisher PE, Spotnitz HM, Burkhoff D, Smith CR: Assessment of transmyocardial perfusion in alligator hearts. *Circulation* 95, 1585-1591 (1997)

Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, Takashima S, Tolentino M, Kim RY, Rohan RM, Colby KA, Yeo KT, Adamis AP: Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 98, 1667-1675 (1996)

Ladoux A, Frelin C.: Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 1005-1010 (1993)

Laguens R, Cabeza Meckert P, Vera Janavel G, Del Valle H, Lascano E, Negroni J, Werba P, Cuniberti L, Martinez V, Melo C, Papouchado M, Ojeda R, Criscuolo M, Crottogini A: Entrance in mitosis of adult cardiomyocytes in ischemic pig hearts after plasmid-mediated rhVEGF165 gene transfer. *Gene Ther* 9, 1676-1681 (2002)

Levy AP, Levy NS, Goldberg MA: Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271, 2746-2753 (1996)

Li J, Hampton T, Morgan JP, Simons M: Stretch-induced VEGF expression in the heart. *J Clin Invest* 100, 18-24 (1997)

Lutter G, Sarai K, Nitzsche E, Saubier B, Frey M, Hoegerle S, Martin J, Zipfel M, Spillner G, Beyersdorf F: Evaluation of transmyocardial laser revascularization by following objective parameters of perfusion and ventricular function. *Thorac Cardiovasc Surg* 48, 79-85 (2000)

Merkle CJ, Montgomery DW: Gene therapy with vascular endothelial growth factor reduces angina. *J Cardiovasc Nurs* 18, 38-43 (2003)

Midy V, Ploüet J: Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 199, 380-386 (1994)

Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 71, 374-379 (1994)

Misfeld M, Szabo K, Kraatz EG, Großherr M, Schmidtke C, Pilgrim M, Kühnel W, Sievers HH: Electron-microscopic findings after transmyocardial laser revascularization in an acute ischemic pig model. *Eur J Card Thorac Surg* 13, 398-403 (1998)

Mueller XM, Tevæarai HH, Genton CY, Bettex D, von Segesser LK: Transmyocardial laser revascularization in acutely ischemic myocardium. *Eur J Cardiothorac Surg* 13, 170-175 (1998)

Nikol S, Engelmann MG, Pelisek J, Fuchs A, Golda A, Shimizu M, Mekkaoui C, Rolland PH: Local perivascular application of a plasmid encoding for vascular endothelial growth factor (VEGF₁₆₅) is efficient for therapeutic angiogenesis in pigs. *Acta Physiol Scand* 176, 151-159 (2002)

Okada M, Shimizu K, Ikuta H, Hrii H, Nakamura K: A new method of myocardial revascularization by laser. *Thorac Cardiovasc Surg* 39, 1-4 (1991)

Okamoto N, Tobe T, Hackett SF, Ozaki H, Viores MA, Larochele W, Zack DJ, Campochiaro PA: Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: A model of intraretinal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol* 151, 281-291 (1997)

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328 (1994)

Park JE, Keller H-A, Ferrara N: The vascular endothelial growth factor isoforms (VEGF): Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4, 1317-1326 (1993)

Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 127, 965-967 (1990)

Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G: Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 188, 2349-2356 (1998)

Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT20 cells. *EMBO J* 8, 3801-3808 (1989)

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vladavsky I, Keshet E, Neufeld G: VEGF 145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 272, 7151-7158 (1997)

Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ: Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 131, 254-260 (1992)

Remsey-Semmelweis E, Ramaswamy KH, Brilla Ch, Maisch B, Mossdorf: Vascular endothelial growth factor-1 gene transfer effect of angiogenesis in transmyocardial laser revascularization treated porcine myocardium. *Heart Surg Forum* 6, 8 (2002)

Sato K, Wu T, Laham RJ, Johnson RB, Douglas P, Li J, Sellke FW, Bunting S, Simons M, Post MJ: Efficacy of intracoronary or intravenous VEGF165 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 37, 616-623 (2001)

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985 (1983)

Sharma HS, Tang ZH, Gho BC, Verdouw PD: Nucleotide sequence and expression of the porcine vascular endothelial growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1260, 235-238 (1995)

Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA: The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem* 271, 3877-3883 (1996)

Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E: Patterns of expression of (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally-mediated angiogenesis. *J Clin Invest* 91, 2235-2243 (1993)

Tischer E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor: Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266, 11947-11954 (1991)

Torry RJ, Labarrere CA, Torry DS, Holt VJ, Faulk WP: Vascular endothelial growth factor expression in transplanted human hearts. *Transplantation* 60, 1451-1457 (1995)

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93, 1493-1495 (1996)

Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB: Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem* 271, 29483-29488 (1996)

Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK: Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 14765-14770 (1996)

Zlotnick AY, Ahmad RM, Reul RM, Laurence RG, Aretz HT, Cohn LH: Neovascularization occurs at the side of closed laser channels after transmyocardial laser revascularization. *Surg Forum* 47, 286-287 (1996)

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest:	Aqua bidestillata
Abb.:	Abbildung
APS:	Ammoniumpersulfat
CABG:	Coronary Artery Bypass Grafting
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
cDNA:	komplementäre DNA
DTT:	Dithiothreitol
ECL:	Enhanced Chemo Luminescence
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
aFGF:	acidic Fibroblast Growth Factor
bFGF:	basic Fibroblast Growth Factor
GTC:	Guanidinthiocyanat
HIF-1 α :	Hypoxieinduzierbarer Faktor-1 alpha
IL-1 β :	Interleukin-1 beta
i.v.:	intravenös
INOS:	Induzierbare Stickoxid-Synthetase
KGF:	Keratinocyte Growth Factor
KHK:	Koronare Herzkrankheit
LAD:	Left Anterior Descending (Artery)
dNTP:	desoxy-Nukleotidtriphosphat
Oligo-dT:	Oligo-desoxy-Thymidin
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PG E2:	Prostaglandin E2
PMSF:	Phenylmethansulfonylfluorid
pO ₂ :	Sauerstoffpartialdruck
PTCA:	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
mRNA:	messenger-RNA
RT:	Reverse Transkription
RTase:	Reverse Transkriptase
s.c.:	subkutan

SDS:	Sodiumdilaurylsulfat
TAE:	Trisacetat-EDTA-Puffer
TEMED:	Tetramethylethylendiamid
TGF:	Transforming Growth Factor
TMLR:	Transmyokardiale Laserrevaskularisation
TNF α :	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VE-Wasser:	Voll Entmineralisiertes Wasser

Veröffentlichungen

Kraatz E-G, Misfeld M, Pilgrim MB, Helm C, Großherr M, Sievers H-H:
The Effect of Transmyocardial Laser Revascularization on Intramyocardial
Oxygen Partial Pressure and Vascular Endothelial Growth Factor in an Acute
Ischemic Pig Model.

Vorgelegt auf der 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Herz-,
Thorax- und Gefäßchirurgie, 2001 in Dresden (Poster)

Kraatz E-G, Misfeld M, Pilgrim MB, Helm C, Großherr M, Sievers H-H:
The Effect of Transmyocardial Laser Revascularization on Intramyocardial
Oxygen Partial Pressure and Vascular Endothelial Growth Factor in an Acute
Ischemic Pig Model.

Thorac Cardiovasc Surg 49, 77 (2001) (Supplement)

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Dr. med. Eric Metzen für die gute Betreuung sowohl bei der Durchführung der Versuche als auch während der schriftlichen Ausarbeitung.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Joachim Fandrey für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die Betreuung während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren.

Frau Bettina Stier für die Einarbeitung in den ersten Wochen.

Frau Gabriela Fletschinger für die geduldige Unterstützung im Umgang mit diversen Computerprogrammen und der digitalen Bildverarbeitung.

Allen anderen Mitarbeitern des physiologischen Instituts für das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Dr. Herbert Hirche, ehem. Leiter der AG Biometrie am Institut für medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie der Universität Essen, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Meiner Familie und meinem Lebenspartner für ihre unerschöpfliche Unterstützung und Motivation.

Lebenslauf

Name: Cathrine Helm
Anschrift: Louisenstr. 60
01099 Dresden
Geburtsdatum: 03.10.1975
Geburtsort: Bad Oldesloe

Schulbildung:

1982-1986: Grundschulen in Lübeck und Groß Grönau
1986-1995: Katharineum zu Lübeck

Hochschulbildung:

1995-1996: Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald: Humanmedizin
1996-2002: Universität zu Lübeck: Humanmedizin
1998: Erstes Staatsexamen
2001: Zweites Staatsexamen
2001-2002: Praktisches Jahr
Wahlfach: Dermatologie und Venerologie,
Universität zu Lübeck
Innere Medizin und Chirurgie am Städt. Krankenhaus Süd,
Lübeck
Dezember 2002: Drittes Staatsexamen

1997 bis 2000: Experimentelle Arbeiten zur Doktorarbeit am
Physiologischen Institut der Universität zu Lübeck

Ärztin im Praktikum:

Seit Mai 2003: Hautklinik, Klinikum Dresden-Friedrichstadt, Dresden