

**Aus der Klinik für Herzchirurgie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H.-H. Sievers**

---

*Etablierung und Anwendung einer semiquantitativen PCR  
für den muskulären vaskulären endothelialen  
Wachstumsfaktor (VEGF) der Ziege*

*Grundlagen zur Optimierung der indirekten muskulären  
Myokardrevaskularisation und Biomechanischer Herzen*

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

**- Aus der Medizinischen Fakultät -**

Vorgelegt von  
Wencke Lindwedel  
aus Hannover

Lübeck 2004

**1. Berichtstatter**

Prof. Dr. med. Norbert Guldner

**2. Berichtstatter**

Prof. Dr. med. Hans-Günther Machens

**Tag der mündlichen Prüfung**

27.04.2005

**Zum Druck genehmigt**

Lübeck, den 27.04.2005

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

Meinen Eltern  
in großer Dankbarkeit  
und Liebe

Meinem Vater  
in ehrendem Gedenken

Wie jede Blüte welkt  
und jede Jugend dem Alter weicht,  
blüht jede Lebensstufe,  
blüht jede Weisheit auch  
und jede Tugend zu ihrer Zeit  
und darf nicht ewig dauern.

Es muss das Herz  
bei jedem Lebensrufe  
bereit zum Abschied sein  
und Neubeginne,  
um sich in Tapferkeit und ohne Trauern  
in andre, neue Bindungen zu geben.

Und jedem Anfang  
wohnt ein Zauber inne,  
der uns beschützt  
und der uns hilft zu leben.  
Wir sollen heiter Raum um Raum  
durchschreiten,  
an keinem wie an einer Heimat hängen,  
der Weltgeist will nicht fesseln uns  
und engen,  
er will uns Stuf´ um Stufe heben, weiten.

(Herrmann Hesse)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>3</b>
<hr/>		
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<hr/>		
<b>2.1</b>	<b>Allgemeine Vorbemerkungen</b>	<b>6</b>
<b>2.2</b>	<b>Die koronare Herzkrankheit (KHK)</b>	<b>7</b>
2.2.1	Die perkutane transluminäre Koronarangioplastie (PTCA)	7
2.2.2	Die Bypasschirurgie	8
2.2.3	Neue, ergänzende, chirurgische Therapieverfahren zu muskulären, indirekten Revaskularisationsverfahren	9
<b>2.3</b>	<b>Die terminale Herzinsuffizienz</b>	<b>11</b>
2.3.1	Die Herztransplantation	12
2.3.2	Mechanische Herzunterstützungssysteme	13
2.3.2.1	Die intraaortale Ballongegenpulsation	13
2.3.2.2	Linksherz-Unterstützungssysteme und Kunstherzen	14
2.3.3	Neue, ergänzende, chirurgische Therapieverfahren zur muskulären Herzunterstützung bei terminaler Herzinsuffizienz	14
2.3.3.1	Die dynamische Kardiomyoplastik	15
2.3.3.2	Die Aortomyoplastik	15
2.3.3.3	Muskuläre Pumpventrikel, das Biomechanische Herz	16
<b>2.4</b>	<b>Vaskularisation durch Elektrostimulation des M. latissimus dorsi</b>	<b>17</b>
<b>2.5</b>	<b>Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und seine klinisch-therapeutische Relevanz</b>	<b>19</b>
<b>2.6</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>25</b>
<hr/>		
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>Etablierung einer semiquantitativen PCR zur Messung der VEGF-mRNA der Ziege</b>	<b>26</b>
<b>3.2</b>	<b>Anwendung der Methode</b>	<b>28</b>
3.2.1	Serie 1: Stimulationsverläufe als Pilotserie	30
3.2.2	Serie 2: Ermittlung der VEGF-mRNA-Menge an verschiedenen Muskelorten	30

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.2.3	Serie 3: Ermittlung der VEGF-Menge nach unterschiedlichen Entnahmezeiten	31
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Aufarbeitung der Proben</b>	<b>33</b>
<b>3.4</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>Geräte</b>	<b>39</b>
<hr/>		
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung einer semiquantitativen PCR für den muskulären VEGF der Ziege</b>	
<b>4.2</b>	<b>Auswirkung der Muskelstimulation auf die VEGF-Expression</b>	<b>44</b>
4.2.1	Pilotserie	44
4.2.1.1	Denaturierendes RNA-Gel	44
4.2.1.2	PCR-Gel	45
4.2.1.3	Stimulationsverläufe	46
<b>4.3</b>	<b>Ermittlung der VEGF-Menge an verschiedenen Muskelorten</b>	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Ermittlung der VEGF-Menge nach unterschiedlichen Entnahmezeiten</b>	<b>53</b>
<hr/>		
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Sequenz des VEGF-Gens der Ziege</b>	<b>59</b>
<b>5.2</b>	<b>Vaskularisierung durch Elektrostimulation</b>	<b>61</b>
5.2.1	Auswahl der Tiere und Probenentnahme	63
<b>5.2.2</b>	<b>Stimulationsmuster und Reizstärken</b>	<b>64</b>
5.2.3	VEGF-Bestimmung in den Muskelproben	67
5.2.4	Verteilung des VEGF innerhalb des Muskels	68
<b>5.3</b>	<b>Relevanz dieser Arbeit</b>	<b>69</b>
<hr/>		
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<hr/>		
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<hr/>		
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>89</b>
<b>8.1</b>	<b>Abbildungen und Sequenzierungsergebnisse</b>	<b>89</b>
<b>8.2</b>	<b>Danksagung</b>	<b>94</b>
<b>8.3</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>95</b>

# 1. Abkürzungen

A	Adenosin
Ag	Attogramm ( $10^{-18}$ g)
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
C	Cytidin
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EGF	endothelialer Wachstumsfaktor
fg	Femtogramm ( $10^{-15}$ g)
flt	“fetal liver kinase”
flk	“fsm-like tyrosine kinase”
G	Guanosin
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GTC	Guanidinium Thiocyanat
h	Stunde
Hz	Hertz
kb	Kilobasen, Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
M.	Musculus
mA	Milliampere
ME	Mercaptoethanol
ml	Milliliter
mg	Milligramm
$\mu$ g	Mikrogramm

## ABKÜRZUNGEN

---

µl	Mikroliter
µM	Mikromol
Min.	Minuten
MOPS	3- [N- Morpholino]- propansulfonsäure
ng	Nanogramm ( $10^{-9}$ g)
nm	Nanometer ( $10^{-9}$ m)
NYHA	New York Heart Association
OP	Operation
oligo-dT	Thymidin-Oligonukleotid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor, Wachstumsfaktor aus Blutplättchen
pmol	Pikomol ( $10^{-12}$ mol)
pH	pondus Hydrogenii (Potenz und Maß für die Wasserstoffionenkonzentration)
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	“messenger- RNA”, Boten-RNA
rRNA	ribosomale RNA
RNAsen	RNA-abbauende Enzyme
RT	reverse Transkription
RTase	retrovirales Enzym für die reverse Transkription
s / sec.	Sekunden
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T	Thymidin; Temperatur
T <sub>ann</sub>	Annealing-Temperatur (Arbeitstemperatur der Primer)
T <sub>m</sub>	Hybridisierungstemperatur (Schmelztemperatur) der Primer
Taq- Polymerase	Thermophilus aquaticus- Polymerase (Enzym für die Polymerasenkettenreaktion)
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
% (v/v)	Volumenprozent
V	Volt

## ABKÜRZUNGEN

---

VEGF	Vascular endothelial growth factor vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VPF	Vascular permeability factor vaskulärer Permeabilitätsfaktor
% (w/w)	Gewichtsprozent

## 2. Einleitung

### 2.1 Allgemeine Vorbemerkungen

In den westlichen Industrieländern sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Todesursache Nummer eins. Ursächlich sind dabei am häufigsten die koronare Herzkrankheit (KHK) sowie die terminale, also medikamentös ausbehandelte, Herzinsuffizienz.

In dieser Arbeit soll eine molekularbiologische Methode zur Erfassung des Kapillarisierungsvorganges im Musculus latissimus dorsi von Ziegen etabliert werden. Der breite Rückenmuskel kann sowohl für die indirekte Myokardrevaskularisation bei koronarer Herzkrankheit (KHK) als auch für Biomechanische Herzen bei terminaler Herzinsuffizienz therapeutisch eingesetzt werden. Bei der indirekten Myokardrevaskularisation wird der M. latissimus dorsi als gestielter Muskellappen auf das Myokard fixiert (Kardiomyopexie) und bildet Anastomosen mit dem Kapillarnetz der Koronarien. Vor dem Bau Biomechanischer Herzen wird der M. latissimus dorsi elektrisch präkonditioniert, um intramuskuläre Kollateralen aus Kapillaren auszubilden, damit er als Skelettmuskelventrikel besser durchblutet und somit leistungsfähiger wird. Deshalb ist es erforderlich, die Kapillarisierungsfaktoren des Muskels genauer zu kennen und Methoden zu entwickeln, über welche Kapillarisierungsvorgänge im Muskel moduliert werden können. In dieser Arbeit wird untersucht, ob die muskulär bestimmte Menge eines Kapillarisierungsfaktors, des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), Aufschlüsse über den Vaskularisierungsvorgang und den späteren Vaskularisierungsgrad des M. latissimus dorsi geben kann. VEGF wurde bereits in vielen hypoglykämischen und hypoxischen Geweben sowie in trainierten Muskeln anderer Spezies vermehrt nachgewiesen. Insofern war der VEGF für unsere grundlegenden Untersuchungen von Interesse. Da die Sequenz des VEGF-Gens der Ziege bisher unbekannt war, musste der Genabschnitt zunächst sequenziert und eine kompetitive PCR für den muskulären VEGF der Ziege etabliert werden. Anschließend sollte die Methode angewandt werden. In einer ähnlichen Studie an Ratten ist festgestellt worden, dass nach einigen Tagen der

Muskelstimulation der muskuläre Gehalt an VEGF deutlich ansteigt und die Kapillardichte in der Muskulatur zunimmt (*Hang et al., 1995*).

## 2.2 Die Koronare Herzkrankheit (KHK)

Die KHK ist durch arteriosklerotische Veränderungen der Koronararterien charakterisiert. Bei der Arteriosklerose erfolgt eine Einlagerung von Lipiden, Bindegewebe und Kalk in die Gefäßwände. Es entwickeln sich Engstellen bis zu hochgradigen Gefäßstenosen, die zum Gefäßverschluss führen können (*Vladover und Edwards, 1971*). Ein kompletter Verschluss einer Koronararterie hat eine Minderdurchblutung des myokardialen Versorgungsgebietes mit nachfolgendem Gewebsuntergang (Infarkt) zur Folge. In den westlichen Industrieländern ist die KHK mit Herzinfarkten, Herzrhythmusstörungen, einer Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod die häufigste Todesursache. Die Therapie ist abhängig vom Schweregrad der KHK: bei leichten Formen der KHK kann versucht werden, durch eine Umstellung der Lebensweise des Patienten (Nikotinkarenz, bewusster Ernährung, mehr Bewegung, optimale BZ-Einstellung) oder medikamentös (Nitrate, Thrombozytenaggregationshemmer, Betablocker, Kalziumantagonisten, Lipid- und Cholesterinsenker etc.) das Fortschreiten der Erkrankung zu verzögern. Wenn alle konservativen Therapiemöglichkeiten erschöpft sind, kann je nach Beschaffenheit der Stenose eine „perkutane transluminale Koronarangioplastie“ (PTCA) oder die chirurgische Revaskularisation des Myokards mit Hilfe der Bypasschirurgie (*Siewert: Chirurgie, 1998*) erfolgen.

### 2.2.1 Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA)

Die PTCA, auch als Ballonkatheterdilatation bezeichnet, ist eine invasive kardiologische Behandlungsmethode, bei der in der Regel über die A. femoralis und die Aorta ein Ballonkatheter in die Koronarien eingeführt wird. Mittels dieses Katheters sind viele Stenosen, vor allem proximal gelegene, dilatierbar. Über diesen Katheter ist es ebenfalls möglich, einen Versuch der Fibrinolyse direkt am Thrombus mit Instillation von Fibrinolytika (Streptokinase oder Urokinase) durchzuführen. Die primäre Erfolgsrate der

Ballondilatation beträgt bei frischen Stenosen 90%, bei älteren Stenosen (>3 Mon.) 70% (*Gruntzig et al., 1981; Dabrowski et al., 1990*). Ein Nachteil dieser Behandlungsmethode ist die hohe Rate an Wiederverschlüssen: innerhalb von 4-6 Monaten bilden sich bei rund 30% aller behandelten Patienten Rezidivstenosen (*Aschermann et al., 1993*). Aus diesem Grund kommen bei vielen Patienten Metallgitter, sogenannte Stents, zum dauerhaften Freihalten der Gefäße zum Einsatz. Diese werden über den Katheter bis in die Koronarstenose vorgeschoben und nach vorheriger Aufweitung des kranken Gefäßabschnittes platziert. Diese Methode bietet den Vorteil, dass die Koronargefäße anschließend ein größeres Lumen aufweisen als bei der Ballondilatation und keiner Gefäßspastik mehr unterworfen sind (*Haude et al., 1996*). Die Rate der relevanten Stentstenosierungen (>50% des Lumens) beträgt durchschnittlich ca. 15% und ist somit im Vergleich zur reinen Ballondilatation um etwa die Hälfte geringer (*Miketic et al., 2002; Kimura et al., 1993*).

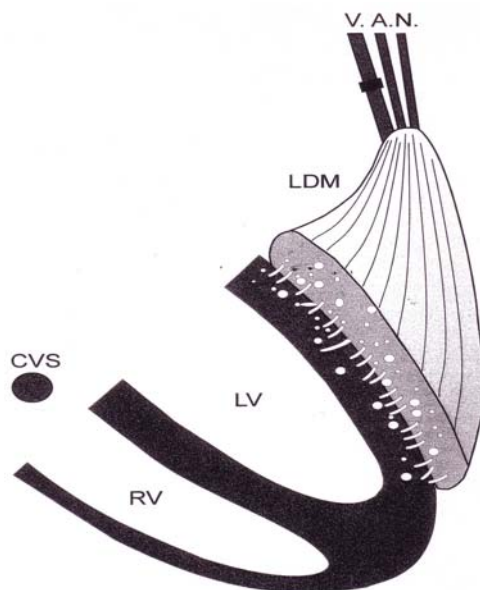
### **2.2.2 Die Bypasschirurgie**

Bei der Bypasschirurgie werden im Wesentlichen zwei verschiedene Überbrückungsverfahren eingesetzt: einmal durch Venen (Vena saphena magna) und zum anderen durch Arterien (Arteria mammaria bzw. Arteria thoracica interna). Favoloro überbrückte erstmalig eine Koronarstenose mittels eines Vena saphena-Segmentes (*Favoloro, 1969*). Von allen Patienten, die der Bypasschirurgie zugeführt werden, erleiden durchschnittlich 30% innerhalb eines postoperativen Zeitraumes von 10 Jahren klinisch relevante, behandlungsbedürftige Restenosen (*Espinola-Klein et al., 1998*). Die Rate der Restenosen kann durch das zusätzliche Einsetzen von Stents in die stenotischen Abschnitte der Koronararterien um etwa 10% gesenkt werden (*Chizynski, 2003; Poyen et al., 2003*). In der Bypasschirurgie müssen zu versorgende stenotische Koronararterien ausreichend dick sein (ca. 1,5 - 2 mm). Außerdem sollte das stenotische Blutgefäß möglichst im proximalen Gefäßabschnitt liegen und der distal der Stenose gelegene Gefäßabschnitt dabei weitestgehend frei von arteriosklerotischen Wandveränderungen sein, denn der Bypass benötigt ein freies Abstromgebiet. Aufgrund dieser Erfordernisse sind beispielsweise Patienten mit einer Mikroangiopathia diabetica oder mit einer „diffuse small vessel coronary artery disease“, bei denen auch in der Peripherie Gefäßstenosen vorliegen, von der Bypasschirurgie ausgeschlossen. Denn bei fehlenden peripheren

Abflussmöglichkeiten des Blutes droht aufgrund der Flussverlangsamung eine schnelle Thrombosierung der transplantierten Gefäße. Für solche Patienten bleibt in entsprechend fortgeschrittenem Krankheitsstadium als ultima ratio lediglich die Transplantation eines Spenderherzens (*Siewert: Chirurgie, 1998*). Hypervaskularisierte Muskulatur, die direkt auf das Myokard aufgebracht wird und mit dem Koronargefäßgebiet kommuniziert, könnte dabei eine klinisch brauchbare Alternative bilden, wie bereits erste klinische Erfahrungen zeigen (*Beyer, 1997*).

### 2.2.3 Neue, ergänzende, chirurgische Therapieverfahren zu muskulären, indirekten Revaskularisationsverfahren

Die indirekte Myokardrevaskularisation durch Muskulatur, welche als Kardiomyopexie bezeichnet wird, ist eine Alternative zur Bypasschirurgie. Bei der Kardiomyopexie wird körpereigenes Muskelgewebe zwischen Epikard und Perikard gebracht. Hierbei wird das Epikard mechanisch entfernt und anschließend das vorher präparierte Muskelgewebe (z.B. M. latissimus dorsi) aufgebracht.



V. = Vene, A. = Arterie, N. = Nerv, LDM = Musculus latissimus dorsi  
 LV = linker Herzventrikel, RV = rechter Herzventrikel

*Abb. 2a: Kardiomyopexie ( indirekte Myokardrevaskularisation durch Muskulatur)  
 - hier unter Verwendung des M. latissimus dorsi*

Bisher gab es Versuche, verschiedene Gewebe auf den Herzmuskel aufzubringen wie z. B. Omentum (*Davis et al., 1938; O`Shaughnessy, 1937*), Lungengewebe (*Lezius, 1937; Carter et al., 1949; Garamella et al., 1956*), Dünndarm (*Baronowsky et al., 1954; Key et al., 1954*) und Haut mit angrenzendem Subkutangewebe (*Moran et al., 1952*). Die Arbeitsgruppe um Becks transplantierte 1937 erstmals einen gestielten Skelettmuskel auf die Herzvorderwand, um dadurch Patienten mit einer KHK zu behandeln. Sie war damit Vorreiter für die indirekte Myokardrevaskularisation durch den M. latissimus dorsi.

Bereits seit mehreren Jahrzehnten sind weltweit zahlreiche Arbeitsgruppen bemüht, neue Wege in der Behandlung der KHK sowie der terminalen Herzinsuffizienz zu finden und die Durchblutung des Herzmuskels durch indirekte Revaskularisation mit körpereigenem Material durchzuführen. Zur Therapie der Herzinsuffizienz werden vermutlich Biomechanische Herzen (BMH) zum Einsatz kommen, welche ebenfalls aus körpereigenem Muskelmaterial sowie einer Polyesterpumpkammer bestehen. Sowohl für die Revaskularisation von Myokardgewebe mittels Kardiomyopexie als auch für die Entwicklung Biomechanischer Herzen hat sich inzwischen der größte Muskel des Rückens, der Musculus latissimus dorsi, etabliert. Dieser Muskel ist für den Patienten entbehrlich (*Bogduk et al., 1998*), vor allem jedoch verfügt er über eine eigene arterielle Versorgung durch die A. thoracodorsalis. Es gibt bereits zahlreiche klinische Studien, die die therapeutische Verwendung dieses Muskels belegen (*Chachques et al., 1988; Christ et Spira, 1982; Beyer et al., 1997; Barron et al., 2001; Kashem et al., 2001*), jedoch wurden bisher nach den Operationen stets Muskelzelluntergänge sowie eine Minderversorgung peripherer Abschnitte der Mm. latissimi dorsi gefunden (*Tang et al., 1999; Monnet et al., 1999*). Dies ist begründet in einem Missverhältnis zwischen einem akuten Mehrbedarf an Sauerstoff und Nährstoffen der Muskelzellen und einer im Verhältnis hierzu sehr viel langsameren Proliferation von Kapillaren. Zudem wird der distale Teil des M. latissimus durch Seitenäste der Intercostalarterien versorgt. Dies ist der Grund dafür, dass bei früheren Versuchen mit Schwenkplastiken dieses Muskels nach einiger Zeit Teilnekrosen im distalen Muskelgewebe zu finden waren. Inzwischen ist bekannt, dass die Verbindungen zu den Intercostalarterien durchtrennt werden, wenn der Muskel operativ eingesetzt wird. Durch die Vorstimulation wird zwischen dem von den Intercostalarterien versorgten Anteil und dem proximalen Muskelanteil, der über die A. thoracodorsalis durchblutet wird, eine Öffnung präformierter Kollateralen bewirkt, so dass die distalen Bereiche des Latissimus nicht mehr nekrotisch werden (*Tang et al., 1998; Salmons et al.,*

1998). Außerdem bewirkt eine elektrische Prästimulation des Muskelgewebes eine Zunahme der Kapillardichte.

Eine Vorstimulierung des Muskels ist somit für das Gelingen jedes operativen Vorgehens erforderlich. Ein Training des Latissimus kann *in situ* bzw. mit Hilfe eines speziellen Trainingsgerätes einige Zeit vor der geplanten Transplantation erfolgen (Guldner et al., 1994; Barron et al., 2001) und soll dem Muskel bessere Möglichkeiten der Kapillarisation und damit der Anpassung an seinen erhöhten Sauerstoffbedarf geben.

Bei der Kardiomyopexie wird nach dem Vorgehen von M. Beyer die A. thoracodorsalis in die Aorta implantiert und der venöse Abfluss direkt in den rechten Vorhof geleitet (Beyer et al., 1996). Vom M. latissimus sprießen Kapillaren von außen in das Myokardgewebe ein und verbessern so das Blutangebot und damit die O<sub>2</sub>-Versorgung des Herzmuskels (Beyer, 1997). Dieses therapeutische Verfahren bietet insbesondere Patienten mit multiplen peripheren und koronaren Gefäßverschlüssen, für die eine Bypasschirurgie nicht in Frage kommen würde, eine alternative Therapieoption (Beyer et al., 1996).

### 2. 3. Die terminale Herzinsuffizienz

Als Herzinsuffizienz wird die Unfähigkeit des Herzens bezeichnet, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen trotz eines ausreichenden venösen Blutangebotes zu fördern (Lohr/Keppler: *Innere Medizin*, 1998).

Die Herzinsuffizienz ist die häufigste Diagnose bei hospitalisierten Patienten über 65 Jahren in der BRD und tritt als Folge unterschiedlicher Grunderkrankungen auf:

1. Herzmuskelerkrankungen, z.B. bei Myokarddegeneration (Koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt), Kardiomyopathien (etwa nach Myokarditis), oder Speicherkrankheiten wie die Hämochromatose
2. Mechanisch-hämodynamische Störungen wie z.B. Herzklappenfehler oder narbige Herzbeutelentzündungen
3. Herzrhythmusstörungen (Lohr/Keppler: *Innere Medizin*, 1998)

Die häufigste Ursache für eine Herzinsuffizienz ist die KHK mit 70%. Die Klinik der Herzinsuffizienz ist gekennzeichnet durch Rückstausymptome wie Lungenödem,

Lebervergrößerung, Aszites, prätibiale und Knöchelödeme, Pleuraergüsse, Zyanose und Tachykardie. Als terminale Herzinsuffizienz bezeichnet man die medikamentös austherapierte Herzinsuffizienz.

Trotz erheblicher therapeutischer Fortschritte im Bereich der medikamentösen Therapie während der vergangenen 10 Jahre gibt es viele therapieresistente Patienten, die unter keiner der für die Herzinsuffizienz üblicherweise eingesetzten Substanzen wie ACE-Hemmer, AT<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten, Diuretika,  $\beta$ -Blocker und Nitrate eine Verbesserung nach den NYHA-Kriterien zeigen. Circa 30% der Patienten mit manifester Herzinsuffizienz versterben im ersten Jahr nach Diagnosestellung (*Berthold: Klinikleitfaden Arzneimitteltherapie, 1999*). Die einzig definitive Therapie einer terminalen Herzinsuffizienz ist heutzutage die Herztransplantation.

### **2.3.1 Die Herztransplantation**

Die Herztransplantation bietet Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz eine realistische Überlebenschance, jedoch werden weltweit weitaus mehr Spenderherzen benötigt, als zur Verfügung stehen. Deshalb gibt es strenge Auswahlkriterien für die Empfänger von Spenderherzen und lange Wartezeiten für die Transplantationen (*Long and Borkon, 1999*). Rund ein Viertel aller Patienten, die auf der Liste für ein Spenderherz stehen, überlebt die Wartezeit bis zur Transplantation nicht (*Laks et al., 1997*). Für Patienten, die über 65 Jahre alt sind und zusätzlich unter anderen Begleiterkrankungen leiden, besteht keine Chance auf den Erhalt eines Spenderherzes (*Allen et al., 1997*). Mit einer Zahl von 500 Herztransplantation pro Jahr in Deutschland und ca. 3000 jährlich weltweit kann noch nicht einmal 5% des Bedarfs an Herztransplantationen gedeckt werden. Nach gelungener Transplantation muss zur Prophylaxe einer Abstoßungsreaktion eine lebenslängliche immunsuppressive Therapie durchgeführt werden (*Hunt et al., 2000*), infolge derer häufig schwere Infektionen das Leben der Patienten bedrohen (*Keck et al., 1997; Brann et al., 1998; Sebbag et al., 2001*).

## 2.3.2 Mechanische Herzunterstützungssysteme

### 2.3.2.1 Die intraaortale Ballongegenpulsation

Bei dieser Methode wird ein aufblasbarer Ballonkatheter in die thorakale Aorta descendens eingeführt. Dies erfolgt meistens über die A. femoralis (*Shahian and Jewell, 1988*). In der Systole ist der Ballon vollständig kollabiert, so dass der Blutstrom ungehindert fließen kann. In der Diastole wird der Ballon aufgebläht: das Blutvolumen wird im Bereich des Ballons verschoben und der intraaortale Druck erhöht, was zu einer Verbesserung der diastolischen Koronarperfusion führt. Zudem bewirkt eine rasche Entleerung am Ende der Diastole einen Abfall des Blutdruckes kurz vor der Aortenklappe, wodurch die Nachlast der linken Herzkammer sinkt (*Datascope GmbH, Grundlagen der intraaortalen Ballongegenpulsation, 1995*).

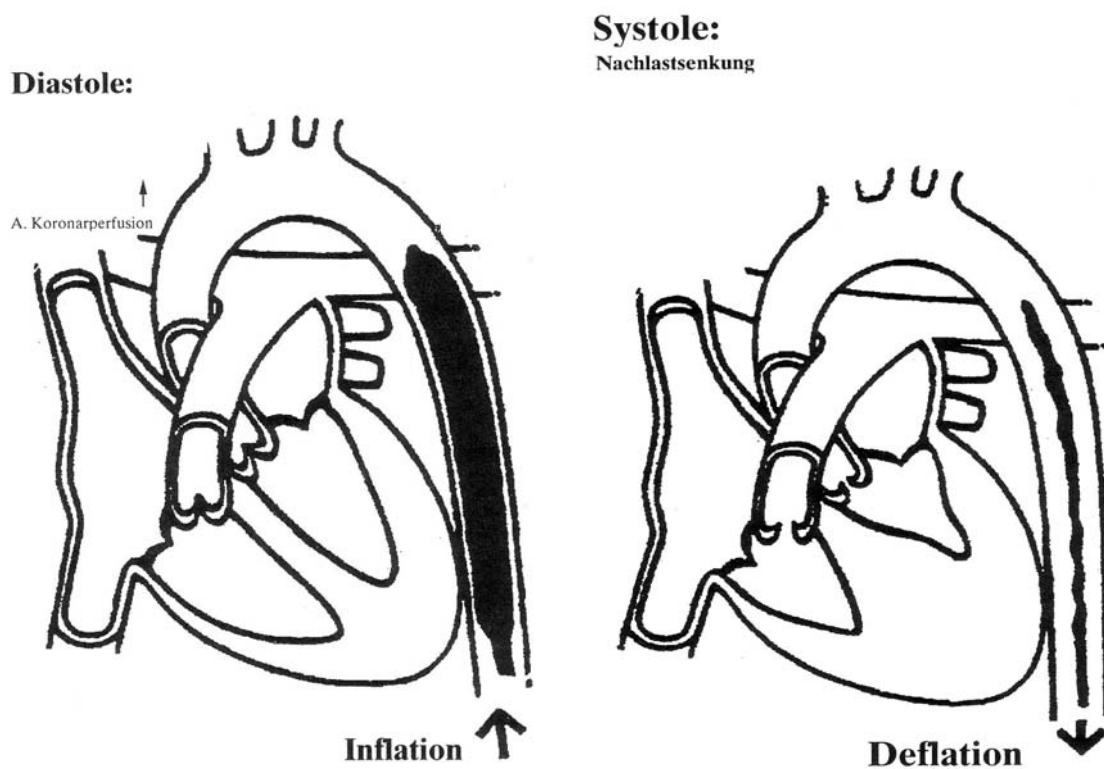


Abb. 2b: Wirkprinzip der intraaortalen Ballonpumpe mit Erhöhung des Aortenmitteldruckes (Inflation) und besserer Koronardurchblutung und Nachlastsenkung (Deflation); (*Datascope GmbH, Grundlagen der intraaortalen Ballongegenpulsation, 1995*).

Die Methode der intraaortalen Gegenpulsation wird zur zeitlich begrenzten Entlastung und Erholung des Myokards eingesetzt (*Mehlhorn et al., 1999*), ist jedoch bisher nicht als Dauertherapie z.B. bei terminaler Herzinsuffizienz geeignet, da der Ballonkatheter einen Fremdkörper darstellt, der entsprechende rheologische Probleme und Infektionsrisiken sowie das Risiko einer Aortendissektion und anderer Verletzungen mit sich bringt (*Meco et al., 2002; Meharwal und Trehan, 2002*).

### **2.3.2.2 Linksherz-Unterstützungssysteme und Kunstherzen**

Kunstherzen werden hauptsächlich zur Überbrückung bis zur Verfügbarkeit eines geeigneten Spenderherzens eingesetzt. Hier wären exemplarisch zu nennen das sog. „Berlin-heart“ aus Metall (*Hetzer et al., 1992; Schiessler et al., 1994; Goullon et Ries, 1994; Loebe et al., 1997*) bzw. das Linksherzunterstützungssystem „Novacor N100“ aus Kunststoff (*Robbins and Oyer, 1999; Wheeldon et al., 2000; Dagenais et al., 2001*). Obwohl in neuesten Studien mit voll implantierbaren linksventrikulären Unterstützungssystemen bereits Überlebenszeiten von mehreren Monaten erreicht werden (*Aaronson et al., 2002*), konnten dennoch bisher solche Herzunterstützungssysteme die Funktionen des körpereigenen Organs nicht dauerhaft ersetzen. Der Nachteil dieser künstlichen Blutpumpen ist neben ihrer unphysiologisch geringen Elastizität vor allem auch die große Fremdoberfläche mit der daraus resultierenden hohen Thrombemboliegefahr und der Notwendigkeit einer ständigen Antikoagulation des Patienten (*Wagner et al., 1992; Schmid et al., 1998; Tandler et al., 2000*).

### **2.3.3 Neue, ergänzende, chirurgische Therapieverfahren zur muskulären Herzunterstützung bei terminaler Herzinsuffizienz**

Bei terminaler Herzinsuffizienz stehen derzeit nur wenige Therapieoptionen zur Verfügung. Die einzige, welche eine realistische Überlebenschance bietet, ist die Transplantation eines Spenderherzens. Diese Methode steht jedoch nur jüngeren Patienten zur Verfügung. Kunstherzen stellen einen Fremdkörper im Organismus dar und dienen lediglich der zeitlichen Überbrückung. Deshalb liegt es nahe, nach körpereigenem Muskelmaterial zu suchen, welches das Herz als kontraktiles Element unterstützen kann, um somit nichttransplantierbaren Patienten eine Therapiealternative zu schaffen.

### 2.3.3.1 Die dynamische Kardiomyoplastik

Das Konzept der Kardiomyoplastik beruht darauf, mittels eines oder beider Mm. latissimi dorsi das Herz systolisch von außen zu komprimieren und durch diese kontraktile Unterstützung den Blutkreislauf bei terminaler Herzinsuffizienz aufrecht zu erhalten. Bei dieser 1985 von der Arbeitsgruppe Carpentier entwickelten Methode wird einer (*Carpentier and Chachques, 1985; Chachques and Carpentier, 1992*) oder werden beide Mm. latissimi dorsi (*Furuta et al., 1999*) operativ als gestielte Myoplastik nach vorn gezogen und schlaufenartig um das gesamte Herz gewickelt, wobei die Muskeln ihre eigene Gefäßversorgung durch die A. thoracodorsalis behalten. Die Mm. latissimi dorsi werden in der Folgezeit durch einen Muskelstimulator zur Kontraktion angeregt. Meist wurden hierbei jedoch einige Zeit nach der Operation Muskelzelluntergänge sowie eine Minderversorgung peripherer Abschnitte der Mm. latissimi dorsi gefunden (*Tang et al., 1999; Monnet et al., 1999*). Diesen Problemen wird deshalb mit einer Vorstimulierung des Muskels begegnet (*Guldner et al., 1994; Barron et al., 2001*). Dieses Muskeltraining zeigt insofern Erfolge, als es mit einer vermehrten Kapillarisation und verminderten Muskelzelluntergängen einhergeht (*Barron et al., 2001*).

Bis jetzt hat die Kardiomyoplastik in einigen klinischen Studien zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Patienten geführt. Trotz aller Versuche, die Methode weiter zu optimieren, ist sie jedoch kein Ersatz für eine Herztransplantation (*Driever et al., 2001*). Möglicherweise stellt die hohe Wandspannung des insuffizienten Herzens einen zu großen Widerstand für den Skelettmuskel dar, den selbst der vorstimulierte M. latissimus nicht überwinden und dauerhaft eine ausreichende Auswurfleistung erzielen kann.

### 2.3.2.2 Die Aortomyoplastik

Bei der Aortomyoplastik handelt es sich um eine Muskelplastik, bei der ein Teil des M. latissimus als Schlinge direkt um die aufsteigende (*Trainini et al., 1999*) oder absteigende Aorta gelegt wird (*Cmolik et al., 2001*). Die Aortomyoplastik wird EKG-getriggert stimuliert und vermag durch Kontraktionen während der Diastole die Koronarperfusion zu verbessern. Die Aortomyoplastik zeigt daher ähnliche hämodynamische Effekte wie die intraaortale Ballonpumpe (*Bolotin et al., 1999*). In der Diastole wird ein Rückfluss des Blutes in Richtung Aortenwurzel und Koronargefäße bewirkt, präsysstolisch sorgt die Erschlaffung der Muskelkammer für einen akuten

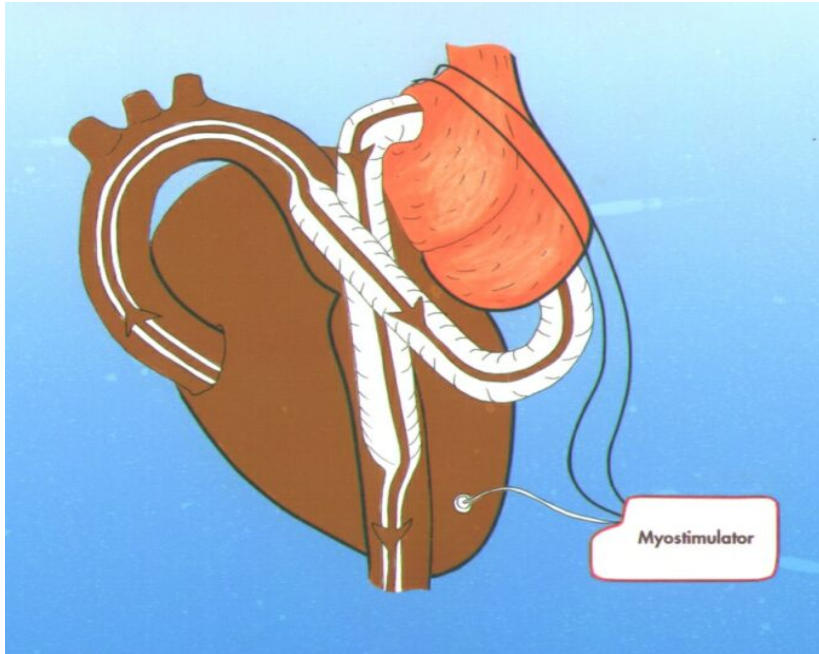
Druckabfall im Aortenbogen. Damit wird die Nachlast der linken Herzkammer gesenkt und die Koronarperfusion verbessert. Der Patient ist nach der Operation mobil und nicht auf eine Apparatur angewiesen, wie es bei der Aortenballonpumpe der Fall ist. Zudem ist bei dieser Technik keine Antikoagulation notwendig.

Es gibt bereits vielversprechende Patientenstudien (*Trainini et al., 1999; Chachques et al., 2000*), welche gute Erfolge in Hinsicht auf eine verbesserte Auswurfleistung des Herzens, eine Abnahme der myokardialen Wanddicke und einer deutlichen Verbesserung der klinischen Befindlichkeit der Patienten im Sinne der NYHA-Kriterien aufzeigen.

### **2.3.2.3 Muskuläre Pumpventrikel, das Biomechanische Herz**

In den letzten Jahren sind muskuläre Blutpumpen entwickelt worden, bei denen aus dem M. latissimus dorsi in Verbindung mit einer künstlichen Pumpkammer ein zusätzlicher Pumpventrikel gebildet wird. Dieser wird an den Blutkreislauf angeschlossen, indem operativ zwei aorto-aortale Anastomosen zur thorakalen Aorta descendens geschaffen werden (*Guldner et al., 2001*). Möglich ist auch eine Verbindung zwischen der thorakalen Aorta descendens und der linken Herzkammerspitze (*Huiping et al., 1993; Greer et al., 1995*).

Beim Biomechanischen Herzen wird um eine Pumpkammer der gestielte M. latissimus dorsi gewickelt und über Stimulationselektroden mittels eines Muskelschrittmachers diastolisch zur Kontraktion gebracht (*Guldner et al., 2001*).



*Abb. 2c: Das Biomechanisches Herz in aorto-aortaler Konfiguration  
(nach Guldner und Mitarbeiter)*

Das Biomechanische Herz macht zwar im Gegensatz zur Aortomyoplastik eine Antikoagulation notwendig, seine entlastende Wirkung auf das Herz ist jedoch größer als bei einer Aortomyoplastik, denn es bewirkt nicht nur eine aortale Gegenpulsation mit Druckänderungen, sondern einen Volumentransport von 2 bis 3 Litern pro Minute zusätzlich zur verbliebenen Pumpleistung des erkrankten Herzens.

## 2.4 Vaskularisation durch Elektrostimulation des Musculus latissimus dorsi

Für den Erfolg der oben genannten Therapien, bei denen der M. latissimus dorsi als körpereigenes Gewebe eingesetzt wird, ist ein optimaler Kapillarisierungszustand des Skelettmuskels mit einer gesicherten Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr notwendig. Der Rückenmuskel ist prinzipiell für Haltefunktionen sowie für schnelle Kontraktionen ausgestattet, nicht jedoch für dauerhafte rhythmische Kontraktionen geeignet. Er wird für die Innenrotation, Adduktion und Retroversion des Armes sowie als expiratorischer

Hilfsatemmuskel rekrutiert und entfaltet seine größte Wirkung beim Ausholen zum Hieb, wie etwa beim Tennisspielen und Holzhacken. Als einer der Haltemuskeln des Stützapparates besteht der M. latissimus dorsi zu ca. 30-40 % aus den langsamen (roten) Typ I-Muskelfasern, die überwiegend oxidativ arbeiten, und zu 60-70 % aus den schnellen (weißen) Typ II-Muskelfasern, welche ihre Energie überwiegend aus der anaeroben Glykolyse beziehen. Die Skelettmuskeln der Extremitäten hingegen bestehen nur zu etwa 25% aus den Typ I-Muskelfasern und dafür zu 75% aus den Typ II-Muskelfasern (*Annex et al., 1998*). Während die roten Muskelfasern sich langsam kontrahieren, dafür aber lange und ausdauernd Haltearbeiten verrichten können, kontrahieren sich weiße Muskelfasern rasch, ermüden jedoch auch ebenso schnell. Ob eine Muskelfaser sich schnell oder langsam kontrahiert, hängt von der ATPase-Aktivität ihrer Myosinköpfe und der Geschwindigkeit der Filament-Gleit-Zyklen ab. Schnelle Typ II-Muskelfasern haben eine hohe ATPase-Aktivität und einen schnellen Filament-Gleit-Zyklus. Aus diesem Grund arbeiten sie unter hohem ATP-Verbrauch und beziehen ihre Energie kurzfristig aus dem anaeroben Stoffwechsel. Durch eine extrem hohe glykolytische Kapazität können sie sehr schnell Energie zur Verfügung stellen, sind nicht in dem Maße von der Sauerstoffzufuhr abhängig wie die roten Muskelfasern und ermüden, wenn ihre Glykogenreserven aufgebraucht sind. Die langsamen Typ I-Muskelfasern hingegen verbrauchen weniger ATP und verfügen über einen sehr viel höheren Myoglobingehalt als die schnellen Fasern. Somit steht ihnen wesentlich mehr Sauerstoff zur Verfügung, und sie können lange aerob arbeiten (*Silbernagl und Klinke, 1996*). Diese langsamen Muskelfasern verfügen über eine sehr viel höhere Kapillardichte als die schnellen Typ II-Muskelfasern; die Kapillardichte des Herzmuskels hingegen ist noch einmal um das 10-fache größer als die der langsamen Typ I-Muskelfasern (*Annex et al., 1998*). Letztlich gehört zu jeder Herzmuskelzelle eine Kapillare. Herzmuskelzellen sind ebenso wie Skelettmuskelzellen quergestreift. Diese Querstreifung kommt zustande durch die Anordnung der kontraktilen Grundelemente beider Muskelarten, der Myofibrillen, bestehend aus den Proteinen Aktin und Myosin. Die Skelettmuskulatur wird überwiegend vom somatischen Nervensystem innerviert und kann willkürlich betätigt werden, während die Herzmuskulatur von einem autonomen vegetativen Nervensystem gesteuert wird. Somit entspricht der Herzmuskel einer einzigen motorischen Einheit. Bei den Skelettmuskelzellen liegen die zahlreichen Zellkerne (bis zu 100) randständig, während die 2-3 Zellkerne der Herzmuskelzelle zentral angeordnet sind. Die Skelettmuskulatur besteht ferner aus unverzweigten Muskelfasern, während die

Herzmuskelzellen ein verzweigtes Netz bilden und über sogenannte „Disci intercalares“ (End-zu-End-Verbindungen) miteinander verbunden sind. Über die Verbindungsstellen (gap junctions) dieser Disci intercalares breitet sich die Erregung im Herzen von Zelle zu Zelle aus. Nerven sind hierbei – im Gegensatz zu den Skelett-Muskelzellen – nicht beteiligt. Vor allem aber besitzen die Herzmuskelzellen mehr Mitochondrien und Sarkoplasma, also mehr Möglichkeiten der Energiegewinnung, als Skelettmuskelfasern. Die Kapillardichte und damit die Versorgung des Muskels mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie seine zellulären Gegebenheiten zur Gewinnung von Energie spielen eine sehr wichtige Rolle bei seiner Kontraktilität und Belastbarkeit.

Es ist vielfach experimentell belegt, dass Skelettmuskeln bei häufiger Aktivierung ihre Leistungsfähigkeit steigern. Hierbei ändern sich je nach Muskelfasertyp verschiedene Parameter: langsame (Typ I)-Muskulatur steigert ihren Gehalt an Myoglobin, Mitochondrien und Kapillaren, wobei die Masse des Muskels wenig geändert wird. Schnelle (Typ II)-Muskeln dagegen vermehren die Zahl ihrer Myofibrillen sowie den Glykogenvorrat. Infolgedessen nehmen der Faserdurchmesser und damit der Muskeldurchmesser zu, was auch als Hypertrophie bezeichnet wird. Voraussetzung für diese zellulären Veränderungen ist jedoch immer eine optimale Vaskularisierung des Muskels.

In der vorliegenden Arbeit ist auf die Erfahrungen früherer Studien mit Dauerstimulationsmustern (*Guldner et al., 1994; Guldner et al., 1997*) zurückgegriffen worden.

## 2.5 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und seine klinisch-therapeutische Relevanz

### 2.5.1 Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF)

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) wird auch vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) genannt. VEGF wurde 1989 entdeckt. In zahlreichen molekularbiologischen Studien der vergangenen 13 Jahre hat sich das Protein VEGF etabliert, welches als Markerprotein für hypoxische und hypoglykämische Gewebe

angesehen werden kann und in Geweben ein vermehrtes Kapillarwachstum anregt. Er ist ein homodimeres Glykoprotein, der zu den potentesten Induktoren der Angiogenese und der Neovaskularisation gehört und spezifisch auf Endothelzellen wirkt (*Ferrara et al., 1992*). Im Embryo bewirkt VEGF hauptsächlich die Neovaskularisation, also die mesodermale Bildung erster Gefäße (*Breier et al., 1992*), während VEGF im adulten Organismus hauptsächlich die Angiogenese, das heißt das Aussprossen neuer Kapillaren aus bereits bestehenden induziert (*Heits et al., 1998*). Wie wichtig die Funktion des VEGF für den Embryo in seiner Entwicklung ist, zeigen die Ergebnisse zweier Arbeitsgruppen, die eine gezielte Deletion des VEGF-Gens an homozygoten Mäusen vornahmen (*Ferrara et al., 1996; Carmeliet et al., 1996*). Bei diesen Mäusen, die kein VEGF mehr bilden konnten, wurde nach 8,5 Tagen intrauterin ein Wachstumsstillstand festgestellt; nach 10,5 Tagen starben die Mäuseembryos aufgrund abnormer Blutgefäßentwicklungen.

VEGF wurde bereits in zahlreichen Geweben nachgewiesen, und zwar sowohl in gesundem Gewebe mit hoher Wachstums- bzw. Neubildungsrate wie zum Beispiel in den Ovarien (*Yamamoto et al., 1997; Reynolds et al., 2000*), in den Testes (*Ergun et al., 1997*), bei der Entwicklung der Lungen (*Marszalek et al., 2001*), beim Wachstum der Knochen (*Wang et al., 1997*) und in heilenden Wunden (*Brown et al., 1992*) sowie bei chronischer Ischämie des Myokards (*Harada et al., 1996; Ladoux et al., 1993; Hashimoto et al., 1994; Brown et al., 1995; Miraliakbari et al., 2000*); ferner in allen bisher untersuchten neoplastischen Prozessen (*Plate et al., 1992; Kim et al., 1993; Senger et al., 1993; Kondo et al., 1994*). Durch eine gesteigerte VEGF-Genexpression in Tumorprozessen und eine Erhöhung der Endothelpermeabilität und Zellmigration fördert VEGF das Wachstum der Tumore sowie deren Metastasierung (*Weidner et al., 1991; Brown et al., 1995; Fidler et al., 1994*).

VEGF kann von zahlreichen verschiedenen Zelltypen gebildet werden, unter anderem von Makrophagen, Mastzellen, T-Zellen, Muskelzellen, Nierenzellen, Keratinozyten, Astrozyten, Granulosazellen, endometrialen Stromazellen, Fibroblasten, Osteoblasten und Tumorzellen (*Klagsbrun und D'Amore, 1996; Heits et al., 1998*).

Das VEGF-Gen enthält 8 Exons, aus welchen durch alternatives Spleißen verschiedene mRNA-Stränge resultieren. Diese mRNA-Stränge kodieren für fünf Isoformen des VEGF, die beim Menschen gemäß ihrer Länge als VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> bezeichnet werden.

Während nur VEGF<sub>206</sub> alle acht Exons enthält, fehlen der Isoform VEGF<sub>189</sub> 17 Aminosäuren vom Exon 6, dem VEGF<sub>165</sub> das komplette Exon 6 und dem VEGF<sub>145</sub> das Exon 7. VEGF<sub>121</sub> schließlich hat weder Exon 6 noch Exon 7 vorzuweisen (*Poltorak et al., 2000*). Alle Isoformen können VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen binden und aktivieren. Sie unterscheiden sich voneinander in ihrer Bioverfügbarkeit aufgrund unterschiedlicher Bindungskapazität zur extrazellulären Matrix (*Houck et al., 1991; Park et al., 1993*). So bindet beispielsweise der VEGF<sub>121</sub> kein Heparin, da die beiden Heparinbindungsstellen des VEGF-Gens auf Exon 6 und Exon 7 zu finden sind. Aufgrund dieser Tatsache diffundiert der VEGF<sub>121</sub> leicht durch die Gewebe. VEGF<sub>145</sub> dagegen wird an die extrazelluläre Matrix gebunden und nur langsam freigesetzt (*Poltorak et al., 2000*). Mit zunehmender Länge und je nach Vorhandensein der Exone 6 und 7 nimmt die Heparin-Bindungskapazität der anderen Isoformen zu (*Keyt et al., 1996*). Die Isoformen VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> bleiben membranständig an Heparansulfat gebunden (*Heits et al., 1998*).

Über die Regulation der Expression der einzelnen Isoformen ist bisher wenig bekannt. Die Formen VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>121</sub> werden am häufigsten produziert (*Klagsbrun und D'Amore, 1996*). Werden diese beiden Isoformen miteinander verglichen, so stimuliert VEGF<sub>165</sub> die Endothelzellproliferation bemerkenswerterweise bis zu 100-fach stärker als VEGF<sub>121</sub>, was dadurch zu erklären ist, dass das Exon 7 eine entscheidende Rolle bei der Aktivität des VEGF als Wachstumsfaktor spielt: in molekulargenetischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass bei Aufspaltung des VEGF<sub>165</sub> in zwei Fragmente - VEGF<sub>1-110</sub> und VEGF<sub>111-165</sub> - die wachstumsvermittelnden Aktivitäten hauptsächlich vom VEGF<sub>111-165</sub> ausgehen, während die Aktivitäten des VEGF<sub>1-110</sub> sehr viel geringer ausfallen. Da dem VEGF<sub>1-110</sub> Exon 7 und 8 fehlen, gleicht es dem VEGF<sub>121</sub>, welches aus VEGF<sub>1-115</sub> plus 6 Aminosäuren vom Exon 8 besteht. Der Genabschnitt mit der hohen mitogenen Potenz konnte auf Exon 7 lokalisiert und seine Basenfrequenz entschlüsselt werden (*Keyt et al., 1996*).

Das wichtigste Stimulans der VEGF-Produktion ist die Hypoxie (*Minchenko et al., 1994; Detmar et al., 1997*). Es konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von VEGF-mRNA in normoxischen Zellen nur 30-45 Min. beträgt, während sie in hypoxischem Gewebe auf 6-8 h zunimmt. Ebenso wird unter hypoxischen Bedingungen vermehrt VEGF freigesetzt und der Abbau der VEGF-mRNA deutlich herabgesetzt (*Shima et al., 1995; Levy et al., 1996*). Lange Zeit war nicht sicher, wie sich der Zusammenhang zwischen der zellulären

Erfassung der Hypoxie und der VEGF-Produktion bzw. der Stabilisierung der VEGF-mRNA verhält. Bei der Erforschung dieser Mechanismen wurde herausgefunden, dass in hypoxischen Geweben zunächst eine vermehrte Produktion des hypoxie-induzierbaren Faktors-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) stattfindet (*Ratcliffe et al., 1998; Chavez et al., 2000; Semenza, 2001*). Dieser induziert dann durch eine Bindung an den Promoter des VEGF-Gens dessen Transkription und somit die Produktion von VEGF. Es konnte eine Sequenz von 47 bp am 5`- Ende des VEGF-Gens identifiziert werden, die HIF-1 $\alpha$  bindet (*Forsythe et al., 1996*). Ferner wurden am 3`Ende der VEGF-mRNA 5 Hypoxie-induzierbare Bindungsstellen (HIRPB) identifiziert, über welche eine Vermittlung der mRNA-Stabilität erfolgt. Vieles deutet inzwischen darauf hin, dass auch die Stabilisierung der VEGF-mRNA zumindest teilweise durch HIF-1 $\alpha$  bewirkt wird (*Liu et al., 2000*).

Neben dem bereits genannten maßgeblichen Stimulus, der Hypoxie, erhöhen hypoglykämische Zustände (*Shweiki et al., 1992 und 1995*) sowie ein Anstieg des Insulinspiegels (*Miele et al., 2000; Mick et al., 2002; Poulaki et al., 2002*) die VEGF-Produktion und die Stabilität der VEGF-mRNA (*Stein et al., 1995*). Ferner wird die VEGF-Produktion durch eine Vielzahl von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Cytokinen reguliert: als Beispiele seien hier das Interferon-1 $\beta$  (*Maruyama et al., 1999; El Awad et al., 2000*), das Interleukin-6 (*Cohen et al., 1996*), der aus Blutplättchen stammende Wachstumsfaktor (PDGF) (*Finkenzeller et al., 1992; Stavri et al., 1995*), der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) (*Goldman et al., 1993*), das Prostaglandin E2 (*Harada et al., 1995*), das luteinisierende Hormon (LH) (*Garrido et al., 1993*) und Adenosin erwähnt. Adenosin, welches infolge einer Verringerung zellulären ATPs freigesetzt wird, vermittelt eine Adenosin/Hypoxie-induzierte VEGF-Produktion (*Hashimoto et al., 1994*). Studien an retinalen Gefäßzellen haben gezeigt, dass eine durch Hypoxie bedingte vermehrte Anhäufung von Adenosin über Adenosin-A2a-Rezeptoren cAMP-abhängig eine Aktivierung der Proteinkinase A bewirkt und über diesen Signalweg die VEGF-Produktion stimuliert (*Takagi et al., 1996*).

VEGF übt seine Wirkung hauptsächlich über zwei spezifische Rezeptoren aus, die zur Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören. Diese werden auf den Endothelzellen in direkter Nähe zu den VEGF-produzierenden Zellen gefunden und bei Vorhandensein von VEGF stark aktiviert (*Brogi et al., 1996; Shen et al., 1998*). Hierbei handelt es sich um die 180 kDa Fsm-like tyrosine kinase (Flt)-1 (*Shibuya et al., 1990; De Vries et al., 1992; Shibuya, 2001*) und um die 200 kDa Kinase insert domain-containing region (KDR) bzw.

ihr murines Analog, die Fetal liver kinase (Flk)-1 (*Matthews et al., 1991; Terman et al., 1992*). Flt-1 wird auch als VEGFR-1 und flk-1/KDR wird auch als VEGFR-2 bezeichnet.

Die Signalvermittlung der aktivierten VEGF-Rezeptoren wurde vielfach untersucht. Zur Zeit sind folgende Signalwege bekannt:

- Die Zellwachstumsfunktionen des VEGF werden durch direkte Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und eine daraufhin stattfindende vermehrte Freisetzung von Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt.
- Die zytoprotektiven Funktionen des VEGF dagegen werden über eine Phosphorylierung verschiedener Botenstoffe einschließlich der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), dem Ras GTPase-aktivierenden Protein und der Phospholipase C- $\gamma$  weitergeleitet (*Fujio et Walsh, 1999; Morales-Ruiz et al., 2000*).

Da es hier zu weit führen würde, alle Signalwege aufzuführen und genau zu beschreiben, sei an dieser Stelle an folgende Textquellen verwiesen:

- *Morales-Ruiz et al., 2000*
- *Larrivee and Karsan, 2000 (Review)*
- *Lin et al., 2002*
- *Stiehl et al., 2002*

Über diese Signalwege stimuliert VEGF die Angiogenese, also das Aussprossen neuer Gefäße aus bereits bestehenden. VEGF induziert die Proliferation von Endothelzellen und bewirkt zudem die Migration von Endothelzellen, Mastzellen und Makrophagen. Diese Migration der genannten Zellen wird dadurch möglich, dass VEGF sie chemotaktisch in angrenzende Gewebe lockt (*Heits et al., 1998*). Eine weitere große Rolle spielt hierbei eine Erhöhung der Permeabilität der Gefäßwand durch VEGF, weswegen er auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bezeichnet wird (*Senger et al., 1993; Roberts et al., 1995*).

Durch das Einwandern neuer Endothelzellen in Gewebe erfolgt eine Einsprossung zusätzlicher Kapillaren. Auf diese Art und Weise werden (Muskel-) Gewebe unter der Wirkung von VEGF besser durchblutet.

### 2.5.2 Die klinisch-therapeutische Relevanz des VEGF

VEGF hat zur Zeit keine therapeutische Relevanz. Aufgrund seiner spezifischen Wirkung gibt er jedoch Anlass zu der Hoffnung, ihn eines Tages in Therapien verwenden zu können. Neben dem großen Gebiet der Tumorforschung ist er insbesondere interessant für die Therapie der KHK und der chronisch ischämischen Herzinsuffizienz, und zwar in den Bereichen der Gentherapie und der Kardiomyopexie.

Bei der Gentherapie werden VEGF-DNA enthaltende Plasmide in einem minimal-invasiven operativen Verfahren direkt in den Herzmuskel eingebracht. Erste Ergebnisse solcher Studien an herzinsuffizienten Patienten zeigen eine signifikante Bildung von Kollateralen sowie eine Verbesserung des myokardialen Sauerstoffangebotes und der klinischen Befindlichkeit der Patienten (*Losordo et al., 1998; Symes et al., 1999*). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch die schwierige Frage der Dosierung des VEGF-Plasmids. Denn neben den gewünschten Effekten, der Angiogenese und der Arteriogenese, besteht die Möglichkeit, dass der VEGF entweder eine fehlerhafte Gefäßbildung und somit ein Angiom erzeugt, oder aus dem Herzmuskel entweicht und an anderer Stelle im Organismus durch unerwünschte Mehrdurchblutung möglicherweise eine Gewebsvermehrung im Sinne eines Tumorwachstums anregt (*Carmeliet, 2000*).

Für die Verfahren der muskulären Herzunterstützungssysteme wird wie oben bereits beschrieben ein vortrainierter Muskel - meist der M. latissimus dorsi - verwendet. Mit zunehmender Übungsintensität steigt der Sauerstoffbedarf von Skelettmuskeln bis hin zur Sauerstoffschuld, und als Folge davon findet man im trainierten bzw. elektrisch stimulierten Muskel einen erhöhten Gehalt an VEGF (*Hang et al., 1995; Skorjanc et al., 1998; Richardson et al., 1999*). Bei chronischer Stimulation des Motoneurons bewirkt der VEGF-Anstieg im Muskel die Aussprossung von Kapillaren und verbessert auf diese Weise sowohl das Sauerstoffangebot als auch die Kontraktilität des Muskels (*Kashem et al., 2001*) Ein vorher eher glykolytisch arbeitender Muskel, der wenig kapillarisiert ist, kann sich hierdurch in einen oxidativen Muskel umbilden. (*Annex et al., 1998; Skorjanc et al., 1998*). Um einen Skelettmuskel wie den M. latissimus dorsi bei akutem Bedarf (etwa bei terminaler Herzinsuffizienz) möglichst rasch für Myoplastieverfahren verwenden zu können, wird von der Arbeitsgruppe um Guldner das direkte Einbringen von VEGF-DNA-enthaltenden Plasmiden in den Muskel diskutiert. Hierzu ist es zunächst aber wichtig, Verfahren zu entwickeln, mit denen der VEGF-Gehalt des Muskels sowie sein Kapillarisierungszustand als auch die Beziehung zwischen beidem erfasst werden kann.

## 2.6 Problemstellung

In dieser Arbeit sollen Grundlagen der Kapillarmodulation auf molekularbiologischer Basis geschaffen werden.

Folgende Fragen werden gestellt:

- 1) Ist die Bestimmung der Menge an VEGF als molekularbiologischer Marker für die Erfassung von Kapillarisierungsvorgängen im Muskel geeignet?
- 2) Wie kann eine semiquantitative PCR zur Messung der VEGF-mRNA der Ziege etabliert werden?
- 3) Wie wirkt sich elektrische Stimulation (Training) auf den VEGF-mRNA-Gehalt und die Kapillardichte des M. latissimus dorsi aus?
- 4) Liegt die VEGF-mRNA im Muskel homogen oder heterogen verteilt vor?
- 5) Sind die Messwerte abhängig von der Schnelligkeit der Probenentnahme?

In einer zeitgleich durchgeführten Dissertation werden Normalwerte für die Kapillarisierung des M. latissimus dorsi bestimmt.

Die Ergebnisse beider Arbeiten werden miteinander verglichen, um eventuelle Zusammenhänge zwischen der molekulargenetisch bestimmten Menge an VEGF und dem morphometrisch ermittelten Vaskularisationsgrad des Muskels erfassen zu können und damit in einen Teil der Vaskularisierungsvorgänge Einsicht zu gewinnen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Etablierung einer semiquantitativen PCR zur Messung der VEGF-mRNA der Ziege

Für die molekularbiologische Untersuchung der Proben auf ihren Gehalt an VEGF ist das Verfahren der Polymerasereaktion ausgewählt worden, da hiermit definierte Ziel-DNA-Sequenzen in vitro schnell zu vervielfältigen sind und so auch bei geringer Ausgangsmenge messbare Mengen entstehen. Da die Gensequenz der Ziegen-VEGF-cDNA in der erhältlichen Literatur nicht bekannt war, musste zunächst eine Teilsequenzierung durchgeführt werden. Nach der Sequenzierung und der Auswahl passender Primer wurde ein kompetitiver Primer hergestellt. Mit Hilfe der so möglich gewordenen Methode, eine kompetitive PCR für den VEGF der Ziege durchführen zu können, konnten die Muskelproben quantitativ auf ihren Gehalt an VEGF-DNA untersucht werden.

Für die Teilsequenzierung wurden zunächst Kombinationen aus drei verschiedenen 5' - und sechs verschiedenen 3' - Primern ausprobiert, welche die VEGF-cDNA von Mensch oder Schwein amplifizieren können. Diese Primer wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Eric Metzgen (Institut für Physiologie, Lübeck) zur Verfügung gestellt.

- |                         |                          |
|-------------------------|--------------------------|
| - 5`VEGF / p3`VEGF189   | - p5`VEGF / 3`VEGF165    |
| - 5`VEGF / 3`VEGF165    | - p5`VEGF / 3`VEGF121    |
| - 5`VEGF / 3`VEGF145    | - p5`VEGF / p3`VEGF121   |
| - 5`VEGF / 3`VEGF121    | - 5`pigVEGF / p3`VEGF189 |
| - 5`VEGF / p3`VEGF121   | - 5`pigVEGF / 3`hVEGF    |
| - p5`VEGF / 3`hVEGF     | - 5`pigVEGF / 3`VEGF121  |
| - p5`VEGF / p3`VEGF189  | - 5`pigVEGF / p3`VEGF121 |
| - p5`VEGF / 3`VEGF145   | - 5`pigVEGF / 3`VEGF145  |
| - 5`pigVEGF / 3`VEGF165 |                          |

Mittels Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte untersucht, wobei das Auftreten einer einzigen Bande mit der erwarteten Größe eine erfolgreiche PCR-Amplifikation zeigte. Das PCR-Produkt des Primerpaares 5'VEGF/ 3'VEGF165 wurde aufgereinigt und mittels Sequenzierung durch GATC Biotech, Koblenz, als VEGF-PCR-Produkt bestätigt.

Für das Ziegen-VEGF wurde eine Sequenz von 304 bp ermittelt (s. Ergebnisse).

Entsprechend wurden für die weiteren Untersuchungen der Ziegen-VEGF-mRNA die Primer

5' VEGF (5'- CAC GAA GTG GTG AAG TTC AT – 3') und  
3' VEGF165 (5'- AGG CCC ACA GGG ATT TTC TTG – 3') verwendet.

Für die Ermittlung der optimalen Arbeitstemperatur der verwendeten Primer - der sogenannten Annealing-Temperatur ( $T_{ann}$ ) - wurde zunächst näherungsweise die Hybridisierungs- bzw. Schmelztemperatur ( $T_m$ ) errechnet, bei der nur noch die Hälfte aller cDNA-Stränge doppelsträngig vorliegt.  $T_m$  errechnet sich aus der Nukleotidzusammensetzung der Primer nach der Näherungsformel

$4*(G+C) + 2*(A+T) = T_m$  und beträgt 58 °C für den 5'- und 64 °C für den 3'-Primer. (Formeln aus: *PCR, C. R. Newton, 2. Auflage*).

Für den ersten PCR-Versuch wird eine Annealing-Temperatur gewählt, die 5 °C unter der errechneten  $T_m$  liegt ( $T_{ann} = T_m - 5$ ). Zeigt sich bei der Gelelektrophorese kein PCR-Produkt, wird die Annealing-Temperatur in Folgeversuchen um jeweils 2 °C erniedrigt, bis eine Bande sichtbar wird. Erscheinen hingegen mehrere Banden auf dem Gel, ist die Annealing-Temperatur zu niedrig, das Annealing damit zu unspezifisch, und die Temperatur muss erhöht werden. Als Annealing-Temperatur für beide Ziegen-VEGF-Primer wurde 58 °C gewählt. Ein weiterer variabler Faktor bei der PCR ist die Anzahl der Amplifizierungen. Bei der Wahl der Zyklenanzahl muss zwischen möglichst hoher Ausbeute und der Qualität des Amplifizierungsproduktes abgewogen werden. Denn die gesuchten Sequenzen vermehren sich nicht beliebig exponentiell. Nach 25 bis 30 PCR-Zyklen, in denen die DNA millionenfach vermehrt wird, ist bei einem molaren Überschuss der Ziel-DNA meist die Enzymmenge der begrenzende Faktor für die Reaktion. Auch die Aktivität der Taq-Polymerase nimmt ab, da die Hitze das Enzym im Laufe der Reaktion denaturiert. Mit zunehmender Konzentration der gewünschten Stränge vermindert auch deren Hybridisierung untereinander die Effektivität der Vervielfältigung, da diese Reaktion mit der Anlagerung der Primer konkurriert. Eine qualitativ und quantitativ optimale

Zyklusanzahl beträgt für die PCR-Versuche dieser Arbeit 37 Zyklen. Das PCR-Produkt stellt sich bei 324 bp auf dem Gel dar.

Zur semi-quantitativen Auswertung wurde ferner eine Standard-DNA benötigt, die dieselben Primer bindet, aber ein kürzeres PCR-Produkt erzeugt. Für die Herstellung des VEGF-Standards diente zum einen der oben erwähnte Primer 3`VEGF165 und zum anderen der spezielle Primer z 5`VEGF comp. mit der Sequenz

5` - CAC GAA GTG GTG AAG TTC ATT GAG TTC ATT TTC  
AAG CCG TC - 3` .

Dieser Primer teilt sich in zwei Abschnitte ein, von denen der erste identisch mit der Sequenz des Primers 5`VEGF ist. Der zweite Abschnitt entspricht einer Sequenz, die 75 bp weiter in Richtung 3`-Ende liegt. Aus diesem Grund sind das 3`- und das 5`-Ende des gesuchten DNA-Abschnittes und des Standards identisch, jedoch enthält der Standard 75 Basenpaare weniger, so dass sich die PCR-Produkte von Probe und Standard anhand ihrer Größe unterscheiden lassen. Das PCR-Produkt des VEGF-Standards hat eine Länge von 249 bp.

### 3.2. Anwendung der Methode

Als Versuchstiere dienten Burenziegen, da ihr Gewicht in etwa mit dem eines erwachsenen Menschen vergleichbar ist und die Anatomie ihrer Mm. latissimi dorsi der des Menschen sehr ähnelt (s. Abb.5a).

Es ist zunächst in einer Pilotserie mit drei Burenziegenböcken untersucht worden, ob die Stimulation eines M. latissimus dorsi eine nachweisbare Produktion von VEGF-mRNA zur Folge hat. Von großem Interesse war hierbei, zu welcher Zeit nach Stimulationsbeginn mit einem deutlichen Anstieg des VEGF zu rechnen ist. Aufgrund der Studie der Arbeitsgruppe Hang an Ratten von 1995 wurde eine Stimulationszeit von 3-5 Tagen bis zum Anstieg des VEGF erwartet (*Hang et al., 1995*).

Eine Latissimus-Seite der Tiere wurde *in situ* mit Hilfe eines Myostimulators über Elektroden dauerhaft stimuliert, während die andere Seite unstimuliert belassen wurde. Bei der Auswahl des Reizmusters wurde auf die Erfahrung früherer Studien mit Ziegenböcken zurückgegriffen (*Guldner et al., 1994; Guldner et al., 1997*). In festgelegten Abständen sind den Tieren Muskelproben entnommen und diese molekularbiologisch untersucht worden.

Die Ergebnisse dieser Pilotversuche warfen die grundlegenden Fragen auf, ob der VEGF innerhalb des Muskels homogen oder heterogen verteilt vorliegt, und ob die Zeit zwischen der Entnahme und dem Einbringen der Muskelprobe in flüssigen Stickstoff in Hinsicht auf eine Zerstörung der RNA durch RNAsen eine Rolle spielt. Zur Klärung dieser grundlegenden Fragen sind anschließend zwei weitere entsprechende Versuchsserien mit je drei Tieren durchgeführt worden.

### **Operationsserien**

#### Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Burenziegenböcke im Alter von 2-5 Jahren und einem Gewicht von 54 bis 72 kg. Diese Tiere wurden tierärztlich in der Abteilung für Versuchstierheilkunde der Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (Leitung: Dr. med. vet. R. Noel) überwacht und standen unter der behördlichen Kontrolle eines Tierschutzbeauftragten des Regierungspräsidiums des Landes Schleswig-Holstein. Die Genehmigung durch die Ethikkommission nach dem geltenden Tierschutzgesetz wurde unter der Versuchsnummer V 252-72241. 122-6 ( 15-1 / 02 ) erteilt.

Alle vier Burenböcke wurden durch eine beidseitige Orchidektomie kastriert, um mehrere Böcke gleichzeitig auf der Wiese in einem Gehege halten zu können. Ohne diesen Eingriff wären ständige Rankkämpfe der Böcke untereinander mit schweren Verletzungen die Regel gewesen. Außerdem hätte eine erhebliche Verletzungsgefahr des Pflegepersonals und der Experimentatoren bestanden.

Vor den nachfolgend beschriebenen Operationen und dem Einsetzen des Myostimulators wurde jeweils eine gründliche Rasur über dem M. latissimus dorsi durchgeführt. Die Narkose erfolgte mit 1,7 ml - 2ml Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, BayerVital GmbH) und 1ml Atropinsulfat (Atropinsulfat, Fresenius) intramuskulär (i.m.). An den Operationen waren außer meiner Person beteiligt: Prof. Dr. med. Norbert Guldner, Dr. med. Anja Gerdes, Dr. Dipl. Ing. Peter Klapproth, Dr. med. Martin Großherr sowie Kinga Monczko.

Unter oben beschriebenen Fragestellungen sind folgende drei Versuchsserien durchgeführt worden:

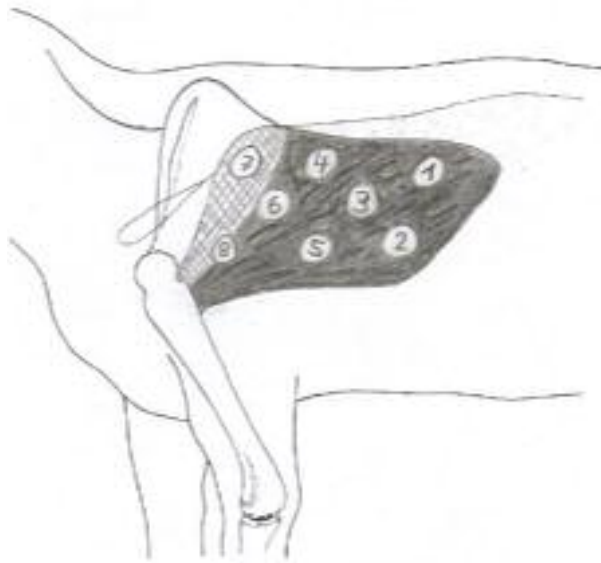
### 3.2.1. Serie 1: Stimulationsverläufe als Pilotserie

Entsprechend der Vorstellung, durch Stimulation des M. latissimus dorsi einen Anstieg des Gehaltes an VEGF im Muskel zu erreichen, wurden bei drei Versuchstieren linksseitig Stimulationselektroden in den Muskel implantiert und diese auf ein Dauerreizmuster von 2 Hz und 5-6 V eines Myostimulators eingestellt. In festgelegten, zunächst 2-3-tägigen, später größeren Zeitabständen von 1-2 Wochen (s. hierzu Ergebnisteil) wurden auf der stimulierten und vergleichend auf der unstimulierten Seite Muskelproben aus den Mm. latissimi dorsi der Tiere entnommen.

Die Ergebnisse dieser Pilotserien warfen die Fragen auf, ob von einer homogenen Expression der VEGF-mRNA innerhalb des Muskels ausgegangen werden kann, und ab welcher Zeitspanne zwischen der Entnahme des Gewebes und dessen Einbringen in flüssigen Stickstoff die Zerstörung der RNA durch RNasen beginnt. Aus diesem Grunde wurden zwei weitere Versuchsserien zur Klärung dieser Fragen begonnen.

### 3.2.2. Serie 2: Ermittlung der VEGF-mRNA-Menge an verschiedenen Muskelorten

Um festzustellen, ob das VEGF-Gen an verschiedenen Orten innerhalb des Muskels verschieden stark exprimiert, wurden bei drei Ziegenböcken beiderseits die Mm. latissimi dorsi komplett entnommen und die Konzentration der VEGF-mRNA an acht definierten Orten bestimmt:



*Abb. 3a: Entnahmestellen der 8 Muskelproben zur Ermittlung der VEGF-Menge an verschiedenen Lokalisationen im M. latissimus dorsi*

### **3.2.3. Serie 3: Ermittlung der VEGF-mRNA-Menge nach unterschiedlichen Entnahmezeiten**

Je länger eine Gewebeprobe bei Raumtemperatur aufbewahrt wird, desto stärker kann die Gewebs-RNA durch endogene RNasen abgebaut werden. Zur Bestimmung der Korrelation des Zeitabstandes zwischen der Muskelentnahme und dem Asservieren der Probe in flüssigen Stickstoff in Hinsicht auf eine mögliche Denaturierung der VEGF-RNA wurde bei der oben erwähnten kompletten Muskelentnahme zur Bestimmung der Ortsverteilung auch ein separates größeres Muskelstück entnommen. Hiervon wurden nach 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 und 60 Min. jeweils einige kleine Stückchen abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der VEGF-mRNA-Gehalt dieser zerkleinerten Muskelstücke wurde später molekularbiologisch bestimmt.

## **Operationsmethoden**

Für die beschriebenen Operationsserien wurden folgende Operationsverfahren angewandt:

- Schrittmacherimplantation und Probenentnahmen für die Serie 1 (Pilotserie)
- Komplette Muskelentfernung für die Serien 2 und 3

Alle nachfolgend beschriebenen Operationen wurden unter sterilen Bedingungen nach gründlicher Elektrorasur und Desinfektion der Ziege über dem M. latissimus dorsi sowie in i.m. Narkose mit 1,7 - 2 ml Rompun und 1 ml Atropin durchgeführt.

### **SCHRITTMACHERIMPLANTATION FÜR DIE SERIE 1 (PILOTSERIE)**

Zur ständigen Stimulation des Muskels wurden bei drei Tieren jeweils auf der linken Seite Stimulationselektroden in den M. latissimus implantiert. Als Muskelstimulatoren dienten hierfür ITREL II-Schrittmacher.

Die Operation begann mit einem ca. 10 cm langen, parallel und caudal zum Humerus verlaufenden Hautschnitt. Nach der Durchtrennung des Subkutangewebes bis zum M. latissimus dorsi wurde die äußere Muskelfaszie freipräpariert. Die Fixierung beider Stimulationselektroden erfolgte auf der Muskelfaszie des M. latissimus dorsi mit Einzelknopfnähten (5-0 Prolene) im Abstand von 6 cm. Anschließend wurde subkutan über

dem Oberschenkel des Tieres eine Schrittmachertasche angelegt. Beide Elektrodenstecker wurden an den Myostimulator angeschlossen und zunächst auf ein konstantes Impulsmuster von 2 Hz und 2,5 V eingestellt. (Da die Reizschwelle im Verlauf des ersten Stimulationstages ansteigt, wurde die Spannung nach 24 h auf 5-6 V erhöht.) Nachdem das Aggregat in die präformierte Schrittmachertasche versenkt worden war, erfolgte subkutan ein Verschluss dieser Tasche mittels Naht mit 2-0 Vicryl. Die Operationswunde wurde durch Subkutannaht mit 2-0 Vicryl und die Haut mit Einzelknopfnähten (Mersilene 2) verschlossen.

Im postoperativen Verlauf wurden im Abstand von zunächst 2-3 Tagen, später im Abstand von 1-2 Wochen sowohl aus dem stimulierten als auch aus dem unstimulierten Muskel der Tiere Proben entnommen, um den Gehalt beider Seiten an VEGF bestimmen und sie danach miteinander vergleichen zu können.

### PROBENENTNAHME

Die Operation begann mit einem schräggestellten, ca. 5 cm langen Hautschnitt in einem naht- u. narbenfreien Hautbezirk über dem M. latissimus dorsi auf der stimulierten Seite des Tieres. Das Subkutangewebe wurde bis auf die Faszie des M. latissimus dorsi durchtrennt und die Muskelfaszie eines Muskelstranges der Länge nach stumpf gespalten. Es folgte die scharfe Exzision eines ca. 2 cm x 2 cm großen Muskelstückes, welches sofort zerkleinert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde, um eine Denaturierung der RNA durch RNAsen zu verhindern. Die Muskelenden wurden mit einer Muskelnahnt adaptiert, es folgten Fasiennaht, Subkutannaht (2-0 Vicryl) und die Einzelknopf-Hautnaht (Mersilene 2). Danach wurde das Tier auf die operierte Seite umgelagert, und die Probenentnahme erfolgte nun auf der unstimulierten Seite auf die gleiche Art und Weise.

### KOMPLETTE MUSKELENTFERNUNG

Bei der kompletten Muskelentfernung für die Versuchsserien 2 und 3 wurde bei der ersten Operation stets nur ein M. latissimus dorsi des Tieres entnommen. Die Entfernung des M. latissimus dorsi der Gegenseite erfolgte meist 2-3 Wochen später nach Abschluss der

Wundheilung. Die Operation begann mit einem ca. 20 cm langen, schräggestellten Hautschnitt über dem M. latissimus dorsi des Tieres. Nach der Durchtrennung des Subkutangewebes kaudal der Skapula wurde das Subkutangewebe bis auf die Faszie des M. latissimus abpräpariert. Anschließend erfolgte die Darstellung des dorsalen Latissimus-Randes und die Abpräparation des M. latissimus vom M. trapezius.

Für die Versuchsserie 2 wurden nun an 8 definierten Orten auf dem M. latissimus (s. oben) Muskelproben entnommen, zerkleinert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Aus einem intakten Bereich des Latissimus wurde außerdem ein ca. 5 cm x 5 cm großes Muskelstück für die Versuchsserie 3 entnommen. Hiervon wurden jeweils nach 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 und 60 Min. einige kleinere Stückchen abgeschnitten und sofort in flüssigen Stickstoff eingebracht. Nachdem alle Probenentnahmen abgeschlossen waren, wurde der kaudale Latissimus-Rand am kaudalen Thorax-Ende dargestellt und durchtrennt. Der Muskel wurde in Richtung des oberen Humerusdrittels abpräpariert. Anschließend erfolgte die Dissektion der Pars superior des M. latissimus dorsi, die fest mit der Skapula verwachsen ist, und der Pars media. Unter Schonung des Gefäß-Nerven-Bündels wurde nun die humerale Insertion des Muskels umfahren und der komplette Muskelrest abgetrennt und entfernt. Die Operationswunde wurde mittels fortlaufender Subkutannaht (2-0 Vicryl) und einer Hautnaht mit Einzelknopfnähten (Mersilene 2) verschlossen.

### 3. 3. Molekularbiologische Aufarbeitung der Proben

#### RNA-Isolation

Um die Konzentration der VEGF-mRNA in den Muskelproben bestimmen zu können, wurde aus ihnen die Gesamt-RNA nach *Chomczynski und Sacchi, 1987* - in modifizierter Weise nach Prof. Dr. Roland Wenger, Institut für Physiologie, Lübeck - extrahiert. Die bei -80 °C eingefrorenen Muskelproben wurden in flüssigen Stickstoff überführt. Jede Probe wurde einzeln aus dem Stickstoff entnommen und in gefrorenem Zustand in 4 ml gekühlte Lösung D (Zusammensetzung s. Kapitel 3.4) gegeben. Unmittelbar danach wurden die Muskelstücke mit Hilfe des Homogenisators bei 15000 bis 20000 Umdrehungen/Min. Leerlaufdrehzahl homogenisiert und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Homogenisate mit 0,4 ml Natriumacetatlösung, 4,0 ml wassergesättigtem Phenol und 0,8

ml Chloroform versetzt und zwischen diesen drei Schritten durchmischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben 20 Min. lang bei 12000 \*g und 4 °C zentrifugiert. Hiernach war in den Röhrcchen eine Phasentrennung erkennbar: eine organische Phase am Boden, eine Interphase mit Proteinen und DNA und oben die wässrige Phase, welche die RNA enthielt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig, das heißt, ohne die Interphase zu berühren, abgenommen, mit 3 ml Isopropanol versetzt und für mindestens 1 Stunde bei -20 °C inkubiert, um die RNA auszufällen. Anschließend wurde die RNA für 20 Min. bei 12000 \*g und 4 °C durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde vollständig verworfen und die RNA in 0,3 ml Lösung D aufgelöst. In einem zweiten Fällungsschritt wurde sie erneut mit 0,3ml Isopropanol versetzt und für eine Stunde bei -20 °C ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 20000 \*g und 4 °C für 20 Min. wurde der Überstand vollständig verworfen, das Pellet mit 100 µl 75 % Ethanol gewaschen und für 30 Min. auf Eis getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde die RNA in 20-100 µl in DEPC-behandeltem Wasser aufgelöst, wofür sie für 15 Min. auf 56 °C erwärmt wurde. Die RNA-Proben sind bis zu ihrer weiteren Verwertung bei -80 °C aufbewahrt worden.

### RNA-Quantitätsmessung am Photometer

Die Ermittlung der RNA-Konzentration erfolgte am Photometer mittels Absorptionsmessung bei 260 nm. Dazu wurden für jede Probe 100 µl einer 1:100-Verdünnung in DEPC-behandeltem Wasser verwendet. Eine Extinktion von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Das ebenfalls gemessene Verhältnis der Extinktion bei 260 und 280 nm ist ein Indiz für die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Die Qualität der RNA ist durch Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen überprüft worden. Hierzu fanden 1,1 % (w/v) Agarose-Gele mit 2 % (v/v) Formaldehyd und MOPS-Puffer als Laufpuffer Verwendung.

5 µg RNA-Probe wurden bis zu einem Volumen von 10 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt, mit 5 µl RNA-Ladepuffer versetzt und für 15 Min. bei 68 °C denaturiert. Dann wurden die Proben 15 Min. auf Eis abgekühlt, auf das Gel aufgetragen und bei 70-85 V

elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einer Laufstrecke von ca. 3 cm erfolgte die Visualisierung der Banden mittels UV-Licht-Anregung.

Anschließend wurde beurteilt, ob sich eine Degradation der RNA durch Schlierenbildung auf dem Gel oder Verluste an 28S-rRNA zeigten, und ob es zu Ungenauigkeiten der RNA-Konzentrationsmessung gekommen war.

### Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mit Hilfe einer retroviralen reversen Transkriptase (RTase) RNA in komplementäre DNA umgeschrieben. Interessant für Untersuchungen der Expression bestimmter Gene ist lediglich die mRNA, welche ca. 1-10 % der gesamten RNA ausmacht. Die Verwendung eines komplementären Thymidin–Oligonukleotids als Startermolekül sorgt dafür, dass spezifisch nur cDNA (kodierende DNA im Gegensatz zu genomischer DNA) zu mRNA-Molekülen produziert wird, da die anderen RNA-Typen kein poly-A-Ende besitzen. Unter Zugabe von Desoxynukleosidtriphosphaten als Bausteine für den Aufbau der DNA wird auf diese Art und Weise cDNA synthetisiert.

Die reverse Transkription wurde nach einem bereits etablierten Protokoll durchgeführt (Wolber *et al.*, 1999). Hierzu wurden die RNA-Proben auf Eis aufgetaut und jeweils 5 µg der RNA mit 1 µg oligo (dT)<sub>18</sub>-Primer in DEPC-behandeltem Wasser zur Auffaltung der Sekundärstrukturen 15 Min. bei 68 °C denaturiert. Anschließend wurden RT-Puffer, dNTPs und 100 U M-MLV-RTase hinzugegeben und die resultierenden 25 µl-Ansätze 45 Min. bei 42 °C, 45 Min. bei 52 °C und 10 Min. bei 100 °C inkubiert. Bis zur Weiterverwertung wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt.

### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Abschnitten. Die Grenzen des amplifizierten Bereichs werden durch die Startermoleküle (sog. „Primer“) festgelegt.

Die Proben wurden auf zwei verschiedene cDNAs untersucht, zum einen auf VEGF und zum anderen auf Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als konstant exprimiertes Haushaltsgen.

Die Nukleotidsequenzen der GAPDH-Primer sind bereits sequenziert (Wolber *et al.*, 1999). Sie lauten:

5' GAPDH-Startermolekül 5' - ATC ATC CCT GCC TCT ACT GG - 3'  
3' GAPDH-Startermolekül 5' - TGG GTG TCG CTG TTG AAG TC - 3'

Die Annealing-Temperatur (optimale Arbeitstemperatur) der GAPDH-Startermoleküle beträgt 55 °C, die optimale Zyklusanzahl ist 27. Das PCR-Produkt zu GAPDH wurde bei einer Länge von 256 bp erwartet.

Für den VEGF wurde eine Teilsequenzierung vorgenommen, welche oben bereits beschrieben wurde. Diese Sequenzierung war nur für die Herstellung des Standards und als Kontrolle der Spezifität notwendig.

Für die Amplifizierungen sind folgende Startermoleküle verwendet worden:

3' VEGF165 5' - AGG CCC ACA GGG ATT TTC TTG - 3'  
5' VEGF 5' - CAC GAA GTG GTG AAG TTC AT - 3'

Die Annealing-Temperatur der VEGF-Startermoleküle beträgt 58 °C, die optimale Zykluszahl sind 37 Zyklen. Das Genprodukt stellt sich bei 324 bp auf dem Gel dar.

Die PCR-Ansätze wurden nach einem Standardprogramm inkubiert (*Mullis et Faloona, 1987*), wobei die oben erwähnte Annealing-Temperatur und die Anzahl der Zyklen die beiden Variablen des PCR-Programmes darstellen: die Annealing-Temperatur ist gleichbedeutend mit der optimalen Arbeitstemperatur der verwendeten Primer; die Anzahl der Zyklen bestimmt den Grad der Vervielfältigung der gesuchten DNA-Abschnitte. Die Erfahrungen mit der kompetitiven PCR gehen von einem Standardverfahren aus, welches Siebert und Larrick 1992 veröffentlichten.

Die PCR-Ansätze von 50 µl Gesamtvolumen enthielten 1 µl cDNA, je 20 pmol des 5'- und des 3'- Starters, je 10 nmol dNTPs und 0,75 U Taq-Polymerase in 1x PCR-Puffer. Als Verdunstungsschutz dienten 2 bis 3 Tropfen hochreines Mineralöl. Zusätzlich zu den Proben wurden als Negativkontrollen Reaktionen mit DEPC-behandeltem Wasser statt cDNA bzw. statt RNA während der RT-Reaktion mitgeführt. Zur semi-quantitativen Auswertung wurden ferner Ansätze mit Standard-DNAs in drei unterschiedlichen Mengen, VEGF-Standard: 1 fg, 100 ag, 10 ag und GAPDH-Standard: 156 fg, 78 fg, 39 fg mitgeführt. Die Standards besitzen ähnliche Sequenzen wie die gesuchten cDNA-Abschnitte, können dieselben Primer binden, erzeugen aber kürzere PCR-Produkte. Sie wurden mit Hilfe spezieller Primer hergestellt. Der GAPDH-Standard wurde hergestellt

wie in der Literatur beschrieben (*Kressin et al., 2001*). Die Herstellung des VEGF-Kompetitors gehörte zur oben beschriebenen Methodenetablierung.

Das PCR-Produkt des VEGF-Standards hat eine Länge von 249 bp, das Produkt des GAPDH-Standards 217 bp. Da die Konzentrationen der Standards bekannt sind, dienen ihre später auf dem Gel sichtbaren Produkte zur semiquantitativen Abschätzung der Menge an cDNA in den Proben.

### Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden in 2 % (w/v) Agarose-Gelen mit 1x TBE als Laufpuffer und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zur DNA-Färbung elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 25 µl PCR-Produkt mit 3 µl DNA-Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. In eine Tasche wurden 0,5 µg eines Größenmarkers (100 bp DNA ladder) eingebracht. Dieser Marker lässt auf dem Gel Banden im Abstand von 100 Basenpaaren erkennen, die eine Abschätzung der PCR-Produktlängen ermöglichen.

Die größenabhängige Auftrennung der PCR-Amplifikate im elektrischen Feld erfolgte bei konstanter Spannung von 100 V. Nach 3-4 cm Laufstrecke wurden die Banden unter UV-Licht visualisiert, dokumentiert sowie densitometrisch ausgewertet.

### 3.4. Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien oder Reagenzien bei Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) in höchstmöglichem Reinheitsgrad erworben. Ausnahmen waren:

Agarose	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
Ethidiumbromid	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
100 bp DNA Standard	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe
dNTPs	Takara Biomedicals, Shiga, Japan
oligo(dT) <sub>18</sub>	MWG Biotech, Ebersberg
PCR-Startermoleküle	MWG Biotech, Ebersberg
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Reverse Transkriptase     Promega, Mannheim  
Taq-DNA-Polymerase     GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe

### DEPC-behandeltes Wasser

0,1 % (v/v) DEPC in Aqua Bidest  
über Nacht rühren lassen, autoklavieren

### Natriumacetat-Lösung

2 M Natriumacetat, pH 4,0 autoklavieren

### Lösung D

4 M        Guanidiniumthiocyanat  
25 mM     Natriumcitrat (pH 7,0)  
0,5 %     Sarcosyl

### MOPS-Puffer

40 mM     MOPS, pH 7,0  
10 mM     Natriumacetat  
1 mM      EDTA  
autoklavieren

### TBE-Puffer

89 mM     Tris-Borat, pH 8,0  
89 mM     Borsäure  
2 mM      EDTA

### TE-Puffer

10 mM     Tris-HCl, pH 8,0  
1 mM      EDTA

RNA-Ladepuffer (1:2 mit Probe zu mischen)

40 mM	MOPS (pH 7,0)
10 mM	Natriumacetat
1 mM	EDTA
7 % (v/v)	Formaldehyd
50 % (v/v)	Formamid
10 % (v/v)	Glycerin
0,05 % (w/w)	Bromphenolblau
40 µg/ml	Ethidiumbromid

DNA-Ladepuffer (1:10 mit Probe zu mischen)

89 mM	Tris-Borat, pH 7,5-7,8
89 mM	Borsäure
2 mM	EDTA
50 % ( v/v )	Glycerin
0,25 % ( w/w )	Bromphenolblau

75 % (v/v) Ethanol

75 % (v/v) Ethanol  
in DEPC-behandeltem Wasser

### 3.5. Geräte

Muskelstimulator

ITREL II (Modell 7420, Medtronic, Bakken Research Center).

Zentrifugen

RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments,  
Sorvall, Bad Homburg  
Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg

Rotoren: GSA und SS-34, Sorvall, Bad Homburg  
Microcentrifuge MC-13, Millipore/Amicon, Eschborn

### UV-Photometer

Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Cambridge, Großbritannien

### Herolab Geldokumentationssystem, Herolab, Wiesloch

Transilluminator: Herolab Darkroom Hood Type RH3

Software: E.A.S.Y. Win, Vers.-Nr. 32

### Polytron-Homogenisator

Ultra-Turrax T25, Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik

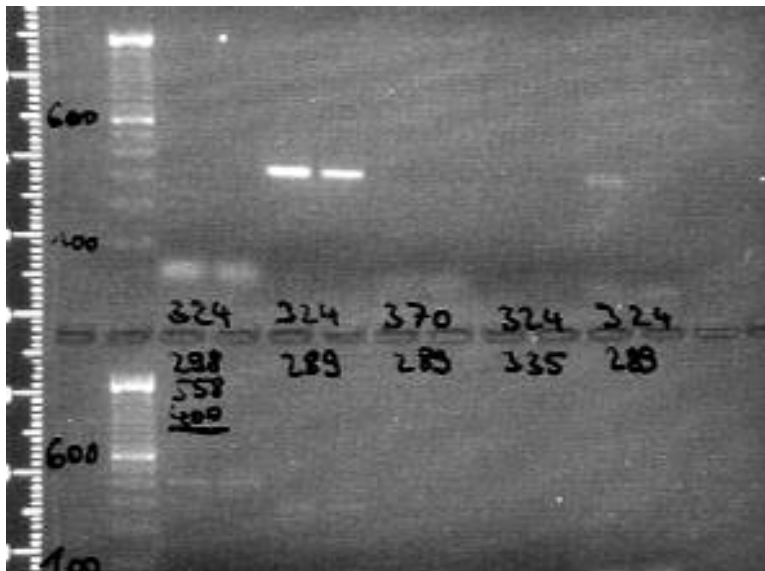
### PCR-Thermocycler

TRIO-Thermoblock, Biometra, Göttingen

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Etablierung einer semiquantitativen PCR für den muskulären VEGF der Ziege

Bevor die Muskelproben auf ihren Gehalt an VEGF-cDNA untersucht werden konnten, musste zunächst eine PCR für den VEGF der Ziege etabliert werden. Von den 17 verschiedenen Kombinationen der Startermoleküle für den VEGF von Mensch oder Schwein bildete nur ein Paar ein einziges PCR-Produkt.



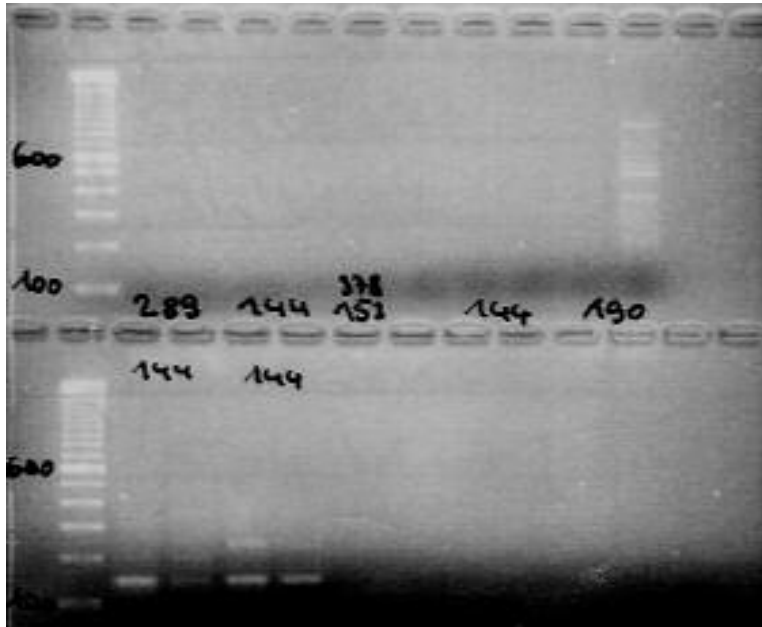
Oben: (von links nach rechts) Größenmarker und Proben 1 bis 10

Unten: (von links nach rechts) Größenmarker und Proben 11 bis 20

Abb. 4a: PCR-Gel Nr. 1 mit den PCR-Produkten folgender Primerkombinationen:

Proben 1 + 2:	PCR-Produkte von	5`VEGF / p3`VEGF189
<b>Proben 3 + 4:</b>	„	<b>5`VEGF / 3`VEGF165</b>
Proben 5 + 6:	„	5`VEGF / 3`VEGF145
Proben 7 + 8:	„	5`VEGF / 3`VEGF121
Proben 9 + 10:	„	5`VEGF / p3`VEGF121
Proben 11 + 12:	„	p5`VEGF / 3`hVEGF
Proben 13 + 14:	„	p5`VEGF / p3`VEGF189
Proben 15 + 16:	„	p5`VEGF / 3`VEGF145
Proben 17 + 18:	„	p5`VEGF / 3`VEGF165
Proben 19 + 20:	„	p5`VEGF / 3`VEGF121

## ERGEBNISSE



Oben: (von links nach rechts) Größenmarker und Proben 21 bis 30

Unten: (von links nach rechts) Größenmarker und Proben 31 bis 34

Abb. 4b: PCR-Gel Nr. 2 mit den PCR-Produkten folgender Primerkombinationen:

Proben 21 + 22:	PCR-Produkte von	$p5`VEGF / p3`VEGF121$
Proben 23 + 24:	„	$5`pigVEGF / p3`VEGF189$
Proben 25 + 26:	„	$5`pigVEGF / 3`hVEGF$
Proben 27 + 28:	„	$5`pigVEGF / 3`VEGF165$
Proben 29 + 30:	„	$5`pigVEGF / 3`VEGF145$
Proben 31 + 32:	„	$5`pigVEGF / 3`VEGF121$
Proben 33 + 34:	„	$5`pigVEGF / p3`VEGF121$

Bei der Betrachtung beider PCR-Gele fällt auf, dass nur die PCR-Ergebnisse in den Geltaschen 3 + 4 deutliche Banden bilden. Diese cDNA-Proben stammen aus den Mm. latissimi zweier unterschiedlicher Ziegen und wurden zuvor mit der Startermolekülkombination  $5`VEGF / 3`VEGF_{165}$  amplifiziert. Die erwartete Größe des Amplifikates war 324 bp, die tatsächliche Basenzahl der Sequenzen beträgt 304 bp bzw. ohne die Sequenz des  $3`$ -Startermoleküls 283 bp.

Das PCR-Produkt des Startermolekülpaars  $5`VEGF$  und  $3`VEGF_{165}$  wurde ausgewählt und zur Sequenzierung an die Firma GATC, Koblenz, gesendet.

Laut Sequenzierungsergebnis handelt es sich bei der amplifizierten cDNA höchstwahrscheinlich um den  $VEGF_{165}$  der Ziege.

### Sequenzierungsergebnis:

```
1   ggatgtctac cagcgcagct tctgccgtcc cattgagacc
41  ctggtggaca tcttccanga gtaccagat gagattgagt
81  tcattttcaa gccgtcctgt gtgccctga tgcggtgcgg
121 gggctgctgt aatgacgaaa gtctggagtg tgtgccact
161 gaggagtcca acatcaccat gcagattatg cggatcaaac
201 ctcaccaaag ccagcacata ggagagatga gtttcctaca
241 gcataacaaa tgtgaatgca gaccaaagaa agataaagca
281 aggcaagaaa atccctgtgg gcct 304
```

Die unterstrichene Sequenz ist die Sequenz des 3'-Primers; für diesen Genabschnitt ist die eigentliche Ziegensequenz unbekannt.

Das Ergebnis der Chromatographie der VEGF-Teilsequenz ist im Anhang unter Abb. 8 b zu finden.

### Vergleich der VEGF-Sequenz mit der anderer Spezies:

Der Vergleich der Sequenzen von Schaf, Rind und Mensch mit der VEGF<sub>165</sub>-cDNA-Sequenz (s. Abb. 8c) aus der Startermolekülkombination 5'VEGF/ 3'VEGF<sub>165</sub> ergab eine 99,4 % ige (Schaf), 98,7 % ige (Rind) bzw. 93 % ige (Mensch) Übereinstimmung. Auch die unvollständigen Sequenzen der VEGF-cDNA von Schwein und Hirsch wiesen große Ähnlichkeit mit diesem PCR-Produkt auf (94,5 %; 98 %). Abweichungen wurden nur bei einzelnen Basenpaaren beobachtet. Bei der Umschreibung dieser veränderten Basentriplets in Aminosäuren (s. Abb. 8d) entstanden jedoch im Vergleich zur Ziegenfrequenz ähnliche Aminosäuren, nämlich Tyrosin statt Phenylalanin (beides aromatische Aminosäuren), Arginin statt Lysin und Histidin statt Arginin (Lysin, Arginin und Histidin gehören zur Gruppe der basischen Aminosäuren). Ferner wurde Glycin anstelle von Serin gebildet. Im tierischen Körper entsteht Glycin aus Serin und durchläuft somit den gleichen Syntheseweg.

Zusammenfassend lassen sich große Übereinstimmungen zwischen den verglichenen Sequenzen feststellen.

Somit konnte das Startermolekül-Paar:

5' VEGF      5' - CAC GAA GTG GTG AAG TTC AT - 3' und  
 3' VEGF165    5' - AGG CCC ACA GGG ATT TTC TTG -3'

für die Untersuchungen der Muskelproben auf ihren Gehalt an VEGF-cDNA eingesetzt werden.

## 4.2 Auswirkung der Muskelstimulation auf die VEGF-Expression

### 4.2.1 Pilotserie

Es wurde zunächst in einer Pilotserie an drei Burenziegenböcken untersucht, ob die Stimulation eines M. latissimus dorsi einen Anstieg der VEGF-mRNA-Menge zur Folge hat. Als Kontrolle diente der unstimulierte M. latissimus der Gegenseite.

#### 4.2.1.1 Denaturierendes RNA-Gel

Die Qualität der extrahierten Gesamt-RNA wurde gelelektrophoretisch untersucht. Die obere Bande ist die 28S-rRNA aus der großen Ribosomen-Untereinheit (Länge 4,7 kb), die untere Bande die 18S-rRNA aus der kleineren Untereinheit (1,9 kb). Alle Proben weisen in der oberen Bande eine etwa 2-3 mal größere RNA-Menge als in der unteren Bande auf. Dies ist ein Qualitätsnachweis und zeigt, dass die RNA nicht degradiert ist.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen beispielhaft das Ergebnis für die Ziege Z4:

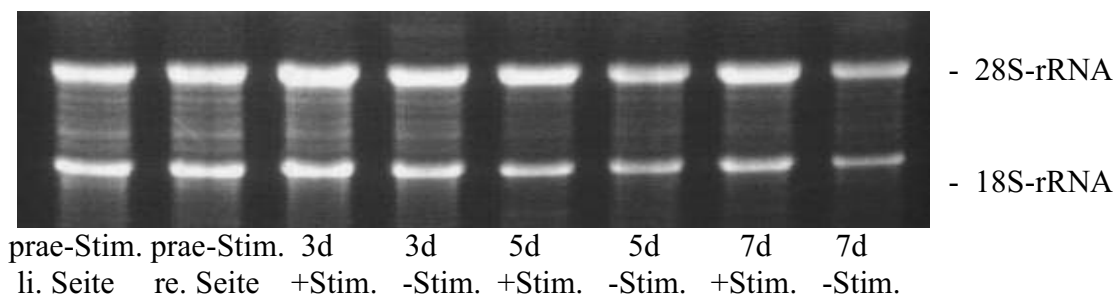


Abb. 4c: RNA-Gel als Qualitätsnachweis, beispielhaft mit Proben der Ziege Z4

(+Stim. = stimulierter Muskel, die Tage geben die Länge der Stimulationsdauer an,  
 -Stim. = unstimulierter Muskel)



*Abb. 4e: Die Abbildung zeigt die VEGF- und GAPDH-cDNA in den Muskelproben der Ziege Z4 vor und nach 3 bis 28 Tagen Elektrostimulation des linken Musculus latissimus dorsi (rechter Latissimus bleibt zum Vergleich unstimuliert). In der oberen Reihe wurden die VEGF-Amplifikate aufgetragen, in der Reihe darunter die GAPDH-Amplifikate. Der mitgeführte Größenmarker lässt auf dem Gel Banden im Abstand von 100 Basenpaaren erkennen, die eine Abschätzung der PCR-Produktlängen ermöglichen. Die Amplifikate des VEGF stellen sich bei 324 bp auf dem Gel dar, die des GAPDH bei 256 bp. Die Standards dienen als Anhalt für die Abschätzung der cDNA-Menge in den Proben: der VEGF-Standard beinhaltet 1fg, der GAPDH-Standard 156 fg cDNA.*

### **4.2.1.3 Stimulationsverläufe**

Die Ziegen wurden linksseitig stimuliert und hierfür auf ein Dauerreizmuster von 2 Hz und 5-6 V eingestellt. In festgelegten, zunächst 2-3-tägigen, später größeren Zeitabständen von 1-2 Wochen wurden von der stimulierten und vergleichend von der unstimulierten Seite der Tiere Muskelproben aus den Mm. latissimi dorsi entnommen.

Dargestellt sind die Vergleiche der cDNA-Mengen von VEGF und GAPDH der stimulierten Seite (+Stim.) mit der unstimulierten Seite (-Stim.) sowie das Verhältnis von VEGF und GAPDH zueinander.

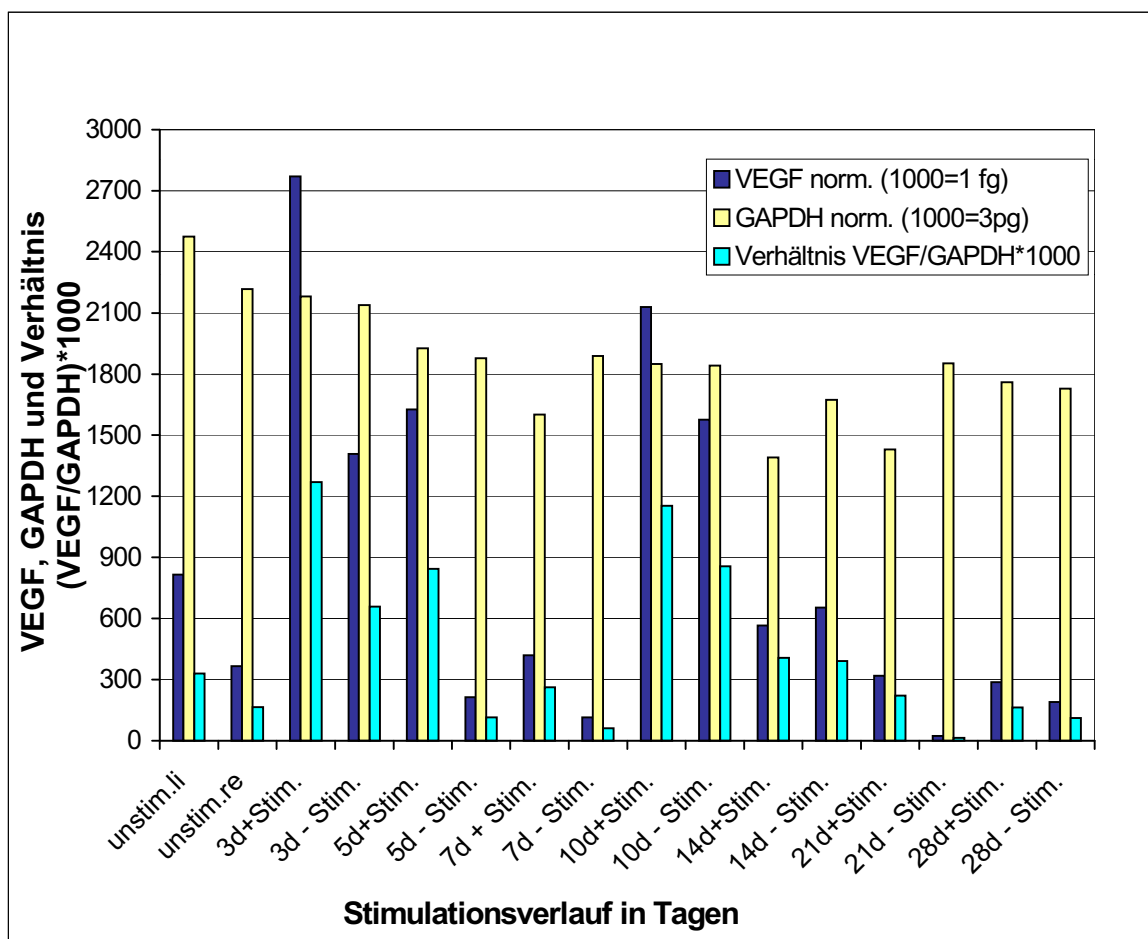


Abb. 4f: Stimulationsverlauf des Ziegenbocks Z4 (+Stim. = stimulierte Muskelseite, - Stim. = unstimulierte Seite)

Das Diagramm 4f zeigt den Stimulationsverlauf der Ziegenbocks Z4 vom Tag der Stimulationsimplantation bis zum 28. Tag unter Stimulation. Dargestellt sind jeweils die Menge an VEGF-cDNA, die Menge an GAPDH-cDNA und das Verhältnis der beiden zueinander. Nach 3 Tagen Stimulation ist ein deutlicher Anstieg des VEGF zu sehen. Danach nimmt die Menge des VEGF bis zum 7. Tag nach Stimulationsbeginn ab und erreicht einen erneuten Höhepunkt am 10. Tag. Jedoch ist am 3. und 10. Tag nach Stimulationsbeginn auch im Muskel der unstimulierten Seite mehr VEGF zu finden als vor der Stimulation. Zudem muss auf die bereits vor Stimulationsbeginn gefundene Differenz zwischen dem VEGF-cDNA-Gehalt der linken und der rechten Seite des Tieres

## ERGEBNISSE

hingewiesen werden. Es wird deutlich, dass in allen untersuchten Muskelproben unabhängig von der Stimulation stets relativ konstante Mengen GAPDH vorliegen. VEGF wird jedoch anscheinend vom Muskel nicht gleichmäßig exprimiert, noch reagiert es auf die Stimulation durch einen Anstieg der cDNA-Menge.

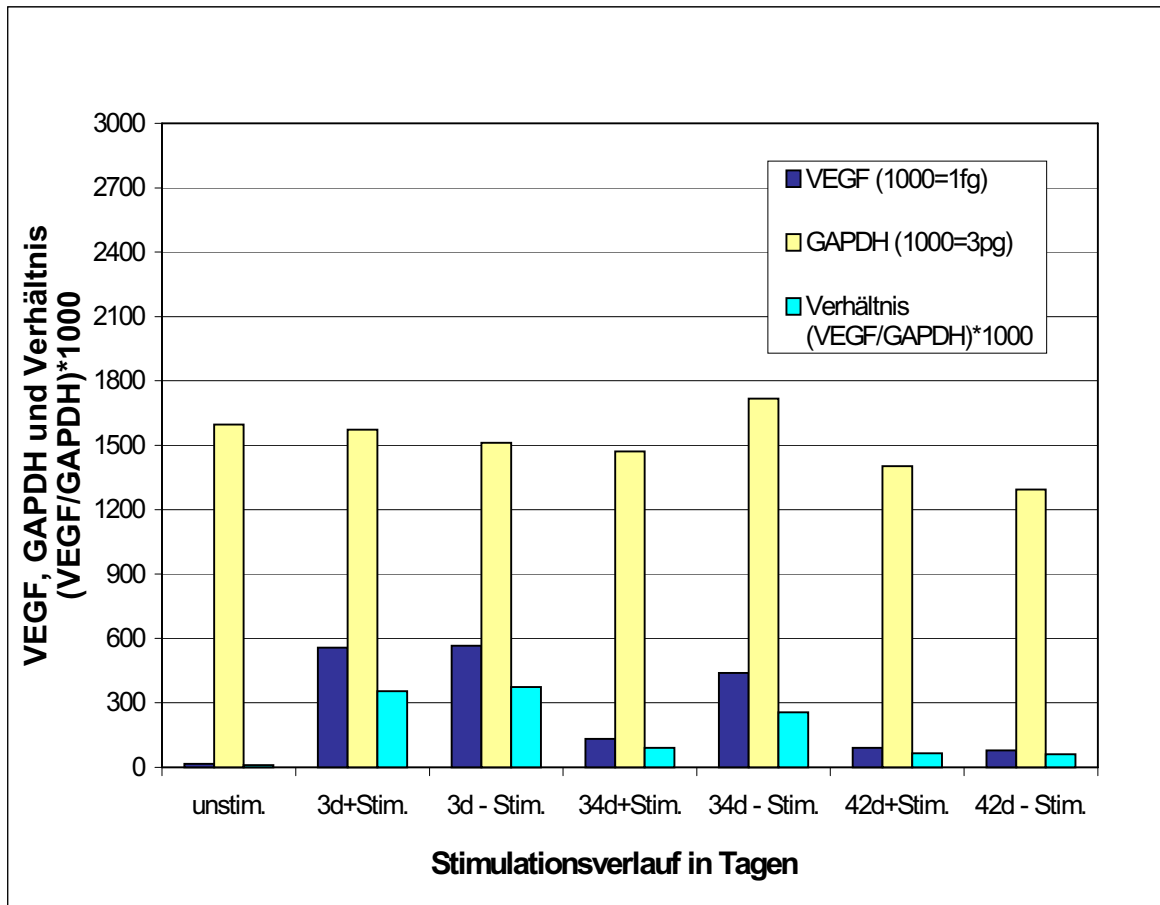


Abb. 4g: Stimulationsverlauf des Ziegenbocks Z5

In der Abb. 4g ist der Stimulationsverlauf der Ziege Z5 vom Tag der Stimulationsimplantation bis zum 42. Tag dargestellt. Aufgrund einer Infektion des Tieres 4 Tage nach Stimulationsbeginn musste die Entnahme von Muskelbiopsien zwischenzeitlich für einen Zeitraum von 30 Tagen unterbrochen werden, wenngleich die Stimulation in dieser Zeit beibehalten wurde. 3 Tage nach Stimulationsbeginn fanden sich sowohl auf der stimulierten als auch auf der unstimulierten Seite erhöhte VEGF-Werte. Nach 34 Tagen wurde auf der unstimulierten Seite des Tieres mehr VEGF-cDNA gefunden als auf der stimulierten.

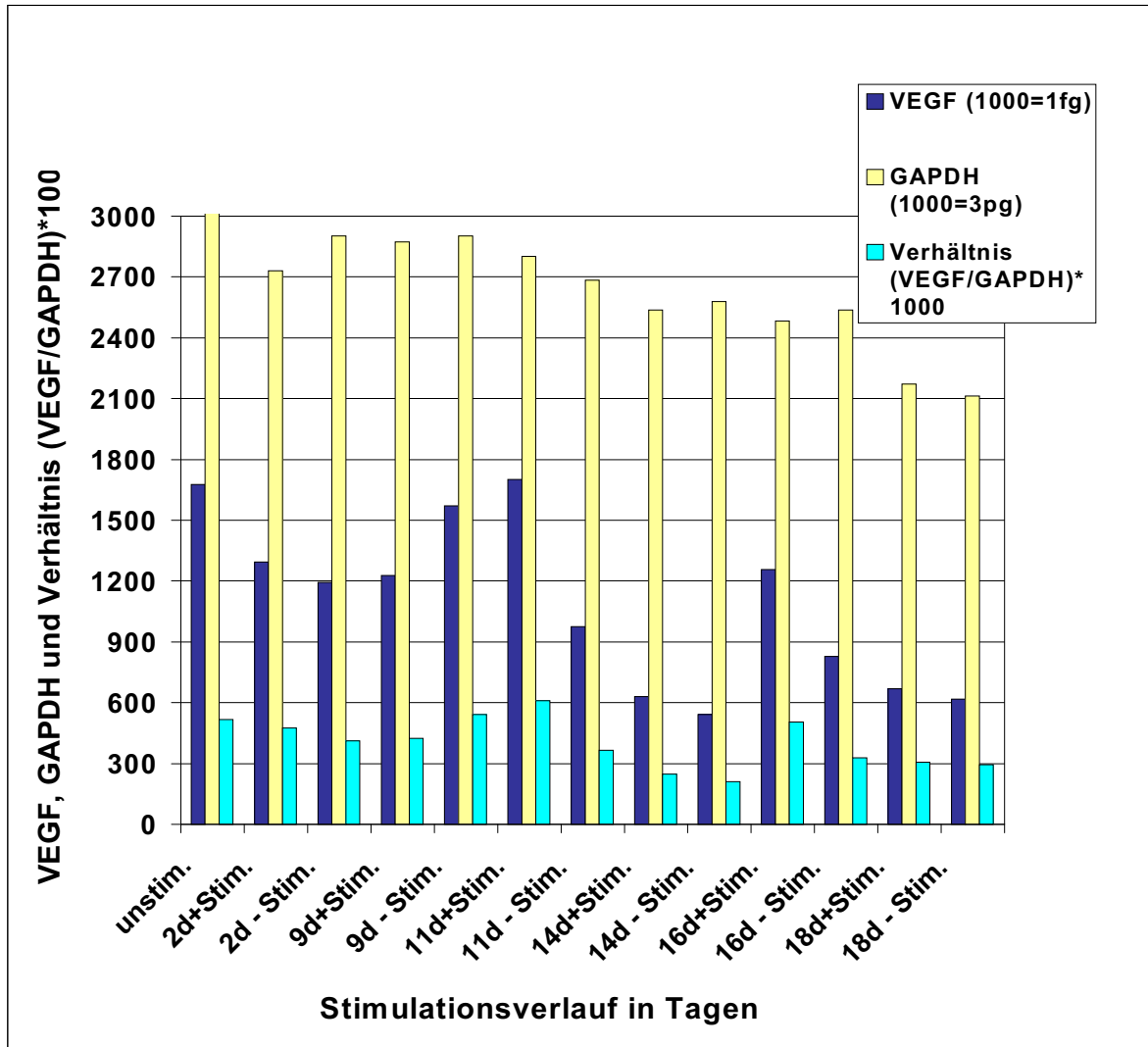


Abb. 4h) Stimulationsverlauf der Ziege Z6

Das Diagramm 4h zeigt den Stimulationsverlauf der Ziege Z6 vom Tag der Stimulationselektrodenimplantation bis zum 18. Tag nach Stimulationsbeginn. Am 16. Tag sowie am 18. Tag nach Stimulationsbeginn hatte sich im Operationsgebiet der stimulierten Muskelseite ein Serom gebildet, welches entlastet werden musste. Nach dem 18. Tag wurde aus diesem Grund der Versuch mit Z6 beendet.

Bei diesem Tier wurde am Tag der Stimulationselektrodenimplantation mehr VEGF im Muskel nachgewiesen als nach 2 Tagen der Stimulation. Am 9. Tag fand sich im stimulierten Muskel eine geringere Menge VEGF-cDNA, während sie auf der unstimulierten Seite angestiegen war. 2 Tage später wurde dann auf der stimulierten Seite der Ziege ein Anstieg des VEGF, auf der unstimulierten Seite ein Abfall des VEGF festgestellt. Dieses Verhältnis fand sich noch einmal am 16. Tag.

Die Ergebnisse dieser drei Pilotversuche zeigen neben relativ konstanten GAPDH-Mengen große Schwankungen in den VEGF-Mengen von stimulierten und unstimulierten Muskeln. Der erwartete Anstieg des VEGF am 3.Tag nach Stimulationsbeginn ließ sich nur bei der Ziege Z4 nachweisen. Dieses Ergebnis konnte bei den anderen beiden Ziegen jedoch nicht reproduziert werden, so dass dieser Befund nicht als relevant bezeichnet werden kann. Zudem muss darauf hingewiesen werden, dass bei der Ziege Z4 die VEGF-cDNA-Mengen des linken und des rechten Muskels bereits vor Stimulationsbeginn deutliche Differenzen aufwiesen. Auch die übrigen Ergebnisse lassen keine logischen Zusammenhänge zwischen der Stimulationsdauer und der vorgefundenen Menge an VEGF-cDNA erkennen. So wurde in einigen Proben der unstimulierten Kontrollmuskeln mehr VEGF-cDNA nachgewiesen als in den stimulierten Muskeln (Z6: 9. Tag; Z5: 34. Tag). Zudem wurde in einigen Fällen bei einem Anstieg des VEGF im stimulierten Muskel auch ein Anstieg der VEGF-cDNA im Kontrollmuskel festgestellt (Z4: 3. Tag; Z5: 3. Tag).

Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die VEGF-Expression im Muskel überhaupt grundsätzlich homogen ausgebildet ist und somit an jedem Ort im Muskel ständig vergleichbare Mengen an VEGF vorliegen. Deshalb wurden bei Muskeln von drei weiteren Ziegenböcken (Z1, Z2 und Z3) beidseits an 8 verschiedenen Orten innerhalb des Muskels (s. Abb. 3a) der Gehalt an VEGF-mRNA gemessen. Zusätzlich wurde an diesen Tieren untersucht, welchen Einfluss der zeitliche Abstand zwischen Probenentnahme und Einfrieren in flüssigem Stickstoff auf die RNA-Qualität sowie die VEGF- und GAPDH-cDNA-Menge hat.

### 4.3 Ermittlung der VEGF-Menge an verschiedenen Muskelorten

Um festzustellen, ob die Verteilung des VEGF an verschiedenen Orten innerhalb des Muskels möglicherweise heterogen ist, wurden bei drei Ziegenböcken (Z1, Z2 und Z3) beidseits die Mm. latissimi dorsi komplett entnommen und die Menge der VEGF-mRNA jeweils an acht definierten Orten (s. Abb. 3a) bestimmt.

## ERGEBNISSE

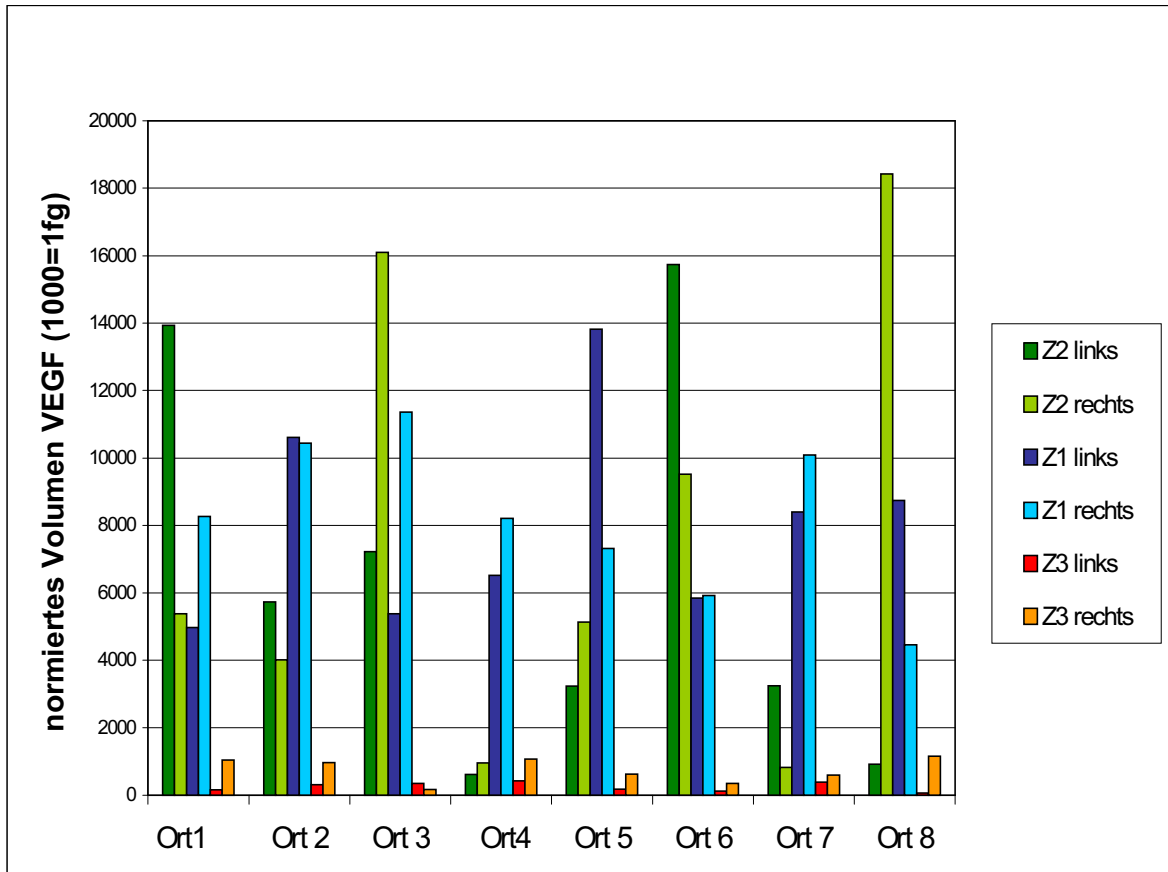


Abb. 4i: Heterogene Verteilung des VEGF im unstimulierten *M. latissimus dorsi*

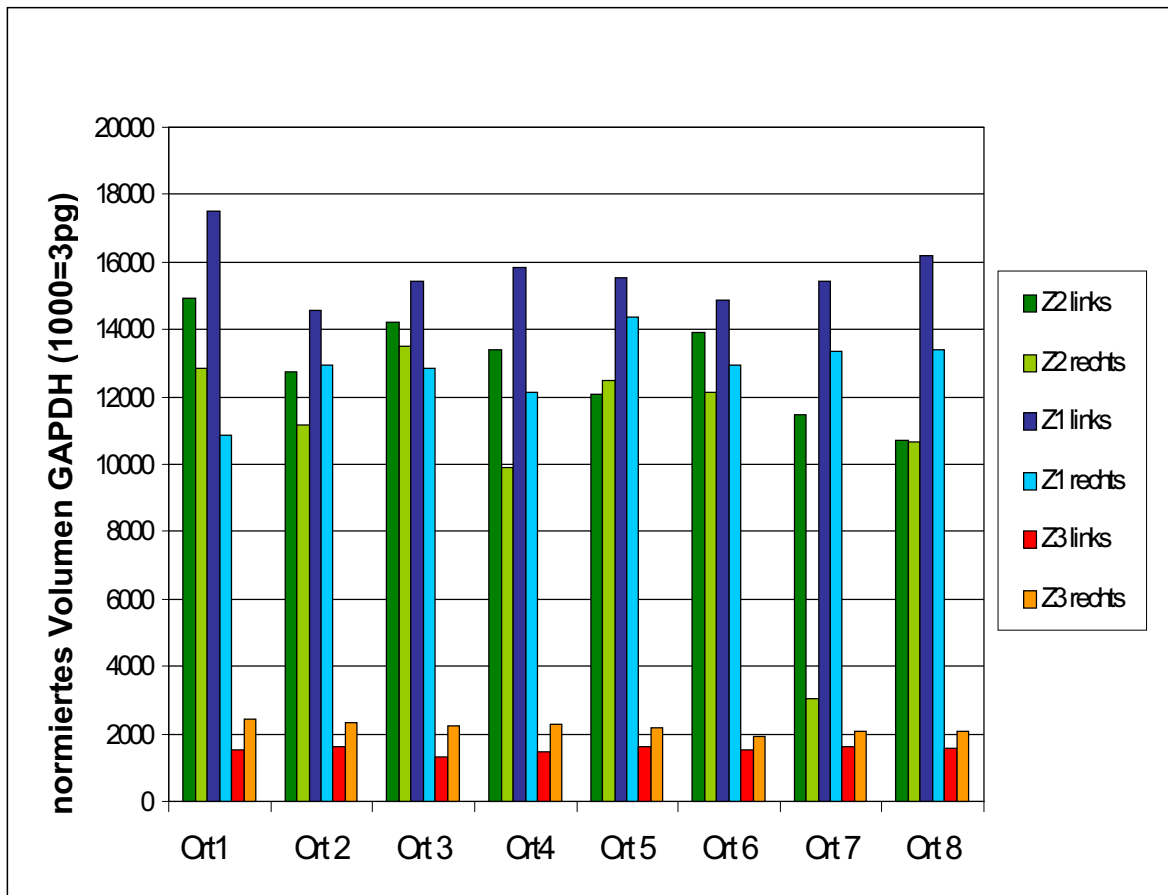


Abb. 4j: Homogene Verteilung des GAPDH im unstimulierten *M. latissimus dorsi*

Gemeinsamer Kommentar zu Abb. 4i+j: Die Diagramme zeigen, dass die VEGF-cDNA heterogen verteilt vorliegt, während die GAPDH-cDNA bei jeder Ziege an allen 8 Orten eine konstante Menge aufweist. Bei der Ziege Z3 finden sich beidseits insgesamt wesentlich geringere Mengen an GAPDH-cDNA und VEGF-cDNA als bei den Ziegen Z1 und Z2, wobei jedoch auch bei dieser Ziege das GAPDH homogen verteilt vorliegt. Die räumliche Verteilung der VEGF-cDNA lässt weder eine Gesetzmäßigkeit noch ein regelmäßiges Verteilungsmuster vermuten.

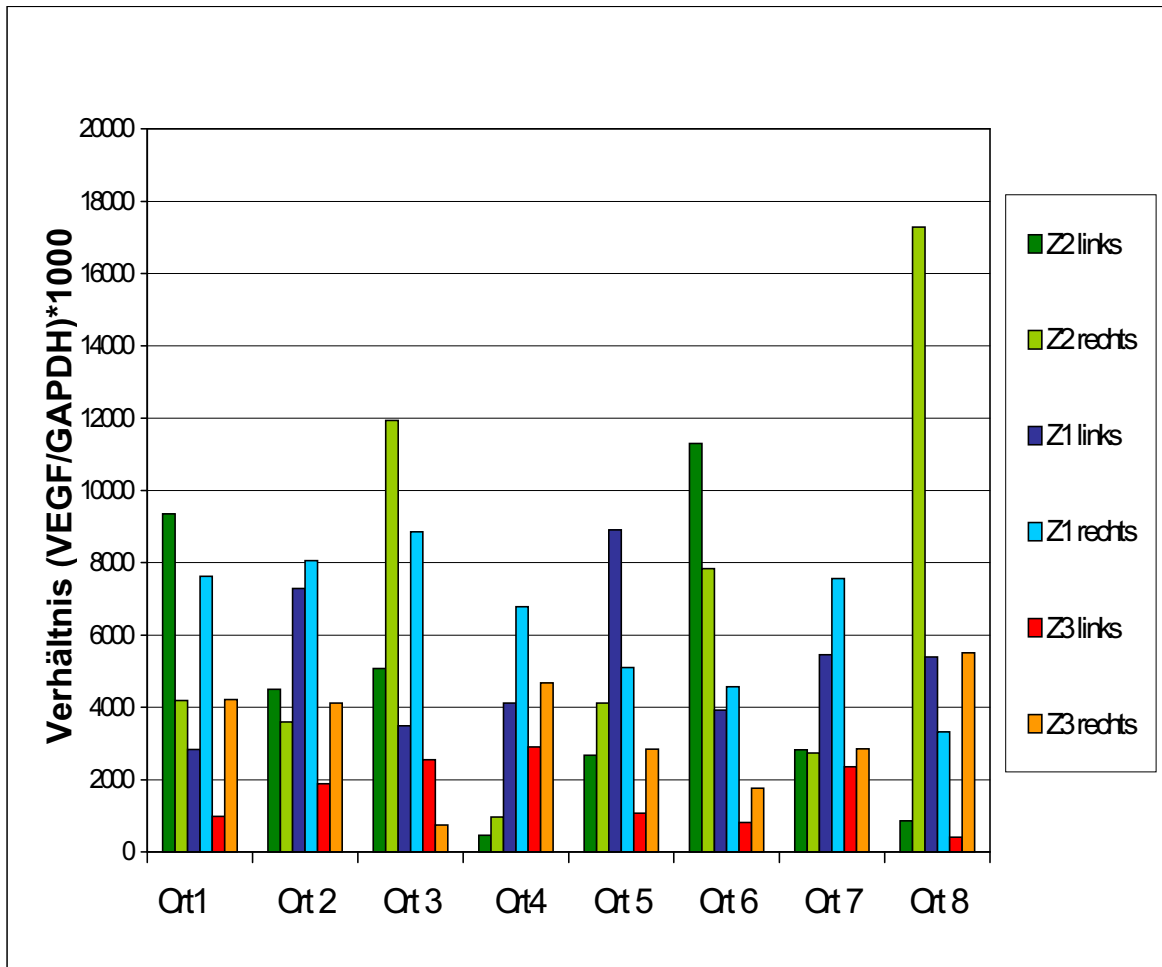


Abb. 4k: Verhältnis der Verteilung von VEGF zu GAPDH an 8 verschiedenen Orten innerhalb des unstimulierten *M. latissimus dorsi*

#### 4.4 Ermittlung der VEGF-Menge nach unterschiedlichen Entnahmezeiten

Diese Versuchsserie wurde durchgeführt zur Bestimmung der Korrelation des Zeitabstandes zwischen der Muskelentnahme und dem Asservieren der Probe in flüssigem Stickstoff in Hinsicht auf eine mögliche Degradierung der RNA.

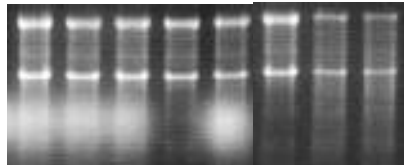
Hierfür sind bei den Ziegen Z1, Z2 und Z3 bei der Probenentnahme für die Bestimmung der Ortsverteilung aus den *Mm. latissimi dorsi* zusätzlich größere Muskelstücke entnommen worden, wovon jeweils 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 und 60 Min. nach Entnahme und Lagerung bei Raumtemperatur jeweils einige Stückchen abgeschnitten und dann in

## ERGEBNISSE

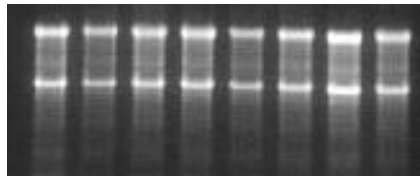
---

flüssigen Stickstoff eingebracht worden sind. Der VEGF-mRNA-Gehalt dieser Stückchen wurde molekularbiologisch bestimmt.

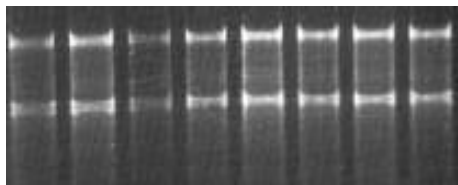
Zunächst soll hier die Qualität der RNA anhand der angefertigten RNA-Gele veranschaulicht werden:



Zeitabstand nach Probennahme: 2 4 6 8 10 20 40 60 Min.  
beim Ziegenbock Z1, linker M. latissimus dorsi (Abb. 4l)



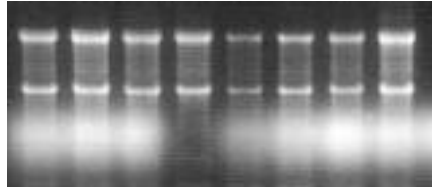
Zeitabstand nach Probennahme: 2 4 6 8 10 20 40 60 Min.  
beim Ziegenbock Z1, rechter M. latissimus dorsi (Abb. 4m)



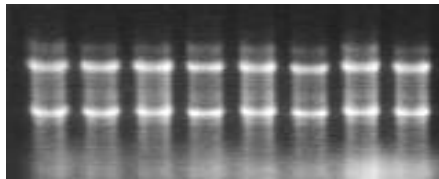
Zeitabstand nach Probennahme: 2 4 6 8 10 20 40 60 Min.  
beim Ziegenbock Z2, linker M. latissimus dorsi (Abb.4n)

## ERGEBNISSE

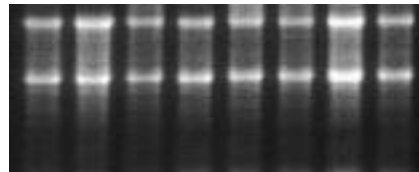
---



Zeitabstand nach Probennahme: 2 4 6 8 10 20 40 60 Min.  
beim Ziegenbock Z2, rechter M. latissimus dorsi (Abb. 4o)



Zeitabstand nach Probennahme: 2 4 6 8 10 20 40 60 Min.  
beim Ziegenbock Z3, linker M. latissimus dorsi (Abb. 4p)



Zeitabstand nach Probennahme: 2 4 6 8 10 20 40 60 Min.  
beim Ziegenbock Z3, rechter M. latissimus dorsi (Abb. 4q)

Alle 6 RNA-Gele (Abb. 4l – 4q) zeigen überwiegend eine gute Qualität der RNA bis hin zu einer Stunde nach Probenentnahme.

In den Auswertungen durch rT-PCR wird nur bei einem Versuchstier ein Abfall der VEGF-cDNA-Menge zwischen der 2. und der 8. Minute erkennbar, bei den anderen Tieren schwanken die Mengen erheblich und lassen keinen zeitlichen Zusammenhang zwischen VEGF-Degradierung und Asservierungszeit erkennen.

## ERGEBNISSE

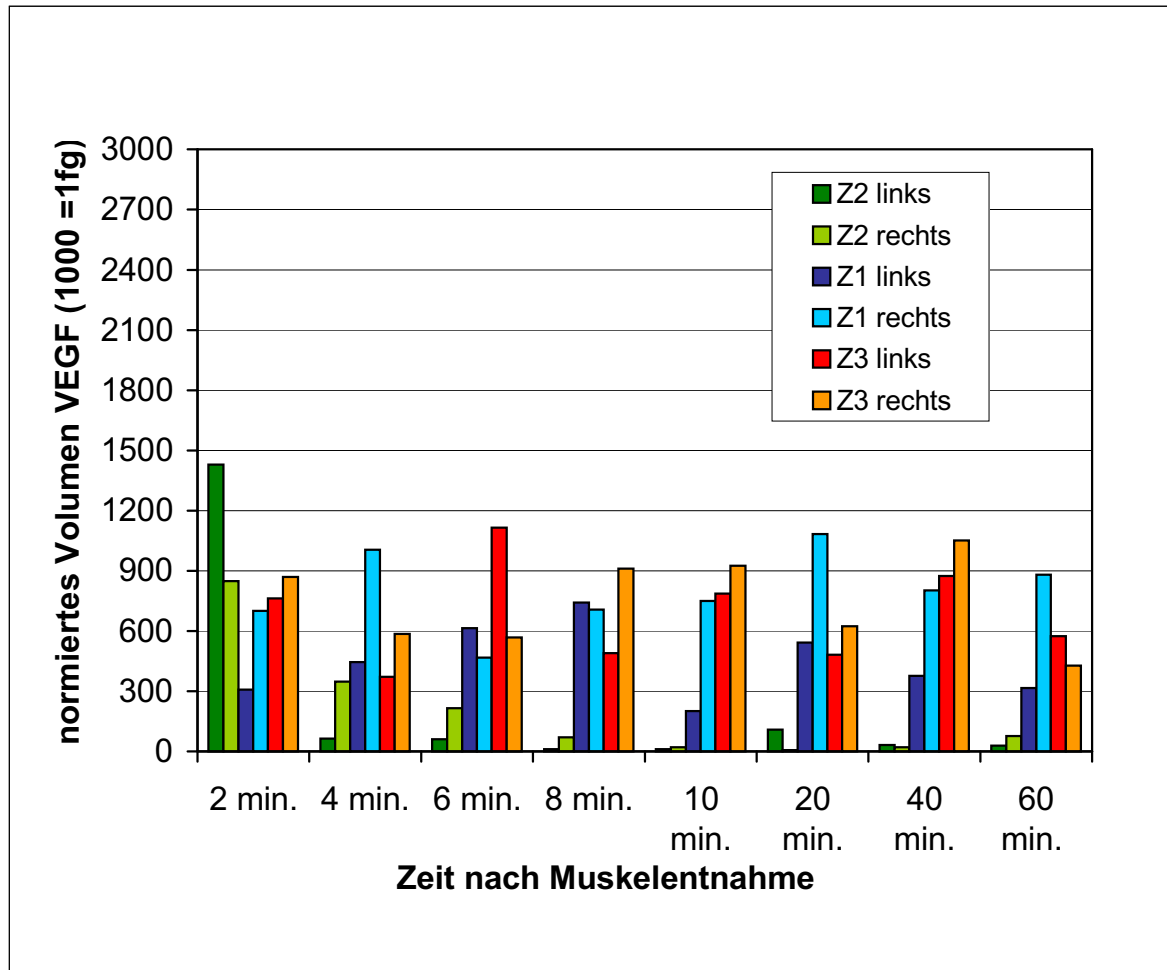


Abb. 4r: VEGF im Zeitverlauf bis 60 Minuten nach Muskelentnahme

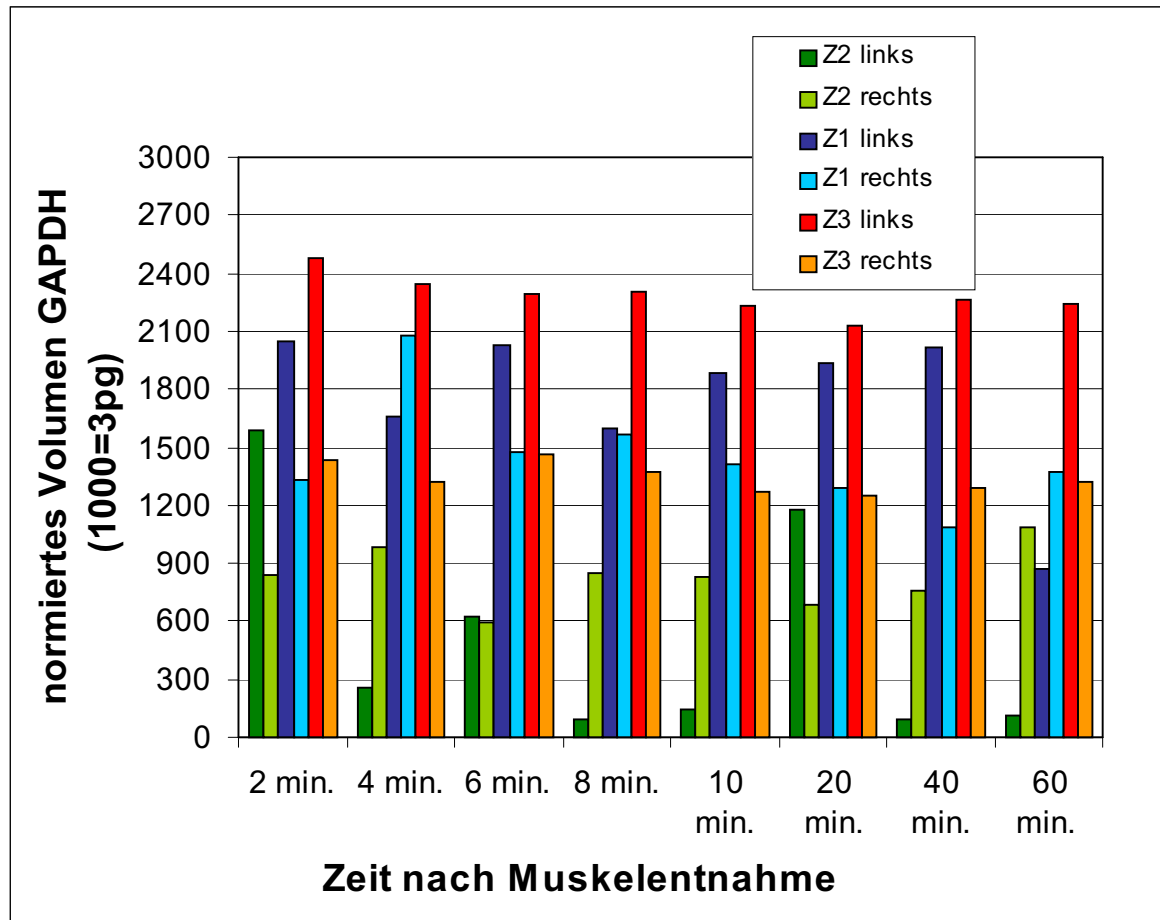


Abb. 4s: GAPDH im Zeitverlauf bis 60 Minuten nach Muskelentnahme

Gemeinsamer Kommentar der Abb. 4r+s: Die Diagramme zeigen sowohl für die VEGF-cDNA als auch für die GAPDH-cDNA keine deutliche Tendenz der RNA-Degradierung. Auch hier wird die Konstanz der GAPDH-Menge in allen untersuchten Muskeln deutlich. Der VEGF der Ziegen Z1 und Z3 schwankt von Probe zu Probe, lediglich die Ziege Z2 lässt einen Abfall der VEGF-Menge von der 2. bis zur 8. Minute erkennen. Die Relevanz dieses Ergebnisses ist jedoch fraglich, da auf der linken Muskelseite des Tieres nochmals nach 20 Minuten und auf der rechten Seite noch einmal nach 60 Minuten ein Anstieg des VEGF gefunden wird. In Hinsicht auf das Ergebnis der räumlichen heterogenen Verteilung der VEGF-cDNA muss die Aussagekraft dieses Zeitversuches für die VEGF-cDNA insgesamt jedoch in Frage gestellt werden; für die Beurteilung einer fraglichen mRNA-Degradierung im zeitlichen Verlauf müssten in den zu untersuchenden Muskelproben gleiche Ausgangsmengen an VEGF-cDNA vorliegen.

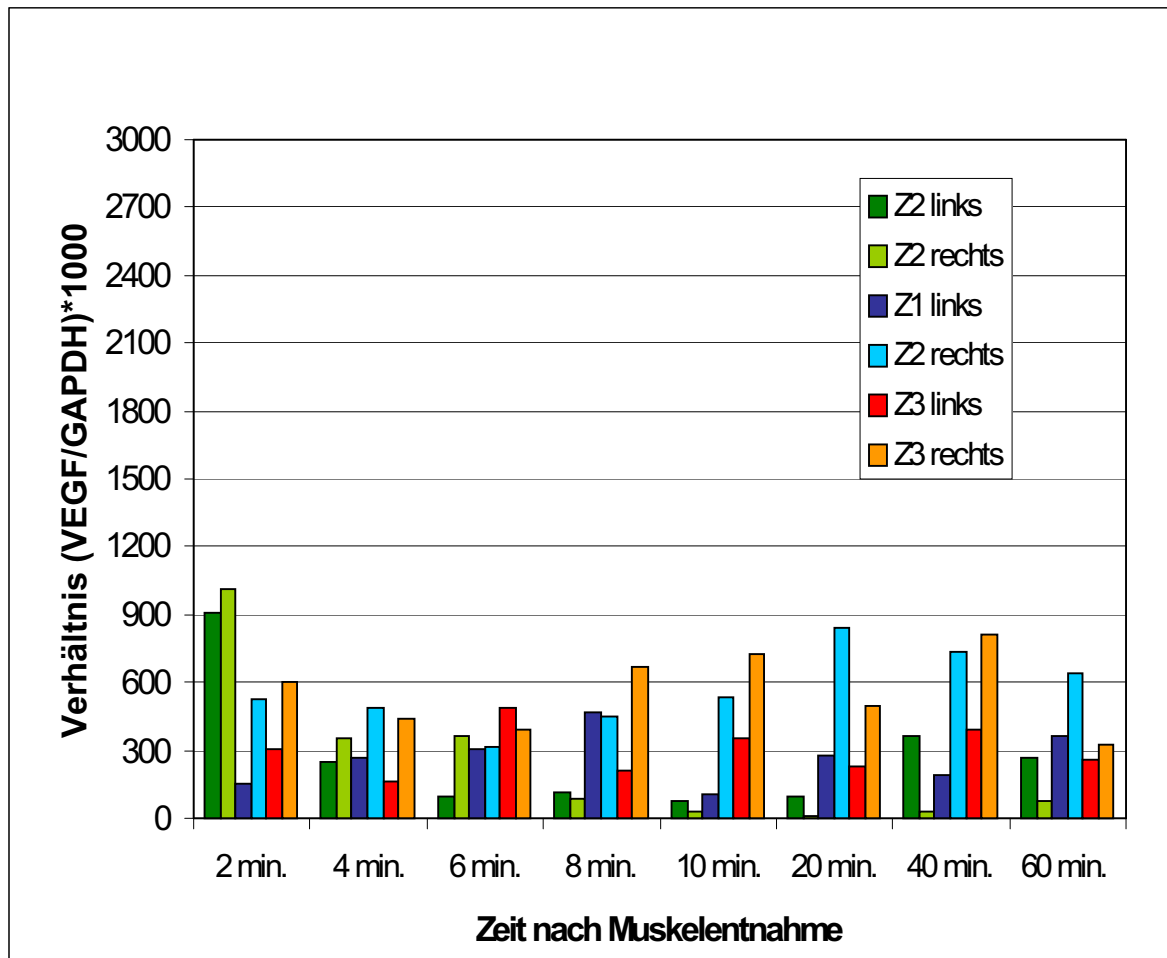


Abb. 4 t: Verhältnis von VEGF zu GAPDH im Zeitverlauf bis 60 Minuten nach Muskelentnahme

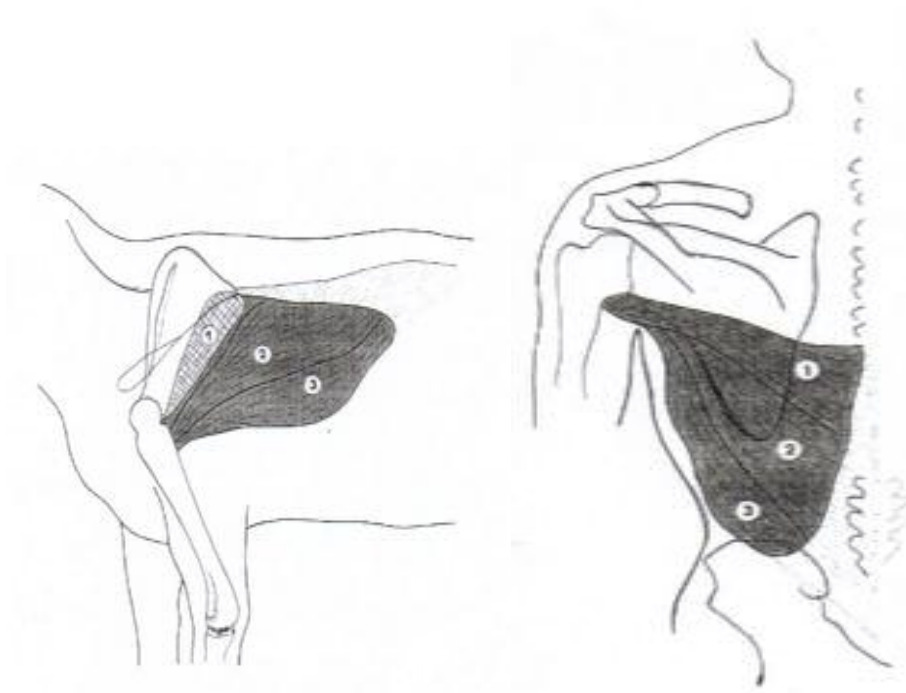
Im Rahmen dieser Arbeit ist neben der Sequenzierung der VEGF-Teilsequenz der Ziege insbesondere durch die Ergebnisse der Versuchsserie 2 eine wichtige grundlegende Erkenntnis für die weiteren Arbeiten mit dem muskulären VEGF von Ziegen getroffen worden. Die Heterogenität der VEGF-Verteilung innerhalb der Ziegenmuskeln stellt einen entscheidenden Störfaktor dar, welcher einzelne Stimulationsverläufe und eine Verlaufsbeurteilung durch das Auswerten der VEGF-cDNA-Menge so nicht erlaubt.

Da die Mengen an VEGF und GAPDH auch zwischen den Tieren erheblich schwanken (vgl. Ziege Z2 und Ziege Z3), könnte diese Methode der molekularbiologischen Auswertung wahrscheinlich selbst dann nicht herangezogen werden, wenn ganze Muskeln mehrerer Ziegen nach unterschiedlichen Stimulationszeiten miteinander auf ihren Gehalt an VEGF verglichen werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Sequenz des VEGF-Gens der Ziege

Für diese Arbeit wurden Burenziegen verwendet. Sie wiegen in etwa so viel wie ein erwachsener Mensch - ca. 60-70 kg, und ihre Mm. latissimi dorsi sind in Größe, Anatomie und sonstigen Eigenschaften (nervale und Gefäßversorgung) denen des Menschen sehr ähnlich. Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht die ähnliche Topografie der Mm. latissimi dorsi von Ziege und Mensch:



*Abb. 5a: Topographische Lage des Musculus latissimus dorsi bei der Ziege und beim Menschen mit den Abschnitten Pars transversalis (1), Pars obliqua (2) und Pars transversalis (3)*

Um die Gemeinsamkeiten auf molekularbiologischer Ebene aufzuzeigen, wurde die VEGF-cDNA der Ziege teilweise sequenziert und anschließend mit der VEGF-Sequenz von einigen anderen Paarhufern sowie der VEGF-Sequenz des Menschen verglichen

(s. Abb. 8c). Hierbei sind zwischen allen betrachteten Spezies viele Übereinstimmungen gefunden worden. Der Vergleich der Nukleotidsequenzen von Ziege und Mensch zeigt bei einer Ziegen-Gensequenz von 283 Basen 21 Abweichungen vom VEGF-Gen des Menschen. Bemerkenswert ist hierbei, dass bei einem Vergleich der translatierten Aminosäuren diese 21 Abweichungen in den Basentripletts nur in 6 Fällen tatsächlich unterschiedliche Aminosäuren produzieren (s. Abb. 8d). Die anderen 15 Basentripletts, die eine unterschiedliche Base beinhalten, kodieren dennoch für die gleiche Aminosäure wie bei der Ziege. Dies erklärt sich dadurch, dass der genetische Code für 20 Aminosäuren aus 4 verfügbaren Basen durch Bildung von Drei-Buchstaben-Wörtern  $4^3=64$  verschiedene Codons (Tripletts) bereitstellt; 61 von diesen Codons translatieren Aminosäuren, drei Codons haben Stopfunktionen. Für die meisten Aminosäuren gibt es daher mehrere synonyme Codons; in diesem Zusammenhang wird auch von einem *degenerierten genetischen Code* gesprochen.

Hier ein Beispiel für die Synonymität einiger Codons: das Triplet der Basen 8-10 der Ziege lautet T A C und codiert für die Aminosäure Tyrosin, während das vergleichbare Triplet der Basen 139-141 des Menschen T A T lautet und ebenfalls für Tyrosin codiert. Da die Aminosäure erhalten bleibt, wird dieses auch als „konservative“ Abweichung bezeichnet. Hingegen findet sich für die Basen 20-23 der Ziege die Sequenz T T C, während sich an vergleichbarer Stelle beim Menschen (Basen 151-154) die Sequenz T A C ergibt. Diese Sequenzen codieren für unterschiedliche Aminosäuren:

T T C für Phenylalanin, T A C für Tyrosin.

Bei den sechs Aminosäuren aus dem VEGF-Gen des Menschen, die von denen der Ziege abweichen, handelt es sich um Aminosäuren, die in ihrer Struktur bzw. Funktion den von vergleichbarer Basensequenz der Ziege codierten Aminosäuren sehr ähnlich sind: an zwei Stellen der VEGF-Teilsequenzen wird anstatt des Phenylalanins der Ziege beim Menschen Tyrosin produziert. Diese Aminosäuren gehören beide der Gruppe der aromatischen Aminosäuren an und unterscheiden sich nur durch eine OH-Gruppe in ihrer Struktur voneinander. Phenylalanin und Tyrosin besitzen eine ähnliche Größe. Phenylalanin ist für das Säugetier eine essenzielle Aminosäure, während Tyrosin aus Phenylalanin gebildet werden kann. Ersetzt werden ferner Arginin durch Histidin, Serin durch Glycin und Lysin durch Arginin. Auch Lysin und Arginin sind Aminosäuren, die sich in ihrer Struktur sehr ähneln. Beides sind basische Aminosäuren; Lysin verfügt über eine Stickstoffgruppe und ist eine essenzielle Aminosäure, während Arginin über zwei Stickstoffgruppen verfügt und

aus Lysin gebildet werden kann. Histidin gehört ebenfalls zu den basischen Aminosäuren, verfügt jedoch nicht über freie Stickstoffgruppen an seinem Ende, sondern über einen Imidazolring; diese Aminosäure wird auf einem eigenen komplexen Stoffwechselweg hergestellt und gehört wie Lysin zu den essenziellen Aminosäuren. Serin schließlich ist ein Vorläuferprotein für Glycin, beide Aminosäuren sind in ihrer Struktur relativ klein (*L. Stryer: Biochemie, 1990*).

Insgesamt lässt sich eine weitgehende Übereinstimmung zwischen dem VEGF-Genom der Ziege und dem des Menschen feststellen.

### 5.2 Vaskularisierung durch Elektrostimulation

Diese Arbeit knüpft an Versuchsergebnisse der Arbeitsgruppe Hang von 1995 an Ratten und der Arbeitsgruppe Annex von 1998 an Kaninchen an, in welchen an Kleintieren der Anstieg an muskulärem VEGF-cDNA-Gehalt nach elektrischer Stimulation nachgewiesen worden ist.

Bei der Studie der Arbeitsgruppe Hang wurde der rechte M. tibialis anterior sowie der M. extensor digitorum longus von 12 Ratten 21 Tage lang über eine elektrische Reizung des N. peroneus mit 10 Hz und 3-4 V stimuliert. Hierbei sind Zyklen von 2 Stunden Stimulation und 4 Stunden Pause gewählt worden, die mit Hilfe einer speziell entwickelten Elektrode mit automatischen Arbeitszyklen verwirklicht werden konnten. Die kontralateralen Muskeln dienten als Kontrolle. Nach 4, 7, 14 und 21 Tagen der Stimulation sind sowohl die stimulierten als auch die unstimulierten Muskeln von jeweils drei Tieren im Ganzen entnommen und auf ihren VEGF-mRNA-Gehalt mittels Northern Blot untersucht worden. Im Vergleich zu den Kontrollmuskeln fand sich im stimulierten Muskel nach 4 Tagen ein sechsfacher Anstieg an VEGF-mRNA, nach 21 Tagen war das VEGF der stimulierten Muskeln noch um das 1,5-fache erhöht.

Die Arbeitsgruppe Annex knüpfte 1998 an diese Versuche an und verwendete Kaninchen als Versuchstiere. Der M. tibialis anterior, der M. extensor digitorum longus und der M. peroneus longus einer Seite der Tiere sind hierbei durch ein Dauerstimulationsmuster von 6-10 Hz erregt worden; die Gegenseite diente als Kontrolle. Nach 3, 5, 10, 21 und 56 Tagen sind die stimulierten Muskeln sowie ihre Kontrollen entnommen und der

Proteingehalt mittels Western-Blot untersucht worden. Hierbei ist die größte VEGF-Proteinmenge am 21. Tag gefunden worden, während an allen anderen Tagen etwa dreimal soviel VEGF in den stimulierten Muskeln gegenüber den Kontrollmuskeln bestimmt werden konnte.

Beide Arbeitsgruppen haben zusätzlich gezeigt, dass sich ihre stimulierten Skelettmuskeln von überwiegend schnellen, glykolytisch arbeitenden Typ II-Muskelfasern in ausdauernde, oxidativ arbeitende Typ I-Muskelfasern umbilden und dass unter vermehrter VEGF-Produktion die Kapillardichte zunimmt. Die Arbeitsgruppe von Annex fand außerdem durch immunhistochemische Färbung der Muskelproben eine vermehrte VEGF-Proteinproduktion im Gewebe zwischen den Myozyten, nicht dagegen in den Muskelfasern selbst. Nach einer Untersuchung verschiedener Muskeltypen mit unterschiedlichen Faserzusammensetzungen auf ihren jeweiligen Gehalt an VEGF konnte die Arbeitsgruppe zudem zeigen, dass das VEGF-Protein in Typ I-Muskeln stets in größeren Mengen vorliegt als in Typ II-Muskeln.

In dieser Studie sollte an die Versuche der Arbeitsgruppen Hang und Annex angeknüpft werden. Auf dem experimentellen Gebiet der Kardiomyopexie und biomechanischer Herzunterstützungssysteme werden hauptsächlich Großtiere wie Ziegen oder Kälber eingesetzt, daher erschien es interessant, die Effekte der Muskelstimulation am M. latissimus dorsi von Ziegen hinsichtlich der im Muskel produzierten Menge an VEGF zu prüfen. Mit Hilfe der Entwicklung einer semiquantitativen cDNA-Bestimmung des Ziegen-VEGF-Gens wurde untersucht, ob durch Bestimmung des Muskelgehaltes an VEGF vergleichbar zu den Versuchen mit Kleintieren der Vaskularisierungszustand des M. latissimus dorsi auch von Ziegen erfasst werden kann.

Die Stimulationsgrafiken von drei Versuchsziegen (Z4, Z5 und Z6) ließen jedoch keine sichtbare Übereinstimmung in Bezug auf das Verhalten des VEGF unter Muskelstimulation (s. Ergebnisse: 4f, 4g, 4h) erkennen. Der erwartete Anstieg von cDNA-VEGF im Muskel nach 3 Tagen Stimulation, wie von der Arbeitsgruppe Hang beschrieben, blieb aus. Insgesamt ließen sich keine Rückschlüsse auf Gesetzmäßigkeiten feststellen. Diese fehlende Relevanz kann mehrere Faktoren als Ursache haben:

- die Auswahl der Tiere und Probenentnahme (vgl. 5.2.1)
- das Stimulationsmuster und die Wahl der Reizstärke (vgl. 5.2.2 und 5.2.3)

- die molekularbiologische Auswertung (vgl. 5.2.3)
- die Verteilung des VEGF innerhalb des Muskels (vgl. 5.2.4)

Auf diese Faktoren wird im folgenden eingegangen:

### 5.2.1 Auswahl der Tiere und Probenentnahme

Im Unterschied zu den Arbeitsgruppen Hang und Annex, die ihre Experimente an Ratten und Kaninchen durchführten, wurden in dieser Arbeit nicht die Extremitätenmuskeln (welche überwiegend aus Typ II-Muskelfasern bestehen) stimuliert, sondern der M. latissimus dorsi (dieser ist ein Muskel mit überwiegend Haltefunktionen und besteht aus größeren Anteilen Typ I-Muskelfasern).

Da es sich bei den Ziegen um Großtiere handelt, konnten die Mm. latissimi dorsi nicht wie bei der Studie mit den Ratten komplett entnommen werden, sondern es wurden statt dessen zu mehreren Zeitpunkten Muskelproben entnommen. Hierdurch wurde der M. latissimus und die Haut über dem Muskel jedes Mal verletzt, so dass bei Probenentnahmen im Abstand von wenigen Tagen ein ständiger Entzündungsreiz und Wundheilungsprozess die Aussage der molekularbiologischen Auswertung beeinflusste. Denn der VEGF wird auch in Entzündungen, Tumoren und heilenden Wunden vermehrt produziert (*Brown et al., 1992; Senger et al., 1993; Kondo et al., 1994*). Zudem reagierte jedes der Tiere verschieden auf die OP-Situation, und die Ziegen hatten unterschiedlich schnelle Wundheilungszeiten. Da auf die Wundheilung und Narbenbildung der Tiere Rücksicht genommen wurde, waren die Abstände zu den vorherigen Entnahmestellen sowie zwischen beiden Muskelseiten nur annähernd vergleichbar.

Bei der Ziege Z4, die sich nach jeder Probenentnahme rasch erholte, fand sich der erwartete VEGF-cDNA-Produktionsverlauf mit einem erheblichen Anstieg am 3. Tag nach Stimulationsbeginn sowie mikroskopisch vermehrten Kapillarbildungen. Jedoch unterschieden sich die VEGF-cDNA-Ausgangsmengen der unstimulierten Muskeln beider Seiten sehr voneinander. Dies musste zu der Überlegung führen, dass VEGF in sämtlichen Teilen beider Muskel ursprünglich in unterschiedlich großen Mengen verteilt vorliegt. Auch an der Muskelstelle, an welcher 3 Tage nach Stimulationsbeginn die nächste Probe entnommen wurde, lag möglicherweise von Anfang an ein viel höherer VEGF-Ausgangsspiegel als an der ersten Muskelentnahmestelle vor. Dies scheint bei der weiteren Betrachtung des Stimulationsverlaufs dieser Ziege umso mehr wahrscheinlich, als die

Werte der stimulierten Muskelseite im Verlauf wieder abfallen, dann wieder steigen, hierbei jedoch zugleich auch auf der nicht stimulierten Seite.

### 5.2.2 Stimulationsmuster und Reizstärken

Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe Hang, in deren Versuchen mit 10 Hz und 3-4 V abwechselnd 2 Stunden stimuliert und 4 Stunden pausiert wurde, und der Arbeitsgruppe Annex, welche ein Dauerreizmuster von 6-10 Hz verwendete, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Stimulationselektroden auf ein Dauerreizmuster von 2 Hz und 5-6 V eingestellt. Hierbei wurde auf die Erfahrungen früherer Studien mit Großtieren wie Ziegen bzw. Kälber zurückgegriffen (*Guldner et al., 1994; Guldner et al., 1997*). Bei diesen Studien der Arbeitsgruppe Guldner wurde unter beschriebenem Reizmuster eine Zunahme der Muskeldicke, Muskelkraft und Kapillardichte des M. latissimus dorsi festgestellt. Ein weiterer Grund für die Verwendung von Dauerreizmustern war der, dass zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch kein Myostimulator für Großtiere mit automatischen on/off-Arbeitszyklen erhältlich war.

## VORSTIMULATION

Für die Vorbereitung des M. latissimus dorsi auf seine späteren Aufgaben wie die Kardiomyopexie oder biomechanische Herzen ist ein Vortraining zur Ausbildung von Kollateralen innerhalb des Muskels und auch eine optimale Kapillarisation für den Muskel unerlässlich (*Kashem et al., 2001*). Der Muskel wird vor der kompletten chirurgischen Mobilisation an seiner ursprünglicher Stelle, d.h. *in situ*, mit Hilfe eines Myostimulators vorstimuliert. Auch Versuche mit einer intrathorakal gelegenen Trainingseinheit aus Silikon, um welche der Muskel gewickelt und anschließend durch den Myostimulator zur Kontraktion gebracht wird, zeigen gute Erfolge (*Guldner et al., 1994; Tang et al., 1999; Barron et al., 2001; Woo et al., 2002*). Durch diese Vorstimulation wird neben einer zunehmenden Kapillarisation des Muskels die Ausbildung von Kollateralen zwischen dem großen Versorgungsgebiet der A. thoracodorsalis und dem kleineren der Interkostalararterien bewirkt (*Tang et al., 1998*). Ein nicht vorstimulierter Muskel, der als gestielter Lappen in den Brustkorb geschwenkt wird, erleidet bei Stimulationsbeginn Muskelzelluntergänge, vor allem im Versorgungsgebiet der Aa. intercostales, und verliert

damit auch einen großen Teil seiner Muskelkraft (*Barron et al., 2001*). Die Arbeitsgruppe um Salmons, Tang und Jarvis konnte an einer Studie mit Schafen zeigen, dass eine Vorstimulierung des M. latissimus dorsi den Muskel resistenter gegen chirurgische Manipulationen werden lässt. In dieser Arbeit wurden 14 Tage lang die Mm. latissimi dorsi von 5 Schafen bei 2 Hz dauerstimuliert; die Kontrollgruppe von 5 Schafen blieb unstimuliert. Anschließend wurden die Mm. latissimi dorsi aller 10 Schafe chirurgisch mobilisiert und gestielt für eine Kardiomyoplastik in den Brustraum der Tiere geschwenkt. In bestimmten zeitlichen Abständen wurden Messungen des Blutflusses mit Hilfe von fluoreszierenden Mikrokügelchen in den Rückenmuskeln der Tiere vorgenommen. Diese ergaben für die unstimulierten Muskeln eine akute globale Reduktion des Blutflusses insbesondere in den distalen Muskelabschnitten, die sich auch 5 Tage nach der Kardiomyoplastik-Operation noch nicht verbessert hatte. In den Muskeln der vortrainierten Tiere dagegen wurde zwar ebenfalls unter der Vorstimulation eine Reduktion des Blutflusses festgestellt, jedoch überstanden diese Muskeln die chirurgische Prozedur besser und erholten sich hinterher auch signifikant schneller davon. Diese Muskeln waren schon kurze Zeit nach der Operation wieder sehr viel leistungsstärker als die nicht vorstimulierten Muskeln (*Tang et al., 1998, Salmons et al., 1998*). Die Ergebnisse jener Studien machen deutlich, dass eine Mobilisation des Muskel gestielt durch die A. thoracodorsalis vor Stimulationsbeginn zu Hypoxie und Gewebeuntergängen führen kann. Die Arbeitsgruppe Barron dagegen konnte 2001 anhand einer Studie mit Kaninchen zeigen, dass eine Teilmobilisation des Muskels mit Training an einer intrathorakalen elastischen Silikonhantel mehr Erfolg bei der Vorstimulation erbringt als die in situ-Stimulation. Hierbei wurden Kaninchenmuskeln dauerhaft mit 2,5 Hz stimuliert. Die Tiere wurden in drei Versuchsgruppen aufgeteilt, von der die Mm. latissimi dorsi der ersten Gruppe in situ stimuliert wurden, die der zweiten Gruppe wurden teilmobilisiert, um eine Silikonkammer gelegt und dann stimuliert, und die Kaninchen der dritten Gruppe sind erst einer kompletten Mobilisation des Latissimus für eine Aortomyoplastik unterzogen und anschließend stimuliert worden. Die meisten Zelluntergänge wurden 2 Wochen später in der dritten Gruppe gefunden. Hierbei entwickelten die Latissimi der Gruppe 2, die an der intrathorakalen elastischen Trainingseinheit aus Silikon stimuliert worden waren, die größte Muskelkraft. Ähnliche Erfolge beim Verwenden einer solchen Trainingseinheit hatte die Arbeitsgruppe von Guldner bereits 1994 publiziert. Weitere Versuche zur Kollateralenbildung bei Vorstimulation wurden 2002 von Woo et al. mit Ratten

durchgeführt. Die Arbeitsgruppe verwendete in ihrer Arbeit eine vergleichsweise hohe Reizstärke von 10 Hz und stimulierte hiermit die Mm. latissimi dorsi von 5 Ratten dauerhaft *in situ*. 5 Wochen später wurde der vorstimulierte linke Muskel der Tiere als gestielte Muskelplastik freipräpariert und in den Brustraum geschwenkt; eine Kontrollgruppe von 5 Ratten wurde dieser Operation ohne Vorstimulation der Mm. latissimi dorsi unterzogen. 24 Stunden später fand die Arbeitsgruppe im distalen Drittel der Muskeln Zelluntergänge, jedoch waren diese bei der Kontrollgruppe wesentlich stärker ausgeprägt als bei der vorstimulierten Gruppe.

Ausgehend von jenen Vorstudien wurde in der vorliegenden Arbeit von einer Vorstimulation des Muskels durch eine intrathorakale elastische Trainingseinheit aus Silikon Abstand genommen und statt dessen die *in situ*- Stimulation des Muskels bevorzugt, da sonst die muskuläre VEGF-Produktion aufgrund zu großer Störungsgrößen (Operationswunden, Entzündungsreize, Hypoxie) möglicherweise nicht hätte beurteilt werden können.

### STIMULATIONSMUSTER UND REIZSTÄRKEN

Bei dieser Arbeit stellte sich unter anderem die Frage, welches Reizmuster für das optimale Training des M. latissimus dorsi ideal ist. Die optimale Stimulation für Skelettmuskeln, die für Herzunterstützungssysteme eingesetzt werden, ist zur Zeit noch nicht klar definiert. Während in dieser Arbeit eine niedrige Reizstärke von 2 Hz zur Stimulierung des M. latissimus dorsi gewählt wurde, wobei auf die Erfahrungen früherer Arbeiten zurückgegriffen worden ist (*Guldner et al., 1997; Tang et al., 1999; Barron et al., 2001*), werden in neueren Studien zur Zeit die Effekte stärkerer Reize von 10 Hz bis zu 100 Hz als Dauerstimulation oder kombiniert mit on/off-Reizmustern getestet (*Kashem et al., 2001; Lopez-Guajardo et al., 2001; Letsou et al., 2001; Binder-Macleod et al., 2002; Woo et al., 2002*).

Die Arbeitsgruppe von Kashem testete 2001 ein on/off-Muster von 10 Stunden Stimulation und 14 Stunden Pause pro Tag an den Mm. latissimi dorsi von Hunden. 12 Hunde wurden 14 Tage lang *in situ* vorstimuliert, während 6 Kontrollhunde unstimuliert blieben. Anschließend wurden alle Hunde einer Kardiomyoplastie unterzogen. Die Mm. latissimi der 6 Kontrollhunde sowie 6 der vorstimulierten Hunde erhielten eine dauerhafte

Stimulation, die restlichen 6 vorstimulierten Tiere wurden im on/off-Muster stimuliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die vorstimulierten und anschließend im on/off-Reizmuster stimulierten Muskeln am leistungsstärksten waren. In einer weiteren Studie befasste dieselbe Arbeitsgruppe sich mit der Wahl der Reizstärke. Es wurden vorstimulierte Muskeln von Hunden als Kardiomyoplastie um die Herzen der Hunde gewickelt und 5 Wochen lang bei 20 Hertz und 4 V, 33 Hertz und 4 Volt oder bei 50 Hertz und 10 Volt stimuliert. Die signifikant höchsten linksventrikulären und aortalen Drücke sowie die größten Auswurffractionen des Herzens wurden bei den Tieren gemessen, die bei 50 Hz Burstfrequenz und 10 Volt stimuliert worden waren.

Die Arbeitsgruppe um Letsou bildete aus den vorstimulierten Mm. latissimi dorsi von Kaninchen Skelettmuskelventrikel, stimulierte sie dann mit Frequenzen von 10 bis zu 65 Hertz und fand heraus, dass Frequenzen zwischen 20-50 Hertz die stärksten Muskeln mit den besten Leistungen lieferten. Mit der Frequenz von 30 Hertz erzielte die Arbeitsgruppe hierbei besonders gute Ergebnisse. Durch die Arbeitsgruppe von Lopez-Guajardo konnte als eine weitere interessante Erkenntnis bei der Stimulation von Tibialis anterior- Muskeln von Kaninchen gezeigt werden, dass Übungsperioden von nur 30 Minuten Stimulation bei 10 Hertz täglich einen wesentlich besseren Aufbau, weniger Ermüdung und bessere Kraftverhältnisse erbringen als eine Dauerstimulation bei 5 Hertz oder verschiedene andere on/off-Muster bei 10 Hertz.

Diesen Studien zufolge sollten in Zukunft bei der Stimulation des M. latissimus der Ziegen andere Reizmuster ausprobiert werden, wie zum Beispiel eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz und vor allem ein geeignetes on/off-Muster. Dieses Reizmuster ist für den Muskelaufbau wesentlich physiologischer als die Dauerstimulation. Eine kürzere Stimulationsperiode innerhalb von 24 Stunden dürfte ausreichen, um den Muskel optimal zu stimulieren, und die Ruhephasen geben den Muskelzellen gleichzeitig genug Zeit zur Erholung bzw. zur Ausbildung von mehr Kapillaren.

### **5.2.3 VEGF-Bestimmung in den Muskelproben**

Bei der Frage, warum keine direkte Abhängigkeit zwischen Muskelstimulation und VEGF-Produktion gefunden werden konnte, muss auch die VEGF-Bestimmung in den Proben betrachtet werden. In dieser Arbeit wurde das Verfahren der rT-PCR angewendet, um die Menge an VEGF-mRNA im stimulierten Muskel zu untersuchen.

Auch die Arbeitsgruppe von Hang untersuchte ihre Muskelproben auf ihren Gehalt an VEGF-mRNA. Hierzu wurden die Proben durch Northern Blots untersucht. Im Unterschied dazu ist in der Studie der Arbeitsgruppe um Annex von 1998 die Technik des Western Blots zur Bestimmung der VEGF-Proteinmenge im stimulierten Muskel eingesetzt worden. Hierbei muss beachtet werden, dass es Unterschiede in der gefundenen VEGF-Menge geben kann, denn ein Anstieg der mRNA-Menge geht nicht zwangsläufig mit einem Anstieg der VEGF-Proteinmenge einher (*Annex et al., 1998*). So kann die mRNA-Bestimmung als sensibler bezeichnet werden, da die mRNA stets eher produziert wird als das Protein. Für die molekularbiologische Untersuchung der Proben auf ihren Gehalt an VEGF ist in dieser Arbeit das Verfahren der Polymerasereaktion ausgewählt worden, da hiermit definierte Ziel-DNA-Sequenzen in vitro schnell zu vervielfältigen sind und so auch bei geringer Ausgangsmenge messbare Mengen entstehen. Zudem ist bei der Methode der kompetitiven PCR eine genauere Bestimmung der tatsächlichen cDNA-Menge möglich, wohingegen beim Northern Blot-Verfahren nur die Signalintensität gemessen werden kann.

### **5.2.4 Verteilung des VEGF innerhalb des Muskels**

In dieser Arbeit ist folgende wichtige Erkenntnis getroffen worden:

der VEGF liegt innerhalb des Muskels der Ziegen grundsätzlich heterogen verteilt vor. Hierfür wurden sechs unstimulierte Muskel jeweils an 8 verschiedenen Orten auf ihren Gehalt an VEGF untersucht (s. Ergebnisse, Abb. 4i). Hiernach liegt bereits vor Stimulationsbeginn ein Unterschied in der VEGF-Verteilung verschiedener Muskelanteile vor, und diese Tatsache ermöglicht kein Verfolgen von Zu- oder Abnahme der VEGF-Menge bei Entnahme von Muskelproben aus verschiedenen Gebieten des Muskels nach Stimulation. Ein Vergleich mit der parallelen Dissertationsarbeit von Kinga Monczko zeigt, dass anhand der Kapillariserungsbestimmung sehr viel besser der Stimulationserfolg nachgewiesen werden kann. Bei dem Tier Z4, bei welchem die Bestimmung des VEGF unter Stimulation keine entsprechende Produktionskurve zeigte, konnte jedoch eindeutig der Stimulationserfolg anhand einer deutlichen Zunahme der Kapillariserung belegt werden. Erwähnenswert im Zusammenhang mit der Erkenntnis der unterschiedlich verteilten VEGF-Mengen ist, dass die VEGF- und die GAPDH-Mengen insgesamt zwischen einzelnen Tieren stark variieren können (s. Ergebnisse, Abb. 4i und 4j; vgl. Z1

mit Z2 und Z3), so dass für die Bestimmung der VEGF-mRNA-Menge auch kein Vergleich ganzer Muskeln von stimulierten und unstimulierten Tieren in Frage kommt. Interessant und möglicherweise zukunftsweisend sind die Ergebnisse von VEGF-Bestimmungen im Serum von Patienten einer Ulmer Arbeitsgruppe. Diese veröffentlichte 2000 eine Studie, in welcher bei drei verschiedenen Patientengruppen VEGF-Untersuchungen im Serum durchgeführt worden waren. In der ersten Gruppe befanden sich Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten hatten, in der zweiten Patienten mit einer instabilen Angina pectoris und in der dritten Gruppe gesunde Patienten. Die Ulmer Arbeitsgruppe um Kranz untersuchte die Seren der jeweiligen Gruppen in definierten zeitlichen Intervallen mittels eines Radioimmunessays und fand im Serum der Myokardpatienten ab dem 3. Tag nach dem Infarktgeschehen einen deutlichen Anstieg des VEGF-A. Dieser Anstieg erreichte am 10. Tag post infarctionem VEGF-Serumkonzentrationen, bei denen eine vermehrte Vaskularisierung des Myokards durch Kollateralen, ausgehend von den Koronarien, sehr wahrscheinlich war. Bei den Patienten mit einer instabilen Angina pectoris wurden keine signifikanten Anstiege des VEGF-A im Serum festgestellt (*Kranz et al., 2000*).

Möglicherweise könnte in Zukunft die Zunahme des Kapillarwachstums innerhalb des M. latissimus bei Vorstimulation ebenfalls über eine Messung der VEGF-Mengen im Serum erfolgen.

### 5.3 Relevanz dieser Arbeit

Mit dieser Arbeit ist eine semiquantitative PCR zur Messung der VEGF-mRNA der Ziege etabliert worden, um mit Hilfe der VEGF-Bestimmung in Muskelproben aus dem M. latissimus dorsi dessen Trainingszustand bestimmen zu können. Der M. latissimus dorsi wird in zahlreichen Großtierversuchen auf seine Eignung für Revaskularisationsverfahren und biomechanische Herzen erforscht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das muskuläre VEGF im Ziegenmuskel eine heterogene Verteilung aufweist. Es eignet sich insofern nicht zur Verlaufskontrolle von Stimulationen an Muskeln von Ziegen. In der Dissertationsarbeit von K. Monczko hingegen konnte anhand von morphometrischen Kapillarzählungen eine Zunahme der Kapillaren nach Stimulation unabhängig vom

Entnahmeort der Probe festgestellt werden. Insofern sollte überlegt werden, ob zukünftig eher die morphometrische Auswertung der Muskelproben bzw. Blutflussmessungen, z. B. durch Doppler-Flow-Metrie, zur Beurteilung des Trainingszustandes herangezogen werden sollten. Denkbar wären auch Versuche, den VEGF zukünftig im Serum der Tiere zu bestimmen und damit an die Versuche der Arbeitsgruppe Kranz et al. (s.o.) anzuknüpfen. Dieses Verfahren ist am wenigsten invasiv - damit würde auch die Störgröße der postoperativen Entzündungsreize nach Probenentnahme bei der Bestimmung des VEGF entfallen.

Das in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Reizmuster von 2 Hz zur Dauerstimulation des M. latissimus dorsi wird in seiner Effektivität durch die Dissertationsarbeit von K. Monzko bestätigt, jedoch könnte das Muskeltraining durch on-off-Phasen sicher noch physiologischer und effektiver gestaltet werden. Hierzu wird ein entsprechender Myostimulator für Großtiere benötigt, der zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht verfügbar war. Mit der vorliegenden Arbeit konnte zudem dargestellt werden, dass die mRNA durch den Abbau durch RNAsen kaum anfällig ist. Der zeitliche Abstand von der Probenentnahme bis zur Konservierung darf nach den Versuchsergebnissen mindestens bis zu einer Stunde betragen (Abb. 4r und 4s). Insofern scheint die Schnelligkeit nach Probenentnahme bis zur Verarbeitung der Probe in Hinsicht auf eine Degeneration der RNA im Zeitrahmen von einer Stunde keine Rolle zu spielen.

Es bleibt anzumerken, dass mit dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte, in welchem genauen Zusammenhang bei der Stimulation des M. latissimus die VEGF-Produktion mit der Kapillarisierung des Muskels steht. Die Ergebnisse der Dissertationsarbeit von K. Monczko zeigen jedoch im Stimulationsverlauf der Ziege Z4 eine deutliche Zunahme der Kapillarisierung. Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen machen deutlich, dass durch die Stimulierung zunächst erhöhter O<sub>2</sub>-Bedarf entsteht, woraufhin VEGF vermehrt produziert wird und dann Kapillaren neu gebildet werden. In neueren Studien wird VEGF als Gentherapie eingesetzt: VEGF-Gen-tragende Plasmide werden in den Muskel oder in die Haut eingebracht. Anschließend wird der Effekt der Gentherapie auf die Kapillarisierung des behandelten Gewebes durch mikroskopische Auswertung überprüft. Die Arbeitsgruppe von Wang konnte 2002 an transplantierten Hautlappen von Ratten zeigen, dass diese durch die Gentherapie besser durchblutet und seltener abgestoßen wurden als unbehandelte Hautlappen. Die Arbeitsgruppe von Zakine veröffentlichte 2003 eine Arbeit, bei der Schafen mittels eines intramuskulär im M. latissimus dorsi platzierten

Katheters VEGF über einen Zeitraum von einem Monat appliziert wurde. Die Muskeln dieser Schafe zeigten im Verlauf mikroskopisch deutlich mehr Kapillarisierung als die mit einer Kochsalzlösung behandelten Vergleichsschafe. Diese Versuche sind möglicherweise richtungsweisend. Da nun die Sequenz des VEGF-Gens der Ziege bekannt ist, kann bei der zukünftigen Vorbereitung der Ziegen auf Versuche mit dem M. latissimus dorsi eine Gentherapie mit Ziegen-VEGF in Betracht gezogen werden. Die Auswertung kann durch mikroskopisches Kapillarenzählen erfolgen. Ferner sind Messungen des Blutflusses im Muskel, z. B. durch Doppler-Flow-Metrie, möglich. Die Arbeitsgruppe um Guldner erforscht zur Zeit Methoden der Blutflussmessung im Muskel der Ziege und kann hier die Erfolge der neuerdings möglichen Stimulation im on/-off-Muster mit sehr guter Zunahme des Blutflusses nachweisen.

## 6. Zusammenfassung

In der Klinik für Herzchirurgie auf dem Campus Lübeck werden muskuläre Herzunterstützungssysteme entwickelt. Der Vergrößerung der Kapillardichte kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Als Myokard-unterstützender Muskel findet dabei der Musculus latissimus dorsi Verwendung und als Tiermodell die Afrikanische Burenziege, da die Topografie und die Faserzusammensetzung ihres Muskels mit der des Menschen vergleichbar ist. Vor dem Gebrauch des M. latissimus dorsi als muskuläres Unterstützungssystem entweder als Biomechanisches Herz oder auch als hyperkapillarisierten Muskellappen zur indirekten Myokardrevaskularisation wird der Muskel mit Hilfe eines Muskelschrittmachers prästimuliert, damit er seine Kapillaren vermehrt und intramuskuläre Kollaterale ausbildet. Nur durch eine optimierte Durchblutungssituation wird der M. latissimus dorsi für seine weitere Anwendung zur muskulären Herzunterstützung verwendbar.

In der vorliegenden Arbeit ist eine molekularbiologische Methode zur Erfassung des muskulären Gehaltes eines Kapillarisierungsfaktors, des Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), entwickelt worden. Zunächst wurde die bisher unbekannt DNA des VEGF-Gens der Ziege sequenziert. Anschließend ist eine semiquantitative PCR zur Messung der muskulären VEGF-cDNA der Ziege etabliert worden: bei der Aufbereitung der Proben wurde die VEGF-mRNA extrahiert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde dann mit Hilfe des PCR-Verfahrens vervielfältigt und durch Gelelektrophorese dargestellt. Mitgeführte Standards definierter Mengen ermöglichten anschließend die Ermittlung des cDNA-Gehaltes der Muskelproben. Damit ist in Muskelproben des M. latissimus dorsi von Ziegen der Gehalt an VEGF bestimmbar geworden.

In drei Versuchsserien wurde während der Prästimulation des M. latissimus dorsi der muskuläre Gehalt an VEGF im zeitlichen Verlauf bestimmt. Überraschenderweise konnten dabei keine signifikanten Erhöhungen der VEGF-cDNA-Mengen festgestellt werden. Im Vergleich wurde auch der Gehalt an VEGF aus mehreren Muskelproben des nicht stimulierten M. latissimus dorsi bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die VEGF-cDNA im Ziegenmuskel grundsätzlich eine äußerst heterogene Verteilung aufweist und

sich somit multilokuläre Muskelproben nicht zur Verlaufskontrolle von Stimulationseffekten eignen. In dieser Arbeit ist zusätzlich untersucht worden, ob die mRNA des VEGF-Gens während der Verarbeitung der Muskelproben im zeitlichen Verlauf durch RNAsen anfällig ist. Nach den vorliegenden Ergebnissen darf das Zeitintervall von der Probenentnahme bis zur Konservierung bis zu einer Stunde betragen, ohne die Bestimmungsgenauigkeit zu beeinflussen. Obwohl der Einfluss der Elektrostimulation auf die Genexpression von VEGF im Muskelgewebe mit dieser Methode im zeitlichen Verlauf über mehrere Wochen nicht messbar geworden ist, ist die Kenntnis der DNA-Sequenz für den VEGF bei der Ziege sowie das zukünftige Fokussieren auf Serumanalysen bei der VEGF-Bestimmung für die weitere Grundlagenforschung über die Vorgänge der Kapillarisierungsmodulation im Muskel von großer Bedeutung.

## 7. Literaturverzeichnis

### 7.1 Textquellen aus Fachzeitschriften

#### A

K. D. Aaronson, M. J. Eppinger, D. B. Dyke, S. Wright, F. D. Pagani:  
Left ventricular assist device therapy improves utilization of donor hearts  
J. Am. Coll. Cardiol. 2002; 39: 1247-54

M. D. Allen, D. P. Fishbein, M. McBride, M. Ellison, O. P. Daily:  
Who gets a heart? Rationing and rationalizing in heart transplantation  
West. J. Med. 1997; 166: 326-36

B. H. Annex, C. E. Torgan, P. Lin, D. A. Taylor, M. A. Thompson, K. G. Peters, W. E. Kraus:  
Induction and maintenance of increased VEGF protein by chronic motor nerve stimulation in skeletal muscle  
The American Physiological Society 1998; H860-7

M. Aschermann, J. Vojacek, J. Humhal, P. Krupicka, V. Holm, D. Tesar:  
Early results and complications of percutaneous transluminal coronary angioplasty  
Cor Vasa 1993; 35(2): 80-3

B. El Awad, B. Kreft, E. M. Wolber; T. Hellwig-Burgel, E. Metzen, J. Fandrey, W. Jelkmann:  
Hypoxia and interleukin-1 $\beta$  stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells  
Kidney Int 2000; 58: 43-50

#### B

J. D. Baronowsky, J. L. Sprafka, J. F. Noble:  
The use of intestinal loops for revascularization of the heart  
Circulat. Res. 1954; 2: 506-513

D. J. Barron, P. J. Etherington, C. P. Winlove, J. C. Jarvis, S. Salmons, J. R. Pepper:  
Combination of preconditioning and delayed flap elevation: evidence for improved perfusion and oxygenation of the latissimus dorsi muscle for cardiomyoplasty  
Ann. Thorac. Surg. 2001; 71: 852-61

C. S. Becks:  
Coronary sklerosis and angina pectoris; treatment by grafting a new blood supply upon the myocardium  
Surg. Gynec. Obstet. 1937; 64: 270-275

- I. Beck, S. Ramirez, R. Weinmann, J. Caro:  
Enhancer element at the 3' flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene  
J.Biol.Chem., 1991; 266: 15563-6
- I. Beck, R. Weinmann, J. Caro:  
Characterization of hypoxia-responsive enhancer in the human erythropoietin gene shows presence of hypoxia-inducible 120-kd nuclear DNA-binding protein in erythropoietin-producing and nonproducing cells  
Blood 1993; 82: 704-11
- M. Beyer, S. Mierdl, T. Scheunert, S. Schleich, F. Oertel, A. Hannekum:  
Initial clinical experiences with indirect myocardial revascularization - free skeletal muscle transplantation for induction of epimyocardial neovascularization  
Z. Kardiol. 1996; 85 Suppl. 4: 29-33
- M. Beyer:  
Cardiomyopathy - current status of an indirect revascularization method  
Z. Kardiol. 1997; 86 Suppl. 1:125-32
- J. Bhayana, A. Andrew, M. Gage, T. Takaro:  
Long-term results of internal mammary artery implantation for coronary artery disease: A controlled trial  
Ann. Thorac. Surg. 1978; 29: 234-242
- N. Bogduk, G. Johnson, D. Spalding:  
The morphology and biomechanics of latissimus dorsi  
Clin. Biomech. (Bristol, Avon) 1998; 13: 377-385
- W. M. Brann, L. E. Bennett, B. M. Keck, J. D. Hosenpud:  
Morbidity, functional status, and immunosuppressive therapy after heart transplantation: an analysis of the joint International Society for Heart and Lung Transplantation/United Network for Organ Sharing Thoracic Registry  
J. Heart Lung Transplant. 1998; 17: 374-82
- G. Breier, U. Albrecht, S. Sterrer, W. Risau:  
Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation  
Development 1992; 114: 521-32
- E. Brogi, G. Schattman, T. Wu, E. A. Kim, L. Varticovski, B. Keyt, J. M. Isner:  
Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression  
J. Clin. Invest. 1996; 97: 469-76
- L. F. Brown, K. T. Yeo, B. Berse, T. K. Yeo, D. R. Senger, H. F. Dvorak:  
Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing  
J. Exp. Med. 1992; 9: 1375-9
- L. F. Brown, B. Berse, R. F. Jackman, K. Tognazzi, A. J. Guidi, H. F. Dvorak, D. R. Senger, J. L. Conolly, S. J. Schnitt:  
Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer  
Hum. Pathol. 1995; 26: 86-91

## C

- P. Carmeliet, V. Ferriera, G. Brier:  
Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele  
Nature 1996; 380: 435-439
- P. Carmeliet:  
VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma -genesis?  
Nature medicine 2000; 6: 1102-1103
- R. N. Carter, S. A. Gall, C. L. Wadsworth:  
An experimental study of collateral coronary circulation produced by cardiopneumopexy  
Surgery 1949; 25: 489-509
- J. C. Chavez, F. Agani, P. Pichiule, J. C. La Manna:  
Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in the brain of rats during chronic hypoxia  
J. Appl. Physiol. 2000; 89: 1937-42
- K. Chizynski:  
Results of coronary heart disease treatment with coronary angioplasty in patient over 65  
Przeegl Lek 2003; 60(7): 456-60
- P. Chomczynski and N. Sacchi:  
Single-step method of RNA-isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction  
Anal. Biochem. 1987; 162: 156-159
- I. E. Christ and M. Spira:  
Application of latissimus dorsi muscle to the heart  
A.. plast. Surg. 1982; 8 (2): 118-124
- T. Cohen, D. Nahari, L. Cerem, G. Neufeld, B. Z. Levi:  
Interleukin-6 induces the expression of vascular endothelial growth factor  
J. Biol. Chem. 1996; 271: 736-741

## D

- M. Dabrowski, B. Norwa-Otto, A. Debski, A. Witkowski, J. J. Jodkowski, M. Demkow, M. Woroszylska, W. Ruzyllo:  
Complex angioplasty (PTCA) in the treatment of coronary artery stenosis  
Kardiol. Pol. 1990; 33(7): 23-31
- F. Dagenais, P. M. Portner, R. C. Robbins, P. E. Oyer:  
The Novacor left ventricular assist system: clinical experience from the Novacor registry  
J. Card. Surg. 2001; 16: 267-71
- D. Davis, H. Mansell, L. O`Shaughnessy:  
Surgery treatment of angina pectoris  
Lancet 1938; 1: 76-82

M. Detmar, L. F. Brown, B. Berse, W. Jackman, B. M. Elicker, H. F. Dvorak, K. P. Claffey:  
Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor  
(VPF/VEGF) and its receptors in human skin  
J. Invest. Dermatol. 1997; 108: 263-8

## E

H. C. Eichstaedt, N. W. Guldner, M. H. J. Tilmans, P. Klapproth, K. Ruck, H. Bressers, P. Bardos,  
B. J. Messmer:  
How to quantify the training of an intrathoracical SMV  
Int. J. Artif. Organs 1991; 14: 567

B. Enholm, K. Paavonenen, A. Ristimäki, V. Kumar, Y. Gunji, J. Klefstrom, L. Kivinen, M. Laiho,  
B. Olofsson, V. Joukov, U. Eriksson, K. Alitalo:  
Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors,  
oncoproteins and hypoxia  
Oncogene 1997; 14: 2475-83

S. Ergun, N. Kilic, W. Fiedler, A. K. Mukhopadhyay:  
Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue  
Mol. Cell. Endocrinol. 1997; 131: 9-20

C. Espinola-Klein, H. J. Rupprecht, R. Erbe, B. Nafe, R. Brennecke, J. Meyer:  
Impact of restenosis 10 years after coronary angioplasty  
Eur. Heart J 1998; 19(7):1047-53

## F

J. Fandrey and H. F. Bunn:  
In vivo and in vitro regulation of Erythropoietin mRNA: measurement by  
competitive polymerase chain reaction  
Blood 1993; 81: 617-23

R. G. Favoloro:  
Saphenous vein graft in the surgical treatment of coronary artery disease  
J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1969; 41: 178-185

R. G. Favoloro, D. B. Effler, L. R. Groves:  
Double internal mammary artery – myocardial implantation: clinical evaluation of results in  
150 patients  
Circulation 1968; 37: 549-558

N. Ferrara, K. Carver-Moore, H. Chen:  
Abnormal blood vessel development and lethality induced by targeted inactivation  
of the VEGF gene  
Nature 1996; 380, 439-442

N. Ferrara, K. Houck, L. Jakeman, D.W. Leung:  
Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor  
family of polypeptides  
Endocr. Rev. 1992; 13: 18-32

I. J. Fidler, M. Ellis:

The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis  
Cell. 1994; 79, 185-188

G. Finkenzeller, D. Marme, H. Weich, H. Hug:

Platelet derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C  
Cancer Research 1992; 52, 4821-4823

J. A. Forsythe, B.-H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos, G. L. Semanza:

Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1  
Cellular Biology 1996; 16: 4604-13

Y. Fujio and K. Walsh:

Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner  
J. Biol. Chem. 1999; 274: 16349-54

## G

J. J. Garamella, L. G. Hay, V. P. George, N. K. Jensen:

Modified cardiopneumopexy employing segmental resection  
Surgery 1956; 39: 374-384

G. Garrido, S. Saule, D. Gospodarowicz:

Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells  
Growth Factors 1993, 8: 109-17

M. A. Goldberg, T. J. Schneider:

Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of the vascular endothelial growth factor and erythropoietin  
J. Biol. Chem. 1994; 269: 4355-59

C. K. Goldman, J. Kim, W.-L. Wong, V. King, T. Brock, G. Y. Gillespie:

Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology  
Mol. Biol. Chem. 1993; 4: 121-33

A. Goullon, D. Ries:

Recovery of end-organ failure during mechanical circulatory support  
Eur. J. Cardiothorac. Surg. 1992; 6: 519-23

K. A. Greer, H. Lu, A. D. Spanta, R. L. Hammond, L. W. Stephenson:

Skeletal muscle ventricles, left ventricular apex-to-aorta configuration: 1 to 11 weeks in circulation  
Circulation, 1995; 95: 497-502

A. Gruntzig, M. Fischer, N. Goebel, M. Schlumpf:

Percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA). Study of 147 patients  
Ann. Radiol. 1981; 24(5): 377-9

N. W. Guldner, H. C. Eichstaedt, P. Klapproth, M. H. J. Tilmans, S. Thuaudet, V. Umbrain, K. Ruck, E. Wyffels, M. Bruyland, M. Sigmund, B. J. Messmer, P. Bardos:  
Dynamic training of skeletal muscle ventricles: a method to increase muscular power for cardiac assistance  
Circulation, 1994; 89: 1032-40

N. W. Guldner, P. Klapproth, T. Fischer, E. Rumpel, I. Büchner, R. Keller, R. Klempien, H. Krischer, S. Thuaudet, R. Noel, H. Kuppe, H. H. Sievers:  
Functionally adapted stimulation patterns for a dynamic training of skeletal muscle ventricles in adult goats  
J. Basic Appl. Myol. 1997; 7: 67-72

N. W. Guldner, P. Klapproth, M. Großherr, A. Brügge, A. Sheikzadeh, R. Tölg, E. Rumpel, R. Noel, H.-H. Sievers:  
Biomechanical Hearts: Muscular Blood Pumps, performed in a one-step operation, and trained under support of Clenbuterol  
Circulation. 2001; 104: 717-722

## H

M. Hamon, C. Bauters, E. P. McFadden, J. M. Lablanche, M. E. Bertrand:  
Should moderate coronary stenosis be dilated in patients with multi-vessel disease?  
Arch. Mal. Coeur. Vaiss. 1993; 86(9): 1299-303

J. Hang, L. Kong, J.-W. Gu, T. H. Adair:  
VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle  
Am. J. Physiol. 1995; 269: H1827-31

S. Harada, S. Rodan, G. Rodan:  
Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in osteoblasts  
Clin. Ortho 1995; 313: 76-80

K. Harada, M. Friedman, J. J. Lopez, S. Y. Wang, J. Li, P. V. Prasad, J. D. Pearlman, E. R. Edelman, F. W. Selke, M. Simons:  
Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia  
Am. J. Physiol. 1996; 270: H1791-H1802

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

M. Haude, G. Caspari, D. Baumgart, B. Eick, F. Liu, R. Brennecke, J. Meyer, R. Erbel:  
Normalization of myocardial perfusion reserve after coronary stent implantation in comparison with balloon angioplasty alone  
Z. Kardiol. 1996; 85(4): 260-72

F. Heits, G. J. Wiedemann und W. Jelkmann  
Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF stimuliert die Angiogenese im Guten wie im Bösen  
Dtsch. Med. Wschr. 1998; 123: 259-265

R. Hetzer, E. Hennig, A. Schiessler, N. Friedel, H. Warnecke, M. Adt:  
Mechanical circulatory support and heart transplantation  
J. Heart Lung Transplant. 1992; 11: S175-81

K. A. Houck, N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li, D. W. Leung:  
The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and  
characterization of alternative splicing of RNA  
Mol. Endocrinol. 1991; 5: 1806-14

L. U. Huiping, R. Jr. Fietsam, R. L. Hammond, H. Nakajima, F. W. Mocek, G. A. Thomas,  
R. Ruggiero, H. Kakajima, M. Colson, L. W. Stephenson:  
Skeletal muscle ventricles: left ventricular apex to aorta configuration  
Ann. Thorac. Surg. 1993; 55: 78-85

S. A. Hunt:  
New immunosuppressive agents in clinical use: mycophenolate mofetil and tacrolimus  
Cardiol. Rev. 2000; 8: 180-4

## K

A. Kashem, W. P. Santamore, B. Chiang, L. Unger, A. T. Ali, A. D. Slater:  
Vascular delay and intermittent stimulation: keys to successful latissimus dorsi muscle stimulation  
Ann. Thorac. Surg. 2001; 71:1866-73

A. Kashem, W. P. Santamore, S. Hassan, B. Chiang, A. D. Slater:  
Can latissimus dorsi muscle stimulation benefit heart during training period after vascular delay?  
ASAIO J. 2001; 47: 655-61

B. M. Keck, L. E. Bennett, J. Rosendale, O. P. Daily, R. J. Novick, J. D. Hosenpud:  
Worldwide thoracic organ transplantation: a report from the UNOS/ISHLT International Registry  
for thoracic organ transplantation  
Clin. Transpl. 1999; 35-49

J. A. Key, F. G. Kergin, Y. Martineau:  
A method of supplementing the coronary circulation by a jejunal pedicle graft  
J. Thorac. Surg. 1954; 28: 320-328

B. A. Keyt, L. T. Berleau, H. V. Nguyen:  
The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its  
mitogenic potency  
J.Biol.Chem.1996, 271: 7788-7795

K. J. Kim, B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H. S. Phillips, N. Ferrara:  
Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth  
in vivo  
Nature 1993; 362: 841-844

T. Kimura, H. Nosaka, H. Yokoi, M. Iwabuchi, M. Nobuyoshi:  
Serial angiographic follow-up after Palmaz-Schatz stent implantation: comparison with  
conventional balloon angioplasty  
J. Am. Coll. Cardiol. 1993; 21(7):1557-63

- M. Klagsbrun and P. A. D'Amore:  
Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptors  
Cytokine & Growth Factor Reviews 1996; 7: 259-270
- P. Klapproth, M. H. J. Tilmans, N. W. Guldner, H. C. Eichstaedt, K. Ruck, H. Bressers,  
P. Bardos, B. J. Messmer:  
Fundamentals and development of a computer-programmed evaluation method for performance  
data assessment of SMV's in training  
Int. J. Artif. Organs, 1991; 14: 568
- S. Kondo, M. Asano, K. Matsuo, I. Ohmori, H. Suzuki:  
Vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor -  
bearing mice and cancer patients  
Biochem. Biophys. Acta 1994; 1221: 211-214
- A. Kranz, C. Rau, M. Kochs, J. Waltenberger:  
Elevation of vascular endothelial growth factor -A serum levels following acute  
myocardial infarction. Evidence for its origin and functional significance.  
J. Mol. Cell. Cardiol. 2000; 32(1): 65-72
- P. Kressin, E. M. Wolber, H. Wodrich, A. Meyhofer-Malik, O. Buchweitz,  
K. Diedrich, E. Malik:  
Vascular endothelial growth factor mRNA in eutopic and ectopic endometrium  
Fertil. Steril. 2001; 76: 1220-4

## L

- A. Ladoux, C. Frelin:  
Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993; 195: 1005-10
- H. Laks, F. G. Scholl, D. C. Drinkwater, A. Blitz, M. Hamilton, J. Moriguchi, G. Fonarow,  
J. Kobashigawa:  
The alternate recipient list for heart transplantation: does it work?  
J. Heart Lung Transplant. 1997; 16: 735-42
- B. Larrivee and A. Karsan:  
Signaling pathways induced by vascular endothelial growth factor  
Int. J. Mol. Med. 2000; 5: 447-56
- G. V. Letsou, J. F. Hogan, Bsee, C.C. Miller, J. A. Elefteriades, D. Francischelli, J. C. Baldwin,  
H. J. Safi:  
Physiologic characteristics of canine skeletal muscle: implications for timing skeletal muscle  
cardiac assist devices  
Ann. Thorac. Surg. 2001; 72: 1336-43
- A. P. Levy, N. S. Levy, M. A. Goldberg:  
Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia  
J. Biol. Chem. 1996; 271: 2746-53

N. S. Levy, M. A. Goldberg, A. P. Levy:  
Sequencing of the human vascular endothelial growth factor (VEGF) 3' untranslated region (UTR):  
conservation of five hypoxia-inducible RNA-protein binding sites  
Biochem. Biophys. Acta 1997 ; 1352: 167-73

A. Lezius:  
Die anatomischen und funktionellen Grundlagen der künstlichen Blutversorgung des Herzmuskels  
durch die Lunge bei Koronararterienverschluss  
Arch. Klin. Chir. 1937; 191: 102-139

L. X. Liu, H. Lu, Y. Luo, T. Date, A. J. Belanger, K. A. Vincent, G. Y. Akita, M. Goldberg,  
S. H. Cheng, R. J. Gregory, C. Jiang:  
Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002; 291: 908-14

M. Loebe, E. Hennig, J. Muller, S. Spiegelsberger, Y. Weng, R. Hetzer:  
Long-term mechanical circulatory support as a bridge to transplantation, for recovery from  
cardiomyopathy, and for permanent replacement  
Eur. J. Cardiothorac. Surg. 1997; 11 Suppl.: S18-24

N. D. Long, A. M. Borkon:  
The dilemma of too few hearts  
J. Transpl. Coord. 1999; 9: 277-80

A. Lopez-Guajardo, H. Sutherland, J. C. Jarvis, S. Salmons:  
Induction of a fatigue-resistant phenotype in rabbit fast muscle by small daily amounts of  
stimulation  
J. Appl. Physiol. 2001; 90: 1909-18

D. W. Losordo, P. R. Vale, J. F. Symes, C. H. Dunnington, D. D. Esakof, M. Maysky,  
A. B. Ashare, K. Lathi, J. M. Isner:  
Gene therapy for myocardial angiogenesis - initial clinical results with direct myocardial  
injection of ph VEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia  
Circulation 1998; 98: 2800-04

A. Lymboussaki, T. A. Partanen, B. Olofsson, J. Thomas-Crusells, C. D. Fletcher,  
R. M. de Waal, A. Kaipainen, K. Alitalo:  
Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGF-3 in lymphatic endothelium  
of the skin and in vascular tumors  
Am. Pathol. 1998; 153: 395-403

## M

A. Marszalek, T. Daa, K. Kashima, I. Nakayama, S. Yokoyama:  
Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the developing rat lung  
Jpn. J. Physiol. 2001; 51: 313-8

K. Maruyama, Y. Mori, S. Murasawa, H. Masaki, N. Takahashi, Y. Tsutusmi, Y. Moriguchi, Y.  
Shibazaki, Y. Tanaka, M. Shibuya, M. Inada, H. Matsubara, T. Iwasaka:  
Interleukin-1  $\beta$  upregulates cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its  
receptor KDR/flk-1 via activation of protein tyrosine kinases  
J. Mol. Cell. Cardiol. 1999; 31: 607-17

W. Matthews, C. Jordan, M. Gavin, N. Jenkins, N. Copeland, I. Lemischka:  
A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991; 88: 9026-9030

I. Maxwell, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe:  
Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines:  
Evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:2423-7

G. J. Mick, X. Wang, K. McCormick:  
White adipocyte vascular endothelial growth factor: regulation by insulin  
Endocrinology 2002; 143: 948-53

C. Miele, J. J. Rochford, N. Filippa, S. Giorgetti-Peraldi, E. Van Obberghen:  
Insulin and insulin-like growth factor-I induce vascular endothelial growth factor mRNA -  
expression via different signaling pathways  
J Biol Chem 2000; 275: 21695-702

S. Miketic, J. Carlsson, U. Tebbe:  
Clinical and angiographic outcome after conventional angioplasty with optional stent implantation  
compared with direct stenting without predilatation.  
Heart. 2002; 88(6): 622-6.

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

R. Miraliakbari, N. A. Francalancia, R. M. Lust, J. A. Gerardo, P.C. Ng., Y. S. Sun,  
W. R. Chitwood:  
Differences in myocardial and peripheral VEGF and KDR levels after acute ischemia  
Ann. Thorac. Surg. 2000; 69: 1750-1754

E. Monnet, E. C. Orton, G. Child, D. Getzy, G. Jacobs, L. Metelman:  
Neuromuscular function of the latissimus dorsi muscle in goats after dynamic cardiomyoplasty  
Pacing Clin. Electrophysiol. 1999; 22: 1625-1633

M. Morales-Ruiz, D. Fulton, S. Grzegorz, L. R. Languino, Y. Fujio, K. Walsh, W. C. Sessa:  
Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial  
cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt  
Circ. Res. 2000; 86: 892-896

R. E. Moran:  
Revascularisation of the heart by tubed pedicle graft on skin and subcutaneous tissue  
Plast. Reconstr. Surg. 1952; 10: 295-303

K. B. Mullis, F. A. Faloona:  
Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction.  
Methods Enzymol 1987; 155: 335-350

## O

H. Oh, H. Takagi, A. Otani, S. Koyama, S. Kemmochi, A. Uemura, Y. Honda:  
Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF):  
a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis  
Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 383-8

L. O' Shaughnessy:  
Surgical treatment of cardiac ischemia  
Lancet 1937; 1: 185-196

## P

J. E. Park, G.-A. Keller, N. Ferrara:  
The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the  
subepithelial ECM-bound VEGF  
Mol. Biol. Cell. 1993; 4: 1317-26

K. H. Plate, G. Breier, H. A. Weich and W. Risau  
Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas  
in vivo  
Nature 1992; 359: (6398): 845-8

Z. Poltorak, T. Cohen, G. Neufeld:  
The VEGF splice variants: properties, receptors, and usage for the treatment of ischemic diseases  
Herz 2000; 25: 126-9

V. Poulaki, W. Qin, A. M. Jousseaume, P. Hurlbut, S. J. Wiegand, J. Rudge, G. D. Yancopoulos,  
A. P. Adamis:  
Acute intensive insulin therapy exacerbates diabetic blood-retinal barrier breakdown via hypoxia-  
inducible factor-1  $\alpha$  and VEGF  
J Clin Invest 2002;109: 805-15

V. Poyen, M. Silvestri, P. Labrunie, B. Valeix:  
Indications of coronary angioplasty and stenting in 2003: what is left to surgery?  
J. Cardiovasc. Surg. (Torino) 2003; 44(3): 307-12

## R

P. J. Ratcliffe, J. F. O'Rourke, P. H. Maxwell, C. W. Pugh:  
Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression  
J. Exp. Biol. 1998; 201: 1153-62

L. P. Reynolds, A. T. Grazul-Bilska, D. A. Redmer:  
Angiogenesis in the corpus luteum  
Endocrine 2000; 12: 1-9

R. S. Richardson, H. Wagner, S. R.D. Mudaliar, R. Henry, E. A. Noyszewski,  
P.D. Wagner:  
Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise  
The American Physiological Society 1999; 0363-6135 : H2247-52

R. C. Robbins, P. E. Oyer:  
Bridge to transplant with the Novacor left ventricular assist system  
Ann. Thorac. Surg. 1999; 68: 695-7

W. G. Roberts, G. E. Palade:  
Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor  
J. Cell. Sci. 1995; 108: 2369-2379

## S

S. Salmons, A. T. Tang, J. C. Jarvis, H. Degens, M. Hastings, T. L. Hooper:  
Morphological and functional evidence, and clinical importance, of vascular anastomoses in the latissimus dorsi muscle of the sheep.  
J Anat. 1998; 193: 93-104

A. Schiessler, N. Friedel, Y. Weng, U. Heinz, M. Hummel, R. Hetzer:  
Mechanical circulatory support and heart transplantation. Pre-operative status and outcome  
ASAIO J. 1994; 40: M476-81

C. Schmid, M. Weyand, D. G. Nabavi, D. Hammel, M. C. Deng, E. B. Ringelstein, H. H. Scheld:  
Cerebral and systemic embolization during left ventricular support with the Novacor N100 device  
Ann. Thorac. Surg. 1998;65: 1703-10

L. Sebbag, P. Boissonnat, J. F. Obadia, J. P. Gare, M. Perinetti, R. Loire, G. Dureau:  
Morbidity, mortality beyond the 10th year following heart transplant: data from a population of 163 patients  
Transplant. Proc. 2001; 33: 3551-2

G. L. Semenza:  
HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing  
Curr. Opin. Cell. Biol. 2001; 13: 167-71

D. R. Senger, L. Van De Water, L. F. Brown:  
Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology  
Canc.Met.Rev. 1993; 12, 303-324

W. H. Sewell:  
The current status of surgery for coronary artery disease  
Vasc. Surg. 1976; 10: 285-296

B. Q. Shen, D. Y. Lee, H. P. Gerber, B. A. Keyt, N. Ferrara, T. F. Zioncheck:  
Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro  
J. Biol. Chem. 1998; 273: 29979-85

M. Shibuya, S. Yamaguchi, A. Yamane:  
Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor -type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fsm family  
Oncogene 1990; 5: 519-24

- D. T. Shima, U. Deutsch, P. A. D'Amore:  
Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability  
FEBS Lett. 1995; 370: 203-8
- D. Shweiki, A. Itin, D. Soffer, E. Keshet:  
Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis  
Nature 1992; 359, 843-5
- D. Shweiki, M. Neeman, A. Itin, E. Keshet:  
Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995; 92, 768-72
- P. D. Siebert and J. W. Larrick:  
Competitive PCR  
Nature 1992; 359: 557-8
- D. Skorjanc, F. Jaschinski, G. Heine, and D. Pette:  
Sequential increases in capillarization and mitochondrial enzymes in low-frequency-stimulated rabbit muscle  
The American Physiological Society 1998; 0363-6143: C810-818
- G. T. Stavri, Y. Hong, I. C. Zachary, G. Breier, P. A. Baskerville, S. Yla-Herttula, W. Risau, J. F. Martin, J. D. Erusalimsky:  
Hypoxia and platelet-derived growth factor synergistically upregulate the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells  
FEBS Lett. 1995; 358: 311-315
- I. Stein, M. Neeman, D. Shweiki, A. Itin, E. Keshet:  
Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes  
Mol. Cell. Biol. 1995; 15: 5363-8
- D. Stiehl, W. Jelkmann, R. H. Wenger, T. Hellwig-Bürgel:  
Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway  
FEBS Lett. 2002; 512: 157-62
- J. F. Symes, D. W. Losordo, P. R. Vale, K. G. Lathi, D. D. Esakof, M. Mayskiy, J. M. Isner:  
Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease  
Ann. Thorac. Surg. 1999; 68: 830-7

## T

- H. Takagi; G. L. King; G. S. Robinson; N. Ferrara; L. P. Aiello:  
Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells  
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1996; 37: 2165-76

R. Tandler, M. Weyand, C. Schmid, R. Gradaus, C. Schmidt, H. H. Scheld:  
Long-term anticoagulation with recombinant hirudin in a patient on left ventricular  
assist device support  
ASAIO J. 2000; 46: 792-4

A.T. Tang, J. C. Jarvis, T. L. Hooper, S. Salmons:  
Cardiomyoplasty: the benefits of electrical prestimulation of the latissimus dorsi muscle in situ  
Ann. Thorac. Surg. 1999; 68: 46-51

B. I. Terman, M. Dougher-Vermazen, M. E. Carrion:  
Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992; 187: 1579-86

## V

K. A. Vincent, K. -G. Shyu, Y. Luo, M. Magner, R. A. Tio, C. Jiang, M. A. Goldberg, G. Y. Akita,  
R. J. Gregory, J. M. Isner:  
Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an  
HIF-1 $\alpha$ /VP16 Hybrid transcription factor  
Circulation 2000; 102: 2255-2261

A. M. Vineberg:  
Development of anastomosis between coronary vessels and transplanted internal mammary artery  
Canad. Med. Ass. J. 1946; 55: 117-122

A. M. Vineberg and J. Walker:  
The surgery treatment of coronary artery heart disease by internal mammary artery implantation:  
report of 140 cases followed up to 14 years  
Dis. Chest. 1964; 45: 190-198

A. Vladover and J. E. Edwards:  
Pathology of coronary arteriosclerosis  
Prog. Cardiovasc. Dis. 1971; 14: 256-262

C. De Vries, J. A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, L. T. Williams:  
The fsm-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor  
Science 1992; 255: 989-91

## W

W. R. Wagner, P. C. Johnson, B. V. Heil, K. A. Thompson, R. L. Kormos,  
B. P. Griffith:  
Thrombin activity resides on LVAD Dacron inflow and outflow grafts  
ASAIO J. 1992; 38: M634-7

D. S. Wang, M. Miura, H. Demura, K. Sato:  
Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial  
growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells  
Endocrinology 1997; 138: 2953-62

F. Wang, M. Zhao, B. Huang, Z. Liu, B. Xiong, T. Cheng, M. Huo:  
Subcutaneous injection of plasmid VEGF gene: a method of gene therapy to enhance the viability of random skin flap  
Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi 2002; 18: 157-9

N. Weidner, J. P. Semple, W. R. Welch, J. Folkman:  
Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma  
New Engl. J. Med. 1991; 324: 1-8

D. R. Wheeldon, P. G. Jansen, P. M. Portner:  
The Novacor electrical implantable left ventricular assist system  
Perfusion 2000; 15: 355-61

E. M. Wolber, C. Dame, H. Fahnenstich, D. Hofmann, P. Bartmann, W. Jelkmann, J. Fandrey:  
Expression of the thrombopoietin gene in human fetal and neonatal tissues  
Blood 1999; 94: 97-105

E. B. Woo, A. T. Tang, J. C. Jarvis, P. S. Hasleton, S. Salmons, T. L. Hooper:  
Improved viability of latissimus dorsi muscle grafts after electrical prestimulation  
Muscle Nerve 2002; 25: 679-684

## Y/Z

S. Yamamoto, I. Konishi, Y. Tsuruta, K. Nanbu, M. Mandai, H. Kuroda, K. Matsushita, A. A. Hamid, Y. Yura, T. Mori:  
Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary  
Gynecol. Endocrinol., 1997; 11: 371-81

G. Zakine, E. Martinod, P. Fornes, M. Sapoval, D. Barritault, A. F. Carpentier, J. C. Chachques:  
Growth factors improve latissimus dorsi muscle vascularization and trophicity after cardiomyoplasty.  
Ann. Thorac. Surg. 2003; 75: 549-54

## 7.2 Textquellen aus Lehrbüchern

J. Koolman, K. L. Röhm:  
Taschenatlas der Biochemie  
2.Auflage, S.56ff  
Thieme Verlag, Stuttgart 1998

M. Lohr, B. Keppler:  
Innere Medizin, Kompendium für Studium und Klinik  
Kap.1, S.2ff,  
Ullstein Medical Verlag, Marburg 1998

C.R. Newton, A. Graham  
PCR  
2. Auflage  
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1992

J. R. Siewert:  
Chirurgie  
6.Auflage, Kap.16, pp.351ff  
Springer Verlag, Berlin 1998

S. Silbernagl, R. Klinke:  
Physiologie  
2. Auflage  
Kap. 6, pp. 79 ff  
Thieme Verlag, Stuttgart 1996

L. Stryer:  
Biochemie  
4.Auflage  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1990

## 8.1. Abbildungen und Sequenzierungsergebnisse

8 a) VEGF-Teilsequenz der Ziege, sequenziert von der Firma GATC  
mit Darstellung ihrer Translation in Aminosäuren:

```

ggatgtctaccagcgcagcttctgccgtcccattgagaccctgggtggacatc
  D V Y Q R S F C R P I E T L V D I

ttccangagtaccagatgagattgagttcattttcaagccgtcctgtgtg
  F X E Y P D E I E F I F K P S C V

ccctgatgCGgtgCGggggctgctgtaatgacgaaagtctggagtgtgtgcc
  P L M R C G G C C N D E S L E C V P

actgaggagtccaacatcaccatgcagattatgcggatcaaacctcaccia
  T E E S N I T M Q I M R I K P H Q

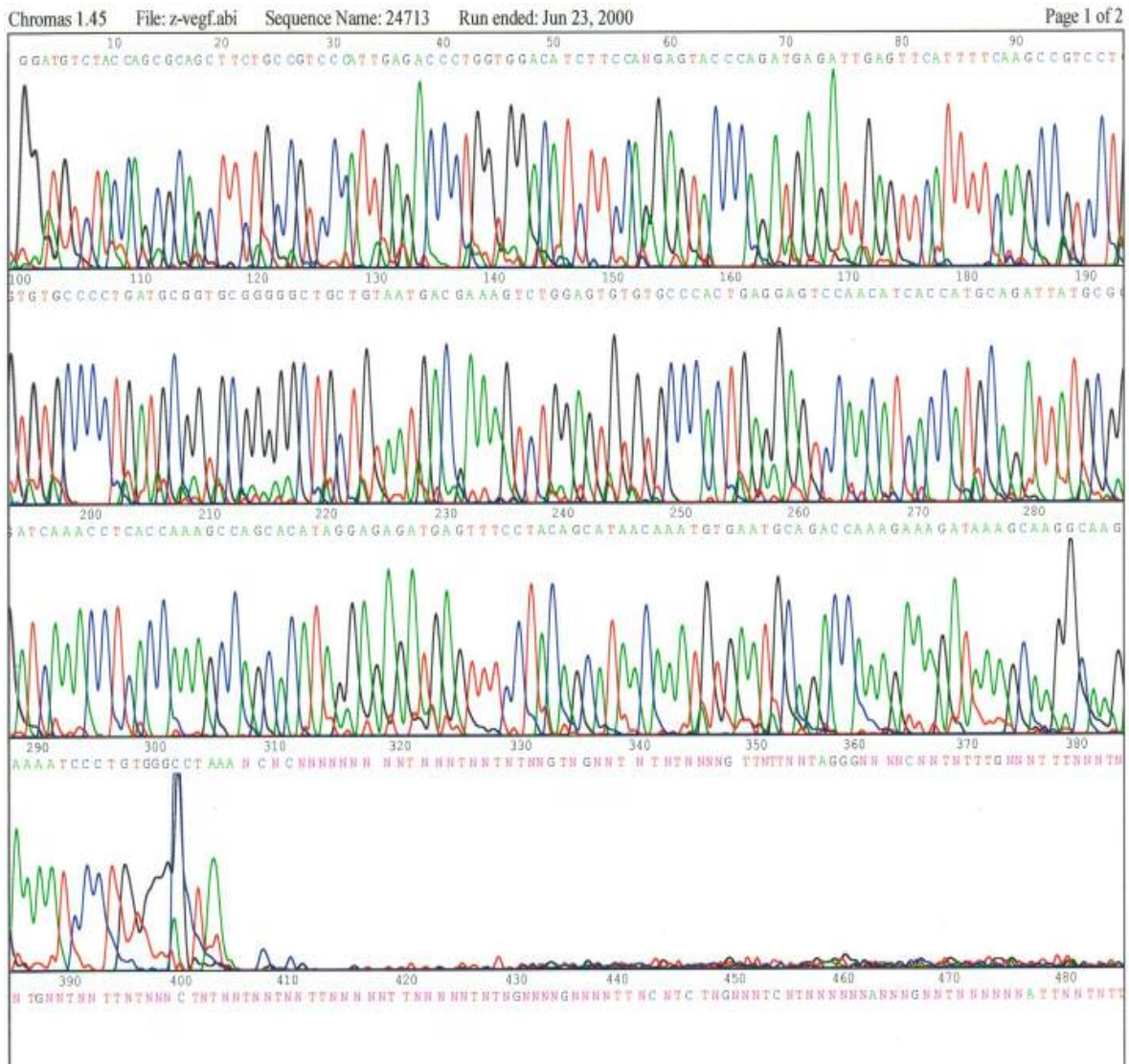
agccagcacataggagagatgagtttctacagcataacaaatgtgaatgc
  S Q H I G E M S F L Q H N K C E C

agaccaagaaagataaagcaaggcaagaaaatccctgtgggcct
  R P K K D K A R Q E N P C G P
    
```

Das erste Basentriplett ist gat; es codiert für die Aminosäure Aspartat. Nachfolgend sind die Verschlüsselungen aller Aminosäuren in Ein-Buchstaben-Symbolen aufgeführt:

A = Alanin	M = Methionin
C = Cystein	N = Asparagin
D = Aspartat	P = Prolin
E = Glutamat	Q = Glutamin
F = Phenylalanin	R = Arginin
G = Glycin	S = Serin
H = Histidin	T = Threonin
I = Isoleucin	W = Tryptophan
K = Lysin	V = Valin
L = Leucin	Y = Tyrosin

Abb. 8 b) Chromatographie der VEGF-Teilsequenz (Firma GATC, Koblenz)



8 c) Analyse der VEGF-Teilsequenz mittels BLAST-Vergleich

Dargestellt ist der Vergleich der Ziegen-VEGF-Teilsequenz mit den VEGF-Teilsequenzen von Schaf, Rind, Schwein, Hirsch und Mensch in der verfügbaren Genbank:

- Ziege Sequenz- Nr. 24713
- Schaf Sequenz- Nr. 3228692

ANHANG

Rind Sequenz- Nr. 163006  
 Schwein Sequenz- Nr. 587559  
 Hirsch Sequenz- Nr. 8132134  
 Mensch Sequenz- Nr. 14781453

Ziege	1	g gatgtctac	cagcgcagct	tctgccc	gtcc
Schaf	129	.	.....	.....	.....
Rind	674	.	.....	.....	.....
Schwein	133		.....	a.....	.....
Hirsch					
Mensch	132	.	.....t	.....	a.....a...

Ziege	31	cattgagacc	ctggtggaca	tcttccanga
Schaf	159	.....	.....	.....g..
Rind	704	...c.....	.....	.....g..
Schwein	159	a..c.....	.....	.....g..
Hirsch	4			..
Mensch	162	a..c.....	.....	.....g..

Ziege	61	gtacccagat	gagattgagt	tcattttcaa
Schaf	189	.....	.....	.....
Rind	734	.....	.....	.....
Schwein	189	.....c...	.....c....	a...c.....
Hirsch	6	.....	.....	.....c.....
Mensch	192	.....t...	.....c....	a...c.....

Ziege	91	gccgtcctgt	gtgcccctga	tgcggtgcgg
Schaf	219	.....	.....	.....
Rind	764	.....	.....	.....
Schwein	219	.....	.....	.....
Hirsch	36	.....	.....	.....
Mensch	222	...a.....	.....	...a.....

Ziege	121	gggctgctgt	aatgacgaaa	gtctggagtg
Schaf	249	.....	.....	.....
Rind	794	.....	.....	.....
Schwein	249	.....c	..c.....g	.....
Hirsch	66	.....	.....t...	.....
Mensch	192	.....c	.....gg	.c.....

ANHANG

Ziege	151	tgtgcccact	gaggagtcca	acatcaccat
Schaf	279	.....	.....t..	.....
Rind	824	.....	.....t..	.....
Schwein	279	.....	.....t..	.....
Hirsch	96	.....c	.....t..	.....
Mensch	222	.....	.....	.....

Ziege	181	gcagattatg	cggatcaaac	ctcaccaaag
Schaf	309	.....	.....	.....
Rind	854	.....	.....	.....
Schwein	309	.....	.....	.....g.
Hirsch	126	.....	.....	.....g.
Mensch	312	.....	.....	.....g.

Ziege	211	ccagcacata	ggagagatga	gtttcctaca
Schaf	339	.....	.....	.....
Rind	884	.....	.....	.c.....
Schwein	339	.....	.....	.c.....
Hirsch	156	.....	.....	.c.....
Mensch	342	.....	.....	.c.....

Ziege	241	gcataaacia	tgtgaatgca	gaccaaaaga
Schaf	369	.....	.....	.....
Rind	914	.....	.....	.....
Schwein	369	..c.....	.....	.....
Hirsch	186	.....	.....	.....
Mensch	372	..c.....	.....	.....

Ziege	271	agataaagca	aggcaagaaa	atccctgtgg
Schaf	399	.....	.....	.....
Rind	949	.....	.....	.....
Schwein	399	.....g..g	.....	.....
Hirsch	216	.....	.....	.....
Mensch	402	.....g....	..a.....	.....

Ziege	301	gcct	304
Schaf	429	....	432
Rind	974	....	977
Schwein	429	....	432
Hirsch	246	....	249
Mensch	432	....	435

8 d) Vergleich der translatierten Aminosäuren von Ziege, Schaf, Rind, Schwein, Hirsch und Mensch miteinander:

*Alignments*

Ziege	1	DVYQRS <u>F</u> <u>C</u> <u>R</u> PIETLVDIFXEYPDEIE <u>F</u> IFKPSCVPL	36
Schaf	44	DVYQRS <u>F</u> <u>C</u> <u>R</u> PIETLVDIFQEYPDEIE <u>F</u> IFKPSCVPL	79
Rind	44	DVYQRS <u>F</u> <u>C</u> <u>R</u> PIETLVDIFQEYPDEIE <u>F</u> IFKPSCVPL	79
Schwein	44	DVYQRS <u>Y</u> <u>C</u> <u>R</u> PIETLVDIFQEYPDEIE <u>Y</u> IFKPSCVPL	79
Hirsch	2	EYPDEIE <u>F</u> IFKPSCVPL	18
Mensch	45	DVYQRS <u>Y</u> <u>H</u> PIETLVDIFQEYPDEIE <u>Y</u> IFKPSCVPL	80

Ziege	37	MRCGGCCNDE <u>S</u> LECVPTTEESNITM	60
Schaf	80	MRCGGCCNDE <u>S</u> LECVPTTEEFNITM	103
Rind	80	MRCGGCCNDE <u>S</u> LECVPTTEEFNITM	103
Schwein	80	MRCGGCCNDE <u>G</u> LECVPTTEEFNITM	103
Hirsch	19	MRCGGCCNDE <u>S</u> LECVPTTEEFNITM	42
Mensch	81	MRCGGCCNDE <u>G</u> LECVPTTEESNITM	104

Ziege	61	QIMRIKPHQ <u>S</u> QHIGEMSFLQHNKCECRPKKD <u>K</u> ARQENPCGP	101
Schaf	104	QIMRIKPHQ <u>S</u> QHIGEMSFLQHNKCECRPKKD <u>K</u> ARQENPCGP	144
Rind	104	QIMRIKPHQ <u>S</u> QHIGEMSFLQHNKCECRPKKD <u>K</u> ARQENPCGP	144
Schwein	104	QIMRIKPHQ <u>G</u> QHIGEMSFLQHNKCECRPKKD <u>R</u> ARQENPCGP	144
Hirsch	43	QIMRIKPHQ <u>G</u> QHIGEMSFLQHNKCECRPKKD <u>K</u> ARQENPCGP	83
Mensch	105	QIMRIKPHQ <u>G</u> QHIGEMSFLQHNKCECRPKKD <u>R</u> ARQENPCGP	145

A = Alanin	M = Methionin
C = Cystein	N = Asparagin
D = Aspartat	P = Prolin
E = Glutamat	Q = Glutamin
F = Phenylalanin	R = Arginin
G = Glycin	S = Serin
H = Histidin	T = Threonin
I = Isoleucin	W = Tryptophan
K = Lysin	V = Valin
L = Leucin	Y = Tyrosin

## 8.2 Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde sowohl in der Klinik für Herzchirurgie als auch im Institut für Physiologie der Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, vom Mai 2000 bis November 2001 durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Norbert Guldner, der mit seiner ideellen und materiellen Unterstützung die Durchführung dieser Dissertation ermöglicht hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jelkmann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Physiologie, Lübeck, für die molekularbiologischen Auswertungen der Proben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Anja Gerdes für die exzellente Betreuung meiner Arbeit, sowie Frau PD Dr. Eva Wolber für ihre überaus wertvollen Ratschläge und Ideen bei dem molekularbiologischen Teil dieser Arbeit.

Vielen Dank Herrn Dr. Eric Metzen des Institutes für Physiologie, Lübeck, für die Bereitstellung der humanen und Schweine-Primer für die Amplifikation.

Ich danke Kinga Monczko für die sehr, sehr gute Zusammenarbeit.

Ein großes „Dankeschön“ für die vielen kleinen und großen Hilfen an Rita Meuer, Britta Keding, Herrn Dr. Dipl.-Ing. P. Klapproth und Herrn Dr. med. M. Großherr.

Ferner danke ich allen anderen Mitarbeitern der Herzchirurgie und der Physiologie in Lübeck für ihre freundliche Unterstützung und die nette Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt gilt meine besondere Dankbarkeit und Anerkennung meinen Eltern Friedhelm und Sigrid Brackhan, die es mir mit all ihrer Unterstützung ermöglichten, mein Medizinstudium und diese Doktorarbeit durchzuführen.

## 8.3 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Wencke Lindwedel, geb. Brackhan  
 Geburtsdatum: 12. April 1977  
 Geburtsort: Hannover  
 Eltern: Friedhelm und Sigrid Brackhan  
 Familienstand: verheiratet

### Bildungsgang

#### Schule

1983 – 1987 Grundschole  
 1987 – 1989 Orientierungsstufe  
 1989 – 1996 Hölty-Gymnasium Wunstorf  
 Juni 1996 Abitur

#### Studium

Okt. 1996 Beginn des Medizinstudiums an der Martin Luther - Universität Halle - Wittenberg  
 August 1998 Physikum  
 August 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 Okt. 1999 Fortsetzung des Studiums am Universitätsklinikum Lübeck  
 März 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 Nov. 2002 Fortsetzung des Medizinstudiums an der Medizinischen Hochschule Hannover  
 Nov. 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

#### Praktisches Jahr

Juni - Juli 2002 Innere Medizin: Kantonsspital Obwalden, Sarnen, Schweiz  
 Aug. - Nov. 2002 Innere Medizin: Städtisches KKH Süd, Lübeck  
 Dez. - März 2003 Chirurgie: AKH Celle  
 März - Juli 2003 Pädiatrie: Kinderklinik des AKH Celle

### Auslandsaufenthalte

Aug. und Sept. 2000 Hospital Loma Plata, Menno, Chaco, Paraguay;  
 Famulatur in der Chirurgie und Ambulanz  
 September 2001 Consolata Hospital Nyeri, Kenya;  
 Famulatur in der Intensivmedizin

**Forschung**

- 1995 – 1996 wissenschaftliche Mitarbeit im Institut für Neurochirurgie der Martin Luther Universität Halle - Wittenberg (Zellkulturversuche mit pluripotenten Stammzellen)
- Feb. - März 1999 Praktikum „Molekulargenetische Analyse des menschlichen Genoms“ unter der Leitung von Prof. Dr. I. Hansmann, Molekulargenetisches Institut der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

**Ärztliche Tätigkeit**

- Apr.- Sept. 2004 Ärztin im Praktikum im KKH Neustadt a. Rbge., Innere Medizin
- Seit Okt. 2004 Assistenzärztin im KKH Neustadt a. Rbge., Innere Medizin