

Journal für Kardiologie

Austrian Journal of Cardiology

Österreichische Zeitschrift für Herz-Kreislauserkrankungen

Veränderte Genexpression als Grundlage für vaskuläres Remodeling

Lang I, Bonderman D, Czerny M
Gharehbaghi-Schnell E, Glogar HD
Grimm M, Hassan A, Ignatescu M
Korschineck I, Maurer G
Rezaie-Majd S, Rosenhek R

*Journal für Kardiologie - Austrian
Journal of Cardiology 2000; 7 (1)
18-23*

Homepage:

www.kup.at/kardiologie

Online-Datenbank
mit Autoren-
und Stichwortsuche



Offizielles
Partnerjournal der ÖKG



Member of the ESC-Editor's Club



Offizielles Organ des
Österreichischen Herzfonds



ACVC
Association for
Acute CardioVascular Care

In Kooperation
mit der ACVC

Indexed in ESCI
part of Web of Science

Indexed in EMBASE

Veranstungskalender

Hybrid-Veranstaltungen der Herausgeber des **Journals für Kardiologie**

Finden Sie alle laufend aktualisierten Termine
auf einem Blick unter

www.kup.at/images/ads/kongress.pdf

Veränderte Genexpression als Grundlage für vaskuläres Remodeling

I. M. Lang, E. Gharehbaghi-Schnell, S. Rezaie-Majd, D. Bonderman, R. Rosenhek, M. Ignatescu, A. Hassan, M. Grimm*, M. Czerny*, I. Korschineck, D. H. Glogar, G. Maurer

Gefäßwandumbau oder „vascular remodeling“ ist definiert als Änderung im Gefäßkaliber, oft ohne Veränderung der Gesamtgewebsmasse. Die Verfügbarkeit des intravaskulären Ultraschalls hat dazu geführt, Gefäßremodeling als dynamischen Prozeß zu beobachten. Zelltod, Zellwachstum, Zellmigration und Produktion oder Abbau extrazellulärer Matrix sind durch die Expression von Genen in der Gefäßwand gesteuert. Anhand von Analysen solcher Genexpressionsmuster in verschiedenen Gefäßgebieten wird die Signifikanz des Forschungskonzepts „Genexpression in der Gefäßwand“ an Beispielen illustriert.

The importance of vascular remodeling defined as a change in calibre of the vessel, often with little or no change in overall tissue mass, has been increasingly recognized by intravascular ultrasound. Vascular remodeling results from cell death, cell growth, cell migration and matrix turnover as the consequence of a dynamic up- and downregulation of genes in the vascular wall. By defining expression patterns of known and novel genes in normal and diseased vessels, alterations of gene expression and potential targets for therapy are identified. J Kardiolog 2000; 7: 18–23.

Die Gefäßwand ist ein histologisch einfach aufgebautes Organ, das aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten besteht, die aber miteinander in Form von noch wenig definierten, aktiven parakrin-autokrinen Interaktionen in Verbindung stehen. Die Möglichkeit, durch intravaskuläre bildgebende Verfahren, zum Beispiel intravaskulären Ultraschall, die Gefäßwand *in vivo* von innen zu sehen und zu vermessen, hat der Gefäßbiologie ein neues Konzept vermittelt. Gefäßwandumbau, oder „vascular remodeling“ ist ein aktiver Prozeß strukturellen Umbaus, der Veränderungen in wenigstens vier zellulären Mechanismen bedingt, nämlich Zelltod, Zellwachstum, Zellmigration und Produktion oder Abbau extrazellulärer Matrix. Es ist definiert als Änderung des Gefäßkalibers mit wenig oder keiner Änderung der Gewebsmasse. Es handelt sich also um eine Verlagerung von Zellen und Matrix zum Lumen oder vom Lumen weg, mit Verkleinerung oder Vergrößerung des Lumenquerschnitts [1–3]. Remodeling passiert oft als Antwort auf eine längerfristige Veränderung der Hämodynamik, aber es entsteht auch infolge anderer Trigger und untersteht einer Dynamik. Ursachen vaskulären Remodelings sind folgende:

1. Atherosklerose [4]
2. Thrombose und Thrombusorganisation [5]
3. Gefäßwandverletzung durch Infektion, vaskuläre Interventionen, Shearstress, Irradiation [6–9]
4. Umstellung von fetalem auf adulten Kreislauf [10, 11]
5. Angeborene Gefäßveränderungen (Aneurysmen, fibromuskuläre Hyperplasie, Stenosen in Kollateralen) [12, 13]
6. Verlust eines funktionell intakten Kapillarbetts
7. (systemische und pulmonale Hypertension) [14, 15]

Zum Beispiel erzeugt hoher arterieller Druck eine Umstrukturierung, die das Verhältnis zwischen Wanddicke und Lumenweite durch Vermehrung von zellulären Bestandteilen und extrazellulärer Matrix vergrößert. Andererseits entstehen bei anderen Formen des vaskulären Remodelings vor allem Veränderungen der Lumenweite, ohne Veränderung des Gesamtgefäßquerschnitts. Beispiele dafür sind Gefäßerweiterung unter erhöhtem Fluß bei

wirksamen Shuntvitien oder intiale Stadien von Aneurysmen. Reduktion des Flusses führt zu Verkleinerung des Gesamtgefäßquerschnitts. Der Verlust eines funktionellen Kapillarbetts ist ein weiteres Beispiel für vaskuläres Remodeling. Ischämie des Parenchyms und kompensatorische Druckerhöhung mit weiterem Remodeling sind die Folge.

Wir haben das Konzept verfolgt, daß vaskuläres Remodeling die Folge veränderter Genexpression in der Gefäßwand darstellt. Damit ergibt sich ein Angriffspunkt für Gentherapien der Zukunft. Die folgende Arbeit illustriert dieses Konzept an mehreren pathophysiologischen Studien an humanen Geweben. Die Daten zeigen, daß Genexpressionsmuster definierbar sind, die in verschiedenen Gefäßgebieten sehr vorhersagbar ablaufen.

Patienten und Methoden

In Abhängigkeit von der speziellen Fragestellung wurden von verschiedenen Patientengruppen Präparate gesammelt. Schwer atherosklerotische Gefäße wurden von Patienten während Aortenaneurysmaoperationen ($n = 28$), femoralen und aortokoronaren Bypassoperationen ($n = 9$), und Endarteriektomiepräparate von Patienten, die sich Karotis- und Koronararterienendarteriektomien unterzogen haben ($n = 8$), gewonnen. Präparate von Patienten mit Aneurysmen der Aorta ascendens wurden während Aortenklappenersatzoperationen oder Ascendensersatzoperationen gewonnen. Thrombus und Pulmonalarterien von Patienten mit chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertension wurden während pulmonaler Thromboendarterektomien isoliert. Die Gewebe von Patienten nach akuten Pulmonalembolien wurden von Patienten, die unter dem klinischen Verdacht akuter Pulmonalembolien akut verstorben waren, innerhalb von 3–6 Stunden post mortem gewonnen. Eine weitere Gruppe von Gefäßgewebe waren frische Arterektomiepräparate, die durch koronare Arterektomien isoliert wurde. Transplant-Donorgefäße dienten als Kontrollen. Eine Hälfte der frischen Präparate wurde sofort in flüssigen Stickstoff eingelegt, die andere Hälfte in 7,5 % gepuffertem Formalin fixiert.

Gewebekultur

Endothelzellen (EZ) wurden aus dem Gefäß isoliert und auf Gelatin-beschichteten 33 mm Gewebekulturplatten (Corning, Corning, NY) in 0,2 ml/cm² M199 Medium mit 20 % fetalem Kälberserum (FCS, Gibco), Heparin (20 U/ml), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und 0,4 % Endothelial Cell Growth Supplement (Technoclone, Wien, Österreich) zur Konfluenz gebracht. Für konditioniertes Medium wurden konfluente EZ Monolayer zweimal mit PBS-(phosphate-buffered saline-)Puffer gewaschen und weitere 24 h in komplettem Zellmedium inkubiert. Die konditionierten Medien wurden gesammelt, zentrifugiert (700 x g) und in 0,01 % Tween 80 bei -70 °C eingefroren. Die Monolayers wurden daraufhin trypsinisiert und die Zellen gezählt. Von Willebrand-Faktor-Färbungen auf Azeton-Methanol fixierten Kulturen dienten der Überprüfung der Kulturreinheit.

t-PA Antigen-, PAI-1 Antigen- und PAI-1 Aktivitäts-Assays

Zur Bestimmung des t-PA und PAI-1 Antigens wurden two-site Immunoassays verwendet [16]. PAI-1 Aktivitätsmessungen wurden mit immobilisiertem gereinigtem t-PA durchgeführt [16].

In situ Detektion apoptotischer Zellen

Terminales transferasemediiertes dUTP Nick End Labeling (TUNEL, *in situ* apoptosis detection kit ApopTag, Oncor Inc., Gaithersburg; MD) wurde nach den Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Für die Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen wurden vier Felder bei 200facher Vergrößerung ausgezählt. Der apoptotische Index wurde mit der Formel: 100 x (Anzahl der TUNEL + Zellkerne pro Gesichtsfeld/Gesamtzahl der Zellkerne pro Gesichtsfeld) kalkuliert.

DNA laddering-Experimente

Genomische DNA wurde aus 200 mg Gefäßgewebe mit Standardtechnik isoliert [17]. Das DNA-Pellet wurde einer Ligations-PCR-Methode (ApoAlert LM-PCR Ladder Assay Kit, Clontech, Palo Alto, CA) unterzogen. 20 µL von jeder Reaktion wurden auf einem 1,5 % Ethidiumbromid-hältigen Agarosegel analysiert und auf einer 302 nm Lichtquelle photographiert.

RNA Isolation und Northern Blot

Totale RNA wurde von frischen und bei -180 °C eingefrorenen Präparaten isoliert. Zuerst wurde das Gewebe zerkleinert und in Solution D (4M Guanidine Isothiocyanat, 25 mM Natriumzitat pH 7,0, 0,5 % Sarcosyl, 0,1M beta-Mercaptoethanol [18]) mit einem Ultra-Turrax T25 Zerkleinerer homogenisiert. Nach Extraktion in Phenol pH 4,3/Chloroform/Isoamylalkohol wurde das Präparat mit Isopropanol zu gleichen Teilen präzipitiert. Darauf erfolgte eine zweite Reinigung mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit. RNA-Integrität wurde auf einem 1%igen Agarosegel bestätigt. Totale RNA (14 µg) wurde dann auf einem denaturierenden Formaldehydgel separiert und auf eine Duralon-UVTM Membran (Stratagene, La Jolla, CA) durch Kapillarttransfer gebロットet [17]. Standardisierung der Blots erfolgte durch Hybridisierung mit einem 284bp Fragment der humanen Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

RT-PCR Analyse

RNA (1 µg) wurde mit dem First strand cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN) mit oligo-(dT)15 Primern revers transkribiert. Verschiedene sequenzspezifische Primerpaare wurden verwendet; Für PD-ECGF wie folgt:

{Vorwärts PD-ECGF: 5'-GCCTGAGCGAAGCGGACATC-3' und Revers PD-ECGF 5'-CATCTGCTCTGGGCTCTGGA-3'} mit einem 377bp Product (Fragment zwischen den Nukleotiden 143-519 der PD-ECGF cDNA [19].

Die Charakterisierung des fibrinolytischen Systems in der Gefäßwand erforderte folgende Primerpaare (t-PA Vorwärts Primer 5'-TGTGAAGCAATCATGGATGCA-3'; t-PA Revers Primer 5'-GTTTCCTTGCTCGCTGCAACT-3'), PAI-1 spezifische Primer (PAI-1 Vorwärts Primer 5'-TCAGCACCACAGACGCGATCTTC-3'; PAI-1 Revers Primer 5'-GTTTCACCAGCACCAGCCGTGTCA-3').

Riboprobe

Die jeweiligen cDNAs wurden in das Vektorsystem pGEM-3Z (Promega, Madison, WI) geklont. Sense und antisense Riboprobe wurden mit Digoxigenin-markiertem UTP durch *in vitro* Transkription mit SP6 und T7 RNA Polymerase (Promega) hergestellt. Es wurden folgende Riboprobe verwendet: ein EcoRI-HindIII-Fragment des pGEM3Z humanen t-PA (Geschenk von Dr. Tor Ny, Uppsala, Schweden) [20], Nukleotide 1370-1985 von psP63 u-PA (Geschenk von Dr. Jean-Dominique Vassalli, Genf, Schweiz) und ein 1085bp-Fragment von humanem Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ 1 (PAI-1) [21].

In-situ-Hybridisierung

Nichtradioaktive *In-situ*-Hybridisierung wurde auf 3–5 µm Paraffinschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden auf Superfrost/Plus Träger aufgebracht (Fisher) und bei 60 °C 5 Stunden getrocknet. Nach Deparaffinierung in Xylol und Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte in 4 %igem Paraformaldehyd fixiert. Es folgte ein Waschschriff mit 0,5 x SSC (1 x SSC= 150 mM NaCl/15 mM/L Natriumzitat, pH 7,0) gefolgt von Protease K Behandlung (20 µg/mL, 20 min, RT). Dann wurden die Schnitte in Prähybridisierungslösung in einer feuchten Kammer inkubiert {50 % (wt/vol) Formamid/0,3 M/L NaCl/20 mM/L Tris-HCl, pH 8,0/5 mM/L EDTA/0,02 % Polyvinylpyrrolidon/0,02 % Ficoll/0,02 % bovines Serum-Albumin/10 % (wt/vol) Dextranulphat/10 mM Dithiothreitol}. Hybridisiert wurde mit 0,5 µg/ml Digoxigenin-gelabelter Riboprobe, die in 20 µl Prähybridisierungspuffer mit 2,5 mg/mL t-RNA (48 °C, 8 Stunden) zugegeben wurde. Als nächstes wurde mit RNase A 30 min inkubiert, 2 Stunden in 0,1 x SSC/50 % Formamid bei 48 °C gewaschen, mit 10 % Ziegen Serum und Alkalischer Phosphatase-markiertem anti-Digoxigenin Fab Fragment (Boehringer Mannheim, 1:1000 in 0,1 % Ziegen Serum/Tris gepuffertem Kochsalz, RT) inkubiert. Die Farbentwicklung erfolgte mit NBT/BCIP als Substrat und Gill's Hämatoxylin zum Gegenfärben. Parallele Schnitte wurden mit der Sense-Probe als negative Kontrolle bearbeitet. Dasselbe Protokoll wurde mit leichten Modifikationen zur Hybridisierung mit 35S UTP-markierten Riboprobe verwendet.

Computerassistierte quantitative histologische Analyse

Alle Präparate wurden in voller Größe mit einem Slide Scanner (Nikon 6,0 35 mm Film Scanner, LS-20, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) gespeichert. Erstellung von Farbkontrasten und andere Bildbearbeitungsmanöver erfolgten unter Zuhilfenahme des Programms Adobe PhotoShop 3.0 (Adobe Systems Inc.). Ein Thrombus oder andere Strukturen wurden flächenmäßig in Prozent (%) der Gesamtfläche mit computergestützter Planimetrie berechnet (NIH Image 1,61/ppc, Bethesda, Maryland). Die dafür verwendete Trichrom-Färbung stellt Erythrozyten gelb dar, Fibrin in rot, Kollagen in grün, und elastische Fasern in schwarz. Drei unabhängige Beob-

achter, die die Patientenidentität nicht kannten, führten die manuellen Zählungen von apoptotischen Zellen, PCNA-positiven Zellen und Kapillaren durch. Die gewonnenen Zahlen wurden auf die jeweilige Präparatefläche bezogen.

Immunhistochemie

Es wurde die indirekte Avidin-Biotin Peroxidase Methode verwendet. Ein gebundener Primär-Antikörper wurde mit biotinyliertem sekundärem Antikörper detektiert (Zymed, South San Francisco, CA) und mit Aminoethylcarbazol (AEC) die Substratniederschläge als rote Farbe entwickelt. Monoklonale Antikörper gegen humanes alpha-Aktin waren von DAKOPATTS. Monoklonale Antikörper gegen PCNA war von Oncogene (10 µg/mL).

Die experimentellen Protokolle waren von der Ethikkommission der Universität Wien genehmigt.

Ergebnisse

Genexpression und Gefäßremodeling im Pulmonalkreislauf

Frühere Studien zeigen, daß das fibrinolytische System für die Thrombusorganisation relevant zu sein scheint [21–23]. Um die Organisation von akuten und chronischen pulmonalen Thromboembolien besser zu verstehen, unternahmen wir eine Analyse des fibrinolytischen Systems der Pulmonalarterienwand. Als Vergleichsgefäß diente die ascendierende Aorta. Die Tissue-type plasminogen activator (t-PA) Antigen-Spiegel in von Pulmonalarterienendothelzellen konditioniertem Medium waren mit $8,3 \pm 1$ ng/10⁵ Zellen signifikant höher als die korrespondierenden Spiegel in Aortenendothelzellmedium ($4,3 \pm 2$ ng/10⁵ Zellen, $p = 0,01$, Abbildung 1). RT-PCR mit t-PA und PAI-1 spezifischen Primern und *In-situ*-Hybridisierung (Abbildungen 2 und 3A–D) wiesen differentielle Expression von t-PA und PAI-1 in der proximalen Pulmonalarterie und in der Aorta auf.

Auf Proteinebene war aus Gesamtproteinextrakten frischer Pulmonalarterien-Aortenpaaren von demselben Spender zu erkennen, daß relativ mehr t-PA Antigen als PAI-1 Antigen zu finden war, unabhängig davon, ob die Gefäßadventitia vorhanden oder entfernt war. Da aus dem Tiermodell bekannt war, daß große Gefäße keine relevante t-PA Expression aufweisen [24], spekulieren wir aus diesen Daten, daß sich der venöse Thromboembolismus beim Menschen als Lebewesen mit aufrechtem Gang parallel mit einer veränderten Genexpression entwickelt hat.

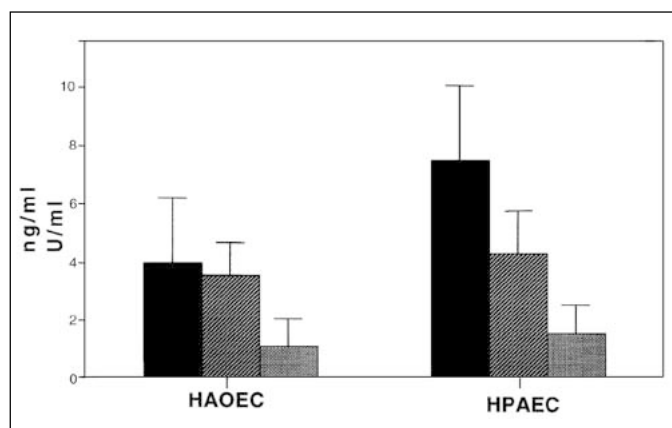


Abbildung 1: t-PA Antigen (schwarze Balken) und PAI-1 Antigen (gestreifte Balken) und -Aktivität (getupfte Balken) in konditioniertem Medium von humanen Aortenendothelzellen (HAOEC) und Pulmonalarterienendothelzellen (HPAEC) des gleichen Spenders.

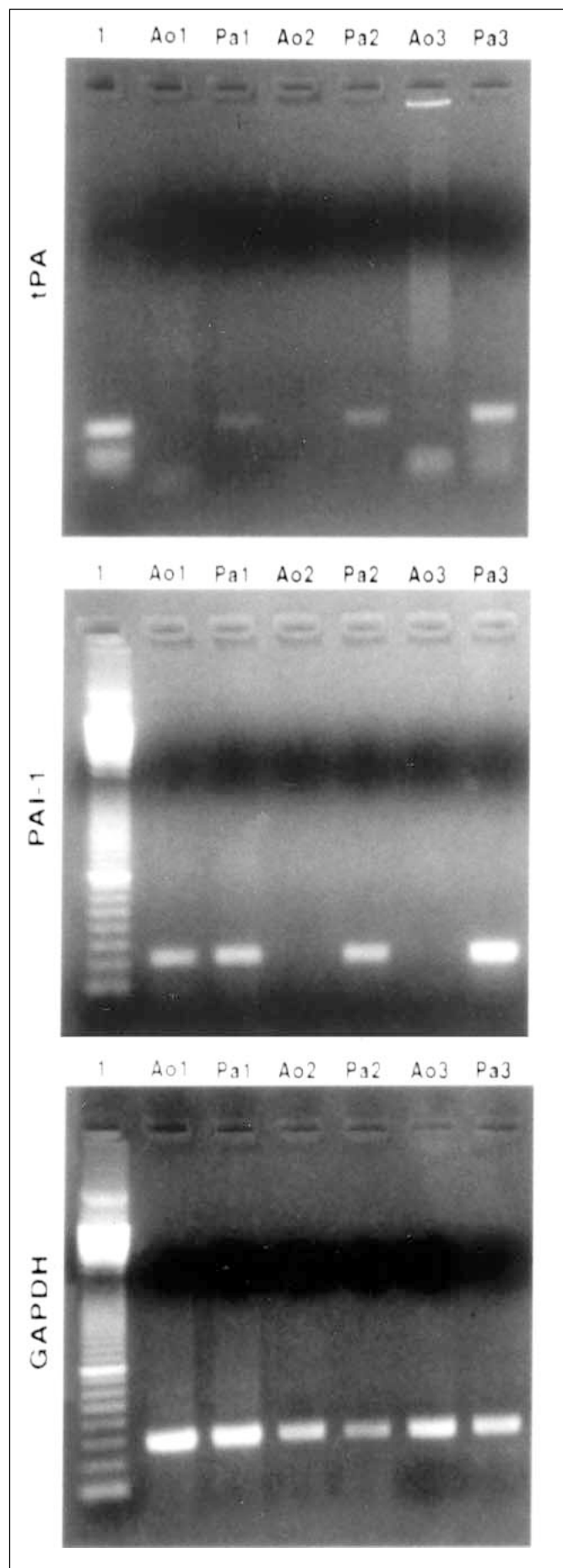


Abbildung 2: RT-PCR Analyse von humanen Aorten (Ao1, Ao2, Ao3) und humanen Pulmonalarterien vom selben Spender (Pa1, Pa2, Pa3). In der ersten Gelspalte des obersten Gels ist die t-PA Kontrolle aufgetragen, in den darunter gezeigten Gelen ist ein Molekulargewichtsstandard (hundred basepair ladder, GIBCO) zu sehen.



Abbildung 3: *In-situ*-Hybridisierung von humanen Pulmonalarterien (A und B) und von humanen Aorten (C und D) mit einer t-PA-Sonde. Blaue Immunreaktivität repräsentiert positives Hybridisierungssignal. Die Kontrollschnitte (B und D) sind mit Senseproben hybridisiert (200fache Vergrößerung).

Aus diesen Untersuchungen lassen sich die Befunde der Genexpression fibrinolytischer Gene bei akuter Pulmonalembolie besser verstehen. Eine Analyse von sechs Patienten innerhalb von sechs Stunden nach tödlicher Pulmonalembolie ergab den Befund mehrzeitiger Ereignisse in allen Patienten. Aus der Beobachtung frischer und organisierter Thrombusanteile nebeneinander ließ sich eine Kaskade der Regulation fibrinolytischer Proteine rekonstruieren, mit einer initialen Aufregulation von EZ PAI-1 (Abb. 4), gefolgt von Aufregulation von t-PA und dem Erscheinen von u-PA in migrierenden glatten Muskelzellen. Im Gegensatz zu diesem Befund war bei chronischen persistierenden thrombotischen Pulmonalverschlüssen (Abbildung 5A) eine Persistenz der hohen endothelialen PAI-1 Expression zu beobachten (Abbildung 5B). Eine Neuthrombose von Thrombusgefäßen trägt bei diesem Modell zum Weiterwachsen des Thrombus bei und führt zu einer kompletten Obstruktion der Pulmonalgefäßstrombahn [21].

Genexpression und Gefäßremodeling in atherosklerotischen Koronararterien

Eine elegante Methode zur Erfassung von Gefäßremodeling und zugrundeliegender Gefäßbiologie ist durch intravaskulären Ultraschall ermöglicht, mit nachfolgender direkter Arteriekтомie. Wir haben versucht, kompensatorische Gefäßvergrößerung (R⁺) und das Fehlen dieses vaskulären Kompensationsmechanismus (R⁻) durch zwei Zugangswege zu analysieren. Einerseits könnte Wachstum oder Schrumpfung durch angiogenetische Wachstumsfaktoren getriggert werden, andererseits kann das Fehlen solcher mit einem Zusammenbruch des Zellzyklus assoziiert sein. Rezente Daten zeigen, daß Platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), ein 45kDa angiogenetisches Protein im Endothel verschiedener Organe, exprimiert ist und mit der Anzahl von Mikrogefäßen in humanen Tumoren korreliert. Weil die Bildung von neuen kleinen Gefäßen eine Schlüsselrolle im atherosklerotischen Gefäßremodeling spielt, haben wir PD-ECGF-Expression in frischen koronaren Plaques studiert. Präparate von 31 Patienten wurden gesammelt. PD-ECGF Immunreaktivität und mRNA wurden in Plaque-Makrophagen, Plaque-Endothelzellen und glatten Muskelzellen gefunden (Abbildungen 6A und B). PD-ECGF Immunreaktivität korrelierte mit der Anzahl von Mikrogefäßen, sowie mit Gefäßschrumpfung.

Andererseits ist Gefäßremodeling durch eine veränderte Balance zwischen Zellproliferation und Zelluntergang

zu verstehen. Wir untersuchten diese Frage an 34 Arteriekтомiepräparaten mit der TUNEL Technik (Beispiel einer positiven TUNEL-Reaktion einer R⁻-Läsion in Abbildung 7). Die statistische Auswertung der Daten zeigt (Abbildung 8), daß R⁻-Läsionen im Vergleich mit R⁺-Läsionen mit einer signifikanten Erhöhung von Apoptose intimaler Zellen assoziiert war ($17,17 \pm 2,19\%$ versus $4,89 \pm 1,7\%$; $p = 0,0007$). Außerdem waren

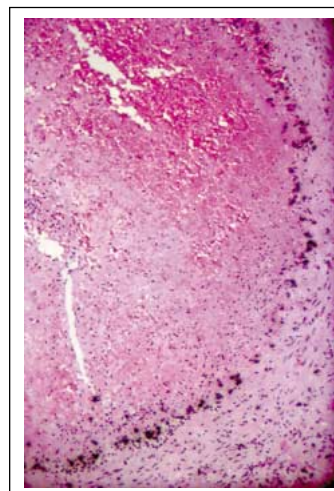


Abbildung 4: Radioaktive *In-situ*-Hybridisierung einer Pulmonalarterie mit einem akuten Pulmonalembolus durch eine PAI-1 Sonde. Schwarze Körner repräsentieren positives Hybridisierungssignal an der Grenzzone zwischen Thrombus und Gefäßendothel (100fache Vergrößerung).

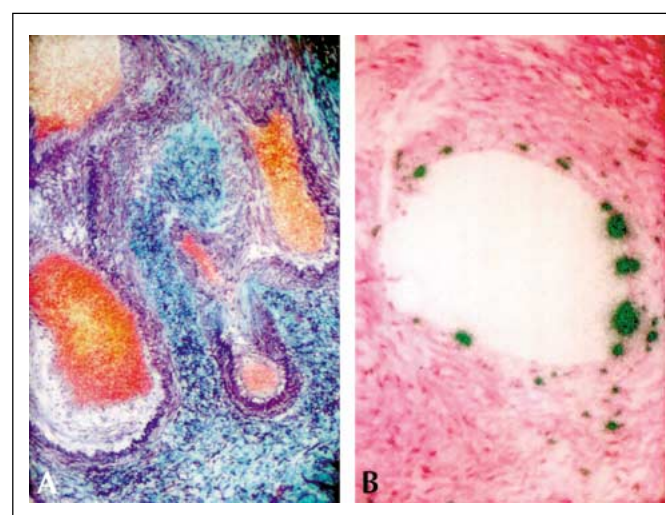


Abbildung 5: A: Trichromfärbung eines pulmonalarteriellen Thromboembolus von einem Patienten mit chronisch thromboembolischer pulmonaler Hypertension. Kollagen stellt sich grün dar, elastische Fasern erscheinen blau, Erythrozyten gelb und Fibrin ist rot gefärbt. Man beachte das Nebeneinander von organisiertem (grün und blau gefärbtem) Material und den frisch thrombosierten (gelb und rot gefärbten) Gefäßräumen innerhalb des Thrombus. B: Radioaktive *In-situ*-Hybridisierung eines Thrombus-Gefäßes. Positives Hybridisierungssignal ist blaugrün dargestellt. Luminale Endothelzellen zeigen stark positive Reaktion nach Hybridisierung mit einer PAI-1-Sonde.

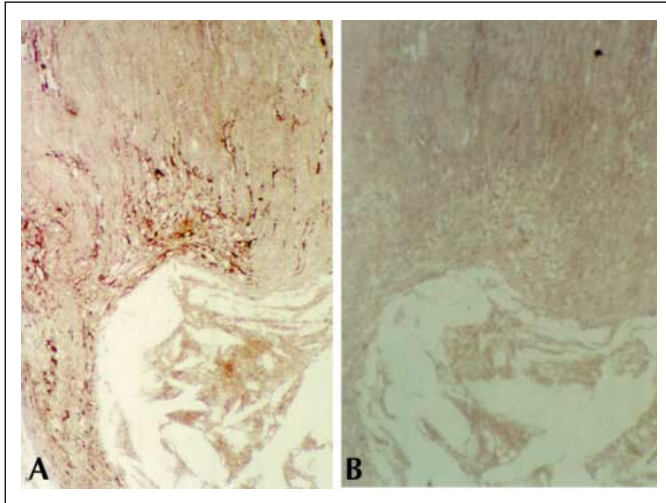


Abbildung 6: A: Nichtradioaktive *In-situ*-Hybridisierung mit einer PD-ECGF Riboprobe. Es ist eine Plaqueschulterregion dargestellt. Es wurde keine Gegenfärbung durchgeführt. Positives Signal ist als feine blaue Immunoreaktivität in kleinen Gefäßräumen der Plaqueschulter zu erkennen. B: Paralleler Schnitt mit einer Senseprobe hybridisiert.

R-Läsionen mit flächenmäßig größerem Thrombus verbunden.

Genexpression und Gefäßremodeling in Aneurysmen der ascendierenden Aorta

Apoptose reguliert die Zellzahl in normalen Geweben [25]. Die histologische Beobachtung von einem fokalen noninflammatorischen Zelluntergang mit Zerfall elastischer Fasern bei Aneurysmen der ascendierenden Aorta, die sogenannte Erdheim'sche zystische Medianekrose, legt die Möglichkeit für das Vorliegen eines außergewöhnlichen apoptotischen Prozesses nahe. Aorta ascendens-Präparate von 32 Patienten wurden mit TUNEL untersucht.

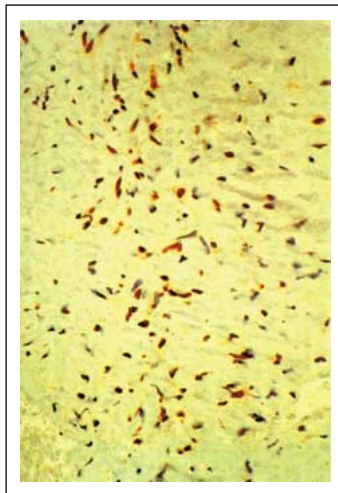


Abbildung 7: TUNEL-Färbung einer schrumpfenden Koronarläsion. Braunrote Kerne repräsentieren DNA-nicking.

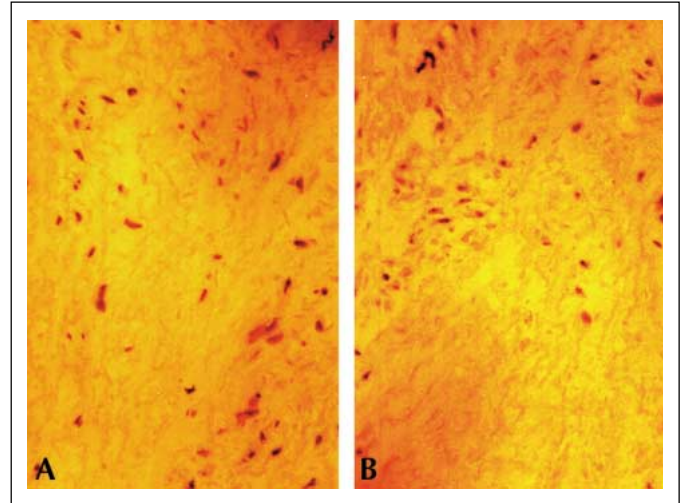


Abbildung 9: A: TUNEL-Färbung einer zystischen Medianekroseläsion aus einem Aneurysma der Aorta ascendens. Braunrote Kerne repräsentieren DNA-nicking. B: Paralleler Schnitt ohne Terminaler Transferase als negative Kontrolle.

Vier Patientengruppen wurden unterschieden: Bikuspidale Klappenträger mit (bi/dil) oder ohne Aortendilatation (bi/0), und trikuspidale Klappenträger mit (tri/dil) oder ohne Aortendilatation (tri/0). Eine massive fokale Apoptose wurde in der Media von bi/dil (mittlerer apoptotischer Index [mAI] $8,1 \pm 6,0$) und tri/dil (mAI $8,1 \pm 8,3$) verglichen mit tri/0 (mAI $0,9 \pm 1,2$; $p = 0,0079$ bzw. $p = 0,037$, Abbildungen 9A und B) gefunden. Bei bi/0 (mAI $9,1 \pm 5,7$) versus tri/0 (mAI $0,9 \pm 1,2$) waren die mAls erhöht ($p = 0,0025$). Bi/dil (mittleres Alter $40,6 \pm 15,7$ Jahre) waren viel jünger als tri/dil (mittleres Alter $56,4 \pm 12,8$ Jahre), die sich einer Operation unterziehen mußten ($p = 0,0123$). Ein vorzeitiger nestartiger Untergang glatter Muskelzellen könnte Teil eines genetischen Programms sein und die Assoziation von Fehlbildungen der Aortenklappen mit Aortenaneurysmen erklären.

Diskussion

Die Daten zeigen, daß Gefäßremodeling ein komplexer Prozeß ist, der mit Änderung der Genexpression in der Gefäßwand gekoppelt ist. Die Analyse der Expressionsmuster normaler Gefäßgebiete ist die Voraussetzung dafür, pathologische Veränderungen von Genexpressionsmustern

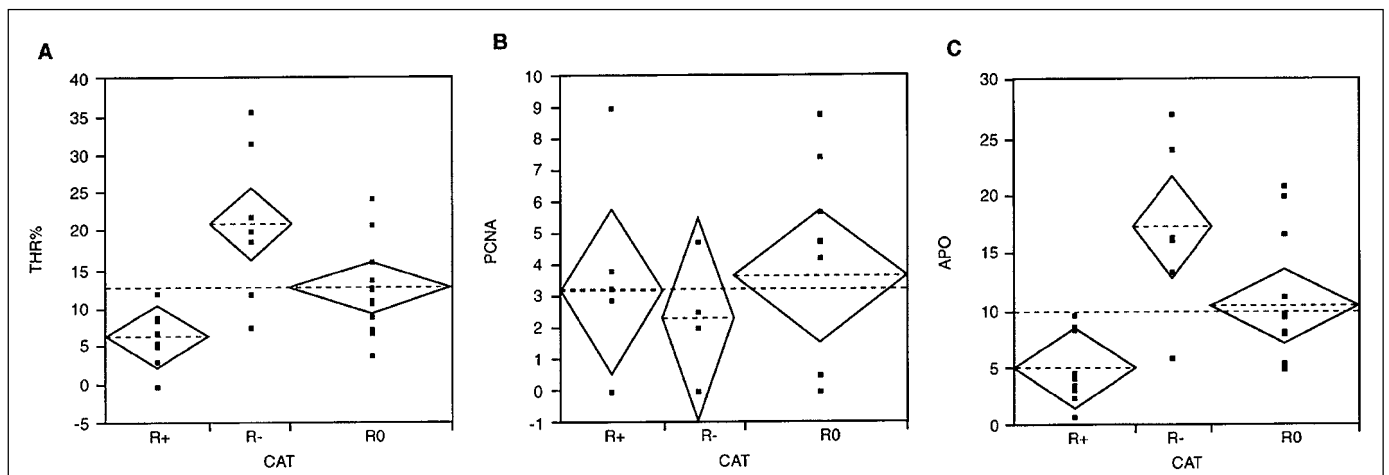


Abbildung 8: Verteilung von relativem Thrombusareal (THR%), Anzahl PCNA-positiver Zellkerne pro Gesamtzahl der Kerne (PCNA) und Apoptischen Indices (APO) in Bezug auf IVUS-definiertes Gefäßremodeling. R⁺ stellen Läsionen mit kompensatorischer Vergrößerung des Gefäßquerschnitts dar, R⁻ stellen Läsionen mit Verlust des Gesamtgefäßquerschnitts dar und R⁰ sind Läsionen, die weniger als 10 % vom Referenzquerschnitt abweichende Gesamtdurchmesser aufweisen.

zu verstehen. Die in unseren Analysen gewählten „Kandidatgene“ und „Kandidatprozesse“ entspringen der Kenntnis von bereits gedachten Mechanismen, gehen aber an den unbekannten Mechanismen vorbei. Allerdings wird mit der nahenden Aufklärung des humanen Genoms die Suche nach neuen Genen immer schwieriger, vielleicht auch weniger interessant. Obwohl Genexpression Gefäßgebiet-spezifisch ist [26], lassen sich zum Beispiel für fibrinolytische Proteine allgemeine vaskuläre Genexpressionsmuster beschreiben. Die von Schneiderman et al. [27, 28] stammende Beschreibung von Plasminogen Aktivatoren und PAI-1 in verschiedenen Stadien abdominalen Aortenaneurysmen zeigt eine sehr ähnliche Dynamik wie die von uns beschriebenen Veränderungen der Genexpression in der Pulmonalarterienwand nach massiver letaler Pulmonalembolie.

Initial wird die Gefäßwand durch den Impakt eines muralen Thrombus verändert. Möglicherweise ist diese Verletzung der Gefäßwand vergleichbar mit einem Ballon-induzierten Schaden, weil in einem Hasen-Ballon-Dilatationsmodell auch eine akute intimale PAI-1 Aufregulation beobachtet wurde [29]. Das erste Ereignis in der Studie von Schneiderman [27], in der Studie von Fujii [30] und in unserer Studie ist die Aufregulation von PAI-1 am neuen „Interface“. Möglicherweise dient starke lokale Plasminogeninhibition hier einer Beschränkung lokaler proteolytischer Aktivität, wie sie aus massivem Zellzerfall resultiert. Uneingeschränkte Aktivität der ubiquitären Protease Plasmin würde die Gefäßintegrität auflösen. In der später einsetzenden Organisationsphase, wo Zellmigration und Zellproliferation vorherrschen und Interphasen verwischt werden, erscheint die Proteaseexpression wieder. Sowohl in Aortenaneurysmen [27], als auch in der Organisationsphase akuter Pulmonalembolien wird u-PA exprimiert. Dieser Plasminogenaktivator wird in normalen intrathorakalen Gefäßen nicht exprimiert.

Apoptose ist Ausdruck einer Zellzyklus-Apokalypse, die sowohl physiologische als auch pathologische Umbauvorgänge in der Gefäßwand begleitet. Die Ursachen für Apoptose sind vielfältig, demnach gibt es viele verschiedene Gene und Genregulationsmuster, die einer Apoptose zugrundeliegen können [31]. Gefäßmuskelfellapoptose wurde vor allem in Restenosen beschrieben [4]. Konstruktives Gefäßremodeling ist der hauptsächliche Remodeling-Mechanismus nach Ballondilatation [32]. Die Beobachtung von vermehrter Apoptose in schrumpfenden Koronarläsionen könnte spekulieren lassen, daß diese Läsionen bereits abgeheilte rupturierte Plaques repräsentieren, also „spontane Restenosen“ darstellen.

Ein ganz anderes Beispiel für Apoptose als biologischer Mechanismus, der mit Remodeling assoziiert ist, stellen Aortendilatation, -ektasie und Aneurysma dar. Im Gegensatz zu intimaler Apoptose (Abb. 7) erscheinen hier apoptotische Gefäßmuskelfellen in Foci, entsprechend zystischen Medianekroseläsionen. Ob diese apoptotischen „Löcher“ genetisch determinierten klonalen Zellgruppen entsprechen, ist unbekannt. Ebenso wird die Verbindung zwischen Apoptose und Expression von Fibrillin und anderen Matrixproteinen zu definieren sein.

Literatur:

1. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *New Engl J Med* 1994; 330: 1431–7.
2. Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Klein KP. Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates. *J Am Med Assoc* 1994; 271: 289–94.

3. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316: 1371–5.
4. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995; 91: 2703–11.
5. Lang IM, Moser KM, Schleef RR. Elevated expression of urokinase-like plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 during the vascular remodeling associated with pulmonary thromboembolism. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 808–15.
6. Haarer SL, Emig LL, Keiser JA. Vascular remodeling in balloon injured rabbit iliac arteries. *Basic Research In Cardiology* 1998; 93: 108–15.
7. Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan Micropig. *Circulation* 1994; 89: 2816–21.
8. Kakuta T, Currier JW, Haudenschild CC, Ryan T, Faxon DP. Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation* 1994; 89: 2809–15.
9. Waksman R, Rodriguez Jc, Robinson KA, Cipolla GD, Crocker IR, Scott NA, King SB, Wilcox JN. Effect of intravascular irradiation on cell proliferation, apoptosis, and vascular remodeling after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 1997; 96: 1944–52.
10. Slomp J, Gittenberger de Groot AC, Glukhova MA, van Munsteren CJ, Kockx MM, Schwartz SM, Kotliansky VE. Differentiation, dedifferentiation, and apoptosis of smooth muscle cells during the development of the human ductus arteriosus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1003–9.
11. Rabinovitch M. Cell-extracellular matrix interactions in the ductus arteriosus and perinatal pulmonary circulation. *Semin Perinatol* 1996; 20: 531–41.
12. Freeston T, Turner RJ, Higman DJ, Lever MJ, Powell JT. Influence of hypercholesterolemia and adventitial inflammation on the development of aortic aneurysm in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 10–7.
13. Bonderman D, Gharehbaghi-Schnell E, Wollenek G, Maurer G, Baumgartner H, Lang IM. Mechanisms underlying aortic dilatation in congenital aortic valve malformation. *Circulation* 1999; 99: 2138–43.
14. Stenmark KR, Mecham RP. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 1997; 59: 89–144.
15. Gibbons GH. The pathophysiology of hypertension: the importance of angiotensin II in cardiovascular remodeling. *Am J Hypertension* 1998; 11: 1775–815.
16. Christ G, Seiffert D, Hufnagl P, Gessl A, Wojta J, Binder BR. Type 1 plasminogen activator inhibitor synthesis of endothelial cells is downregulated by smooth muscle cells. *Blood* 1993; 81: 1277–83.
17. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1992.
18. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–9.
19. Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, Usuki K, Takaku F, Risau W, Heldin CH. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 1989; 338: 557–62.
20. Edlund T, Tor N, Ranby M, Helen LO, Palm G, Holmgren E, Josephson S. Isolation of cDNA sequences coding for a part of human tissue plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 349–52.
21. Lang IM, Marsh JJ, Olman MA, Moser KM, Loskutoff DJ, Schleef RR. Expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in chronic pulmonary thromboemboli. *Circulation* 1994; 89: 2715–21.
22. Olman MA, Marsh JJ, Lang IM, Binder BR, Moser KM, Schleef RR. The endogenous fibrinolytic system in chronic large vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation* 1992; 86: 1241–8.
23. Loskutoff DJ, van Aken B, Seiffert D. Abnormalities in the fibrinolytic system of the vascular wall associated with atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748: 177–83.
24. Levin EG, Santell L, Osborn KG. The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J Cell Sci* 1997; 110: 139–48.
25. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 1993; 14: 133–51.
26. Wojta J, Hoover RL, Daniel TO. Vascular origin determines plasminogen activator expression in human endothelial cells. Renal endothelial cells produce large amounts of single chain urokinase type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1989; 264: 2846–52.
27. Schneiderman J, Bordin GM, Adar R, Smolinsky A, Seiffert D, Emgelberg I, Dilley RB, Thinnies T, Loskutoff DJ. Patterns of Expression of fibrinolytic genes and matrix metalloproteinase-9 in dissecting aortic aneurysms. *Am J Pathol* 1998; 152: 703–10.
28. Schneiderman J, Bordin GM, Engelberg I, Adar R, Seiffert D, Thinnies T, Bernstein EF, Dilley RB, Loskutoff DJ. Expression of fibrinolytic genes in atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. A possible mechanism for aneurysm expansion. *J Clin Invest* 1995; 96: 639–45.
29. Sawa H, Sobel BE, Fujii S. Potentiation by hypercholesterolemia of the induction of aortic intramural synthesis of plasminogen activator inhibitor type 1 by endothelial injury. *Circ Res* 1993; 73: 671–80.
30. Fujii S, Sawa H, Saffitz JE, Lucore CL, Sobel BE. Induction of endothelial cell expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 gene by thrombosis in vivo. *Circulation* 1992; 86: 2000–10.
31. Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodeling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 361–8.
32. Isner JM. Vascular remodeling. *Circulation* 1994; 89: 2937–40.

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

☒ Medizintechnik-Produkte



Neues CRT-D Implantat
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3
Labotect GmbH



InControl 1050
Labotect GmbH

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

☒ Bestellung e-Journal-Abo

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)