Aus dem Zentrum für Kardiologie – Kardiologie I
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Bedeutung der Protein Tyrosin Phosphatase 1B in glatten Gefäßmuskelzellen für die Neointimabildung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

David Velmeden
aus Gießen

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 06. Juli 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

Tabellenverzeichnis ..... **IX**

Abbildungsverzeichnis ..... **X**

1 Einleitung **1**

1.1 Thematische Einführung 1

1.2 Gegenstand und Ziel der Dissertation 3

2 Literaturdiskussion **4**

2.1 Gefäßfunktion und vaskuläre Erkrankungen 4

2.1.1 Epidemiologie vaskulärer Erkrankungen 4

2.1.2 Aufbau und Funktion der Gefäßwand 5

2.2 Atherosklerose 7

2.2.1 Pathophysiologie der Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit 8

2.2.2 Medikamentöse Therapie der Koronaren Herzkrankheit 10

2.2.3 Interventionelle Therapie der Koronaren Herzkrankheit 11

2.3 Restenose und Neointimabildung 11

2.3.1 Pathogenese der Restenose 12

2.3.2 Risikofaktoren für eine In-Stent-Restenose 15

2.3.3 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Neointimabildung 16

2.4 Protein Tyrosin Phosphatase 1B 19

2.4.1 Allgemeine Charakterisierung der PTP1B 20

2.4.2 Regulation der PTP1B-Aktivität 21

2.4.3 Mögliche Bedeutung der PTP1B in der vaskulären Wundheilung 22

2.5 Tiermodelle zur Untersuchung von Neointimabildung und Restenose 25

2.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit 27

3 Materialien **28**

3.1 Geräte 28

3.2 Software 30

3.3 Zubehör und Hilfsmittel 31
3.4 Verbrauchsmaterialien 32
3.5 Chemikalien und Reagenzien 34
3.6 Kits 36
3.7 Enzyme, Inhibitoren und Hormone 36
3.8 PCR, Umschreibung in cDNA 37
3.9 PCR Primer 38
3.10 Antikörper und Chromogene 39
3.11 Zelllinien und Zellkulturmedien 40
3.12 Reagenzien für die Zellkultur 40
3.13 Versuchstiere und Versuchstierhaltung 41

4 Methoden 43

4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen 43
4.1.1 Genehmigung der tierexperimentellen Untersuchungen 43
4.1.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung 43
4.1.3 Versuchsgruppen und Versuchsablauf 44
4.1.4 Das Cre-loxP-System 45
4.1.5 Generierung von SMMHC.Cre(+)PTP1B$^{flox/flox}$-Mäusen 46
4.1.6 Induzierung des zellspezifischen PTP1B-Knockouts 47
4.1.7 Genotypisierung 48
4.2 Anwendung des $FeCl_3$-Modells zur experimentellen Gefäßverletzung 51
4.2.1 Anästhesie 51
4.2.2 Durchführung des $FeCl_3$ Modells 52
4.2.3 Entnahme der Karotisarterien am Versuchsende 54
4.3 Gewebeaufbereitung 55
4.3.1 Einbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten 55
4.3.2 Einbettung und Anfertigung von Gefrierschnitten 57
4.4 Histologische Färbungen 58
4.4.1 Verhoeffs Elastica–Masson-Trichrom-Färbung (VES-MTC) 58
4.4.2 Picrosiriusrot zur Anfärbung von Kollagen 60
4.5 Immunhistochemische Färbungen 61
4.5.1 Prinzip immunhistochemischer Färbungen 61

4.5.2 Ablauf der immunhistochemischen Färbungen 61
4.5.3 Qualitätssicherung der Immunhistochemie 65
4.6 Immunfluoreszenz 66
4.7 Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen 67
4.7.1 Morphometrische Analyse der Neointima-Bildung 67
4.7.2 Quantitative Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen 70
4.8 *In-vitro*-Zellkultur-Untersuchungen 71
4.8.1 Herkunft der MOVAS 71
4.8.2 Auftauen und Kultivieren der Zellen 71
4.8.3 Splitten der Zellen 71
4.8.4 Bestimmung der Zellzahl 72
4.8.5 Versuchsaufbau und -ablauf 73
4.9 Untersuchung der mRNA-Expression 75
4.9.1 RNA-Isolation aus Zellen 75
4.9.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit 76
4.9.3 Umschreibung der RNA in cDNA 77
4.9.4 *Real-time* quantitative PCR 78
4.9.5 Quantifizierung nach ΔΔCt-Methode 80
4.9.6 Schmelzkurven-Analyse 80
4.10 Statistische Auswertung 82

5 Ergebnisse 83
5.1 PTP1B-Expression vor und nach $FeCl_3$-induzierter Gefäßverletzung 83
5.2 Bestätigung Knockouts von PTP1B in glatten Muskelzellen 85
5.3 Histologische Analysen 87
5.3.1 Morphometrische Auswertungen nach Gefäßverletzung 87
5.3.2 Bestimmung des Kollagenanteils 91
5.4 Untersuchung der Auswirkung von Tamoxifen auf den Phänotyp der Versuchstiere 94
5.5 Immunhistochemische Untersuchungen 97
5.5.1 Analyse der Zellproliferation mithilfe von PCNA 97
5.5.2 Nachweis des Glattmuskelzellmarkers SM Alpha-Actin 102
5.5.3 Immunhistochemischer Nachweis des Myofibroblastenmarkers PDGFR-β 105

5.5.4 Immunhistochemischer Nachweis des Perizytenmarkers NG2 108
5.5.5 Immunhistochemischer Nachweis des Makrophagenmarkers F4/80. 111
5.5.6 Immunhistochemischer Nachweis des Endothelzellmarkers CD31 ... 114
5.5.7 Immunhistochemischer Nachweis des BDNF Rezeptors TrkB 117
5.5.8 Immunhistochemischer Nachweis von BDNF 121
5.6 Untersuchungen an kultivierten murinen Glattmuskelzellen 123
5.6.1 qPCR..... 123

6 Diskussion 126
6.1 Einfluss der reduzierten glattmuskulären PTP1B-Expression auf das vaskuläre *Remodeling* 128
6.2 Einfluss der glattmuskulären PTP1B-Deletion auf die zelluläre Zusammensetzung der Gefäßwand nach Verletzung 131
6.3 Mögliche Bedeutung neuartiger Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren für die Neointimabildung: BDNF und TrkB 136
6.4 *In-vitro*-Versuche zur Modellierung der Prozesse einer Gefäßverletzung mithilfe der Zellkultur..... 137
6.5 Mechanismus des vaskulären Umbaus mit perivaskulärer Fibrose..... 140
6.6 Fazit und Limitationen der Arbeit 142

7 Zusammenfassung 146

8 Literaturverzeichnis 149

9 Anhang..... 165
9.1 Herstellung von Lösungen und Puffern..... 165
9.2 Immunhistochemische Färbeprotokolle 169
9.3 Einfluss des VSMC-spezifischen PTP1B-Knockouts auf das Gewicht der Versuchstiere..... 174

Danksagung..... 175

Tabellarischer Lebenslauf..... 176

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
ABC	Avidin-Biotin-Komplex (engl. *avidin-biotin complex*)
AdvSca1	*adventitial sca1-positive progenitor cells*
AEC	Aminoethylcarbazol
AG	Aktiengesellschaft
ANOVA	Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*)
Aq. dest.	doppelt destilliertes Wasser
Art.-Nr.	Artikel-Nummer
bFGF	Basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (*engl. Basic fibroblast growth factor*)
BMI	Body-Mass-Index
BMS	*bare metal stent*
bp	Basenpaar (engl. *base pair*)
BSA	Rinder Serum Albumin (engl. *bovine serum albumin*)
CD31	engl. *cluster of differentiation 31*
CH	Schweiz
cm^2	Quadratzentimeter
Cre	engl. *cyclization recombinase*
Ct	Schwellenzyklus (engl. *threshold cycle*)
DAB	3.3.-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	*drug-eluting stent*
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*)
EACTS	*European Association for Cardio-Thoracic Surgery*
ECS	*European Society of Cardiology*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. *ethylene diamine tetraacetic acid*)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (engl. *epidermal growth factor*)
ELK1	engl. *ETS-like-1 protein*

EPR	Endoplasmatisches Retikulum
ER	Östrogen Rezeptor
ERK	engl. *extracellular signal-regulated kinases*
Fab	Antigen-bindendes Fragment (engl. *fragment antigen-binding*)
Fc	kristallisierbares Fragment (engl. *fragment crystallizable*)
$FeCl_3$	Eisen(III)-Chlorid
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. *fibroblast growth factor*)
floxed	engl. *flanked by loxP*
G	Gauge
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl. *high-density lipoprotein*)
HIER	Hitze-induzierte Antigen-Demaskierung (engl. *heat induced epitope retrieval*)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HUVECs	humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (engl. *Human umbilical vein endothelial cells)*
IE	Internationale Einheiten
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin Gamma
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Inc.	Gesellschaft mit beschränkter Haftung (engl. *Incorporated*)
IR	Insulin-Rezeptor
ISR	In-Stent-Restenose
kg	Kilogramm
KLF4	*Krüppel-like factor 4*
KO	Knockout
LBD	Liganden-bindende Domäne
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (engl. *low-density lipoprotein*)
LLC	engl. *Limited Liability Company*
loxP	engl. *locus of crossover (x) in P1 bacteriophage*

Ltd.	engl. *limited*
mAB	monoklonaler Antikörper (engl. *monoclonal antibody*)
MAP	engl. *mitogen-activated protein*
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
MEK	Methylethylketon (2-Butanon)
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloprotease
MTC	Masson's Trichrom
NaCl	Natriumchlorid
NCEP	*National Cholesterol Education Program*
NDS	Normales Eselserum (engl. *normal donkey serum*)
NGS	Normales Ziegen Serum (engl. *normal goat serum)*
NIH	Nationale Gesundheitsinstitute (engl. *National Institutes of Health*)
NO	Stickstoffmonoxid (engl. *nitric oxide*)
Nr.	Nummer
NRS	Normales Kaninchen Serum (engl. *normal rabbit serum*)
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*)
PCNA	engl*. proliferating cell nuclear antigen*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*)
PDGF	engl. *platelet-derived growth factor*
PDGFR-β	engl. *platelet-derived growth factor receptor-beta*
PECAM-1	engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*
PP	Polypropylen
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
PTK	Protein Tyrosinkinase
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PTP1B	Protein Tyrosin Phosphatase 1B

qRT-PCR	engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*
rcf	relative Zentrifugalkraft (engl. *relative centrifugal force*)
RFU	engl. *relative fluorescence units*
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. *revolutions per minute*)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. *real-time polymerase chain reaction*
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean*)
SMA	engl. *smooth muscle alpha-actin*
SMC	glatte Muskelzelle (engl. *smooth muscle cell*)
STAT3	engl. *signal transducer and activator of transcription 3*
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGFβ	engl. *transforming growth factor-β*
TxA2	Thromboxan A2
U	Umrandung
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl. *United States of America*)
VCAM-1	engl. *vascular cell adhesion protein-1*
VEGF	engl. *vascular endothelial growth factor*
VEGFR	engl. *vascular endothelial growth factor receptor*
VES	Verhoeffs Elastica Färbung (engl. *Verhoeff's elastica stain*)
WT	Wildtyp
λ	Wellenlänge

Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von PTP1Bflox 49
Tabelle 4-2: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von SMMHC.CreER^{T2} 50
Tabelle 4-3: PCR-Programm für die Genotypisierung von PTP1Bflox 50
Tabelle 4-4: PCR-Programm für die Genotypisierung von SMMHC.CreER^{T2} 50
Tabelle 4-5: Einbettung von Paraffinschnitten 55
Tabelle 4-6: Protokoll zum Entparaffinieren und Wässern von Paraffinschnitten 58
Tabelle 4-7: Verhoeffs Elastica-Masson-Trichrom-Färbung 59
Tabelle 4-8: Picrosiriusrot zur Anfärbung von Kollagen 60
Tabelle 4-9: Entwässern und Eindecken immunhistochemischer Schnitte bei Verwendung des Chromogens DAB 63
Tabelle 4-10: spezifische Färbungen zum immunhistochemischen Nachweis 64
Tabelle 4-11: spezifische Antikörper Immunfluoreszenz 66
Tabelle 4-12: Berechnungen der morphometrischen Auswertungsparameter 68
Tabelle 4-13: Splitten und Aussäen der Zellen 72
Tabelle 4-14: Stimulanzien des *In-vitro*-Experiments 74
Tabelle 4-15: Pipettierschema für die cDNA-Umschreibung 77
Tabelle 4-16: Pipettierschema der qPCR 78
Tabelle 4-17: Ablauf der qPCR 78
Tabelle 9-1: Färbeprotokoll zum Nachweis von BDNF 169
Tabelle 9-2: Färbeprotokoll zum Nachweis von F4/80 169
Tabelle 9-3: Färbeprotokoll zum Nachweis von NG2 170
Tabelle 9-4: Färbeprotokoll zum Nachweis von PCNA 170
Tabelle 9-5: Färbeprotokoll zum Nachweis von PDFGR-β 171
Tabelle 9-6: Färbeprotokoll zum Nachweis von PECAM-1 (CD31) 171
Tabelle 9-7: Färbeprotokoll zum Nachweis von PTP1B 172
Tabelle 9-8: Färbeprotokoll zum Nachweis von SM Alpha-Actin 172
Tabelle 9-9: Färbeprotokoll zum Nachweis von TrkB 173

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes 6
Abbildung 4-1: Zeitlicher Ablauf des Versuchs..... 45
Abbildung 4-2: Schema des Cre-loxP-Systems zur Generierung von zellspezifischen Knockout-Mäusen..... 46
Abbildung 4-3: Generierung von Mäusen mit VSMC-spezifischem PTP1B-Knockout..... 47
Abbildung 4-4: Mausmodell der $FeCl_3$-induzierten Gefäßverletzung der *Arteria carotis communis sinister* 53
Abbildung 4-5: Schematische Darstellung der angefertigten Serienschnitte. 56
Abbildung 4-6: Schematische Darstellung der morphometrischen Auswertung. 67
Abbildung 4-7: Morphometrische Auswertung mit ImagePro Plus 7.0. 69
Abbildung 4-8: Detailansicht der morphometrischen Auswertung..... 69
Abbildung 4-9: Belegung der Six-Well-Plates beim *In-vitro*-Stimulationsversuch 74
Abbildung 4-10: Amplifizierungskurve qPCR. 79
Abbildung 4-11: Abbildung einer charakteristischen Schmelzkurven-Analyse..... 81
Abbildung 5-1: PTP1B-Expression im zeitlichen Verlauf nach Gefäßverletzung. 84
Abbildung 5-2: Nachweis des VSMC-spezifischen PTP1B-Knockouts. 86
Abbildung 5-3: Ergebnisse der Morphometrischen Auswertung 1. 89
Abbildung 5-4: Ergebnisse der morphometrischen Auswertung 2. 90
Abbildung 5-5: Statistische Auswertung des Kollagennachweises durch Picrosiriusrot-Färbung 1. 92
Abbildung 5-6: Statistische Auswertung des Kollagennachweises durch Picrosiriusrot-Färbung 2. 93
Abbildung 5-7: Morphometrische Analyse der beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe 96
Abbildung 5-8: Statistische Auswertung der Zellproliferation mithilfe der PCNA-Immunhistochemie 1..... 98
Abbildung 5-9: Statistische Auswertung der Zellproliferation mithilfe der PCNA-Immunhistochemie 2..... 99
Abbildung 5-10: Statistische Auswertung der Zellproliferation mithilfe der PCNA-Immunhistochemie 3..... 101
Abbildung 5-11: Repräsentative Bilder der SMA-Immunhistochemie Paraffin-fixierter Schnitte der vaskulären Läsion. 102
Abbildung 5-12: Quantitative Analyse der Verteilung von SM Alpha-Actin. 104
Abbildung 5-13: Quantitative Analyse der PDGFR-β Expression. 106
Abbildung 5-14: Quantitative Analyse der PDGFR-β-positiven Zellen. 107

Abbildung 5-15: Statistische Auswertung der NG2-Expression 1. 109
Abbildung 5-16: Statistische Auswertung der NG2-Expression 2. 110
Abbildung 5-17: Statistische Auswertung der Verteilung von F4/80 1. 112
Abbildung 5-18: Statistische Auswertung der Zahl F4/80-positiver Zellen 2. 113
Abbildung 5-19: Statistische Auswertung der CD31-Expression. 115
Abbildung 5-20: Repräsentative Bilder der CD31-Immunhistochemie Paraffin-fixierter Schnitte der vaskulären Läsion. 116
Abbildung 5-21: Statistische Auswertung TrkB 1. 118
Abbildung 5-22: Statistische Auswertung TrkB 2. 119
Abbildung 5-23: Statistische Auswertung der BDNFExpression. 121
Abbildung 5-24: Statistische Auswertung der BDNF-Expression in unverletzten Karotisarterien. 122
Abbildung 5-25: Ergebnisse qPCR MOVAS 1 123
Abbildung 5-26: Ergebnisse qPCR MOVAS 2 125
Abbildung 9-1: Körpergewicht der Versuchstiere 174

1 Einleitung

1.1 Thematische Einführung

Nach wie vor stellen kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit die häufigste Todesursache dar. Zwar ist zwischen den Jahren 1990 und 2013 die Inzidenz der Ischämischen Herzkrankheit (ICD) und die des Schlaganfalls stark gesunken, jedoch bleibt die ICD weiterhin der Hauptgrund für eine vorzeitige Mortalität im Erwachsenenalter (1). Vor allem in westlichen Industrienationen bleibt die Sterblichkeitsrate trotz guter medizinischer Infrastruktur weiterhin hoch.

Als Hauptrisikofaktoren für eine Koronare Herzkrankheit (KHK) wurden Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Nikotinkonsum, Bewegungsmangel, Übergewicht, eine positive Familienanamnese und ein erhöhtes Lebensalter identifiziert (2). Die aktuell angewandten Therapieverfahren stellen vor allem eine Behandlung der einzelnen Risikofaktoren bzw. eine symptomatische Therapie der Folgen der KHK dar. Als direkte Behandlungsmöglichkeiten haben sich die chirurgische Bypass-Operation sowie die interventionelle perkutane transluminale Koronarangioplastie (engl. *percutaneous transluminal coronary angioplasty,* PTCA) etabliert. So hat man heute die Möglichkeit, betroffene Areale durch interventionelle Dilatation und Stent-Implantation zu revaskularisieren. Trotz des stetigen Fortschritts auf dem Gebiet der interventionellen Therapie bleibt die postinterventionelle Restenose oder In-Stent-Stenose eine weit verbreitete Komplikation (3, 4). Vor allem Patienten mit den typischen Risikofaktoren einer KHK, wie zum Beispiel Diabetes mellitus oder eine vorhandene Dyslipidämie, zeigen ein erhöhtes Restenose-Risiko (5, 6).

Die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in Antwort auf Wachstumsfaktoren spielt eine Schlüsselrolle in vaskulären Umbau- und Wundheilungsprozessen. In überschießender Form treten diese Vorgänge auch bei Krankheitsprozessen, wie zum Beispiel der Bildung von atherosklerotischen Läsionen oder Restenosen nach einer perkutanen Koronarintervention mit Stent-Implantation auf. Als endogener Kontrollmechanismus zur Verhinderung überschießender Reaktion auf die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren dienen unter anderem Tyrosin Phosphatasen. Diese entfalten durch die Dephosphorylierung von Tyrosinresten ihre Wirkung als „molekulare Bremsen“ und regulieren auf diesem Weg aktivierte Signalkaskaden verschiedener Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Das Gleichgewicht zwischen Rezeptoraktivierung und -deaktivierung durch Tyrosinphosphorylierung bzw. -dephosphorylierung spielt eine kritische Rolle: So trägt eine Überexpression von Phosphatasen zur Desensibilisierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren, wie beispielsweise im Rahmen der Leptin- oder Insulinresistenz bei (7, 8), während das Fehlen oder die Inhibition von Phosphatasen andererseits in einer Rezeptorüberstimulation und einer vorzeitigen Seneszenz münden kann (9, 10).

Eine der wichtigsten Protein Tyrosin Phosphatasen, welche auch in vaskulären Zellen und glatten Muskelzellen vorkommt, ist die ubiquitär exprimierte Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B) (11). In einer Studie an Ratten wurde bereits eine erhöhte PTP1B-Expression in proliferierenden und migrierenden glatten Muskelzellen der Intima und Media nach einem Ballonkatheter-induziertem Gefäßschaden gezeigt (12). Darüber hinaus konnte in weiteren Tiermodellen eine erhöhte PTP1B-Expression in Skelettmuskel, Fettgewebe und Gehirn bei metabolischen Erkrankungen wie Übergewicht und Diabetes mellitus nachgewiesen werden (13). Diese Vorbefunde lassen vermuten, dass Faktoren, die das Restenoserisiko erhöhen, mit einer erhöhten PTP1B-Expression korrelieren. Es stellt sich daher die Frage, ob die erhöhte PTP1B-Expression im Rahmen eines adaptiven Schutzmechanismus stattfindet oder ein kausaler Bestandteil der zugrundeliegenden Pathologie ist.

Die genaue Funktion von PTP1B während vaskulärer Umbauprozesse und der zugrundeliegende Mechanismus, vor allem in glatten Gefäßmuskelzellen, sind jedoch bisher noch unvollständig geklärt.

1.2 Gegenstand und Ziel der Dissertation

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktion von PTP1B in glatten Gefäßmuskelzellen (engl. *vascular smooth muscle cells*, VSMC) im Rahmen der Wundheilung nach einer Gefäßverletzung zu untersuchen. Als Versuchstiere dienten männliche Mäuse mit glattmuskelspezifischer, Tamoxifen induzierbarer, genetischer Deletion von PTP1B. Männliche Wurfgeschwister mit einem identischen genetischen Hintergrund wurden in eine Kontroll- und eine Versuchsgruppe aufgeteilt, wobei die Versuchsgruppe zur Induktion des Knockouts über einen Zeitraum von sechs Wochen Tamoxifen-haltiges Futter erhielt. Die Kontrollgruppe wurde hingegen mit dem Standardfutter für Nagetiere ernährt. Im Anschluss erfolgte eine Gefäßverletzung der linken *Arteria carotis* unter Verwendung des $FeCl_3$-Modells (14). Nach 21 Tagen wurden die verletzte sowie die kontralaterale, unverletzte Karotisarterie zur histologischen, morphometrischen und immunhistologischen Analyse entnommen.

Zur Unterstützung der Befunde im Mausmodell und weiterer mechanistischer Untersuchungen erfolgten darüber hinaus Versuche an murinen aortalen glatten Muskelzellen (MOVAS). Diese wurden mit einem spezifischen, zell-permeablen PTP1B-Inhibitor behandelt bzw. mit spezifischen Agonisten stimuliert, um verschiedene Prozesse im Rahmen des Gefäßverletzungsprozesses, wie Hypoxie, oxidativen Stress und eine Gefäßkonstriktion *in vitro* zu modellieren. Im Anschluss wurde die RNA isoliert und die mRNA-Expression verschiedener Marker von Interesse mittels quantitativer *real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) untersucht.

2 Literaturdiskussion

2.1 Gefäßfunktion und vaskuläre Erkrankungen

Eine intakte Gefäßfunktion ist ausschlaggebend für einen funktionierenden Organismus. Viele Wohlstandserkrankungen wie Diabetes mellitus, KHK oder Schlaganfälle besitzen eine mikro- und eine makrovaskuläre Krankheitskomponente. Aufgrund verschiedener Risikofaktoren, die nicht selten mit einem westlichen Lebensstil verbunden sind, kommt es zum Auftreten der Atherosklerose mit konsekutiver Einengung des Gefäßlumens (Stenose). Sind die Koronararterien von einer Atherosklerose und Stenose betroffen, spricht man von einer KHK. Sie äußert sich in einer mangelhaften Sauerstoffversorgung des Herzmuskels. Bei totalem oder subtotalem Verschluss eines Herzkranzgefäßes kommt es zum Myokardinfarkt mit ischämischem Untergang von Herzmuskelgewebe. Wird dieses Ereignis überlebt, kann sich durch Narbenbildung eine chronische Herzmuskelschwäche entwickeln, welche als Ischämische Herzkrankheit bezeichnet wird (IHD, engl. *ischemic heart disease*). Im folgenden Kapitel werden die normale Gefäßfunktion sowie die Pathologie der Atherosklerose näher erläutert.

2.1.1 Epidemiologie vaskulärer Erkrankungen

Die IHD oder KHK ist der Hauptgrund für durch vorzeitigen Tod verlorene Lebensjahre (1). Dabei ist die Atherosklerose die am häufigsten auftretende vaskuläre Erkrankung weltweit (15). Neben der erhöhten Mortalität sind Patienten häufig in ihrer körperlichen Leistungsfähigkeit eingeschränkt und leiden an Folgeerkrankungen wie Herzrhythmusstörungen oder Herzinsuffizienz. Zudem ist das Auftreten des Myokardinfarkts oder des plötzlichen Herztods begünstigt (16).

Auch in Deutschland bilden Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems mit 38,5% der Gesamttodesursachen die häufigste Todesursache. In absoluten Zahlen waren es im Jahr 2015 356.616 Todesfälle, wobei 128.230 Fälle auf die Ischämische Herzkrankheit und 50.948 Todesfälle auf akute und rezidivierende Myokardinfarkte zurückzuführen waren (17). Diese Zahlen zeigen, dass nach wie vor die meisten Todesfälle eine Folge von Gefäßschäden und Stenosen sind.

2.1.2 Aufbau und Funktion der Gefäßwand

Grundsätzlich lässt sich das Gefäßsystem in ein Austausch- und in Transportsystem einteilen. Das Transportsystem besteht aus den Arterien und Venen und dient der Speicherung des Blutvolumens und der Blutdruckregulierung. Das Austauschsystem besteht aus den kleinen Blutgefäßen, also Kapillaren und postkapilläre Venolen und ist durch einen insgesamt großen Querschnitt, eine dünne Wandschicht und langsame Fließgeschwindigkeiten charakterisiert. So bietet es optimale Bedingungen für den Stoffaustausch (18).

Der Aufbau von Blutgefäßen gliedert sich in drei Schichten. Die innerste Schicht ist die *Tunica intima* („Intima“). Danach folgt die *Tunica media* („Media“), die wiederrum von der *Tunica adventitia* („Adventitia“) umgeben ist. Die einzelnen Schichten können wiederum weiter unterteilt werden (siehe **Abbildung 2-1**).

In Arterien ist die glattmuskuläre *Tunica media* stärker ausgeprägt, wohingegen Venen eine dünne Media und ein größeres Lumen aufweisen.

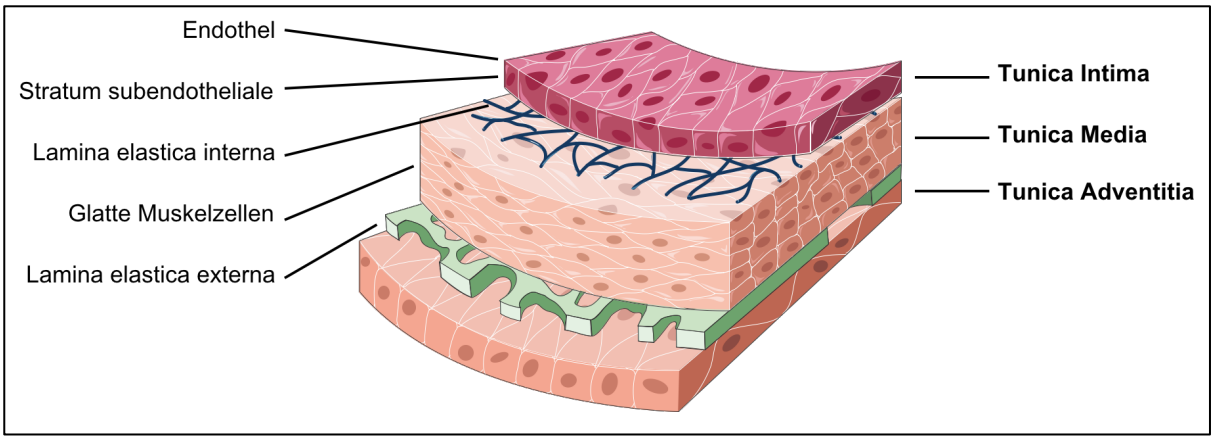

Abbildung 2-1: Aufbau eines arteriellen Blutgefäßes
Modifizierte Darstellung erstellt mithilfe der *Powerpoint image bank* von *Servier Medical Art*.

Die Intima gliedert sich in das lumenauskleidende Endothel, das *Stratum subendotheliale* und die *Membrana elastica interna* (engl. *internal elastic lamina*, IEL). Das Endothel dient vor allem dem Stoffaustausch und stellt eine Diffusionsbarriere dar. Des Weiteren reguliert es die Zelladhäsion, Blutgerinnung und, in Kooperation mit Glattmuskelzellen in der Media, die Gefäßweite (19, 20). Die Zelladhäsion wird durch ein gesundes, funktionierendes Endothel weitestgehend verhindert, nach Aktivierung kann jedoch die Adhäsion von Leukozyten oder Thrombozyten durch Veränderungen in der Expression spezifischer Rezeptoren oder Liganden verstärkt sein. Das gesunde Endothel hemmt die Thrombozytenaggregation durch Prostacyclinsekretion (21), wohingegen aktiviertes oder verletztes Endothel diese durch die Sekretion des von-Willebrand-Faktors (vWF) fördert. Zudem kann es mittels vasoaktiver Substanzen, die von der Media erzeugte, Wandspannung beeinflussen. So führt Stickstoff-Monoxid (NO) zu einer Vasodilatation, wohingegen Endothelin vasokonstriktorisch wirkt (22-24).

Als Umkleidung des Endothels dient das *Stratum subendotheliale*, eine Extrazellulärmatrix aus verschiedenen Proteoglykanen und Mikrofibrillen. Im Zusammenspiel mit dem vom Endothel sezernierten vWF initiiert es die primäre Hämostase. Die äußerste Schicht der Intima ist die *Membrana elastica interna*, die vor allem aus elastischen Fasern besteht.

Die *Tunica media* besteht aus einer Schicht glatter Muskelzellen und wird von der *Membrana elastica externa* (engl. *external elastic lamina*, EEL) nach außen hin begrenzt. Sie reguliert die Lumenweite und damit den Gefäßwiderstand.

Die äußerste Schicht eines Blutgefäßes ist die Adventitia. Sie ist ein bindegewebiger Zusammenschluss aus elastischen und kollagenen Fasern und führt gefäßeigene Nerven sowie Lymph- und Blutgefäße. Neben glatten Muskelzellen enthält die Adventitia Myofibroblasten, Perizyten und mesenchymale Stamm- oder Vorläuferzellen. Sie verankert das Gefäß in seiner Umgebung.

2.2 Atherosklerose

Stenosen von Blutgefäßen treten bei einer Reihe von Erkrankungen auf. Das bekannteste Beispiel ist die KHK, bei der es zu atherosklerotischen Prozessen im Bereich der Koronararterien kommt. Dabei handelt es sich um einen chronischen Prozess. Im Verlauf der Erkrankung, die zu Beginn meist asymptomatisch ist, kommt es aufgrund mangelnder Sauerstoffversorgung des Herzmuskels zu einer Abnahme der Leistungsfähigkeit. Daneben treten Ischämieschmerzen in Form einer Angina pectoris auf. Im Endstadium kann sich eine Herzinsuffizienz manifestieren.

Die akute Verlaufsform der Koronarstenose mit vollständigem oder subtotalem Verschluss ist der Myokardinfarkt. Zu der Mortalität eines akuten Herzinfarkts in Deutschland gibt es keine einheitlichen Zahlen, jedoch wurde 2008 eine Studie publiziert, die anhand von Versicherungsdaten AOK-Versicherter im Zeitraum von 2004 bis 2005 die Mortalität einzelner Patientensubgruppen untersuchte. Daraus ergaben sich eine Mortalität während des Krankenhausaufenthalts von 13,9 % und eine 1-Jahres-Mortalität von insgesamt 28,1 % (25). Die Autoren räumen jedoch ein, dass es sich bei dem Patientenkollektiv um insgesamt ältere Menschen mit mehr Vorerkrankungen im Vergleich zur Gesamtbevölkerung handeln könne. Des Weiteren fand keine Betrachtung der prähospitalen Mortalität statt. Amann et al. konnten anhand von Daten des MONICA/KORA Herzinfarktregisters für Patienten im Alter von 75 bis 84 Jahren eine prähospitale Mortalität von 38,8 % und eine 24-Stundenmortalität der hospitalisierten Patienten von 32 % feststellen. Daraus ergibt sich eine Mortalität von ca. 60% innerhalb der ersten 24 Stunden für das untersuchte Patientenkollektiv (26).

Anhand dieser Zahlen wird klar, dass der Myokardinfarkt trotz moderner Behandlungsmöglichkeiten weiterhin häufig tödlich verläuft.

Laut der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ beträgt die Lebenszeitprävalenz für das Erleiden eines Herzinfarkts in der Altersgruppe von 40 bis 79 Jahren 4,7 %. Dabei ist die Erkrankungsrate bei Männern mit 7 % fast dreimal so hoch wie die von Frauen mit 2,5 % (27). In der gleichen Alterskohorte liegt die Lebenszeitprävalenz für eine KHK insgesamt bei 9,3 %. Männer zeigen auch hier mit 12,3 % eine deutlich höhere Prävalenz als Frauen mit 6,4 %. Mit steigendem Lebensalter steigt auch die Prävalenz (27).

2.2.1 Pathophysiologie der Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit

Zwei der Hauptgründe für die Entwicklung einer Atherosklerose sind die Hypercholesterinämie und Dyslipidämie. Dabei kommt es zu erhöhten Cholesterin- und Triglyzeridwerten im Blut. Vor allem das *Low-density Lipoprotein* Cholesterin (Lipoprotein niederer Dichte, LDL) ist dabei erhöht, wohingegen das *High-density Lipoprotein* Cholesterin (Lipoprotein höherer Dichte, HDL) häufig erniedrigt ist. Vereinfacht haben beide Lipoproteine gegensätzliche Funktionen. So ist die Funktion von LDL, Cholesterin über LDL-Rezeptoren im Zielgewebe einzubauen, wohingegen HDL Cholesterin aus dem Gewebe aufnimmt und zur Leber transportiert, wo es in den hepatobiliären Kreislauf gelangt und augeschieden wird.

Erhöhte LDL-Plasmaspiegel führen zu einer erhöhten Endothelpermeabilität. So kommt es dazu, dass sich LDL-Cholesterin in der Gefäßwand ablagern kann. Das Endothel exprimiert das *vascular cell adhesion molecule*-1 (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1, VCAM-1) und verschiedene Selektine. Darüber lagern sich Monozyten an das Endothel an und wandern durch Diapedese in die Media ein. Dort wandeln sie sich in Makrophagen um und werden nach der Aufnahme von Triglyzeriden oder Cholesterin zu Schaumzellen. Es erfolgt die Oxidation von LDL-Partikeln, die so zu einer verstärkten Chemotaxis von Muskelzellen und Immunzellen führt. So kommt es zur vermehrten Anlagerung von Cholesterin durch die Expression von Scavenger-Rezeptoren der Gruppen A und B1, CD36 oder CD68 (28). Als Folge davon kommt es zu Gefäßwandveränderungen, welche in Atherosklerose und mit

zunehmendem Größenwachstum in einer Gefäßeinengung (Stenose) münden können.

Durch die Einwanderung von glatten Muskelzellen (engl. *smooth muscle cells,* SMC) aus der *Tunica media* entwickelt sich eine Intimaverdickung. Es bilden sich streifige, fettreiche Gewebeveränderungen, sog. *fatty streaks*, die aus einer Mischung von Schaumzellen, glatten Muskelzellen und Bindegewebe bestehen. Im weiteren Verlauf kommt es zur pathologischen Intimaverdickung mit beginnender Stenose. Hierbei kommt es zur schichtartigen Akkumulation von glatten Muskelzellen, unter denen sich lipidhaltige Infiltrate bilden. Diese Infiltrate werden zu Fibroatheromen, die einen fetthaltigen, nekrotischen azellulären Kern besitzen, der von einer Matrix aus glatten Muskelzellen, Proteoglykanen und Kollagen bedeckt ist. Daraus entwickeln sich oftmals instabile Plaques, deren Kern aus prothrombotischem Material nur von einer dünnen Kollagenschicht mit wenigen glatten Muskelzellen umgeben ist. Hinzu kommen Einblutungen (Hämorrhagien), Kalzifizierungen sowie eine vermehrte Immunzelleinwanderung in die Adventitia und Gefäßeinsprossungen. In Folge dessen nimmt die Stenose des betroffenen Gefäßes zu und geht im Falle einer Koronararterie und einem Ungleichgewicht von Sauerstoffbedarf und -angebot mit ischämietypischen Symptomen wie Angina pectoris einher.

Prozesse wie die Immunzellaktivierung mit subsequenter Inflammation führen zu Umbauprozessen der Gefäße. Daran sind vor allem Monozyten, Makrophagen und T-Zellen beteiligt. Inflammatorische Zytokine rekrutieren und aktivieren weitere Immunzellen, aber auch mesenchymale Zellen, wodurch die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen angeregt wird und die Extrazellulärmatrixproduktion gesteigert wird. Daneben spielt auch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren eine Rolle im Rahmen der Umbauprozesse.

Zudem stellen atherosklerotische Läsionen jeder Art ein Risiko für thrombotische Gefäßverschlüsse und damit einhergehende Infarkte dar. Der Hauptursprung von Koronarthromben sind mit 55-65 % Plaquerupturen, gefolgt von Plaqueerosionen (*acute coronary syndrome with intact fibrous cap*, IFC-ACS) mit 30-35 % und in 2-7 % der Fälle kalzifizierten Knoten (18).

Kommt es zur Ruptur von vulnerablen Plaques, wird der prothrombogene Inhalt freigesetzt und es kommt zur Aktivierung der Blutgerinnung mit konsekutivem vollständigem oder partiellem Gefäßverschluss.

2.2.2 Medikamentöse Therapie der Koronaren Herzkrankheit

Die medikamentöse Therapie einer stabilen KHK ist immer ein multimodales Konzept mit verschiedenen Wirkstoffgruppen. Zur Behandlung der zugrundeliegenden Dyslipidämie werden in der Regel mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A), sogenannten Statine verwendet. Diese haben sich im klinischen Alltag als Mittel der Wahl etabliert und sind fester Bestandteil der KHK-Therapie (29). Hinzu kommt der Wirkstoff Ezetimib, ein Cholesterinaufnahmehemmer, der bereits die Aufnahme von Cholesterin aus dem Darm hemmt (30). Ezetimib kann zur Wirkungsverstärkung mit Statinen kombiniert werden. Eine neue vielversprechende Medikamentengruppe sind die PCSK-9-Inhibitoren (Proproteinkonvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 Inhibitoren). Diese verhindern den Abbau von LDL-Rezeptoren auf Leberzellen und bewirken somit einen vermehrten LDL-Abbau und damit geringere Plasmaspiegel. Vorerst sind sie jedoch nur bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie oder bei Patienten, bei denen die Kombination aus Statinen und Ezetemib nur unzureichend wirkt, zugelassen und mit hohen Kosten verbunden (30).

Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure (ASS) oder Clopidogrel werden für die KHK-Therapie empfohlen, da sie die Inzidenz tödlicher Myokardinfarkte senken (29)

Beta-Blocker dienen der Senkung der Herzfrequenz. Damit sollen der kardiale Sauerstoffverbrauch reduziert und die Diastolendauer, in der die Koronardurchblutung stattfindet, verlängert werden.

Als weitere Medikamentengruppe werden ACE-Hemmer (engl. *Angiotensin Converting Enzyme*; Angiotensin konvertierendes Enzym) und AT1-Rezeptorantagonisten (Angiotensin-1-Rezeptorantagonisten) zur Blutdrucksenkung verwendet. Dadurch wird die hämodynamische Endothelbelastung reduziert. Außerdem wirken sie dem kardialen *Remodeling* entgegen, dass bei fortgeschrittener KHK durch die Myokardischämie ausgelöst wird.

Als weiterer Therapiebaustein dienen Aldosteronantagonisten wie Spironolacton. Sie wirken sich positiv auf eine eventuell bereits bestehende linksventrikuläre Insuffizienz aus und senken die Mortalität bei Patienten mit ST-Streckenhebungs-Myokardinfarkt (engl. *ST-segment elevation myocardial infarction*, STEMI) (31).

Zur symptomatischen Therapie werden zudem Nitrate, die durch NO-Freisetzung die Koronargefäße weiten und damit die Myokardperfusion kurzzeitig verbessern, eingesetzt. So können akute Angina pectoris Anfälle durchbrochen und die Anfallsfrequenz und –schwere reduziert werden.

Die vorhandenen Wirkstoffe senken zum einen den kardialen Sauerstoffverbrauch und verbessern das O_2-Angebot. Zudem wird das vaskuläre *Remodeling* gebremst, indem die Risikofaktoren Hypercholesterinämie und Dyslipidämie behandelt werden.

2.2.3 Interventionelle Therapie der Koronaren Herzkrankheit

Zusätzlich zu den oben genannten medikamentösen Therapieoptionen können koronare Stenosen im Herzkatheterlabor durch eine Ballondilatation geweitet und mithilfe einer Gefäßstütze, einem sog. Stent, dauerhaft offengehalten werden. Im Laufe der Jahre wurden die interventionellen Behandlungstechniken stetig weiterentwickelt. Die Entwicklungen zielten vor allem darauf ab, die Hauptkomplikation in Form von In-Stent-Stenosen zu reduzieren. Hierbei bildet sich eine Neointima, die über den Stent wächst und so eine erneute Stenose verursacht.

Zu Beginn der interventionellen Therapie der KHK erfolgte eine einfache Dilatation des betroffenen Gefäßes mithilfe eines Ballonkatheters. Als nächste Weiterentwicklung kamen Metallgefäßstützen (engl. *Bare Metal Stents;* BMS) zum Einsatz, wodurch das Risiko für eine In-Stent-Stenose auf 17-41 % reduziert werden konnte (4). Aktuell werden sog. *Drug Eluting Stents* (DES), also mit antiproliferativ wirkenden Substanzen wie Sirolismus beschichtete Stents, verwendet.

Zudem können bei Patienten mit stattgehabter In-Stent-Stenose mit antiproliferativ wirkenden Stoffen beschichtete Ballons (engl. *drug coated balloons*; DCB) zur Aufweitung der Gefäße benutzt werden. Laut der Leitlinie „Myokardiale Revaskularisierung“ der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (*European Society of Cardiology*, ESC) und der Europäischen Vereinigung für Vereinigung für Herz-Thorax-Chirurgie (*European Association for Cardio-Thoracic Surgery,* EACTS) von

2018 sind diese den einfachen Ballonkathetern in diesem Anwendungsfall überlegen (32). Dennoch kommt es in der Gesamtheit der Patienten mit DES in <10 % (33, 34) der Fälle zu Restenosen (4).

2.3 Restenose und Neointimabildung

Eine Restenose ist definiert als erneute Gefäßverengung nach erfolgter PCI mit oder ohne Implantation eines Stents (4) und stellt nach wie vor eine schwerwiegende Komplikation der interventionellen Therapie von Stenosen dar. Die Gründe für die Entwicklung einer Restenose sind vielfältig. Man kann sie in vier verschiedene Entitäten unterteilen: *Elastic Recoil* (elastisches Zurückspringen), *Vascular Remodeling* (vaskuläre Umbauprozesse, VR), Neointimahyperplasie und Neoatherosklerose. In den folgenden Abschnitten wird auf die Pathogenese, die Risikofaktoren und Tiermodelle der Restenose bzw. Neointimabildung eingegangen.

2.3.1 Pathogenese der Restenose

Je nach Art der Intervention unterscheidet sich die Pathogenese der Restenose, jedoch ist das Endergebnis immer ein erneut verengtes Gefäß. Im Falle einer Intervention ohne Stent kommt es durch die elastischen Rückstellkräfte des Gefäßes zu einer erneuten Verengung. Diesen Prozess bezeichnet man als *Elastic Recoil*. Die elastischen Rückstellkräfte sind auf die *Laminae elastica externa* und *interna* zurückzuführen (4) und treten bereits Sekunden bis Minuten nach Deflation des Ballonkathters auf.

Durch die Ballondilatation kommt es zur Verletzung mehrerer Gefäßschichten. Das *Vascular remodeling* ist die Reaktion von Media und Adventitia auf diese Verletzung. Diese beiden Mechanismen der Restenose können erfolgreich durch *Stenting* verhindert oder reduziert werden und haben daher heute nur noch einen geringen Stellenwert.

Durch das *Stenting* entsteht eine exogen herbeigeführte Läsion mit einhergehender Endothelverletzung oder -dysfunktion. Vergleichbare Läsionen treten im klinischen

Alltag im Zusammenhang mit Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Atherosklerose auf.

Nach Stentimplantation kommt es zur Reendothelialisierung, einem Prozess, bei dem eine neue Endothelschicht über den Stent wächst. Sie ist ein reaktiver physiologischer und gewollter Prozess, der jedoch auch in einem überschießenden Wachstum, also einer Neointimahyperplasie münden kann. Nach Implantation des Stents kommt es zu einer inflammatorisch und immunologisch bestimmten Akutreaktion. Durch das Dilatieren beim *Stenting* kommt es zu Rupturen in der IEL und zur Dissektion der Media. Hinzu kommt eine Verletzung des Endothels sowie eine Ablagerung von Fibrin und Thrombozyten auf der Stentoberfläche. Endothelzellen, Glatte Muskelzellen, Leukozyten und Thrombozyten setzen Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Mitogene frei. Mithilfe von Integrin-Adhäsionsmolekülen erfolgt die Einwanderung von Leukozyten entlang des Zytokin-Konzentrationsgradienten (4).

Bei BMS wandelt sich die Akutreaktion im Laufe der Zeit zu einem chronisch-inflammatorischen Prozess, der von Makrophagen, Riesenzellen und Lymphozyten bestimmt wird. Deren Zytokine triggern die Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media (35). Bereits nach drei bis sieben Tagen sind glatte Muskelzellen auf der Stentoberfläche nachzuweisen (36). Zur vollständigen Reendothelialisierung wird eine intakte extrazelluläre und zelluläre Matrix benötigt. Erst wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, kann es zur vollständigen Gefäßheilung kommen. Die Neointima besteht vor allem aus glatten Gefäßmuskelzellen und einer proteoglykanreichen Matrix und ist zell- und gewebereich (35).

Bei der Verwendung von DES läuft die Akutreaktion in ähnlicher Weise ab, jedoch verbleibt die Fibrinschicht auf der Oberfläche der beschichteten Stents für Monate und nicht nur für wenige Tage wie bei BMS. Dadurch ist die Stentoberfläche deutlich länger exponiert und stellt einen prothrombogenen Risikofaktor dar (37). Die verzögerte Reendothelialisierung an sich führt zu einer kontinuierlichen Fibrinablagerung und Plättchenaktivierung. Damit stellt sie möglicherweise eine Ursache für eine fortwährende Zytokinfreisetzung und einer damit einhergehenden Neointimahyperplasie dar (38). Die bei DES gebildete Neointima ist im Vergleich zu BMS zellarm und besteht hauptsächlich aus einer proteoglykanreichen Matrix. Dieses Ergebnis ist der antiproliferativ und antimigratorisch wirkenden Beschichtung

geschuldet (35). Des Weiteren wurde für das Polymergerüst der Stents auch nach vollständiger Abgabe der Wirkstoffe ein proinflammatorischer Effekt nachgewiesen (38). Die verzögerte Reendothelialisierung führt darüber hinaus zu einer länger bestehenden endothelialen Dysfunktion und einer damit einhergehenden geringeren NO-Freisetzung. NO spielt im vaskulären Heilungsprozess eine entscheidende Rolle und reduziert die Plättchenaggregation sowie die Muskelzellproliferation und -migration (39). Folglich kommt der endogene Schutzmechanismus des Endothels nicht zum Tragen.

Vor allem bei der Verwendung von BMS tritt die Neointimahyperplasie als direkte Komplikation auf, wohingegen diese bei DES in der Regel durch antiproliferative Medikamente verhindert wird. Jedoch ist auch Jahre nach Einbringen des DES die Reendothelialisierung noch nicht vollständig abgeschlossen. Eine endotheliale Dysfunktion mit möglicher konsekutiver Neoatherosklerose ist die Folge. Sie stellt eine weitere Entität der Restenose dar und ist durch verfrüht einsetzende atherosklerotische Prozesse aufgrund einer endothelialen Dysfunktion charakterisiert. Aufgrund der antiproliferativen und antimigratorischen Wirkung kommt es nur zu einer unvollständigen Reendothelialisierung. Konsekutiv kommt es zur Endothelzellaktivierung, Monozytenadhäsion und Migration in das *Stratum subendotheliale*. Dieses Schema folgt den gleichen Prinzipien wie der Atherogenese in zuvor nicht gestenteten Gefäßen. Zudem wird es durch eine verminderte Zellintegrität und einer geringeren Expression von antithrombotischen Faktoren wie NO oder Thrombomodulin verstärkt. Die Ausprägung reicht von einer einfachen Intimaverdickng über Schaumzellbildung bis hin zur Bildung instabiler Plaques (23). Dabei kann es innerhalb von zwei Jahren nach *Stenting* beim Auftreten einer Plaqueruptur zu Stentverschlüssen kommen (40). Neoatherosklerose tritt signifikant häufiger und früher in DES als in BMS auf. Es kommt bei DES zu fast doppelt so vielen neoatherosklerotischen Läsionen (31 % in beschichteten Stents vs. 16 % in unbeschichteten Stents) (35, 41). Dennoch treten bei der Verwendung von DES insgesamt weniger restenotische Ereignisse auf (40). Nichtsdestotrotz wird eine geringere Restenoserate durch einen deutlich prolongierten Heilungsprozess und ein erhöhtes Thromboserisiko erkauft (42, 43).

Insgesamt wird also deutlich, dass DES trotz einer Restenose-Rate von unter 10 % weiterhin Schwachstellen aufweisen, die pharmakologisch besser gelöst werden könnten. Wünschenswert wäre also eine schnelle Reendothelialisierung sowie eine antiproliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen, um ein überschießendes Wachstum zu verhindern. Die gleichzeitige, unspezifische Hemmung des Wachstums sowohl von glatten Muskelzellen und Endothelzellen unter Inkaufnahme einer unvollständigen Reendothelialisierung stellt aktuell die beste Option dar.

2.3.2 Risikofaktoren für eine In-Stent-Restenose

Neben physiologischen Wundheilungsprozessen, die sich zu überschießenden pathologischen Wachstumsvorgängen weiterentwickeln können, gibt es eine Reihe weiterer (Risiko-) Faktoren, die eine erneute Stenosebildung beschleunigen können.

Das Auftreten einer In-Stent-Restenose (ISR) wird neben der Art des verwendeten Stents von einer Reihe weiterer Faktoren beeinflusst. Die Gesamtheit der Faktoren kann man in drei Kategorien aufteilen. Diese sind patientenabhängige Faktoren, läsionsabhängige Faktoren und prozedurabhängige Faktoren (4, 44).

Patientenabhängige Faktoren umfassen Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und genetische Faktoren. Holmes et al. ermittelten 1988 für weibliche Patienten und Patienten mit einem Alter über 65 Jahren eine erhöhte Mortalität (5). Neuere Studien widerlegten jedoch nach der Adjustierung für mögliche *Confounder* eine erhöhte Mortalität für das weibliche Geschlecht (45, 46). Auch ein bekannter Diabetes mellitus und eine vorhandene Dyslipidämie erhöhen das Risiko einer ISR (6). Nikotinabusus, die arterielle Hypertonie und Mehrgefäßerkrankungen wurden von Cassese et al. als bedeutendsten prädiktiven Faktoren eingeschätzt (44). Daneben wurden von Cho et al. ein höheres Alter, Diabetes und die Verwendung von DES der ersten Generation als weitere Risikofaktoren für eine Restenose mit ACS identifiziert (47).

Zu den läsionsabhängigen Risikofaktoren, die die Restenosewahrscheinlichkeit erhöhen, gehören komplexe Läsionen (beispielsweise Stenosen in allen drei Koronargefäßen), ostium- oder bifurkationsnahe Läsionen, kleine betroffene Gefäße und Mehrgefäßerkrankungen (48).

Weitere Risikofaktoren ergeben sich aus der Art der durchgeführten PCI. Diese sind die Art der verwendeten Stents, Anzahl und Länge der Stents, Stent-Überlappungen, nicht vollständig expandierte Stents und der minimale Lumendurchmesser. So konnte gezeigt werden, dass es vor allem bei DES der ersten Generation deutlich mehr Restenosen mit konsekutivem akutem Koronarsyndrom (ACS) gab als bei DES der zweiten Generation (47).

2.3.3 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Neointimabildung

Der Prozess der Neointimabildung trägt zur Bildung einer Restenose nach Ballonangioplastie eines zuvor verengten Gefäßes bei und ist zudem fester Bestandteil des Heilungsprozesses nach Implantation eines Stents. Sie hängt von einer Vielzahl verschiedener Faktoren ab. Dabei kommt es zum Zusammenspiel von inflammatorischen, immunologischen und migratorischen Effekten. Auslösende Faktoren sind der Endothelverlust, die Verletzung glatter Gefäßmuskelzellen sowie die Plättchenaktivierung (mit der Freisetzung von Wachstumsfaktoren) und Ablagerung von Thromben (49). Diese Prozesse führen zur Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und der Ablagerung einer Extrazellulärmatrix. Die Anzahl der Thrombozyten steht dabei im direkten Zusammenhang mit der initialen Intimahyperplasie (50). Je nach Art der verwendeten Stents variieren die einzelnen Abläufe, die an der Bildung der Neointima (und einer Restenose) beteiligt sind. Eine Vielzahl verschiedener Botenstoffe und Wachstumsfaktoren spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die beteiligten Wachstumsfaktoren werden im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

Welt et al. haben die beteiligten Faktoren der Restenose analysiert und in Wachstumsfaktoren und Zytokine eingeteilt (51). Zu den wichtigsten beteiligten Zytokinen gehören MCP-1 (Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1), IL-6 (Interleukin 6) und IL-8 (Interleukin-8). Sie werden von Makrophagen, glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, T-Zellen und Leukozyten ausgeschüttet. MCP-1 ist vor allem für die Monozytenrekrutierung verantwortlich. IL-8 sorgt für eine chemotaktische Rekrutierung von hauptsächlich neutrophilen Granulozyten und auch Monozyten. IL-6 gehört zu den Akute-Phase-Proteinen und ist Bestandteil von Entzündungsreaktionen. Die genauen Effekte auf Blutgefäße sind noch nicht vollständig erforscht.

Zu den beteiligten Wachstumsfaktoren gehören vor allem PDGF (*platelet-derived growth factor*, Wachstumsfaktor aus Thrombozyten) -A und -B und bFGF (*basic fibroblast growth factor, Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor*), aber auch IGF (*Insulin-like growth factors*, Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren) und EGF (*epidermal growth factor*, Epidermaler Wachstumsfaktor) (52). Im Folgenden werden die einzelnen Faktoren und ihre Funktionen genauer beschrieben.

Das vaskuläre *Remodeling* erfolgt als direkte Konsequenz einer Gefäßverletzung. Nach einer Gefäßverletzung wird vermehrt vWF aus aktivierten Endothelzellen freigesetzt und Kollagen in der subendothelialien Matrix freigelegt. Daran lagern sich Thrombozyten mithilfe verschiedener Adhäsionsmoleküle (Glykoprotein Ib, IX, Ia, IIa) an. Durch Glykoprotein IIb und IIIa und Fibrinogen werden Verbindungen zwischen einzelnen Blutplättchen und der Gefäßwand gebildet. Es kommt zur Thrombozytenaktivierung und -aggregation (53). Die aktivierten Plättchen schütten wiederum PDGF, Thromboxan A2 (TxA2), Serotonin, TGFβ (*transforming growth factor-β*, transformierender Wachstumsfaktor-beta) und Histamin aus. PDGF und Wachstumsfaktoren der FGF-Familie stimulieren die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen der Media (54, 55). Im Tierversuch konnte zudem ein proliferativer Effekt auf Zellen der Intima gezeigt werden (56). Zudem wurde eine durch PDGF verstärkte Neointimabildung nach Ballon-induzierter Gefäßverletzung nachgewiesen (57).

Ein Zusammenhang zwischen einer Neointimavergrößerung nach Gefäßverletzung und einer erhöhten Expression der Wachstumsfaktorrezeptoren für bFGF, PDGF und EGF wird vermutet (58, 59). Die Aktivierung der PDGF-vermittelten Signaltransduktion erfolgt durch Phosphorylierung des PDGFR-β Rezeptors (60, 61). Durch Dephosphorylierung von PDGFR-β (und anderer Tyrosinkinase-Rezeptoren) durch PTP1B wird die Aktivierung beendet und die Signaltransduktionskaskade somit negativ reguliert (22, 54, 62). Auf diese Art und Weise wird ein überschießendes Wachstumsfaktor-*Signaling* verhindert. Passend dazu wurde in Ratten nach Stimulation glatter aortaler Muskelzellen mit PDGF und bFGF wurde ein reaktiver Anstieg von PTP1B und anderen Phosphatasen beobachtet (52).

Als weiterer Wachstumsfaktor wird FGF (*fibroblast growth factor, Fibroblasten-Wachstumsfaktor*) von verletzten glatten Muskelzellen freigesetzt. FGF hat den stärksten proliferationsfördernden Effekt der beteiligten Wachstumsfaktoren (63).

Nach einer Gefäßverletzung zeigt sich außerdem eine IGF-Überexpression in glatten Gefäßmuskelzellen (64). IGF entfaltet seine mitogene Wirkung als Kofaktor von PDGF und FGF (65).

TGFβ wird vermehrt von Endothelzellen und anderen Zellen der Neointima exprimiert (66) und führt dort zu einem verstärkten Wachstum (55). Außerdem wird TGFβ aus aktivierten Blutplättchen freigesetzt. Im Tiermodell wurde nach TGFβ-Transfektion eine vermehrte Intimahyperplasie festgestellt (67), wohingegen der Einsatz von TGFβ-Antikörpern (68) oder eine genetische Deletion von TGFβ in Thrombozyten (69) die Neointimabildung nach Gefäßverletzung inhibierte. Im Tierversuch wurde zudem eine verstärkte Neointimabildung nach Gabe von TGFβ gezeigt (70). Zudem schreiben verschiedene weitere Studien TGFβ eine Wirkung als Regulator von Proliferation, Apoptose und Struktur von Endothelzellen zu (71-73). Des Weiteren stimuliert TGFβ die Kollagensynthese.

VEGF wird von Endothelzellen, Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen ausgeschüttet und regt die Proliferation und Migration von Endothelzellen an (19, 74, 75). Außerdem wird durch VEGF die Angiogenese stimuliert (76). Daneben hat VEGF auch mitogene Effekte auf Monozyten und Makrophagen (77, 78). Dementsprechend ist VEGF auch Teil der immunologischen und inflammatorischen Komponente der Neointimabildung.

EGF ist unter anderem in humanen Thrombozyten zu finden (79). Für den Wachstumsfaktor konnten vasokonstriktorische Eigenschaften und eine stimulierende Wirkung auf SMC nachgewiesen werden (80). Die mitogene Wirkung auf SMC wurde im Zellkulturexperiment an glatten Gefäßmuskelzellen von Rindern nachgewiesen (81).

Die Neointimabildung und das Auftreten einer Restenose sind komplexe Ereignisse mit einer Vielzahl von ablaufenden Prozessen. Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen sowie die Reendothelialisierung sind wichtige Bestandteile davon.

Die oben genannten Wachstumsfaktoren stellen einen Teil der beteiligten Akteure dar. Die Wachstumsfaktoren PDGF, FGR, EGF, IGF und VEGF haben die Gemeinsamkeit ihre Wirkung über Rezeptortyrosinkinasen zu entfalten. Die Aktivierung von RTK erfolgt durch Phosphorylierung von Tyrosinresten. PTP1B hat durch seine dephosphorylierende Wirkung einen modulierenden und (in der Regel) hemmenden Effekt, der im nächsten Unterkapitel genauer erläutert wird. Die Wirkung von TGFβ entfaltet sich über Serin/Threoninkinase-Rezeptoren (82). Folglich findet keine direkte Beeinflussung durch eine PTP1B-vermittelte Dephosphorylierung statt. Nichtsdestotrotz wurde für PTP1B-defiziente Hepatozyten eine Resistenz gegenüber TGFβ nachgewiesen (83).

Neben den genannten Wachstumsfaktor-Rezeptoren kommen auch Neurotrophin-Rezeptoren in glatten Muskelzellen vor (84) und werden von PTP1B reguliert (85, 86). VSMC exprimieren Neutrophin-Rezeptoren der Trk-Familie (Tropomyosin Rezeptor Kinase B), und erste Arbeiten konnten zeigen dass NGF (*nerve growth factor*, Nervenwachstumsfaktor) über Trk-Rezeptor A die Migration glatter Muskelzellen auslösen kann (87). Zudem wurde eine verstärkte Expression von TrkB und BDNF (engl. *brain derived neurorophic factor*) bei Ratten nach Gefäßverletzung durch eine Ballonangioplastie festgestellt (88). Die genaue Wirkung von Neurotrophinen und Trk-Rezeptoren im Rahmen von vaskulären Umbauprozessen wurde bis dato allerdings noch kaum untersucht.

2.4 Protein Tyrosin Phosphatase 1B

Die Protein Tyrosin Phosphatase 1B (PTP1B) ist an einer Vielzahl von Prozessen im menschlichen Körper beteiligt und reguliert unter anderem die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren, welche über Rezeptortyrosinkinasen signalisieren (wie PDGF, FGF, IGF oder VEGF). Daher ist sie möglicherweise für eine Vielzahl vaskulärer Krankheitsbilder und Umbauprozesse nach Gefäßverletzung von Bedeutung. Das folgende Kapitel behandelt die Charakterisierung dieser Phosphatase, ihre Wirkungen auf die verschiedenen Substrate sowie bedeutende Krankheitsbilder und den Einfluss von PTP1B auf das vaskuläre *Remodeling*.

2.4.1 Allgemeine Charakterisierung der PTP1B

PTP1B wird ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert (89) und durch das PTPN1-Gen (*Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 1*) kodiert (90). PTP1B besteht aus 240 bis 250 Aminosäuren und besitzt eine katalytische Domäne mit Spezifität für Phosphotyrosinreste (91). Daneben besitzt sie eine nicht-katalytische Domäne zur Substraterkennung (92). Im Jahr 1988 wurde PTP1B als erste Phosphatase der Gruppe der Protein Tyrosin Phosphatasen (PTP) beschrieben (93).

Protein Tyrosin Phosphatasen gehören zu den rezeptorartigen Nicht-Transmembranproteinen und sind wichtige Modulatoren der zellulären Signaltransduktion (94). Sie sind sowohl für die Initiation als auch für die Termination verschiedener Prozesse zuständig (95). Sie stellen die Gegenspieler der phosphorylierenden Protein Tyrosinkinasen (PTK) dar. Während Kinasen den Grad der Phosphorylierung von Wachstumsfaktoren erhöhen und damit deren Aktivität steigern, haben PTP eine dephosphorylierende und inhibierende Wirkung.

Neben ihrer vorwiegend hemmenden Wirkung auf die Signaltransduktion von Rezeptortyrosinkinasen besitzt PTP1B auch eine aktivierende Wirkung. Diese tritt bei der Src-Familie (engl. *Sarcoma*, Sarkom) der Rezeptortyrosinkinasen auf. Diese besitzen unter anderem eine inhibierende Phosphorylierungsregion. Kommt es zur Dephosphorylierung, wird diese aktiviert und eine Signalkaskade ausgelöst (96).

Aufgrund der ubiquitären Expression und des weitreichenden Einflusses von PTP1B auf verschiedene zelluläre Signalwege ist eine genaue Regulation der Aktivität der Phosphatase notwendig. Die Steuerung geschieht durch die subzelluläre Lokalisation und post-translationale Modifikation. Frangioni et al. konnten zeigen, dass PTP1B auf der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (EPR) lokalisiert ist (97). Das ermöglicht die Interaktion mit Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise EGFR und PDGFR nach deren Aktivierung und Endozytose (89). Dieser Prozess vollzieht sich an spezialisierten Stellen der EPR-Oberfläche (98). Zudem verhindert die Verankerung auf der EPR-Oberfläche unerwünschte Interaktionen während der Biosynthese von Rezeptortyrosinkinasen im Inneren des Endoplasmatischen Retikulums. Des Weiteren wird auch eine Beteiligung an der Proteinsynthese, der posttranslationalen Modifikation, der Lipid-Synthese und dem Vesikel-Transport

diskutiert (97). Hinzu kommt, dass höchstwahrscheinlich eine vorzeitige intrazelluläre Aktivierung von RTK durch PTP1B verhindert wird. In aktivierten Thrombozyten findet eine Abspaltung von PTP1B vom EPR statt, was zur Entstehung eines löslichen Enzyms im Intrazellulärraum führt (99). An Kontaktstellen von Zell-Zellkontakten ist es PTP1B auch möglich, auf der Zellmembran befindliche Substrate zu dephosphorylieren (100, 101).

2.4.2 Regulation der PTP1B-Aktivität

Durch die ubiquitäre Expression von PTP1B sind Regulationsmechanismen für eine zielgerichtete Aktivität besonders wichtig. Die Regulierung der PTP1B-Aktivität erfolgt durch verschiedene posttranslationale Modifikationen.

Dazu zählen Oxidation (102, 103), Phosphorylierung, S-Sulfhydrierung (Anhängen von Persulfidgruppen, H_2S) (104), proteolytische Spaltung, S-Nitrosylierung (105) und die Sumoylierung (*SUMO*, engl. *Small Ubiquitin-related Modifier,* kleiner Ubiquitin-verwandter Modifikator; Anhängen von sog. SUMO-Proteinen) (106).

Die Oxidierung findet vor allem durch reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) statt und führt zur reversiblen Inhibierung des Enzyms (103). ROS stellen zudem intrazelluläre Sekundärbotenstoffe und Aktivatoren für Rezeptortyrosinkinasen dar. Eine Rezeptortyrosinkinase-Aktivierung führt zur Bildung von H_2O_2 und damit einhergehend zur Rezeptoraktivierung (107). Durch Wasserstoffperoxid kommt es zur reversiblen Oxidation und einer vorübergehenden Inhibition von PTP1B, welche ansonsten die Signalwege der Wachstumsfaktoren hemmen würde. Über diesen Mechanismus führen sowohl eine Insulin-Stimulation (108) als auch eine EGF-Aktivierung (109, 110) zur Inaktivierung von PTP1B.

Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor (IR) führt zu dessen Autophosphorylierung. So kommt es zu einer verstärkten Kinaseaktivität des IR und Phosphorylierung von PTP1B mit konsekutiver Inhibierung (111). Tao et al. konnten zeigen, dass die Phosphorylierung verschiedener Reste von PTP1B die Aktivität der Phosphatase in unterschiedlicher Art und Weise beeinflusst. So konnte der Effekt der Autophosphorylierung des IR und eine damit einhergehende Aktivitätsminderung von PTP1B in der Skelettmuskulatur und dem Fettgewebe von Mäusen beobachtet werden. Gleichzeitig wurde ein Anstieg von Phosphotyrosinen festgestellt,

wohingegen eine leichte Abnahme von Phosphoserinen zu beobachten war (112). Im Gegensatz dazu wurde bei einem Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) eine Zunahme phosphorylierter Serinreste und eine verstärkte Aktivität von PTP1B beobachtet (112). Diese Beispiele zeigen, dass nicht nur die Art der posttranslationalen Modifikation, sondern auch die modifizierten funktionellen Gruppen von PTP1B eine entscheidende Rolle im komplexen Regulationsprozess spielen.

Die S-Nitrosylierung erfolgt durch reaktives Stickstoffmonoxid (NO) und führt ebenfalls zu einer reversiblen Inaktivierung (105). Wahrscheinlich dient dieser Mechanismus zur Vermeidung einer irreversiblen Oxidation und damit eines kompletten Funktionsverlusts (113). Auch eine Überlastung des EPR (EPR-Stress), beispielsweise durch die Akkumulation fehlgefalteter Proteine (114), induziert eine PTP1B-Inaktivierung durch Anlagerung einer Persulfidgruppe an dessen Cysteinrest. Dieser Mechanismus stellt möglicherweise eine Stressantwort des EPR dar (95).

Die Sumoylierung von PTP1B findet an zwei Lysin-Resten statt (106). So besitzt auch die Insulin-Stimulation einen sumoylierenden Effekt und gleicht damit die negativen Effekte von PTP1B auf die Insulin-Signaltransduktion aus (106).

So wie die Effekte von PTP1B ist auch dessen Regulierung vielfältig und hochkomplex. Die verschiedenen Prozesse können nicht isoliert betrachtet werden, sondern müssen gemeinsam gesehen werden.

2.4.3 Mögliche Bedeutung der PTP1B in der vaskulären Wundheilung

In der Gefäßwand ist die Protein Tyrosin Phosphatase 1B eine der wichtigsten Protein Tyrosin Phosphatasen und wird vor allem in glatten Muskelzellen exprimiert (11). Ihr Einfluss auf vaskuläre Umbauprozesse erfolgt durch die Steuerung und Inhibierung verschiedener Signalwege, welche durch Wachstumsfaktoren aus aktivierten Plättchen oder Immunzellen ausgelöst werden. Die Auswirkung der einzelnen Wachstumsfaktoren wurden bereits zuvor beschrieben (siehe Kap. 2.3.3).

Eine Studie in Ratten konnte eine erhöhte PTP1B mRNA Expression in proliferierenden und migrierenden glatten Muskelzellen der Intima und Media als Reaktion auf eine Ballon-Katheter-induzierte Gefäßverletzung zeigen (12). Es ist

jedoch nicht klar, ob dieser Effekt ein adaptiver Mechanismus ist oder kausal an einer Restenose beteiligt ist.

Daneben wurde mithilfe von Adenoviren eine Überexpression von PTP1B induziert, was zur Inhibition von Proliferation und Migration glatter Muskelzellen als Antwort auf die Wachstumsfaktoren PDGF-BB und FGF2 führte. Dahingegen förderte eine Inhibition von PTP1B die Zellantwort (54).

Eine dominant-negative PTP1B Expression verstärkte in Ratten die Neointimabildung nach der Gefäßverletzung mithilfe eines Ballonkatheters (54). Im Rahmen von Vorläuferstudien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine endotheliale PTP1B-Inhibition zur verstärkten Neointima-Bildung führt (9, 10). Als möglichen Grund für diese Beobachtungen konnte die Gruppe zeigen, dass dabei eine vorzeitige Seneszenz von Endothelzellen und reduzierte Reendothelialisierung nach Deletion von PTP1B im Endothel eine Rolle spielt (9).

Hyperinsulinämie, wie sie beispielsweise im Rahmen eines Diabetes Mellitus Typ II auftritt, unterdrückt die PTP1B Expression und verstärkt die PDGF-induzierte Motilität von glatten Muskelzellen (115). Die kardiovaskulären Risikofaktoren Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und Insulinresistenz wurden zudem im Tiermodell mit einem verstärkten Auftreten der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht (116). Die Signaltransduktion von VEGF (62, 117), Insulin und Leptin (118, 119) wird ebenfalls durch PTP1B beeinflusst. Die Botenstoffe vermitteln eine proliferative und migratorische Wirkung auf VSMC und sind an den vaskulären Komplikationen von Diabetes und Übergewicht beteiligt. Eine chronische Insulin-Stimulation von VSMC von Ratten verstärkte den Einfluss von PDGF auf diese Zellen. Daneben kam es noch zu einer Insulin-induzierten Suppression der reaktiven PTP1B-Hochregulation (115). Diese Prozesse sprechen für eine bremsende Wirkung von PTP1B auf vaskuläre Umbauprozesse.

Des Weiteren wurde ein reaktiver Anstieg von PTP1B nach PDGF-Stimulation nachgewiesen (115). Daraus geht die Rolle der Phosphatase als Regulator und Inhibitor von überschießendem Wachstum hervor. Eine periadventitiale Applikation von PTK-Inhibitoren reduzierte zudem die Neointimabildung nach einer Gefäßverletzung (120).

Eine Hypoxie, wie sie oftmals auch im Rahmen einer Gefäßverletzung auftritt, vermindert die Expression von PTP1B, was wiederum zu einer verstärkten PDGF-Rezeptoraktivierung und Proliferation sowie Chemotaxis von humanen pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (*human pulmonary arterial smooth muscle cells*, hPASMC) führt (121).

Wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, besitzen auch neurotrophe Wachstumsfaktoren (sog. Neutrophine) und Trk-Rezeptoren eine Funktion im Rahmen vaskulärer Umbauprozesse nach einer Gefäßverletzung. Neurotrophine spielen eine entscheidende Rolle in neuronalen Entwicklungsprozessen und neuronaler Homöostase (122). Sie sind existenziell für Wachstum, Überleben und Differenzierung von Neuronen des sympathischen Nervensystems. In Bezug auf vaskuläres *Remodeling* konnte bisher eine Hypoxie-induzierte Hochregulation von BDNF und TrkB-Rezeptoren mit einer verstärkten Proliferation glatter Muskelzellen und einer erhöhten Aktivität von Matrix-Metalloproteasen (vorwiegend MMP2 und MMP9) in Verbindung gebracht werden (123). Bis jetzt weiß man jedoch nur sehr wenig über die PTP1B-gesteuerte Kontrolle von Trk-Rezeptor-Signalwegen im Rahmen vaskulärer Umbauprozesse und ihre zellspezifischen Funktionen im Hinblick auf die Neointimabildung wurden bislang noch nicht untersucht.

Aus der aktuellen Datenlage geht hervor, dass PTP1B durch eine inhibitorische Wirkung auf Wachstumsfaktorsignaltransduktionskaskaden vor allem überschießendes Wachstum verhindert. Vermutlich dient die endogene Expressionserhöhung nach Gefäßverletzung als Schutzmechanismus. Umso wichtiger ist es, die genaue Funktionsweise und Bedeutung weiter zu untersuchen.

2.5 Tiermodelle zur Untersuchung von Neointimabildung und Restenose

Restenose und Neointimabildung zeigen sich noch immer häufig als Komplikationen der PTCA. Bei der Untersuchung der komplexen, Vorgänge *in vivo* haben Tiermodelle einen großen Stellenwert. Zudem werden sie zur Untersuchung neuer Wirkstoffe benötigt. Vor der klinischen Erprobung von Verfahren und Wirkstoffen muss bereits im Tiermodell eine Wirkung gezeigt werden. Des Weiteren ist eine detaillierte Analyse unter kontrollierten Versuchsbedingungen beim Menschen nicht in gleicher Form möglich, wie in einem Tierversuch. *In vitro* Untersuchungen stellen eine Ergänzung dar und erlauben die gezielte Untersuchung unter kontrollierten Bedingungen. Trotzdem muss bedacht werden, dass je nach angewandter Methode und Modellorganismus die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen begrenzt sein kann.

Man kann die verfügbaren Tiermodelle zur Untersuchung von Neointimabildung und Restenose grob in intra- und perivaskuläre Verletzungen einteilen. Intraluminal kann mittels eines Drahts (124), eines Ballons (102, 125, 126) oder einer Kombination beider Verfahren das Endothel gezielt von innen abgetragen oder verletzt werden. Des Weiteren ist auch die Verwendung von Stents möglich (127). Die unterschiedlichen Methoden haben charakteristische Verletzungsmuster. So kommt es bei Verwendung eines Drahts zum Endothelschaden, aber auch zur Verletzung glatter Muskelzellen der Media. Der Ballonkatheter fügt primär einen Endothelschaden zu und beeinträchtigt keine weiteren Gefäßschichten (102), da er in einem geringeren Maße als bei einer PTCA expandiert wird. In beiden Fällen kommt es zur Bildung einer Neointima und damit einhergehender Proliferation und Migration glatter Muskelzellen (124, 126).

Als perivaskuläre Varianten bieten sich das Anbringen einer Manschette (126, 128) oder eine Gefäßverletzung mittels elektrischer Stimulation an. Bei Verwendung einer Manschette kommt es zu einer Intimaverdickung und einer begleitenden Stenose, jedoch zu keiner Neointimabildung, da das Endothel nicht zwingend geschädigt wird. Die Schädigung durch elektrischen Strom führt zu schweren, alle Wandschichten betreffenden Schäden, auch hier ist die Neointimabildung gering ausgeprägt.

De Meyer et al. unterscheiden zudem zwischen einer einzeitigen und einer zweizeitigen Gefäßverletzung, bei der eine durch die bereits beschriebenen Techniken

verletzte Arterie mittels Ballonangioplastie erneut verletzt wird (102). Auf diese Weise sollen Prozesse im Menschen noch besser modelliert werden.

Das für die vorliegende Versuchsreihe genutzte Eisenchlorid-Modell (s. Kapitel 4.2) stellt eine weitere perivaskuläre Methode der Neointimainduktion dar. Es kommt durch die Bildung freier Radikale und den Einfluss von oxidativen Stress zu einer transmuralen Gefäßverletzung mit dem Untergang von Endothelzellen (14). Dadurch bildet sich ein (okklusiver) Thrombus (129). Nach drei Wochen kann eine an glatten Muskelzellen reiche Neointimahyperplasie festgestellt werden (14). Bei Fütterung einer cholesterinhaltigen Diät weisen diese Läsionen histologisch typische Merkmale humaner atherosklerotischer Läsionen auf, wie beispielsweise oxLDL-speichernde Makrophagen (130-132).

Neben den verschiedenen Methoden der Gefäßverletzung unterscheiden sich die einzelnen Modelle zudem in der verwendeten Spezies. So unterscheidet man zwischen Groß- und Kleintiermodellen. Kleintiermodelle verwenden beispielsweise Mäuse, Ratten und Kaninchen. Als Großtiere dienen Schweine und Hunde, aber auch Schafe oder Primaten (133). Je nach Größe der Versuchstiere ergeben sich verschiedene Möglichkeiten. So ist das $FeCl_3$-Modell bei Mäusen und Ratten gleichermaßen anwendbar (14, 129, 131, 132, 134), aber das Ballonkatheter-Modell nur bei Ratten und größeren Tieren (102, 125, 133). Abschließend ist also festzustellen, dass abhängig von der Fragestellung der geeignete Modellorganismus mit den dazugehörigen Vor- und Nachteilen auszuwählen ist.

2.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Bisherige experimentelle Arbeiten zur Funktion von PTP1B im kardiovaskulären System verwendeten vor allem Modelle mit globaler Hemmung oder Überexpression von PTP1B. Während die zellspezifische Expression und Funktion bis dato nur für das Endothel untersucht wurde, gibt es keine Arbeit, die die Funktion von PTP1B *in vivo* spezifisch in glatten Muskelzellen untersucht. Im Hinblick auf die vaskuläre Wundheilung spielen jedoch vor allem die glatten Muskelzellen eine große Rolle.

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten eine protektive Wirkung der PTP1B-Inhibition für die Entwicklung einer Endotheldysfunktion im Rahmen von Diabetes (8, 135) oder einer Herzinsuffizienz (136). Jedoch konnten auch negative Auswirkungen in Form zellulärer Seneszenz nach ungebremster Wachstumsfaktorstimulation gezeigt werden (9).

In der Zusammenschau der aktuellen Datenlage ergibt sich, vor allem in Bezug auf die vaskuläre Wundheilung, die Frage nach der Bedeutung von PTP1B für das Wachstum glatter Muskelzellen und damit das Ausmaß der Neointimabildung. Eine überschießende Reaktion glatter Muskelzellen auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren im Rahmen der Entwicklung einer Restenose könnte auf eine Fehlfunktion oder verminderte Expression gegenregulatorischer Systeme, wie PTP1B, hindeuten. Die bekannte Regulation von PTP1B durch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes mellitus macht diese Phosphatase umso interessanter für die Forschung und unterstreicht den Stellenwert von PTP1B als potenziellen pharmakologischen Angriffspunkt. Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Expression von PTP1B und ihre Bedeutung für die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren während der Neointimabildung zu untersuchen und mögliche Regulationsmechanismen zu identifizieren.

3 Materialien

3.1 Geräte

Gerät	Firma
Absaugsystem *VACUSAFE*	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Abzug mc6	Waldner Laboreinrichtungen GmbH (Wangen im Allgäu)
Auflichtmikroskop AE31	Motic (Wetzlar)
Autoklav Webeco EA	Webeco (Selmsdorf)
BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)
Centrifuge 5424 R	Eppendorf AG (Hamburg)
CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Easypet 3	Eppendorf AG (Hamburg)
Einbettautomat TP1020	Leica Microsystems (Wetzlar)
Eismaschine	Scotsman (Mailand, Italien)
Elektrophorese System *Sub-Cell® GT* (mit Gelgießvorrichtung, Gelschalen, Wasserwaage rund, 20-Well Kämmen)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Elektrophorese- und Blotting-Apparatur Mini-PROTEAN® Tetra Cell and Mini Trans-Blot® Module (mit Tank, Deckel mit Anschluss, Elektrophorese-Glasplattenhalter, Blotting-Gelkassettenhalter mit Kassetten, Schwämmen, Kühlelement)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Eppendorf (Hamburg) µCuvette	Eppendorf AG (Hamburg)
Feinwaage MC1 Analytic AC 210 S	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzlampe U-RFL-T	Olympus (Hamburg)

Folienschweißgerät	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Gelgieß-Apparatur Mini-PROTEAN® Tetra Cell (mit Gelgießstand, Glasplattenhalter, Dichtung, Glasplatten mit 1,0 mm *Spacer,* Glasplatten kurz, 10-Well Kämmen)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Herasafe™ KSP biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II	Thermo Scientific - Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Heratherm Wärmeschrank 37 °C	Thermo Scientific - Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Inkubator Galaxy 170 S	New Brunswick (*an Eppendorf company*) (Hamburg)
Kamera MicroPublisher 5.0 RTV	QImaging (Surrey,BC, CA)
Kamera Moticam 5	Motic Deutschland GmbH (Wetzlar)
Kryostat Leica CM3050 S	Leica Biosystems GmbH (Wetzlar)
Kühl-und Gefrierschränke	Liebherr-International AG, (Bulle, Schweiz)
Kühlplatte für das modulare Einbettsystem EG 1150 C	Leica Microsystems (Wetzlar)
Magnetheizrührer *VMS-C7*	VWR International (Radnor, PA, USA)
Magnetrührer VS-C4	VWR International (Radnor, PA, USA)
Mastercycler nexus gradient	Eppendorf AG (Hamburg)
MicroPublisher 5.0 RTV	Qimaging (Surrey, British Columbia, Kanada)
Mikroskop BX51	Olympus (Hamburg)
Mikroskop *Motic BA210E* (Zellkultur)	Motic Deutschland GmbH (Wetzlar)
Mikrotom RM2245	Leica Microsystems (Wetzlar)
Mikrowelle	Sharp Deutschland (Köln)
Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Objektivrevolver mit Polarisation	Olympus Europa (Hamburg)
Paraffinausgießstation EG 1150 H	Leica Microsystems (Wetzlar)
Polarisator Mikroskop	Olympus Europa (Hamburg)
Purelab Ultra	Elga (Celle)
StepOne qPCRStepOnePlus™ Real-Time PCR System	StepOne (Düsseldorf)
Stereomikroskop *SZ40* (Maus-OP)	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg)

Timer	TFA Dostmann (Wertheim)
Trockenschrank *DRY-Line*®	VWR international (Radnor, PA, USA)
U725-G Innova Ultra-Low Temperature Freezer	New Brunswick (*über Eppendorf company*) (Hamburg)
Ultratiefkühlschrank New Brunswick™ Innova® U725-G	New Brunswick (*über Eppendorf company*) (Hamburg)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, New York, USA)
Waage MC1 Laboratory LC 2200 P	Sartorius (Göttingen)
Wärmeplatte (Maus-Operation)	Vogel GmbH & Co KG (Fernwald)
Wärmeschrank *Heratherm*®	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Wasserbad Zellkultur	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge *5424 R*	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifuge FastGene Mini	Nippon Genetics Europe GmbH (Düren)
Zentrifuge *miniSpin*	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifuge mit Ausschwingrotor *5810 R*	Eppendorf AG (Hamburg)

3.2 Software

Name	**Firma**
CFX Maestro 1.1	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Graph Pad Prism, version 6.0	GraphPad Software (La Jolla, Kalifornien, USA)
ImagePro Plus, version 7.0	Media Cybernetics (Rockville, Maryland, USA)
Motic Image	Motic (Wetzlar)
Nano Drop	Thermo Scientific - Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

3.3 Zubehör und Hilfsmittel

Name	Firma
Bechergläser *DURAN*® (600 ml, 250 ml, 100 ml)	Schott AG (Mainz)
Kryoboxen aus Karton	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Dispenser Eppendorf Varispenser®	Eppendorf AG (Hamburg)
Einzelständer für 50 ml-Zentrifugenröhrchen	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Einzelständer für 50 ml-Zentrifugenröhrchen	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Färbeeinsatz mit Drahtbügel	VWR International (Radnor, PA, USA)
Färbeglasküvetten mit Deckel	VWR International (Radnor, PA, USA)
Färbekästen nach Hellendahl mit Deckel	VWR International (Radnor, PA, USA)
ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen	Vector Laboratories, (Burlingame, CA, USA)
Kanister mit Ablasshahn *Nalgene*®	VWR International (Radnor, PA, USA)
Kryo-Einfriergefäß für Zellen *Nalgene*®	VWR International (Radnor, PA, USA)
Kühlakku für PCR-Gefäße *PCR-Cooler*	Eppendorf AG (Hamburg)
Laborflasche, Braunglas, vierkant	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Laborflaschen *DURAN*® mit PP-Schraub-kappe (1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml)	Schott AG (Mainz)
Magnetrührstäbchen und -Entferner	VWR International (Radnor, PA, USA)
Messzylinder *Kartell*® (2000 ml, 1000 ml, 500 ml, 100 ml)	VWR International (Radnor, PA, USA)
Mikrotomklingen *Leica DB80 LS*	Leica Biosystems GmbH (Nussloch)
Mikrowellenbehälter mit Deckel *Clip Pac*®	Picnic Plast Industrial Co. Ltd. (Bangkok, Thailand)
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik Ltd (Lancing, UK)
Objektträgerkästen	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Pinzette (10 cm, gezahnt); gerade (11150-10); gebogen (11151-10)	Fine Science Tools® (Heidelberg)
Pinzetten, fein *Dumont #5/45* (11251-35)	Fine Science Tools® (Heidelberg)
Pipette *Eppendorf Reference®2* (0,1 - 2,5 µl)	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipetten Eppendorf Research® plus (100 - 1000 µl; 10 - 100 µl; 0,5 - 10 µl)	Eppendorf AG (Hamburg)
Spritzflasche *Nalgene*®	VWR international (Radnor, PA, USA)
Stegeinsätze 9x9x30 mm	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Trichter	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)

Zellkammer-Objektträger, 4-Well Nunc™ Chamber Lab-Tek®II Slide™	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)

3.4 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
Aluminiumfolie Universal	VWR International (Radnor, PA, USA)
Chirurgisches Nahtmaterial *Ethilon 6-0 Polyamid* (697H)	Ethicon, division of Johnson & Johnson Medical Limited (Livingston, SCO)
Deckgläser (24 x 60 mm, #1)	Gerhard Menzel GmbH (Braunschweig)
Deckgläser 24x60 mm	Thermo Scientific - Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Einbettkassetten, weiß *Bio-Net*	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH (Edermünde)
Entsorgungsbeutel, Polypropylen	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Filterpapier (MN 615 ¼; Ø 150 mm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren)
Fixierklebeband TimeMed® Labeling Systems	VWR International (Radnor, PA, USA)
Flügelkanüle (Venofix® Safety; Best-Nr. 4056503-01)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Gewebekulturschale 10 cm steril (Zellkultur)	Greiner (Kremsmünster, Österreich)
Glasküvetten mit Deckel	VWR International (Radnor, PA, USA)
Glaspasteurpipetten 230 mm	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Immersionsöl	Olympus (Hamburg)
Insulinspritze (29G, 1 ml)	BD Medical (Franklin Lakes, NJ, USA)
Kryoeinbettformen *Tissue-Tek® Cryomold®* (10 x 10 x 5 mm)	Sakura Finetek Europe B.V. (Alphen am Rhein, Niederlande)
Leica Microsystems (Wetzlar) Mikrotommesser DB 80 LS (rot)	VWR International (Radnor, PA, USA)
Objektträger Superfrost ultra	Thermo Scientific - Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Paraffin Surgipath® Paraplast®	Leica Biosystems GmbH (Wetzlar)
Pasteurpipetten (Glas, 150 mm)	VWR International (Radnor, PA, USA)
Pasteurpipetten ohne Wattestopfen, steril (Kalksoda-Klarglas, Gesamtlänge 230 mm)	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)
Pipettenspitzen mit Filter *TipOne®* (steril)	Starlab International GmbH (Hamburg)

(1000 µl; 300 µl graduiert; 100 µl abgeschrägt; 10/20 µl XL graduiert)	
Pipettenspitzen *TipOne*® (1000 µl Blue graduiert; 200 µl *Yellow*; 10 µl XL graduiert)	Starlab International GmbH (Hamburg)
Reaktionsgefäße *Eppendorf Safe-Lock Tubes* (5 ml, 2 ml, 1.5 ml, 0.5 ml; farblos)	Eppendorf AG (Hamburg)
Reaktionsgefäße PCR 8er-Strips (0,2 ml)	Brand GmbH + CO KG (Wertheim)
Reaktionsgefäße *PCR Soft Tubes* (0,2 ml; farblich gemischt)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Serologische Pipetten *CELLSTAR*® (10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Serologische Pipetten *CELLSTAR*®, steril, einzeln verpackt (10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Skalpell Nr. 11, Einweg, steril	VWR international (Radnor, PA, USA)
Spritze *Discardit II* (5 ml)	BD (Becton, Dickinson and Company) (New Jersey, USA)
Spritzen *Omnifix*®*-F* (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Spritzenfilter, 25 mm, 0.2 µm SFCA *Nalgene*™	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Spritzenfilter, 25 mm, 0.2 µm SFCA *Nalgene*™	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Transferpipetten (3,5 ml, 1 ml)	Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
Transferpipetten 5,8 ml (15,5 cm, 14,7 cm)	VWR International (Radnor, PA, USA)
Tücher, fusselfrei VWR® Light-Duty Tissue Wipers	VWR International (Radnor, PA, USA)
Wägeschalen	VWR International (Radnor, PA, USA)
Wägeschiffchen, Einweg (5 ml, 25 ml, 100 ml)	VWR International (Radnor, PA, USA)
Wasserbadschutzmittel	VWR International (Radnor, PA, USA)
Zellkulturschale (PS, 100/20 mm, steril)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zellkulturschale, 6-Well Nunc™ - Nuclon™ Delta Surface	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Zellschaber, 28 cm Grifflänge, steril	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Zentrifugenröhrchen, konisch *Falcons* (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)

3.5 Chemikalien und Reagenzien

Name	Firma	Bestell-nummer
Aceton	Applichem (Darmstadt)	A1582,2500
Acid Fuchsin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	F8129
Agarose, Broad Range	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	232-731-8
Anilinblau	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	4002.1
BSA - Albumin Fraktion V, pH 5,2	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	2834.2
Chloroform (Trichlormethan)	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	7331.1
Citratpuffer 0,01 M pH 6,0 (Citric Acid Monohydrat)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	C1909
D(+) Saccharose	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	4621.1
ddH_2O - Millipore		
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Zellkultur	Applichem (Darmstadt)	A3672,0100
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	ATCC American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)	30-2002
Eisen(III)-Chlorid hexahydrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	236489
Entellan	Merck (Darmstadt)	1.07961.0100
Essigsäure 100 %	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	3738.4
Ethanol 70 % mit 1 % MEK	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	T913.3
Ethanol 96 % mit 1 % MEK	Applichem (Darmstadt)	A2551
Ethanol 99,8 % mit 1 % MEK	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	K928.4
Ethanol reinst	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	5054.1
fluorescence mounting medium (Floureszenz Eindeck-Medium)	Dako (Hamburg)	S3023
Formaldehyd 4 % neutral gepuffert	VWR international (Radnor, PA, USA)	361387P

Gill's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	GHS332
H_2O_2	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	9681.4
ImmuMount	Thermo Scientific - Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	9990412
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	6752.4
Methanol	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	CP43.2
Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)	617004
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	P034.1
Normal Goat Serum	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab156046
Normal Rabbit Serum	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab166640
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	158127
PBS 10X	Gibco - Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	70011-051
Phosphomolybdänsäure	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	4440.3
Phosphotungstensäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	P6395
Pikrinsäure, gesättigt	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	P6744-1GA
Ponceau Biebrich-Scarlett	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	B6008
Roti-Liquid Barrier	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	
Roticlear	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	A538.5
Siriusrot (Direct Red)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	365548-5G
Tissue-Tek OCT compound	Sakura Finetek Germany (Staufen)	4583
TRIS buffer 1 M pH 8,0	Applichem (Darmstadt)	A4577
TRIS HCl	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	9090.3

Triton-X 100	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	3051.3
Wasser, nuklease-freies, DEPC-behandelt, steril und autoklaviert	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	T143.1
Wasserstoffperoxid (H_2O_2), 30 %	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	9681,4
Xylol	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	9713.3
Zinkformalin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	

3.6 Kits

Name	Firma	Bestell-nummer
AEC (3-Amino-9-Ethyl Carbazol) Peroxidase Substrate Kit	VectorLabs (Burlingame, Kalifornien, USA) (Burlingame, Kalifornien, USA)	SK4200
DAB Substrate Kit	VectorLabs (Burlingame, Kalifornien, USA)	SK4100
Fast Red Solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	F4523
Fast Red Substrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	F4523
VectaStain ABC-Kit Elite	VectorLabs (Burlingame, Kalifornien, USA)	PK-6100

3.7 Enzyme, Inhibitoren und Hormone

Reagenz	Firma	Bestell-nummer
Accutase StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent	Gibco® by Life Technologies™ (Carlsberg, CA, USA)	A1110501
Angiotensin II human	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	A9525-5MG
$CoCl_2$ (Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	7095.1
Proteinase K-Lösung peqGOLD (20 mg/ml)	Peqlab by VWR Life Science Competence Center (Erlangen)	04-1075
PTP1B Inhibitor	Calbiochem (San Diego, Kalifornien, USA)	539741

3.8 PCR, Umschreibung in cDNA

Reagenz	Firma	Art.-Nr.
DNA Polymerase *Go Taq® G2 Flexi* (5 U/µl) mit 5X Green *GoTaq®Flexi* Buffer und 25 mM $MgCl_2$	Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA)	M7806
Genotypisierungs-Primer (Sequenzen siehe Abschnitt 2.9)	Eurofins MWG Operon ECommerce – Eurofins Genomics, Ebersberg	
M-MLV Reverse Transkriptase mit M-MLV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer	Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA)	M1701
$MgCl_2$ (25 mM)	Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA)	A3511
PCR Folie QPCR-Hochtransparent	Sarstedt (Nürnbrecht)	95.1999
PCR Nucleotide Mix (10 mM dNTPs)	Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA)	C1145
qPCR-Primer (Sequenzen siehe Abschnitt 2.9)	Eurofins MWG Operon ECommerce – Eurofins Genomics, Ebersberg	
Random Hexamer Primer	Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA)	C1181
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (RNAse inhibitor; 40 U/µl)	Promega Corporation (Madison, Wisconsin, USA)	N2515
Rnase AWAY	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	A998.4
SYBR Green SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)	172-5274
Wasser, nuklease-freies, DEPC-behandelt, steril und autoklaviert	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	

3.9 PCR Primer

Genotypisierung

Name	Gen (Maus)	Sequenz 5‘-3‘	Produkt [bp]
PTP1B flox	PTP1Bfl	for- TGC TCA CTC ACC CTG CTA CAA rev- GAA ATG GCT CAC TCC TAC TGG	74
SMMHC-CreER^{T2}	SMWT1 SMWT2 phCREAS	TGA CCC CAT CTC TTC ACT CC AAC TCC ACG ACC ACC TCA TC AGT CCC TCA CAT CCT CAG GTT	129

qPCR Primer*

Name	Gen (Maus)	Sequenz 5‘-3‘	Produkt [bp]
Calponin 1	*Cnn1*	for- CCA GCA TGG CCA AGA CAA AAG rev- GGA TCA TAG AGG TGA CGC CG	190
Cyclin D1	*Ccnd1*	for- GTT CGT GGC CTC TAA GAT GAA GGA rev- CAC TTG AGC TTG TTC ACC AGA AGC	129
Desmin	*Des*	for- GTT TCA GAC TTG ACT CAG GCA G rev- TCT CGC AGG TGT AGG ACT GG	106
Myocardin	*Myocd*	for- CCA CCC CAG ACA TCA AAT CC rev- TGC ATC ATT CTT GTC ACT TTC TGA	86
PTP1B	*Ptpn1*	for- CAA AAA CCG GAA CAG GTA CC rev- TTT TTA TCA AGC TGG CAT TGA T	101
SM22 alpha	*Tagln*	for- GAC TGA CAT GTT CCA GAC TGT TGA C rev- CAA ACT GCC CAA AGC CAT TAG	85
SMA	*Acta2*	for - GGA CGT ACA ACT GGT ATT GTG C rev – CAA ACT GCC CAA AGC CAT TAG	178
β-Actin	*Actb*	for- GCA GGA GTA CGA TGA GTC CG rev- ACG CAG CTC AGT AAC AGT CC	74

* Die Spezifität der Primer wurde mithilfe von Primer-BLAST überprüft (https.//www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) und durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) hergestellt.

3.10 Antikörper und Chromogene

Primärantikörper	Wirt	Methode	Firma	Art.-Nr.
CD31 (Pecam 1)	rat, mAb	IHC	Dianova (Hamburg)	DIA-310
PCNA	mouse, mAb	IHC	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas)	sc-56
PDGFR-β	rabbit, mAb	IHC	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab32570
PTP1B	goat, pAb	IHC	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas)	sc-1718
PTP1B	rabbit, mAb	IF	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	ab52650
Smooth Muscle α-Actin (SMA)	mouse, mAb	IHC	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	A2547
TrkB	rabbit, pAb	IHC	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas)	sc-8316

Abkürzungen: mAb: monoclonaler Antikörper; pAb: polykloner Antikörper; IF: Immunfluoreszenz; IHC: Immunhistochemie

Sekundärantikörper	Methode	Firma	Art.-Nr.
Biotin-xx goat-anti-mouse IgG	IHC	Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA)	B2763
Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	IHC	Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA)	B2770
Biotin-xx goat-anti-rat IgG	IHC	Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA)	A10517
Biotin-xx rabbit-anti-goat IgG	IHC	Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oregon, USA)	A10518
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid), Kernfarbstoff	IF	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	6335
MFP555 donkey-anti-goat IgG	IF	MoBiTec GmbH (Göttingen)	A2432
MFP555 goat-anti-rabbit IgG	IF	MoBiTec GmbH (Göttingen)	A2428

3.11 Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinie	Firma
MOVAS (MOVAS-1) (ATCC® CRL-2797™) *Murine aortic smooth muscle cells*	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA

Zellkulturmedien MOVAS		
MOVAS-Kulturmedium	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC; 30-2002) enthält: - Glukose 4,5 g/l - Natriumbicarbonat 1,5 g/l	500 ml
	+ 0,2 mg/l G418 (Merck)	1667 µl
	+ 10 % FBS (Fetales Rinder Serum) (ATCC; 30-2020)	50 ml
MOVAS-Kulturmedium (reduziert)	DMEM (ATCC; 30-2002) + 0,2 mg/l G418 (Merck) + 0,5 % FBS (ATCC; 30-2020)	500 ml 1667 µl 2,5 ml
MOVAS-Einfriermedium	DMEM (ATCC; 30-2002) + 0,2 mg/l G418 (Merck) + 10 % FBS (ATCC; 30-2020) + 5 % DMSO	500 ml 1667 µl 50 ml 25 ml

3.12 Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Firma	Bestell-nummer
1X *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), pH 7.4, no Mg, no Ca	Gibco - Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)	10010056
DEPC Wasser	Carl Roth® GmbH + Co (Karlsruhe)	T143.1
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Zellkultur	Applichem (Darmstadt)	A3672,0100
TRI Reagent®	Ambion	AM9738
Cobalt(II) Chlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	C8661-100G

3.13 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Mauslinie	Herkunft/Erstbeschreiber
$PTP1B^{flox/flox}$	Bence KK et al. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. Nat Med 2006;12;917-924
$SMMHC.ER^{T2}$-Cre tg	Wirth A. et al. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. Nat Med 2008;14: 64-68
$SMMHC.ER^{T2}.Cre(+)PTP1B^{flox/flox}$	Der GVO wurde durch Verpaarung von $SMMHC.ER^{T2}$-Cre tg mit $PTP1B^{flox/flox}$ transgenen Mäusen erzeugt

Haltungsfutter und Spezialdiäten	Firma
Alleinfuttermittel für die Haltung von Mäusen R/M-H TARC Mainz: Extrudat (V1536)	Ssniff® Spezialdiäten GmbH (Soest)
Spezialfutter mit 400 mg Tamoxifen-Citrat / kg Futter (TD55125)	Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, IN, USA)

Käfig und Zubehör	Firma
TARC Mainz: Käfig Typ 2 (Laufbodenfläche 360 cm²; Höhe 14 cm; innenliegender Gitterdeckel mit herausnehmbarem Trennblech; Filterhaube; Trinkflasche)	ZOONLAB GmbH (Castrop-Rauxel)
Einstreu und Nistmaterial	Standardmaterial Versuchstiereinrichtung

Medikamente	Firma
Augensalbe *Bepanthen*®	Bayer AG, Leverkusen
Isofluran *Forene*® 100% (V/V) Inhalationsnarkotikum	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 % (steril, für Injektionen)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Isotone Natriumchloridlösung 0,9 % (steril, für Injektionen)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Ketamin 10 % (Injektionslösung) (als Ketaminhydrochlorid;1 ml Injektionslösung entsprechen 100 mg Ketamin)	Medistar Arzneimittelvertrieb (Ascheberg)
Xylazin 2 % (Injektionslösung) (als Xylazinhydrochlorid; 1 ml Injektionslösung entsprechen 20 mg Xylazin)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH (Burgdorf)

4 Methoden

4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

4.1.1 Genehmigung der tierexperimentellen Untersuchungen

Die Versuchstierhaltung und tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach §1 der Landesverordnung über Zuständigkeiten auf dem Gebiet des Tierschutzrechts (GVBl 2005 S. 146) vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt (Aktenzeichen 23 177-07 / G 16-1-081; Schreiben vom 20.10.2016).

4.1.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Während der Zucht und des Versuchszeitraums wurden die Mäuse unter kontrollierten Bedingungen im *Translational Animal Research Center* (TARC) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität gehalten. Die Haltung entsprach einer konventionellen Barrierehaltung mit kontrollierten Beleuchtungs- und Luftverhältnissen. Es wurden hierzu Typ 2-Käfige mit Filterhaube und einer Laufbodenfläche von 360 cm² verwendet. Ein 12 h/12 h Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Hellphase von 6:00 bis 18:00 Uhr wurde eingehalten. Die normale Lichtintensität lag bei 200 Lux, wobei diese für Arbeiten teilweise kurzfristig auf 400 Lux erhöht wurde. Die Raumtemperatur (RT) wurde konstant bei 22 ± 2°C gehalten und die relative Luftfeuchtigkeit betrug 60 ± 10 %.

4.1.3 Versuchsgruppen und Versuchsablauf

Die verwendeten Mauslinien sind in Kapitel 3.13 aufgeführt. Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden an zwei Versuchsgruppen und einer Kontrollgruppe durchgeführt. Die Versuchsgruppen gliederten sich in eine Knockout- und eine Wildtypgruppe auf. Es wurden ausschließlich männliche Wurfgeschwister verwendet.

Dabei hatten sowohl die Knockout- als auch die Wildtyp-Mäuse einen identischen genetischen Hintergrund. Es handelte sich um transgene Mäuse des Genotyps SMMHC.ER^{T2}.Cre(+)PTP1B$^{flox/flox}$. Beide Gruppen exprimierten eine, an das *Smooth Muscle Myosin Heavy Chain* (SMMHC) Gen gekoppelte Cre-Recombinase, die vor allem in glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird. Daneben wiesen sie ein „gefloxtes“ PTP1B-Gen auf. Dieses Vorgehen war notwendig, da aufgrund der Lokalisation des Transgens auf dem Y-Chromosom alle Männchen Cre-positiv waren. Die Induktion der Cre Recombinase-Aktivität und somit des Knockouts des PTP1B-Gens in SMMHC-exprimierenden Zellen erfolgte durch die Gabe eines speziellen Tamoxifen-haltigen Nagetierfutters. Diese Tiere werden als SMC.PTP1B-Knockout (SMC.PTP1B-KO) bezeichnet. Als Kontrollgruppe wurden SMMHC.ER^{T2}.Cre(+)PTP1B$^{flox/flox}$ transgene Tiere verwendet, die nicht mit Tamoxifenfutter gefüttert wurden (SMC.PTP1B-Wildtyp, SMC.PTP1B-WT). Die ausführliche Erläuterung der Verpaarung erfolgt in Kapitel 4.1.5

Eine weitere Kontrollgruppe bestand aus transgenen Mäusen mit dem Genotyp SMMHC.ER^{T2}-Cre tg (137). Tiere dieser Versuchsgruppe erhielten ebenfalls Tamoxifen-Futter, dass in diesem Fall aber nicht der Induktion eines Knockouts diente, da die Tiere kein „gefloxtes“ PTP1B-Transgen exprimierten. So sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte den Phänotyp durch das Tamoxifen-Futter und nicht durch den Knockout an sich hervorgerufen wurden.

Vor der Anwendung des $FeCl_3$-Modells (14) erfolgte die Induktion des glattmuskelzellspezifischen Knockouts von PTP1B in der SMC.PTP1B-KO-Gruppe. Im Alter von fünf bis sechs Wochen erfolgte dazu über einen Zeitraum von sechs Wochen die Gabe des speziellen Tamoxifen-Futters, während Tiere der SMC.PTP1B-WT-Gruppe im gleichen Zeitraum weiterhin das Standardfutter erhielt. Aufgrund der Eigenschaften von Tamoxifen als selektiver Östrogenrezeptormodulator erfolgte die Aktivierung des Östrogen-Rezeptors (ER) der an SMMHC-gekoppelten Cre-Recombinase. Nach Ablauf der sechs Wochen erhielten beide Versuchsgruppen für

eine Woche vor Induktion der Gefäßverletzung und für die restliche Dauer des Versuchs Standard-Mausfutter.

Im Anschluss erfolgte die Verletzung der linken Karotisarterien nach dem $FeCl_3$-Modell. Zum Zeitpunkt der Operation betrug das durchschnittliche Alter der Mäuse 12 Wochen. An Tag 21 nach der Gefäßverletzung erfolgte die Entnahme der verletzten linken sowie der kontralateralen, unverletzten Karotisarterie. Eine schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs ist der **Abbildung 4-1** zu entnehmen.

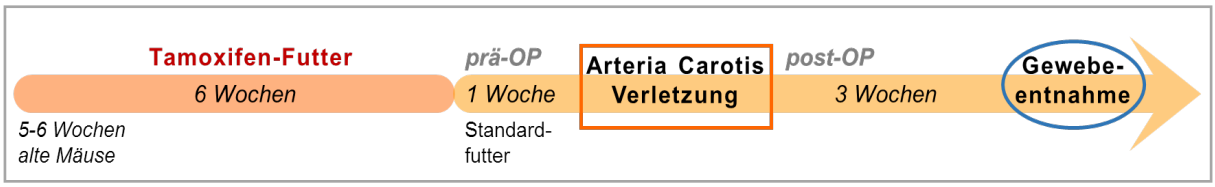

Abbildung 4-1: Zeitlicher Ablauf des Versuchs

4.1.4 Das Cre-loxP-System

Die Verwendung des Cre-loxP-Systems ermöglicht durch Verwendung einer Tamoxifen-induzierbaren Cre-Recombinase einen zell- und gewebsspezifischen Knockout. Zuvor wurden vor allem generalisierte Knockouts verwendet, die weniger spezifische Ergebnisse für bestimmte Fragestellungen lieferten. Zudem können mithilfe eines gewebsspezifischen Ansatzes mögliche Folgen eines Knockouts auf die embryonale Entwicklung vermieden werden. Außerdem wird auf diese Art und Weise die Betrachtung von ubiquitär exprimierten Genen in einem speziellen gewebsspezifischen Kontext ermöglicht. Die Cre-Recombinase steht für „*cyclization recombinase*“. Das Enzym wurde entwickelt, um Gensequenzen zwischen zwei loxP-markierten Stellen im Genom herauszuschneiden. LoxP steht für „*Locus of x-over P1 Bacteriophage*“. Es handelt sich dabei um eine Gensequenz auf P1-Bakteriophagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für den induzierbaren Knockout eine Glattmuskelzell-spezifische Cre-Recombinase des Typs $CreER^{T2}$ verwendet. Diese spezifische Cre-Recombinase ist mit einer mutierten Liganden-bindenden-Domäne (LBD) des Östrogen-Rezeptors verbunden. Der Promoter war in diesem Fall SMMHC.

Ohne Ligand ist sie somit inaktiv. Bindet jedoch Tamoxifen an der LBD, erfolgt eine Translokation in den Zellkern, wo eine Rekombination des loxP-geflankten Substrats

stattfinden kann. So wird durch Tamoxifen vor allem die Lokalisation, und damit indirekt auch die Aktivität der Cre-Recombinase, beeinflusst. Ein Effekt tritt ein, da es nur im Zellkern das passende Substrat für sie gibt. Neben der transgenen gewebsspezifischen Cre-Maus, wurde noch eine Maus benötigt, bei der PTP1B von loxP flankiert („gefloxt“) ist. Diese beiden verschiedenen Genotypen wurden miteinander verpaart, um Versuchstiere des gewünschten Genotyps zu erhalten (siehe Kapitel 4.1.5).

4.1.5 Generierung von SMMHC.Cre(+)PTP1B$^{flox/flox}$-Mäusen

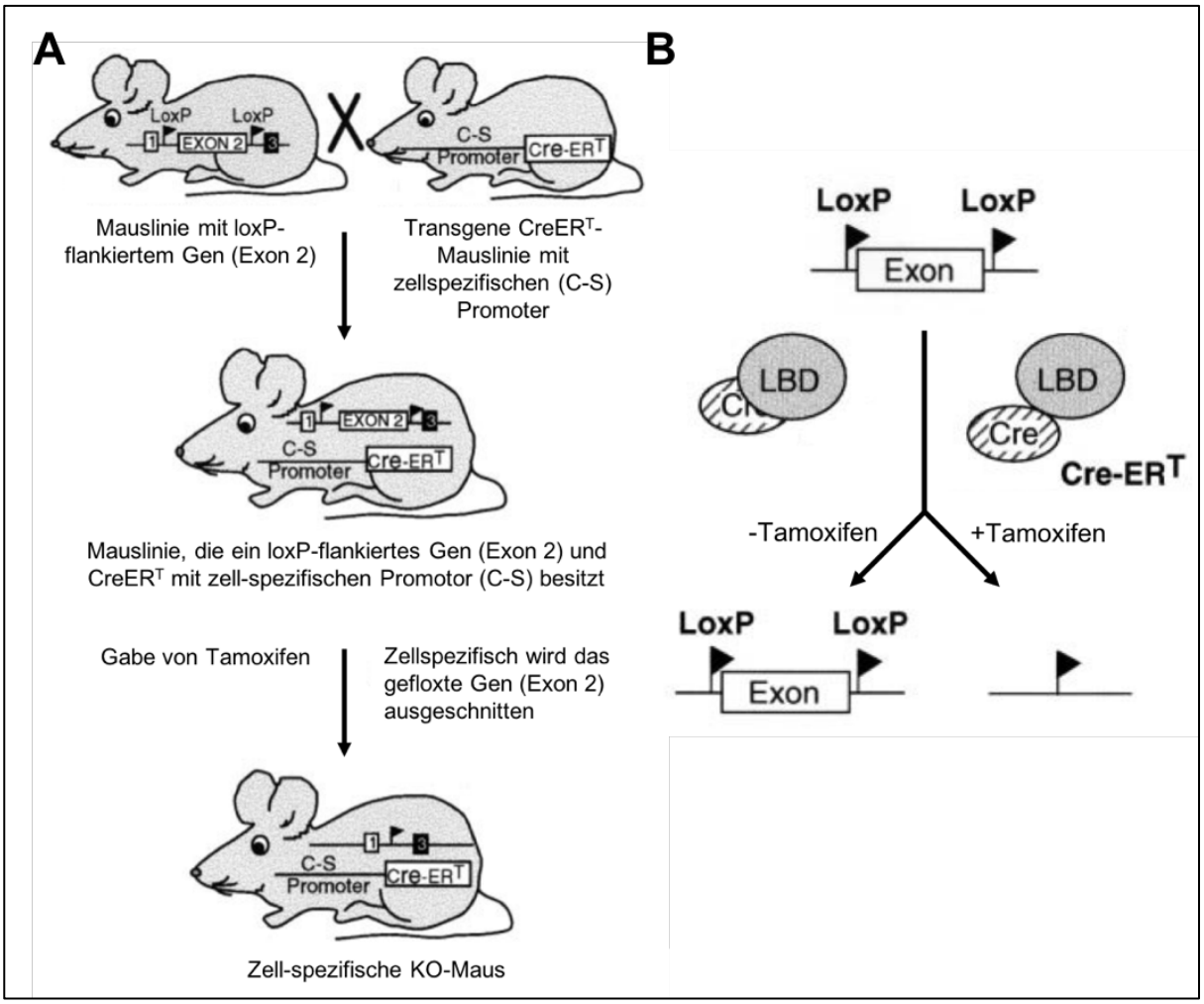

Abbildung 4-2: Schema des Cre-loxP-Systems zur Generierung von zellspezifischen Knockout-Mäusen.
(A) vereinfachtes Verpaarungsschema zur Kombination der gewebsspezifischen Cre-recombinase mit dem von loxP flankierten PTP1B-Gen. (B) Ausschneiden des markierten Genabschnitts durch Tamoxifen (über das Futter). Modifiziert nach Metzger et al., Methods, 2001 (138).

Zur Generierung eines zellspezifischen, induzierbaren Knockouts wurden zwei Mauslinien benötigt. Zum einen wurden männliche SMMHC.ER^{T2}.Cre tg-Mäuse (137) verwendet, bei denen eine Cre-Recombinase mit dem SMMHC-Promoter verbunden war. Zum anderen wurden weibliche PTP1B$^{flox/flox}$-Mäuse (139) verwendet, bei denen die Basenpaarsequenz des Proteins PTP1B von loxP flankiert war. Diese beiden Genotypen wurden verpaart, wodurch heterozygote SMMHC.ER^{T2}.Cre(+)PTP1B$^{flox/+}$-Mäuse entstanden. Diese besitzen sowohl die Cre-Recombinase als auch ein einzelnes Allel, das für PTP1Bflox positiv ist. Zur Erzeugung homozygoter SMMHC.ER^{T2}.Cre(+)PTP1B$^{flox/flox}$-Mäuse wurden männliche, heterozygote SMMHC.ER^{T2}.Cre(+)PTP1B$^{flox/+}$-Mäuse erneut mit weiblichen PTP1B$^{flox/flox}$-Mäusen verpaart. Das genaue Verpaarungsschema kann der **Abbildung 4-3** entnommen werden.

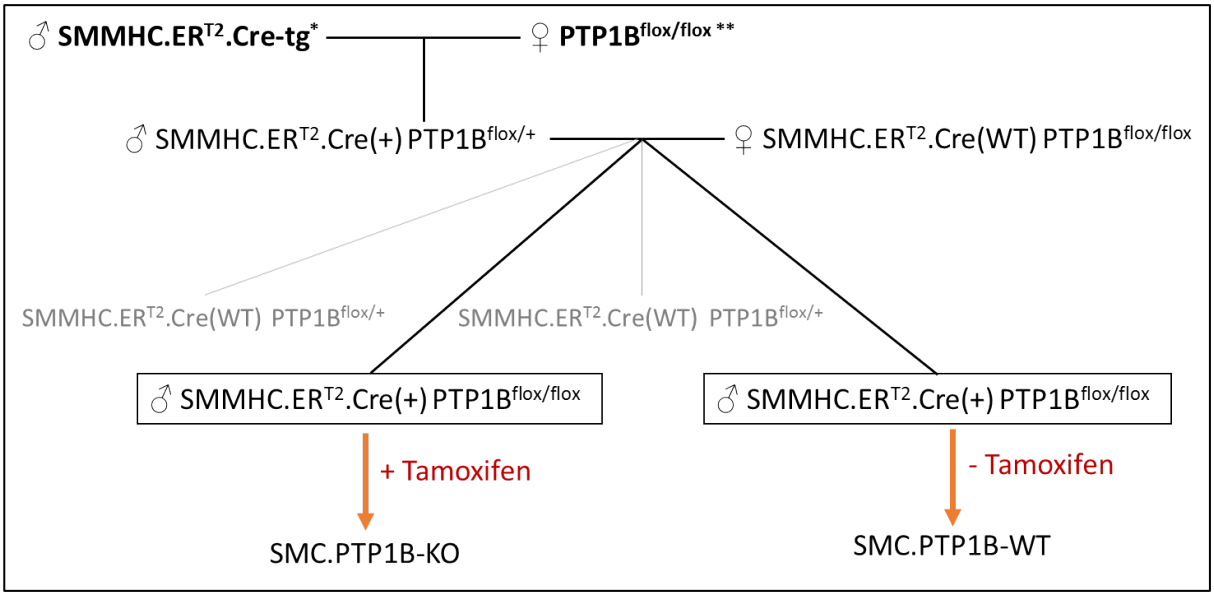

Abbildung 4-3: Generierung von Mäusen mit VSMC-spezifischem PTP1B-Knockout

4.1.6 Induzierung des zellspezifischen PTP1B-Knockouts

Zur Induzierung des Knockouts erhielten die Mäuse der Knockout-Gruppe in einem Alter von 5 bis 6 Wochen über einen Zeitraum von 6 Wochen spezielles Tamoxifen-Futter (Dosis: 400 mg/kg). Die Versuchstiere der Wildtyp-Gruppe erhielten weiterhin das Standardfutter. Dadurch kam es zur Aktivierung Cre-Recombinase, wodurch das PTP1B-Gen aus den glatten Muskelzellen ausgeschnitten wurde.

4.1.7 Genotypisierung

Die Genotypisierungen wurde von einer Medizinisch-Technischen Assistentin der Arbeitsgruppe durchgeführt. Diese erfolgten regelmäßig während der Weiterzucht der Mauslinie. Vor Versuchsbeginn wurde bei den Versuchstieren auf diese Art und Weise der der benötigte Genotyp SMMHC.Cre.ER^{T2}(+)PTP1B$^{flox/flox}$ gesichert.

Lyse

Zu Beginn wurden ca. 0,2 bis 0,3 cm der Schwanzspitzen der Mäuse mit 150 µl *Direct PCR® Lysis Reagent Tail* und 0,2 mg/ml Proteinase K versehen und im Thermomixer bei 55°C und 300 rpm (engl. *revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute) für 3-16 h über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für mindestens 45 min bei 85°C im Wasserbad ohne Schütteln inkubiert, um die Proteinase K zu deaktivieren und somit einen späteren Verdau der Taq-Polymerase zu verhindern. Nach der Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben für 10 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Die auf diese Art und Weise gewonnene genomische DNA konnte ohne weitere Schritte für die PCR-Reaktion verwendet werden.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Pro PCR-Ansatz wurden jeweils 5 µl des zuvor gewonnenen Lysats verwendet. Die dazugehörigen Pipettierschemata und PCR-Programme sind in den nachfolgenden Tabellen Tabelle 4-1 bis Tabelle 4-4 zu finden.

Gelelektrophorese

Um die PCR-Produkte aufzutrennen, wurde eine Gelelektrophorese mit Hilfe des Gelelektrophorese-Systems *Sub-Cell® GT* durchgeführt. Dabei wurden die DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Durch die negative Ladung der DNA wanderten die Fragmente zum Pluspol (Katode) und wurden durch die Poren des Agarose-Gels aufgetrennt, wobei größere Fragmente eine kürzere Strecke

zurücklegen, da sie stärker zurückgehalten werden. Somit kann man mithilfe einer DNA-Leiter die Größe der PCR-Produkte in Basenpaaren abschätzen.

Zuerst wurde ein 1,5-prozentiges Agarose-Gel hergestellt (1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer, Herstellung siehe Anhang 9.1). Die Lösung wurde in der Mikrowelle aufgekocht, bis sie klar wurde. Im darauffolgenden Schritt ließ man die Lösung auf 60°C abkühlen und gab 5 µl des DNA-interkalierenden Farbstoffs *Midori Green* hinzu und mischte die Lösung vorsichtig, unter Vermeidung von Bläschenbildung, durch. Danach wurde die Mischung in die nivellierte Gelschale des Gießstandes gegeben und die Kämme wurden angebracht. Im Anschluss ließ man das Gel für 20 bis 30 min auspolymerisieren und überführte es dann vorsichtig in die mit 1X TAE-Puffer befüllte Gelelektrophorese-Kammer, so dass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt war. Nach dem Entfernen der Kämme wurden 20 µl DNA-Marker (100 bp) und die einzelnen Proben aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte für eine Stunde bei 100 V. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die Ergebnisse in einer UV-Geldokumentationskammer aufgenommen.

Tabellen für Pipettierschemata und PCR Programme

Tabelle 4-1: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von PTP1Bflox

Reagenz	Volumen pro Ansatz (µl)	Finale Konzentration
nuklease-freies H_2O	8,80	-
5X Puffer	4,00	1x
$MgCl_2$ 25 mM	1,60	2,00 mM
dNTPs, je 10 mM	0,40	0,20 mM
10 µM Primer 1: **PTP1Bfl 1**	1,00	0,25 µM
10 µM Primer 2: **PTP1Bfl 2**	1,00	0,25 µM
DNA	3,00	0,05 U/µl
GoTaq-Flexi 5 U/µl	0,20	
Gesamtvolumen	20	

Tabelle 4-2: PCR-Pipettierschema für die Genotypisierung von SMMHC.CreER^{T2}

Reagenz	Volumen pro Ansatz (µl)	Finale Konzentration
nuklease-freies H_2O	5,8	-
5X Puffer	4	1x
$MgCl_2$ 25 mM	1,6	2,00 mM
dNTPs, je 10 mM	0,4	0,20 mM
10 µM Primer 1: **SMWT1**	1,2	0,60 µM
10 µM Primer 2: **SMWT 2**	0,6	0,30 µM
10 µM Primer 3: **phCREAS**	1,2	0,60 µM
DNA	0,2	0,05 U/µl
GoTaq-Flexi 5 U/µl	5	-
Gesamtvolumen	20	

Tabelle 4-3: PCR-Programm für die Genotypisierung von PTP1Bflox

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Aufheizen des Deckels	105 °C	durchgehend	-
Initiale Denaturierung	94 °C	2 min	-
Denaturierung	94 °C	30 s	35 Zyklen
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	90 s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	-
Kühlung	4 °C	halten	-

Tabelle 4-4: PCR-Programm für die Genotypisierung von SMMHC.CreER^{T2}

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Aufheizen des Deckels	105°C	durchgehend	-
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	-
Denaturierung	95°C	45 s	30 Zyklen
Annealing	58°C	45 s	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	-
Kühlung	4°C	halten	-

4.2 Anwendung des $FeCl_3$-Modells zur experimentellen Gefäßverletzung

Die Maus-OPs und Gewebeentnahmen wurden von einer wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe, durchgeführt. Die Gefäßverletzung erfolgte unter Verwendung des $FeCl_3$-Modells, wie in (14) beschrieben.

4.2.1 Anästhesie

Vor Durchführung der Anästhesie wurden die Tiere gewogen und das Körpergewicht notiert. Die Anästhesie während der Gefäßläsion und der Entnahme der Karotisarterien fand mit einer Mischung aus 20 IE (Internationale Einheiten) NaCl (Natriumchlorid) (B. Braun), 10 IE Ketamin S (Medistar Arzneimittelvertrieb) und 10 IE Xylazin (CP-Pharma) per intraperitonealer Injektion mithilfe einer Insulinspritze (B. Braun) statt. 40 IE entsprechen 1 ml. Da nur Männchen verwendet wurden, entsprach die Dosierung 1 IE pro 6 g KG (Körpergewicht). So erzielte man eine Narkosedauer von ca 1 Stunde.

Zur Schmerzstillung erhielten die Versuchstiere ab dem ersten prä-operativen bis zum fünften post-operativem Tag Metamizol (Novalgin®; 15 Tropfen auf 250 ml) über das Trinkwasser. Bei einem Volumen von ca. 1 ml pro 20 Tropfen und einer Wirkstoffkonzentration von 500 mg pro ml entspricht die Dosierung ungefähr 1,5 mg/ml. Leidende Tiere wurden schmerzfrei getötet (mittels Genickbruch unter tiefer Anästhesie).

4.2.2 Durchführung des $FeCl_3$ Modells

Vor Beginn der Operation wurde das OP-Gebiet hergerichtet. Auf einer Wärmeplatte wurden dafür zwei Korkplatten in einem Abstand von 3-4 cm nebeneinander angeordnet und fixiert. Die Maus wurde an den Vorder- und Hinterläufen mithilfe von Fixierpflastern (Leucosilk ®) auf den Korkplatten fixiert. Der Unterkiefer der Maus wurde mittels eines weiteren Fixierpflasters leicht überstreckt, jedoch ohne dass der Hals zu stark unter Spannung stand.

Anschließend wurde das Operationsgebiet großzügig mit 70 % Ethanol gereinigt und das Fell der Maus zur Seite gestrichen. Zu Beginn der Operation wurde mithilfe einer Pinzette die Haut oberhalb der *Incisura jugularis* gegriffen und mit einer Schere ein kleiner Hautschnitt gesetzt. Dieser wurde anschließend auf eine Länge von ca. 1-1,5 cm erweitert. Danach wurde mit einer groben gebogenen Pinzette das OP-Gebiet seitlich erweitert und die beiden Schilddrüsenlappen zur Seite bewegt. Um die Schilddrüse aus dem OP-Gebiet zu bewegen, musste zudem die Bindegewebsbrücke zwischen den beiden Lappen getrennt werden. Um das Gebiet offen zu halten und zu erweitern, wurden zwei Haltehebel, bestehend aus jeweils einer aufgebogenen Büroklammer, die mittels einer Heftklammer auf der Korkplatte fixiert wurde, verwendet.

Um in die Tiefe des Gewebes zur linken *Arteria carotis* zu gelangen, wurden mithilfe einer feinen gebogenen Pinzette die einzelnen Faszien grob durchtrennt. Anschließend wurde der *Nervus vagus* aufgesucht, der in der Regel dorsal der *A. carotis* liegt. Dieser wurde vorsichtig gegriffen und danach die Faszie zwischen *Vena jugularis*, *A. carotis* und dem Nerv durch leichtes Spreizen mit der Pinzettenspitze durchtrennt. Sobald die Faszie soweit wie möglich nach kranial und kaudal gelöst war, wurde die Karotisarterie mit zwei Ethylonfäden unterzogen. Der obere Faden lag auf Höhe der Bifurkation, der untere Faden befand sich auf Höhe des Dreiecks zwischen dem *Musculus sternocleidomastoideus* und der Trachea. Durch Ziehen an den beiden Fäden wurde die Karotisarterie in der Länge dargestellt und leicht angehoben.

Anschließend wurde ein Stück Filterpapier (etwa 1 mm x 0,5 mm) in 10 %-iger $FeCl_3$-Lösung getränkt und ventral auf der Arterie platziert, ohne das umliegende Gewebe zu berühren. Nach drei Minuten wurde das Filterpapier mit einer Pinzette entnommen und die Arterie mit PBS (engl. *phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte

Kochsalzlösung) mit einer Transferpipette umspült. Die Spüllösung wurde hierbei für mindestens 10 min im Operationsgebiet belassen. In dieser Zeit wurde der Thrombosierungsgrad der Läsionsstelle minütlich visuell kontrolliert. Nach ca. 7-8 min stellte sich in der Regel ein gelblicher Thrombus auf der ganzen Länge der Läsionsstelle dar. Nach dem Absaugen der Spüllösung wurde die Arterie wieder in die physiologische Lage gelegt und die Haltehebel wurden entfernt. Zum Schluss wurden die Schilddrüsenlappen wieder über das *Trigonum caroticum* gelegt und das Gebiet mit drei bis vier Stichen durch eine Hautnaht verschlossen. Anschließend wurde die Maus zum Aufwachen in einen sauberen, leeren Käfig überführt, der auf einer Wärmeplatte stand und seitlich von einem Infrarotlicht erwärmt wurde. Nach jedem Eingriff wurden sowohl der Operationstisch als auch alle Instrumente mit 70 % Ethanol gereinigt.

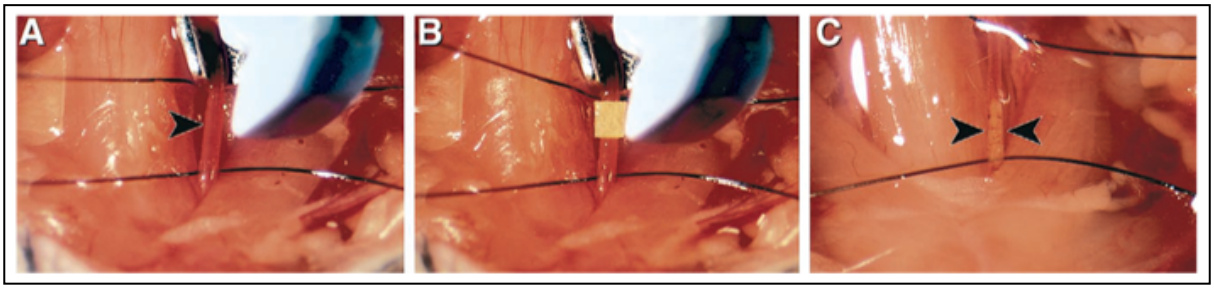

Abbildung 4-4: Mausmodell der $FeCl_3$-induzierten Gefäßverletzung der *Arteria carotis communis sinister* (aus: Konstantinides S. et al., Circulation 2001) A: linke *A. carotis*, die durch zwei Fäden von der Umgebungsstruktur separiert wird. B: mit $FeCl_3$-getränktes Filterpapier auf der linken *A. carotis*. C: Ein gelblicher Thrombus ist in der Länge der Läsionsstelle zu erkennen.

4.2.3 Entnahme der Karotisarterien am Versuchsende

Nach 21 Tagen wurden jeweils die linke (verletzte) und die rechte (unverletzte) Karotisarterie entnommen. Die Präparation erfolgte in gleicher Weise wie bei Anwendung des $FeCl_3$-Modells, wobei besondere Sorgfalt auf die Präparation der Blutgefäße gelegt wurde, da aufgrund der vorherigen Operation Vernarbungen des Gewebes bestanden. Zunächst wurden die Karotisarterien mit je zwei Ethylonfäden angehoben und soweit wie möglich proximal des Herzens gelöst. Nach der Präparation der Arterien wurde das Herz mit einer 27G-Kanüle und einer 1 ml Spritze punktiert und ca. 1,0 ml Blut entnommen. Dafür wurde unterhalb des *Xyphoids* durch die Haut der Thorax punktiert und in ein Eppendorf Tube umgefüllt. Nach Gerinnung und Zentrifugation (10 min bei 3.000 rpm) wurde der Überstand (Serum) erneut in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Messungen im Serum vorgenommen. Im nächsten Schritt wurde die Haut über dem Thorax entfernt und der Thorax eröffnet. Die *Vena cava* und der *Oesophagus* wurden unterhalb des Herzens durchtrennt. Anschließend erfolgte die Punktion des linken Ventrikels mit einer 23G Flügelkanüle (Venofix® Safety; B. Braun; Best-Nr. 4056503-01). Die korrekte Lage der Kanüle wurde durch Aspiration von Blut sichergestellt. Nach der Positionierung der Kanüle wurden durch eine angeschlossene Spritze ca. 1-2 ml Zink-Formalin langsam in den Kreislauf der Maus injiziert Zudem wurden auch einige Tropfen Zink-Formalin auf das Präparationsgebiet am Hals geträufelt und mindestens eine Minute gewartet. Im Anschluss wurden mit einer frischen Skalpellspitze unter mikroskopischer Kontrolle die Arterien jeweils in Höhe der Bifurkation durchtrennt und aus ihrer Faszie gelöst. Unter Zug der Arterie in Richtung kranial wurde diese ca. 1 mm unterhalb der Läsionsstelle durchtrennt. Nach der Entnahme wurden die Arterien in einen verschließbaren Glasbehälter mit Zink-Formalin überführt. So verblieben die Arterien für ca. 4 h in dem Glasbecher und wurden danach in 70 % Ethanol überführt und später in Paraffinwachs eingebettet.

4.3 Gewebeaufbereitung

4.3.1 Einbettung und Anfertigung von Paraffinschnitten

Nach Entnahme der Karotisarterien der Mäuse wurden diese zunächst in ein verschließbares Glasgefäß mit 15 ml Zinkformalin (Zinc Formal-FIXX™; Sigma Z2902-3,75L) gegeben und der Maus-Nummer (lt. Labor-internem Maus-Operations-Dokumentationsbuch) sowie Datum und Uhrzeit) gekennzeichnet. Nach mindestens 24-stündiger Inkubation (maximal 7 Tage) bei 4°C erfolgte die Überführung in eine Einbettkapsel. Dazu werden die Karotisarterien zunächst für 15 min mit Aq. dest. gespült und anschließend in 70 % Ethanol überführt. Bis zur Einbettung wurden die Arterien bei 4°C gelagert.

Vor dem Einbetten wurden die Kapseln für 3 h fließend gewässert. Die Einbettung des Gewebes erfolgte durch den Einbettautomaten nach dem folgenden Schema:

Tabelle 4-5: Einbettung von Paraffinschnitten

	Schritt	Reagenz	Dauer
1		Aq. dest.	5 min
		Aq. Dest.	30 min
2	Entwässern	70 % Ethanol	2 h
		80 % Ethanol	2 h
		96 % Ethanol	2 h
		96 % Ethanol	2 h
		100 % Ethanol	2 h
		100 % Ethanol	2 h
3	Intermedium	Histoclear	2 h
		Histoclear	2 h
4	Einbetten	Paraffin	2 h
		Paraffin	4 h

Nach der Einbettung wurde das Gewebe in einen Paraffinblock ausgegossen.

Nach der Einbettung in Paraffinblöcke wurden 5 µm-dicke Serienschnitten mithilfe eines Mikrotoms (Leica Microsystems; RM2245) angefertigt. Die Schnittrichtung erfolgte von proximal nach distal in Richtung Karotisbifurkation. Zunächst wurde der

Beginn der $FeCl_3$-induzierten Veränderungen des „normalen“ Gefäßaufbaus aufgesucht (z.B. erkennbar an einer Verdickung der Media, Entstehung einer Neointima). Dieser Abschnitt markierte den Startpunkt, von dem in regelmäßigen Abständen bis zu dem Punkt geschnitten wurde, an dem wieder gesundes Gewebe und eine physiologische Gefäßmorphologie vorherrschten. Auf jeden Objektträger (Superfrost Ultra; Thermo Scientific; J3800AMNZ) wurden je vier Paare von linken und rechten Karotisarterien aufgetragen. Nach dem Schneiden und Aufziehen der Paraffinschnitte auf die Objektträger trockneten diese über Nacht bei 60°C im Wärmeschrank (*Heratherm*, Thermo Fisher Scientific) aus.

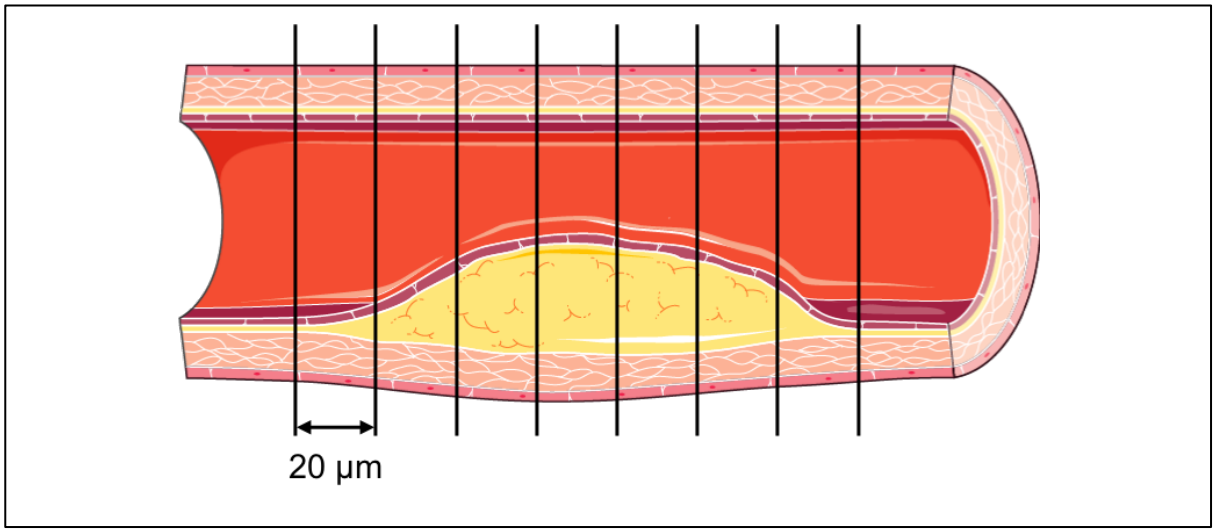

Abbildung 4-5: Schematische Darstellung der angefertigten Serienschnitte.
Die Serienschnitte wurden in einem regelmäßigen Abstand von 20 µm zur morphometrischen Auswertung begutachtet. Modifizierte Darstellung erstellt mithilfe der *Powerpoint image bank* von *Servier Medical Art*.

4.3.2 Einbettung und Anfertigung von Gefrierschnitten

Gefrierschnitte werden zur Untersuchung von Formalin-empfindlichen Enzymen benötigt. Im Falle dieser Arbeit wurden sie zum Nachweis von PTP1B durch Immunfluoreszenz verwendet. Die Einbettung von Gefrierschnitten erfolgt nach einem anderen Prinzip als die für Paraffinschnitte. Bereits vor Entnahme des Gewebes werden die Mäuse zunächst für 1 min mit 1 % Paraformaldehyd perfundiert. Anschließend erfolgt eine Perfusion mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min. Nach der Gewebeentnahme wurde das Gewebe sofort in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube oder ein 15 ml Falconröhrchen mit Paraformaldehyd überführt und auf Eis gelagert. Danach erfolgt eine zweistündige Inkubation auf einem Schüttler bei RT. Nach der Inkubation wurde das Gewebe 3-mal mit 1X PBS gewaschen, um möglich Blutrückstände zu entfernen. Nach dem Waschen erfolgt eine Inkubation in Saccharose-Lösung mit aufsteigender Konzentration. Zu Beginn werden die Proben bei 4°C auf dem Multi-Rotator in einer 15-prozentigen Saccharose-Lösung inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben in 30-prozentige Saccharose-Lösung überführt und inkubierten erneut für 24 Stunden. Nach der Inkubation werden die Proben mittels Tissue-Tek OCT compound (Sakura, 4583) in Einbettkassetten (10x10x5mm; Biopsy) eingebettet. Diese härteten bei -80°C aus und wurden anschließend bei -80°C gelagert.

Vor dem Färben des Gewebes wurden Gewebeschnitte mithilfe eines Kryotoms (Leica) angefertigt. Die Schichtdicke betrug 8 µm und jeweils 4 Schnitte wurden pro Objektträger aufgebracht. Die fertigen Kryoschnitte wurden bei -20°C gelagert.

4.4 Histologische Färbungen

Die histologischen Färbungen erfolgten auf Paraffinschnitten. Davor musste eine Entparaffinierung durchgeführt werden. Dazu wurden die Objektträger drei Mal für je 5 Minuten in Xylol getaucht. Anschließend folgte eine absteigende Alkoholreihe: 2-mal 100 % EtOH, 2-mal 96 % EtOH, 70 % EtOH und 50 % EtOH für jeweils 2 Minuten. Danach wurden die Objektträger in dH_2O überführt und dort 5 Minuten gewässert.

Tabelle 4-6: Protokoll zum Entparaffinieren und Wässern von Paraffinschnitten

	Schritt	Reagenz	Dauer
1	Entparaffinieren	Xylol	3 x 5 min
2	absteigende Alkoholreihe	100 % EtOH	2 x 2 min
		96 % EtOH	2 x 2 min
		70 % EtOH	2 x 2 min
		50 % EtOH	2 x 2 min
3	Wässern	dH_2O	5 min

4.4.1 Verhoeffs Elastica–Masson-Trichrom-Färbung (VES-MTC)

Zur Beurteilung der Gefäßmorphologie wurde die VES-MTC-Färbung verwendet, da sich diese sehr gut zur Beurteilung von Blutgefäßen eignet. Vor allem lassen sich die einzelnen Gefäßschichten sehr gut voneinander abgrenzen, da sich die Elastica schwarz, Muskelgewebe rot und Bindegewebe blau anfärbt. Durch die MTC-Färbung lassen sich Fibrin, Muskel und Bindegewebe farblich voneinander unterscheiden.

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte bei RT über Nacht in Bouin's Fixative nachfixiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Waschschritt mit fließendem Leitungswasser. Danach wurden die Schnitte für 15 Minuten in Verhoeffs-Elastica-Färbelösung getaucht und anschließend für 20 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Zur Differenzierung wurden die Schnitte für 2-3 Minuten in 2 % Eisenchlorid und darauffolgend für 5 Minuten in 5 % Natriumthiosulfat getaucht. Anschließend erfolgt eine zweiminütige Färbung in Biebrich-Scarlet-Acid-Fuchsin. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte erneut mit dH_2O gewaschen und danach mit Phosphomolybden-Phosphotungsten-Lösung differenziert. Abschließend wurden die Schnitte mit Anilinblau gegengefärbt, mit dH_2O gewaschen und mit 1% Essigsäure

differenziert. Nach der Färbung erfolgten das Entwässern, Klären und Eindecken der Schnitte. Das genaue Protokoll kann der nachfolgenden Tabelle entnommen werden (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7: Verhoeffs Elastica-Masson-Trichrom-Färbung

	Schritt	Lösung	Zeit
1	Nachfixieren	Bouin's Fixative	über Nacht bei RT
2	Waschen	Fließendes Leitungswasser	Bis klar
3	Färben	Verhoeffs Elastica Farblösung	15 min
4	Bläuen/Waschen	fließendes Leitungswasser	20 min
5	Spülen	dH_2O	kurz spülen
6	Differenzieren	2 % Eisenchlorid	2 min
7		5 % Natriumthiosulfat	5 min
8	Färben	Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin	2 min
9	Waschen	dH_2O	bis klar
10	Differenzieren	1,25 % Phosphomolybden-Phosphotungsten-Lösung	12-15 min
11	Gegenfärben	2,5 % Anilinblau Lösung	8-10 min
12	Waschen	dH_2O	bis klar
13	Differenzieren	1 % Essigsäure	3 min
14	Entwässern über aufsteigende Alkoholreihe	96 % EtOH	2 x 30 sec
		100 % EtOH	2 x 2 min
15	Klären	Xylol	je 2x 5 Min
16	Eindecken	Entellan /Eukitt	

4.4.2 Picrosiriusrot zur Anfärbung von Kollagen

Die Siriusrot-Färbung wurde verwendet, um Kollagen unter anzufärben. Mithilfe eines Polarisationsfilters lassen sich Kollagenfasern unter dem Mikroskop orangerot darstellen. Im Gegensatz zum Standardprotokoll zum Eindecken histologischer Schritte erfolgt bei der Picrosiriusrotfärbung das Entwässern nicht über eine aufsteigende Alkoholreihe, sondern in drei aufeinanderfolgenden Bädern in 100 % EtOH. Das Eindecken erfolgt ansonsten nach demselben Schema.

Tabelle 4-8: Picrosiriusrot zur Anfärbung von Kollagen

	Schritt	Lösung	Zeit
1	Färbung	1 % Picrosiriusrot-Lösung (wiederverwendbar)	60 min
2	überschüssige Färbung auf Tuch abtropfen		
3	Spülen	30 % Essigsäure	2 x 1 min
4	Spülen	dH_2O	kurz
5	Entwässern	100 % Ethanol	3 x 3 min
6	Klären	Xylol	je 2 x 5 Min
7	Eindecken	Entellan /Eukitt	

4.5 Immunhistochemische Färbungen

4.5.1 Prinzip immunhistochemischer Färbungen

Immunhistochemische Färbungen beruhen auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper Bindung. Hierbei kommen Antikörper des Typs Gamma-Immunglobuline (IgG) zum Einsatz. Diese kann man sich schematisch γ-förmig vorstellen. Die beiden „Äste“ stellen das sogenannte Fab-Fragment (engl. *Fragment-antigen-binding*, Antigen-bindendes Fragment) dar, das an bestimmte Antigene bindet. Der „Stamm“ ist das Fc-Fragment (engl. *fragment crystallizable*, kristallisierbares Fragment) und stellt die konstante Region des Antikörpers dar. Es weist selber Eigenschaften eines Antigens auf, die für alle Antikörper einer Spezies identisch sind. Hieran können sogenannte Sekundärantikörper binden, die für den indirekten immunhistochemischen Nachweis benötigt werden. Sekundärantikörper sind in der Regel biotinyliert. Die Biotinylierung ermöglicht, dass der Avidin-Biotin-Komplex (engl. *Avidin-Biotin-Complex,* ABC) an sie binden kann. Er besteht aus Avidin, Biotin und einem Enzym (hier: Peroxidase). Die Enzyme des ABC-Komplexes sind in der Lage ein Chromogen, wie zum Beispiel DAB (3,3'-Diaminobenzidin) oder AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol), enzymatisch umzuwandeln und die nachzuweisenden Antigene durch einen Farbumschlag sichtbar zu machen.

4.5.2 Ablauf der immunhistochemischen Färbungen

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden ausschließlich Paraffinschnitte verwendet. Die Herstellung der verwendeten Lösungen ist im Anhang 9.1 beschrieben. Zu Beginn wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden sie für jeweils 2 min in 100 % Ethanol getaucht. Danach fand die Blockierung der endogenen Peroxidase statt. Dazu wurden die Proben in 3 % H_2O_2 in Methanol getaucht und für 10 min unter einer lichtundurchlässigen Abdeckung inkubiert. Nach der Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte das Wässern der Gewebeschnitte mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe. Dazu wurden die Proben jeweils für zweimal 2 min in 96 % Ethanol, 70 % Ethanol und 50 % Ethanol getaucht und abschließend in dH_2O gewässert. Nach dem Wässern erfolgte gegebenenfalls eine Permeabilisierung des Gewebes, um die Bindung der Antikörper an Epitope zu

erleichtern. Danach erfolgt das *Heat Induced Epitope Retrieval* (HIER) zur Freilegung des Antigens. Hierzu wurden die Proben in einer verschließbaren, mit 500 ml Pufferlösung gefüllten Box für 11 min bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt. Nach einem 20-minütigem Abkühlen in der Pufferlösung wurden die Schnitte in 1X PBS überführt (engl. *Phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung) und mit Roti-Liquid-Barrier eingezirkelt. Durch die Umrandung entstand eine Flüssigkeitsbarriere um die einzelnen Schnitte, was das ungewollte „Verlaufen" verhinderte und das Mitführen einer Negativkontrolle ermöglichte. Nach dem Einzirkeln erfolgte die Blockierung des Sekundärantikörpers mithilfe von NGS (engl. *Normal goat serum*, Normales Rinderserum) oder BSA (Bovines Serumalbumin) für 30 min. So wurden freie unspezifische Bindungsstellen blockiert, damit der Sekundärantikörper nicht an diese bindet und ein falsch positives Ergebnis liefert. Nach der Blockierung erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei einer Temperatur von 4°C über Nacht (in einer feuchten Kammer, um das Austrocknen zu vermeiden).

Am zweiten Tag der immunhistochemischen Färbungen wurden die Proben zunächst dreimal für jeweils 5 min in 1X PBS gewaschen, um ungebundene Reste des Primärantikörpers abzulösen. Danach wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist und an dessen F_C-Fragment bindet. Nach der Inkubation bei RT für 60 min erfolgte eine erneute dreimalige Waschung in 1X PBS für jeweils 5 min. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem VectaStain® ABC-Kit Elite, das mindestens 30 min zuvor frisch angesetzt wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen in 1X PBS wurde das Chromogen hinzugegeben. Nach Eintreten eines Farbumschlags wurde die Reaktion durch 5-minütiges Waschen in dH_2O beendet. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung durch dreimaliges kurzes Eintauchen in Hämatoxylin nach Gill. Dann wurden die Proben unter fließendem Leitungswasser gewaschen und gebläut, bis kein Färbemittel mehr abgelöst werden konnte. Vor der Eindeckung erfolgte ein 5-minütiger Waschschritt in dH_2O. Proben, für die das Chromogen AEC verwendet wurde, konnten direkt nach dem Spülen in dH_2O mit dem wässrigen Eindeckmedium ImmuMount eingedeckt werden. Mit dem Chromogen DAB behandelte Proben wurden mussten über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert werden und wurden danach mit Entellan eingedeckt. Die Schritte sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 4-9: Entwässern und Eindecken immunhistochemischer Schnitte bei Verwendung des Chromogens DAB

	Schritt	Lösung	Zeit
1	Entwässern über aufsteigende Alkoholreihe	96 % EtOH	2 x 2 min
2		100 % EtOH	2 x 2 min
3	Klären	Xylol	je 2 x 5 min
4	Eindecken	Entellan/Eukitt	

Tabelle 4-10: spezifische Färbungen zum immunhistochemischen Nachweis

Färbung	Primär AK	Firma, Best.-Nr.	Verdünnung in Medium	HIER	Permeabi-lisierung	Dauer Permeabi-lisierung	Blockierung Sekundär-AK	Sekundär-AK	Ver-dünnung	Chromo-gen	Inkubations-zeit Chromogen
BDNF	rabbit anti-mouse BDNF	Abcam, ab108319	1:250 in 1X PBS	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	nein	/	10 % NGS in 1X PBS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	1:1.000 in 1X PBS	AEC-Kit	7 min
F4/80	rat anti-mouse F4/80	Bio-Rad, MCA497GA	1:200 in 1X PBS	10 mM Tris / mM EDTA (pH 9,0)	nein	/	5 % NGS in 1x 1X PBS	Biotin-xx goat-anti-rat IgG	1:1.000 in 1X PBS	DAB-Kit	7 min
NG2	rabbit anti-mouse NG2	Abcam, ab129051	1:200 in AB-Diluent	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	nein	/	1 % BSA in 1X PBS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	1:1.000 in 1X PBS	AEC-Kit	10 min
PCNA	mouse anti-mouse PCNA (PC10)	Abcam, ab92552	1:500 in 1X PBS	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	0,05 % Triton-X100	15 min bei 37°C	10 % NGS in 1X PBS	Biotin-xx goat-anti-mouse IgG	1:1.000 in 1X PBS	DAB-Kit	2 min 15 s
PDGFR-β	rabbit anti-mouse PDGFR-β	Abcam, ab32570	1:100 in 1X PBS	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	Nein	/	10 % NGS in 1X PBS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	1:1.000 in 1X PBS	DAB-Kit	10 min
Pecam-1 (CD31)	rat anti-mouse Pecam-1 (CD31)	SantaCruz, sc18916	1:20 in AB-Diluent	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	0,05 % Triton-X100	10 min bei 37°C	5 % NGS in 1X PBS	Biotin-xx goat-anti-rat IgG	1:1.000 in 1X PBS	AEC-Kit	20 min
PTP1B	rabbit anti-mouse PTP1B	Abcam, ab189179	1:100 in 1X PBS	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	nein	/	10 % NGS in 1X PBS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	1:1.000 in 1X PBS	AEC-Kit	10 min
SM α-Actin	mouse anti-mouse SM α-Actin	Sigma, A2547	1:500 in 1X PBS	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	Nein	/	10 % NGS in 1X PBS	Biotin-xx goat-anti-mouse IgG	1:1.000 in 1X PBS	AEC-Kit	10 min
TrkB	rabbit anti-mouse TrkB	Santa Cruz, sc8316	1:200 in 1X PBS	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)	0,05 % Triton-X100	10 min bei 37°C	5 % NGS in 1X PBS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	1:1.000 in 1X PBS	DAB-Kit	10 min

4.5.3 Qualitätssicherung der Immunhistochemie

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der Immunhistochemie gleichbleibend und nicht falsch-positiv beziehungsweise falsch-negativ sind, wurden mehrere Maßnahmen der Qualitätssicherung angewendet. So wurde zum einen bei jedem Färbevorgang ein bestimmtes Gewebe mitgeführt, das die gesuchten anzufärbenden Strukturen enthält und für das bereits eine positive Reaktion gesichert ist. Zudem enthielt jeder Objektträger eine Negativkontrolle. In diesem Fall wurde immer der linke Schnitt von den vier Gewebeschnitten jedes Objektträgers mit 1X PBS anstatt mit dem Primärantikörper inkubiert, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Des Weiteren wurde die endogene Peroxidase mithilfe 3 % H_2O_2 in 100 % Methanol blockiert, um Reaktionen derselben mit dem Chromogen und damit falsch-positive Ergebnisse zu verhindern. Außerdem wurden mögliche unspezifische Bindungsstellen des Sekundärantikörpers durch Normalseren der gleichen Spezies blockiert. So wurde beispielsweise NGS verwendet, wenn es sich beim Sekundärantikörper um einen Ziege-anti-Maus-Antikörper handelte. Zur allgemeinen Qualitätssicherung wurden nur standardisierte und erprobte Protokolle mit festen Inkubationszeiten für die jeweiligen Färbungen verwendet, so dass zwischen den einzelnen Chargen Vergleichbarkeit gewährleistet war.

4.6 Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie die indirekte Immunhistochemie, jedoch ist der Sekundärantikörper nicht biotinyliert, sondern mit einem Chromogen verbunden, das unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge in einer bestimmten Farbe zurückstrahlt. Durch dieses Verfahren ist es möglich, mehrere Zielstrukturen gleichzeitig anzufärben.

Für Immunfluoreszenz wurden ausschließlich Gefrierschnitte verwendet. Diese wurden zunächst für 5 min bei RT aufgetaut und anschließend für 5 min in 1X PBS gewässert. Nach dem Wässern erfolgte eine 10-minütige Nachfixierung mit Aceton bei -20°C. Nach einer Verdunstungszeit von 5 min wurden die Proben erneut für 5 min in 1X PBS gewässert. Danach erfolgte die Permeabilisierung mit Triton-X bei 37°C. Die genauen Inkubationszeiten können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden. Im Anschluss wurden die Objektträger drei Mal für jeweils 5 min in 1X PBS gespült. Nach dem Spülen wurden die einzelnen Proben mit Roti-Liquid Barrier eingezirkelt. Anschließend erfolgte die Blockierung des Sekundärantikörpers mithilfe eines Normalserums wie beispielsweise *Normal Donkey Serum* (NDS, Normales Eselserum). Danach erfolgte die Inkubation mit den/dem Primärantikörper(n), die über Nacht bei 4°C.

Am zweiten Tag wurden die Proben zu Beginn dreimalig für jeweils 5 min in 1X PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern und DAPI für 60 min bei RT in einer abgedunkelten Box. Nach der Inkubation erfolgte dreimaliges fünfminütiges Waschen in 1X PBS und zweiminütiges Spülen in Aq. dest.. Zum Schluss wurden die Objektträger mit dem wässrigen Eindeckmedium Roti®-Mount FluoCare eingedeckt und über Nacht lichtgeschützt bei 4°C ausgehärtet.

Tabelle 4-11: spezifische Antikörper Immunfluoreszenz

Färbung	Primär AK	Verdünnung in 1x PBS	Permeabilisierung	Blockierung Sekundär-AK	Sekundär-AK
PTP1B	Goat-anti-mouse PTP1B IgG	1:25	0,05 % Triton-X in 1X PBS für 10 min bei 37°C	5 % NDS in 1X PBS für 45 min	555-donkey-anti-goat IgG 1:5.000 in 1X PBS DAPI 1:5.000 in 1X PBS

4.7 Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen

4.7.1 Morphometrische Analyse der Neointima-Bildung

Zur morphometrischen Analyse der Neointima-Bildung wurden pro Versuchstier jeweils vier bis sechs Paraffinschnitte verwendet. Je nach Ausdehnung (Länge) der Gefäßläsion wurde jeder siebte bis zehnte Objektträger verwendet, was einem Abstand zwischen den einzelnen Objektträgern von ca. 140 bis 200 µm entsprach. Diese Schnitte wurden zur besseren Beurteilung der Morphologie in VES-MTC gefärbt.

Mithilfe des Programmes ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics) wurden die innere Schicht der Gefäßwand (das Endothel), die *Lamina elastica interna* (IEL), *Lamina elastica externa* (EEL) und die äußere Begrenzung der Adventitia umrandet. Anschließend wurden die jeweiligen Flächeninhalte der Umrandungen und die entsprechenden Umfänge berechnet (vgl. U1-U4 **Abbildung 4-6**).

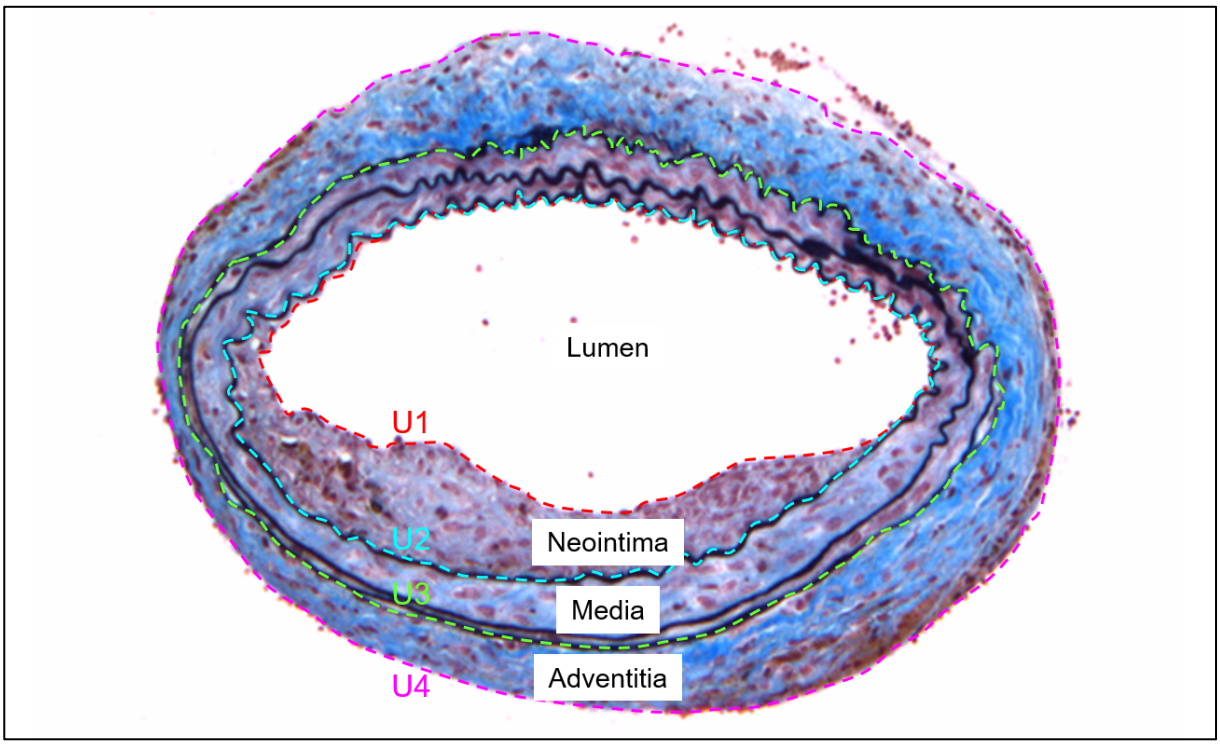

Abbildung 4-6: Schematische Darstellung der morphometrischen Auswertung.
Umrandung (U) U1: Endothel, U2: Lamina elastica interna, U3: Lamina elastica externa, U4: äußere Begrenzung der Adventitia.

Zusätzlich zur Bestimmung von Umfang und Flächeninhalt war es möglich, die Abstände zwischen zwei Umrandungen zu bestimmen. Dadurch konnte man die minimale, maximale und mittlere Dicke der einzelnen Gefäßschichten berechnen (vgl. **Abbildung 4-6** und **Abbildung 4-7**). Nach der Bestimmung der Einzelwerte wurden für jedes Versuchstier Durchschnittswerte bestimmt, mit denen die verschiedenen Berechnungen durchgeführt wurden. Diese können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 4-12: Berechnungen der morphometrischen Auswertungsparameter

Parameter (Einheit)	Berechnung
Lumen (µm²)	Fläche U1
Neointima (µm²)	Fläche U2 – Fläche U1
IEL-Fläche (µm²)	Fläche U2
Lumenstenose (%)	100 – (Fläche U1 / Fläche U2) x 100
Media (µm²)	Fläche U3 – Fläche U2
Adventitia (µm²)	Fläche U4 – Fläche U3
Intima-Media-Verhältnis	Fläche Neointima / Fläche Media
EEL-Fläche (µm²)	Fläche U3
EEL-Länge (µm)	Länge U3
Neointima in Bezug auf EEL-Fläche (%)	Neointima / EEL-Fläche x 100
Media in Bezug auf EEL-Fläche (%)	Media / EEL-Fläche x 100
Minimale, mittlere und maximale Breite der Media (µm)	Berechnung des Abstands zwischen U2 und U3 mithilfe von ImagePro Plus 7.0
Mittlere Breite der Adventitia (µm)	Berechnung des Abstands zwischen U3 und U4 mithilfe von ImagePro Plus 7.0

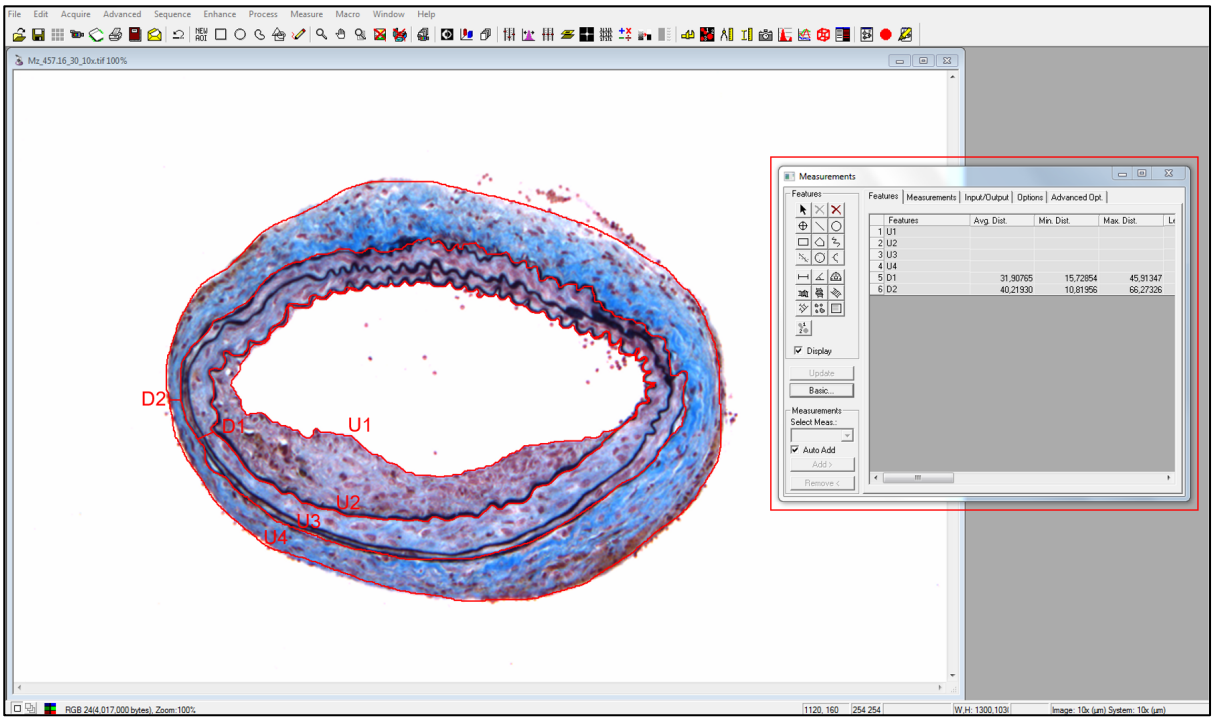

Abbildung 4-7: Morphometrische Auswertung mit ImagePro Plus 7.0.

Man erkennt die einzelnen Umrandungen U1- U4 sowie die Abstandsmessungen D1 und D2.

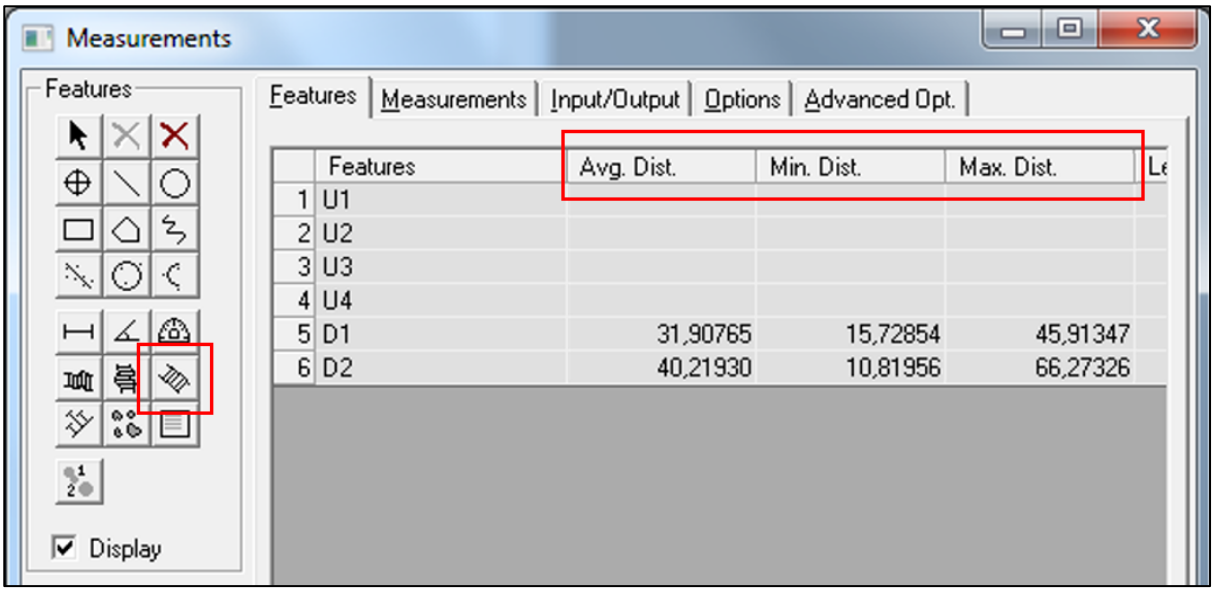

Abbildung 4-8: Detailansicht der morphometrischen Auswertung.

Auf dem Bild ist das Werkzeug zur Bestimmung der Abstände zwischen zwei Linien zu erkennen. Zudem sieht man die Ergebnisse der zuvor gezeigten Arterie.

4.7.2 Quantitative Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen

Die quantitative Auswertung der verschiedenen histologischen und immunhistochemischen Färbungen erfolgte mithilfe des Programms *Image Pro Plus 7.0*. Zunächst wurden die zu betrachteten Gefäßschichten markiert (als *region-of-interest*) und anschließend der für den jeweiligen Antikörper positiv angefärbte Bereich bewertet. Danach wurden daraus die absoluten Zahlen (Fläche in µm², positiv gefärbte Zellkerne) und die relativen Anteile (positiv gefärbte Fläche in Bezug auf die zu untersuchende Fläche in %, Anteil der positiv gefärbten Zellkerne in Bezug zur Gesamtzellzahl in %) berechnet. Von jeder Versuchsgruppe wurden die Mittelwerte miteinander verglichen.

4.8 *In-vitro*-Zellkultur-Untersuchungen

4.8.1 Herkunft der MOVAS

Für die *In-vitro*-Experimente wurden murine aortale glatte Muskelzellen (MOVAS; ATCC® CRL2797™) verwendet. Diese wurden in Passage 14 mit DMSO in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.8.2 Auftauen und Kultivieren der Zellen

Zu Beginn wurden die Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und langsam im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach wurden sie auf einer 10 cm Zellkulturschale verteilt, die bereits 10 ml Zellkulturmedium enthielt. Die genaue Zusammensetzung des Nährmediums kann Kapitel 3.11 entnommen werden. Nach dem Überführen der Zellen wurde die Schale geschwenkt und danach unter dem Mikroskop betrachtet, um die gleichmäßige Verteilung der Zellen zu überprüfen. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO_2 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach erneuter mikroskopischer Kontrolle ein Wechsel des Mediums, um die Reste des potenziell zelltoxischen DMSO aus dem verwendetem Einfriermedium zu entfernen. Am Folgetag wurde nach mikroskopischer Kontrolle das verbrauchte Medium abgesaugt und durch frisches, auf 37° C erwärmtes Medium ersetzt, um die angefallenen Stoffwechselprodukte der Zellen zu entfernen und neue Nährstoffe bereitzustellen. Je nach Zelldichte erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Wechsel des Kulturmediums.

4.8.3 Splitten der Zellen

Nach 48 Stunden wurden die Zellen erstmalig gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellkulturschale wurde mit auf 37°C erwärmtem 1X PBS gespült. Anschließend wurden 2 ml Accutase® Lösung auf die Zellen gegeben. Diese wurden danach für 3 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Zellkulturschale von außen beklopft, um die Zellen mechanisch vom Boden zu lösen. Nach einer mikroskopischen Kontrolle wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe des Nährmediums gestoppt und die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig von der Platte gelöst. Die im Medium befindlichen Zellen wurden nun mithilfe einer Pipette in ein Falcon-Röhrchen überführt. Darauffolgend erfolgte die Aussaat in neue 10 cm Zellkulturschalen, wobei die Zellen

im Verhältnis 1:5 gesplittet wurden. Die gesplitteten Zellen befanden sich zum Zeitpunkt der Aussaat in Passage 16. Bei 80 bis 90-prozentiger Konfluenz wurden die Zellen erneut im Verhältnis von 1:5 gesplittet.

Beim ersten Splitten der Zellen wurden zudem auf zwei *Six-well*-Platten Zellen ausgesät, sodass sich in zehn von 12 Feldern je 100.000 Zellen auf 3 ml Medium befanden. Nach diesem Schema wurden pro Versuchsdurchgang je zwei *Six-well*-Platten vorbereitet, die vor Versuchsbeginn für 12 h bei 37°C im Inkubator inkubierten.

Tabelle 4-13: Splitten und Aussäen der Zellen

Reihenfolge	Versuchsschritt
1	Begutachten der Zellen nach 24 h
2	Medium absaugen
3	mit 3 ml 1X PBS spülen, Lösung anschließend absaugen
4	1,5 ml Accutase® pro Well
5	3 min bei 37°C inkubieren
6	seitliches Abklopfen der Platten, um Zellen zu lösen
7	Mikroskopische Analyse der gelösten Zellen
8	Medium bis auf gewünschte Verdünnung hinzugeben, um die Accutase® zu neutralisieren
9	Zellen und Medium mit Pipette absaugen und in 15 ml Falcon Röhrchen sammeln
10	Aussäen auf mit Medium gefüllte 10 cm Zellkulturschalen

4.8.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl fand während des Splittens der Zellen statt. Nachdem die Zellen im Falcon Röhrchen gesammelt wurden, nahm man nach vorherigem Mischen 10 µl der Zellsuspension mit einer Pipette auf und gab sie in eine Neubauer Zählkammer. Nun zählte man die vier Randquadrate aus, wobei man die Zellen, die auf den unteren und rechten Rändern der Quadrate liegen mitzählte, aber nicht die, die auf den oberen oder linken Rändern lagen. Danach wurde der Mittelwert der Zellzahl der vier Quadrate gebildet und mit 10.000 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Ausgehend davon setzte man in einem neuen 50 ml Falcon Gefäß eine

Suspension mit der gewünschten Zellzahl pro ml an. Pro *Well* einer Six-Well-Platte wurden $1x10^5$ Zellen ausgesät.

4.8.5 Versuchsaufbau und -ablauf

Ziel des *In-vitro*-Stimulationsversuches war es, die Ergebnisse des *In-vivo*-Tierexperiments mithilfe der Zellkultur zu bestätigen. Dazu wurden murine aortale Muskelzellen verwendet, die mit verschiedenen Stimulanzien behandelt wurden. So wurde ein Knockout von PTP1B mithilfe eines PTP1B-Inhibitors simuliert. Kobaltchlorid ($CoCl_2$) erzeugte eine chemische Hypoxie, die die Hypoxie nach Gefäßverletzung imitieren soll. Wasserstoffperoxid erzeugt reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die auch bei einer Gefäßverletzung anzufinden sind. Während einer Gefäßverletzung wird unter anderem Angiotensin II ausgeschüttet, um eine Verengung und konsekutive Blutungsstillung einzuleiten. Dieser Effekt sollte durch die Gabe des rekombinanten Proteins nachgeahmt werden.

Nach Stimulation und Isolation der Zellen erfolgte die Isolation der RNA, die anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. Mithilfe der qPCR wurde Expression verschiedener Proteine untersucht und in ein Verhältnis zur Kontrolle gebracht, die nur mit DMSO behandelt wurde.

Für den Stimulationsversuch wurden 12 h vor Beginn auf zwei *Sixwell*-Platten Zellen in zehn von 12 Feldern je 100.000 Zellen auf 3 ml Medium ausgesät. Diese inkubierten für 12 h bei 37° im Inkubator.

Nach ca. 12 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium aus den Wells der Six-Wellplatten abgesaugt und diese wurden mit jeweils 2 ml 1X PBS gespült. Anschließend wurden die Wells mit 3 ml reduziertem DMEM (0,5 % FBS) aufgefüllt. Danach erfolgte die Zugabe der verschiedenen Stimulanzien mithilfe eine Mikropipette (Eppendorf). Um unerwartete Effekte des DMSO auszuschließen, wurden jeder Probe zusätzlich zum Stimulanz 3 µl DMSO (0,1 %) hinzugegeben, da der PTP1B-Inhibitor in DMSO gelöst war. Die genaue Belegung der Wells kann der **Abbildung 4-9** entnommen werden. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde zunächst 1 ml des Überstands von jedem *Well* entnommen und anschließend bei -80° für mögliche nachfolgende Analysen eingefroren. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die einzelnen Wells erneut mit 1X PBS gespült.

Anschließend wurde nacheinander in jedes *Well* 300 µl TRI Reagent® Lösung (Thermo Fisher) gegeben und mit den Zellen vermischt. Dann wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst und danach mit einer 1.000 µl-Pipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogenisiert und anschließend in ein Safelock Eppendorfgefäß überführt. Die Homogenisate wurden sofort auf Eis gekühlt, um die Reaktion mit der TRI-Ragent® Solution abzustoppen. Es wurden jeweils zwei Proben einer Stimulanz gepoolt. Vor der RNA-Isolation wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Tabelle 4-14: Stimulanzien des *In-vitro*-Experiments (bei dH_2O handelt es sich hierbei um autoklaviertes dH_2O, das für Zellkulturversuche bereitstand.)

Stimulanz	Konzentration Working Solution	Menge	Endkonzentration
DMSO	/	3 µl	0,1 %
PTP1B-Inhibitor	20 mM (in DMSO)	3 µl	20 µM
$CoCl_2$	100 mM (in dH_2O)	3 µl	100 µM
H_2O_2	1 mM (in dH_2O)	3 µl	1 µM
AT II	1 mM (in dH_2O)	3 µl	1 µM

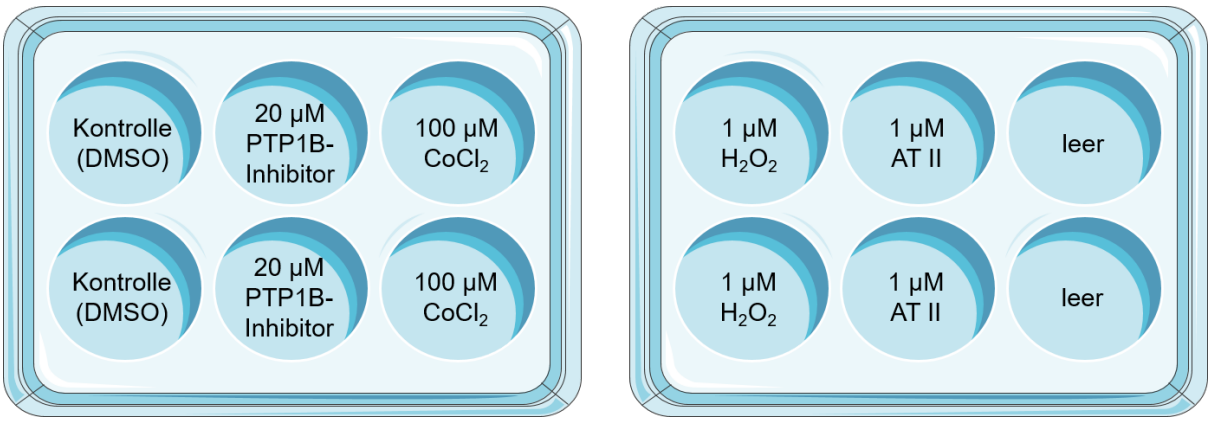

Abbildung 4-9: Belegung der Six-Well-Plates beim *In-vitro*-Stimulationsversuch
Modifizierte Darstellung erstellt mithilfe der *Powerpoint image bank* von *Servier Medical Art*.

4.9 Untersuchung der mRNA-Expression

4.9.1 RNA-Isolation aus Zellen

Zu Beginn muss die RNA aus den homogenisierten Zellen isoliert werden. Dafür wurde die *Single-step*-Methode nach Chomczynski und (140, 141) mithilfe von TRI Reagent® Lösung verwendet. Sie basiert auf der einstufigen Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion.

Vor Beginn der RNA-Isolation wurden die bereits homogenisierten Zellen schonend auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Proben für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde in jedes Gefäß 120 µl Chloroform (200 µl pro 1.000 µl TRI Reagent® Lösung) gegeben und durch Kippen vorsichtig mit dem Homogenisat vermischt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation über 15 min bei RT. Danach wurden die Proben bei 4°C mit 12.000 rcf (*engl. relative centrifugal force,* relative Zentrifugalkraft) für 15 min zentrifugiert. Der klare wässrige Überstand wurde mithilfe einer 100 µl-Pipette vorsichtig abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Safelock Eppendorf Gefäß überführt. Die verbleibende DNA enthaltende Interphase sowie die Proteine enthaltende, untere Phase wurden beide verworfen.

Anschließend musste die RNA ausgefällt werden. Dafür wurden zu jedem Überstand mit einer 1.000 µl-Pipette 300 µl Isopropanol gegeben (500 µl Isopropanol pro eingesetzten 1.000 µl TRI Reagent® Lösung). Die Proben wurden jeweils für 5-10 s gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben bei 4°C für 8 min bei 12.000 rcf zentrifugiert und der entstandene Überstand abgekippt. Zu dem gebildeten RNA-Pellet wurden 600 µl 75 % Ethanol gegeben (die verwendete Ethanolmenge entsprach der Menge der verwendeten TRI Reagent® Lösung), um Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 rcf für 5 min, um wieder ein festes Pellet zu erhalten. Danach wurde der Ethanolüberstand vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde danach für 5-10 min getrocknet, ohne das Pellet auszutrocknen jedoch alle restlichen Ethanolrückstände zu entfernen. Abschließend wurde das getrocknete RNA-Pellet in 20 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.9.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit

Vor der Lagerung bei -80°C wurde die zuvor isolierte und resuspendierte RNA auf Eis gestellt und die RNA-Konzentration bestimmt. Die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte unter Zuhilfenahme eines Photometers (Eppendorf BioPhotometer) nach der Bedienungsanweisung des Herstellers. Es wurden nur unverdünnte, hochkonzentrierte RNA-Proben verwendet. Zur Leerwertbestimmung vor der eigentlichen Messung wurden 2 µl Nuklease-freies Wasser mittig auf die Küvette gegeben und anschließend wurde diese in das Photometer eingeführt. Um den Leerwert des Verdünnungsmediums zu bestimmen wurde die „Blank"-Taste gedrückt. Die Messungen der RNA-Proben erfolgten nach dem gleichen Prinzip. Vor jeder Messung wurden die Proben mithilfe einer 10 µl-Pipette zur Homogenisierung auf- und abpipettiert und anschließend wurden 2 µl auf die Küvette gegeben und in das Photometer eingeführt. Zur Ermittlung der Konzentration und Reinheit der RNA wurde anschließend die „Sample"-Taste betätigt. Nach jeder Messung wurde die Küvette mithilfe eines fusselfreien Tuchs und 70-prozentigem Ethanol gereinigt.

Die Methode der Konzentrationsbestimmung basiert auf der Messung der optischen Dichte (OD) bei λ=260 nm (OD_{260}) und bei λ=280 nm (OD_{280}). Bei 260 nm liegt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, also auch der RNA. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Aus beiden Werten der optischen Dichten wird ein Verhältnis gebildet, wobei ein Wert von 2,0 reiner RNA entspricht. Liegt der Wert unterhalb von 2,0 spricht dies für etwaige Verunreinigungen. Für die Versuche wurden ausschließlich Proben mit Werten ≥ 1,9 verwendet, was einer sehr hohen Reinheit entspricht. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht 40 µg/ml RNA. Daher wurde nach der Formel $Konzentration\ [\mu g/ml] = OD_{260} \times 40\ \mu g/ml$ die RNA-Konzentration berechnet.

4.9.3 Umschreibung der RNA in cDNA

Die mRNA (*messenger RNA*) wurde mithilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase M-MLV Reverse Transkriptase in cDNA (*copy DNA*) umgeschrieben. Dafür wurde zunächst ein Mastermix hergestellt, dem zum Schluss die Reverse Transkriptase und 1 µg RNA in Nuklease-freiem Wasser hinzugegeben wurden. Bis dahin wurde die Reverse Transkriptase bei -20°C gelagert, um eine vorzeitige Aktivierung zu vermeiden. Das Pipettierschema ist der Tabelle 4-15 zu entnehmen. Nachdem alle Bestandteile pipettiert wurden, erfolgte ein kurzer Zentrifugationsschritt, um alle Bestandteile am Boden der Reaktionsgefäße zu sammeln. Danach wurden die Proben in den Thermocycler Mastercycler® gestellt. Das Programm zur cDNA-Synthese umfasst 20 min bei 42°C, gefolgt von 5 min bei 99°C und 5 min bei 5°C. Danach wurden die Proben bei 4°C gekühlt. Die Lagerung bis zur weiteren Analyse erfolgte kurzfristig bei -20°C, dauerhaft bei -80°C.

Tabelle 4-15: Pipettierschema für die cDNA-Umschreibung

Reagenz	Volumen pro Ansatz [µl]	Endkonzentration
25 mM $MgCl_2$	4	5 mM
M-MLV RT 5X Puffer	4	1X
10 mM dNTP	2	200 µM
Random hexamer primer	0,2	
40 U/µl RNase-Inhibitor	1	2 U/µl
200 U/µl mlV RT	0,8	8 U/µl
1 µg RNA (in Nuklease-freiem Wasser)	8	1 µg
Gesamtvolumen	20	

4.9.4 *Real-time* quantitative PCR

Die *real-time* quantitative PCR (qPCR) wurde mit dem Real-Time PCR-System *CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System* von Bio-Rad und der CFX Maestro Software durchgeführt. Das Pipettierschema und der Ablauf der qPCR sind den nachfolgenden Tabelle 4-16 und

Tabelle 4-17 zu entnehmen. Von jeder Probe wurden für jeden Primer Duplikate verwendet. Zudem wurde auch eine DNA-freie Wasser-Kontrolle verwendet.

Tabelle 4-16: Pipettierschema der qPCR

Reagenz	Volumen pro Ansatz [µl]	Endkonzentration
SYBR Green SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (2x)	10	1X
Nuklease-freies Wasser	6,5	/
2,5 µM Primer_forward	0,5	0,1 µM
2,5 µM Primer_reverse	0,5	0,1 µM
cDNA	2,5	
Gesamtvolumen	20	

Tabelle 4-17: Ablauf der qPCR

Schritt		Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung		95°C	3 min	-
Denaturierung		95°C	10 s	40
Annealing/Elongation		60°C	1 min	
Analyse der Schmelzkurven		95°C	10 s	-
		65°	5 s pro 0,5°C	schrittweise Erhöhung der Temp um 0,5°C
		95°C		

Die qPCR basiert darauf, dass der im SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix enthaltene Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green an doppelsträngige DNA bindet. Bei Anregung durch Blaulicht (λmax=497 nm) wird grünes Licht emittiert (λmax=520 nm). Das Fluoreszenzsignal wird nach jedem Replikationszyklus detektiert. Proportional zur replizierten cDNA steigt es von Zyklus zu Zyklus an. Mithilfe

einer Amplifizierungskurve (x-Achse: Zykluszahl, y-Achse: Fluoreszenzsignal) lässt sich der Vorgang darstellen. Die Hintergrundfluoreszenz wird als Basislinie (*baseline*) bezeichnet. Zu Beginn ist sie noch höher als das gesuchte Signal, da dieses sich unter der Detektionsschwelle befindet. Je nach dem Ausgangsprodukt kommt es nach einer bestimmten Zahl an Zyklen zu einem exponentiellen Anstieg in der Replikation, wobei die Menge der Replikationsprodukte stark ansteigt. Zu diesem Zeitpunkt ist das Signal erstmals stärker als das Hintergrundrauschen. Die *Baseline* wird erstmals überschritten. Die Anzahl an Replikationszyklen nach der der exponentielle Kurvenverlauf beginnt ist als Ct-Wert definiert. Dieser wird für die quantitative Auswertung benötigt. Am Ende der qPCR sind die für die Replikation benötigten Substrate verbraucht. Es kommt zu einer Plateaubildung in der Kurve.

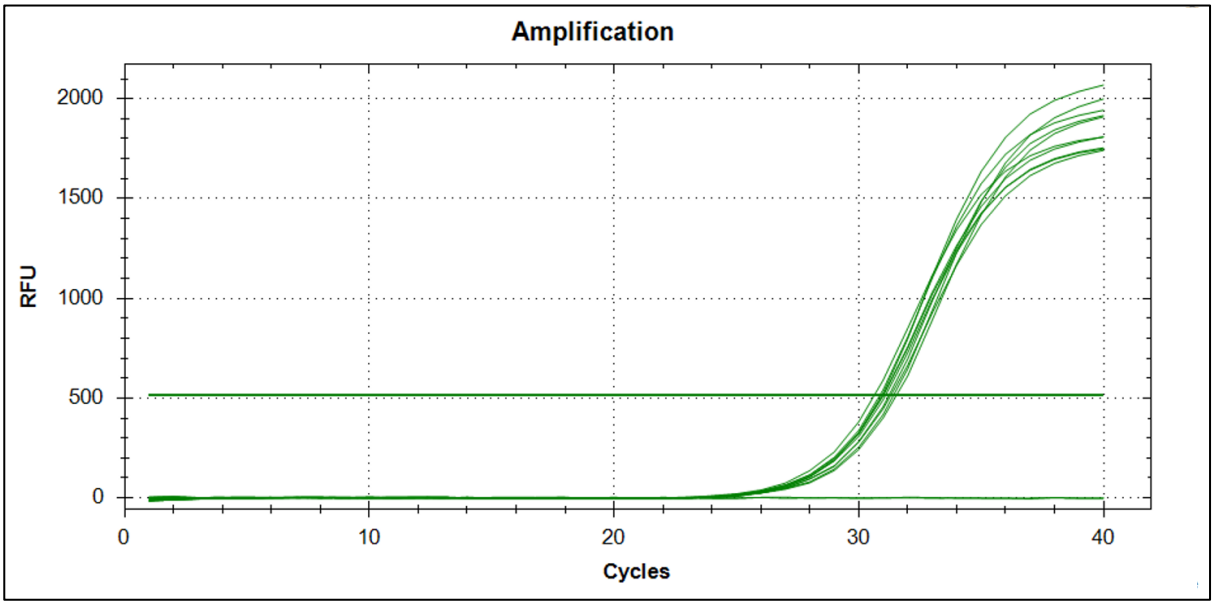

Abbildung 4-10: Amplifizierungskurve qPCR.

Die Abbildung zeigt die Amplifizierungskurve für den Primer PTP1B. Die untere Linie, die keinerlei Amplifizierung zeigt stellt den Verlauf für die Negativkontrolle mit Wasser dar. Die zweite gerade Linie bei 500 RFU (*relative flourescence units*) gibt den Schwellenwert (*Threshold*) an.

4.9.5 Quantifizierung nach ΔΔCt-Methode

Die Auswertung der qPCR-Ergebnisse erfolgte nach der ΔΔCt-Methode (142). Hier normalisierte man das zu untersuchende Zielgen mit einem sogenannten *Housekeeping* Gen, das nicht reguliert wird. So erhielt man die interne Kontrolle (ΔCt). In der vorliegenden Arbeit wurde β-Actin, ein Zytoskelettfilament, als Referenzgen verwendet. Die Berechnung erfolgte durch das Subtrahieren der jeweiligen Ct-Werte voneinander. Das Ergebnis wurde anschließend in die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eingesetzt.

$\Delta Ct = C_t$ Zielgen – C_t Referenzgen

$\Delta\Delta Ct = C_t$ Versuchsgruppe – C_t Kontrollgruppe

$2^{-\Delta\Delta CT}$ = n-fache Expression (Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe)

4.9.6 Schmelzkurven-Analyse

Die Schmelzkurven-Analyse diente der Überprüfung der Spezifität der einzelnen Primer. Nach Amplifizierung der cDNA erfolgte diese durch schrittweise Erhöhung um 0,5°C in 5 s von 65°C auf 95°C im Reaktionsgefäß. Diese qualitative Auswertung nutzt aus, dass doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt aufweisen als unspezifische Produkte oder Primerdimere, da diese eine größere Anzahl an Wasserstoffbrücken besitzen. Bei dem Schmelzvorgang wird der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt, was in einer Fluoreszenzabnahme resultiert, welche einen charakteristischen Höhepunkt (*Peak*) aufweist. Die verschiedenen PCR-Produkte haben spezifische Schmelztemperaturen, wohingegen die Wasser-Kontrolle keine charakteristische Schmelztemperatur aufweisen sollte.

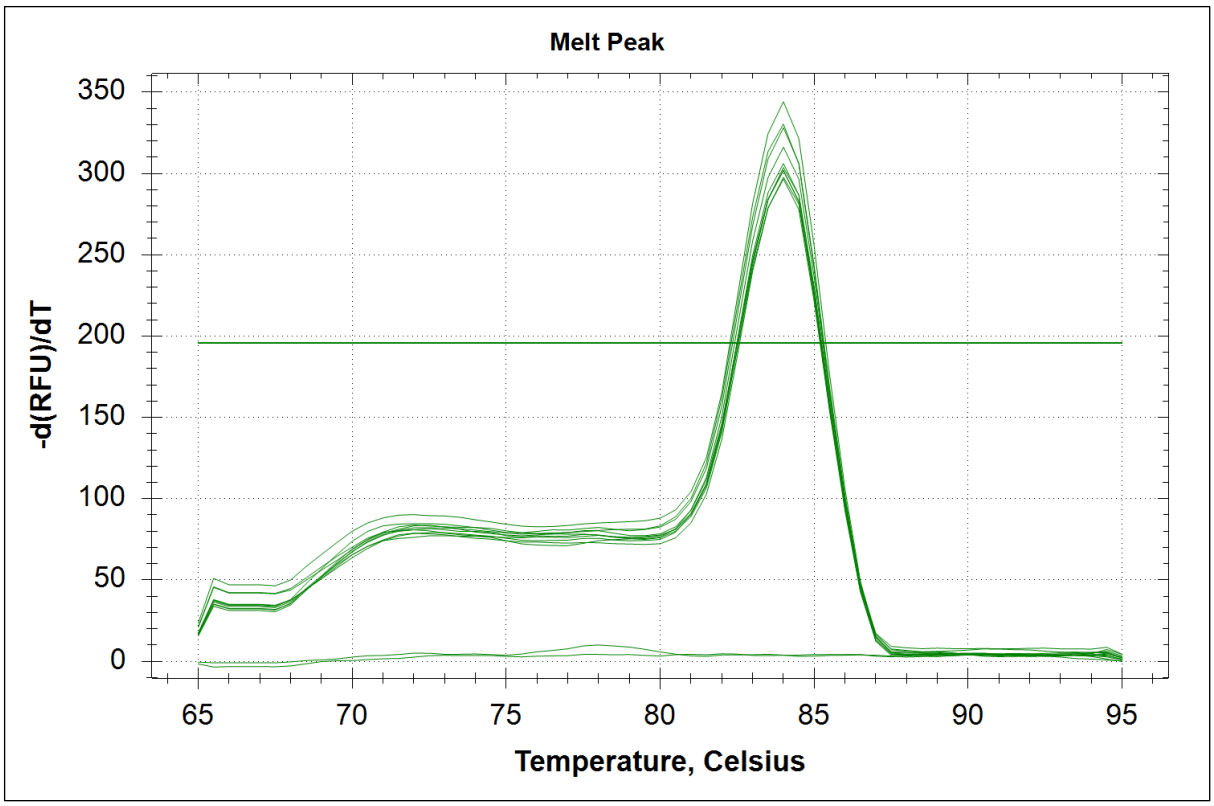

Abbildung 4-11: Abbildung einer charakteristischen Schmelzkurven-Analyse

Mithilfe der Bio-Rad CFX-Maestro Software erstellt) Die x-Achse zeigt die Temperatur in °C und die y-Achse zeigt den abgeleiteten Wert des Fluoreszenzsignals. Die spezifischen PCR-Produkte zeigen einen charakteristischen *Peak* bei einer bestimmten Schmelztemperatur, wohingegen die Wasser-Kontrolle (unten dargestellt) keinen Höhepunkt hat.

4.10 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 7.0 durchgeführt. Die zugehörigen Graphen und Abbildungen wurden ebenfalls ausschließlich mit GraphPad Prism 7.0 erstellt.

Mithilfe des D'Agostino & Pearson Omnibus-Test (Stichprobenumfang von mindestens 8) wurde vor jeder statistischen Auswertung überprüft, ob eine Normalverteilung vorlag.

Die Darstellung von normalverteilen Daten erfolgt nach dem Prinzip Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM, engl. *standard error of mean*). Die Signifikanz von normalverteilten Daten wurde mit parametrischen Tests, die eine Normalverteilung voraussetzten, geprüft. Zwei unabhängige Stichproben (in diesem Fall SMC.PTP1B-WT und SMC.PTP1B-KO) wurden mit dem Zweistichproben-t-Test (*Student's t-Test*) für ungepaarte Stichproben auf ihre Signifikanz untersucht.

Die Signifikanzen von mehr als zwei Stichproben wurden mithilfe ein- beziehungsweise zweifaktorieller Varianzanalysen (ein- oder zweifaktorielle ANOVA) berechnet. Bei signifikanten Unterschieden erfolgte im Anschluss ein Bonferroni-Test, der die Mittelwerte der einzelnen Messgruppen miteinander verglich.

Daten nicht normalverteilter Gruppen werden als Median mit Interquartilsabstand dargestellt. Zur Signifikanzprüfung wurden für diese Daten nicht-parametrische Tests verwendet. Beim Vergleich von zwei Gruppen kam der Mann-Whitney-Test zum Einsatz. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, so wurde der Kruskall-Wallis-Test mit anschließenden *Dunn's-Post-Hoc-Test* genutzt. Bei P-Werten von <0,05 galten Unterschiede als statistisch signifikant.

Die Ergebnisse der Analysen von zwei Stichproben werden in Form der p-Werte dargestellt. Bei Analysen von mehr als zwei Stichproben werden die Ergebnisse in den Abbildungen jeweils mit einem * gekennzeichnet, wobei folgende Regeln gelten:

- * entspricht P≤0,05
- ** entspricht P≤0,01
- *** entspricht P≤0,001
- **** entspricht P≤0,0001
- n.s. entspricht P>0,05

5 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel wird zunächst der Nachweis des erfolgreichen glattmuskelspezifischen Knockouts gezeigt. Danach erfolgt der Nachweis der Auswirkung des Knockouts auf den vaskulären Phänotyp der Versuchstiere in Antwort auf eine Gefäßverletzung. Daran schließen sich die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Auswertungen der *In-vivo*-Versuche an. Darauf folgt die Präsentation der Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen von murinen aortalen Glattmuskelzellen in Form von qPCR-Analysen.

5.1 PTP1B-Expression vor und nach $FeCl_3$-induzierter Gefäßverletzung

Bereits zuvor wurden in unserer Arbeitsgruppe Daten bezüglich der PTP1B-Expression in der Gefäßwand der *A. carotis* vor und nach Induktion einer Gefäßverletzung mittels $FeCl_3$ erhoben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Abschnitt dargestellt. Bei der quantitativen Analyse der PTP1B-Proteinexpression mittels Western Blot ergibt sich eine signifikant erhöhte Expression von PTP1B für den Zeitpunkt von sieben Tagen nach der $FeCl_3$-induzierten Gefäßverletzung im Vergleich mit einem unverletztem Gefäß (1,0 ± 0,01 in unverletzt vs. 2,4 ± 0,15 an Tag 7 (7 d); P=0,001; **Abbildung 5-1 A**). Eine repräsentative Western Blot-Membran (siehe **Abbildung 5-1 B**) zeigt am siebten Tag nach Gefäßverletzung die höchste Expression von PTP1B. Nach 21 Tagen zeigt sich bereits eine schwächere Ausprägung.

Die immunhistochemische Darstellung von PTP1B (siehe **Abbildung 5-1 C**) bestätigt das Ergebnis der Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot. Am siebten Tag nach Gefäßverletzung kommt es zur stärksten Ausprägung der PTP1B-Expression in der Gefäßwand. Nach 21 Tagen war diese bereits wieder abgeklungen. Dieses Ergebnis spricht für einen frühzeitigen Adaptionsmechanismus des verletzten Gefäßes und unterstreicht die mögliche Rolle von PTP1B während der Neointimabildung.

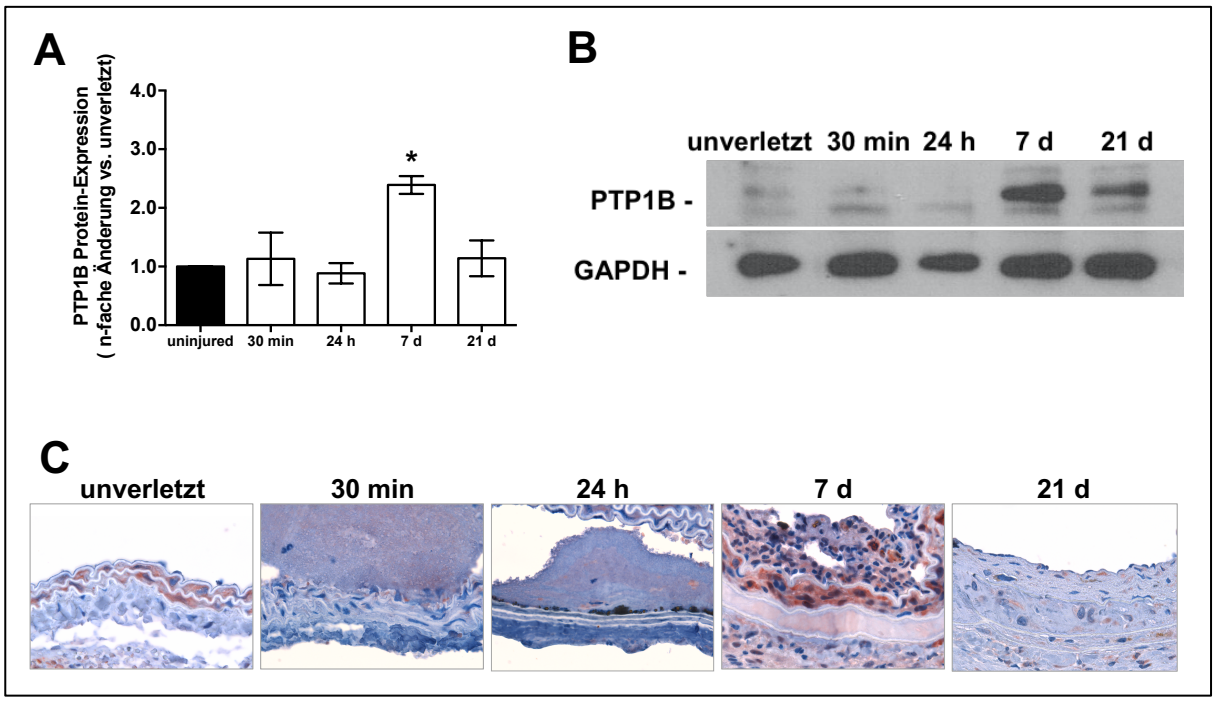

Abbildung 5-1: PTP1B-Expression im zeitlichen Verlauf nach Gefäßverletzung.

(A) Quantitative Analyse der PTP1B Protein-Expression. (B) Repräsentative Western Blot Membran zur Darstellung von Änderungen der PTP1B Proteinexpression im zeitlichen Verlauf. GAPDH wurde als Kontrolle zur Proteinbeladung verwendet. (C) Immunhistochemischer PTP1B-Nachweis im zeitlichen Verlauf nach Gefäßverletzung. Sieben Tage nach Gefäßverletzung zeigt sich die maximale Expression von PTP1B. Nach 21 Tagen ist das Expressionsniveau bereits annähernd auf das Ausgangsniveau zurückgegangen.

5.2 Bestätigung Knockouts von PTP1B in glatten Muskelzellen

Um die kausale Bedeutung von PTP1B für vaskuläre Umbauprozesse und die Funktion von Glattmuskelzellen zu untersuchen, wurde eine gentechnisch veränderte Mauslinie mit glattmuskelspezifischem PTP1B-Knockout generiert. Dafür wurden Mäuse mit glattmuskelzellspezifischer Expression der Cre-Recombinase und Mäuse transgen für das „gefloxte“ PTP1B-Allel verpaart (siehe 4.1.5). Der glattmuskelspezifische PTP1B-Knockout wurde durch verschiedene Untersuchungen sichergestellt, deren Ergebnisse in **Abbildung 5-2** dargestellt sind.

Zur Überprüfung des Genotyps der Versuchstiere wurde zunächst eine Schwanzbiopsie entnommen und anschließend für die DNA-Isolation und Genotypisierung verwendet (siehe Kapitel 4.1.7). Die Gelelektrophorese der Genotypisierungs-PCR zeigt sowohl die Expression der glattmuskelzellspezifischen Cre-Recombinase als auch den gefloxten Gen-Abschnitt von PTP1B. Die durch Tamoxifengabe induzierte Exzision des gefloxten Gen-Abschnitts in SMC.PTP1B-KO Mäusen zeigt sich als neu entstandenes Gen-Produkt PTP1BΔ und bestätigt somit einen erfolgreichen Knockout (siehe **Abbildung 5-2 A**).

Der Nachweis des PTP1B-Knockouts erfolgte außerdem mittels PTP1B-Immunfluoreszenz (siehe Kapitel 4.6 und **Abbildung 5-2 B**). Die Immunfluoreszenz zeigt den erfolgreichen Knockout von PTP1B in glatten Gefäßmuskelzellen. Der PTP1B-Antikörper lagert sich in SMC.PTP1B-KO im Vergleich zu SMC.PTP1B-WT nur sehr schwach an Gefäßmuskelzellen der Media an. Es kommt zu einem schwach ausgeprägten Fluoreszenzsignal, bei dem es sich auch um ein unspezifisches Hintergrundsignal handeln könnte, da auch die einzelnen Membranen fluoreszieren.

Daneben wurden mithilfe von Konfokalmikroskopie und Immunhistochemie weitere Nachweise eines erfolgreichen Knockouts erbracht (siehe **Abbildung 5-2 C und D**). Beide Abbildungen zeigen eine deutlich verminderte oder fehlende PTP1B-Expression in primären glatten Muskelzellen der Aorta bzw. SMCs innerhalb der Media der *A. carotis* von Versuchstieren der SMC.PTP1B-KO-Gruppe. Diese Analysen wurden von einer wissenschaftlichen Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe durchgeführt.

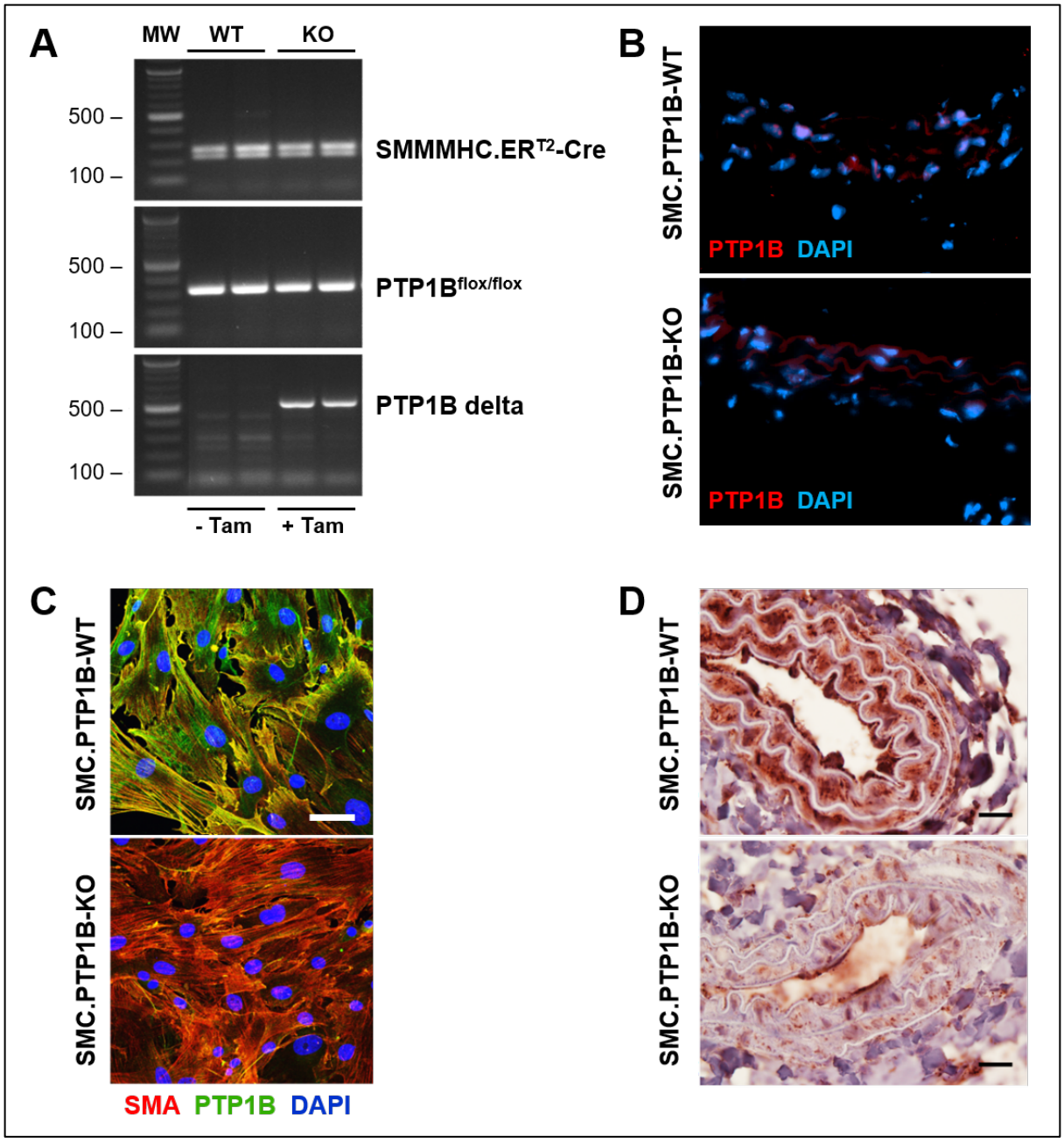

Abbildung 5-2: Nachweis des VSMC-spezifischen PTP1B-Knockouts.

(A) Die Genotypisierung zeigt sowohl für SMC.PTP1B-WT- als auch für SMC.PTP1B-KO-Mäuse die Genprodukte der VSMC-spezifischen Cre-Recombinase und den für PTP1B „gefloxten" Genabschnitt. Nur die Versuchstiere der Gruppe SMC.PTP1B-KO zeigen nach Tamoxifengabe das neu entstandene Genprodukt PTP1B delta. (B) PTP1B-Nachweis mittels Immunfluoreszenz in Querschnitten durch die *A. carotis* von SMC.PTP1B-WT- und -KO-Mäusen (100-fache Vergrößerung). (C) Konfokalmikroskopischer Nachweis der Expression von PTP1B (grün) und SMA (rot) in primären glatten Muskelzellen, isoliert aus der Aorta von SMC.PTP1B-WT- und -KO-Mäusen. Die Zellkerne sind mittels DAPI (blau) dargestellt. (D) Immunhistochemischer PTP1B-Nachweis in der Aorta von SMC.PTP1B-WT- und -KO-Mäusen. Die Maßbalken repräsentieren 20 µm.

5.3 Histologische Analysen

5.3.1 Morphometrische Auswertungen nach Gefäßverletzung

Zu Beginn wurde eine morphometrische Analyse beider Versuchsgruppen (also SMC.PTP1B-WT und SMC.PTP1B-KO) durchgeführt. Dafür wurden pro Versuchstier, je nach Ausdehnung der Läsion, vier bis sechs histologische Gewebequerschnitte analysiert und für jedes Tier im Anschluss der Mittelwert für die einzelnen untersuchten Parameter gebildet. Die Darstellung der Ergebnisse für normalverteilte Daten erfolgt als Mittelwert mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (engl. *standard error of mean,* SEM) beider Gruppen und dem P-Wert. Die Auswertung nicht-normalverteilter Daten erfolgte unter Verwendung nonparametrischer Tests. Diese Ergebnisse werden im Folgenden als Median und Interquartilsabstand dargestellt. Dabei wird als erstes immer die SMC.PTP1B-WT-Versuchsgruppe genannt und anschließend die SMC.PTP1B-KO-Versuchsgruppe.

Als erstes wurde die von der EEL umschlossene Fläche gemessen. Diese Fläche entspricht der Gesamtgefäßfläche ohne die Adventitia. Hierbei fiel auf, dass die durchschnittliche von der EEL eingeschlossene Fläche der KO-Mäuse signifikant kleiner war als die der WT-Mäuse (141.902 ± 7.324 µm˝ in SMC.PTP1B-WT vs. 118.833 ± 6.039 µm˝ in SMC.PTP1B-KO; P=0,02; **Abbildung 5-3 A**). Dementsprechend war der durchschnittliche Umfang der EEL in der SMC.PTP1B-KO-Gruppe auch signifikant geringer (1.648 ± 44 µm in SMC.PTP1B-WT vs. 1.533 ± 32 µm in SMC.PTP1B-KO; P=0,04; **Abbildung 5-3 B**). Trotz der kleineren EEL-Fläche der KO-Mäuse gab es keine signifikanten Unterschiede in der Fläche der Neointima (11.112 [6.665-18.256] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 10.641 [5.541-15.812] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,70; **Abbildung 5-3 C**) und der prozentual errechneten Lumenstenose (15,2 ± 2,8 % in SMC.PTP1B-WT vs. 17,7 ± 2,8 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,53; **Abbildung 5-3 D**). Nichtsdestotrotz zeigte sich für Mäuse der Gruppe SMC.PTP1B-KO ein verkleinertes Gefäßlumen (78.194 ± 5.959 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 56.730 ± 5.473 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,01; **Abbildung 5-4 C**). Bei der Fläche der Media (50.253 ± 3.362 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 49.891 ± 2.638 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,93; **Abbildung 5-3 E**) und dem Verhältnis von Intima- zu Media-Fläche (0,29 ± 0,06 in SMC.PTP1B-WT vs. 0,25 ± 0,04 in SMC.PTP1B-KO; P=0,60) zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede. Auffällig war jedoch, dass die

Media in Bezug zur EEL-Fläche in SMC.PTP1B-KO signifikant größer war als in SMC.PTP1B-WT (35,4 ± 1,4 % in SMC.PTP1B-WT vs. 43,2 ± 2,7 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,02; **Abbildung 5-3 F**).

Neben den unterschiedlichen EEL-Flächen fiel vor allem auf, dass die Adventitia der KO-Mäuse signifikant größer (55.978 ± 3.944 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 73.055 ± 3.657 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,004; **Abbildung 5-4 A**) und breiter (34,7 ± 2,3 µm in SMC.PTP1B-WT vs. 46,4 ± 2,2 µm in SMC.PTP1B-KO; P=0,0008; **Abbildung 5-4 B**) war.

Zudem wurden auch die unverletzten Arterien der Versuchstiere morphometrisch ausgewertet. Dort stellten sich keine signifikanten Unterschiede dar, sodass diese Daten nicht aufgeführt sind.

Die Ergebnisse der morphometrischen Analysen zeigen, dass das Fehlen von PTP1B in glatten Muskelzellen zu keiner verstärkten Neointimabildung führt, jedoch kommt es zu einer Vergrößerung und Verbreiterung der Adventitia sowie einer und verkleinerten Gesamtgefäßfläche und einem eingeengten Gefäßlumen. Diese Ergebnisse ähneln dem Bild einer perivaskulären Fibrose.

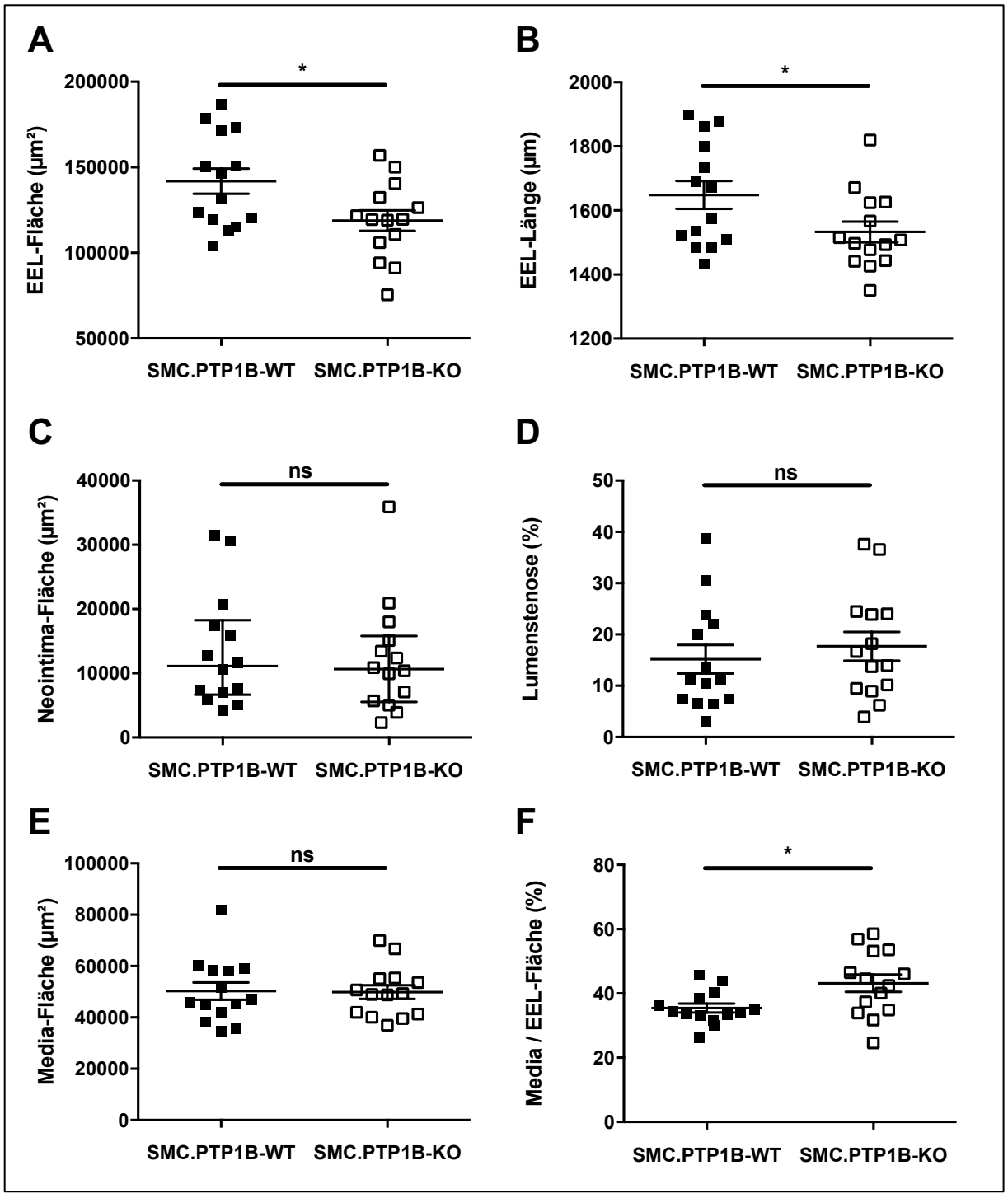

Abbildung 5-3: Ergebnisse der Morphometrischen Auswertung 1.

(A) Morphometrische Analyse der EEL-Fläche, EEL-Länge (B), Neointima-Fläche (C), Lumenstenose (D), Media-Fläche (E) und Media / EEL-Fläche (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (A, B, D-F) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (C).

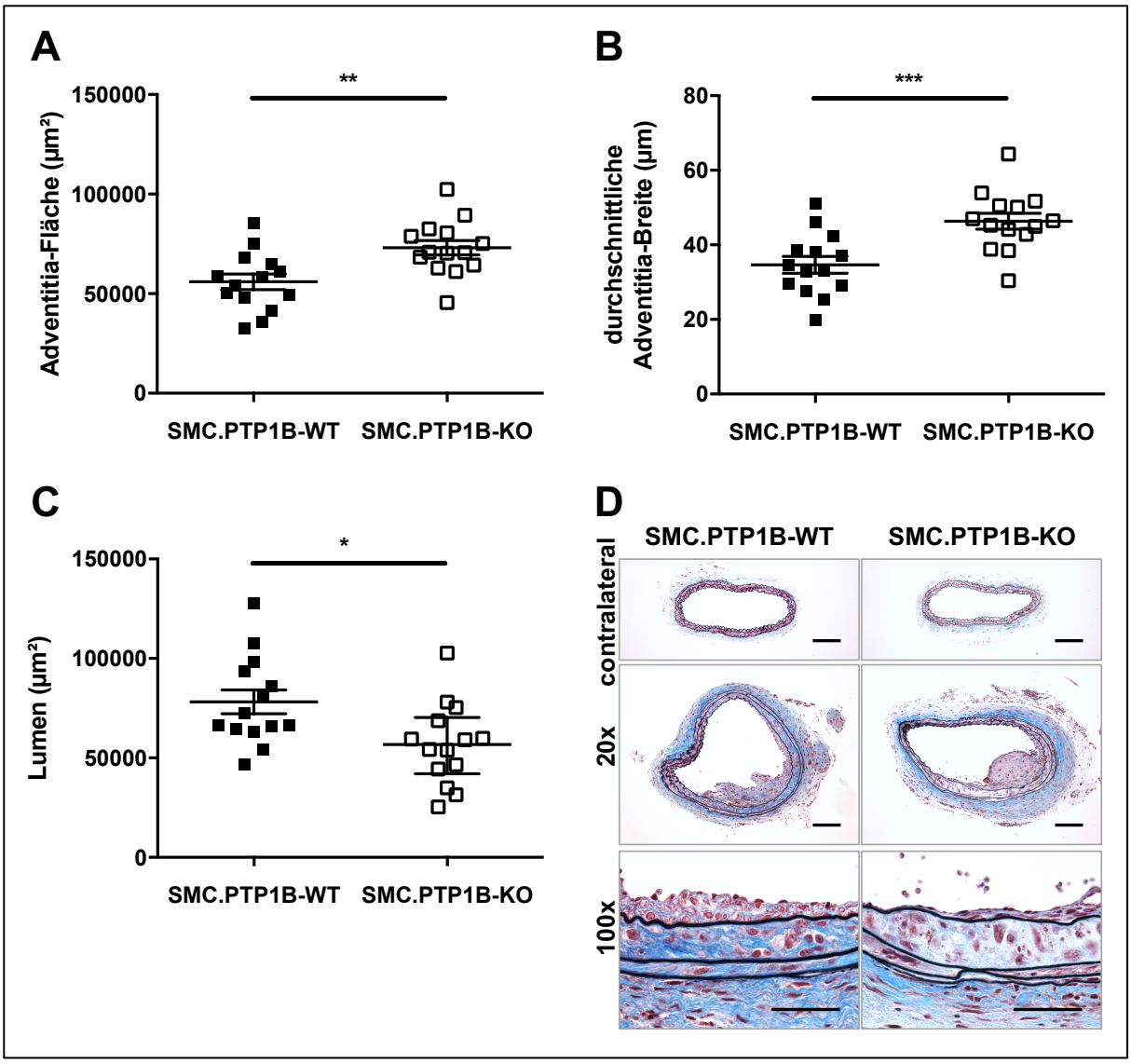

Abbildung 5-4: Ergebnisse der morphometrischen Auswertung 2.

Morphometrische Analyse der Adventitia-Fläche (A), der Adventitia-Breite (B) und der Fläche des offenen Gefäßlumens (C). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. (D) Repräsentative Bilder der VES-MTC-Färbung Paraffin-fixierter Serienschnitte der vaskulären Läsion (oben: unverletzte Arterien in 20-facher Vergrößerung, Mitte: 20-fache Vergrößerung, unten: 100-fache Vergrößerung). Die Maßbalken repräsentieren 100 µm.

5.3.2 Bestimmung des Kollagenanteils

Um die Hypothese einer verstärkten perivaskulären Fibrose beim Fehlen von PTP1B in glatten Muskelzellen weiter zu untersuchen, wurden der Gehalt an interstitiellem Kollagen mithilfe der Picrosiriusrotfärbung überprüft. Hier zeigten sich für die Neointima keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Sowohl die absolute Kollagen-positive Fläche (11,1 [0-65,2] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 12,4 [0-52,9] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,87; **Abbildung 5-5A**) als auch der prozentuale Anteil an der Neointima-Fläche (0,07 [0-0,25] % in SMC.PTP1B-WT vs. 0,10 [0-0,27] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,86; **Abbildung 5-5 B**) war in beiden Gruppen nicht signifikant verschieden.

Bei der Kollagen-positiven Fläche in der Media (526 [161-1.412] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 528 [147-1.772] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,98; **Abbildung 5-5 C**) und dem prozentualen Anteil der Kollagen-positiven Fläche an der Media-Fläche (0,77 [0,28-2,30] % in SMC.PTP1B-WT vs. 0,83 [0,24-2,96] % in SMC.PTP1B-KO; P>0,99; **Abbildung 5-5 D**) gab es ebenfalls keine Unterschiede.

Im Gegensatz zu den Befunden in Neointima und Media zeigte die Adventitia deutliche Unterschiede im Kollagengehalt zwischen beiden Gruppen. Diese Unterschiede sind auch den repräsentativen Bildern in **Abbildung 5-5 C** zu entnehmen. Sowohl die absolute Kollagen-positive Fläche (9.340 [6.313-16.012] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 20.456 [13.247-27.004] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,001; **Abbildung 5-6 A**) als auch der prozentuale Anteil der Kollagen-positiven Fläche an der Adventitia-Fläche (17,3 ± 2,5 % in SMC.PTP1B-WT vs. 28,5 ± 3,2 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,01; **Abbildung 5-6 B**) war in SMC.PTP1B-KO signifikant höher.

Der VSMC-spezifische PTP1B-Knockout führt zu einem signifikant erhöhten Kollagenanteil in der Adventitia, was auf eine vermehrte Anzahl an Myofibroblasten und Fibrozyten hinweisen könnte. Diese Resultate passen zu den morphometrischen Ergebnissen der vergrößerten Adventitia und untermauern das Bild einer perivaskulären Fibrose.

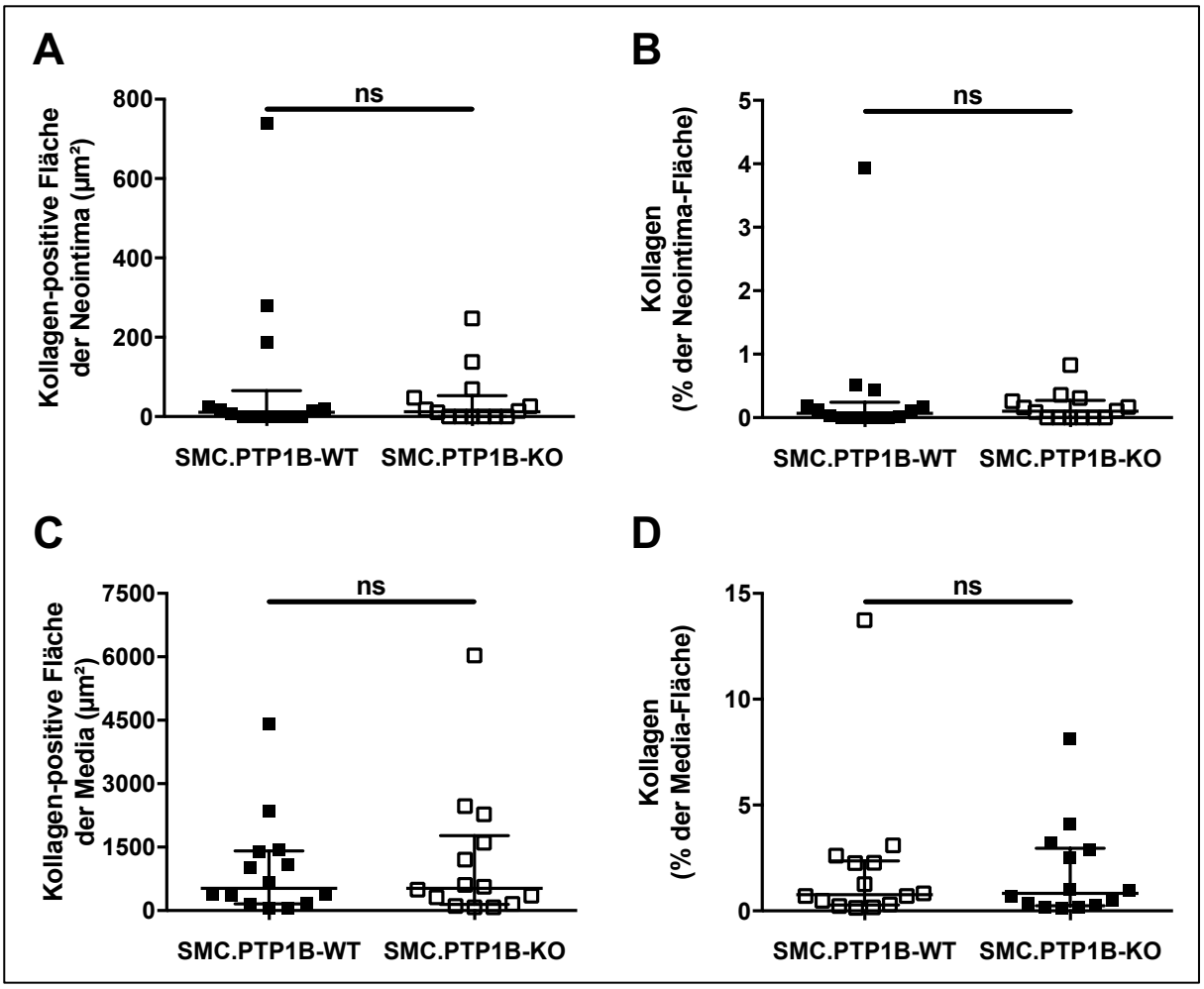

Abbildung 5-5: Statistische Auswertung des Kollagennachweises durch Picrosiriusrot-Färbung 1.

(A) Kollagen-positive Neointima-Fläche, Anteil der Kollagen-positiven Fläche an der Neointima-Fläche (B), Kollagen-positive Media-Fläche (C), Anteil der Kollagen-positiven Fläche an der Media-Fläche (D). Die Ergebnisse sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand.

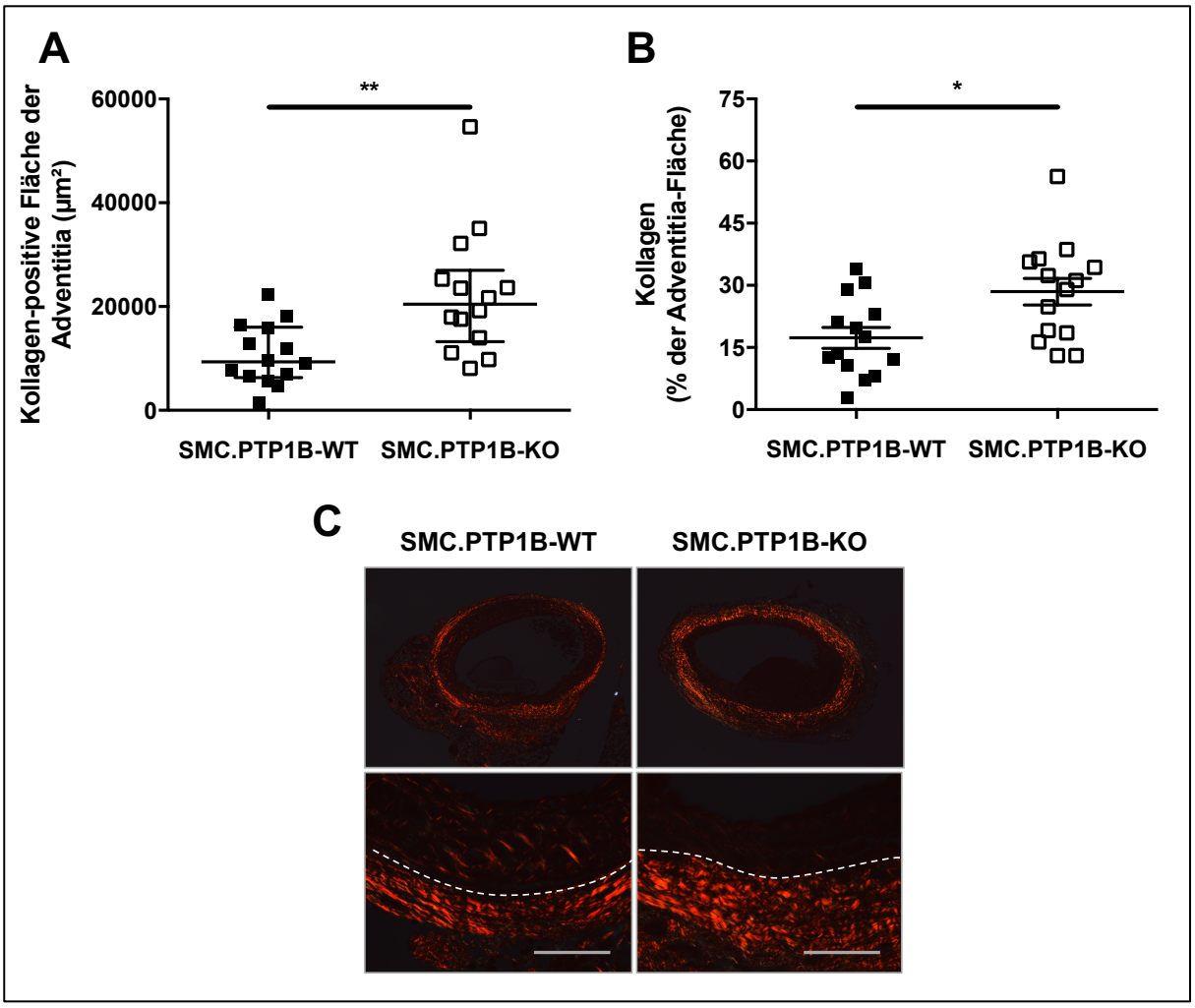

Abbildung 5-6: Statistische Auswertung des Kollagennachweises durch Picrosiriusrot-Färbung 2.

(A) Kollagen-positive Adventitia-Fläche, Anteil der Kollagen-positiven Fläche an der Adventitia-Fläche (B). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (B) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (B). (C) Repräsentative Bilder der Picrosiriusrot-Färbung Paraffin-fixierter Serienschnitte der vaskulären Läsion. Oben: 20-fache Vergrößerung, unten: 100-fache Vergrößerung. Die Maßbalken repräsentieren 100 µm.

5.4 Untersuchung der Auswirkung von Tamoxifen auf den Phänotyp der Versuchstiere

Um auszuschließen, dass die morphometrischen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen durch das Tamoxifen-Spezialfutter und nicht durch den PTP1B-Knockout selbst hervorgerufen wurden, erfolgte eine weitere Versuchsreihe mit Mäusen des Genotyps SMMHC.ER^{T2}-Cre tg, welche die Cre-Recombinase, jedoch nicht das gefloxte Transgen exprimierten, weshalb eine Gendeletion unmöglich war. Die Versuchstiere erhielten über einen Zeitraum von sechs Wochen Tamoxifen-Spezialfutter und wurden analog zum Protokoll der beiden anderen Versuchsgruppen behandelt. Der Vergleich der drei Gruppen erfolgte mittels ANOVA gefolgt von *Bonferroni's multiple comparisons test*. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse präsentiert.

Im Vergleich zeigten sich in den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung der Neointima (13.455 ± 2.385 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 10.953 ± 2.248 µm² in SMMHC.Cre + Tam; P=0,99; 12.212 ± 2.318 µm² in SMC.PTP1B-KO vs. 10.953 ± 2.248 µm² in SMMHC.Cre + Tam; P=0,99; **Abbildung 5-7 A**).

Die Media-Fläche dieser Kontrollgruppe (SMMHC.Cre + Tam) war hingegen signifikant kleiner als die in SMC.PTP1B-WT und SMC.PTP1B-KO Mäusen (50.253 ± 3.362 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 37.984 ± 2.477 µm² in SMMHC.Cre + Tam; P=0,01; 49.891 ± 2.638 µm² in SMC.PTP1B-KO vs. 37.984 ± 2.477 µm² in SMMHC.Cre + Tam; P=0,02; **Abbildung 5-7 B**).

Wie in **Abbildung 5-7 C** dargestellt, unterschied sich auch die Adventitia-Fläche in SMMHC.Cre + Tam-Mäusen nicht signifikant von der in SMC.PTP1B-WT (48.408 ± 3.512 µm² in SMMHC.Cre + Tam vs. 55.978 ± 3.944 µm² in SMC.PTP1B-WT; P=0,48) und war ebenfalls signifikant kleiner als die der KO-Mäuse (48.408 ± 3.512 µm² in SMMHC.Cre + Tam vs. 73.055 ± 3.657 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,0001; **Abbildung 5-7 C**). Diese Ergebnisse gehen somit mit den vorherigen Ergebnissen einher.

Auch für die Breite der Adventitia zeigte sich zeigte sich beim Vergleich der Gruppen SMC.PTP1B-WT und SMMHC.Cre + Tam kein signifikanter Unterschied in der Breite der Adventitia (34,7 ± 2,24 µm in SMC.PTP1B-WT vs. 34,8 ± 2,49 µm in SMMHC.Cre

+ Tam; P=0,99), wohingegen auch im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung in SMC.PTP1B-KO-Mäusen festzustellen (46,4± 2,14 µm in SMC.PTP1B-KO vs. 34,8 ± 2,49 µm in SMMHC.Cre + Tam; P=0,003; **Abbildung 5-7 D**).

Nur in Bezug auf die Fläche der Media zeigte sich ein Unterschied zwischen Versuchstieren der Gruppen SMC.PTP1B-WT und SMMHC.Cre + Tam in Form einer kleineren Media in Mäusen der Kontrollgruppe. Morphometrisch lässt sich somit keine ungewünschte Beeinflussung des Phänotyps einer vergrößerten Adventitia alleine durch Tamoxifen feststellen. Der stärkste Effekt des VSMC-spezifischen PTP1B Knockouts – eine vergrößerte Adventitia – ist nur in der SMC.PTP1B-KO-Gruppe zu beobachten. Ein spezifischer Effekt des Knockouts auf den Genotyp ist anzunehmen und eine ungewünschte Tamoxifenwirkung erscheint unwahrscheinlich.

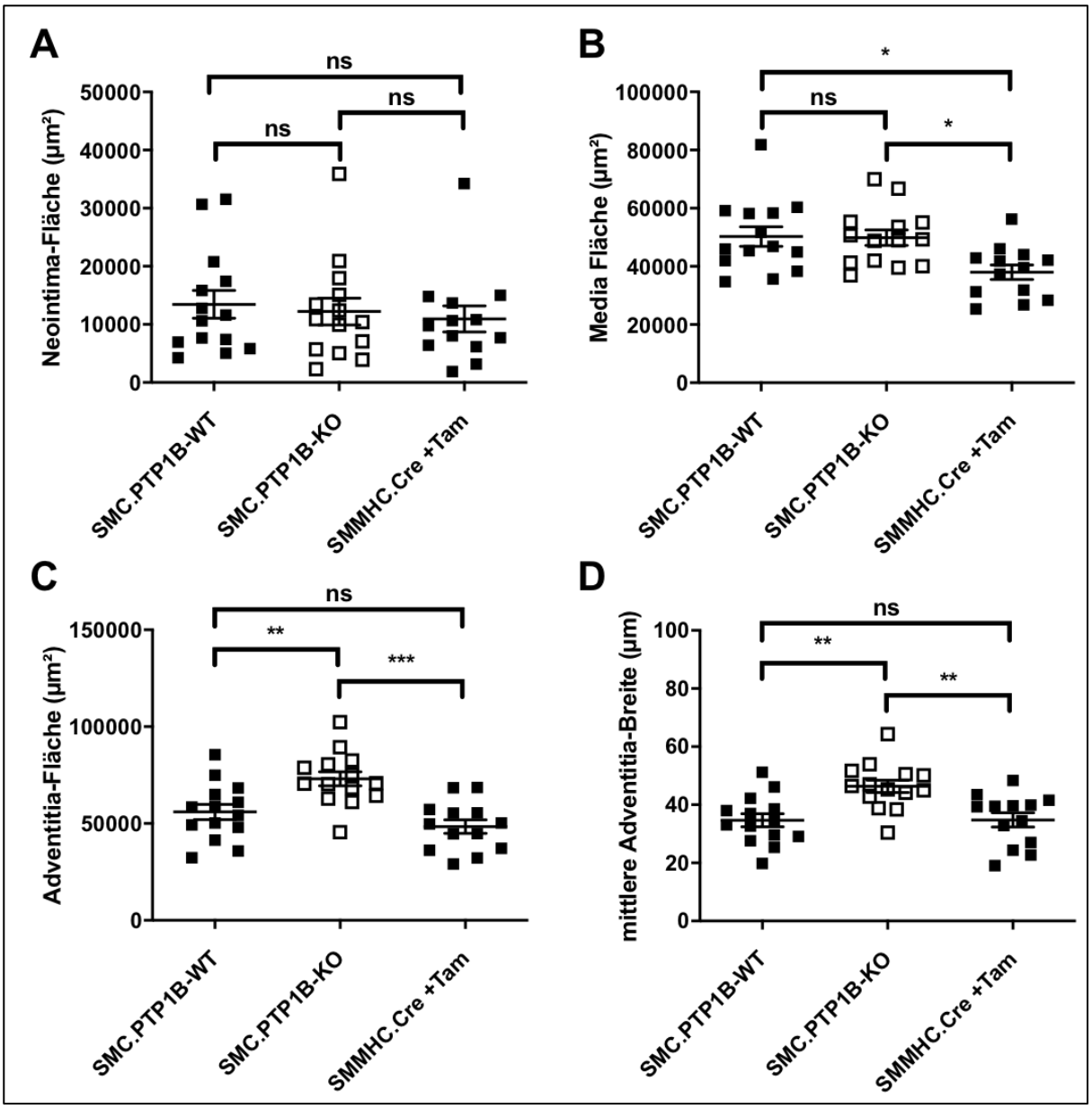

Abbildung 5-7: Morphometrische Analyse der beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe
(A) Morphometrische Analyse der Neointima-Fläche (µm^2). (B) Morphometrische Analyse der Media-Fläche (µm^2). (C) Morphometrische Analyse der Adventitia-Fläche (µm^2). (D) Morphometrische Analyse der Adventitia-Breite (µm). Darstellung des Mittelwerts ± SEM.

5.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Neben den histologischen Untersuchungen wurden auch immunhistochemische Färbungen mit anschließender quantitativer Analyse durchgeführt. Die Darstellungsweise der Ergebnisse erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die Darstellung der histologischen Analysen.

5.5.1 Analyse der Zellproliferation mithilfe von PCNA

Zur Analyse der Proliferation der Zellen wurden Gewebeschnitte durch die Läsion mit Antikörpern gegen PCNA inkubiert, wodurch sich proliferierende Zellkerne braun und alle restlichen Zellkerne blau angefärbten. Anschließend wurden für jeden Schnitt die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl der PCNA-positiven, proliferierenden Zellen bestimmt. Daraus konnten die jeweiligen Anteile für die verschiedenen Gefäßschichten berechnet werden.

Bei der Auswertung war deutlich zu erkennen, dass die Proliferationsraten in SMC.PTP1B-KO signifikant erhöht waren. So zeigten sich für die Neointima zwar keine signifikanten Unterschiede für die Anzahl PCNA-positiver Zellen (23,5 [11-34] in SMC.PTP1B-WT vs. 27,5 [20-47] in SMC.PTP1B-KO; P=0,19; **Abbildung 5-8 A**) und die Gesamtzellzahl (1.089 ± 15 in SMC.PTP1B-WT vs. 111 ± 18 in SMC.PTP1B-KO; P=0,92; **Abbildung 5-8 C)**, jedoch war der Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtzellzahl in SMC.PTP1B-KO signifikant erhöht (21,3 ± 3,5 % in SMC.PTP1B-WT vs. 34,9 ± 4,9 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,03; **Abbildung 5-8 B**). Auch für die Media ergab die Auswertung eine erhöhte Zahl proliferierender Zellen (23 [15-46] in SMC.PTP1B-WT vs. 63 [42-108] in SMC.PTP1B-KO; P=0,002; **Abbildung 5-8 D**) und einen erhöhten Anteil der PCNA-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl (19 [10-31] % in SMC.PTP1B-WT vs. 49 [27-67] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,002; **Abbildung 5-8 E**). Bei der Gesamtzellzahl gab es keine signifikanten Unterschiede (152 ± 8,6 in SMC.PTP1B-WT vs. 174 ± 16 in SMC.PTP1B-KO; P=0,23; **Abbildung 5-8 F**).

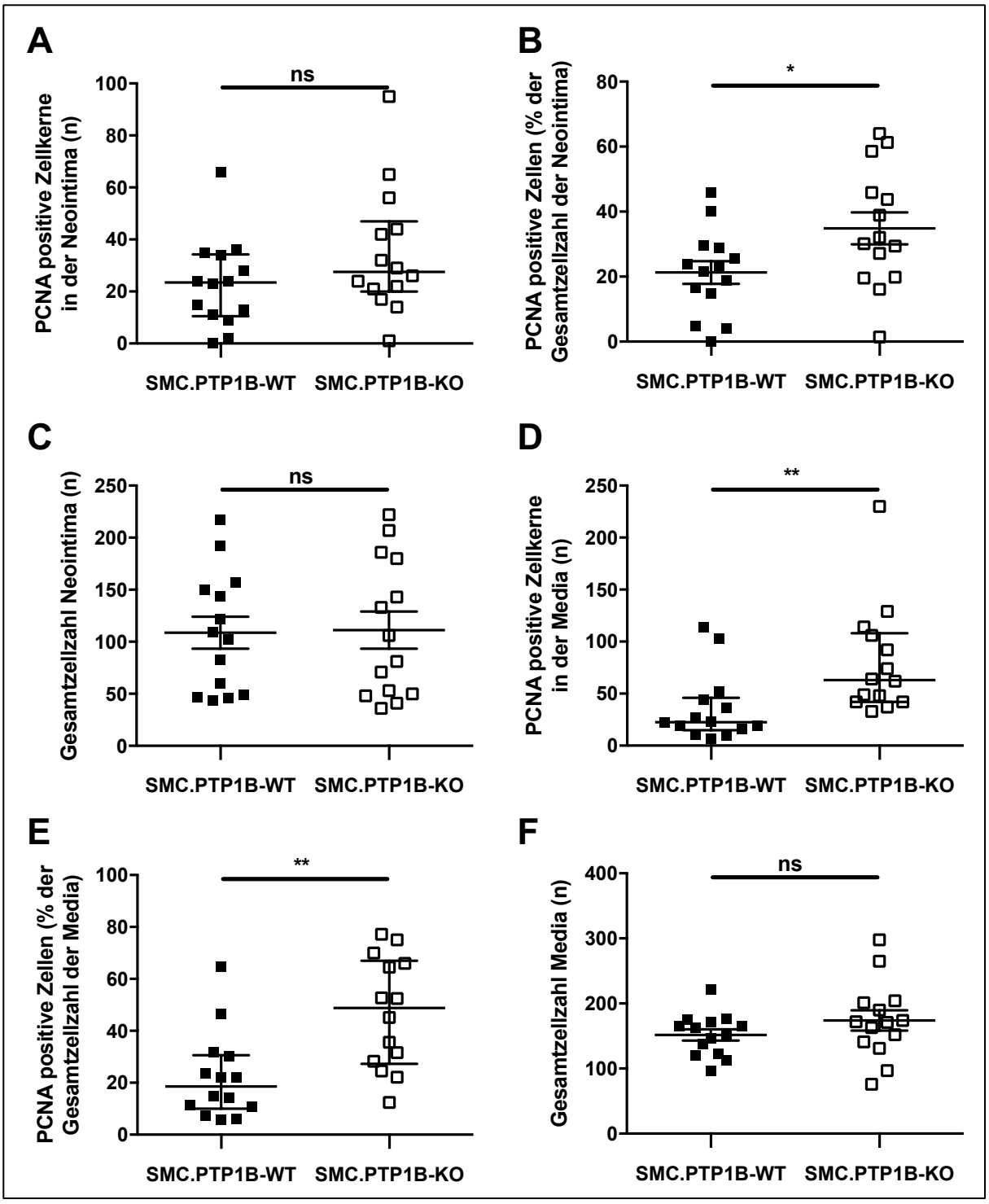

Abbildung 5-8: Statistische Auswertung der Zellproliferation mithilfe der PCNA-Immunhistochemie 1.

(A) Quantitative Analyse der PCNA-positiven Zellen in der Neointima, des Anteils der PCNA-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl der Neointima (B), der Gesamtzellzahl in der Neointima (C), der PCNA-positiven Zellen in der Media (D), des Anteils der PCNA-positiven Zellen der Gesamtzellzahl in der Media (E), der Gesamtzellzahl in der Media (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (B, C, F) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (A, D, E).

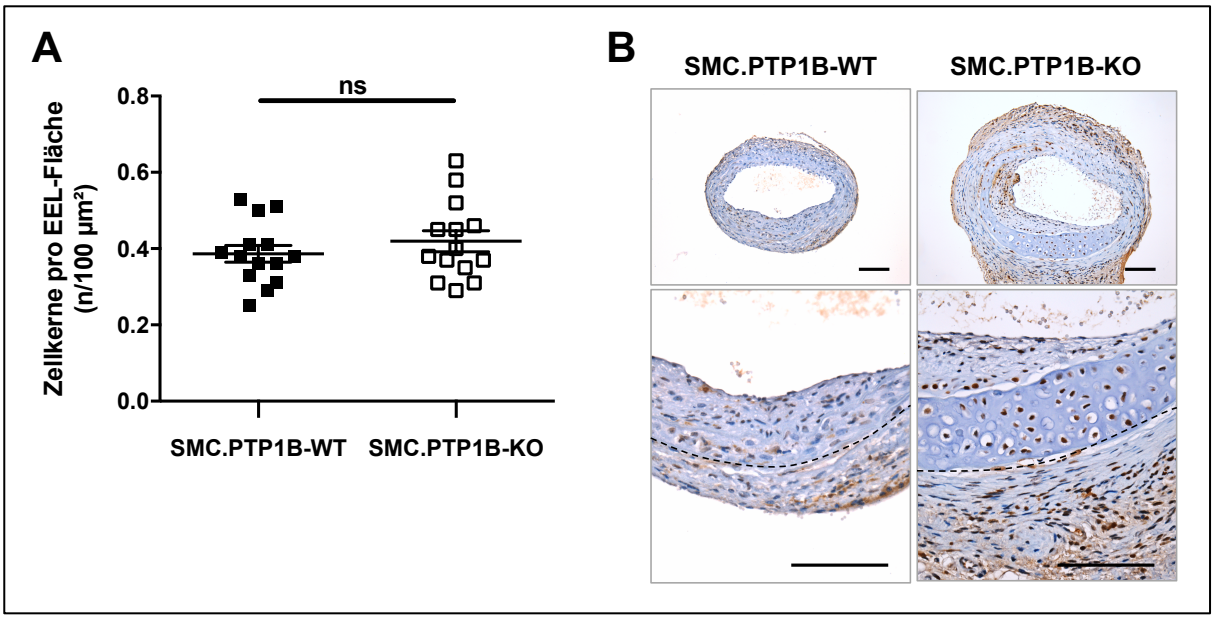

Abbildung 5-9: Statistische Auswertung der Zellproliferation mithilfe der PCNA-Immunhistochemie 2.

(A) Zellkerne pro EEL-Fläche. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. (B) Repräsentative Bilder PCNA-Immunhistochemie Paraffin-fixierter Schnitte der vaskulären Läsion (oben: 20-fache Vergrößerung, unten: 100-fache Vergrößerung). Die Maßbalken repräsentieren 100 µm.

Die Auswertung von Zellkernen pro 100 µm² EEL-Fläche zeigte keine signifikanten Unterschiede (0,39 ± 0,02 in SMC.PTP1B-WT vs. 0,42 ± 0,03 in SMC.PTP1B-KO; P=0,36; **Abbildung 5-9 A**).

Die Analyse der Adventitia und des Gefäßes als Ganzes ergab in allen Bereichen erhöhte Werte für Mäuse der SMC.PTP1B-KO-Gruppe. So unterschieden sich beide Gruppen in der Adventitia in der Anzahl der proliferierenden Zellen (19,0 [13,8-25,5] in SMC.PTP1B-WT vs. 52,5 [39,3-90] in SMC.PTP1B-KO; P=0,0003; **Abbildung 5-10 A**), der Gesamtzellzahl (187 ± 13 in SMC.PTP1B-WT vs. 309 ± 33 in SMC.PTP1B-KO; P=0,002; **Abbildung 5-10 C**) und dem Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtzellzahl in der Adventitia (10,9 [7,8-13,5] % in SMC.PTP1B-WT vs. 20,8 [13,6-31,7] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,009; **Abbildung 5-10 B**) signifikant.

Betrachtet man alle Gefäßschichten gemeinsam, so ergeben sich signifikante Unterschiede in der Anzahl der proliferierenden Zellen (72 [46-90] in SMC.PTP1B-WT vs. 160 [105-224] in SMC.PTP1B-KO; P=0,0008; **Abbildung 5-10 D**), der Gesamtzellzahl (448 ± 23 in SMC.PTP1B-WT vs. 594 ± 50 in SMC.PTP1B-KO; P=0,01; **Abbildung 5-10 F**) und dem prozentualen Anteil der proliferierenden Zellen

an der Gesamtzellzahl (17,4 ± 2,4 % in SMC.PTP1B-WT vs. 31,5 ± 4,0 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,007; **Abbildung 5-10 E**).

Der Knockout von PTP1B in VSMC ist mit einer signifikant erhöhten Zellzahl und erhöhten Proliferationsrate assoziiert. Dieses Ergebnis ist mit einer verstärkten Wachstumsfaktor-Signaltransduktion in Abwesenheit von PTP1B vereinbar.

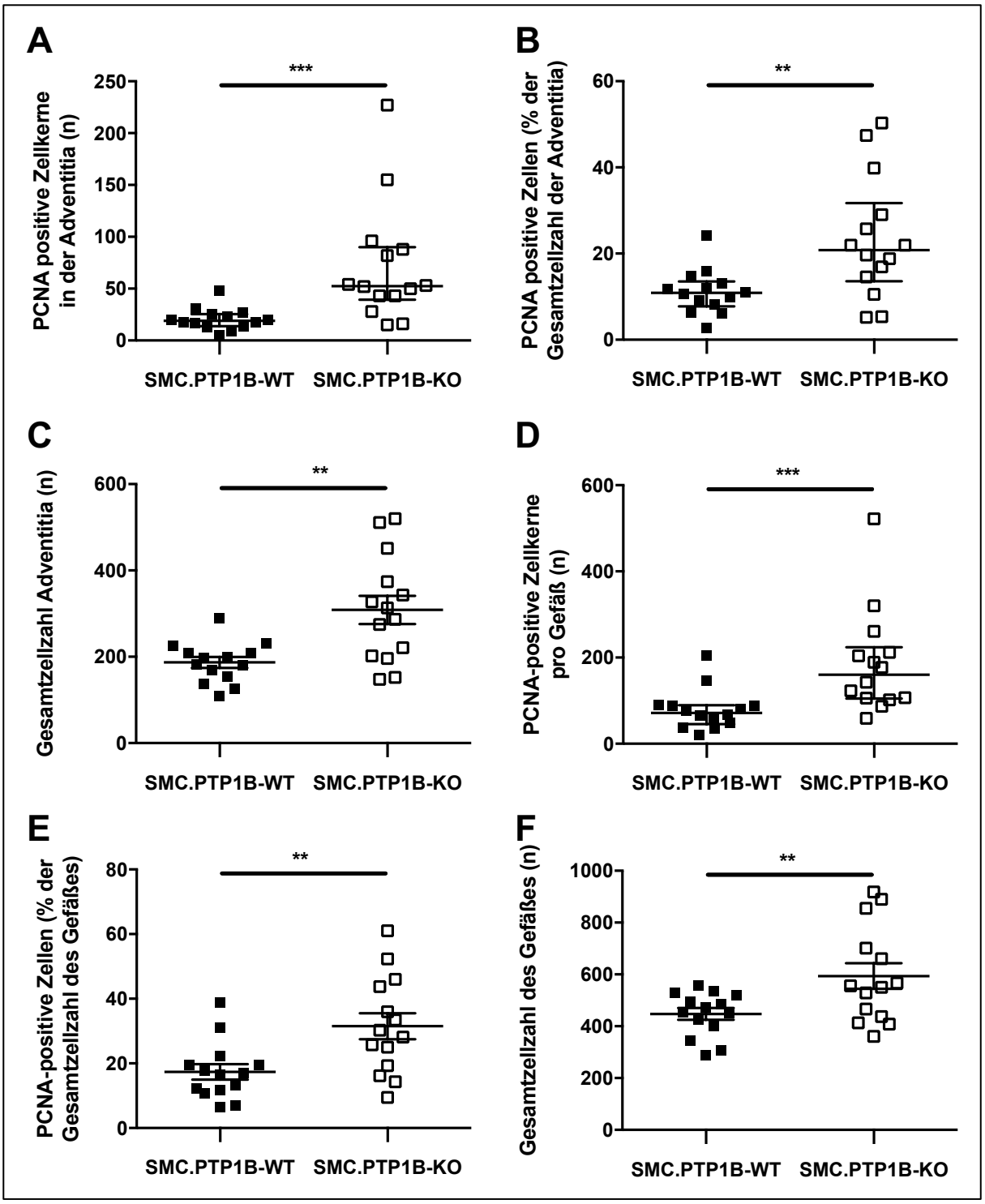

Abbildung 5-10: Statistische Auswertung der Zellproliferation mithilfe der PCNA-Immunhistochemie 3.

(A) Quantitative Analyse der PCNA-positiven Zellen in der Adventitia, des Anteils der PCNA-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl in der Adventitia (B), der Gesamtzellzahl in der Adventitia (C), der PCNA-positiven Zellen des Gefäßes (D), des Anteils der PCNA-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl des Gefäßes (E), der Gesamtzellzahl des Gefäßes (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (C, E, F) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (A, B, D).

5.5.2 Nachweis des Glattmuskelzellmarkers SM Alpha-Actin

Um nachzuweisen, ob es sich bei vermehrten Zellen in der Adventitia um Extrazellulärmatrix-produzierende glatte Muskelzellen handeln könnte, wurde SM Alpha-Actin (SMA) als Marker verwendet. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen in der Gefäßwand zeigte ausschließlich in der Adventitia signifikante Unterschiede. Diese Ergebnisse unterstreichen die bereits vorhandenen Daten aus den morphometrischen Analysen sowie der Quantifizierung des Kollagen-Gehalts und der Proliferation von Zellen und sind auch auf den repräsentativen Bildern zu erkennen (**Abbildung 5-11**).

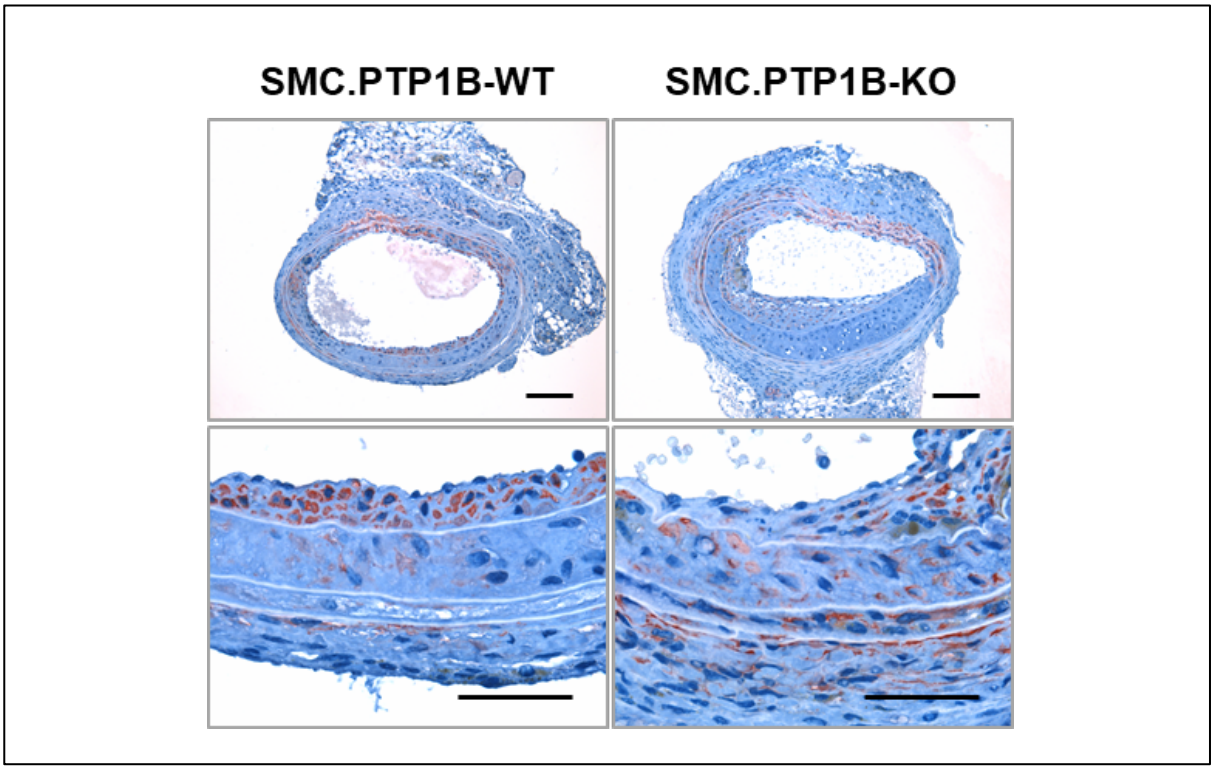

Abbildung 5-11: Repräsentative Bilder der SMA-Immunhistochemie Paraffin-fixierter Schnitte der vaskulären Läsion. (oben: 20-fache Vergrößerung, unten: 100-fache Vergrößerung). Die Maßbalken repräsentieren 100 µm.

Die Analysen zeigten für die SMA-positive Neointima-Fläche (1.483 [303-4.108] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 2.281 [688-2.587] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,31; **Abbildung 5-12 A**), dem SMA-positiven Anteil der Neointima-Fläche (9,8 ± 1,7 % in SMC.PTP1B-WT vs. 12,8 ± 1,9 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,25; **Abbildung 5-12 B**), der SMA-positiven Media-Fläche (5.078 ± 860 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 6.245 ± 784 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,33; **Abbildung 5-12 C**) und dem SMA-positiven Anteil der Media (11,1 ± 2,3 % in SMC.PTP1B-WT vs. 12,0 ± 1,2 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,75; **Abbildung 5-12 D**) keine signifikanten Unterschiede.

In der Adventitia waren jedoch sowohl die absolute SMA-positive Fläche (580 [231-1.632] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 4.621 [2.796-6.660] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,0003; **Abbildung 5-12 E**) als auch der SMA-positive Anteil an der Adventitia-Fläche 0,70 [0,33-1,46] % in SMC.PTP1B-WT vs. 4,62 [3,10-8,25] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,00005; **Abbildung 5-12 F**) in der Gruppe der SMC.PTP1B-KO-Mäuse signifikant größer.

Der Knockout von PTP1B führt zu einer verstärkten SMA-Expression in der Adventitia. Dieses Phänomen könnte durch eine verstärkte Proliferation lokaler Zellen oder die Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Adventitia erklärt werden. Daneben ist auch eine Umdifferenzierung von residenten Vorläuferzellen der Adventitia zu glatten Muskelzellen möglich.

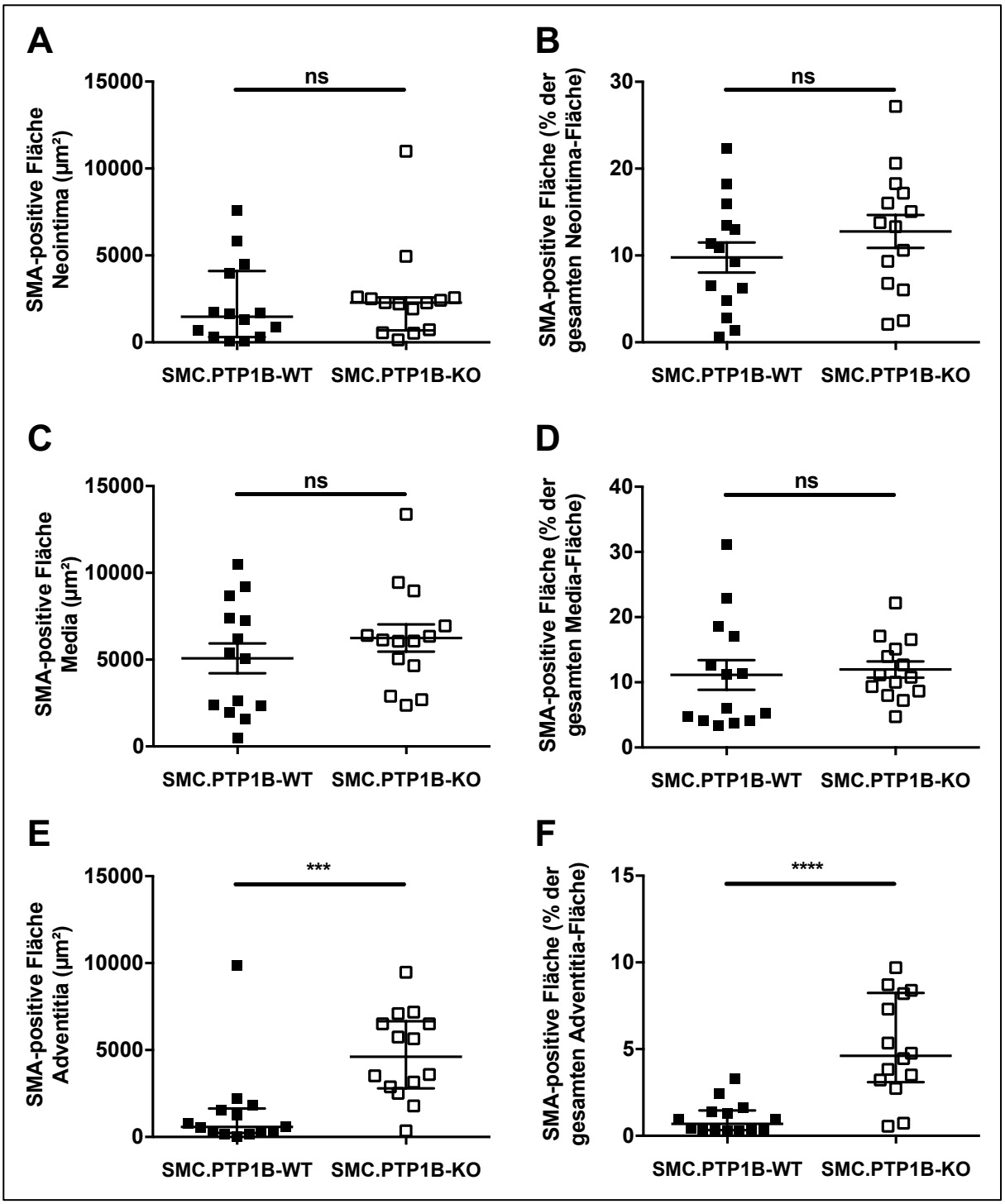

Abbildung 5-12: Quantitative Analyse der Verteilung von SM Alpha-Actin.

(A) SMA-positive Fläche in der Neointima, Anteil der SMA-positiven Fläche an der Neointima-Fläche (B), SMA-positive Media-Fläche (C), Anteil der SMA-positiven Fläche an der Media-Fläche (D), SMA-positive Adventitia-Fläche (E), Anteil der SMA-positiven Fläche an der Adventitia-Fläche (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (B, C, D) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (A; E, F).

5.5.3 Immunhistochemischer Nachweis des Myofibroblastenmarkers PDGFR-β

Als zusätzlicher Marker wurde PDGFR-β verwendet, welcher (wie auch SMA) Myofibroblasten markiert. Dabei zeigten sich vor allem in der Media signifikante Unterschiede, die darlegen, dass es in SMC.PTP1B-KO eine höhere PDGFR-β-Expression gibt. In der Neointima war die absolute PDGFR-β-positive Fläche nicht signifikant unterschiedlich (583 [117-951] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 533 [152-1.989] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,52; **Abbildung 5-13 A**), aber der prozentuale Anteil an der Gesamtfläche (3,8 [1,8-5,4] % in SMC.PTP1B-WT vs. 7,3 [3,6-8,7] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,02; **Abbildung 5-13 B**) zeigte einen signifikanten Unterschied. In der Media waren sowohl die absolute PDGFR-β-positive-Fläche (1.332 [597-2.448] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 3.175 [2.183-6.216] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,01; **Abbildung 5-13 C**) als auch der PDGFR-β-positive Anteil der Media-Fläche (2,6 [1,1-5,7] % in SMC.PTP1B-WT vs. 5,3 [4,7-10,8] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,02; **Abbildung 5-13 D**) signifikant unterschiedlich. Dahingegen wies die Adventitia sowohl absolut (5.243 ± 1.594 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 10.030 ± 2.376 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,02; **Abbildung 5-13 E**) als auch prozentual (9,4 ± 3,0 % in SMC.PTP1B-WT vs. 12,2 ± 2,7 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,5; **Abbildung 5-13 F**) keine Unterschiede bei der PDGFR-β-positiven Fläche auf.

Hingegen brachte das Auszählen PDGFR-β-immunpositiver Zellen in der Adventitia hervor, dass sowohl die Gesamtzellzahl (226 ± 20 in SMC.PTP1B-WT vs. 334 ± 42 in SMC.PTP1B-KO; P=0,03; **Abbildung 5-14 A**) als auch die Zahl der PDGFR-β-positiven Zellen (41,4 ± 6,3 in SMC.PTP1B-WT vs. 76,0 ± 9,1 in SMC.PTP1B-KO; P=0,004; **Abbildung 5-14 C**) in SMC.PTP1B-KO signifikant erhöht war. Der prozentuale Anteil von PDGFR-β-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl war jedoch in beiden Gruppen nicht unterschiedlich (19,0 ± 2,5 % in SMC.PTP1B-WT vs. 23,5 ± 1,9 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,16; **Abbildung 5-14 B**). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den repräsentativen Bildern wider (**Abbildung 5-14 D**).

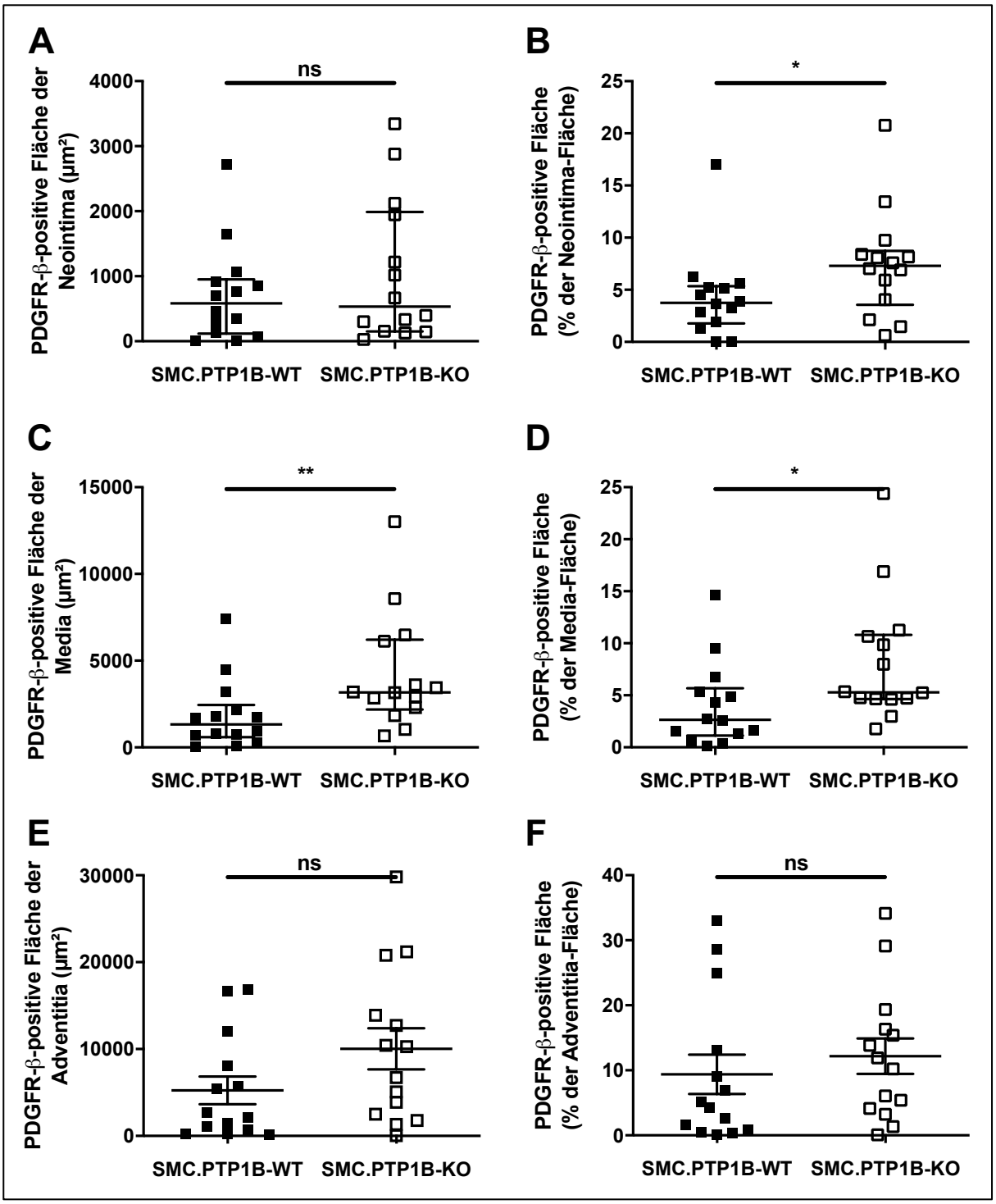

Abbildung 5-13: Quantitative Analyse der PDGFR-β Expression.

(A) PDGFR-β-positive Neointima-Fläche, PDGFR-β-positiver Anteil an der Neointima-Fläche (B), PDGFR-β-positive Media-Fläche (C), PDGFR-β-positiver Anteil an der Media-Fläche (D), PDGFR-β-positive Adventitia-Fläche (E), PDGFR-β-positiver Anteil an der Adventitia-Fläche (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (A-D) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (E, F).

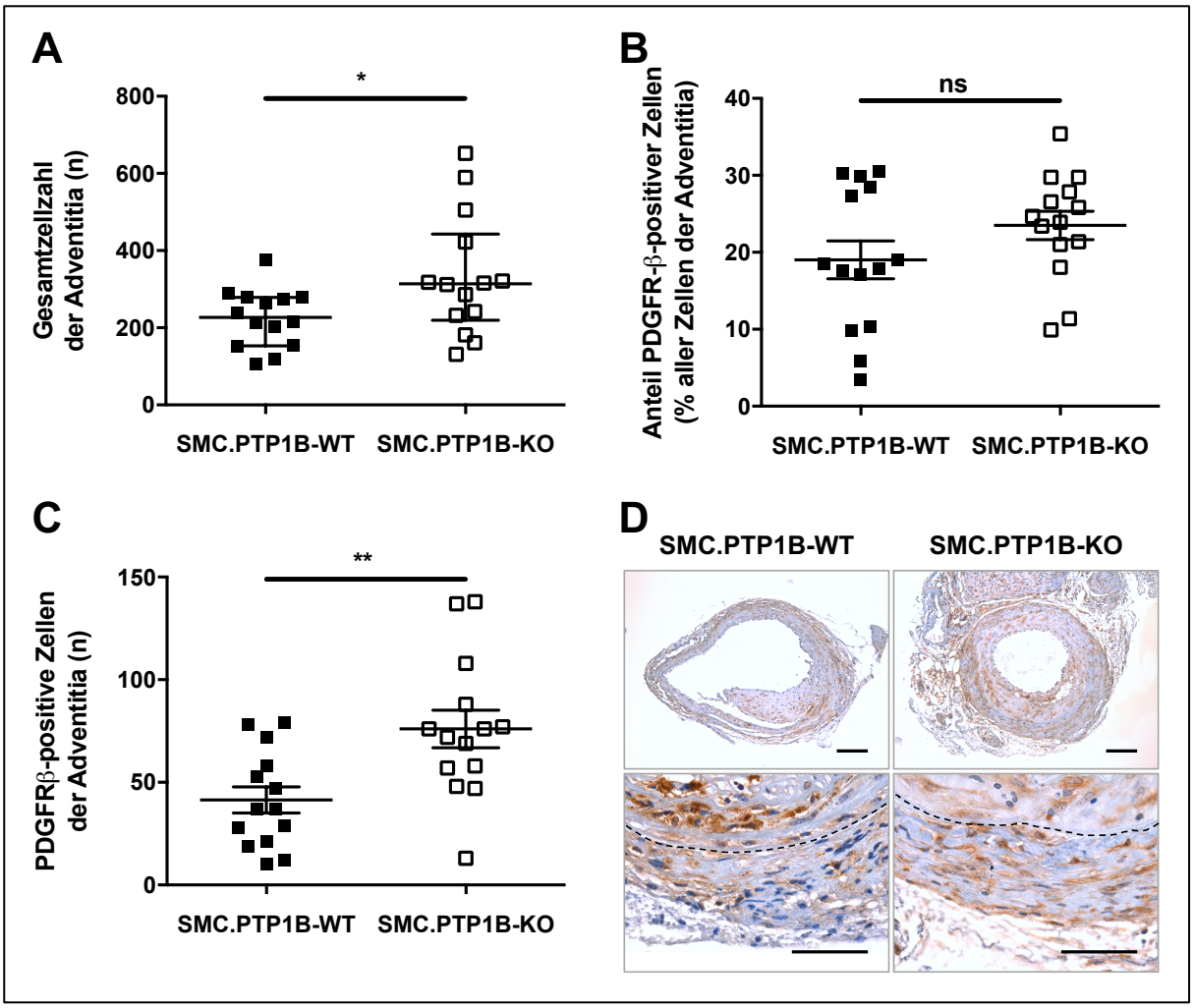

Abbildung 5-14: Quantitative Analyse der PDGFR-β-positiven Zellen.

(A) Gesamtzellzahl der Adventitia, Anteil PDGFR-β-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl der Adventitia (B), Anteil PDGFR-β-positiver Zellen an der Adventitia (C). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM. (D) Repräsentative Bilder der PDGFR-β-Immunhistochemie Paraffin-fixierter Schnitte der vaskulären Läsion. (oben: 20-fache Vergrößerung, unten: 100-fache Vergrößerung). Die Maßbalken repräsentieren 100 µm.

In allen Wandschichten, vor allem in Media und Adventitia, kam es nach Induzierung des PTP1B-Knockouts in Glattmuskelzellen zu einer Zunahme an Zellen mit Expression der Rezeptortyrosinkinase PDGFR-β. Der prozentuale Anteil an PDGFR-β-positiver Fläche war jedoch nur in Neointima und Media erhöht.

5.5.4 Immunhistochemischer Nachweis des Perizytenmarkers NG2

Bis auf die Erhöhung der absoluten NG2-positiven Media-Fläche in der SMC.PTP1B-KO Versuchsgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Die Neointima zeigt sowohl für die absolute NG2-positive Fläche (327 [195-831] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 939 [204-3.833] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,19; **Abbildung 5-15 A**) als auch für den prozentualen Anteil der NG2-positiven Fläche an der gesamten Neointima-Fläche (2,58 [1,32-3,62] % in SMC.PTP1B-WT vs. 5,62 [1,32-19,51] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,14; **Abbildung 5-15 B**) keine signifikanten Unterschiede.

Die absolute NG2-positive Media-Fläche war in SMC.PTP1B-KO signifikant größer (910 ± 240 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 3.664 ± 1.143 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,03; **Abbildung 5-15 C**), wohingegen der prozentuale Anteil der NG2-positiven Fläche an der gesamten Media-Fläche keinen signifikanten Unterschied aufwies (1,10 [0,27-2,96] % in SMC.PTP1B-WT vs. 3,05 [0,61-15,16] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,16; **Abbildung 5-15 D**).

Auch die Auswertung der Adventitia zeigte sowohl in der absoluten Fläche (369 [224-1.304] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 763 [426-9.755] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,10; **Abbildung 5-16 A**) als auch im prozentualen Anteil der NG2-positiven Fläche (0,77 [0,33-2,53] % in SMC.PTP1B-WT vs. 1,01 [0,56-9,11] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,33; **Abbildung 5-16 B**) keine signifikanten Unterschiede zwischen SMC.PTP1B-WT und SMC.PTP1B-KO Mäusen.

Außerdem unterscheiden sich in beiden Gruppen weder die absolute Anzahl der NG2-positiven Zellen in der Adventitia (23 [12-44] in SMC.PTP1B-WT vs. 28 [18-66] in SMC.PTP1B-KO; P=0,46; **Abbildung 5-16 C**) noch der Anteil der NG2-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl in der Adventitia (7,8 [4,2-17,0] % in SMC.PTP1B-WT vs. 7,6 [5,0-14,1] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,84; **Abbildung 5-16 E**). Die Gesamtzellzahl der Adventitia zeigte keinen signifikanten Unterschied (291 ± 20 in SMC.PTP1B-WT vs. 438 ± 67 in SMC.PTP1B-KO; P= 0,05).

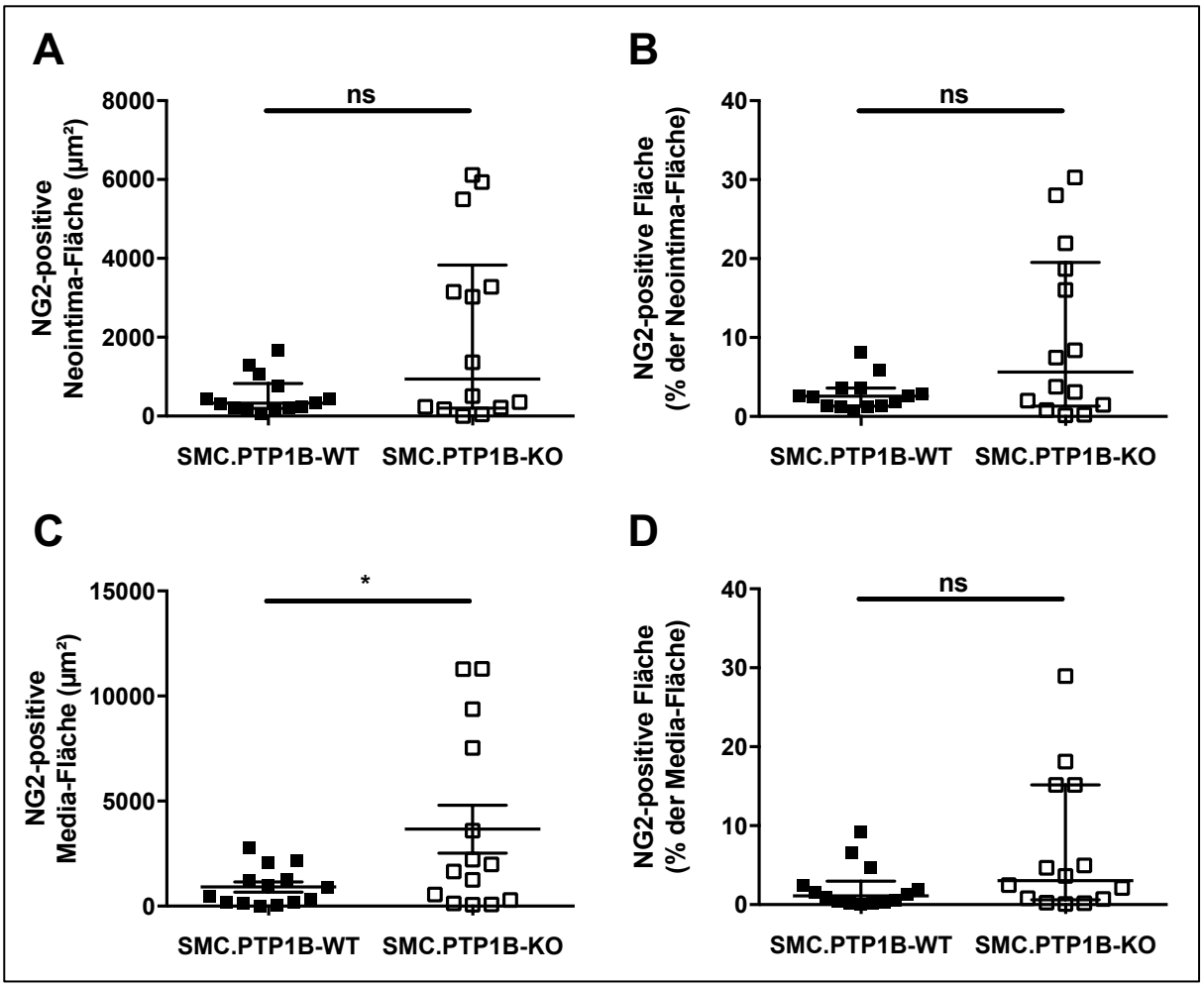

Abbildung 5-15: Statistische Auswertung der NG2-Expression 1.

(A) NG2-positive Neointima-Fläche, NG2-positiver Anteil an der Neointima-Fläche (B), NG2-positive Media-Fläche (C), NG2-positiver Anteil an der Media-Fläche (D). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (C) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (A, B, D).

PTP1B-Knockout-Mäuse weisen in der Tunica media eine höhere absolute NG2-Expression auf. Der Perizytenmarker, der auch von unreifen glatten Muskelzellen exprimiert wird, könnte für eine verstärkte Proliferation und Entdifferenzierung glatter Muskelzellen beim Fehlen von PTP1B sprechen.

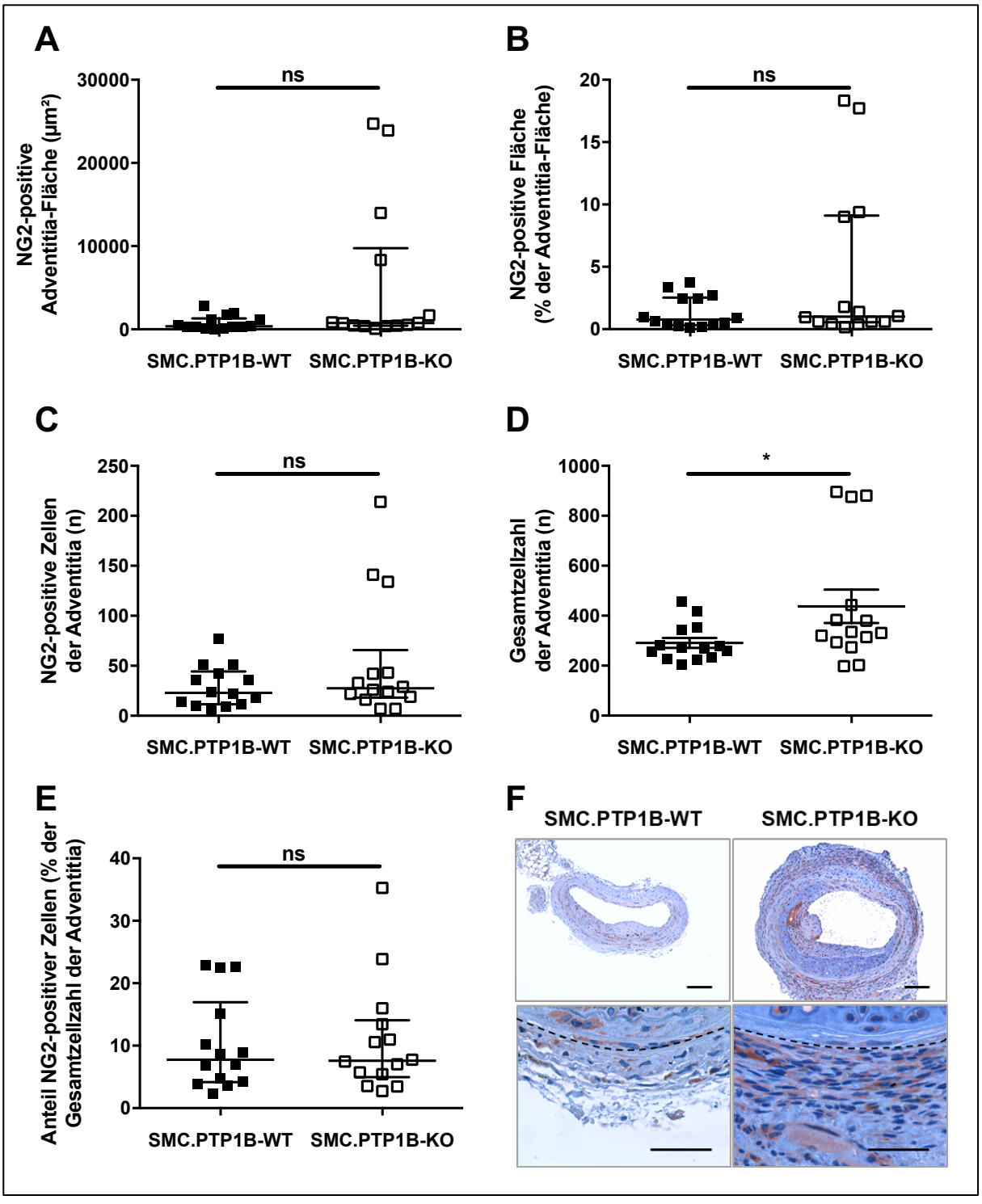

Abbildung 5-16: Statistische Auswertung der NG2-Expression 2.

(A) NG2-positive Adventitia-Fläche, Anteil der NG2-positiven Fläche an der Adventitia-Fläche (B), NG2-positive Zellen in der Adventitia (C), Gesamtzellzahl der Adventitia (D), Anteil NG2-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl der Adventitia (E). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (D) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (A-C, E). (F) Repräsentative Bilder der NG2-Immunhistochemie Paraffin-fixierter Schnitte der vaskulären Läsion. (oben: 20-fache Vergrößerung, unten: 100-fache Vergrößerung). Die Maßbalken repräsentieren 100 µm.

5.5.5 Immunhistochemischer Nachweis des Makrophagenmarkers F4/80

Um zu untersuchen, ob es sich bei den vermehrten Zellen um Immunzellen handeln könnte, wurde F4/80 als Marker für Gewebsmakrophagen verwendet. Sowohl die absolute F4/80-positive Neointima-Fläche (443 [133-901] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 802 [42-1.150] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,72; **Abbildung 5-17 A**) als auch der prozentuale F4/80-positive Anteil an der Neointima-Fläche (3.1 ± 0,6 % in SMC.PTP1B-WT vs. 5,2 ± 1,3 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,16; **Abbildung 5-17 B**) und die Anzahl der F4/80-positiven Zellkerne (10,5 [4,5-14,5] in SMC.PTP1B-WT vs. 12,5 [2,5-16,5] in SMC.PTP1B-KO; P=0,76; **Abbildung 5-17 C**) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Das gleiche Bild zeigte sich auch für die F4/80-positive Media-Fläche (379 [155-694] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 346 [116-1.864] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,95; **Abbildung 5-17 D**), den prozentualen Anteil an der Media-Fläche (0,86 [0,37-0,95] % in SMC.PTP1B-WT vs. 0,69 [0,17-3,59] % in SMC.PTP1B-KO; P>0,99; **Abbildung 5-17 E**) und die Anzahl der F4/80-positiven Zellkerne der Media (12,0 ± 2,2 in SMC.PTP1B-WT vs. 13,0 ± 2,9 in SMC.PTP1B-KO; P=0,78; **Abbildung 5-17 F**).

Auch die Adventitia zeigte in Bezug auf die F4/80-positive Fläche (623 ± 112 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 621 ± 178 µm² in SMC.PTP1B-KO; P>0,99; **Abbildung 5-18 A**) und den F4/80-positiven Anteil an der Adventitia-Fläche (0,79 [0,47-1,2] % in SMC.PTP1B-WT vs. 0,45 [0,13-1,2] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,31; **Abbildung 5-18 B**) keine signifikanten Unterschiede. Ebenso unterschieden sich weder die absolute Anzahl der F4/80-positiven Zellen in der Adventitia (11,8 ± 1,4 in SMC.PTP1B-WT vs. 16,4 ± 1,9 in SMC.PTP1B-KO; P=0,06; **Abbildung 5-18 C**) noch die Anzahl aller F4/80-positiven Zellen im gesamten Gefäß (31,5 [24,0-48,5] in SMC.PTP1B-WT vs. 44,5 [19,8-52,3] in SMC.PTP1B-KO; P=0,45; **Abbildung 5-18 D**).

Die statistische Auswertung des Makrophagenantigens F4/80 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die vermehrte Zellzahl und verstärkte Kollagenansammlung in der Adventitia und anderen Teilen der Gefäßwand beim Fehlen von PTP1B scheint also nicht auf einer vermehrten Einwanderung an Makrophagen zu beruhen.

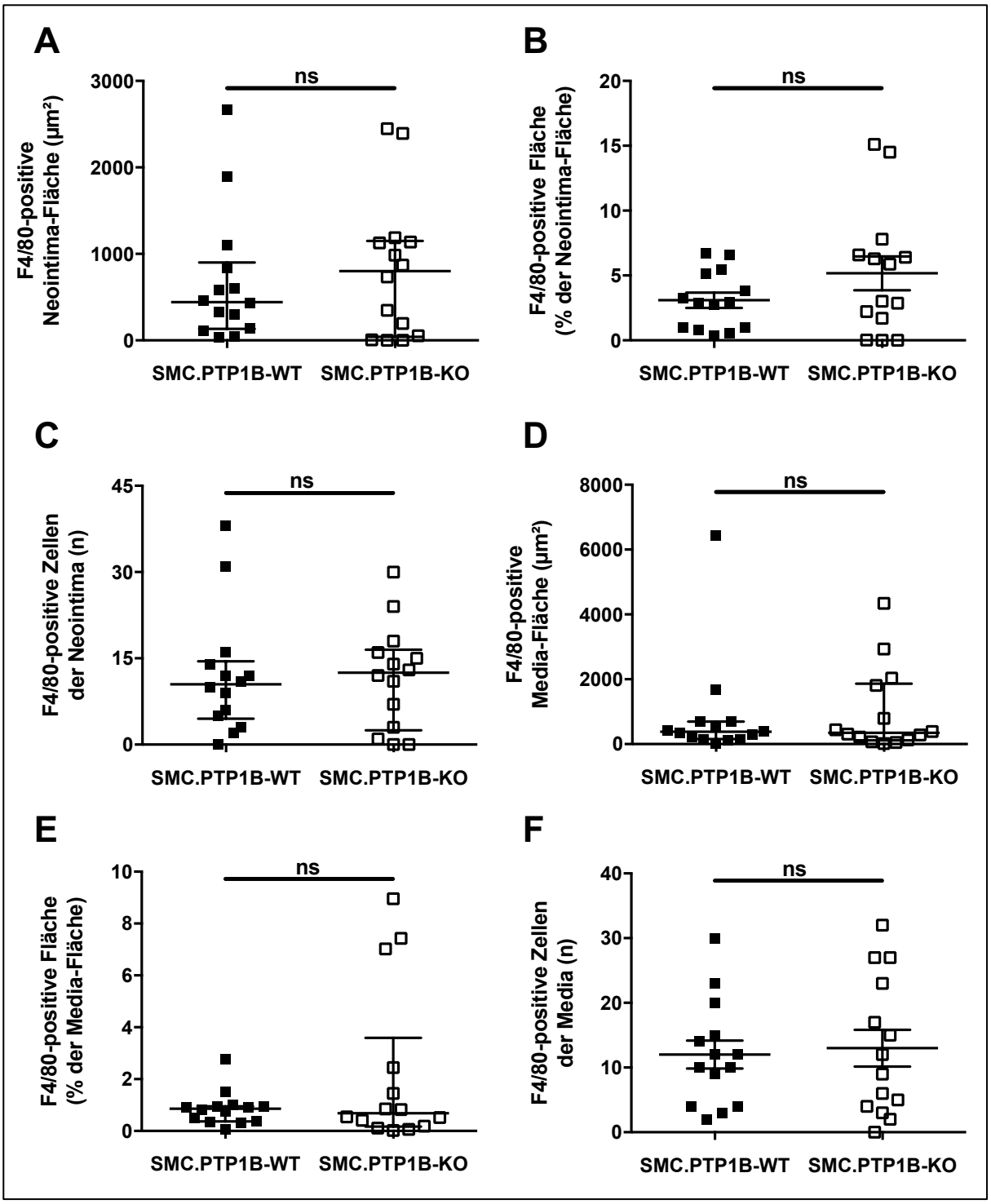

Abbildung 5-17: Statistische Auswertung der Verteilung von F4/80 1.

(A) F4/80-positive Neointima-Fläche, Anteil der F4/80-positiven Fläche an der Neointima-Fläche (B), F4/80-positve Zellen in der Neointima, F4/80-positive Media-Fläche (D), Anteil der F4/80-positiven Fläche an der Media-Fläche (E), F4/80-positive Zellen in der Media (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (B, F) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (A, C-E).

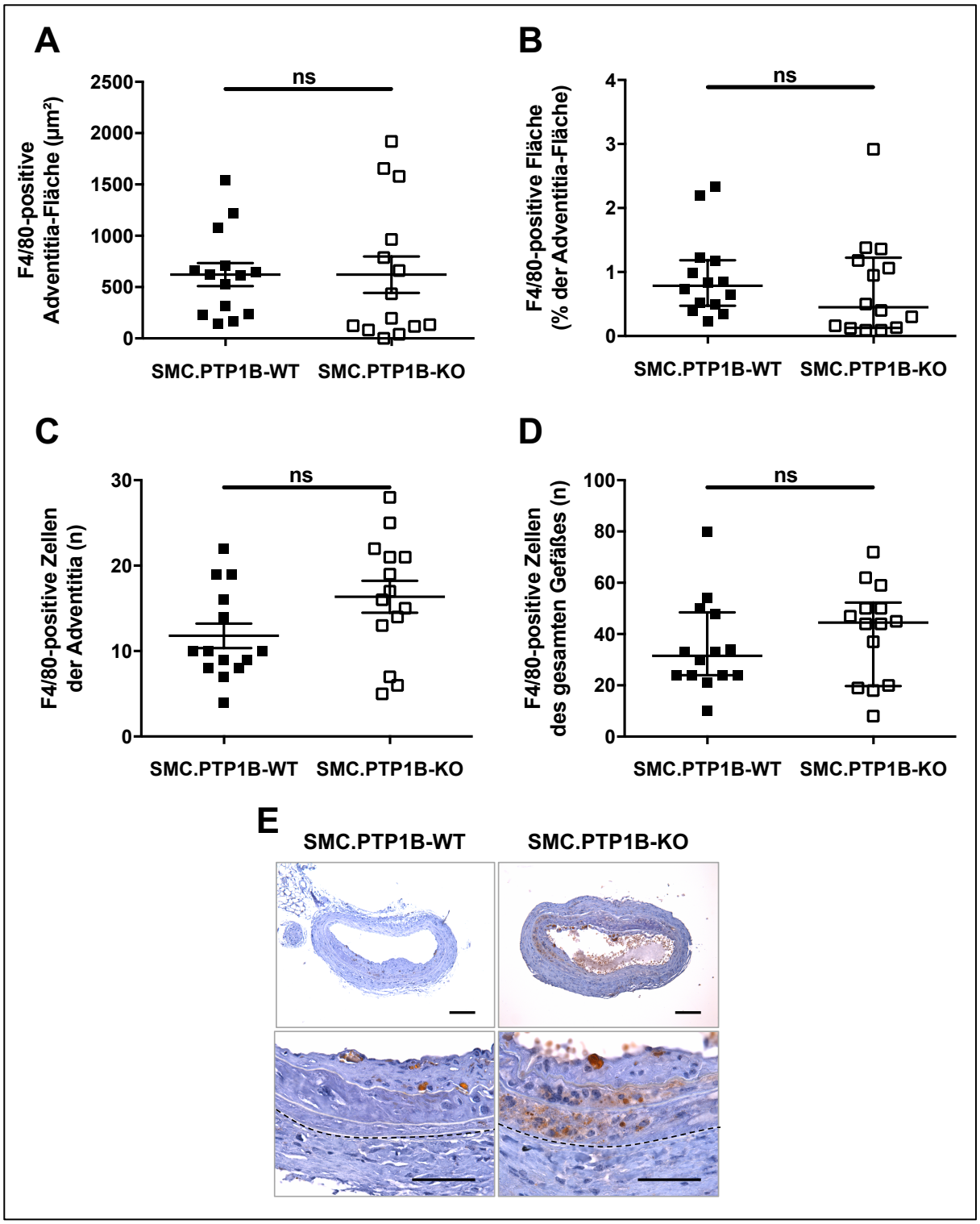

Abbildung 5-18: Statistische Auswertung der Zahl F4/80-positiver Zellen 2.

(A) F4/80-positive Adventitia-Fläche, Anteil der F4/80-positiven Fläche an der Adventitia-Fläche (B), F4/80-positive Zellen in der Adventitia (C), F4/80-positive Zellen innerhalb des gesamten Gefäßes (D). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (A, C) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (B, D). (E) Repräsentative Bilder der F4/80-Immunhistochemie Paraffin-fixierter Schnitte der vaskulären Läsion. (oben: 20-fache Vergrößerung, unten: 100-fache Vergrößerung). Die Maßbalken repräsentieren 100 µm.

5.5.6 Immunhistochemischer Nachweis des Endothelzellmarkers CD31

Der Oberflächenmarker *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) oder auch „*Cluster of differentiation 31*“ (CD31) ist ein Protein, das auch auf der Oberfläche von unreifen, proliferierenden Endothelzellen zu finden ist. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um den Grad der Endothelialisierung nach der Gefäßläsion durch $FeCl_3$ in beiden Gruppen miteinander zu vergleichen. Zudem war es mithilfe der Immunhistochemie für CD31 möglich, neu gebildete Gefäße in der Adventitia (sog. *vasa vasorum*) darzustellen und zu quantifizieren.

Wie bei einem gefäßmuskelspezifischen Knockout von PTP1B zu erwarten, waren keine Unterschiede bezüglich der Endothelialisierung zwischen beiden Gruppen zu erkennen. Des Weiteren zeigte sich trotz Größenzunahme und verstärkter Zellproliferation in der Media der SMC.PTP1B-KO-Gruppe (vgl. **Abbildung 5-8 D, E**) keine erhöhte Anzahl von *Vasa vasorum* in der Adventitia

Die absolute CD31-positive Endothel-Fläche (762 [608-1.015] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 767 [518-1.035] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,8; **Abbildung 5-19 A**) sowie der Anteil der CD31-positiven Fläche an der gesamten inneren Auskleidung des Gefäßlumens (21,2 ± 2,3 %in SMC.PTP1B-WT vs. 27,4 ± 3,5 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,15; **Abbildung 5-19 B**) zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Außerdem zeigten beide Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der *Vasa vasorum* in der Neointima (0,90 ± 0,35 in SMC.PTP1B-WT vs. 0,57 ± 0,23 in SMC.PTP1B-KO; P= 0,42; **Abbildung 5-19 C**), Media (0 [0-1] in SMC.PTP1B-WT vs. 0 [0-1] in SMC.PTP1B-KO; P=0,73; **Abbildung 5-19 D**) und Adventitia (0 [0-1,25] in SMC.PTP1B-WT vs. 0 [0-1] in SMC.PTP1B-KO; P=0,91; **Abbildung 5-19 E**). Zudem war die Fläche der neu gebildeten Gefäße in Bezug auf die Media-Fläche nicht unterschiedlich (0 [0-7,0] % in SMC.PTP1B-WT vs. 0 [0-0,36] % in SMC.PTP1B-KO; P=0,29; **Abbildung 5-19 F**).

Der Knockout von PTP1B in glatten Gefäßmuskelzellen führte zu keinem Unterschied hinsichtlich der Reendothelisierung nach Zufügen einer Gefäßverletzung. Zudem zeigten sich trotz der vergrößerten Adventitia in SMC.PTP1B-KO keine Unterschiede in der Anzahl der *Vasa vasorum*.

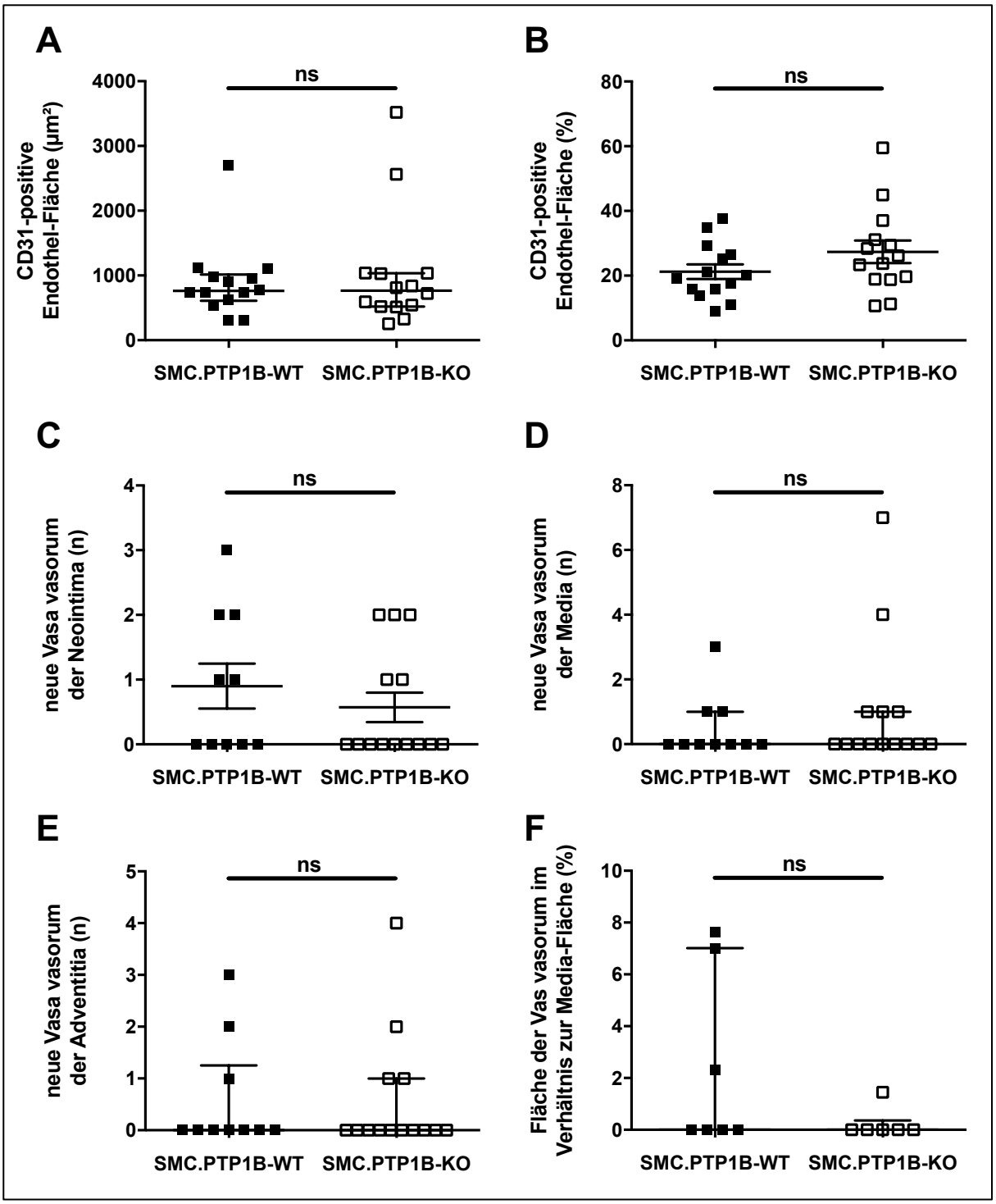

Abbildung 5-19: Statistische Auswertung der CD31-Expression.

(A) CD31-positive Endothel-Fläche, CD31-positiver Anteil der Endothel-Fläche (B), Vasa vasorum der Neointima (C), der Media (D), der Adventitia (E), Fläche der Vasa vasorum in Bezug zur Media-Fläche (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (B, C) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (A, D-F).

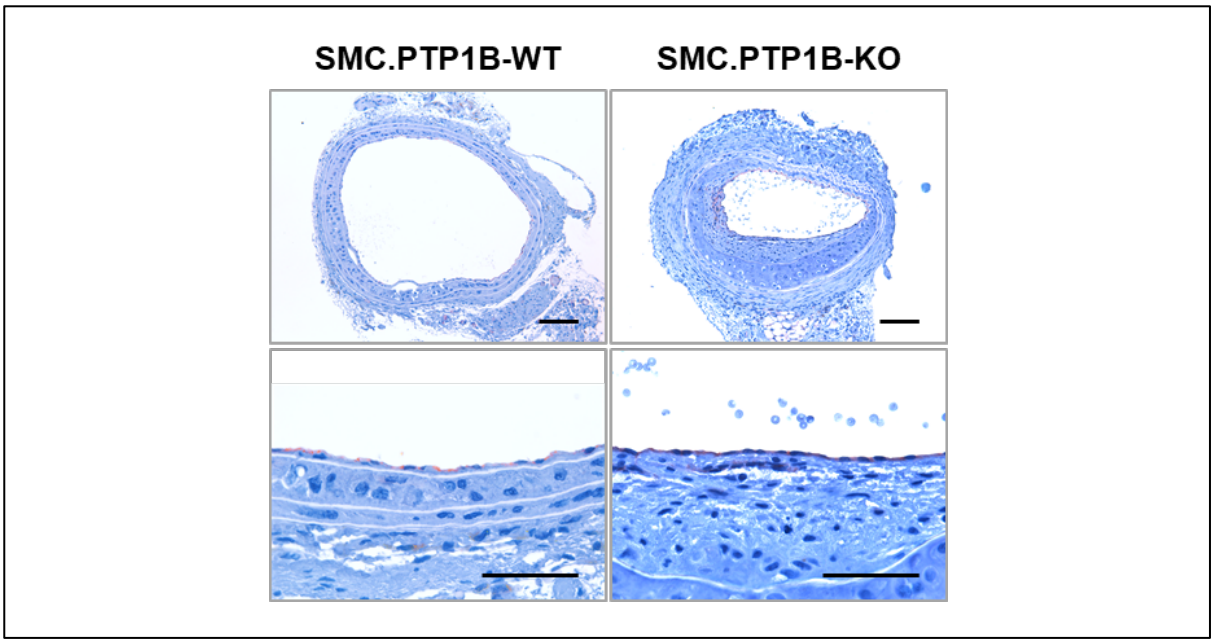

Abbildung 5-20: Repräsentative Bilder der CD31-Immunhistochemie Paraffin-fixierter Schnitte der vaskulären Läsion. (oben: 20-fache Vergrößerung, unten: 100-fache Vergrößerung). Die Maßbalken repräsentieren 100 µm.

5.5.7 Immunhistochemischer Nachweis des BDNF Rezeptors TrkB

Die Tropomyosin Rezeptor Kinase B (TrkB) ist ein Rezeptor für Neurotrophine, insbesondere für *brain derived neurotrophic factor* (BDNF). Die BDNF-TrkB-vermittelte Signaltransduktion reguliert die Entwicklung, Differenzierung und das Überleben von Neuronen. Aufgrund von Befunden anderer (88) und der eigenen Arbeitsgruppe (Manuskript in Revision) weiß man, dass Neurotrophine auch in der Gefäßwand exprimiert werden und dass Neurotrophinrezeptoren als Tyrosinkinaserezeptoren auch von PTP1B reguliert werden (85). Ziel war es, die Interaktion zwischen PTP1B, dem negativen Regulator von Rezeptortyrosinkinasen und der Expression von TrkB im Zusammenhang mit der Neointimabildung zu beleuchten.

Die Ergebnisse zeigen hierbei, dass es nach der Gefäßläsion in der SMC.PTP1B-KO-Gruppe in allem Gefäßschichten zu einer signifikant erhöhten TrkB-Expression kam. In unverletzten Arterien konnten diese Ergebnisse nicht gezeigt werden, was dafür spricht, dass die Interaktion von PTP1B und TrkB vor allem im Zeitraum nach einer Gefäßläsion von Bedeutung ist.

So zeigte sich für die absolute TrkB-positive Neointima-Fläche (3.016 ± 970 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 5.478 ± 1.111 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,11; **Abbildung 5-21 A**) kein signifikanter Unterschied, jedoch war der TrkB-positive Anteil der Neointima-Fläche (13,9 ± 3,7 % in SMC.PTP1B-WT vs. 31,8 ± 4,2 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,003; **Abbildung 5-21 B**) in SMC.PTP1B-KO signifikant erhöht. Für die Media zeigte sich eine signifikante Erhöhung der absoluten TrkB-positiven Fläche (5.777 ± 1.417 µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 13.520 ± 2.008 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,004; **Abbildung 5-21 C**) als auch des prozentualen Anteils (11,5 ± 3,1 % in SMC.PTP1B-WT vs. 25,2 ± 3,1 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,004; **Abbildung 5-21 D**) in den KO-Mäusen. Auch in der Adventitia waren die absolute TrkB-positive Fläche (2.649 [854-7.264] µm² in SMC.PTP1B-WT vs. 6.980 [5.185-20.064] µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,03; **Abbildung 5-21 E**) sowie deren Anteil an der Adventitia-Fläche (6,2 ± 1,5 % in SMC.PTP1B-WT vs. 12,6 ± 2,3 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,03; **Abbildung 5-21 F**) signifikant größer in Mäusen der SMC.PTP1B-KO-Gruppe. Auch die repräsentativen Bilder (**Abbildung 5-22 E**) spiegeln diese Ergebnisse deutlich wider.

Der Knockout von PTP1B führt zu einer deutlich verstärkten TrkB-Expression in allen Schichten der Gefäßwand verletzter Arterien.

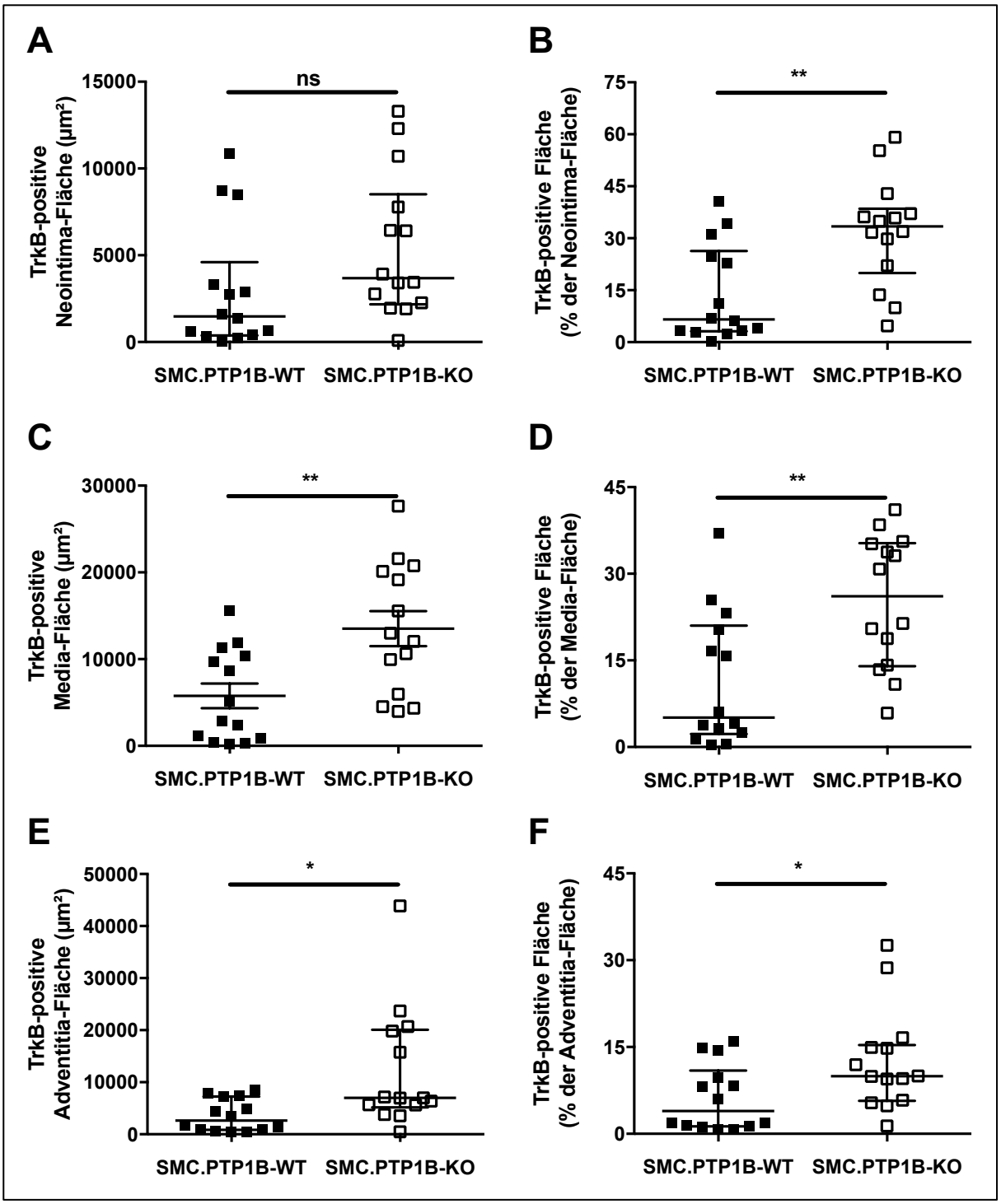

Abbildung 5-21: Statistische Auswertung TrkB 1.

(A) TrkB-positive Neointima-Fläche, Anteil der TrkB-positiven Fläche an der Neointima-Fläche (B), TrkB-positive Media-Fläche (C), Anteil der TrkB-positiven Fläche an der Media-Fläche (D), TrkB-positive Adventitia-Fläche (E), Anteil der TrkB-positiven Fläche an der Adventitia-Fläche (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM bzw. als Median mit Interquartilsabstand (F).

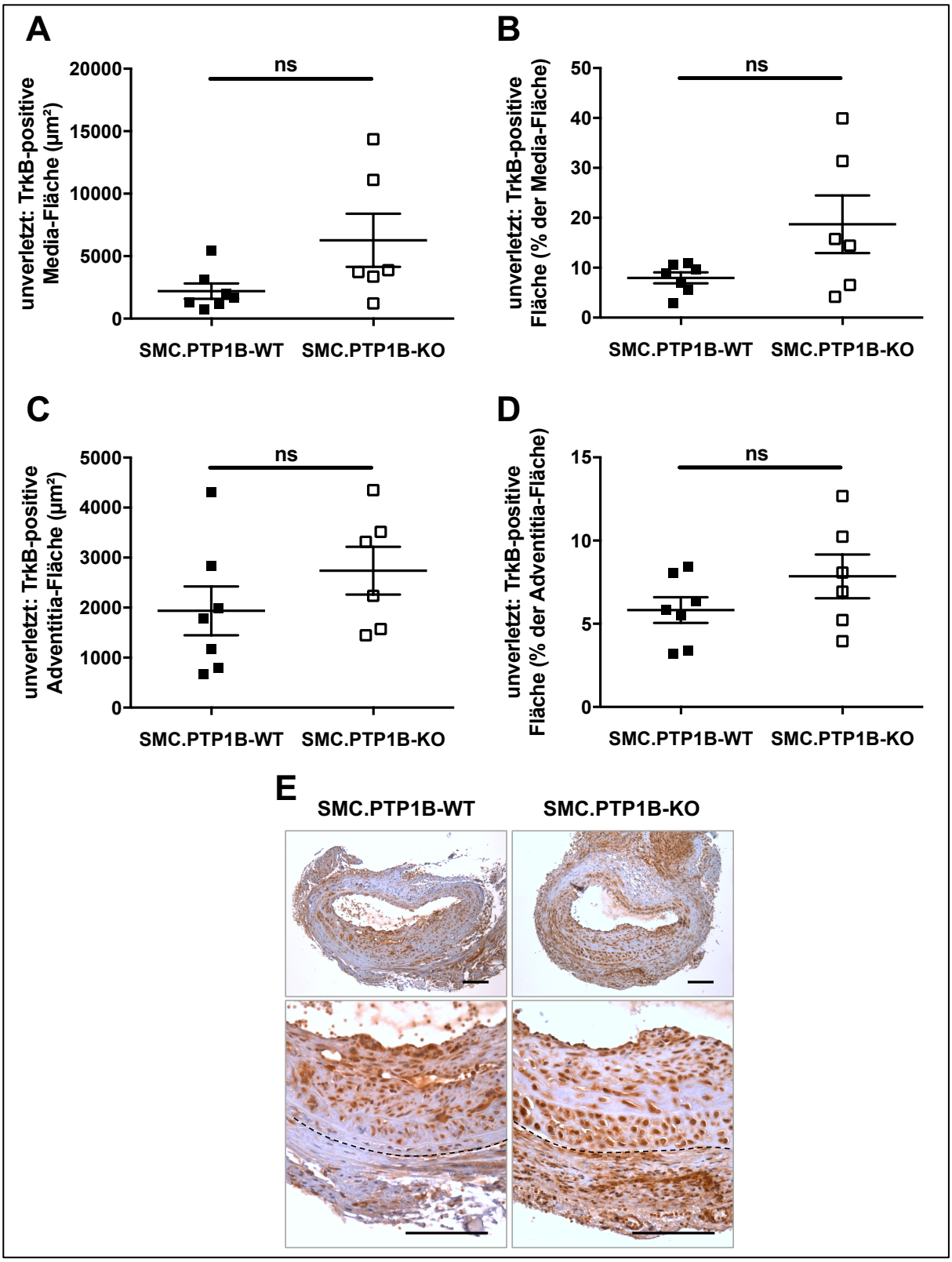

Abbildung 5-22: Statistische Auswertung TrkB 2.

(A) TrkB-positive Media-Fläche der unverletzten Arterien, Anteil der TrkB-positiven Fläche an der Media-Fläche der unverletzten Arterien (B), TrkB-positive Adventitia-Fläche der unverletzten Arterien (C), Anteil der TrkB-positiven Fläche an der Adventitia-Fläche der unverletzten Arterien (D). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM.

Für die absolute TrkB-positive Media-Fläche der unverletzten Arterien zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Immunsignalstärke, wobei jedoch ein Trend in SMC.PTP1B-KO erkennbar war (2.195 ± 612 µm² SMC.PTP1B-WT vs. 6.274 ± 2.122 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,07; **Abbildung 5-22 A**). Auch der prozentuale Anteil der TrkB-positiven Media-Fläche in Bezug zur Gesamtfläche der Media unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen (8,0 ± 1,1 % SMC.PTP1B-WT vs. 18,7 ± 5,8 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,07; **Abbildung 5-22 B**). Auch in der Adventitia der unverletzten Karotisarterien zeigten sich keine Unterschiede. So ergab sich für die absolute TrkB-positive Fläche (1.936 ± 487 µm² SMC.PTP1B-WT vs. 2.739 ± 477 µm² in SMC.PTP1B-KO; P=0,27; **Abbildung 5-22 C**) sowie für den prozentualen Anteil der positiven Fläche (5,8 ± 0,8 % SMC.PTP1B-WT vs. 7,9 ± 1,3 % in SMC.PTP1B-KO; P=0,19; **Abbildung 5-22 D**) kein signifikanter Unterschied.

Für die unverletzten Arterien der Versuchsgruppen SMC.PTP1B-WT und SMC.PTP1B-KO zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der TrkB-Expression. Dies deutet darauf hin, dass die Hochregulation von TrkB Teil des adaptiven Prozesses im Rahmen einer Gefäßverletzung ist.

5.5.8 Immunhistochemischer Nachweis von BDNF

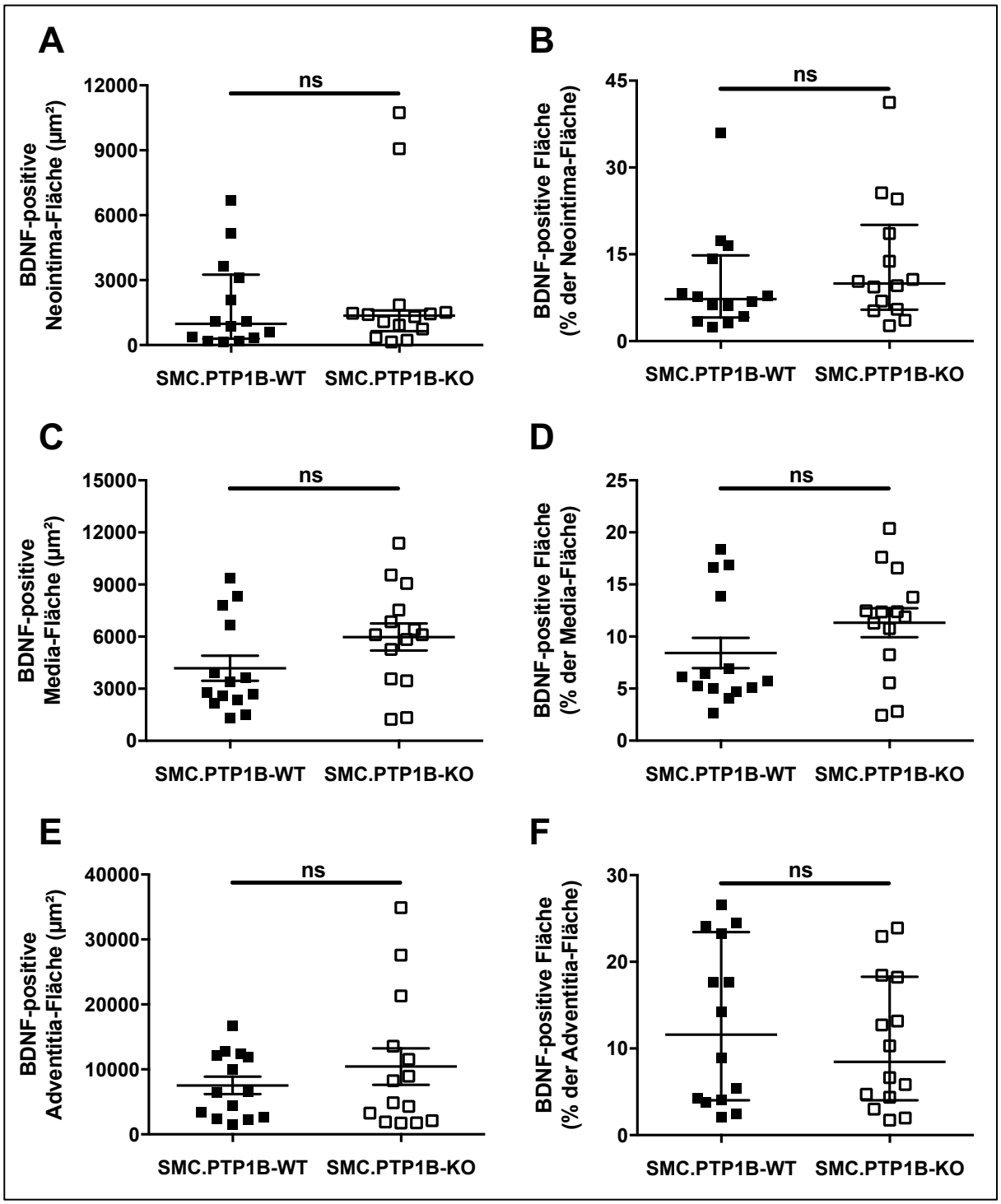

Abbildung 5-23: Statistische Auswertung der BDNFExpression.

(A) BDNF-positive Neointima-Fläche, Anteil der BDNF-positiven Fläche an der Neointima-Fläche (B), BDNF-positive Media-Fläche (C), Anteil der BDNF-positiven Fläche an der Media-Fläche (D), BDNF-positive Adventitia-Fläche (E), Anteil der BDNF-positiven Fläche an der Adventitia-Fläche (F). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (C-E) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (A, B, F).

Der VSMC-spezifische PTP1B-Knockout führte sowohl in verletzten als auch in unverletzten Arterien zu keinem signifikanten Unterschied in der BDNF-Expression. In **Abbildung 5-23** und **Abbildung 5-24** sind die Ergebnisse grafisch dargestellt.

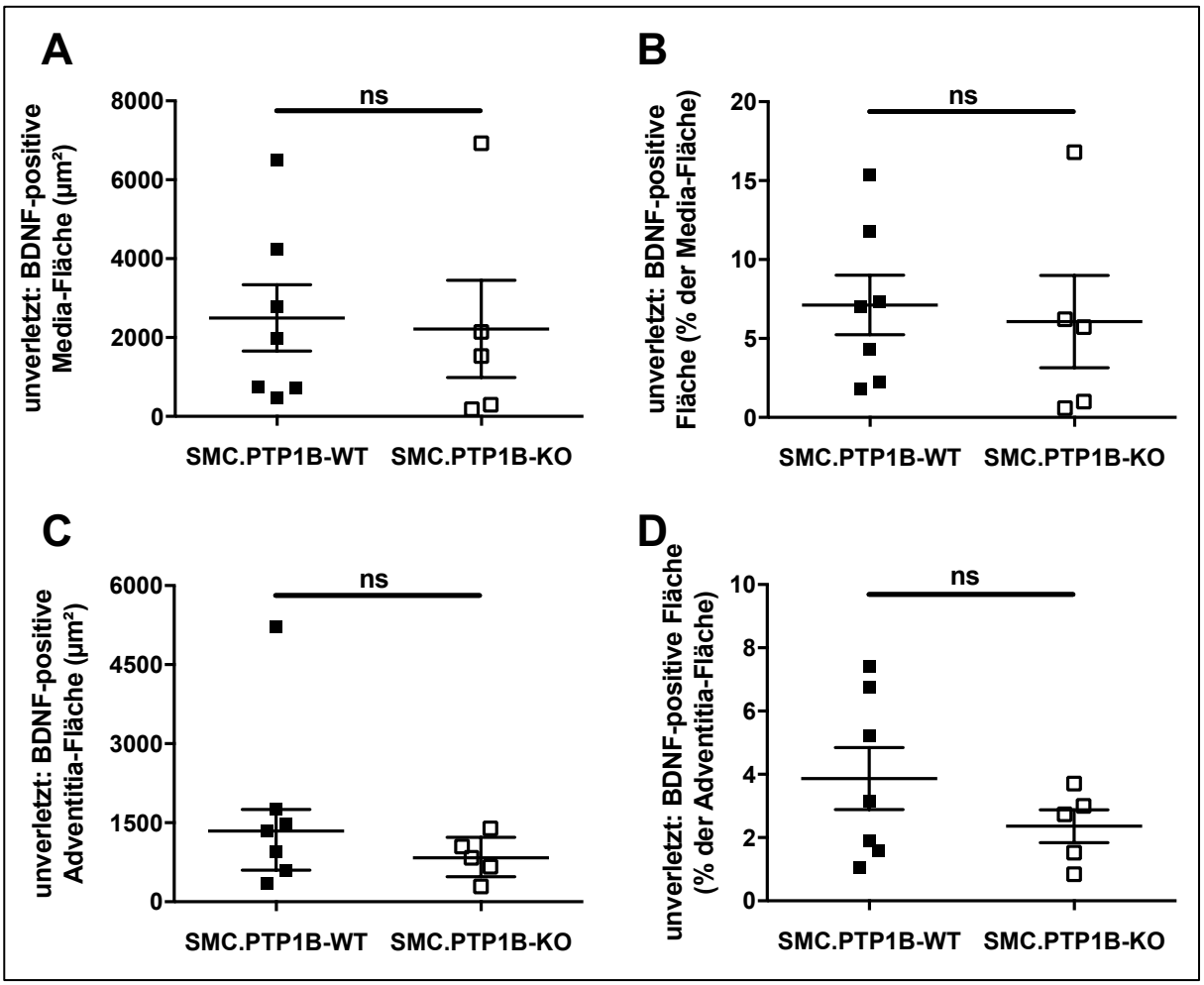

Abbildung 5-24: Statistische Auswertung der BDNF-Expression in unverletzten Karotisarterien.

(A) BDNF-positive Media-Fläche der unverletzten Arterien, Anteil der BDNF-positiven Fläche an der Media-Fläche der unverletzten Arterien (B), BDNF-positive Adventitia-Fläche der unverletzten Arterien (C), Anteil der BDNF-positiven Fläche an der Adventitia-Fläche der unverletzten Arterien (D). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert ± SEM (A, B, D) bzw. als Median mit Interquartilsabstand (C).

5.6 Untersuchungen an kultivierten murinen Glattmuskelzellen

Die Untersuchungen an kultivierten murinen Glattmuskelzellen dienten der Modellierung verschiedener Prozesse, die während einer Gefäßverletzung ablaufen. Kobaltchlorid ($CoCl_2$) wurde zur chemischen Induktion einer Hypoxie verwendet. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) löste als reaktive Sauerstoffspezies oxidativen Stress aus. Angiotensin II (ATII) diente der Modellierung einer Gefäßkonstriktion. Dabei wurden vor allem die Expression von PTP1B und Marker für Proliferation (Cyclin D1) oder die Differenzierung glatter Muskelzellen betrachtet. Der Effekt eines chemischen PTP1B Inhibitors (gelöst in DMSO) wurde mit einer Kontrollprobe (nur DMSO) verglichen. Der genaue Versuchsaufbau ist in Kapitel 4.8.5 beschrieben.

5.6.1 qPCR

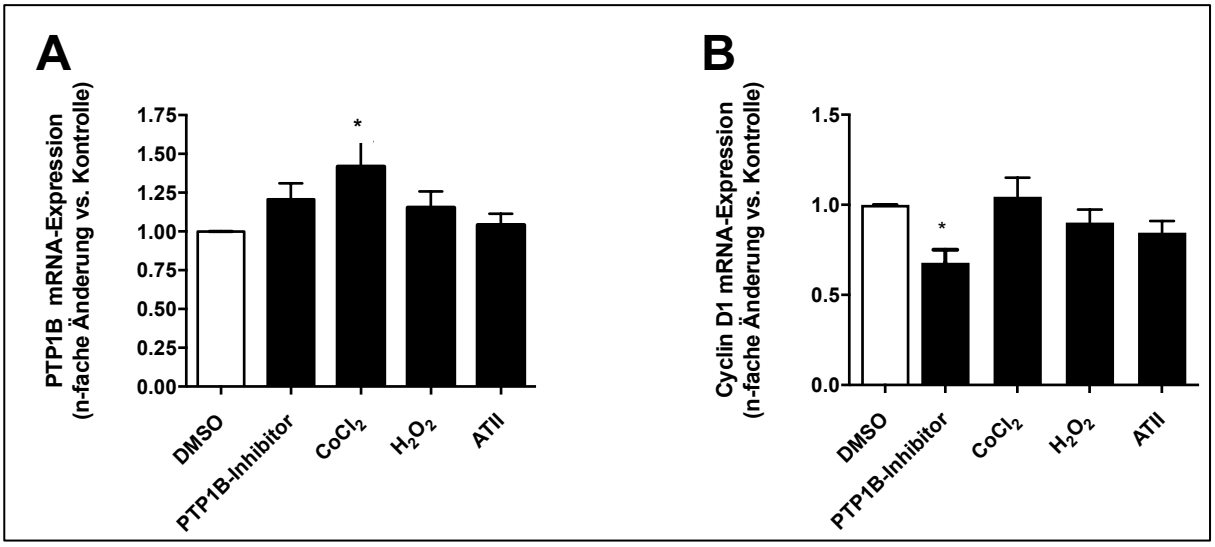

Abbildung 5-25: Ergebnisse qPCR MOVAS 1.

(A) PTP1B mRNA-Expression (B), Cyclin D1 mRNA-Expression). Die Graphen zeigen die n-fache Expressionsänderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO). Darstellung des Mittelwerts ± SEM, * entspricht $P<0.05$ (getestet mittels einfaktorieller Varianzanalyse und anschließendem Bonferroni-Test)

Zu Beginn erfolgte die Analyse des Proliferationsmarker Cyclin D1. Überraschenderweise zeigte sich eine signifikant verminderte Expression in den Proben, die mit einem PTP1B-Inhibitor behandelt wurden (PTP1B-Inhibitor: -32,3 ± 10,2 %; P=0,01; **Abbildung 5-25 A**). Alle weiteren Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe ($CoCl_2$: +4,4 ± 10,2 %;

P=0,97; H_2O_2: -9,9 ± 10,2 %; P= 0,73; ATII: -15,6 ± 10,2 %; P= 0,37; **Abbildung 5-25 A**).

Die Untersuchung der PTP1B-Expression zeigte für die mit Kobaltchlorid ($CoCl_2$) behandelte Probe eine verstärkte Expression (+41,8 ± 14,5 %; P=0,02; **Abbildung 5-25 B**). Bei allen anderen Proben zeigte sich eine erhöhte PTP1B-Expression, die sich jedoch als nicht signifikant erwies (PTP1B-Inhibitor: +20,7 ± 14,5 %; P=0,42; H_2O_2: +15,3 ± 14,5 %; P= 0,67; ATII +4,1 ± 14,5 %; P= 0,99; **Abbildung 5-25 B**).

Auch für die mRNA-Expression von Desmin zeigte sich ein signifikanter Anstieg für die Proben, die mit dem PTP1B-Inhibitor behandelt worden waren (PTP1B-Inhibitor: +130 ± 18,6 %; P<0,0001; **Abbildung 5-26 A**). Für die anderen Proben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($CoCl_2$: +21,8 ± 18,6 %; P=0,59; H_2O_2: -1,6 ± 18,6 %; P=0,99; ATII: -4,7 ± 18,6 %; P 0,99; **Abbildung 5-26 A**).

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für die Myocardin-Expression (PTP1B-Inhibitor: +88,8 ± 18,6 %; P<0,0001; $CoCl_2$: +31,3 ± 18,6 %; P=0,28; H_2O_2: -14,0 ± 18,6 %; P=0,86; ATII: -4,7 ± 18,6 %; P= 0,43; **Abbildung 5-26 B**).

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Analyse hinsichtlich der SM22-alpha-Expression zeigte sich eine signifikant verminderte Expression für Proben, die mit $CoCl_2$ behandelt wurden ($CoCl_2$: -53,7 ± 8,3 %; P<0,0001; **Abbildung 5-26 C**). Für die anderen Versuchsproben ergaben sich keine signifikanten Änderungen (PTP1B-Inhibitor: -20,9 ± 8,3 %; P=0,05; H_2O_2: +11,2 ± 8,3 %; P=0,47; ATII: -1,0 ± 8,3 %; P=0,99; **Abbildung 5-26 C**). Die SMA-Expression war in den Proben mit PTP1B-Inhibitor, $CoCl_2$ und H_2O_2 und signifikant erniedrigt, nur ATII zeigte keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle (PTP1B-Inhibitor: -38,6 ± 5,5 %; P<0,0001; $CoCl_2$: -64,4 ± 5,5 %; P<0,0001; H_2O_2: -17,3 ± 5,5 %; P=0,99; ATII: -13,2 ± 5,5 %; P=0,99; **Abbildung 5-26 D**). Die Expression von Calponin zeigte für die Proben nach Inkubation mit $CoCl_2$ signifikant niedrigere Werte an, wobei die anderen Proben nahezu keinen Unterschied zeigten (PTP1B-Inhibitor: -6,6 ± 10,2 %; P=0,91; $CoCl_2$: -59,1 ± 10,2 %; P<0,0001; H_2O_2: -11,7 ± 10,2 %; P=0,61; ATII: -12,4 ± 10,2 %; P=0,56; **Abbildung 5-26 E**).

Eine Inhibition von PTP1B führte zu einer verstärkten Expression von Desmin und Myocardin in murinen aortalen glatten Muskelzellen, wohingegen die SMA-Expression signifikant abnahm. Daneben zwigt sich eine geringere Expression von Cyclin D1 nach Behandlung mit einem PTP1B-Inhibitor.

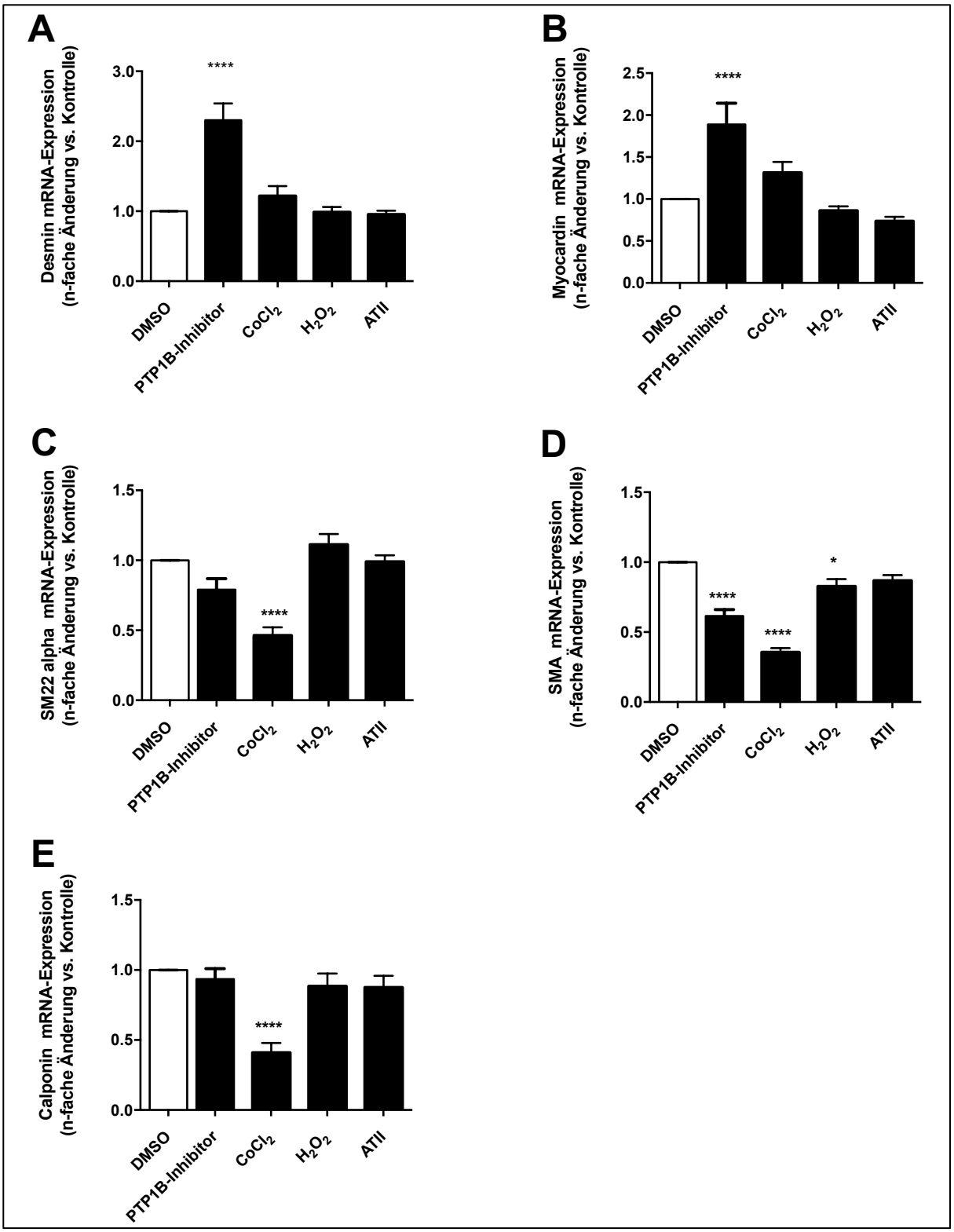

Abbildung 5-26: Ergebnisse qPCR MOVAS 2.

(A) Desmin mRNA-Expression. (B) Myocardin mRNA-Expression. (C) SM22 alpha mRNA-Expression. (D) SMA mRNA-Expression. (E) Calponin mRNA-Expression. Die Graphen zeigen die n-fache Expressionsänderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO). Darstellung des Mittelwerts ± SEM. * entspricht P<0,05 und **** entspricht P<0,0001 (bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse und anschließendem Bonferroni-Test)

6 Diskussion

Die Entwicklung einer Restenose nach PTCA stellt nach wie vor, und trotz der Anwendung beschichteter Stents, eine schwerwiegende und häufige Komplikation nach interventioneller Therapie der KHK dar (4) und gilt neben weiteren Faktoren als Prädiktor einer erhöhten Mortalität (44). Die Pathomechanismen sind zwar weitreichend erforscht, jedoch gibt es bis dato keine Möglichkeit, diese Komplikation vollständig zu verhindern. In diesem Zusammenhang ist die Phosphatase PTP1B als mögliche Zielstruktur therapeutischer Maßnahmen vielversprechend, da sie einen bedeutenden Gegenregulator im Rahmen zellulärer Wachstumsvorgänge und der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren darstellt und diese Prozesse entscheidend für die Entstehung einer Restenose sind.

PTP1B ist eine ubiquitär exprimierte Phosphatase, welche Tyrosinkinaserezeptoren, insbesondere verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren, dephosphoryliert und damit deren Signaltransduktion inhibiert. Aufgrund der maßgeblichen Beteiligung von Wachstumsfaktoren im Rahmen vaskulärer Umbauprozesse, wie der Restenose nach PTCA, könnte PTP1B einen möglichen pharmakologischen Angriffspunkt darstellen. In diesem Zusammenhang wurde bereits eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch PTP1B-Inhibition im Rahmen einer Herzinsuffizienz gezeigt (143). Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe an Mäusen mit endothelzellspezifischer PTP1B-Deletion konnten ebenfalls zeigen, dass PTP1B die kardiale Gefäßneubildung reguliert und zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie beiträgt (136). Dabei konnte eine verstärkte Signaltransduktion von VEGF und verbesserte Angiogenese mit konsekutiv reduzierter kardialer Ischämie festgestellt werden (136). Andere Studien fanden eine beschleunigte Wundheilung nach einer Gefäßverletzung (62, 144).

Zudem wurden als Folge einer systemischen Inhibition positive Auswirkungen auf metabolische Erkrankungen und eine damit einhergehende verbesserte Endothelfunktion festgestellt (8, 145). Denkbar wäre eine Modifikation von PTP1B, um eine schnellere Reendothelialisierung zu erreichen und eine endotheliale Dysfunktion vorzubeugen. Auf diese Art und Weise könnte man einen der Hauptgründe für Restenosen nach Einbringen von DES behandeln. Allerdings ergaben tierexperimentelle Arbeiten der eigenen Gruppe, dass dieser Ansatz mit oxidativem Stress und der Entwicklung einer vorzeitigen endothelialen Seneszenz verbunden ist (9). Die eintretenden Effekte nach Induzierung eines Knockouts sind folglich nicht allumfassend positiv oder negativ zu werten und zeigen ein gemischtes Bild in Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp und Verletzungsreiz.

Die vorliegende Arbeit analysiert nun die Rolle von PTP1B in glatten Muskelzellen im Rahmen einer Gefäßverletzung mit konsekutivem vaskulären *Remodeling* und Ausbildung einer Neointima. Dafür wurden Mäuse mit VSMC-spezifischen PTP1B-Knockout generiert und untersucht, nachdem mittels $FeCl_3$ eine experimentelle Verletzung an der linken Karotisarterie zugefügt wurde. Im Anschluss an die Gewebeentnahme erfolgten histologische und immunhistochemische Analysen der Größe und Zusammensetzung der Neointima. Darüber hinaus wurde mithilfe einer Zelllinie muriner arterieller Glattmuskelzellen (MOVAS) *in vitro* verschiedene vaskuläre Prozesse einer Gefäßverletzung modelliert und die Auswirkungen einer PTP1B-Inhibition untersucht und mit anderen Stimuli verglichen (Hypoxie, oxidativer Stress, Angiotensin II). Anschließend wurde die Expression von Proliferationsmarkern, Muskelzellmarkern und PTP1B mittels qPCR quantifiziert.

6.1 Einfluss der reduzierten glattmuskulären PTP1B-Expression auf das vaskuläre *Remodeling*

Die gängige Hypothese des vaskulären *Remodeling* nach einer Gefäßverletzung beschreibt eine durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren getriggerte Migration von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima (siehe Kapitel 2.2.3). Es kommt zur Bildung einer Neointima und einer damit einhergehenden Einengung (Stenose) des Gefäßlumens mit Minderdurchblutung im nachgeschalteten Stromgebiet. Frühere Studien haben gezeigt, dass PTP1B durch Dephosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren den Effekt einzelner Faktoren abschwächt und so Resistenzen verursacht (54, 146, 147). Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war folglich das Eintreten einer verstärkten Neointima-Bildung nach einem Knockout von PTP1B in glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Die Vermutung bestand darin, dass es durch das Fehlen von PTP1B zur ungebremsten Wirkung von Wachstumsfaktoren und einer damit einhergehenden Migration der Muskelzellen in die Intima kommen würde. Diese Hypothese wurde bisher nie direkt und *in vivo* untersucht.

Entgegen der Erwartungen zeigte sich in der morphometrischen Analyse kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Größe der Neointima und das Ausmaß der Lumenstenose. Was jedoch auffiel, war ein signifikant kleinerer Gesamtgefäßdurchmesser und infolgedessen ein reduziertes Lumen in der Versuchsgruppe mit PTP1B-Knockout. Zudem wies SMC.PTP1B-KO Mäuse eine deutlich größere Adventitia auf. Sowohl die Breite als auch die Fläche waren signifikant vergrößert. Somit konnte die Hypothese der verstärkten Proliferation und Migration glatter Muskelzellen beim Fehlen von PTP1B zwar bestätigt werden, diese trat jedoch vor allem in der Adventitia auf.

Das gewählte Modell der Gefäßverletzung ist weiterer entscheidender Faktor bei der Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse. Unter der Verwendung des Modells konnten vorherige Arbeiten keine Auswirkungen auf die Morphologie und die zelluläre Zusammensetzung der Adventitia feststellen (14, 131, 132, 148). Das $FeCl_3$-Modell führt zu einer Intimaverletzung mit konsekutiver Neointimabildung. Der Effekt tritt an der Endothel-Blut-Grenze zwischen auf. In einer vorherigen Studie der Arbeitsgruppe konnte im Falle eines endothelialen PTP1B-Knockouts keine Veränderungen der Adventitia festgestellt werden (9). Daraus lässt sich schließen, dass vor allem die

glatten Muskelzellen der Media eine entscheidende Rolle für die Wachstumsfaktorsignaltransduktion haben und nicht ausschließlich durch das *Signaling* von Endothelzellen zur Migration und Proliferation angeregt werden. Sie stellen sowohl eine Zielstruktur als auch eine Quelle für Wachstumsfaktoren dar. Analog zum Auftreten einer signifikant vergrößerten Adventitia bei Versuchstieren der SMC.PTP1B-KO-Gruppe führt ein endothelialer Knockout von PTP1B – wie eine Studie unserer Arbeitsgruppe zeigen konnte – zu einer Neointimahyperplasie mit überschießendem Muskelzellwachstum und -migration (9).

Ein weiterer Faktor, der die vorliegenden Ergebnisse erklären könnte, ist die räumliche Nähe der Media zur Adventitia, die eine Migration von glatten Muskelzellen in Richtung Adventitia bedingen könnte. Hierzu haben Majeski et al. bereits zeigen können, dass es im Rahmen einer Gefäßverletzung zur Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Adventitia mit anschließender Transformation zu pluripotenten Progenitorzellen kommt (149). Ebenso wie in unserer Arbeit wurden in dieser Studie ebenfalls SMMHC.Cre transgene Mäuse zum Genknockout verwendet, so dass auch in der vorliegenden Arbeit von der Deletion von PTP1B in glattmuskulären Vorläuferzellen auszugehen ist. Aufgrund des VSMC-spezifischen Knockouts von PTP1B kommt es vermutlich zu einem stärker ausgeprägten Effekt der Wachstumsfaktoren und damit zu einer deutlicheren Migration in die Adventitia, während ein endothelspezifischer Knockout dieses Phänomen nicht aufwies (9).

Das Bild einer stark vergrößerten Adventitia und einer Reduktion des Lumens sprechen für das Vorliegen einer perivaskulären Fibrose mit begleitendem *Inward Remodeling*. Auch bei atherosklerotischen Krankheitsprozessen und nach durchgeführter PTCA kommt es zu pathologischen Gefäßveränderungen, die von luminal nach perivaskulär ablaufen. Da PTP1B zum einen stark in Muskelzellen exprimiert ist (11) und zum anderen reaktiv nach Gefäßverletzung in der Expression ansteigt (12) verstärkt ein VSMC-spezifischer Knockout in der Media den Effekt des $FeCl_3$-Modells. Als mögliche Konsequenz ergibt sich daraus eine verminderte Elastizität und eine Beeinträchtigung des Blutflusses, allerdings wurde das in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Interessanterweise zeigte die CD31-Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Eine stärkere Auswirkung des Knockouts auf den Grad der

Endothelialisierung wäre für einen endothelialen Knockout zu erwarten gewesen. In diesem Fall kam es in einer Studie der Arbeitsgruppe wobei Fall nur bei übergewichtigen Mäusen zu Unterschieden hinsichtlich der Endothelialisierung gekommen ist (9).

Im Gegensatz dazu zeigte ein Endothel-spezifischer Knockout überraschenderweise eine reduzierte Reendothelialisierung und infolge der fehlenden Freisetzung antimitogener Substanzen eine verstärkte Neointimabildung nach FeCl3-Verletzung (9). Im Gegensatz dazu konnte in einem anderen Krankheitsmodell (Herzinsuffizienz aufgrund chronischer kardiale Druckhypertrophie) eine verbesserte Gefäßneubildung beobachtet werden (136). Dabei konnte ein verstärktes VEGF-*Signaling* und eine verbesserte Angiogenese mit konsekutiv reduzierter kardialer Ischämie und einem geringeren Verlust an Endothelzellen festgestellt werden (136). Andere Autoren fanden, dass es zu einer beschleunigten Wundheilung nach einer Gefäßverletzung kommt (62, 144). Die eintretenden Effekte nach Induzierung eines Knockouts sind folglich nicht allumfassend positiv oder negativ, sondern abhängig vom Krankheitsmodell und dem auslösenden Stimulus zu werten und zeigen ein gemischtes Bild.

6.2 Einfluss der glattmuskulären PTP1B-Deletion auf die zelluläre Zusammensetzung der Gefäßwand nach Verletzung

Neben den morphometrischen Auswirkungen, die sich bei den Versuchstieren der Gruppe SMC.PTP1B-KO zeigten, waren auch deutliche Veränderung der zellulären Zusammensetzung der einzelen Gefäßwandschichten erkennbar. Diese wurden mithilfe von histologischen und immunhistochemischen Färbungen analysiert.

Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Zellzahl in der Adventitia und eine vergrößerte Gesamtgefäßfläche in SMC.PTP1B-KO Mäusen. Zudem zeigte sich nach PCNA-Immunhistochemie, dass der Anteil an proliferierenden Zellen in allen Gefäßschichten der KO-Mäuse signifikant erhöht war (siehe Kapitel 5.5.1). Sowohl die absolute Anzahl als auch der prozentuale Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtzellzahl war in allen Gefäßschichten erhöht. Damit bestätigte sich die Hypothese einer verstärkten Proliferation als Reaktion auf eine ungebremste Wirkung der Wachstumsfaktoren.

Mehrere Studien konnten *in vitro* ähnliche Effekte belegen. Während das Fehlen von PTP1B zu einer verstärkten Wachstumsfaktorsignaltransduktion mit konsekutiv verstärkter Proliferation und Migration von VSMC führte, kamen in Anwesenheit von PTP1B dessen inhibitorische Eigenschaften zum Tragen. Zum einen wurde *in vitro* der Nachweis einer PTP1B-vermittelten Hemmung der PDGF-induzierten Proliferation und Migration an VSMC von Ratten erbracht (11). Eine weitere Studie konnte einen inhibitorischen Effekt von PTP1B auf PDGF- und FGF-vermittelte Wachstumsprozesse an kultivierten aortalen glatten Muskelzellen von Ratten darstellen (54). Daneben wurde in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (engl. *Human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) für PTP1B eine hemmende Wirkung auf die Signaltransduktion mittels VEGF festgestellt (147). Für die EGF-Signaltransduktion zeigte sich eine hemmender Effekt von PTP1B in Zellen des humanen Epidermoidkarzinoms (110).

Entgegen unserer Hypothese zeigte sich der Effekt jedoch am stärksten in der Adventitia und nicht wie angenommen in der Media. Ursächlich könnte eine Migration der glatten Muskelzellen aus der Media in die Adventitia sein. Zum anderen könnte aufgrund des erhöhten Einflusses von Wachstumsfaktoren eine verstärkte Proliferation von Myofibroblasten vorliegen. Zur weiteren Analyse der Zusammensetzung der Adventitia erfolgten weitere Färbungen. Zunächst erfolgte eine

Picrosiriusrot-Färbung zum Nachweis von Kollagen, das hauptsächlich von Fibroblasten gebildet wird. Mittels polarisierten Lichts konnten interstitielle Kollagenfasern mikroskopisch dargestellt werden. Auch hier zeigte sich in der Adventitia ein erhöhter Anteil an Kollagen in SMC.PTP1B-KO. Sowohl der absolute als auch der prozentuale Anteil an Kollagen in der Adventitia waren signifikant erhöht (siehe Kapitel 5.3.2). Der erhöhte Kollagenanteil spricht für eine erhöhte Anzahl an Fibroblasten in der SMC.PTP1B-KO-Gruppe und für die Hypothese einer aus dem Knockout resultierenden perivaskulären Fibrose. In diesem Zusammenhang beschreiben Majesky et al. eine Zellpopulation, bei der es sich um migrierte glatte Muskelzellen handelt, die nach der Migration Eigenschaften von pluripotenten Progenitorzellen annimmt und sich letztlich zu Fibroblasten differenziert (149).

Neben der Kollagenanalyse wurde auch eine Immunhistochemie für den Muskellzell-Marker SMA durchgeführt. Für Neointima und Media konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gewebezusammensetzung hinsichtlich glatter Muskelzellen gezeigt werden, jedoch trat in der Gruppe des PTP1B-Knockouts in der Adventitia ein signifikant erhöhter prozentualer Anteil an SMA-positiver Fläche auf. Auch die absolute SMA-positive Fläche war signifikant größer (siehe Kapitel 5.5.2). Aufgrund des erhöhten Anteiles an glatten Muskelzellen in der Adventitia von SMC.PTP1B-KO, lässt sich eine Migration aus der Media in die Adventitia sowie eine verstärkte Proliferation glatter Muskelzellen ableiten.

Im Zusammenspiel mit den Daten der morphometrischen Analyse und der Kollagenanalyse manifestiert sich das Bild einer perivaskulären Fibrose. Durch die Erhöhung des Kollagenanteils und der Vergrößerung der Adventitia nimmt höchstwahrscheinlich die Gefäßelastizität im Bereich der Läsion ab. Des Weiteren führt die erhöhte Zahl an glatten Muskelzellen zu einer erhöhten Kontraktilität und damit einhergehend zu einer verstärkten Gefäßverengung, die sich im verkleinerten Lumen der Versuchstiere mit PTP1B-Knockout widerspiegelt. Ob der erhöhte Kollagenanteil auf einem verminderten Abbau beruht (z.B. durch Matrixmetalloproteasen) oder ob andere Extrazellulärmatrixbestandteile (wie Fibronektin oder Laminin) ebenfalls verändert sind, wurde nicht untersucht.

Neben Bindegwebe und Kollagen enthält die Adventitia Perizyten, Progenitorzellen und glatte Muskelzellen. Zudem wird Perizyten eine bedeutende Rolle im Rahmen der

Restenose nach Gefäßverletzungen beigemessen (150). Neben ihrer typischen Lage in der Adventitia werden Perizyten durch die Expression bestimmter zellulärer Marker definiert, darunter PDGFR-β und NG2. Vor allem nach einer Gefäßverletzung kommt es zu Ko-Expression beider Marker (150). Aufgrund der morphologischen und zellulären Veränderungen der SMC.PTP1B-KO-Gruppe wurden beide Marker genauer betrachtet. PDGFR-β ist zudem eine Rezeptortyrosinkinase und wird somit direkt durch PTP1B reguliert. Die immunhistochemische Analyse und Quantifizierung des PDGFR-β Immunsignals ergab eine signifikant erhöhte Ausprägung in SMC.PTP1B-KO. Jedoch waren nur Neointima und Media betroffen, wobei beide Schichten einen erhöhten prozentualen Anteil aufwiesen, die absolute PDGFR-β-positive Fläche jedoch nur in der Media der KO-Mäuse erhöht war. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass der gezielte PTP1B-Knockout in glatten Muskelzellen vor allem in der Media zum Tragen kam. Der Zuwachs an Zellen lässt vermuten, dass die beobachtete Zunahme des PDGFR-β Immunsignals in der Media auf einer Zunahme PDGFR-β-positiver Zellen beruht. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass es aufgrund der, in Abwesenheit von PTP1B, weniger stark regulierten Signaltransduktion des PDGF-Rezeptors adaptiv zu einer Hochregulation seiner Expression gekommen sein könnte. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht definitiv geklärt werden. Bei Betrachtung der positiv angefärbten Zellen zeigten sich auch in der Adventitia eine erhöhte Anzahl positiver Zellen in der SMC.PTP1B-KO-Gruppe, jedoch wies der prozentuale Anteil positiver Zellen keine signifikanten Unterschiede auf. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass auch die Adventitia in Mäusen der SMC.PTP1B-KO-Gruppe vergrößert war, so dass die absolute Zunahme positiver Zellen verhältnismäßig unverändert blieb.

Möglicherweise handelte es sich bei den positiv gefärbten Zellen um eingewanderte Zellen aus der Media, jedoch wäre es auch denkbar, dass diese Zellpopulation aus residenten Perizyten besteht. Um diese Möglichkeit zu weiter zu untersuchen, wurde ein weiterer, etablierter Marker für Perizyten analysiert, NG2, der nicht direkt durch PTP1B reguliert wird. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich die NG2-Expression nur in der Media signifikant unterscheidet. Dort ist sie in der SMC.PTP1B-KO-Gruppe signifikant erhöht. Bei der Auswertung der Adventitia ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Bei der Analyse des Markers muss der Kontext betrachtet

werden. Ozerdem et al. differenzieren zwischen einer NG2-Expression von glatten Muskelzellen in der Makrovaskulatur und einer NG2-Expression von Perizyten während der Gefäßbildung in der Mikrovaskulatur (151). Neben arteriellen adventitialen Perizyten-Progenitorzellen (150) haben weitere Studien NG2 in einer Reihe anderer Zelltypen, wie beispielsweise VSMC (152), oligodendrozytären Progenitorzellen (153) oder Chondroblasten (154) nachgewiesen. Zudem wurde eine Minderung der NG2-Expression im Rahmen von voranschreitenden Differenzierungsprozessen festgestellt, jedoch kommt es im Rahmen der Angiogenese als Teil der Wundheilung zu einer erneuten NG2-Hochregulation (155). Aufgrund des fehlenden Einflusses von PTP1B auf die NG2-Expression ist das vorliegende Ergebnis nicht überraschend. Es ist davon auszugehen, dass es sich in der Adventitia um residente Perizyten handelt, die nicht direkt durch PTP1B beeinflusst werden. Im Rahmen einer verstärkten Ausbildung von *Vasa vasorum* wäre vermutlich eine höhere Expression von NG2 nachzuweisen, jedoch zeigten sich auch bezüglich der der Ausbildung neuer Vasa vasorum in der Adventitia keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Die signifikante Erhöhung der NG2-positiven Zellzahl der Media kann als eine erhöhte Anzahl glatter Muskelzellen oder als eine schwächer ausgeprägte Differenzierung verstanden werden, wobei auch der prozentuale Anteil nicht signifikant verändert war.

Der Immunmarker F4/80 wurde zur Darstellung von Gewebsmakrophagen verwendet. Es konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden, was die Annahme unterstützt, dass die morphologischen Unterschiede auf den verschiedenen Genotypen bzw. der geringeren Expression von PTP1B beruhen und nicht auf inflammatorische Vorgänge zurückzuführen sind. Nichtsdestotrotz bleibt eine entzündliche Komponente nicht ausgeschlossen, da vor allem die Akutreaktion immunologisch vermittelt ist und die Gewebeentnahme drei Wochen nach Gefäßverletzung stattfand.

Perivaskuläre Zellen und VSMC sind nicht vollständig ausdifferenziert und besitzen die Möglichkeit, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (156). Der *Krüppel-like factor 4* (KLF4) stellt einen wichtigen Bestandteil der Regulation der Differenzierungsprozesse dar (157). Im Rahmen der Änderung des Phänotyps von VSMC reduziert sich die Expression spezifischer Marker wie beispielsweise SMA,

SMMHC und SM22 alpha. Auch im Rahmen der Gefäßverletzung konnte ein Verlust der Marker beobachtet werden (158). Durch Stimulation mit PDGF-BB konnte der gleiche Effekt erzielt werden (159). Des Weiteren konnte eine KLF4-regulierte Differenzierung von c-kit/sca1-positiven Progenitorzellen nachgewiesen werden (160), wohingegen eine Hemmung von KLF4 zu einer Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu glatten Muskelzellen (161) und zu einer schwächer ausgeprägten Neointima-Bildung nach Gefäßverletzung mittels Ballondilatation führte (162). Die Aktivität von KLF4 wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert (163), jedoch ist aktuell noch nicht bekannt wie sich das Fehlen von PTP1B auf die KLF4-Aktivität auswirkt. Das Fehlen von PTP1B führt möglicherweise zu einer verstärkten Phosphorylierung von KLF4. Über MAP-Kinasen (engl. *mitogen-activated protein*), auch *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) genannt, werden eine Vielzahl von Prozessen, unter anderem der Zellzyklus und die Zelldifferenzierung, reguliert. Es wurde gezeigt, dass PTP1B-Inhibitoren eine ERK1/2-Aktivierung sowie eine *ETS-like-1-protein*-vermittelte (ELK1) Transkriptionsaktivierung und Zellproliferation induzieren (164). Daneben konnte gezeigt werden, dass für die Zelldifferenzierung ein Export von KLF4 aus dem Zellkern stattfinden muss. Dieser Vorgang ist abhängig von einer ERK-Aktivierung und darauffolgender KLF4-Phosphorylierung durch die aktivierten ERK (165). Durch nur eingeschränkte PTP1B-vermittelte Dephosphorylierung von PDGFR-β, ERK1/2 und ELK1 könnte es zu einer verstärkten KLF4-Aktivierung und Ausdifferenzierung der perivaskulären Progenitorzellen zu Myofibroblasten gekommen sein. Das Fehlen von PTP1B könnte durch Verstärkung des KLF4-Signalwegs ursächlich für eine Adventitia Vergrößerung mit einhergehender perivaskulärer Fibrose sein. Insgesamt muss jedoch angemerkt werden, dass der Einfluss von Phosphatasen, im speziellen PTP1B, auf KLF4 noch nicht hinreichend untersucht wurde.

Zwar ist bei beiden Versuchsgruppen weiterhin eine Neointimabildung durch Zellmigration und -proliferation nach Anwendung des Eisenchlorid-Modells zu erkennen, jedoch zeigt der PTP1B-Knockout seine Wirkung vor allem im Bereich der Adventitia. Alles in allem stehen bei dem Modell des PTP1B-Knockouts in glatten Muskelzellen der Media nicht der klassische Pathomechanismus der Restenose mit Bildung einer Neointima im Vordergrund, sondern die Einengung des Gefäßes durch

Veränderungen des umliegenden Gewebes. Nach Betrachtung der Ergebnisse in ihrer Gesamtheit verfestigt sich das Bild einer perivaskulären Fibrose, die letztlich zu einem reduzierten Lumen, also einer Stenose führt. Diese wird durch das Vorhandensein von PTP1B vermutlich verhindert.

6.3 Mögliche Bedeutung neuartiger Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren für die Neointimabildung: BDNF und TrkB

Neutrophine dienen der Ausbildung und dem Erhalt neuronaler Netzwerke. Man kann sie auch als neuronale Wachstumsfaktoren bezeichnen. Sie wirken im zentralen Nervensystem (ZNS) an der Regulierung von Nahrungszufuhr und Energiekontrolle mit. Mutationen (166, 167) oder eine Haploinsuffizienz (168) des Gens für BDNF, dem Hauptliganden von TrkB wurden mit Übergewicht von Menschen in Verbindung gebracht. Außerdem konnte im Tierexperiment an Mäusen gezeigt werden, dass eine zentrale Stimulation von TrkB Rezeptoren zu einer verminderten Nahrungsaufnahme, einem reduzierten Körpergewicht und Schutz vor, mit Übergewicht verbundenen, Erkrankungen führt (169). Andere Untersuchungen zeigten jedoch, dass zentrale BDNF-Injektionen (170) oder die Gabe eines TrkB-Antikörpers (171) mit einem dosis-abhängigen Blutdruckanstieg trotz des Gewichtsverlust assoziiert sind. Die Dephosphorylierung von TrkB durch PTP1B führt zudem zu Übergewicht (85). Neben den genannten Eigenschaften wirken sich Neutrophine auch wachstumsfördernd auf glatte Muskelzellen aus. Dazu exprimieren glatte Muskelzellen beispielsweise den TrkB-Rezeptor (84). TrkB gehört auch zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen und erste Arbeiten konnten zeigen, dass TrkB und BDNF ebenfalls von PTP1B inhibiert werden (85). Aufgrund dieser Vordaten wurden Veränderungen von TrkB und seinem Hauptliganden BDNF in der Gefäßwand nach $FeCl_3$-Verletzung untersucht und wie diese durch das Fehlen von PTP1B beeinflusst werden. Unverletzte Arterien zeigten nur eine geringe TrkB-Expression und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Im Falle der verletzten Karotisarterien präsentierte SMC.PTP1B-KO sowohl absolut als auch prozentual eine höhere Expression in allen Gefäßschichten, mit Ausnahme der Neointima, die nur einen höheren prozentualen Anteil aufwies. Diese Ergebnisse gehen mit dem Stand der Forschung einher, da es durch Hypoxie, also einem Prozess, der während einer Gefäßverletzung abläuft, zu

einem reaktiven Anstieg der Rezeptoren kommt (123). Der erhöhten Expression von TrkB könnte einer adaptive Hochregulation in Abwesenheit von PTP1B zugrunde liegen. Der Anstieg von TrkB könnte jedoch auch auf ein vermehrtes Anfallen von Neutrophinen in Abwesenheit von PTP1B zurückzuführen sein.

Des Weiteren erfolgte die Auswertung der Expression von BDNF, des wichtigsten TrkB-Liganden. Hierbei kam es jedoch zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen beiden Gruppen. Aufgrund der signifikanten Expressionsänderungen von TrkB kann jedoch vermutet werden, dass die Signaltransduktion von BDNF trotz dieses Befundes stärker in SMC.PTP1B-KO ausgeprägt.

6.4 *In-vitro*-Versuche zur Modellierung der Prozesse einer Gefäßverletzung mithilfe der Zellkultur

Neben den histologischen und immunhistochemischen Untersuchung wurden zudem ausgewählte zelluläre Prozesse einer Gefäßverletzung *in vitro* in der Zellkultur modelliert. In diesen vorläufigen Versuchsreihen zeigten sich zum Teil unvorhergesehene Ergebnisse, die weiterer Bestätigung und Untersuchung bedürfen Die Anfangshypothese umfasste eine verstärkte Proliferation nach Inkubation der MOVAS mit dem PTP1B-Inhibtor. Des Weiteren lag eine Dedifferenzierung der glatten Muskelzellen vom funktionalen kontraktilen Typ hin zum synthetischen Typ nahe. Beide Hypothesen konnten in dieser Form nicht bestätigt werden.

Nach PTP1B-Inhibition zeigten die MOVAS eine geringere mRNA-Expression des Proliferationsmarkers Cyclin D1 (siehe Kapitel 5.6.1, **Abbildung 5-25 A**). Dies widerspricht wiederum den Ergebnissen der PCNA-Immunhistochemie in Mäusen der SMC.PTP1B-KO-Gruppe (siehe Kapitel 5.5.1). Möglicherweise ist der Widerspruch in der Expression der Proliferationsmarker auf die Verwendung unterschiedlicher Marker oder die verwendete Zelllinie zurückzuführen. MOVAS proliferieren bereits im unbehandelten Zustand stark, und Unterschiede in der Anwesenheit eines PTP1B Inhibitors mögen nicht erkennbar gewesen sein. Zudem lagen die verwendeten Zellen bereits in Passage 14 vor und waren möglicherweise hinsichtlich der Expression von PTP1B und anderer wichtiger Faktoren ungünstig verändert. Es könnte auch sein, dass der Nachweis auf mRNA-Ebene nur die negative Gegenregulation aufgrund einer

erhöhten Proteinexpression widerspiegelt. Untersuchungen an primären Glattmuskelzellen aus der Maus könnten hier besser geeignet sein.

Zudem wird die Wirkung des PTP1B-Inhibtiors höchstwahrscheinlich erst nach Einfluss von Wachstumsfaktoren vollständig entfaltet. Basierend auf dieser Annahme wäre eine stärkere Cyclin D1 Expression nach gleichzeitiger Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu erwarten. Natürlich könnte das Ausbleiben einer verstärkten Expression des Proliferationsmarkers dem Versuchsaufbau *in vitro* geschuldet sein. In der mikroskopischen Kontrolle mittels Phasenkontrast zeigten die Zellen keine wahrnehmbaren Unterschiede bezüglich ihrer Konfluenz. Aufgrund der fehlenden Umgebung eines Organismus kommt es nach PTP1B-Inhibition nicht zu einer verstärkten Wirkung der verschiedenen Wachstumsfaktoren, die die Proliferation anregen, da die Zellkultur ausschließlich MOVAS beinhaltet. Hinzu kommt, dass es in einer physiologischen Umgebung zum reaktiven PTP1B-Anstieg nach Gefäßverletzung kommt (12), der in diesem Fall aufgrund der fehlenden Verletzung wegfällt. Nach chemischer Induktion einer Hypoxie mithilfe von Kobaltchlorid zeigten die Zellen zudem eine erhöhte PTP1B-Expression. Dieses Ergebnis geht einher mit einer erhöhten Expression von PTP1B nach Gefäßverletzung (siehe Kapitel 5.1). Der gleiche Effekt wurde zuvor auch von Wright et al. beschrieben (12).

Deshalb könnte es sein, dass PTP1B auch in der Kontrollgruppe nur schwach exprimiert ist und die Inhibition aufgrund dessen nur eine geringe Wirkung zeigt. Eine weitere Studie konnte ebenfalls eine nur geringe Auswirkungen eines PTP1B-Inhibitors auf die Proliferation kultivierter Zellen zeigen (117). Um diese Frage zu klären, wäre die Versuchswiederholung in primären glatten Muskelzellen der Maus zu einer frühen Passage besser geeignet. Allerdings konnten auch Lanahan et al. bei PTP1B-defizienten Endothelzellen keine verstärkte Proliferation beobachten (62).

Differenzierte Muskelzellen exprimieren vor allem kontraktile Proteine wie SMA, Calponin und Proteine des Zytoskeletts wie Desmin und SM22 alpha. Mit der Dedifferenzierung gehen diese Marker verloren, da die funktionellen Eigenschaften zugunsten der Proliferation in den Hintergrund treten. In den *In-vitro*-Untersuchungen traten für den Zytoskelettmarker Desmin und den Transkriptionsfaktor Myocardin nach PTP1B-Inhibition eine verstärkte Expression auf, wohingegen die Expression von SMA, einem Marker kontraktiler differenzierter Muskelfasern, in der mRNA abnahm

(siehe Kapitel 5.6.1). Die Expression von Calponin und SM22 alpha zeigten keine deutliche Veränderung. Insgesamt zeigt sich nach PTP1B-Inhibition also kein klares Bild des muskulären Differenzierungsgrades oder widersprechen unseren Befunden *in vivo* (mehr Proliferation, mehr SMA-positive Zellen). Als Ursache für die unklaren Ergebnisse kommt ein fehlender Reiz in Form einer Gefäßverletzung in Betracht. Ohne den Reiz bleibt eine reaktive Expressionserhöhung aus, um Wachstumsprozesse zu inhibieren und zu bremsen. Gesunde Gefäße zeigen zudem physiologisch nur eine geringe Expression von PTP1B. Im direkten Zusammenhang mit einer schädigenden Noxe der Muskelzellen wäre es möglicherweise zu einer stärkeren Wirkung des Inhibitors gekommen.

Interessanterweise kam es nach Induktion einer chemischen Hypoxie mit Kobaltchlorid zur Expressionszunahme von PTP1B, was mit einer reaktiven PTP1B-Zunahme nach Hypoxie und Gefäßverletzung einhergeht. Zudem zeigte sich eine signifikante Abnahme der Expression von SMA, SM22 alpha und Calponin, was mit einer Abnahme des Differenzierungsgrads gleichgesetzt werden kann. Dieses Ergebnis passt zu den Beobachtungen von Majesky et al., die nach Gefäßverletzung eine Einwanderung von glatten Muskelzellen in die Adventitia mit konsekutiver Umwandlung in pluripotente adventitiale Sca1-positive Progenitorzellen feststellen konnten (149).

Nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid, einem Radikalbildner, war ebenfalls eine Abnahme der SMA-Expression in der qPCR zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten sich nach Behandlung mit Angiotensin II keine signifikanten Veränderungen, auch nicht für die Expression von PTP1B. Vermutlich ist die kontraktile Wirkung von ATII im Vergleich zu den weiteren Prozessen nach einer Gefäßverletzung weniger bedeutend und hat im Rahmen vaskulärer Umbauprozesse einen geringeren Einfluss.

In Zusammenschau der Ergebnisse der Zellkulturversuche ergibt sich ein gemischtes Bild. Die Ergebnisse der *In-vivo*-Versuche konnten nicht vollständig in den *In-vitro*-Versuchen nachgebildet werden. Wie schon zuvor beschrieben ist das Phänomen wahrscheinlich auf einen fehlenden Reiz auf die Muskelzellen zurückzuführen. Diese These wird durch die Expressionsänderungen nach Behandlung mit Kobaltchlorid und Wasserstoffperoxid unterstützt, da Hypoxie und der Einfluss von Sauerstoffradikalen Teil einer Gefäßverletzung sind. Eine kombinierte Behandlung der Zellen mithilfe eines

PTP1B-Inhibitors und weiterer Stimulanzien hätte vermutlich zu einem deutlicheren Ergebnis hinsichtlich der Dedifferenzierung glatter Muskelzellen geführt.

6.5 Mechanismus des vaskulären Umbaus mit perivaskulärer Fibrose

In Zusammenschau der Ergebnisse ergibt sich nach Induzierung eines VSMC-spezifischen PTP1B Knockouts nach Gefäßverletzung das morphologische Bild einer perivaskulären Fibrose. Neben der stark vergrößerten und zellreichen Adventitia präsentieren die Versuchstiere nach PTP1B-Knockout ein signifikant verengtes Lumen. Zudem sind Zellzahl und Proliferationsrate stark erhöht. Insgesamt leitet sich von den vorliegenden Befunden das Bild eines hypertrophen *Inward Remodeling* ab, bei dem es zur Einengung des Gefäßes von außen kommt (172). Das Auftreten eines *Inward Remodeling* wurde zuvor mit Hypertonie und Vasokonstriktion kleiner Arterien in Verbindung gebracht (173, 174). Zudem konnte ein Auftreten auch unter dem Einfluss von Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren beobachtet werden (175), was die vorliegenden Ergebnisse und Hypothesen unterstützt.

Daneben sprechen eine stärkere Expression von PDGFR-β, SMA und Kollagen in der Adventitia der SMC.PTP1B-KO-Gruppe für eine Vermehrung lokaler SMMHC-positiver Zellen oder die Migration glatter Muskelzellen in die Adventitia in Abwesenheit von PTP1B. Eine vermehrte Zahl von (Myo)Fibroblasten und ein damit einhergehender erhöhter Kollagenanteil sowie der erhöhte Anteil an proliferierenden PCNA-positiven Zellen sprechen für eine einsetzende Dedifferenzierung.

Untermauert wird der Effekt durch die *In-vitro*-Zellkulturversuche, in denen wir nach PTP1B-Inhibtion eine geringere mRNA-Expression von SMA, SM22 alpha und Calponin zeigen konnten, wobei nur für SMA ein signifikanter Unterschied festzustellen war und die anderen Ergebnisse nur Trends darstellen. Wahrscheinlich ist dieses Ergebnis der Art der verwendeten Zellen zuzuschreiben. Die verwendeten MOVAS befanden sich zum Versuchszeitpunkt bereits in Passage 16 bis 18. Womöglich haben die Zellen zu diesem Zeitpunkt die Expression verschiedener Marker verloren. Ein weiterer möglicher Grund für die Ergebnisse könnte der Zelltyp an sich sein. Da es

sich um immortalisierte Zellen mit einer überdurchschnittlichen hohen Teilungsrate handelt, sind Unterschiede zu primären isolierten VSMC nicht auszuschließen.

Eine Dedifferenzierung von VSMC ist möglicherweise durch KLF4 vermittelt. Wie bereits in Kapitel 6.2 beschrieben handelt es sich dabei um einen Pluripotenz-assoziierten Transkriptionsfaktor. In diesem Zusammenhang konnten Majewsky et al. nachweisen, dass glatte Muskelzellen in Abhängigkeit von KLF4 von der Media in die Adventitia migrieren, spezifische Muskelzellmarker verlieren und die von Progenitorzellen annehmen (149). Diese Zellen zeigten nach der Migration Eigenschaften von *Adventitial sca1-positive progenitor cells* (AdvSca1, adventitiale Sca1-positive Progenitorzellen) und besaßen die Fähigkeit, sich in verschiedene Zelltypen umzuwandeln, wie zum Beispiel murale Zellen, makrophagenähnliche Zellen und endothelähnliche Zellen. Es ist nicht auszuschließen, dass PTP1B maßgeblich an der Regulation von KLF4 beteiligt ist und dass ein Knockout zu einer ungebremsten Signaltransduktion mit folgender Dedifferenzierung führt. Diesbezüglich bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Im Rahmen des inflammatorisch vermittelten migratorischen und transformativen Prozesses spielen verschiedene Zelltypen und Wachstumsfaktoren eine bedeutende Rolle. Dazu gehören glatte Gefäßmuskelzellen, (Myo)Fibroblasten, und Entzündungszellen (176). Kramann et al. konnten zudem für $Gli1^{+}$-Progenitorzellen eine Beteiligung an fibrotischen Prozessen nachweisen (177) und schreiben diesen Eigenschaften PDGFR-β-positiver Stammzellen zu.

Ein ähnliches Bild auch im Rahmen einer perivaskulären Fibrose zu erkennen, die einen Veränderungsprozess der Extrazellulärmatrix der *Tunica adventitia* darstellt. Bei dieser Art des vaskulären *Remodeling* kommt es zum Verlust der Gefäß-Elastizität (Compliance). Erst kürzlich wurde für microRNA-214 (miR-214) eine Schlüsselrolle in der Pathologie der endothelialen Dysfunktion und perivaskulären Fibrose mit konsekutivem Elastizitätsverlust nachgewiesen (178). Beim Auftreten einer perivaskulären Inflammation als Teil der arteriellen Hypertonie ist miR-214 mit der T-Zell-Aktivierung und -Rekrutierung in Verbindung gebracht worden (178). MiR-214-defiziente Mäuse waren vor einer durch Angiotensin II induzierten perivaskulären Fibrose geschützt. In diesem Zusammenhang wäre auch eine verstärkte miR-214-Expression nach PTP1B-Knockout und damit einhergehend eine verstärkte

perivaskuläre Fibrose denkbar. Der Mechanismus hinter dem Auftreten der perivaskulären Fibrose ist jedoch noch nicht vollständig untersucht und charakterisiert.

Profibrotische Effekte werden durch Signaltransduktionsmoleküle wie zum Beispiel PDGF (179), TGFβ (180) oder EGF (181, 182) vermittelt. Des Weiteren werden auch ROS (183) und Endothelin-1 (184) profibrotische Eigenschaften nachgesagt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die über Rezeptrotyrosinkinasen vermittelten Signalwege der perivaskulären Fibrose auch durch PTP1B beeinflusst und höchstwahrscheinlich gebremst werden. Dazu zählen die Rezeptoren für PDGF und EGF.

Die fehlende negative Regulation nach PTP1B-Knockout zeigt sich klar in den morphometrischen Analysen und trägt vermutlich auch zur Entwicklung einer perivaskulären Fibrose bei, auch wenn die genauen Pathomechanismen in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnten, Dahingehend sollten weitere Untersuchungen stattfinden. Außerdem sollte der Stellenwert glatter Muskelzellen im Rahmen der perivaskulären Fibrose in Zukunft genauer untersucht werden. Sie stellt neben der Neointimahyperplasie einen weiteren bedeutenden vaskulären Umbauprozess dar.

6.6 Fazit und Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse der Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Expression von PTP1B in glatten Muskelzellen eine aktive Rolle im Rahmen vaskulärer Reparatur- und Umbauprozesse nach einer Gefäßverletzung spielt und wichtig ist für die Hemmung überschießender Wundheilungsprozesse. Die morphologischen und immunhistochemischen Analysen von Geweben der SMC.PTP1B-KO-Gruppe zeigten nach experimenteller Gefäßverletzung interessanterweise vor allem eine perivaskuläre Fibrose mit begleitender Hyperproliferation als morphologisches Korrelat eines glattmuskelzellspezifischen PTP1B-Knockouts.

Anders als erwartet stand nicht die Bildung einer Neointima im Vordergrund. Es kam zwar nach Gefäßverletzung mithilfe des Eisenchlorid-Modells in beiden Versuchsgruppen zu einer Neointimabildung mit begleitender Lumeneinengung und Stenose, jedoch hatte der Knockout keine Auswirkungen auf die Größe der Neointima

oder Media, sondern entfaltete seine Wirkung vor allem im Bereich der Adventitia. Diese war stark vergrößert und deutlich zellreicher. Daneben zeigen sich signifikant mehr proliferierende Zellen sowie ein erhöhter Kollagenanteil und eine erhöhte SMA-Expression. Diese Veränderungen resultierten in einer Einengung der Gefäße durch Veränderungen des umliegenden Gewebes und einem signifikant kleineren Lumen in der SMC.PTP1B-KO-Gruppe.

Die vorliegenden Ergebnisse können durch eine verstärkte Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in Abwesenheit von PTP1B erklärt werden und werden möglicherweise über eine verstärkte Signaltransduktion des PTP1B-Substrats PDGF Rezeptor vermittelt. Diese Wirkung war besonders ausgeprägt in der Adventitia, was auf lokale Effekte oder eine vermehrte Migration aus der Media in Richtung Adventitia schließen lässt. Daneben könnten auch bisher kaum untersuchte Rezeptortyrosinkinasen, wie TrkB, eine Rolle gespielt haben. Die von der Gefäßverletzung hervorgerufene Wachstumsfaktorsignaltransduktion wird durch reduzierte PTP1B-Expression weniger stark gegenreguliert und mündet in einem überschießendem Wachstums- und Proliferationsreiz. Infolgedessen kommt es in der Adventitia zur Entdifferenzierung eingewanderter glatter Muskelzellen vom kontraktilen Typ hin zum synthetischen, proliferativem Typ. Allerdings konnten erste *In-vitro*-Versuche in murinen aortalen glatten Muskelzellen nach PTP1B-Inhibition hier kein klares Bild der Dedifferenzierung aufzeigen und sollten in Primärzellen mit genetischer PTP1B-Deletion und nach zusätzlicher Stimulation wiederholt werden. Eine weitere Hypothese zur Erklärung der vorliegenden Befunde stellen die bereits beschrieben Erkenntnisse von Majewsky et al. dar, bei denen es zur Umwandlung von migrierten glatten Muskelzellen zu pluripotenten Progenitorzellen kommt (149). Nach der Umwandlung ist ein Verlust differenzierter Muskelzellmarker zu beobachten. Diese Beobachtungen sind ein vielversprechender Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen. Gleiches gilt für die Analyse von Fibrosemarkern.

Kritisch anzumerken ist, dass das Eisenchlorid-Modell nicht dem klassischen Pathomechanismus eine Atherosklerose bzw. Restenose entspricht. Zur Untersuchung von Pathomechanismen der Restenose beim Menschen nach PTCA wären endogene Verletzungsmodelle in Großtieren mittels Ballon oder Katheter besser geeignet. Allerdings lässt sich in diesen Spezies, im Gegensatz zur Maus,

(noch) kein zellspezifischer KO induzieren. Bei der klassischen Restenose stehen vor allem eine verletzte Intima und verletzte Zellen der Media im Vordergrund. Dennoch gilt das Eisenchlorid-Modell als etabliert und führt zu einer Neointima-Bildung. Aus aktivierten Plättchen und anderen Zellen kommt es bei diesem Modell außerdem zur vermehrten Expression und Freisetzung von Wachstumsfaktoren, was in Bezug auf die Untersuchung von PTP1B relevant ist.

Wie schon in Kapitel 6.4 beschrieben, konnte *in vitro* keine vollständige Modellierung des *In-vivo*-Versuchs erreicht werden. Um dies zu erreichen, hätten eine gleichzeitige Behandlung mit PTP1B-Inhibitor und den weiteren Stimulanzien stattfinden müssen. So wäre die Vergleichbarkeit der Proben mit der Kontrollprobe aber nicht mehr sichergestellt gewesen und es wäre zudem unklar, ob die Effekte aufgrund des Inhibitors oder den weiteren Stimulanzien auftreten. Alternativ hätten isolierte Primärzellen aus KO- und WT-Mäusen anstelle von MOVAS (einer murinen Zelllinie) untersucht werden können. Die in der Arbeit verwendeten MOVAS befanden sich bereits zu Beginn der Experimente in einer fortgeschrittenen Passage und exprimierten aufgrund dessen unter Umständen wichtige Marker oder Rezeptoren nicht mehr vollständig. Die Analyse des von Majeski et al. beschriebenen Transkriptionsfaktors KLF4 (149) für die Umdifferenzierung glatter Muskelzellvorläuferzellen wäre zudem aufschlussreich gewesen und hätte möglicherweise ein vollständigeres Bild des Mechanismus vermitteln können.

Auch wenn aktuelle Studien die Zugehörigkeit zum weiblichen Geschlecht nicht mehr mit einer erhöhten Mortalität im Rahmen einer PTCA assoziieren (45, 46), muss angemerkt werden, dass mögliche Unterschiede in der Ausprägung der Gefäßverletzung zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden konnten, da die Cre-Lox-vermittelte Gendeletion von PTP1B aufgrund der Lokalisierung der Cre-Recombinase auf dem Y-Chromosom nur in männlichen Tieren möglich war. Somit können keine Aussagen zu vaskulären Umbauprozessen in weiblichen Tieren getroffen werden.

Es lässt sich zusammenfassen, dass das Fehlen von PTP1B in glatten Muskelzellen zu einem überschießenden Wachstum glatter Muskelzellen und Myofibroblasten führt, welches vor allem in der Adventitia deutlich wird. Daraus lässt sich schließen, dass PTP1B eine bedeutende und eher protektive Funktion im Rahmen der Regulation nach

einer Gefäßverletzung besitzt. Vor allem in glatten Muskelzellen und in Zellen der Adventitia ist diese Funktion von großer Bedeutung.

Dies ist die erste Studie, die die Bedeutung von PTP1B in glatten Muskelzellen direkt untersucht. Frühere Studien zur Bedeutung von PTP1B, z.B. in Endothelzellen, zeigten zwar überwiegend positive Effekte eines PTP1B-Knockouts, beispielsweise im Rahmen der Herzinsuffizienz (136), dies liegt jedoch in Unterschieden in der zellulären Signaltransduktion und Bedeutung im Gefäßsystem begründet, andere Faktoren könnten sie auslösende Reize betreffen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ein ungebremstes Wachstum und einer verstärkten Migration der Muskelzellen beim Fehlen von PTP1B. Auch in Endothelzellen führte die Induktion einer Gefäßverletzung mittels $FeCl_3$ zu einem überschießenden Wachstum und einer vorzeitigen Seneszenz und damit indirekt zu einer Zunahme der Neointimabildung (9). Es lässt sich also zusammenfassen, dass PTP1B eine wichtige Rolle für die Proliferation und Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen und anderer vaskulärer Zellen spielt, was vor allem nach einer Gefäßverletzung zum Tragen kommt. Abschließend ist anzumerken, dass die vorliegenden Befunde noch auf den humanen Organismus übertragen und validiert werden müssen.

7 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von PTP1B in glatten Gefäßmuskelzellen für vaskuläre Umbauprozesse nach einer experimentellen Gefäßverletzung zu untersuchen. Dazu wurde zunächst eine Mauslinie mit genetischer Deletion von PTP1B spezifisch in glatten Gefäßmuskelzellen hergestellt und anschließend phänotypsiert. Bei der Ausbildung einer Neointima nach einer Gefäßverletzung spielen die Signaltransduktion in glatten Muskelzellen und nachfolgende Proliferations- und Migrationsprozesse in Antwort auf Wachstumsfaktoren eine maßgebliche Rolle. Diese bestimmen die Entwicklung einer Restenose nach PTCA.

Die Protein Tyrosin Phosphatase-1B spielt eine Rolle bei der negativen Regulation der Wachstumsfaktorrezeptor-Signaltransduktion. Veränderungen in ihrer Expression oder Aktivität könnten zur Neointimabildung beitragen. In vorangegangenen Studien zur Bedeutung von PTP1B für die vaskuläre Wundheilung wurden bisher nur globale (145) und endothelspezifische PTP1B-Knockoutmodelle (9, 62) untersucht oder Versuche an kultivierten glatten Muskelzellen durchgeführt. Aus Vorläuferstudien war bereits bekannt, dass ein selektiver Knockout von PTP1B in Endothelzellen zu einer verstärkten Neointimabildung und damit zu einer stärker ausgeprägten Gefäßlumenstenose führt (9).

Durch den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren und immunologischer Prozesse kommt es zur Neointimabildung, wobei PTP1B die einzelnen Signalkaskaden durch Dephosphorylierung negativ reguliert. Glatte Muskelzellen stellen den Großteil der migrierenden und proliferierenden Zellen im Rahmen vaskulärer Umbauprozesse dar und sind zudem sowohl Zielstruktur als auch Quelle

vieler Wachstumsfaktoren. Vor diesem Hintergrund wurde die Wirkung von PTP1B als „molekulare Bremse“ der Signaltransduktion und Funktion glatter Muskelzellen *in vivo* und *in vitro* untersucht.

Zu Beginnn erschien eine verstärkte Neointimabildung aufgrund fehlender Regulationsmechanismen nach VSMC-spezifischem PTP1B-Knockout wahrscheinlich. Die Anfangshypothese bestätigte sich jedoch nicht. Eine signifikant vergrößerte Neointima in SMC.PTP1B-KO blieb aus. Stattdessen zeigte sich das Bild einer stark vergrößerten und zellreichen Adventitia. Zudem fiel nach genauer Untersuchung auf, dass das Fehlen von PTP1B in Gefäßmuskelzellen mit einer signifikant kleineren Gesamtgefäßfläche und einem kleineren Gefäßlumen assoziiert war, obwohl es hinsichtlich der relativen Stenosierung des Gefäßlumens keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen gab.

Durch die vergrößerte und stärker mit interstitiellem Kollagen durchsetzte Adventitia kam es zu einer Einengung der Gefäße der Versuchstiere der SMC.PTP1B-KO-Gruppe. Daneben fielen vor allem eine höhere Zellzahl und vermehrte Anzahl proliferierender Zellen auf. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese einer ungebremsten Wachstumsfaktorsignaltransduktion. Des Weiteren zeigte sich eine verstärkte Expression von Zellmarkern für glatte Muskelzellen bzw. Myofibroblasten und eine Zunahme interstitieller Kollagenfasern in der Adventitia.

Passend dazu wiesen Neointima und Media der SMC.PTP1B-KO-Gruppe auch eine verstärkte Expression der Wachstumsfaktor- und Neurotrophinrezeptoren PDGFR-β und TrkB auf, während für den TrkB-Liganden BDNF keine Unterschiede festgestellt werden konnten.

Gleiches gilt für den Makrophagenmarker F4/80, woraus geschlossen werden kann, dass der beobachtete Phänotyp wahrscheinlich nicht auf eine Verstärkung inflammatorischer Prozesse durch die Reduktion von PTP1B beruht.

Aus den Ergebnissen ist zu schließen, dass ein glattmuskelspezifischer Knockout (unter Verwendung des SMMHC-Promoters) von PTP1B vor allem die Zellmigration in die Adventitia beeinflusst. Alternativ könnten auch lokale SMMHC-Cre positive (Vorläufer)zellen in der Adventitia durch das Fehlen von PTP1B Änderungen erfahren haben. Es ergibt sich das Bild einer perivaskulären Fibrose im Zusammenspiel mit einem *Inward Remodeling*. Aus der stark vergrößerten und zellreichen Adventitia

könnte ein Verlust der Gefäßelastizität resultieren, der wiederum die Fließeigenschaften des Blutes negativ beeinflussen könnte. Aufgrund der verstärkten Proliferation kann von einer Dedifferenzierung der Muskelzellen vom kontraktilen hin zum synthetischen Typ ausgegangen werden. Die *In-vitro*-Versuche zeigen diesbezüglich jedoch kein klares Bild. Eine PTP1B-Inhibition führt weder zu einer verstärkten Proliferation noch zu einer klaren Dedifferenzierung. Beides ist jedoch nach Induktion einer chemischen Hypoxie durch Kobaltchlorid zu erkennen. Somit ist davon auszugehen, dass neben der Inhibition ein weiterer Reiz wie beim Auftreten einer Gefäßverletzung benötigt wird, damit PTP1B seine Wirkungen messbar entfalten kann und es zu einer verstärkten Wachstumsfaktorsignaltransduktion kommt.

Die vorliegende Arbeit konnte aufzeigen, dass es nach Anwendung eines VSMC-spezifischen PTP1B-Knockouts zur verstärkten Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen mit einhergehender Dedifferenzierung kommt. Diese Prozesse sind möglicherweise PDGFR-β-vermittelt und werden physiologisch von PTP1B gebremst. In Abwesenheit von PTP1B findet jedoch keine Gegenregulation der Wachstumsfaktorsignaltransduktion statt, was die proliferativen und migratorischen Effekte im Rahmen einer Gefäßverletzung weiter verstärkt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Inhibition von PTP1B mit negativen Effekten im Rahmen von vaskulären Reparaturprozessen einhergeht. Es ist also festzuhalten, dass PTP1B ein wichtiger regulativer Bestandteil der vaskulären Wundheilung ist, ohne den es zu einem überschießenden Wachstum glatter Muskelzellen und Myofibroblasten kommt. Nach glattmuskulärer PTP1B-Deletion zeigte sich eine starke Vergrößerung der Adventitia als Resultat der Gefäßverletzung. Das morphologische Korrelat entspricht einer perivaskulären Fibrose mit Einengung des Gefäßlumens.

8 Literaturverzeichnis

1. Mortality GBD, Causes of Death C. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2015;385(9963):117-71.

2. Hajar R. Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. Heart Views. 2017;18(3):109-14.

3. Scheller B, Levenson B, Joner M, Zahn R, Klauss V, Naber C, et al. Medikamente freisetzende Koronarstents und mit Medikamenten beschichtete Ballonkatheter. Der Kardiologe. 2011;5(6):411-35.

4. Buccheri D, Piraino D, Andolina G, Cortese B. Understanding and managing in-stent restenosis: a review of clinical data, from pathogenesis to treatment. J Thorac Dis. 2016;8(10):E1150-E62.

5. Holmes DR, Jr., Holubkov R, Vlietstra RE, Kelsey SF, Reeder GS, Dorros G, et al. Comparison of complications during percutaneous transluminal coronary angioplasty from 1977 to 1981 and from 1985 to 1986: the National Heart, Lung, and Blood Institute Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty Registry. J Am Coll Cardiol. 1988;12(5):1149-55.

6. Qin Z, Zheng FW, Zeng C, Zhou K, Geng Y, Wang JL, et al. Elevated Levels of Very Low-density Lipoprotein Cholesterol Independently Associated with In-stent Restenosis in Diabetic Patients after Drug-eluting Stent Implantation. Chin Med J (Engl). 2017;130(19):2326-32.

7. Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, et al. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. Dev Cell. 2002;2(4):497-503.

8. Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. Mol Cell Biol. 2000;20(15):5479-89.

9. Jäger M, Hubert A, Gogiraju R, Bochenek ML, Münzel T, Schäfer K. Inducible Knockdown of Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase-1B Promotes Neointima Formation in Obese Mice by Enhancing Endothelial Senescence. Antioxid Redox Signal. 2019;30(7):927-44.

10. Yang M, Haase AD, Huang FK, Coulis G, Rivera KD, Dickinson BC, et al. Dephosphorylation of tyrosine 393 in argonaute 2 by protein tyrosine phosphatase 1B regulates gene silencing in oncogenic RAS-induced senescence. Mol Cell. 2014;55(5):782-90.

11. Shimizu H, Shiota M, Yamada N, Miyazaki K, Ishida N, Kim S, et al. Low M(r) protein tyrosine phosphatase inhibits growth and migration of vascular smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor. Biochem Biophys Res Commun. 2001;289(2):602-7.

12. Wright MB, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Protein-tyrosine phosphatases in the vessel wall: differential expression after acute arterial injury. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(5):1189-98.

13. Ahmad F, Azevedo JL, Cortright R, Dohm GL, Goldstein BJ. Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. J Clin Invest. 1997;100(2):449-58.

14. Konstantinides S, Schäfer K, Thinnes T, Loskutoff DJ. Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Its Cofactor Vitronectin Stabilize Arterial Thrombi After Vascular Injury in Mice. Circulation. 2001;103(4):576-83.

15. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. Circ Res. 2016;118(4):535-46.

16. Henderson A. Coronary heart disease: overview. Lancet. 1996;348 Suppl 1:s1-4.

17. Statistisches Bundesamt (Destatis). Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12 - Gesundheit, Reihe 4. 2017.

18. Krams R, Bäck M, European Society of Cardiology. The ESC textbook of vascular biology. Oxford: Oxford University Press; 2017. xvii, 326 pages p.

19. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev. 1997;18(1):4-25.

20. Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. Endocrinology. 1990;127(2):965-7.

21. Moncada S, Vane JR. The role of prostacyclin in vascular tissue. Fed Proc. 1979;38(1):66-71.

22. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature. 1988;332(6163):411-5.

23. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288(5789):373-6.

24. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J. 1989;3(9):2007-18.

25. Heller G, Babitsch B, Gunster C, Mockel M. Mortality following myocardial infarction in women and men: an analysis of insurance claims data from inpatient hospitalizations. Dtsch Arztebl Int. 2008;105(15):279-85.

26. Amann U, Kirchberger I, Heier M, von Scheidt W, Kuch B, Peters A, et al. Acute myocardial infarction in the elderly: Treatment strategies and 28-day-case fatality from the MONICA/KORA myocardial infarction registry. Catheter Cardiovasc Interv. 2016;87(4):680-8.

27. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2013;56(5-6):650-5.

28. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. Heart Lung Circ. 2013;22(6):399-411.

29. Bundesärztekammer (BÄK), Arbeitsgemeinschaft der Deutschen Ärztekammern, Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), (AWMF) AdWMF. Nationale Versorgungs Leitlinie Chronische KHK. 2019;5. Auflage, Version 1.

30. Bergheanu SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis : Current view and future perspective on lipoprotein modification treatment. Neth Heart J. 2017;25(4):231-42.

31. Beygui F, Cayla G, Roule V, Roubille F, Delarche N, Silvain J, et al. Early Aldosterone Blockade in Acute Myocardial Infarction: The ALBATROSS Randomized Clinical Trial. J Am Coll Cardiol. 2016;67(16):1917-27.

32. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. Eur Heart J. 2019;40(2):87-165.

33. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. N Engl J Med. 2003;349(14):1315-23.

34. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. N Engl J Med. 2004;350(3):221-31.

35. Kufner S, Byrne RA, Joner M, Kastrati A. In-Stent-Neoatherosklerose nach perkutaner Koronarintervention. CardioVasc. 2014;14(2):46-50.

36. Farb A, Sangiorgi G, Carter AJ, Walley VM, Edwards WD, Schwartz RS, et al. Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. Circulation. 1999;99(1):44-52.

37. Finn AV, Joner M, Nakazawa G, Kolodgie F, Newell J, John MC, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. Circulation. 2007;115(18):2435-41.

38. Byrne RA, Iijima R, Mehilli J, Pinieck S, Bruskina O, Schomig A, et al. Durability of antirestenotic efficacy in drug-eluting stents with and without permanent polymer. JACC Cardiovasc Interv. 2009;2(4):291-9.

39. von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(4):1137-41.

40. Nakazawa G, Otsuka F, Nakano M, Vorpahl M, Yazdani SK, Ladich E, et al. The pathology of neoatherosclerosis in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents. J Am Coll Cardiol. 2011;57(11):1314-22.

41. Nakazawa G, Vorpahl M, Finn AV, Narula J, Virmani R. One step forward and two steps back with drug-eluting-stents: from preventing restenosis to causing late thrombosis and nouveau atherosclerosis. JACC Cardiovasc Imaging. 2009;2(5):625-8.

42. Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. J Am Coll Cardiol. 2006;48(1):193-202.

43. Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? Circulation. 2004;109(6):701-5.

44. Cassese S, Byrne RA, Schulz S, Hoppman P, Kreutzer J, Feuchtenberger A, et al. Prognostic role of restenosis in 10 004 patients undergoing routine control angiography after coronary stenting. Eur Heart J. 2015;36(2):94-9.

45. Peterson ED, Dai D, DeLong ER, Brennan JM, Singh M, Rao SV, et al. Contemporary mortality risk prediction for percutaneous coronary intervention: results from 588,398 procedures in the National Cardiovascular Data Registry. J Am Coll Cardiol. 2010;55(18):1923-32.

46. Singh M, Rihal CS, Gersh BJ, Roger VL, Bell MR, Lennon RJ, et al. Mortality differences between men and women after percutaneous coronary interventions. A 25-year, single-center experience. J Am Coll Cardiol. 2008;51(24):2313-20.

47. Cho JY. Identification of Risk Factors Influencing In-Stent Restenosis with Acute Coronary Syndrome Presentation. Chonnam Med J. 2017;53(3):203-10.

48. Bakhai A, Booth J, Delahunty N, Nugara F, Clayton T, McNeill J, et al. The SV stent study: a prospective, multicentre, angiographic evaluation of the BiodivYsio phosphorylcholine coated small vessel stent in small coronary vessels. Int J Cardiol. 2005;102(1):95-102.

49. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. Lab Invest. 1983;49(3):327-33.

50. Moore S, Friedman RJ, Singal DP, Gauldie J, Blajchman MA, Roberts RS. Inhibition of injury induced thromboatherosclerotic lesions by anti-platelet serum in rabbits. Thromb Haemost. 1976;35(1):70-81.

51. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22(11):1769-76.

52. Chang Y, Zhuang D, Zhang C, Hassid A. Increase of PTP levels in vascular injury and in cultured aortic smooth muscle cells treated with specific growth factors. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004;287(5):H2201-8.

53. Chandrasekar B, Tanguay JF. Platelets and restenosis. J Am Coll Cardiol. 2000;35(3):555-62.

54. Chang Y, Ceacareanu B, Zhuang D, Zhang C, Pu Q, Ceacareanu AC, et al. Counter-regulatory function of protein tyrosine phosphatase 1B in platelet-derived growth factor- or fibroblast growth factor-induced motility and proliferation of cultured smooth muscle cells and in neointima formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(3):501-7.

55. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. Circ Res. 1995;77(3):445-65.

56. Uchida K, Sasahara M, Morigami N, Hazama F, Kinoshita M. Expression of platelet-derived growth factor B-chain in neointimal smooth muscle cells of balloon injured rabbit femoral arteries. Atherosclerosis. 1996;124(1):9-23.

57. Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. J Clin Invest. 1992;89(2):507-11.

58. Igura T, Kawata S, Miyagawa J, Inui Y, Tamura S, Fukuda K, et al. Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in neointimal cells

induced by balloon injury in rat carotid arteries. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996;16(12):1524-31.

59. Lindner V. Role of basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor (B-chain) in neointima formation after arterial injury. Z Kardiol. 1995;84 Suppl 4:137-44.

60. Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. Biochim Biophys Acta. 1998;1378(1):F79-113.

61. Kundra V, Escobedo JA, Kazlauskas A, Kim HK, Rhee SG, Williams LT, et al. Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta. Nature. 1994;367(6462):474-6.

62. Lanahan AA, Lech D, Dubrac A, Zhang J, Zhuang ZW, Eichmann A, et al. PTP1b is a physiologic regulator of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. Circulation. 2014;130(11):902-9.

63. Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(9):3739-43.

64. Cercek B, Fishbein MC, Forrester JS, Helfant RH, Fagin JA. Induction of insulin-like growth factor I messenger RNA in rat aorta after balloon denudation. Circ Res. 1990;66(6):1755-60.

65. Clemmons DR, Van Wyk JJ. Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedinlike peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells. J Clin Invest. 1985;75(6):1914-8.

66. Majesky MW, Lindner V, Twardzik DR, Schwartz SM, Reidy MA. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. J Clin Invest. 1991;88(3):904-10.

67. Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, Yang ZY, San H, Shu HB, et al. Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(22):10759-63.

68. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. J Clin Invest. 1994;93(3):1172-8.

69. Schütz E, Bochenek ML, Riehl DR, Bosmann M, Münzel T, Konstantinides S, et al. Absence of transforming growth factor beta 1 in murine platelets reduces neointima formation without affecting arterial thrombosis. Thromb Haemost. 2017;117(9):1782-97.

70. Kanzaki T, Tamura K, Takahashi K, Saito Y, Akikusa B, Oohashi H, et al. In vivo effect of TGF- beta 1. Enhanced intimal thickening by administration of TGF- beta

1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995;15(11):1951-7.

71. Lu Q, Patel B, Harrington EO, Rounds S. Transforming growth factor-beta1 causes pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis via ALK5. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;296(5):L825-38.

72. Myoken Y, Kan M, Sato GH, McKeehan WL, Sato JD. Bifunctional effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta) on endothelial cell growth correlate with phenotypes of TGF-beta binding sites. Exp Cell Res. 1990;191(2):299-304.

73. Roberts AB, Sporn MB. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. Am Rev Respir Dis. 1989;140(4):1126-8.

74. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). J Pathol. 2000;190(3):338-42.

75. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med. 1995;1(1):27-31.

76. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 1992;189(2):824-31.

77. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS, et al. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. Int J Hematol. 1995;62(4):203-15.

78. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. J Exp Med. 1990;172(6):1535-45.

79. Oka Y, Orth DN. Human plasma epidermal growth factor/beta-urogastrone is associated with blood platelets. J Clin Invest. 1983;72(1):249-59.

80. Berk BC, Brock TA, Webb RC, Taubman MB, Atkinson WJ, Gimbrone MA, Jr., et al. Epidermal growth factor, a vascular smooth muscle mitogen, induces rat aortic contraction. J Clin Invest. 1985;75(3):1083-6.

81. Gospodarowicz D, Hirabayashi K, Giguere L, Tauber JP. Factors controlling the proliferative rate, final cell density, and life span of bovine vascular smooth muscle cells in culture. J Cell Biol. 1981;89(3):568-78.

82. Atfi A, Lepage K, Allard P, Chapdelaine A, Chevalier S. Activation of a serine/threonine kinase signaling pathway by transforming growth factor type beta. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(26):12110-4.

83. Ortiz C, Caja L, Bertran E, Gonzalez-Rodriguez A, Valverde AM, Fabregat I, et al. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) deficiency confers resistance to

transforming growth factor-beta (TGF-beta)-induced suppressor effects in hepatocytes. J Biol Chem. 2012;287(19):15263-74.

84. Nemoto K, Miyata S, Nemoto F, Yasumoto T, Murai U, Kageyama H, et al. Gene expression of neurotrophins and their receptors in lead nitrate-induced rat liver hyperplasia. Biochem Biophys Res Commun. 2000;275(2):472-6.

85. Ozek C, Kanoski SE, Zhang ZY, Grill HJ, Bence KK. Protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) is a novel regulator of central brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin receptor kinase B (TrkB) signaling. J Biol Chem. 2014;289(46):31682-92.

86. Shibata T, Nakahara H, Kita N, Matsubara Y, Han C, Morimitsu Y, et al. A food-derived synergist of NGF signaling: identification of protein tyrosine phosphatase 1B as a key regulator of NGF receptor-initiated signal transduction. J Neurochem. 2008;107(5):1248-60.

87. Kraemer R, Nguyen H, March KL, Hempstead B. NGF activates similar intracellular signaling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different biological responses. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(4):1041-50.

88. Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. Am J Pathol. 1995;147(2):309-24.

89. Zhang ZY. Protein tyrosine phosphatases: Structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2002;42:209-34.

90. Brown-Shimer S, Johnson KA, Lawrence JB, Johnson C, Bruskin A, Green NR, et al. Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(13):5148-52.

91. Denu JM, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. Curr Opin Chem Biol. 1998;2(5):633-41.

92. Brautigan DL, Pinault FM. Serine phosphorylation of protein tyrosine phosphatase (PTP1B) in HeLa cells in response to analogues of cAMP or diacylglycerol plus okadaic acid. Mol Cell Biochem. 1993;127-128:121-9.

93. Charbonneau H, Tonks NK, Kumar S, Diltz CD, Harrylock M, Cool DE, et al. Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989;86(14):5252-6.

94. Bakke J, Haj FG. Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. Semin Cell Dev Biol. 2015;37:58-65.

95. Tonks NK, Neel BG. Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. Curr Opin Cell Biol. 2001;13(2):182-95.

96. Sun H, Tonks NK. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. Trends Biochem Sci. 1994;19(11):480-5.

97. Frangioni JV, Beahm PH, Shifrin V, Jost CA, Neel BG. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. Cell. 1992;68(3):545-60.

98. Haj FG, Verveer PJ, Squire A, Neel BG, Bastiaens PI. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. Science. 2002;295(5560):1708-11.

99. Frangioni JV, Oda A, Smith M, Salzman EW, Neel BG. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. EMBO J. 1993;12(12):4843-56.

100. Anderie I, Schulz I, Schmid A. Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets. Cell Signal. 2007;19(3):582-92.

101. Pathre P, Arregui C, Wampler T, Kue I, Leung TC, Lilien J, et al. PTP1B regulates neurite extension mediated by cell-cell and cell-matrix adhesion molecules. J Neurosci Res. 2001;63(2):143-50.

102. De Meyer GR, Bult H. Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models. Vasc Med. 1997;2(3):179-89.

103. van Montfort RL, Congreve M, Tisi D, Carr R, Jhoti H. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. Nature. 2003;423(6941):773-7.

104. Krishnan N, Fu C, Pappin DJ, Tonks NK. H2S-Induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. Sci Signal. 2011;4(203):ra86.

105. Chen YY, Huang YF, Khoo KH, Meng TC. Mass spectrometry-based analyses for identifying and characterizing S-nitrosylation of protein tyrosine phosphatases. Methods. 2007;42(3):243-9.

106. Dadke S, Cotteret S, Yip SC, Jaffer ZM, Haj F, Ivanov A, et al. Regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by sumoylation. Nat Cell Biol. 2007;9(1):80-5.

107. Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. Sci STKE. 2000;2000(53):pe1.

108. Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, Goldstein BJ. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. J Biol Chem. 2001;276(24):21938-42.

109. Heppner DE, van der Vliet A. Redox-dependent regulation of epidermal growth factor receptor signaling. Redox Biol. 2016;8:24-7.

110. Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. J Biol Chem. 1998;273(25):15366-72.

111. Bandyopadhyay D, Kusari A, Kenner KA, Liu F, Chernoff J, Gustafson TA, et al. Protein-tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosine-phosphorylated in the presence of insulin. J Biol Chem. 1997;272(3):1639-45.

112. Tao J, Malbon CC, Wang HY. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo. J Biol Chem. 2001;276(31):29520-5.

113. Chen YY, Chu HM, Pan KT, Teng CH, Wang DL, Wang AH, et al. Cysteine S-nitrosylation protects protein-tyrosine phosphatase 1B against oxidation-induced permanent inactivation. J Biol Chem. 2008;283(50):35265-72.

114. Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3(6):411-21.

115. Zhuang D, Pu Q, Ceacareanu B, Chang Y, Dixit M, Hassid A. Chronic insulin treatment amplifies PDGF-induced motility in differentiated aortic smooth muscle cells by suppressing the expression and function of PTP1B. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2008;295(1):H163-73.

116. Watson KE, Peters Harmel AL, Matson G. Atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus: the role of insulin resistance. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2003;8(4):253-60.

117. Wang Y, Yan F, Ye Q, Wu X, Jiang F. PTP1B inhibitor promotes endothelial cell motility by activating the DOCK180/Rac1 pathway. Sci Rep. 2016;6:24111.

118. Pu Q, Chang Y, Zhang C, Cai Y, Hassid A. Chronic insulin treatment suppresses PTP1B function, induces increased PDGF signaling, and amplifies neointima formation in the balloon-injured rat artery. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009;296(1):H132-9.

119. Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. Dev Cell. 2002;2(4):489-95.

120. Golomb G, Fishbein I, Banai S, Mishaly D, Moscovitz D, Gertz SD, et al. Controlled delivery of a tyrphostin inhibits intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model. Atherosclerosis. 1996;125(2):171-82.

121. ten Freyhaus H, Dagnell M, Leuchs M, Vantler M, Berghausen EM, Caglayan E, et al. Hypoxia enhances platelet-derived growth factor signaling in the pulmonary vasculature by down-regulation of protein tyrosine phosphatases. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183(8):1092-102.

122. Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. Annu Rev Neurosci. 1996;19:289-317.

123. Kwapiszewska G, Chwalek K, Marsh LM, Wygrecka M, Wilhelm J, Best J, et al. BDNF/TrkB signaling augments smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. Am J Pathol. 2012;181(6):2018-29.

124. Lindner V, Fingerle J, Reidy MA. Mouse model of arterial injury. Circ Res. 1993;73(5):792-6.

125. Jackson CL. Animal models of restenosis. Trends Cardiovasc Med. 1994;4(3):122-30.

126. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. Lab Invest. 1983;49(2):208-15.

127. Schwartz RS, Murphy JG, Edwards WD, Camrud AR, Vliestra RE, Holmes DR. Restenosis after balloon angioplasty. A practical proliferative model in porcine coronary arteries. Circulation. 1990;82(6):2190-200.

128. Hirosumi J, Nomoto A, Ohkubo Y, Sekiguchi C, Mutoh S, Yamaguchi I, et al. Inflammatory responses in cuff-induced atherosclerosis in rabbits. Atherosclerosis. 1987;64(2-3):243-54.

129. Eckly A, Hechler B, Freund M, Zerr M, Cazenave JP, Lanza F, et al. Mechanisms underlying FeCl3-induced arterial thrombosis. J Thromb Haemost. 2011;9(4):779-89.

130. Czepluch FS, Meier J, Binder C, Hasenfuss G, Schäfer K. CCL5 deficiency reduces neointima formation following arterial injury and thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. Thromb Res. 2016;144:136-43.

131. Schäfer K, Konstantinides S, Riedel C, Thinnes T, Muller K, Dellas C, et al. Different mechanisms of increased luminal stenosis after arterial injury in mice deficient for urokinase- or tissue-type plasminogen activator. Circulation. 2002;106(14):1847-52.

132. Schäfer K, Halle M, Goeschen C, Dellas C, Pynn M, Loskutoff DJ, et al. Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24(1):112-7.

133. Jeremy JY, Thomas AC. Animal models for studying neointima formation. Curr Vasc Pharmacol. 2010;8(2):198-219.

134. Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. Thromb Res. 1990;60(4):269-80.

135. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. Science. 1999;283(5407):1544-8.

136. Gogiraju R, Schroeter MR, Bochenek ML, Hubert A, Münzel T, Hasenfuss G, et al. Endothelial deletion of protein tyrosine phosphatase-1B protects against pressure overload-induced heart failure in mice. Cardiovasc Res. 2016;111(3):204-16.

137. Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, et al. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. Nat Med. 2008;14(1):64-8.

138. Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. Methods. 2001;24(1):71-80.

139. Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, et al. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. Nature Medicine. 2006;12(8):917-24.

140. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987;162(1):156-9.

141. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc. 2006;1(2):581-5.

142. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.

143. Vercauteren M, Remy E, Devaux C, Dautreaux B, Henry JP, Bauer F, et al. Improvement of peripheral endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibitors in heart failure. Circulation. 2006;114(23):2498-507.

144. Wang Y, Yan F, Zhang W, Pang S, Jiang F. Inhibiting Protein Tyrosine Phosphatase 1B to Improve Regenerative Functions of Endothelial Cells. J Cardiovasc Pharmacol. 2018;71(2):59-64.

145. Herre DJ, Norman JB, Anderson R, Tremblay ML, Huby AC, Belin de Chantemele EJ. Deletion of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Enhances Endothelial Cyclooxygenase 2 Expression and Protects Mice from Type 1 Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction. PLoS One. 2015;10(5):e0126866.

146. Dube N, Cheng A, Tremblay ML. The role of protein tyrosine phosphatase 1B in Ras signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(7):1834-9.

147. Nakamura Y, Patrushev N, Inomata H, Mehta D, Urao N, Kim HW, et al. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. Circ Res. 2008;102(10):1182-91.

148. Schäfer K, Schroeter MR, Dellas C, Puls M, Nitsche M, Weiss E, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 from bone marrow-derived cells suppresses neointimal formation after vascular injury in mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(6):1254-9.

149. Majesky MW, Horita H, Ostriker A, Lu S, Regan JN, Bagchi A, et al. Differentiated Smooth Muscle Cells Generate a Subpopulation of Resident Vascular Progenitor Cells in the Adventitia Regulated by Klf4. Circ Res. 2017;120(2):296-311.

150. Tigges U, Komatsu M, Stallcup WB. Adventitial pericyte progenitor/mesenchymal stem cells participate in the restenotic response to arterial injury. J Vasc Res. 2013;50(2):134-44.

151. Ozerdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. Dev Dyn. 2001;222(2):218-27.

152. Grako KA, Stallcup WB. Participation of the NG2 proteoglycan in rat aortic smooth muscle cell responses to platelet-derived growth factor. Exp Cell Res. 1995;221(1):231-40.

153. Nishiyama A, Lin XH, Giese N, Heldin CH, Stallcup WB. Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain. J Neurosci Res. 1996;43(3):299-314.

154. Fukushi J, Inatani M, Yamaguchi Y, Stallcup WB. Expression of NG2 proteoglycan during endochondral and intramembranous ossification. Dev Dyn. 2003;228(1):143-8.

155. Stallcup WB, Huang FJ. A role for the NG2 proteoglycan in glioma progression. Cell Adh Migr. 2008;2(3):192-201.

156. Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. Cardiovasc Res. 2012;95(2):156-64.

157. Yoshida T, Hayashi M. Role of Krüppel-like factor 4 and its binding proteins in vascular disease. J Atheroscler Thromb. 2014;21(5):402-13.

158. Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. Circ Res. 2005;96(3):280-91.

159. Yoshida T, Gan Q, Shang Y, Owens GK. Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL

factors and histone deacetylases to their promoters. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292(2):C886-95.

160. Campagnolo P, Tsai TN, Hong X, Kirton JP, So PW, Margariti A, et al. c-Kit+ progenitors generate vascular cells for tissue-engineered grafts through modulation of the Wnt/Klf4 pathway. Biomaterials. 2015;60:53-61.

161. Yeh YT, Wei J, Thorossian S, Nguyen K, Hoffman C, Del Alamo JC, et al. MiR-145 mediates cell morphology-regulated mesenchymal stem cell differentiation to smooth muscle cells. Biomaterials. 2019;204:59-69.

162. Lin CM, Wang BW, Pan CM, Fang WJ, Chua SK, Hou SW, et al. Effects of flavonoids on MicroRNA 145 regulation through Klf4 and myocardin in neointimal formation in vitro and in vivo. J Nutr Biochem. 2018;52:27-35.

163. Ghaleb AM, Yang VW. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. Gene. 2017;611:27-37.

164. Xie L, Lee SY, Andersen JN, Waters S, Shen K, Guo XL, et al. Cellular effects of small molecule PTP1B inhibitors on insulin signaling. Biochemistry. 2003;42(44):12792-804.

165. Dhaliwal NK, Miri K, Davidson S, Tamim El Jarkass H, Mitchell JA. KLF4 Nuclear Export Requires ERK Activation and Initiates Exit from Naive Pluripotency. Stem Cell Reports. 2018;10(4):1308-23.

166. Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadottir A, et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. Nat Genet. 2009;41(1):18-24.

167. Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, et al. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. Nat Neurosci. 2004;7(11):1187-9.

168. Gray J, Yeo GS, Cox JJ, Morton J, Adlam AL, Keogh JM, et al. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. Diabetes. 2006;55(12):3366-71.

169. Tsao D, Thomsen HK, Chou J, Stratton J, Hagen M, Loo C, et al. TrkB agonists ameliorate obesity and associated metabolic conditions in mice. Endocrinology. 2008;149(3):1038-48.

170. Wang H, Zhou XF. Injection of brain-derived neurotrophic factor in the rostral ventrolateral medulla increases arterial blood pressure in anaesthetized rats. Neuroscience. 2002;112(4):967-75.

171. Xu L, Zhang Y, Cohen SB, DiPetrillo K. TrkB agonist antibody dose-dependently raises blood pressure in mice with diet-induced obesity. Am J Hypertens. 2010;23(7):732-6.

172. van Varik BJ, Rennenberg RJ, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. Front Genet. 2012;3:290.

173. Bakker EN, van Der Meulen ET, Spaan JA, VanBavel E. Organoid culture of cannulated rat resistance arteries: effect of serum factors on vasoactivity and remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000;278(4):H1233-40.

174. Bakker EN, van der Meulen ET, van den Berg BM, Everts V, Spaan JA, VanBavel E. Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries. J Vasc Res. 2002;39(1):12-20.

175. Bakker EN, Buus CL, VanBavel E, Mulvany MJ. Activation of resistance arteries with endothelin-1: from vasoconstriction to functional adaptation and remodeling. J Vasc Res. 2004;41(2):174-82.

176. de Boer RA, De Keulenaer G, Bauersachs J, Brutsaert D, Cleland JG, Diez J, et al. Towards better definition, quantification and treatment of fibrosis in heart failure. A scientific roadmap by the Committee of Translational Research of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology. Eur J Heart Fail. 2019;21(3):272-85.

177. Kramann R, Schneider RK, DiRocco DP, Machado F, Fleig S, Bondzie PA, et al. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. Cell Stem Cell. 2015;16(1):51-66.

178. Nosalski R, Siedlinski M, Denby L, McGinnigle E, Nowak M, Cat AND, et al. T-Cell-Derived miRNA-214 Mediates Perivascular Fibrosis in Hypertension. Circ Res. 2020;126(8):988-1003.

179. Leask A. Getting to the heart of the matter: new insights into cardiac fibrosis. Circ Res. 2015;116(7):1269-76.

180. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. J Mol Cell Cardiol. 2011;51(4):600-6.

181. Chen J, Chen JK, Nagai K, Plieth D, Tan M, Lee TC, et al. EGFR signaling promotes TGFbeta-dependent renal fibrosis. J Am Soc Nephrol. 2012;23(2):215-24.

182. Tzouvelekis A, Ntolios P, Karameris A, Vilaras G, Boglou P, Koulelidis A, et al. Increased expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in patients with different forms of lung fibrosis. Biomed Res Int. 2013;2013:654354.

183. Richter K, Kietzmann T. Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. Cell Tissue Res. 2016;365(3):591-605.

184. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. Cell Mol Life Sci. 2014;71(4):549-74.

185. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. Nat Med. 1995;1(11):1155-61.

9 Anhang

9.1 Herstellung von Lösungen und Puffern

Maus-OP		
10%ige Eisenchlorid-Lösung (am OP-Tag frisch angesetzt)	Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat ddH_2O	1 g 10 ml

Gelelektrophorese		
TAE Puffer (1X)	TAE Puffer (50X) ddH_2O	40 ml 2000 ml

Gewebeeinbettung		
Zinkformalin-Gebrauchslösung	Zinkformalin Konzentrat ddH_2O	200 ml 800 ml
4%ige Paraformaldehyd (PFA)-Lösung	Paraformaldehyd PBS (1X)	4 g 100 ml
15%ige Saccharose-Lösung	D(+)-Saccharose PBS (1X)	15 g 100 ml
30%ige Saccharose-Lösung	D(+)-Saccharose PBS (1X)	30 g 100 ml

RNA-Isolation		
75%iger Ethanol	Ethanol absolut, für die Molekularbiologie	30 ml
	Wasser, nuklease-freies, DEPC-behandelt, steril und autoklaviert	10 ml

VES-MTC		
1 % Essigsäure	100 % Essigsäure Roth; 3738.8)	1 ml
	ddH_2O	99 ml
10 % Alkohol-Hämatoxylin-Lösung	Hämatoxylin (Roth; 3816.2)	10 g
	100 % Ethanol	100 ml
10 % Eisenchlorid-Lösung	Eisenchlorid (Sigma; 236489-500G)	10 g
	ddH_2O	100 ml
2 % Eisenchlorid-Differenzierungslösung	10 % Eisenchlorid-Lösung	20 ml
	ddH_2O	80 ml
5 % Natriumthiosulfat-Lösung	Natriumthiosulfat (Roth; PO34.2)	5 g
	ddH_2O	100 ml
Acid-Fuchsin 1 % wässrige Lösung	Acid Fuchsin (Sigma; F-8129; C20H17N3O9S3Na2)	1 g
	ddH_2O	100 ml
Anilinblau-Lösung 2,0 %	Anilinblau (Roth; 4002.1)	2,5 g
	ddH_2O	100 ml
	100 % Essigsäure (Roth; 3738.8)	2 ml
Biebrich-Scarlet 1 % wässrige Lösung	Ponceau Biebrich Scarlet (Sigma; B-6008; C22H14N4O7S2Na2)	1 g
	ddH_2O	100 ml
Biebrich-Scarlet-Acid-Fuchsin	Biebrich Scarlet 1 %	90 ml
	Acid-Fuchsin 1 %	10 ml
	100 % Essigsäure (Roth; 3738.8)	1 ml
Bouins Fixative	Pikrinsäure, gesättigt (Sigma; P6744-1GA)	750 ml
	37 % Formaldehyd (Roth; 4979.1)	25 ml
	100 % Essigsäure (Roth; 3738.8)	50 ml
Phosphomolybdän-Phosphotungsten-Lösung	Phosphomolybdänsäure (Roth; 4440.3-100G; $H_3Mo_{12}O_{40}P$)	1,25 g
	Phosphotungstensäure (Sigma-Aldrich; P6395-100G; $2Na_2OP_2O_{512}WO_{318}H_2O$	1,25 g
	ddH_2O	100 ml

Verhoeffs Elastica-Färbelösung	10 % Alkohol-Hämatoxylin-Lösung 100 % Ethanol 10 % Eisenchlorid-Lösung Verhoeffs Jod-Lösung	20 ml 20 ml 20 ml 20 ml
Verhoeffs Jod-Lösung	Jod (Roth; X864.1) Kaliumjodid (Roth: 6750.1) ddH_2O	2 g 4 g 100 ml

Picrosiriusrot-Färbung		
1 % Picrosiriusrot-Lösung	Siriusrou (Direct Red 80; Sigma; 365548-5G) Pikrinsäure, gesättigt (Sigma; P6744-1GA)	1 g 100 ml
30 % Essigsäure	100 % Essigsäure (Roth; 3738.8) ddH_2O	120 ml 280 ml

Immunhistochemie		
0,01 M Citratpuffer, pH 6,0	0,1 M Citratpuffer pH 6,0; 10X Stock ddH_2O	100 ml 900 ml
0,01 M Tris / 0,001 M EDTA pH 9,0 (gebrauchsfertig)	0,1 M Tris / 0,01 M EDTA pH 9,0 10X Stock ddH_2O	100 ml 900 ml
0,05 % TritonX-100	Triton-X-100 (Roth; 3051.3) 1X PBS	50 µl 100 ml
0,1 M Citratpuffer pH 6,0; 10X Stock	Citronensäuremonohydrat (Sigma; C1909) ddH_2O pH auf 6,0 eingestellt	21,01 g 100 ml
0,1 M Tris / 0,01 M EDTA pH 9,0 10x Stock	Tris (Roth; 0188.3) EDTA (Applichem; A3553) ddH_2O pH 9,0 einstellen	12,1 g 3,72 g 1000 ml
10 % Normal Goat Serum	Normal Goat Serum 1x PBS	500 µl 4500 µl
1x PBS	10x PBS (Gibco; #70011-051) ddH_2O	100 ml 900 ml
3 % H_2O_2 in Methanol	30 % H_2O_2 100 % Methanol	50 ml 450 ml

5 % Normal Goat Serum	10 % Normal Goat Serum ddH_2O	1 ml 1 ml
ABC-Link	1x PBS Lösung A (VectaStain ABC-kit Elite, PK-6100) Lösung B	5 ml 2 Tropfen 2 Tropfen
AEC-Chromogen	5 ml ddH_2O Puffer Lösung AEC-Lösung H_2O_2	5 ml 2 Tropfen 3 Tropfen 2 Tropfen
DAB-Chromogen	ddH_2O Puffer Lösung DAB Stock-Lösung	5 ml 2 Tropfen 4 Tropfen

Immunfloureszenz		
DAPI Stock solution 5 mg/ml	DAPI (Roth; 6335.1) ddH_2O	5 µg 1 ml
DAPI *Working solution* 0,2 µg/ml	DAPI Stock solution 1x PBS	0,5 µl 2,5 ml
0,2%iger Triton-X100-Puffer	PBS pH 7.4 (1X) Triton-X100	1 ml 500 ml
10%iger Triton-X100-Puffer (Stammlösung)	PBS pH 7.4 (1X) Triton-X100	90 ml 10 ml
Blockierungs-Puffer I (1%iges BSA mit 0.1%igem Triton-X100 in PBS (1X))	Albumin, Fraktion V, pH 5.2, für die Proteinanalyse 10%iger Triton-X100-Puffer PBS pH 7.4 (1X)	1 g 1 ml 100 ml
Blockierungs-Puffer II (5%iges *Normal Goat Serum* mit 0,3%igem Triton-X100 in PBS (1X))	PBS pH 7.4 (1X) Normal Goat Serum 10%iger Triton-X100-Puffer	4600 µl 250 µl 150 µl

9.2 Immunhistochemische Färbeprotokolle

Tabelle 9-1: Färbeprotokoll zum Nachweis von BDNF

Positivkontrolle	Gehirn
Primärantikörper	Rabbit anti-mouse BDNF
Firma, Bestell-Nr.	Abcam, ab108319
Verdünnung in Medium	1:250 in 1X PBS
HIER	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)
Permeabilisierung	nein
Blockierung Sekundär-AK	10 % NGS in 1X PBS
Sekundärantikörper	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG
Verdünnung in Medium	1:1.000 in 1X PBS
Chromogen	AEC-Kit für 7 min

Tabelle 9-2: Färbeprotokoll zum Nachweis von F4/80

Positivkontrolle	Leber, Milz
Primärantikörper	rat anti-mouse F4/80
Firma, Bestell-Nr.	Bio-Rad, MCA497GA
Verdünnung in Medium	1:200 in 1X PBS
HIER	10 mM Tris / mM EDTA (pH 9,0)
Permeabilisierung	nein
Blockierung Sekundär-AK	5 % NGS in 1x 1X PBS
Sekundärantikörper	Biotin-xx goat-anti-rat IgG
Verdünnung in Medium	1:1.000 in 1X PBS
Chromogen	DAB-Kit für 7 min

Tabelle 9-3: Färbeprotokoll zum Nachweis von NG2

Positivkontrolle	**Multiblock 1**
Primärantikörper	rabbit anti-mouse NG2
Firma, Bestell-Nr.	Abcam, ab129051
Verdünnung in Medium	1:200 in AB-Diluent
HIER	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)
Permeabilisierung	nein
Blockierung Sekundär-AK	1 % BSA in 1X PBS
Sekundärantikörper	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG
Verdünnung in Medium	1:1.000 in 1X PBS
Chromogen	AEC-Kit für 10 min

Tabelle 9-4: Färbeprotokoll zum Nachweis von PCNA

Positivkontrolle	**Lymphknoten, Colon**
Primärantikörper	mouse anti-mouse PCNA (PC10)
Firma, Bestell-Nr.	Abcam, ab92552
Verdünnung in Medium	1:500 in 1X PBS
HIER	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)
Permeabilisierung	0,05 % Triton-X100 für 15 min bei 37°C
Blockierung Sekundär-AK	10 % NGS in 1X PBS
Sekundärantikörper	Biotin-xx goat-anti-mouse IgG
Verdünnung in Medium	1:1.000 in 1X PBS
Chromogen	DAB-Kit für 2 min 15 s

Tabelle 9-5: Färbeprotokoll zum Nachweis von PDFGR-β

Positivkontrolle	**Prostata-Karzinom, Lunge**
Primärantikörper	rabbit anti-mouse PDGFR-β
Firma, Bestell-Nr.	Abcam, ab32570
Verdünnung in Medium	1:100 in 1X PBS
HIER	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)
Permeabilisierung	nein
Blockierung Sekundär-AK	10 % NGS in 1X PBS
Sekundärantikörper	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG
Verdünnung in Medium	1:1.000 in 1X PBS
Chromogen	DAB-Kit für 10 min

Tabelle 9-6: Färbeprotokoll zum Nachweis von PECAM-1 (CD31)

Positivkontrolle	**Haut, Niere, Tonsille, Leber**
Primärantikörper	rat anti-mouse Pecam-1 (CD31)
Firma, Bestell-Nr.	Santa Cruz Biotechnology, sc18916
Verdünnung in Medium	1:20 in AB-Diluent
HIER	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)
Permeabilisierung	0.05 % Triton-X100 für 10 min bei 37°C
Blockierung Sekundär-AK	5 % NGS in 1X PBS
Sekundärantikörper	Biotin-xx goat-anti-rat IgG
Verdünnung in Medium	1:1.000 in 1X PBS
Chromogen	AEC-Kit für 20 min

Tabelle 9-7: Färbeprotokoll zum Nachweis von PTP1B

Positivkontrolle	**Niere, Glutgefäße**
Primärantikörper	rabbit anti-mouse PTP1B
Firma, Bestell-Nr.	Abcam, ab189179
Verdünnung in Medium	1:100 in 1X PBS
HIER	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)
Permeabilisierung	nein
Blockierung Sekundär-AK	10 % NGS in 1X PBS
Sekundärantikörper	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG
Verdünnung in Medium	1:1.000 in 1X PBS
Chromogen	AEC-Kit für 10 min

Tabelle 9-8: Färbeprotokoll zum Nachweis von SM Alpha-Actin

Positivkontrolle	**Kolon, Milz**
Primärantikörper	mouse anti-mouse SM α-Actin
Firma, Bestell-Nr.	Sigma, A2547
Verdünnung in Medium	1:500 in 1X PBS
HIER	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)
Permeabilisierung	nein
Blockierung Sekundär-AK	10 % NGS in 1X PBS
Sekundärantikörper	Biotin-xx goat-anti-mouse IgG
Verdünnung in Medium	1:1.000 in 1X PBS
Chromogen	AEC-Kit für 10 min

Tabelle 9-9: Färbeprotokoll zum Nachweis von TrkB

Positivkontrolle	**Haut (human), Gehirn (murin)**
Primärantikörper	rabbit anti-mouse TrkB
Firma, Bestell-Nr.	Santa Cruz Biotechnology, sc8316
Verdünnung in Medium	1:200 in 1X PBS
HIER	0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0)
Permeabilisierung	0,05 % Triton-X100
Blockierung Sekundär-AK	5 % NGS in 1X PBS
Sekundärantikörper	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG
Verdünnung in Medium	1:1.000 in 1X PBS
Chromogen	DAB-Kit für 10 min

9.3 Einfluss des VSMC-spezifischen PTP1B-Knockouts auf das Gewicht der Versuchstiere

Übergewicht wird mit Hyperleptinämie und Leptinresistenz in Verbindung gebracht (185). Beim Vorliegen einer (prä-)diabetischen Stoffwechsellage zeigte sich eine Reduzierung der PTP1B-Expression (115). Im Tiermodell etablierte sich zudem ein systemischer PTP1B-Knockout als Schutz für Diabetes und Übergewicht trotz Verabreichung einer Hochfettdiät (8, 135).

Anders als ein systemischer Knockout von PTP1B hatte der für glatte Gefäßmuskelzellen spezifische PTP1B-Knockout keine Auswirkungen auf das Körpergewicht der Versuchstiere. Vor der Operation der Karotisarterien zeigten sich keine signifikanten Gewichtsunterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen (25,5 ± 0,63 g in SMC.PTP1B-WT vs. 24,8 ± 0,61 g in SMC.PTP1B-KO; P=0,45; **Abbildung 9-1 A**). Zum Zeitpunkt der Organentnahme 3 Wochen später war es in beiden Gruppen zu einer Gewichtszunahme gekommen, jedoch zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (26,0 ± 0,69 g in SMC.PTP1B-WT vs. 26,6 ± 0,50 g in SMC.PTP1B-KO; P=0,43; **Abbildung 9-1 B**).

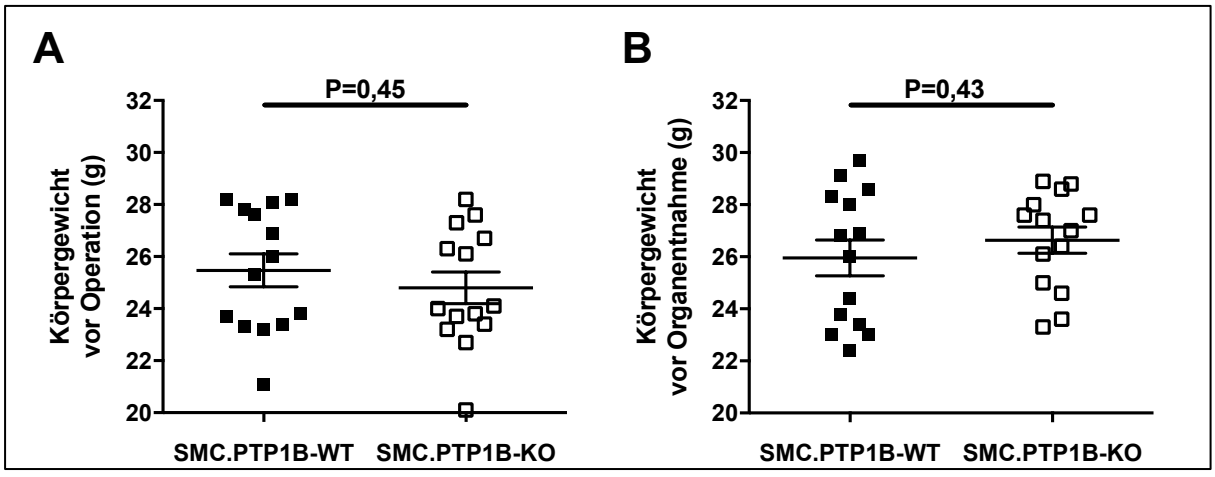

Abbildung 9-1: Körpergewicht der Versuchstiere(A) Körpergewicht der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Anwendung des $FeCl_3$-Modells (g). (B) Körpergewicht der Versuchstiere vor Entnahme der Karotisarterien 3 Wochen später (g). Darstellung von Mittelwert ± SEM.

Danksagung

Aus Datenschutzgründen wurde die Danksagung entfernt

Tabellarischer Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wurde der tabellarische Lebenslauf entfernt.