

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Fakultät für Chemie  
Institute for Advanced Study (IAS)

## **Differentielle Intergrinaktivierung im Restenose- und Endothelialisierungsprozess humaner Stents**

**Liang Li**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

### **Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Franz Hagn  
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Percy A. Knolle  
2. apl. Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich

Die Dissertation wurde am 17.01.2018 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 18.06.2018 angenommen.





*Zitat: To be fond of learning is akin to knowledge. To practice with vigor is akin to benevolence. To possess the feeling of shame is akin to courage.*

*Von Confucius*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Fakultät für Chemie am Institute for Advanced Study der Technischen Universität München in der Zeit von August 2010 bis April 2014 unter der Leitung von Prof. Dr. Horst Kessler angefertigt.

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Arbeitsgruppeneleiter Prof. Dr. med. Michael Joner bedanken. Ohne seine Themenstellung und Betreuung wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen. Ich werde unseren wissenschaftlichen Meinungsaustausch vermissen. Ich bin sehr dankbar, dass er mir den Weg in der Kardiologie geführt hat.

Für die großartige Unterstützung von Prof. Percy Knolle, Prof. Aphrodite Kapurniotu und Prof. Wolfgang Eisenreich an dem Abschluss meiner Doktorarbeit bedanke ich mich vielmals. Ohne ihren ermutigenden Rat würde ich nie mir diesen akademischen Titel gönnen können.

Ich bin Prof. Dr. Horst Kessler sehr dankbar. Sein breites Fachwissen und persönliches Charisma haben mir geholfen, Eigeninitiative zu ergreifen und meinen wissenschaftlichen Weg positiv beeinflusst. Ich möchte mich auch für den aktiven Austausch mit Dr. Rechenmacher Florian und Dr. Stephanie Neubauer in der Kooperationsgruppe bedanken. Die von der Gruppe synthetisierten Peptide waren für meine Arbeit eine große Hilfe.

Durch die Teilnahme im IGSSSE-Programm habe ich mich fachlich und persönlich weiterentwickeln können. Die administrative Arbeit von Frau Küster und Frau O'Meara ließ meine Promotion reibungslos und schön verlaufen.

Zwei Personen muss ich auf jeden Fall erwähnen: Dr. Carles Mas Moruno (ehemaliger Projektleiter) und Dr. Lin Zhang. Ich kann mich gut erinnern, wie ausführlich sich Carles am Anfang der Kooperation einbrachte und wie intensiv er sich auf dem Kickoff Meeting um den Projektfortschritt bemühte. Lin, ein chinesischer Kollege der Nachbargruppe im deutschen Herzzentrum München, gab mir rund um die Uhr „inoffiziell“ unermüdlich Vorschläge und war ein wertvoller Berater. Ihr habt mir gezeigt, wie man sich als „Young professional“ verhalten sollte.

Während der Promotion durfte ich die neue Technik der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München (Prof. Dr. Ute Reuning) lernen. Dank Frau Anke Bengel habe ich immer tiefere Erkenntnisse in der molekularen Diagnostik erworben.

Nicht zu vergessen ist, dass Michael Lorenz und Dr. Andreas Petry mich im gemeinsamen Forschungslabor im Deutschen Herzzentrum München bei der Etablierung vieler in vitro Versuche enorm unterstützt haben.

Die Zeit mit meinen Kollegen (Elizabeth Kennerknecht, Anna Titova, Medizinstudenten Kristina Euler und Benedikt Blumberg sowie Dr. Caroline Malle und Dr. Kristin Steigerwald)

verlief unbeschreiblich einzigartig. Der Wiesen-Auftritt, das Labmeeting bei dem „Hot Pot“ und Kuchenessen und das exotische Verweilen bei Uschi für den Kirsch-Abend machen meine PhD-Zeit unvergesslich.

Meinen besten Dank für die Korrektur dieser Arbeit richte ich an Diana Rädler, Helge Siemens, Stephanie Wolf und Sandra Westermann. Ihr habt in einer kuriosen langen Korrektur-Phase viel Zeit investiert.

Meine lieben Freunde: Marian Sanclemente Santiago, Cristiane Aoqui, Jing Dai und Juan Equis, Eure Motivation und stetige Aufmunterung gaben mir viel Kraft.

Es tut mir Leid für meinen Fußballverein, Irish Rover Munich. Aufgrund der unabsehbaren Laborarbeit konnte ich nicht immer am Training teilnehmen. Mit meiner Fußball-Kameraden (Carlos, Andy, Mike, Rory und Jason) habe ich viel Spaß einherging gehabt. Ich mochte es immer Gas zugeben, war immer mit viel Engagement dabei – auf und neben dem Platz.

Zum Schluss danke ich natürlich meiner Familie: meiner Mutter und meinen Onkels, weil ich Euch sehr liebe. Ich denke, dass meine zwei verstorbene Großmütter und mein Vater im Himmel sehen, dass ich ihre Wünsche und Erwartungen erfüllt habe. Ich denke an Euch für immer!

## Inhalt

Abkürzungen: .....	11
1. Hintergrund .....	14
1.1. Koronare Herzkrankheit (KHK) und Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie (PTCA) .....	14
1.2. Stents .....	15
1.2.1. Eigenschaft des Stents .....	15
1.2.2. In-Stent-Restenose .....	17
1.2.3. Reendothelialisierung .....	18
1.2.4. Stentthrombose .....	19
1.3. Integrine .....	20
1.3.1. Struktur von Integrinen .....	20
1.3.2. Untereinheiten der Integrine .....	22
1.3.3. Funktion des Integrins .....	23
1.3.4. Aktivierung der Integrine im Signaltransduktionsprozess .....	24
1.4. Kinasen in der integrin-vermittelten Signaltransduktion .....	25
1.4.1. Integrin Linked Kinase .....	25
1.4.2. Fokale Adhäsion Kinase .....	25
1.4.3. SRC Familie Kinase .....	26
1.5. RGD Antagonisten .....	27
1.5.1. RGD-Sequenz .....	27
1.5.2. Anwendung von Integrin Liganden .....	28
1.5.3. RGD-Peptide/Peptidomimetika .....	29
2. Zielsetzung .....	30
3. Material .....	31
3.1. Reagenzien und Chemikalien .....	31
3.2. Lösung, Puffer und Kits .....	32
3.3. Antikörper und Primer .....	33
3.4. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software .....	34
4. Methoden .....	35
4.1. Zellkultur primärer humaner koronarer Zellen .....	35
4.1.1. Kultivierung und Subkultivierung .....	35
4.1.2. Zählen der Zellen .....	36
4.2. Proliferations Assay .....	36

4.3. Migrations Assay .....	37
4.4. Adhäsions Assay .....	39
4.5. Stentbesiedlung mit CAECs .....	39
4.6. Fluorescence activated cell sorting .....	40
4.7. Replatings Assay .....	41
4.8. Proteinanalyse mittels Western Blot .....	41
4.8.1. Zell-Lyse .....	42
4.8.2. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	42
4.8.3. Natriumlaurylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese .....	42
4.8.4. Western Blot .....	42
4.8.5. Immunodetektion .....	43
4.8.6. Strippen der Proteinbanden .....	43
4.9. Immunfluoreszenz (IF) .....	44
4.10. Cre/LoxP-Rekombinationssystem .....	44
4.11. Genotypisierung von WT- und KO-Mäusen .....	47
4.11.1. Isolation von muriner DNA .....	47
4.11.2. Genotypisierung der Cre- und $\beta$ 1 Integrin DNA .....	47
4.12. Zellkultur für mASMCs .....	48
4.12.1. Isolation glatter Gefäßmuskelzellen aus der murinen Aorta .....	48
4.12.2. Immunfluoreszenz .....	48
4.12.3. $\beta$ -Gal Färbung <i>in vitro</i> .....	49
4.13. <i>Arteria femoralis</i> Verletzungen .....	49
4.14. Vergleich der Morphologie der <i>A. femoralis</i> zwischen Wildtyp und Knockout-Mäusen .....	51
4.14.1. Histologische Färbung .....	52
4.14.2. Analyse der Morphologie der <i>A. femoralis</i> .....	54
4.15. Statistische Auswertung .....	54
4.16. RGD-Peptide/Peptidomimetika .....	54
5. Ergebnisse .....	57
5.1. Studiendesign des humanen Projekts .....	57
5.2. Integrin Expressionsmuster auf stimulierten CAECs und CASMCs .....	57
5.3. Inhibition der Proliferationsrate beider Zelltypen .....	61
5.3.1. Proliferationsrate von CAECs und CASMCs bei unterschiedlichen Konzentrationen von Peptiden/Peptidomimetika .....	61
5.3.2. Einfluss von 10 $\mu$ M RGD-Peptide/Peptidomimetika auf die Proliferationsrate von CAECs und CASMCs .....	66
5.4. Inhibition der Zellmigration von CAECs und CASMCs durch RGD-Peptide/Peptidomimetika .....	67

5.5. Erhöhte Adhäsion von CAECs.....	70
5.6. Besiedlung von CAECs auf Stent .....	75
5.7. Veränderte Proteinen-Expression.....	76
5.7.1. ILK Regulation nach VEGF- und PDGF Stimulation .....	76
5.7.2. Nachweis der Expression von pFAK und pSRC im Replatings Assay.....	78
5.8. Nachweis von pFAK mittels Immunfluoreszenz .....	79
5.9. Studiendesign des murinen Projekts .....	82
5.10. Genotypisierung von Cre und $\beta 1$ Integrin.....	82
5.11. Zellkulturen der mASMCs .....	83
5.11.1. Identifizierung von Calponin und $\alpha$ -smooth muscle actin .....	83
5.11.2. Überprüfung des Knockouts von $\beta 1$ Integrin mittels X-Gal-Färbung.....	84
5.11.3. Veränderte phosphorylierte Focal Adhesion Kinase Färbung .....	85
5.12. Verminderte Proliferationsrate von Itg $\beta 1$ <sup>+/Pdgfrb-Cre</sup> .....	86
5.13. Verminderte Zellmigration von Itg $\beta 1$ <sup>+/Pdgfrb-Cre</sup> .....	87
5.14. Überprüfung des Knockouts von $\beta 1$ Integrin mittels X-Gal Färbung.....	88
5.15. Morphologischer Vergleich von <i>Arteria femoralis</i> Gefäßen zwischen Wildtyp und Knockout Mäuse .....	89
5.15.1. Lumen Fläche .....	89
5.15.2. Intima Fläche.....	91
5.15.3. Media-, interne elastische Lamina- und externe elastische Lamina Fläche.....	91
5.15.4. Prozentuale Stenose.....	93
6. Diskussion .....	95
6.1. Expression der Integrine nach der Stimulation mit VEGF und PDGF .....	95
6.2. RGD-Peptide/Peptidomimetika, ihre Auswirkung auf die Proliferationsrate, Zellmigration und Zelladhäsion .....	97
6.3. ILK Regulation und Phosphorylierung von FAK und SRC nach Bindung von Integrin Liganden.....	100
6.4. Ausblick im humanen Projekt der Integrinforschung .....	101
6.5. <i>In vitro</i> Versuche der $\beta 1$ Integrin Knockout Mauslinie im Cre-LoxP System .....	101
6.6. Arterielle Verletzungsmodelle und histomorphometrische Färbung der murinen Gefäße nach femoraler Verletzung .....	102
7. Zusammenfassung.....	104

**Abkürzungen:**

<b>Arteria</b>	A.
<b>ADMIDAS</b>	Adjacent to MIDAS
<b>Ahx</b>	Aminohexansäure
<b>BMS</b>	Bare Metal Stent
<b>Bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CABG</b>	Coronary Artery Bypass Graft <i>deutsch:</i> Koronararterien-Bypass
<b>CAECs</b>	Coronary Artery Endothelial Cells <i>deutsch:</i> koronare arterielle Endothelzellen
<b>CASMCs</b>	Coronary Artery Smooth Muscle Cells <i>deutsch:</i> Koronare arterielle glatte Muskelzellen
<b>Cre</b>	Cyclization Rekombinase
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidine
<b>DES</b>	Drug Eluting Stent <i>deutsch:</i> Medikamentenfreisetzender Stent
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid <i>deutsch:</i> Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EEL</b>	External Elastic Lamina <i>deutsch:</i> externe elastische Lamina
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor <i>deutsch:</i> epidermaler Wachstumsfaktor
<b>EGM</b>	Endothelial Cell Growth Medium
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>EGM</b>	Endothelial Cell Growth Medium
<b>ERK</b>	Extracellular Regulated Kinase
<b>EVG</b>	Elastica Van Gieson
<b>EZs</b>	Endothelzellen
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FA</b>	Fokale Adhäsionen
<b>FACS</b>	Fluorescence Activated Cell Sorting <i>deutsch:</i> Durchflusszytometrie
<b>FAK</b>	Fokal Adhäsion Kinase
<b>FCS</b>	Fetal Calf Serum <i>deutsch:</i> Fötale Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluorescein Isothiocyanate
<b>FN</b>	Fibronektin
<b>FSC</b>	Forward Scatter
<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde 3 Phosphate Dehydrogenase
<b>GMZs</b>	Glatte Muskelzellen
<b>Grb7</b>	Growth Factor Receptor-Bound protein 7
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>Hegas</b>	Hexaoxaeicosansäure

<b>HRP</b>	Horseradish Peroxidase
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1
<b>IEL</b>	Intern Elastische Lamina <i>deutsch:</i> Interne elastische Lamina
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>ILK</b>	Integrin Linked Kinase
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>KO</b>	Knockout
<b>LDH</b>	Lactatdehydrogenase
<b>mASMCs</b>	Murine Aorta Smooth Muscle Cells
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Proteinkinase
<b>MIDAS</b>	Metal Ion Dependent Adhesion Site
<b>mTOR</b>	Mammalian Target of Rapamycin
<b>NaI</b>	Naphthalin
<b>NTE</b>	NaCl-Tris-EDTA Puffer
<b>NO</b>	Nitritoxid
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline <i>deutsch:</i> Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction <i>deutsch:</i> Polymerase-Kettenreaktion
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor
<b>PECAM</b>	Platelet Endothelia Cell Adhesion Molecule
<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>PET</b>	Polyethylenterephthalat
<b>pFAK</b>	Phosphorylated Focal Adhesion Kinase
<b>PLL</b>	Poly-L-lysin
<b>Phe</b>	Phenylalanin
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate
<b>PTCA</b>	Percutaneous transluminal coronary angioplasty <i>deutsch:</i> Perkutane transluminale koronare Angioplastie
<b>RGD</b>	Arginin-Glycin-Aspartat (Arg-Gly-Asp)
<b>RPM</b>	Revolutions Per Minute
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>SH2</b>	SRC-Homology 2
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
<b>SmGM</b>	Smooth Muscle Growth Medium
<b>SRC</b>	Cellular Sarcoms
<b>SSC</b>	Side Scatter
<b>TBE</b>	TRIS-Borat-EDTA
<b>TBS</b>	Tris-Buffered Saline
<b>T-PA</b>	Tissue-type Plasminogen Activator
<b>UE</b>	Untereinheiten
<b>VCAM-1</b>	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WF</b>	Wachstumsfaktoren
<b>WT</b>	Wildtyp

**Liste der RGD-Peptide/Peptidomimetika**

<b>BL562</b>	$\alpha$ v $\beta$ 3 Peptid
<b>FR237</b>	$\alpha$ 5 $\beta$ 1 Peptidomimetikum
<b>SN503</b>	$\alpha$ v $\beta$ 3 Peptidomimetikum

Es wurden zwei Mauszelltypen von mASMCs untersucht.

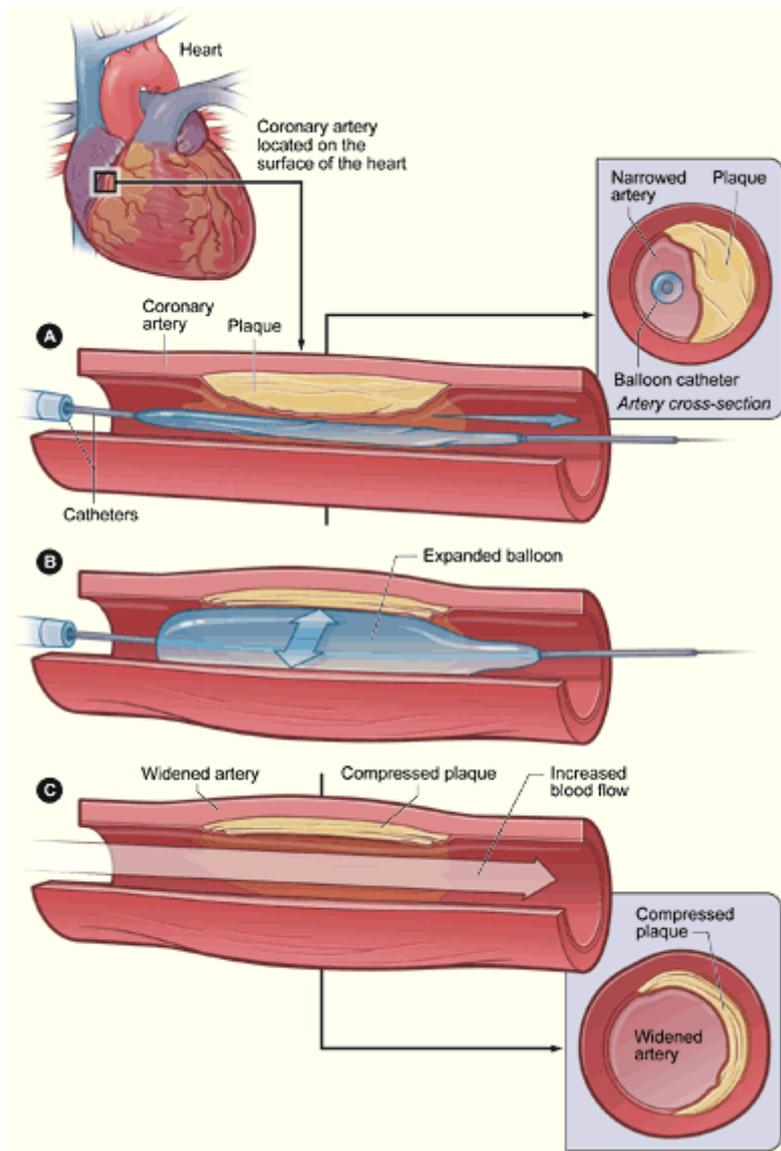
<b>Mauslinien</b>	<b>Mauszelltypen</b>
<b>WT</b>	<b>Wildtypzellen</b>
<b>KO (Heterozygote-Mutante)</b>	<b>Itg<math>\beta</math>1<sup>+/Pdgrfb-Cre</sup> mASMCs</b>

## **1. Hintergrund**

### **1.1. Koronare Herzkrankheit (KHK) und Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie (PTCA)**

Laut einem Bericht der „World Health Organisation“ aus dem Jahr 2008 starben weltweit 17,3 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, was 30% der globalen Todesfälle ausmachte. Allein 7,3 Millionen Menschen leiden dem Bericht zufolge unter der koronaren Herzkrankheit <sup>[1]</sup>. In 90% der koronaren Herzkrankheiten (KHK) wurden durch atherosklerotische Läsionen Verengungen der Koronararterien verursacht, die eine starke Ansammlung von Lipiden, umgeben von Proteoglykanmatrix und Kollagen aufweisen. Neben den genetischen Ursachen für Herzkrankheiten erhöht sich das Risiko eines Gefäßverschlusses durch Rauchen, Hypertonie und Diabetes mellitus.

Der Pionier René Favaloro führte als erste Person im Jahr 1968 den Koronararterien-Bypass (Coronary Artery Bypass Graft, CABG) durch <sup>[2]</sup>. Diese Operation ist allerdings aufgrund des invasiven chirurgischen Eingriffs durch viele Faktoren limitiert. Bei Gefäßverengung durch koronare arteriosklerotische Läsionen wird als Alternative immer häufiger die perkutane transluminale koronare Angioplastie („Percutaneous transluminal coronary angioplasty“, PTCA) verwendet, wobei über einen Führungsdraht ein Ballon an der Engstelle der Gefäße eingebracht und anschließend expandiert wird (Abb. 1). Gruentzig et al. führten in Zürich im Jahre 1977 die erste koronare Angioplastie zur instrumentellen Erweiterung arteriosklerotisch verengter Koronararterien mittels eines Ballonkatheters durch <sup>[3]</sup>. Die Dilatationszeit beträgt zwischen 20 und 60 Sekunden.



**Abbildung 1: Perkutane transluminale koronare Angioplastie.** An der Engstelle der Gefäße wird ein Ballon mithilfe eines Führungskatheters eingebracht und dilatiert. Häufig wird ein Stent zum Stützen des Gefäßlumens an der Stelle eingeführt. Quelle: National Heart, Lung and Blood Institute© (NHLBI).

## 1.2. Stents

### 1.2.1. Eigenschaft des Stents

Ein Stent, auch Gefäßstütze genannt, ist ein medizinisches Implantat. Der Stent wird häufig in die Engstelle eines Hohlorgans eingebracht, um Blutgefäße, Atemwege, Gallenwege und Speiseröhre nach der Aufdehnung offenzuhalten. Der Stent für das Blutgefäß ist ein röhrenförmiges, gitterartiges und dehnbares Metall- oder Kunststoffgeflecht, das in eine Arterie eingebracht wird. Normalerweise ist der Stent flexibel aufgrund seiner Federform. Das Primärziel der Stentimplantation ist es, den dilatierten Gefäßabschnitt offenzuhalten.

Der Durchmesser des Stents kann je nach den individuellen Gefäßen von zwei bis vier mm variieren. Abhängig vom Umfang des koronaren Aufbaus beträgt seine Länge zwischen acht und 38 mm. Das häufigste Material ist eine Cobalt/Chrom-Legierung, die dem Stent Härte, Festigkeit, eine gewisse Plastizität und Schutz gegen Korrosion verleiht <sup>[4]</sup>. Neben diesen Eigenschaften ist der Stent röntgendicht und thromboseresistent. Der Stent wird 10% bis 20% größer als der lumenale vaskuläre Durchmesser gewählt. Zum einen wirkt diese Wahl des Größenverhältnisses der Rückstellkraft („Recoil“) entgegen. Zum anderen schützt sie vor den Lageveränderungen des Stents.

In März 1986 implantierten Puel und Sigwart den ersten Stent im Menschen <sup>[5]</sup>. Die häufigste Anwendung finden Stents im Bereich der Herzkranzgefäße. Der Stent ist das einzige medizinische Instrument oder Implantat gegen die Verengung von Blutgefäßen, welches von der United States „Food und Drug Administration“ zugelassen ist.



**Abbildung 2: Promus Element (TM) Stent.** Quelle: kardionet.de ©

#### **1.2.1.1. Der Bare Metal Stent**

Die erste Generation der Stents ist der „Bare Metal Stent“ (BMS). Die Einführung des BMS senkt die Restenose, Wiederverengung eines Blutgefäßes, bei KHK gegenüber einer Angioplastie ohne Stentimplantation auf ca. 20-30%. Leider bleibt jedoch in mehr als 50% der PTCA-Fällen die In-Stent-Restenose, die Verengung des Gefäßes, das hartnäckigste Problem. Mithilfe des BMS ist häufig eine Revaskularisation (10-15%) nötig <sup>[6]</sup>.

Die Symptome einer Restenose treten beim BMS zwischen sechs und zwölf Monate nach der Stentimplantation auf. Die Restenose äußert sich einerseits als stabile Angina pectoris und andererseits als akutes Koronarsyndrom, welches 35,9% der Fälle ausmacht <sup>[7]</sup>.

#### **1.2.1.2. Der Drug Eluting Stent**

Die meisten Medikament-freisetzender Stents („Drug eluting stents“, DES) bestehen aus einer Stentplattform, einem Medikament und einer Trägersubstanz. „Sirolimus Eluting

Stent“ und „Paclitaxel Eluting Stent“ gehören zu der ersten Generation des DES. Die mit Sirolimus (auch Rapamycin genannt, Cypher®) und Paclitaxel (Taxol®) beschichteten DES kamen in der Vergangenheit aufgrund der deutlichen Hemmung einer Restenose immer häufiger zum Einsatz. Sirolimus, sowie seine Strukturanaloga Everolimus, Biolimus und Zotarolimus, sind Antagonisten der wichtigsten Proteinkinase „Mammalian Target of Rapamycin“ (mTOR) in der G1-Phase des Zellzyklus. mTOR hat eine übergeordnete Funktion in einer Vielzahl von Signalkaskaden und ist in meisten essentiellen biologischen Prozessen eingebunden, so auch Wachstum, Proliferation, Zellüberleben und Motilität. Paclitaxel wirkt dem Aufbau und der Stabilisierung der Mikrotubuli während der Mitose entgegen. Ebenso wie bei Sirolimus wird der Zellzyklus gestört und der Zelltod durch Apoptose eingeleitet <sup>[8]</sup>. Ihre Wirkung ist allerdings nicht zelltypspezifisch, sodass die Endothelialisierung des Stents durch Endothelzellen (EZs) ebenfalls inhibiert wird, denn nach dem Einbringen des Stents in das Gefäß soll dieser durch EZs überwachsen werden <sup>[9]</sup>. Außerdem ist die ungleichmäßige Verteilung der Medikamente in der Gefäßwand nicht zu vermeiden. Beim freiliegenden Stentstreifen ohne Endothelbedeckung besteht die Gefahr der Anheftung und Aggregation von Thrombozyten. Die Folge davon ist die Notwendigkeit einer andauernden Antiplättchen-Therapie <sup>[10]</sup>. Darüber hinaus induzieren Sirolimus und Paclitaxel die Expression von Gewebefaktoren, die eine Aktivierung der Gerinnungskaskade fördern <sup>[11]</sup>. Als ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung der Biokompatibilität eines Stents muss die Induktion einer Inflammation bei der Stentimplantation berücksichtigt werden. Häufig entsteht aufgrund des DES, der lokalen hohen Dosis von Medikamenten wie zum Beispiel Sirolimus und des Polymers, eine Inflammation <sup>[12]</sup>. Das Polymer spielt bei der Induktion der Entzündungsreaktion auch eine größte Rolle. Bei der entstehenden Inflammation bzw. in seltenen Fall bei der provozierten Hypersensibilitätsreaktion durch den Stent, kommt es zu einer Zellinfiltration von Lymphozyten, Makrophagen, Riesenzellen, Neutrophilen und Eosinophilen. Die Leukozyten werden insbesondere durch angehäuften, aggregierte Blutplättchen und Fibrin-Ablagerungen an der de-endothelialisierten Gefäßwand rekrutiert. Die zweite Generation von DES, „Everolimus Eluting Stent“ und „Zotarolimus Eluting Stent“, hat immer die Vormachtstellung im Aspekt von weniger Inflammation mit biokompatibler Polymer und schneller Reendothelialisierung.

### **1.2.2. In-Stent-Restenose**

Als In-Stent-Restenose bezeichnet man die Wiederverengung der behandelten Gefäße nach einer PTCA, sobald der Lumenverlust mehr als 50% des nach der Ballon-Dilatation erreichten Durchmessers der Gefäße beträgt <sup>[13]</sup>. Die In-Stent-Restenose ist durch Entzündungen, Neusynthese extrazellulärer Matrix (EZM) sowie Proliferation und Migration glatter Muskelzellen (GMZs) charakterisiert. Die Folge des Fortschreitens der In-Stent-Stenose ist ein begrenzter Blutstrom und Sauerstoffmangel. Im schlimmsten Fall kann ein lebensbedrohlicher Myokardinfarkt auftreten. Drei bis sechs Monate nach der Stentimplantation tritt bei 30-60% der Patienten, die einen BMS erhalten, eine Wiederverengung des dilatierten Gefäßabschnitts auf und erfordert eine erneute Revaskularisierung <sup>[14]</sup>.

Die Pathophysiologie der In-Stent-Restenose ist äußerst komplex und noch unvollständig aufgeklärt und deshalb hier nur vereinfacht dargestellt. In Bezug auf eine In-Stent-Restenose muss die Neointima-Hyperplasie als Hauptgrund genauer untersucht und analysiert werden. Nach einer PTCA wird eine große Menge an Wachstumsfaktoren (WF) und Zytokinen, unter anderem „Platelet-derived growth factor“ (PDGF) von den aktivierten Makrophagen, GMZs, EZs und Blutplättchen freigesetzt <sup>[15]</sup>. Die GMZs wandeln sich zu Beginn von einem ruhenden, kontraktilen in einen proliferierenden, sekretorischen Typ um <sup>[16]</sup>. Als Antwort auf die Sekretion von PDGF migrieren GMZs von der internen elastischen Lamina (IEL) über die *Tunica media* in die *Tunica intima* <sup>[17]</sup>. Darüber hinaus setzen die GMZs viel Zellmatrix und prothrombotische Moleküle frei <sup>[18]</sup>. Die Hypertrophie der GMZs und die von ihnen neu synthetisierte EZM tragen zu dem expandierten Volumen der Neointima-Läsion bei. Die von ihnen freigesetzten EZM-Komponenten sind einem zeitlichen „Remodelling“ unterzogen. In der Anfangsphase synthetisieren sie überwiegend Chondroitin- und Dermatansulfate. Danach verringert sich die Menge an EZM und diese besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ I und Decorin. Alles zusammen trägt zur Neointima-Hyperplasie bei.

Neben der Neointima-Hyperplasie sind die verzögerte Reendothelialisierung und die Thrombusbildung die zwei wichtigsten klinischen Probleme nach PTCA.

### **1.2.3. Reendothelialisierung**

Das vaskuläre Endothel stellt eine anti-oxidative, anti-inflammatorische, anti-koagulatorische und pro-fibrinolytische Schutzschicht dar. Unter nicht-pathologischen Bedingungen setzt das Endothel Stickstoffmonoxid frei, was die Wanderung von Leukozyten, die Migration von proliferativen GMZs und die Aggregation von Thrombozyten inhibiert. Darüber hinaus

stabilisiert das Endothel den vaskulären Tonus. Die antiproliferativen Substanzen von DES, die nur GMZs inhibieren sollen, beeinträchtigen ebenfalls die EZs <sup>[19]</sup>. Nach einer PTCA kommt es wegen der Denudation und dem Reiz durch den Ballon (je nach Inflationsdruck) bzw. den Stent häufig zu einer verzögerten, inkompletten oder fehlenden Reendothelialisierung der Stentstreben <sup>[20]</sup>.

#### **1.2.4. Stentthrombose**

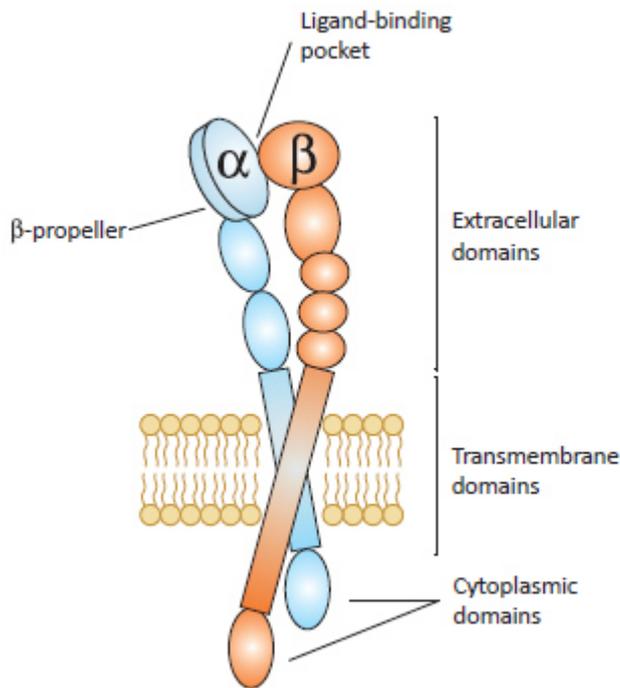
Die mechanische Belastung der Endothelschicht durch die Dilatation des Ballons und das intravaskuläre Stenting führt häufig zu einer Dysfunktion der EZs. Der freiliegende, robuste subendotheliale Teil hat direkten Kontakt mit dem Blut und gibt Blutplättchen eine ideale Möglichkeit sich daran anzuheften. Die Folge ist meistens eine unerwünschte Thrombusbildung. Trotz einer Reduktion der Wiederverengung des Gefäßes stellt die Stentthrombose eine große Gefahr nach der Stentimplantation dar. Am häufigsten führt dies zu einem Myokardinfarkt und oft verläuft die Stentthrombose tödlich. Die unphysiologische, verzögerte Reendothelialisierung des Stents, sowie die anhaltende Entzündung im vaskulären System begünstigen eine Adhäsion von Thrombozyten und stellen bedeutende Risikofaktoren bei der Entstehung einer späten (30 Tage bis 1 Jahr) und sehr späten (über 1 Jahr) Stentthrombose dar <sup>[20-21]</sup>. Als Reaktion setzt das verletzte Endothel zahlreiche antithrombotische Faktoren wie Nitritoxid, Prostaglandine und gewebespezifischen Plasminogenaktivator („Tissue-type plasminogen activator“, t-PA) frei. Es gibt keinen Unterschied in der frühen (weniger als 30 Tage) und späten Stentthrombose zwischen BMS und DES. Allerdings ist die sehr späte Stentthrombose höher bei DES als BMS <sup>[22]</sup>. Einige Studienergebnisse zeigen jedoch, dass die Stentthrombose rate des „Everolimus Eluting Stent“ innerhalb von zwei Jahren signifikant niedriger als des herkömmlichen Edelmetallstents und der ersten DES Generation ist <sup>[23]</sup>. Profitiert von der zweiten DES Generation mit dem dünnen Gerüst <sup>[24]</sup> wurde die Stentthrombose innerhalb von drei Jahren bis zu 1,5 % gesunken <sup>[11]</sup>. Für die genauere Aussage über die Stentthrombose folgen die multiple klinischen Meta-Analyse. Als Prophylaxe der Stentthrombose wird den Patienten mit DES empfohlen, mindestens ein Jahr ASS und Clopidogrel zur Blutplättchenhemmung einzunehmen.

## 1.3. Integrine

### 1.3.1. Struktur von Integrinen

Integrine wurden am Anfang der 80er Jahre zunächst als Fibronectin-Rezeptoren beschrieben. Sie spielen als transmembrane Rezeptor-Proteine bei der Zelladhäsion eine wichtige Rolle. Ihre genauere Identifizierung erfolgte im Jahr 1985<sup>[25]</sup>, wobei ein 140 kDa Signal nach der Affinitätschromatographie in „Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis“ (SDS-PAGE) unter reduzierter Bedingung detektiert wurde. Ein Jahr später wurde das Integrin von Tamkun et al. als das Bindeglied zwischen der EZM und dem Zytoskelett identifiziert<sup>[26]</sup>.

Integrine sind Glykoproteinrezeptoren, die ubiquitär auf fast allen Zelltypen vorkommen, mit Ausnahme der Erythrozyten. Sie bestehen aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (UE), die nicht-kovalent miteinander verbunden sind (Abb. 3). Der große extrazelluläre Teil des Integrins fungiert als Rezeptor zur Ligandenbindung. Die für die Signaltransduktion wichtige Transmembran Domäne besteht aus zwei Regionen zur Interaktion. Angrenzend am extrazellulären Bereich bildet sich durch Motiv  $^{972}\text{Gxx}^{976}\text{G}$  von  $\alpha$ -UE (x steht für nicht-konservierte Aminosäuren, AS) die Helix-Helix Interaktion in engem Kontakt. Näher des intrazellulären Bereichs tragen eine Schleife mit hoch konserviertem Motiv GFFKR von  $\alpha$ -UE und  $\beta$ -UE (Salzbrücke) zur separat stehenden Helices bei<sup>[27]</sup>. Der hohe Kreuzungswinkel zwischen der Helices des Integrins bei der Glykophorine A-ähnlichen Struktur von der Transmembran Domäne schützt vor der Bildung der Salzbrücke, die Integrin auf niedrigen Affinitätszustand blockiert<sup>[28]</sup>. Die Trennung der Salzbrücke ist essentiell für die Aktivierung des Integrins, wobei die  $\alpha/\beta$  Membran-proximale Regionen auseinander trafen<sup>[29]</sup>. Die zytoplasmatische Domäne des Integrins ist relativ klein und hat meistens 50 AS<sup>[30]</sup>.

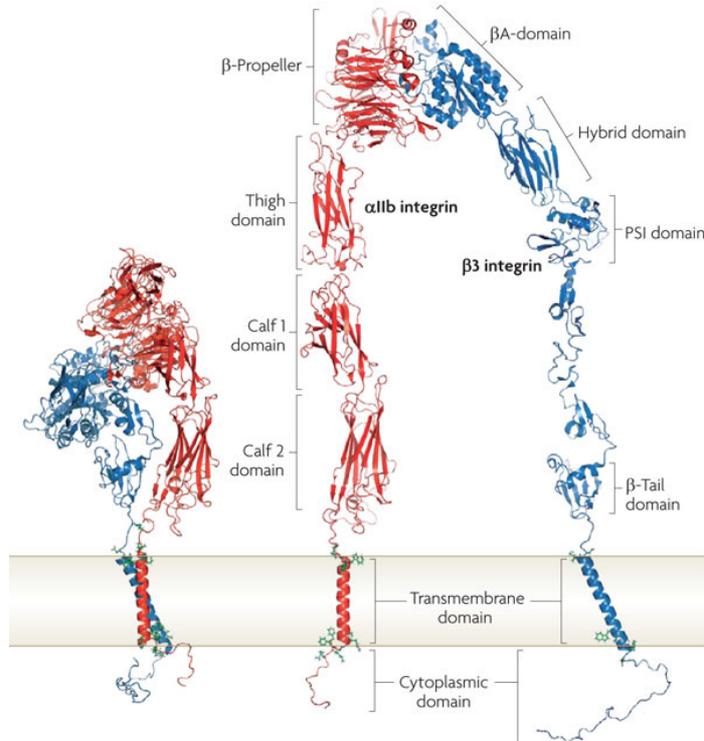


**Abbildung 3: Struktur eines Integrins.** Integrine bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -UE. Mit ihrer großen extrazellulären Domäne interagieren sie sich mit der EZM, hier beispielhaft Kollagen und Fibronectin (FN). Die nicht-enzymatische kleine Domäne aktiviert intrazellulär die Aktinfilamente durch einen Komplex von Signalproteinkinasen. <sup>[31]</sup>

Die Wechselwirkung der extrazellulären Domäne der Integrine mit den natürlichen Liganden der EZM aktiviert die Signalkaskade. Der intrazelluläre C-Terminus der Integrine besitzt zwar keine direkten intrinsischen Funktionen, um ein extrazellulär transduziertes Signal durch Phosphorylierung von Proteinkinasen weiterzuleiten, ist aber mit vielen Adaptorproteinen assoziiert, die eine Verbindung zu verschiedenen Signalwegen herstellen und damit eine Kopplung an das Zytoskelett vermitteln <sup>[33]</sup>.

Ein wichtiger Schritt zur Strukturaufklärung des Integrins war die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des  $\alpha\beta_3$  Integrins durch Xiong et al. Der einzelne Sequenz-Abschnitt der beiden UE und ihre Funktion wurden erstmalig charakterisiert <sup>[35]</sup>. Das Integrin besteht aus einem ovalen Kopf und zwei geknickten Stelzen-Regionen (Abb. 4). Die  $\alpha$ -UE hat einen siebenblättrigen Propeller, einen „Thigh“-Teil und zwei ähnliche Domänen, die das „Calf“-Modul formen. Einige  $\alpha$ -UEs ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\alpha_{11}$ ,  $\alpha_L$ ,  $\alpha_D$ ,  $\alpha_M$ ,  $\alpha_X$  und  $\alpha_E$ ) besitzen zwischen dem zweiten und dritten Propellerblatt eine zusätzliche  $\alpha I$ -Domäne (auch  $\alpha A$  genannt). Die  $\beta$ -UE besteht aus einer  $\beta I$ -Domäne, einer PSI-Domäne, einer Immunoglobulin (Ig)-ähnlichen Hybrid-Domäne, vier hochkonservierten cysteinreichen Domänen, die Homologie zum Motiv des epidermalen Wachstumsfaktors („Epidermal

Growth Factor“, EGF) aufweisen. Eine für die Ligandenbindung zuständige „Metal Ion Dependent Adhesion Site“ (MIDAS) <sup>[32, 36]</sup> ist sowohl bei der  $\alpha$  als auch bei der  $\beta$ -Domäne vorhanden, die zur Bindung von divalenten Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) beiträgt. Bei dem Integrintyp ohne  $\alpha$ -Domäne liegt die Bindungstasche des Liganden zwischen der  $\beta$ -Domäne der  $\beta$ -UE und dem  $\beta$ -Propeller der  $\alpha$ -UE.



**Abbildung 4: Ein Integrin-Heterodimer (links: im inaktiven „Ruhezustand“, rechts: nach Aktivierung).** Die  $\alpha$ -Domäne, der  $\beta$ -Propeller der  $\alpha$ -UE und die  $\beta$ -, Hybrid-, PSI-Domänen der  $\beta$ -UE bilden den Kopfbereich im extrazellulären Teil des Integrins. Durch die „Thigh“-Domäne ist  $\beta$ -Propeller mit zwei „Calf“-Domänen der  $\alpha$ -UE verbunden. Dagegen stellen vier EGF-ähnliche Domänen den Schwanz-Teil der  $\beta$ -UE dar. PSI: Plexin Semaphorin Integrin. <sup>[37b]</sup>

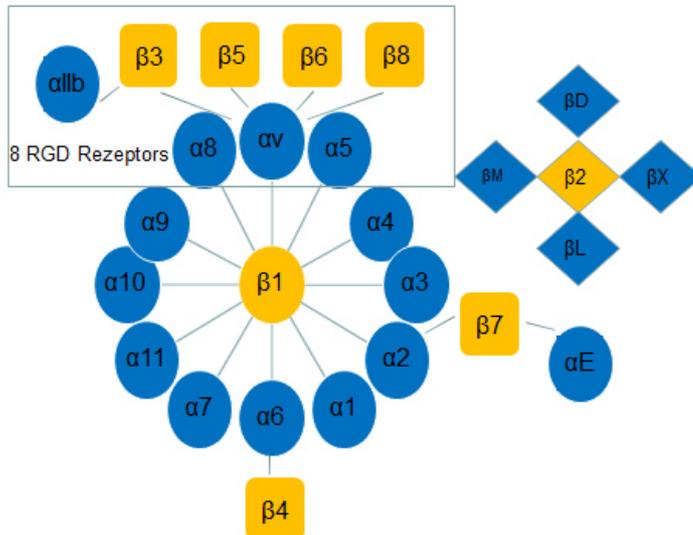
### 1.3.2. Untereinheiten der Integrine

Jede UE der Integrine besteht aus einer großen extrazellulären Domäne (außer bei den  $\beta$ 4- und  $\beta$ 8-Integrinen), einer Transmembranhelix und einer kleinen intrazellulären Domäne <sup>[38]</sup>. Die  $\alpha$ -UE mit 1100 AS wird durch zwei Aminosäureketten aufgebaut, die über eine Disulfidgruppe verbunden sind. Die  $\beta$ -UE hat meistens 800 AS. Die  $\beta$ -UE ist zuständig für die Bindung an die Signalproteine und die Zytoskelettkomponenten. Dagegen hat die  $\alpha$ -UE eher regulatorische Funktion <sup>[33b]</sup>.

Bisher sind bei Säugetieren als Kombination von 18  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -UE 24 verschiedene Integrin-Heterodimere bekannt <sup>[39]</sup> (Abb. 5). Zur Diversität der Integrine tragen zahlreiche

Modifikationen während Transkription und Translation bei, zum Beispiel Spleißen der Ribonukleinsäuren (RNA) und Glykosylierung der Proteine <sup>[40]</sup>.

Die  $\beta$ 1-UE hat die meisten Kombinationen mit der  $\alpha$ -UE und interagiert allein mit zehn verschiedenen Signalproteinen und Zytoskelettkomponenten <sup>[41]</sup>.



**Abbildung 5: Alle vorkommenden Kombinationen der Integrin-Untereinheiten und acht RGD Integrin-Rezeptoren. (s. Kasten)**

### 1.3.3. Funktion des Integrins

Neben Cadherinen und Selektinen als Zelladhäsionsmolekülen spielen Integrine eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion bzw. ihrer Kommunikation. Dies ist nicht verwunderlich in Anbetracht seiner essentiellen Rolle bei der Adhäsion, Migration, Proliferation, Apoptose und Invasion <sup>[42]</sup>. Integrine sind unentbehrlich bei vielen Vorgängen wie Embryogenese, Hämostase, Homöostase, Wundheilung, Tumorgenese und Metastasierung <sup>[43]</sup>. Integrine sind ebenfalls an vielen pathologischen Prozessen wie Thrombosen, Retinopathien, Entzündungen und Osteoporose beteiligt. Als Membranrezeptor übernimmt das Integrin die Signaltransduktion zwischen dem extrazellulären und intrazellulären Milieu und moduliert diverse vaskuläre Phänomene <sup>[33a, 43a]</sup>.

Verschiedene Subtypen von Integrine verfügen über diverse Funktionen, wie im Folgenden beispielhaft dargestellt. Ein besonders intensiv untersuchtes Integrin ist  $\alpha$ 11 $\beta$ 3, das in der Gerinnungskaskade aktiviert wird, wobei es zur Aggregation der Thrombozyten führt <sup>[44]</sup>. Die  $\alpha$ v $\beta$ 3- und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Integrine tragen zur VEGF-vermittelten Angiogenese von Tumoren bei <sup>[45]</sup>.

Nach der durch den Ballon induzierten Denudation werden ebenfalls die beiden Integrine  $\alpha\beta3$  und  $\alpha5\beta1$  von GMZs hochreguliert <sup>[46]</sup>. Es ist mittlerweile auch bekannt, dass sich die GMZs in diesem Prozess von einer kontraktilen Form in eine proliferative Form umwandeln. Diese Umwandlung wird durch das  $\alpha5\beta1$ -Integrin vermittelt und ermöglicht dadurch eine Migration der GMZs in die Intimaschicht <sup>[47]</sup>.

#### **1.3.4. Aktivierung der Integrine im Signaltransduktionsprozess**

Es existieren zwei allosterische Hauptformen von Integrinen: eine inaktive und eine aktive Form. Normalerweise befinden sich Integrine überwiegend in inaktiver Form in cholesterinreichen Bereichen der Zellmembran, den sogenannten „Lipid rafts“. Nach der Interaktion mit der EZM gehen die Integrine von einer gebogenen niedrigaffinen Konformation ihrer extrazellulären Domänen in eine gestreckte hochaffine Konformation über (Abb. 6) <sup>[48]</sup>. Diese Konformationsveränderung führt zu einer Trennung der zytoplasmatischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne und zur Integrin-Clusterbildung auf der Zellmembran. Durch die Bildung einer nachgeschalteten zytoplasmatischen Proteinkinase an die intrazelluläre Domäne der Integrine nach der Ligandenbindung, kommt es schließlich zu einer Ansammlung von Aktinfilamenten des Zytoskeletts. Diese Art der Reorganisation der Aktinfilamente in der Zelle in Form sogenannter „Stress fibers“ überträgt das Signal nochmals nach außen, indem es ein vermehrtes Integrin-Clustering und damit eine erhöhte EZM-Bindung ermöglicht (Abb. 6).

Vom intrazellulären Raum können Integrine auch durch das Zytoskelettprotein Talin aktiviert werden. Nach Bindung von Talin an die  $\beta$ -Domäne des Integrins trennen sich die  $\alpha$ - und  $\beta$ -UE, wodurch es zu einer Aktivierung der Integrine kommt <sup>[49]</sup>.

Über den „Crosstalk“ zwischen Integrinen und WF- sowie Zytokin-Rezeptoren wurde viel berichtet. Integrine und WF erhöhen synergistisch die Intensität und die Dauer der Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) im Rahmen der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Signalkaskade. ERK1/2 reguliert als Transkriptionsfaktor die Aktivität zahlreicher Gene <sup>[50]</sup>. Die Bindung der entsprechenden extrazellulären Liganden an Integrine als vorausgehender Schritt, gewährleistet die durch WF-aktivierte Proliferation und Migration der Zellen. Die Integrin-vermittelte Adhäsion schützt die Zellen ebenfalls vor Apoptose, eine Beobachtung, die auf die Existenz des „Crosstalks“ zwischen Integrinen und WF schließen lässt <sup>[51]</sup>. Bekannt ist die Phosphorylierung der WF-Rezeptoren nach einer Integrinaktivierung.

## 1.4. Kinasen in der integrin-vermittelten Signaltransduktion

Die zytoplasmatische Domäne der Integrine besitzt keine intrinsische enzymatische Aktivität. Der Signalübertragung findet daher über Bindung von Adaptorproteinen und Proteinkinasen sowie Zytoskelettproteinen statt. Dazu gehören die Integrin Linked Kinase (ILK), die Fokale Adhäsion Kinase (FAK), Talin, Paxillin und Cellular und Sarcoma (SRC, Abb. 6).

### 1.4.1. Integrin Linked Kinase

Erst Anfang der 90er Jahre wurde die ILK als Serin/Threonin-Proteinkinase beschrieben <sup>[52]</sup>, die mit dem zytoplasmatischen Teil von  $\beta$ 1- <sup>[53]</sup>,  $\beta$ 2-, und  $\beta$ 3-Integrin interagiert. ILK, eine proximale Proteinkinase mit vier Ankyrin-Wiederholungssequenzen, ist durch die Bindung an der Regulationsproteine wie Pinch,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Parvin und Paxillin an diversen Zellaktivitäten beteiligt <sup>[54]</sup>. Als Adaptorprotein hat ILK die primäre Aufgabe, die EZM nach Bindung an Integrine mit den intrazellulären Strukturproteinen wie dem Aktin-Zytoskelett zu verbinden. Die ILK ist von großer Bedeutung bei der Adhäsion, Apoptose, Invasion, Mitose und Tumorangio-genese. Ihre Funktion bei Tumoren wurde *in vivo* intensiv erforscht <sup>[55]</sup>. Die Dysfunktion von ILK kann zudem zu einer Kardiomyopathie führen <sup>[53]</sup>. In ILK-Knockout-Mäusen kommt es zu einer frühen embryonalen Letalität aufgrund von Defekten bei der Zelladhäsion und Desorganisation des Zytoskeletts. In der Karotisarterie von Ratten erfolgt nach einer Verletzung durch den Ballonkatheter eine reduzierte Expression der ILK in der *Tunica media*, jedoch eine erhöhte Expression der ILK in der *Tunica intima* <sup>[56]</sup>.

### 1.4.2. Fokale Adhäsion Kinase

Als fokale Adhäsion (FA) wird eine mechanische Kopplung der EZM mit Zellen bezeichnet, die durch Integrinbindung, Integrin-Clustering und Signaltransduktion von zahlreichen Signalproteinen charakterisiert ist. Die FA ist ein hochorganisiertes Netzwerk, das nur auf die klar abgegrenzten Bereiche der Zellen beschränkt ist. Die FA kann sich aus über 50 verschiedenen Proteinen zusammensetzen. In ruhenden Zellen ist die FA stabil. Bei migrierenden Zellen wird die FA jedoch immer wieder auf- und abgebaut. In der FA wird zuerst über das RGD-, DGEA- und GFOGER-Motiv in der EZM die kurze AS-Sequenz von Integri-nen gebunden. Danach wird das Signal klassisch über Adaptorproteine wie Talin,  $\alpha$ -Actinin, Filamin, Vinculin und die wichtigsten Tyrosin-Proteinkinasen FAK und Cellular

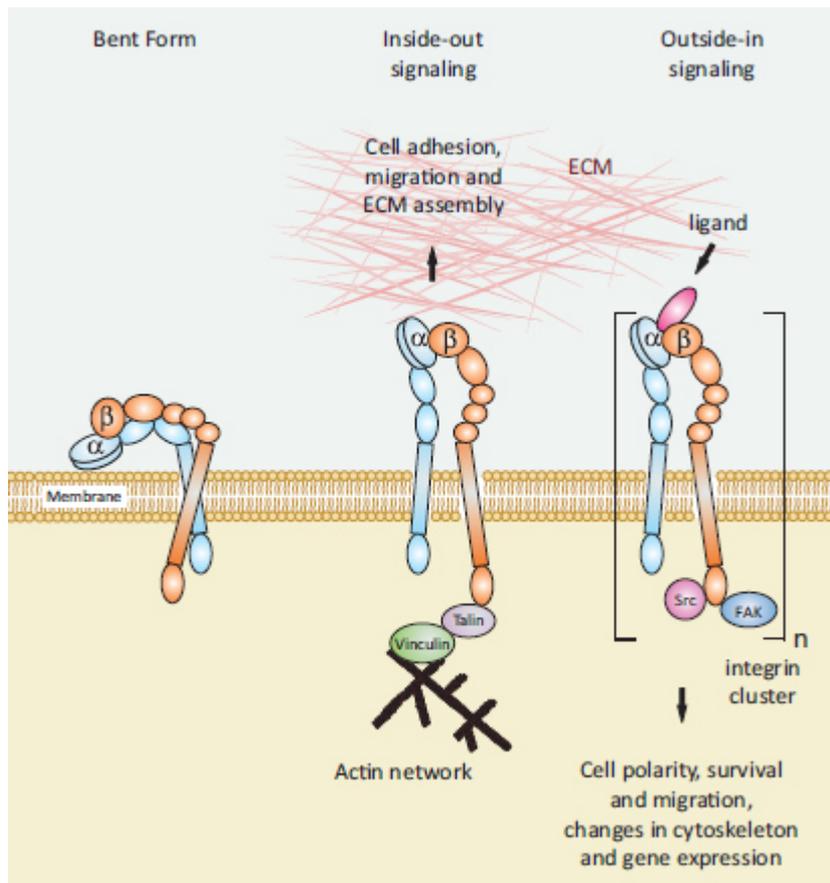
Sarcoma (c-SRC) weitergeleitet. Schließlich kommt es zu einer Ankopplung der Aktinfilamente.

FAK ist eine bedeutende Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase bei der Signaltransduktion im FA-Komplex. Nach der Aktivierung der Integrine interagiert ihre zytoplasmatische  $\beta$ -UE entweder durch Talin und Paxilin oder auf direktem Weg mit FAK, wobei FAK an Tyr397<sup>[57]</sup> autophosphoryliert wird. Somit entsteht eine freie Bindungsstelle mit hoher Affinität an der SH2 (SRC-homology 2)-Domäne, die SRC Familie Kinase, Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Grb7 und Phospholipase Cr beinhalten<sup>[58]</sup>. Nach diesem Aktivierungsschritt führt es erneut zu einer Phosphorylierung an Tyr925 bei FAK. Bisher sind sechs Phosphorylierungsstellen von FAK bekannt, nämlich Tyr397, Tyr407, Tyr576, Tyr577, Tyr861 und Tyr925<sup>[59]</sup>.

#### **1.4.3. SRC Familie Kinase**

Eine andere nachgeschaltete Kinase in FK ist c-SRC, die zu den SRC Familie Kinasen gehört (SRC, Fyn, Yes, Lck, Hck, Blk, Fgr, Lyn und Yrk)<sup>[60]</sup>. Der Name **Sarcoma** in **SRC** besagt, dass es sich bei SRC eigentlich um ein Protoonkogen handelt. Entdeckt wurde SRC in Rous-Sarcoma-Viren bei Hühnern. Als zelluläres Homologes des viralen SRC wurde c-SRC 1979 von Oppermann et al. identifiziert<sup>[61]</sup>.

SRC ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase. Durch ihre SH3-Domäne assoziiert SRC mit der zytoplasmatischen  $\beta$ 3-UE von Integrinen<sup>[62]</sup>. Die Autophosphorylierung an Tyr397 der FAK soll ein entscheidender Schritt für die Nachschaltung von SRC sein. Der FAK/SRC-Komplex und sein nachgeschaltetes Signal inhibieren Apoptose<sup>[63]</sup>.



**Abbildung 6: Integrin-Aktivierung.** Die extrazellulären Domänen der Integrine strecken sich nach der Ligandenbindung zu einer aufrechten Form. Das Signal an der EZM führt zur Rekrutierung diverser Proteinkinasen (FAK und SRC) und Adaptorproteine (ILK, Talin und Vinculin). Diese interagieren über die zytoplasmatischen Integrindomänen mit Aktinfilamenten. Die Folge ist eine Reorganisation des Zytoskeletts, was wiederum das Integrin-Clustering verstärkt. Dieses Phänomen nennt man fokale Adhäsion <sup>[31]</sup>.

## 1.5. RGD Antagonisten

### 1.5.1. RGD-Sequenz

Das RGD-Motiv wurde zunächst im adhäsiven Glykoprotein Fibronectin 1984 von Pierschbacher und Ruoslahti entdeckt <sup>[64-65]</sup>. Dieses Motiv beeinflusst entscheidend das Anhaften der Zellen an Fibronectin. Die ursprünglich gefundene Sequenz ist eigentlich Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Serin (Arg-Gly-Asp-Ser), allerdings spielt die vierte AS Serin eine unwesentliche Rolle bei der Erkennung der Zellen. Durch den Ersatz des Serins an dieser Stelle durch eine andere AS, verminderte sich die Bindungsaktivität der Zellen mit Fibronectin nicht <sup>[34, 64-65]</sup>.

Von allen Kombinationen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -UE in Integrinen gibt es mindestens acht Heterodimere, die die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) erkennen <sup>[39b]</sup>: alle fünf av-Integrine und

die Integrine  $\alpha 5\beta 1$ -,  $\alpha 8\beta 1$ - und  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  [66]. Durch dieses prominente Motiv in der EZM stehen Integrine in Kontakt mit Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, Laminin, Von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Entactin, Tenascin, Osteopontin und Kollagen [67].

### 1.5.2. Anwendung von Integrin Liganden

Aufgrund der Rolle der Integrine bei vielen Krankheiten wie Tumoren, Infektionen und Autoimmunerkrankung werden Integrin-Antagonisten vielfach diagnostisch und therapeutisch eingesetzt [39b, 68]. Der radio-iodierte Antagonist ( $^{125}\text{I}$ IP2) zeigt beim malignen Melanom eine hohe Affinität zum  $\alpha\beta 3$  Integrin. Dieser Integrintyp wird im Melanom überexprimiert, wodurch die Integrin-Akkumulation im Tumor durch den markierten Antagonisten detektiert werden kann [69]. Die Galacto Peptide werden zur Bildgebung der  $\alpha\beta 3$  Integrin *in vivo* verwendet [70]. Mittels Positronen-Emissions-Tomographie werden die Makrophagen durch  $^{18}\text{F}$ -Galacto RGD-Peptide nach der Inflammation der artherosklerotische Läsion veranschaulicht [71]. Wie  $^{18}\text{F}$ -Galacto RGD-Peptide wird die Aufnahme von  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA- und  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP(RGD)<sub>3</sub>-RGD-Peptide in einem Tiermodell beim Angiogenese nach Myokardinfarkt detektiert [72]. Die hochselektiven RGD-Peptidomimetika, welche an  $\alpha\beta 3$ - und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine binden, wurden vor kurzem beschrieben. Durch die chemische Funktionalisierung ermöglicht dies die selektive Bildgebung beider Integrinsubtypen [73].

Therapeutisch werden 72 von 258 Anti-Integrin Wirkstoffen aktuell in verschiedenen klinischen Phasen getestet [74]. Häufige Vertreter sind RGD-basierte Liganden, die ein Drittel der Integrine erkennen und binden. Das von Merck & Co., Inc entwickelte Tirofiban, ein nicht-peptidischer Thrombozyten-Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonist ( $\alpha \text{IIb}\beta 3$ ), wird in der Kardiologie zur Hemmung der Thrombozyten-Aggregation bei der instabilen *Angina pectoris* eingesetzt [75]. Ein  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetikum (SC56631) wird zur Hemmung der Resorption des Knochens bei Osteoporose verwendet [76]. Auch die  $\alpha\beta 3$  Integrin-Antagonisten werden in der Onkologie durch ihre Hemmung der Angiogenese zur Minderung des Tumorwachstums häufig angewendet [77]. Cilengitide, ein zyklisches N-methylierte Peptid c(RGDfNMeVal), inhibiert  $\alpha\beta 3$ - und  $\alpha\beta 5$ -Integrine und unterbindet dadurch das Wachstum von tumoreigenen Blutgefäßen (Angiogenese) bei Glioblastom [31, 78]. In einer Zusammenarbeit mit Merck KGaA (Darmstadt) wurde bei der Überprüfung der Wirksamkeit der Cilengitide in der klinischen III Phase bestätigt [79]. In der aktuellen Testphase führte es jedoch nicht zu einer verbesserten Überlebensrate, wenn Cilengitide bei der

Radiochemotherapie hinzugefügt wird <sup>[80]</sup>. Ihrer Wirksamkeit gegenüber der Kontrollgruppe fehlte es <sup>[81]</sup>.

### **1.5.3. RGD-Peptide/Peptidomimetika**

Peptide bestehen aus bis zu 50 verknüpften AS. Dabei sind die linearen RGD-Peptide hochflexibel und haben viele Konformationsmöglichkeiten. Die linearen RGD-Peptide sind aber oft durch Proteasen degradierbar. Außerdem fehlt den linearen RGD-Peptiden eine hohe Selektivität zu einer Integrin-Familie. Die kleinen „Head to tail“ zyklischen Peptide (Penta- bzw. Hexa-Peptide), mit ihrem reduzierten Konformationsraum, sind gut gegen den enzymatischen Abbau geschützt. Normalerweise hat die durch den zyklischen Ring aufgespannte Konformation der RGD-Peptide eine höhere Affinität und Selektivität zu bestimmten Integrinen als die linearen flexiblen RGD-Peptide, wenn sie an Integrine gebunden sind.

Peptidomimetika, als niedermolekulare Verbindungen, ähneln dem zugrunde liegenden Protein bezüglich der Bindungseigenschaften der Integrine. In der Regel weisen Peptidomimetika kein durchgängiges Peptidrückgrat auf und imitieren die essentiellen chemischen Gruppen mit der pharmakologischen Wirkung, die für die Ligandenbindung entscheidend sind. Für die Ligandenerkennung ist oft nur eine Seitenkette aus vier bis acht AS entscheidend. Die zusätzlichen nicht-natürlichen AS bzw. die anderen chemischen Bausteine von RGD-Peptidomimetika kann man sich zu Nutze machen, um einen hochselektiven Integrin-Antagonisten zu entwickeln. Zusätzlich unterliegen Peptidomimetika einer erhöhten Resorption im Körper <sup>[82]</sup> und sie haben eine reduzierte Immunogenität, weniger Nebenwirkungen und eine verbesserte orale Bioverfügbarkeit gegenüber anderen Peptid-Analoga. Aus diesen Gründen gewinnen Peptidomimetika in der letzten Zeit immer mehr Beachtung bei der Wahl der Arzneimittel <sup>[83]</sup>. Im Gegensatz zu RGD-Peptiden bleibt allerdings die Synthese der selektiven RGD-Peptidomimetika ohne den Verlust der hohen Aktivität in den letzten Jahren eine große Herausforderung <sup>[84]</sup>.

## 2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es die Regulation der auf vaskulären Zellen am häufigsten vorkommenden Integrine  $\alpha\beta3$ - und  $\alpha5\beta1$  zu untersuchen. Hierbei stellte sich die Frage, ob eine differentielle Regulierung dieser Integrine auf Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen besteht, welche sich nutzen lässt, um selektiv in die Vorgänge während der Gefäßheilung einzugreifen. Während bisherige Ansätze zur Reduktion der Neointimabildung durch eine deutliche Nicht-Selektivität gekennzeichnet sind, besteht die Möglichkeit durch Interaktion mit verschiedenen Integrinsubtypen ( $\alpha\beta3$  und  $\alpha5\beta1$ ) eine selektive Blockade der Migration glatte Gefäßmuskelzellen und eine unverzögerte Endothelialisierung humaner Stentimplantate zu erreichen.

Zur Untersuchung der Funktion und Regulation dieser Integrine standen spezifische Inhibitoren in Form von Peptiden/Peptidomimetika zu Verfügung. Gleichzeitig wurde die Rolle des  $\beta1$  Integrins anhand von konditionellen Knockout (KO) Mäusen nach arterieller Gefäßverletzung untersucht. Die folgenden Fragestellungen ließen sich hierbei ableiten:

1. Besteht eine differentielle Regulation von  $\alpha\beta3$ - und  $\alpha5\beta1$  Integrinen auf koronare arterielle Endothelzellen („Coronary Artery Endothelial Cells“, CAECs) und koronare arterielle glatte Muskelzellen („Coronary Artery Smooth Muscle Cells“, CASMCs) nach *in vitro* Stimulation?
2. In welchem Ausmaß werden die wichtigen Zellaktivitäten und die nachgeschalteten intrazellulären Signalwege unter Zugabe spezifischer Peptide/Peptidomimetika inhibiert?
3. Lässt sich im Knockout-Mausmodell durch eine selektive Unterdrückung des  $\beta1$  Integrins in glatten Gefäßmuskelzellen nach arterieller Gefäßverletzung die Neointimabildung unterdrücken ohne dabei eine Verzögerung der Gefäßheilung zu verursachen?

### 3. Material

#### 3.1. Reagenzien und Chemikalien

Endothelial Cell Growth Medium, EGM	Lonza, Köln, Deutschland
Smooth Muscle Growth Medium, SmGM	Lonza, Köln, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	Lonza, Köln, Deutschland
Biotase	Biochrom, Berlin, Deutschland
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland,
Kristallviolett	AppliChem, Darmstadt, Deutschland,
Hoechst 33342	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Hamburg, Deutschland
VEGF	R&D Systems, Minneapolis, US
PDGF	Cell Signaling, Frankfurt am Main
Eukitt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-HCL	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteininhibitor Cocktail III	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Substrates A und B von DC Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
0,1% Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-Buffered Saline (TBS)	Bio-Rad, München, Deutschland
Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg Deutschland
Proteinmarker, Roti-Mark 10-150	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Potassium hexacyanoferrate(III)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Potassium hexacyanoferrate(II)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phalloidin, mit Atto 488 gekoppelt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteinase K	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isoamylalkohol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Xylol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hämalaun	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Resorsinfuchsin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pikrofuchsin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fixierungslösung, 0,2% Glutaraldehyd	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

### 3.2. Lösung, Puffer und Kits

#### **NTE-Puffer**

150 mM NaCl  
 Tris-HCL 50 mM  
 EDTA 5 mM  
 auf ddH<sub>2</sub>O auffüllen

#### **Lysepuffer**

Proteininhibitor Cocktail III 1:200  
 Phosphatase-Inhibitor 1:1000  
 auf NTE-Puffer auffüllen

#### **Lämmli-Puffer**

4% SDS  
 20% Glycerol  
 10% 2-Mercaptoethanol  
 0,004% Bromphenolblau  
 0,125 M Tris-HCL, pH=6,8

#### **Tris-Buffered Saline und Tween 20 (TBS-T) Lösung**

0,1% Tween 20  
 auf TBS auffüllen

#### **“Stripping“ Lösung (300 ml)**

4,5 g Glycin  
 0,3 g SDS  
 3 ml Tween-20  
 auf ddH<sub>2</sub>O auffüllen, pH=2,2

#### **Fixierungslösung**

0,2%ige Glutaraldehyd  
 2 mM MgCl<sub>2</sub>  
 5 mM EDTA  
 auf PBS auffüllen

#### **Detergens Puffer**

1 ml 10%iges Natrium-Deoxycholat  
 2 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>  
 2 ml 10% (v/v) Nonoxinol 40  
 auf 1 L PBS auffüllen, pH=7

**X-Gal Stammlösung**

40 mg/ml X-Gal

auf Dimethylformamid Lösung auffüllen

**X-Gal Puffer**1 ml 0,5 M  $K_3Fe(CN)_6$ 1 ml 0,5 M  $K_4Fe(CN)_6$ 

auf 100 ml Detergens Puffer auffüllen

**X-Gal Arbeitslösung (40 ml)**

1 ml X-Gal Stammlösung

39 ml X-Gal Puffer

**PCR-Puffer**Thermo Scientific, Braunschweig,  
Deutschland**Lauf-Puffer von WB**

Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

**Transfer-Puffer von WB**

Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

**Lysis Solution**

Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

**X-Gal Solution Kit**

„Fixation Solution“

Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

„Staining Solution“

**3.3. Antikörper und Primer**

Mouse anti $\alpha\beta 3$ Integrin	1:50	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mouse anti $\alpha 5\beta 1$ Integrin	1:500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Goat anti Mouse sekundärer Antikörper	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Mouse anti $\beta 3$ Integrin	1:1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mouse anti $\beta 1$ Integrin	1:1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mouse anti ILK	1:2000	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland
Rabbit anti pFAK <sub>397</sub>	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit anti Phospho-SRC Tyr <sub>416</sub>	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland
Rabbit anti GAPDH	1:2000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Anti Rabbit und anti Mouse sekundäre Antikörper	1:5000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, Deutschland
<b>Immunfluoreszenz</b>		
Rabbit anti pFAK <sub>397</sub>	1:200	Abcam, Cambridge, UK
Mouse anti $\alpha$ -Aktin	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland

Rabbit anti Calponin	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Goat anti Rabbit und Rabbit anti Mouse sekundärer Antikörper	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland

**Primer für PCR**

Cre		Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien
β1 Integrin		Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien

**3.4. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Software****Gerät**

FACSCalibur	BD Bioscience, Deutschland
ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Bolt® Mini-Gel-Apparat	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Densitometrie Gerät, GS-800	Bio-Rad, München, Deutschland
Genequant	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schlittenmikrotome	Leica, Wetzlar, Deutschland

**Verbrauchsmaterialien**

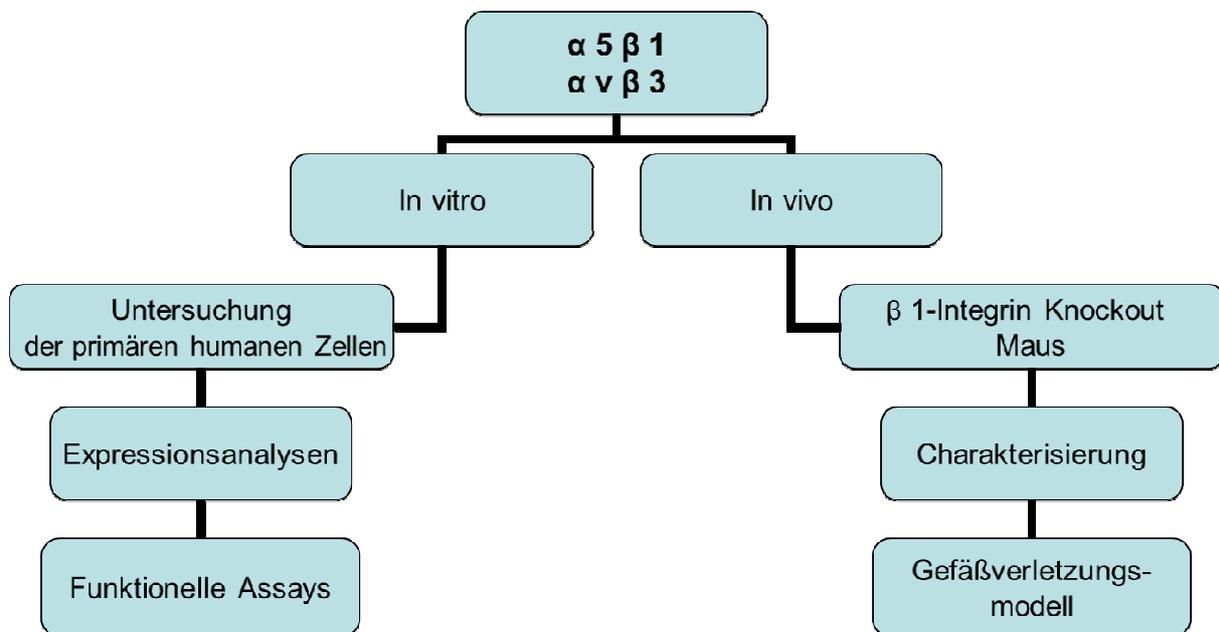
Zellkulturflasche	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Petrischale	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Neubauer Zählkammer	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
8µm Well Insert	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Stent	Neoplas, Greifswald, Deutschland
Spitzbodenröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger, Superfrost	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Röntgenfilm, FUJIfilms	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Nitrozellulose Membran	Bio-Rad, München, Deutschland
Deckglas	Menzel, Braunschweig, Deutschland

**Software**

Flowjo	Flowjo, Oregon, USA
Quantity One	Bio-Rad, München, Deutschland
Cell^F	Olympus, Hamburg, Deutschland
SPSS statistics 21	SPSS Inc., Chicago, USA

## 4. Methoden

In der folgenden Abbildung wird das Studiendesign, untergliedert *in vitro* und *in vivo*, erläutert. Die Integrinsubtypen  $\alpha v \beta 3$ - und  $\alpha 5 \beta 1$  wurden untersucht.



**Abbildung 7: Studiendesign.** Zuerst wurde die Expression beider Integrinsubtypen in den wichtigsten humanen koronaren Zellen (CAECs und CSMCs) bestimmt. Mithilfe der Integrin Liganden (RGD-Peptide/Peptidomimetika) wurde ihr Einfluss auf die Zellaktivität (Proliferation, Migration und Adhäsion) getestet. Im Mausmodell wurde, mittels des Cre-LoxP Systems  $\beta 1$  Integrin konditionell in glatten Gefäßmuskelzellen deletiert. Die erfolgreiche Rekombination und somit die Deletion von  $\beta 1$  Integrin konnte durch ein LacZ Reporterkonstrukt untersucht werden. In einer arteriellen Verletzungssimulation wurde der neointimale Schweregrad der Gefäßstenose mittels pathohistologischer Färbungen untersucht.

### 4.1. Zellkultur primärer humaner koronarer Zellen

#### 4.1.1. Kultivierung und Subkultivierung

Die primären humanen Zellkulturen wurden von Lonza bezogen, sofort aufgetaut und alle zwei Tage mit dem entsprechenden Medium (EGM und SmGM) kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese zuerst mit phosphatgepufferter Salzlösung („Phosphate Buffered Saline“, PBS, pH=7,4) gewaschen, anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen durch fünf Min. Inkubation mit Trypsin-EDTA im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Zellen, welche für nachfolgende Untersuchungen (zum Beispiel „Fluorescence activated cell sorting“, FACS)

verwendet werden sollten, wurden durch die Inkubation im Brutschrank für 10 Min. mit Biotase abgelöst, um die Konformation des nativen aktiven Integrins auf der Membran nicht zu verändern. Hierzu wurden die Zellen wie o. g. mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Min. im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen des Ablösungsvorgangs mit Trypsin (bzw. Biotase) wurde jeweils 20% Fötale Kälberserum („Fetal Calf Serum, FCS) haltiges Kulturmedium (bzw. 1% BSA-haltiges PBS) verwendet. Danach wurden die Zellen bei 1100 RPM sedimentiert und nach Resuspension entweder in eine neue Kulturflasche für die weitere Kultivierung überführt oder für nachfolgende Untersuchungen verwendet.

#### **4.1.2. Zählen der Zellen**

Nach dem Ablösen der Zellen wurde das Zellpellet in einer definierten Kulturmediummenge resuspendiert und die Zellsuspension wurde dann mit Trypanblau-Lösung gemischt. Die Berechnung der gesamten Zellzahl mithilfe von einem Neubauer Zählkammer erfolgte nach der folgenden Formel: Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat x Verdünnungsfaktor x  $10^4$  x Volumen der Zellsuspension (ml).

#### **4.2. Proliferations Assay**

Auf einer 12-Well-Platte wurden die Zellen zuerst im Doppelansatz ausgesät. Für die CAECs betrug die Zellzahl 10.000 pro Well, für die CASMC 15.000. Um die Zellen für die Untersuchung der Proliferationsrate in der Ruhephase  $G_0$  zu synchronisieren, wurden sie zunächst über Nacht mit Medium ohne Serum inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Peptide/Peptidomimetika (BL562, SN503 und FR237) inkubiert. Es wurden folgende Ansätze untersucht: Kontrolle (nur Medium), 100  $\mu$ M-, 10  $\mu$ M-, 1  $\mu$ M-, 100 nM-, 10 nM-, und 1 nM RGD-Peptide/Peptidomimetika. Schließlich wurde die Anzahl adhärenter Zellen unter Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung am Tag 0 (der Tag, als die Peptidlösung verabreicht wurde), Tag 1, Tag 2 und Tag 3 dokumentiert (Abb. 8). Durch sechs zufällig ausgewählte Helllichtfelder vom Doppelansatz wurde die Zellzahl in „Adobe Photoshop“ mithilfe eines Zählungswerkzeugs ermittelt. Die Hemmungsrate von Proliferations Assay war der prozentuelle Anteil der inhibierten Zellzahl von der in Kontrolle.

Dieser Vorversuch diente dazu, die wirkungsvollste Peptid/Petidomimetikum Konzentration zu ermitteln. Diese Konzentration wurde für die weiteren Versuche zur Bestimmung der Proliferationsrate ausgewählt. In diesen Versuchen wurde der Einfluss der drei RGD-

Peptide/Peptidomimetika auf die Proliferationsrate von beiden humanen Zelltypen in einem Zeitraum von drei Tagen getestet.

*In Vivo*, im Mausmodell wurde die Auswirkung des Verlusts des  $\beta 1$  Integrin Allels auf die Proliferationsrate in „Murinen aorta smooth muscle cells“ (mASMCs) analysiert. Hierzu wurde die Teilungsrate in mASMCs von Wildtyp (WT) und Heterozygoten-Mutanten ( $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$ ) verglichen. Dabei wurde die Proliferationsrate an zwei Tagen analysiert. Als Maßstab für die Proliferationsrate wurde die Generationszeit der beiden murinen Zelltypen wie folgt berechnet: die ermittelte Zellzahl am Tag 1 und 2 dividiert durch die am Tag 0.



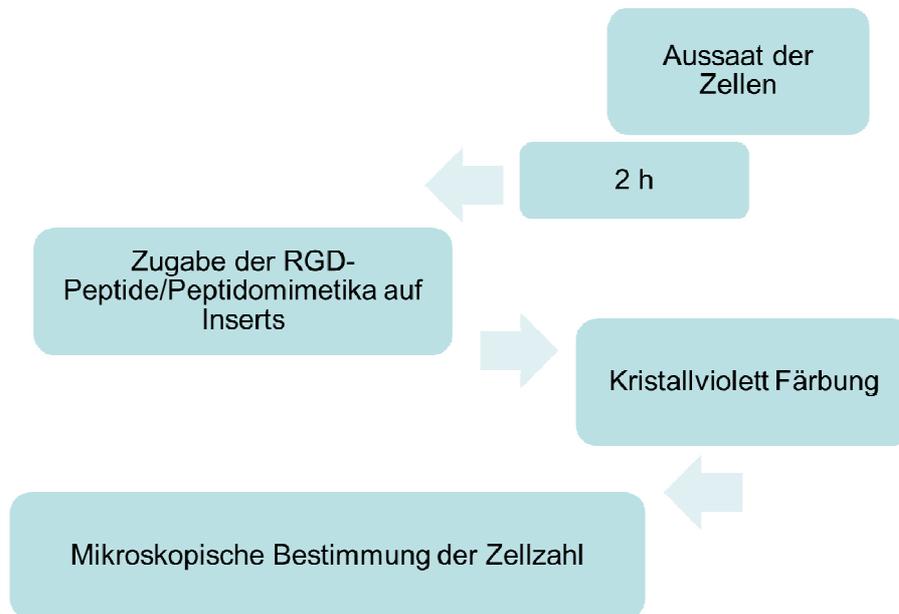
**Abbildung 8: Proliferations Assay.** Die Zellen wurden auf 12-Well-Platte ausgesät. Über Nacht folgten die Mediumabnahme und die Zugabe der RGD-Peptide/Peptidomimetika Lösung. Die Proliferationsrate am Tag 0, Tag 1, Tag 2 und Tag 3 wurde über die Bestimmung der Zellzahl errechnet.

### 4.3. Migrations Assay

Die durch Chemotaxis stimulierte Zellmigration wurde mittels 8  $\mu\text{m}$  Well Inserts (Abb. 9) untersucht. Es wurde zuerst ein FCS-Gradient erzeugt, indem im Well der Zellkulturplatte Medium/10% FCS vorgelegt wurde. Danach wurden die Inserts vorsichtig mit einer sterilen Pinzette ins Well aufgebracht.

Anschließend wurden 15.000 CAECs bzw. 20.000 CASMCs im Insert in Medium/5% FCS ausgesät. Die Zellen migrierten durch die 8  $\mu\text{m}$  Poren des Inserts auf die untere Seite der Membran. Ziel dieses Versuchs war es die inhibitorische Wirkung der RGD-Peptide/Peptidomimetika auf das Migrationsverhalten der zwei Zelltypen zu untersuchen.

Dazu wurde die Peptide/Peptidomimetika Lösung unmittelbar nach der Aussaat in die Zellsuspension in die Inserts gegeben.



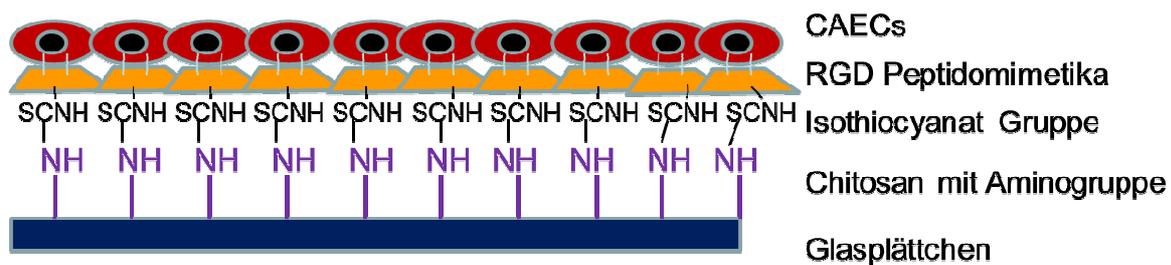
**Abbildung 9: Migrations Assay.** Das Insert hat eine Polyethylenterephthalat (PET) Membran. Im Versuch wurden Inserts in 12 Wellplatten verwendet. Die Zellen migrierten durch die 8  $\mu\text{M}$  Poren der Membran des Inserts auf die untere Seite der Membran. Es folgte Kristallviolett Färbung. Die inhibitorische Wirkung der RGD-Peptide/Peptidomimetika auf die Migrationsrate der analysierten Zelltypen wurde am Zeitpunkt 6-, 18- und 48 Stunden getestet.

Zur Auswertung wurde nach 6-, 18- und 48 Stunden Inkubationszeit eine Kristallviolett Färbung durchgeführt. Die Zellzahl wurde, wie oben für die Proliferationsrate beschrieben, erfasst. Nachdem alle Zellen gezählt waren, wurden nicht migrierte Zellen auf der Innenseite der Membran des Inserts mit einem Wattestäbchen abgewischt. Die auf der Unterseite der Membran migrierten Zellen konnten nun gezählt werden. Die Migrationsrate wurde durch die Division der Anzahl der migrierten Zellen (Zellen auf der Unterseite der Membran) durch die Gesamtzellzahl (obere- und untere Seite der Membran) errechnet.

Untersuchungen der Migrationsrate von mASMCs (WT und  $\text{Itg}\beta 1^{+/Pdgfrb-Cre}$ ) wurde nach dem gleichen Verfahren durchgeführt. Allerdings wurde hier die Migrationsrate nach 48 h und 72 h untersucht.

#### 4.4. Adhäsions Assay

Mit Adhäsions Assay sollte die Adhäsion der CAECs an mit RGD-Peptidomimetika (RGDfk als Grundmuster) beschichteten Glasplättchen untersucht werden. Hierzu wurden durch eine Isothiocyanat-Gruppe funktionalisierte RGD-Peptidomimetika mit verschiedenen Spacern (Ahx=Aminohexansäure, Hegas=Hexaoxaecosansäure und Proline) verwendet. Zudem waren Glasplättchen mit Chitosan bzw. Silan behandelt, was die Bindung der funktionalisierten RGD-Peptidomimetika erleichtern sollte (Abb. 10). Die Glasplättchen wurden in einer 6-Well-Platte mit basischer Peptidomimetikum Lösung bei Raumtemperatur über Nacht ohne Schütteln beschichtet. Es wurden zwei verschiedenen Kontrollen verwendet: a. Glasplättchen ohne Chitosan-Beschichtung aber mit Peptidomimetikum Lösung b. Glasplättchen mit Chitosan-Beschichtung und PBS. Am nächsten Tag wurde die Peptidomimetikum Lösung bzw. das PBS abgesaugt, und die CAEC-Zellsuspension (150.000 pro Ansatz) zugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 90 Min. um den Zellen die Adhäsion zu ermöglichen. Anschließend wurde die Zellen mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 5 Min. mit „Hoechst 33342“ (1:1000) inkubiert um die DNA im Zellkern anzufärben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen vorsichtig auf einen Objektträger überführt und mit dem „Fluorescence Mounting Medium“ abgedeckt. Die Zellzahl konnte mithilfe des blau gefärbten Zellkerns mittels eines Fluoreszenzmikroskops dokumentiert werden.



**Abbildung 10: Schema für den Adhäsions Assay.** Die Oberfläche der Glasplättchen wurde mit Chitosan beschichtet. Dieses Biopolymer verfügte über eine Aminogruppe, an die das durch Isothiocyanat-Gruppe funktionalisierte RGD-Peptidomimetikum irreversibel binden kann. Nach der Beschichtung mit der Peptidomimetikum Lösung erfolgte am nächsten Tag die Aussaat der CAECs.

#### 4.5. Stentbesiedlung mit CAECs

Ein Stent, welcher nach der Plasmabehandlung mit Isothiocyanat funktionalisiertem  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetikum (SN438, dies zeigte die beste Wirksamkeit im Adhäsions Assay)

beschichtet war, wurde für die dreidimensionalen Kolonisation durch CAECs verwendet. Der Stent wurde vertikal aufgeschnitten und auf den Zellrasen in einem zuvor plattierten Well einer 24er Platte gelegen. Am Tag 1 und 2 wurde die Besiedlung des Stents durch die CAECs gestoppt. Hierzu wurde einmal vorsichtig mit PBS gewaschen, anschließend wurden die Zellen auf dem Stent mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Zur Markierung von F-Aktin durch Phalloidin wurden die besiedelten Stents für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Visualisierung der DNA im Zellkern wurde wieder „Hoechst 33342“ verwendet. Am Mikroskop wurde jeweils im Hellfeldlicht und unter Fluoreszenzlicht die Zellbesiedlung auf dem Stent quantitativ bestimmt.

#### **4.6. Fluorescence activated cell sorting**

Als die Zellen im Well einer 6er Platte 70-80% konfluent waren, wurden sie den Zelltypen entsprechend mit WF (CAECs mit VEGF 1 ng/ml und CASMCs mit PDGF 10 ng/ml) für unterschiedliche Dauer (1-, 3-, und 6 Stunden) stimuliert. Die WF-Lösung war serumfrei weil die Zellen nicht von anderen WF bzw. Zytokinen im FCS-haltigen Medium beeinflusst werden sollten. Zu jedem Zeitpunkt wurde für die FACS-Analyse ein Doppelansatz mit je 100.000 Zellen mittels Biotase abgelöst und in Spitzbodenröhrchen gesammelt. Zunächst wurden durch Blocken mit 2% BSA/PBS für eine halbe Stunde bei 4°C unspezifische Bindungen vermindert. Nach der Zentrifugation und der Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 1% BSA/PBS resuspendiert. Es folgte gleichzeitig die Zugabe des jeweiligen primären Antikörpers. Das Gemisch wurde abschließend für 90 Min. bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstands erfolgte eine Inkubation für 45 Min. mit dem sekundären Antikörper in 1% BSA/PBS im Dunkeln, der mit Fluorescein Isothiocyanate (FITC, die Wellenlänge der Emission liegt bei 514 nm) gekoppelt war. Für alle drei Zeitpunkte der Stimulation wurde ebenfalls ein Doppelansatz ohne WF als Kontrolle untersucht. Für die Fluoreszenz-Detektion gab es eine Kontrolle ohne Zugabe beider Antikörper, um eine Autofluoreszenz zu messen, und eine weitere Kontrolle ohne Zugabe des primären Antikörpers. Zur Messung wurde das Gerät „FACSCalibur“ verwendet.

Durch das Vorwärtsstreulicht als x Achsel („Forward Scatter“, FSC) und das Seitwärtsstreulicht als y Achsel („Side Scatter“, SSC) wurde die Zellpopulation nach Volumen und Granularität getrennt. Mittels Software „Flowjo“ wurde auf die dichteste Zellpopulation gated, um die Integrin-Expression von intakten Zellen präziser zu ermitteln. Anschließend wurden die vitalen Zellen durch Propidiumiodid (PI) von toten Zellen diskriminiert, da PI

nicht die intakte Zellmembran durchdringt. Von beiden multiplizierten Zellpopulationen wurde ein Mittelwert nach Fluoreszenz Intensität für die Expression des Integrins ermittelt, der durch einen mit FITC gekoppelten sekundären Antikörper (FL1-H, typische Emission Kanal für FITC) zustande kam. Der so ermittelte Mittelwert war proportional zur Expression von Integrin.

In Doppelansatz wurde die Expression des Integrins einer Kontrolle und einer stimulierten Probe nach je 1-, 3- und 6 Stunden bestimmt. Der absolute Mittelwert ließ dadurch berechnen, in dem der Mittelwert der Probe ohne primären Antikörper von dem jeder stimulierten Probe abgezogen wurde. Der Mittelwert der Probe ohne primären Antikörper war quasi ein Blindwert, der ohne Kopplung des fluoreszierenden sekundären Antikörpers unspezifisch sich ergab.

Ein Teil der abgelösten Proben zur FACS-Analyse wurde nach der Stimulation lysiert und der Lysat wurde später mittels Western Blot (WB) nach Expression von ILK und Integrinsubtypen untersucht.

#### **4.7. Replatings Assay**

Die Zellen (CAECs und CASMCs) wurden mit Biotase abgelöst und nach Resuspendieren in PBS Lösung eine Stunde in der Suspension ausgehungert. Kurz vor dem Replating wurde eine 10  $\mu$ M RGD-Peptide/Peptidomimetika Lösung mit der Zellsuspension vermischt. 90 Min. nach der Aussaat wurden die Zellen auf einem Well einer 6er Platte mit eiskalten PBS gewaschen und sofort mit Lysepuffer für 30 Min. inkubiert. Zur späteren Untersuchung im WB wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

#### **4.8. Proteinanalyse mittels Western Blot**

Die Proteine wurden zuerst vom Zelllysate extrahiert. Die Konzentration der isolierten Proteine jeder Probe wurde nach LOWRY bestimmt. Danach wurde die gleiche Menge an Proteine auf Polyacrylamid-Gel aufgetragen und durch Elektrophorese nach Größe aufgetrennt. Schließlich wurden die gelaufenen Proteine auf einer Membran transferiert und mittels Immunodetektion nachgewiesen.

#### **4.8.1. Zell-Lyse**

Die Zellen wurden nach der Stimulation mit WF bzw. nach dem Replatings Assay kurz mit eiskaltem PBS gewaschen und sofort für 30 Min. in Lysepuffer (Proteininhibitor Cocktail III und Phosphatase-Inhibitor in NTE-Puffer) inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal für 10 Sekunden einer Ultraschall-Behandlung unterzogen und wurden anschließend bei 4 °C und 13000 RPM abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.8.2. Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die modifizierte Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY <sup>[85]</sup>, welche auf einer Redoxreaktion basiert. Die Proteinproben wurden mit einer NTE-Lösung 1:5 verdünnt. In der Doppelbestimmung wurde je 5 µl Proteinlösung in ein Well einer 96er Platte pipettiert, danach wurden 25 µl Substrat A und 200 µl Substrat B zugegeben. Nach 10 Min. Inkubation im Dunkeln wurden die Extinktion-Werte im ELISA-Reader bei 750 nm gemessen. Als Kontrolle wurde eine BSA-Eichkurve mit bekannten Konzentrationen erstellt.

#### **4.8.3. Natriumlaurylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese**

Unmittelbar nach der Proteinbestimmung wurden die Lysate mit Lämmli-Puffer verdünnt und 10 Min. bei 95°C erhitzt. Die Proteine wurden durch diesen Schritt denaturiert und linearisiert. Das Detergens Natriumlaurylsulfat ("Sodium Dodecyl Sulfate", SDS) bindet im Verhältnis der Masse 1,4:1 an Proteine, bildet Mizellen aus und verleiht den Proteinen negative Ladungen. Zur gleichen Zeit wurde das vorgefertigte Polyacrylamid-Gel in Bolt® Mini-Gel-Apparat eingesteckt und mit „Lauf-Puffer“ aufgefüllt. Danach wurde das gleiche Volumen der Lysate in jeder Tasche des Gels aufgetragen. Die unter denaturierenden Bedingungen negativ geladenen Proteine wanderten bei 125 Volt für 40 Min. durch die Poren des diskontinuierlichen SDS Polyacrylamid Gels. Durch die Elektrophorese trennten sich die Proteine nach der Größe auf.

#### **4.8.4. Western Blot**

Es wurde folgender Versuchsaufbau zum Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran gewählt: ein Schwamm, danach ein Filterpapier, das SDS-Gel, die Nitrozellulose Membran, ein Filterpapier und ein Schwamm. Dieser Aufbau wird im Folgenden „Sandwich“ genannt. Die Membran wurde kurz vor dem blotten mit dem Transferpuffer angefeuchtet. Das „Sandwich“ wurde in eine vertikale Kammer eingeklemmt

und mit dem Transferpuffer aufgefüllt. In zwei Stunden bei 30 Volt wurden die im Gel getrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Membran transferiert. Um den Blot-Prozess qualitativ zu prüfen, wurde die Membran nach dem Blotten in Ponceau S Lösung angefärbt. Ponceau S ist als ein Farbstoff, der reversibel an positiv geladenen AS bindet. Damit gewinnt man zunächst einen Überblick darüber, ob die Proteine im Gel gleichmäßig auf die Membran übertragen wurden bzw. ob durch Luftblasen Ungleichmäßigkeiten zu verzichten sind. Die rote Farbe der Ponceau S Lösung auf der Membran lässt sich reversibel mit TBS-T Lösung entfärben. Auf dem Gel konnte man die verbleibenden Proteine mit „Coomassie Brilliant Blue,, anfärben. Der darin enthaltene anionische Farbstoff bindet an die hydrophoben basischen Gruppen der Proteine, wodurch blaue Proteinbanden sichtbar werden.

#### **4.8.5. Immunodetektion**

Die Membran wurde eine Stunde in 5% BSA geblockt und danach mit dem entsprechenden Antikörper bei 4 °C unter Rollen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und anschließend eine Stunde mit dem sekundären Antikörper in 1% BSA/PBS (1:5000), der mit „Horseradish Peroxidase“ (HRP) gekoppelt war, inkubiert. Nach Zugabe des Substrates („Blotting Luminol Reagent“) auf Membran konnten die Proteinbanden (entsprechend der verwendeten primären Antikörper) aufgrund der spezifischen Chemolumineszenz der HRP visualisiert werden. Die Chemolumineszenz wurde mithilfe eines Röntgenfilms („FUJifilms“) in einer Dunkelkammer detektiert. Hierzu wurde der Röntgenfilm zusammen mit der Membran in einer Entwicklungskassette gegeben. Das Silberbromid auf dem Röntgenfilm wird durch das Licht der Chemolumineszenz reduziert und verfärbt sich schwarz. Die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm können mittels eines Proteinmarkers (Roti-Mark 10-150) identifiziert und nach Densitometrie (GS-800) Messung in Programm „Quantity One“ quantifiziert werden. Schließlich wurde vom stimulierten Versuch die Kontrolle auf 1 normalisiert. Die normalisierte Regulation der Expression von Proteinen wurde von mindestens drei Versuchen gemittelt.

#### **4.8.6. Strippen der Proteinbanden**

Bei ausreichendem Abstand der spezifischen Proteinbanden auf der Nitrocellulosemembran (aufgrund von deutlich unterschiedlichem Molekulargewicht) konnten die Banden vorsichtig aus der Membran ausgeschnitten werden um somit eine Membran für die Detektion von zwei oder mehreren spezifischen Proteinen mittels inkompatibler primärer bzw. sekundärer

Antikörper verwenden zu können. Falls kein ausreichender Größenunterschied vorlag, mussten die gebundenen Antikörper auf der Membran durch das sogenannte „Strippen“ wieder entfernt werden. Dies ist eine wichtige Methode um eine Aussage zur Proteinexpression in ein und demselben Lysat machen zu können.

Als Ladekontrolle wurde der Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Gehalt in den verschiedenen Lysaten bestimmt. GAPDH ist ein ubiquitär exprimiertes Haushaltsgen, welches in vergleichbaren Mengen und unbeeinflusst durch die Versuchsbedingungen exprimiert wird.

#### **4.9. Immunfluoreszenz (IF)**

Die humanen Zellen (CAECs und CSMCs) wurden mit RGD-Peptide/Peptidomimetika (FR237, BL562 und SN503) in Suspension versetzt, auf Glasdeckgläschen (beschichtet mit Poly-L-Lysin) ausgesät und zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Zellen 10 Min. mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Während des Blockens (2% BSA) permeabilisierte man zugleich die Zellmembran mit 0,2% Triton-X-100. Bei der Doppelfärbung (pFAK<sub>397</sub> und F-Aktin, s. 3.3) wurde zuerst der primäre Antikörper anti-pFAK<sub>397</sub> (1:200) hinzugefügt, nach dem Waschen mit PBS inkubierte man die fixierten Zellen auf dem Glasdeckgläschen im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper (Goat anti Rabbit, s. 3.3), der mit FITC gekoppelt war und bei einer Wellenlänge von 514nm grün fluoreszierte. Anschließend erfolgte die F-Aktin-Markierung durch Phalloidin (mit Atto 488 gekoppelt, 1:200, s. 3.1) und die Färbung der DNA im Zellkern mittels Hoechst 33342 (1:1000, s. 3.1). Aufgrund der Laseranregung konnte man unter dem Mikroskop durch die Auswahl des Filters pFAK<sub>397</sub>, F-Aktin und Zellkern visualisieren. Als ein prominentes Protein im Komplex der fokalen Adhäsion wurde FAK hier untersucht. FAK liegt an der zentralen Schaltstelle der Signaltransduktion nach dem Integrin-Clustering. Die Aktivierung von FAK ist abhängig von der Autophosphorylierungsstelle 397.

Bei den murinen Zellen wurde zunächst die fokale Adhäsion (durch pFAK<sub>397</sub> und F-Aktin) für WT- und Itgβ1<sup>+ / Pdgfrb-Cre</sup> mASMCs durch die Fluoreszenz-Färbung verglichen. Anschließend wurden Veränderungen der fokalen Adhäsion durch die Zugabe von RGD-Peptiden/Peptidomimetika untersucht.

#### **4.10. Cre/LoxP-Rekombinationssystem**

Das 1980 entwickelte Cre/LoxP-Rekombinationssystem ermöglicht die Zelltyp- bzw. organspezifische Deletion eines Zielgens in der Keimbahn von Organismen. Trotz seines

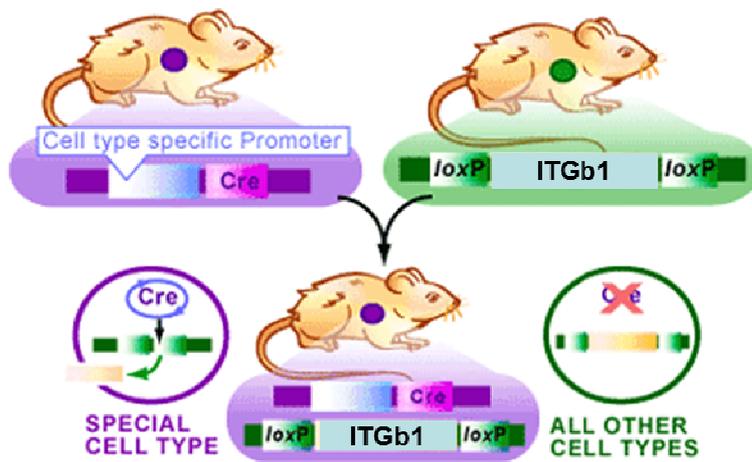
mikrobiellen Ursprungs stellt das System eine effiziente Methode zur Erforschung der Genfunktion in Eukaryoten dar. Das Cre/LoxP-System findet häufig Anwendung bei der Generierung von genetisch veränderten Mäusen ein. Die Cre-Rekombinase, ein 38 kDa großes Protein, stammt aus dem Bakteriophagen P1. Die LoxP-Sequenz (locus of X-over P1) beinhaltet zwei invertierte 13 bp lange Wiederholungen und eine zentrale asymmetrische acht bp Kernregion <sup>[86]</sup>. Das Zielgen wird von zwei LoxP-Sequenzen flankiert. Die Cre-Rekombinase ermöglicht ein „Crossing-over“ der Kernregion zwischen den LoxP-Sequenzen, der flankierte Genanschnitt wird dadurch ausgeschnitten.

In Abb. 11 A wird der gewebespezifische Knockout von  $\beta 1$  Integrin in Mäusen unter Verwendung des Cre/LoxP-Systems veranschaulicht. Zuerst wurde in Maus 1  $\beta 1$  Integrin Gen mit zwei LoxP Sequenzen markiert <sup>[87]</sup>. Danach wurde Maus 1 mit Maus 2 gekreuzt, die eine Cyclization-Rekombinase besitzt <sup>[88]</sup>. Die Cre-Rekombinase löste eine Punktmutation aus. Im Nachkommen erkennt die Cre-Rekombinase die LoxP-Sequenzen (34 bp). Wenn die LoxP-Sequenzen in gleicher Orientierung vorlagen, wurde der von ihnen flankierte Bereich des  $\beta 1$  Integrin Gens ausgeschnitten und eine einzelne LoxP-Sequenz blieb erhalten. Um die Exzision des  $\beta 1$  Integrins gewebespezifisch durchzuführen, wurde die Expression der Cre-Rekombinase durch einen gewebespezifischen Promotor (zum Beispiel für GMZs den Pdgfrb-Promotor) reguliert. Die genetisch veränderten Mäuse wiesen dann den  $\beta 1$  Integrin-Knockout nur in GMZs auf. Die Erzeugung konditionaler Knockout Mäuse ist der Hauptanwendungsbereich des Cre/LoxP Rekombinationssystems. Anders als beim konstitutiven Knockout eines Gens, wobei die Genfunktion in allen Zellen und zu jeder Phase der Entwicklung vom Embryo bis zum adulten Tier, ausgeschaltet wird (häufig mit lethalem Folgen) wird beim konditionalen Knockout die Genfunktion nur gewebespezifisch ausgeschaltet.

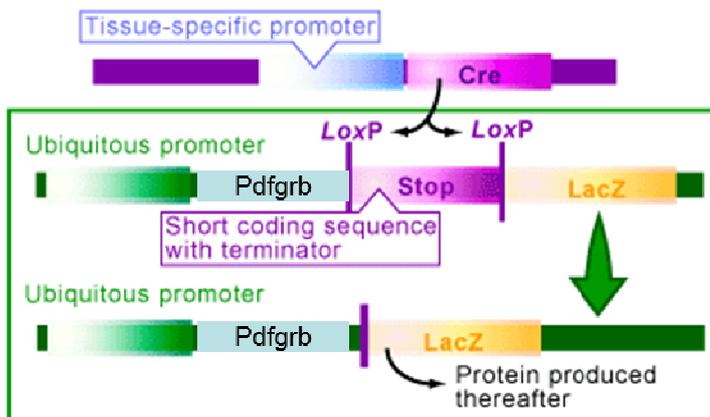
Für die hier beschriebenen Versuche wurde zudem ein lacZ Reporterkonstrukt zur Detektion einer erfolgreichen Rekombination und dadurch Deletion von  $\beta 1$  Integrin in GMZs verwendet. LacZ kodiert für  $\beta$ -Galaktosidase, welche für das Reporterkonstrukt „Downstream“ der LoxP-Sequenz kloniert wurde (Abb. 11 B). Normalerweise wird die Expression des LacZ-Gens durch die geflochte Sequenz geblockt. Erst wenn die Cre-Rekombinase die LoxP-Sequenzen erkennt und ausschneidet, wird diese Inhibition des LacZ-Gens aufgehoben und die  $\beta$ -Galaktosidase wird exprimiert. Sie kann das Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) spalten, wobei ein tiefblaues Produkt (5-Brom-4-

Chlor-Indigo) entsteht. Anhand dieser Farbreaktion ließ sich überprüfen, ob die konditionelle Deletion des  $\beta 1$  Integrins gelungen war.

Der Knockout von  $\beta 1$  Integrin mithilfe des Cre/LoxP Systems wurde bereits in der Literatur beschrieben <sup>[89]</sup>. Die homozygoten Mutanten starben an E5.5 aufgrund von Gastrulationsdefekten während der Embryogenese <sup>[90]</sup>. Der hier verwendete konditionelle  $\beta 1$  Integrin Knockout ließ aber auch Untersuchungen im adulten Tier zu <sup>[91]</sup>.



A



B

**Abbildung 11: Übersicht über Pdgr Cre/LoxP-System.** A. Die Cre-Maus wurde mit der zweiten Maus gekreuzt, bei der das  $\beta 1$  Integrin Gen (ITGb1) von zwei LoxP-Sequenzen flankiert wurde. In den Nachkommen dieser Kreuzung erkennt die Cre-Rekombinase die LoxP-Sequenz, ITGb1 wurde dadurch herausgeschnitten. B. Um das Ausschneiden von ITGb1 gewebespezifisch (hier in GMZ) durchzuführen, wurde die Expression der Cre Recombinase unter die Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors (hier Pdfgrb) gestellt. Nach erfolgreicher Rekombination wurde auch ein Stopp-Codon welches die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase verhindert, entfernt. Das Protein wurde jetzt gebildet <sup>[92]</sup>.

#### 4.11. Genotypisierung von WT- und KO-Mäusen

Der Genotyp von WT- und KO-Mäusen (Cre- und  $\beta 1$  Integrin DNA) wurde mittels der Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“, PCR) ermittelt.

##### 4.11.1. Isolation von muriner DNA

Zur Isolation von muriner DNA wurden die Schwanzspitzen von Mäusen entfernt. Diese wurden 18 Stunden in Lyse Solution mit Proteinase K bei 55 °C in einem Schüttler verdaut. Die murine DNA wurde anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 25:24:1) extrahiert, unter Zugabe von 96% Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation (10 Min. bei 12.000 RPM) wurde die DNA in TE-Puffer bei 4°C gelagert.

Die Konzentration der gewonnenen murinen DNA wurde nach Verdünnung (1:50 bzw. 1:100 in Aquadest.) im Genequant bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Reinheitsgrad ergab sich aus dem Quotient A260/A280 und sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Ein signifikant niedriger oder höherer Wert deutet auf eine Verunreinigung durch Proteine und/oder Phenol hin.

##### 4.11.2. Genotypisierung der Cre- und $\beta 1$ Integrin DNA

Für die PCR wurden 80 ng murine DNA zu einem PCR-Mastermix pipettiert. Dieser Mastermix setzte sich wie folgt zusammen: Primer (Cre und  $\beta 1$  Integrin), Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Taq-Polymerase und PCR-Puffer. Während der PCR wurden die durch die Primer definierten Abschnitte der DNA durch die Taq-Polymerase amplifiziert. Anhand der Größe der erhaltenen PCR-Produkte konnte der Genotyp (WT, Homozygoten- und Heterozygoten Mutante) bestimmt werden (Tab. 1).

**Tabelle. 1: Primersequenzen und PCR-Programme für die Cre- und  $\beta 1$  Integrin Genotypisierung.**

	Cre
<b>Forward Primer</b>	5`-CGG TCG ATG CAA CGA GTG ATG AGG-3`
<b>Reverse Primer</b>	5`-CCA GAG ACG GAA ATC CAT CGC TCG-3`
<b>Zyklus</b>	1x5 Min. 95 °C, 35 x (45 Sek. 95 °C + 45 Sek. 53 °C + 30 Sek. 72 °C), 3 Min. 72 °C, auf 4 °C aufbewahren
<b>Basenpaar (bp)</b>	650 bp
	<b><math>\beta 1</math> Integrin</b>

---

<b>Forward Primer</b>	5`-GGG TTG CCC TTC CCT CTA G-3`
<b>Reverse Primer</b>	5`-GTG AAG TAG GTG AAA GGT AAC-3`
<b>Zyklus</b>	10 x [30 Sek. 94 °C + 30 Sek. (63-0,1,2,3...10) °C + 30 Sek. 72°C], 35 x (30 Sek. 94 °C + 30 Sek. 63 °C + 30 Sek. 72 °C), auf 4 °C aufbewahren
<b>Basenpaar (bp)</b>	WT 350 bp, gefloxt 450 bp

Zur qualitativen Analyse der Genotypisierung-PCR wurden die DNA Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese bei 115V für 90 Minuten separiert. Die DNA Banden der Cre Rekombinase und der  $\beta 1$  Integrine (WT, 350 bp und flankiertes  $\beta 1$  Integrin, 450 bp) wurde auf einem UV-Transillumulator sichtbar gemacht.

#### 4.12. Zellkultur für mASMCs

Die mASMCs wurden unmittelbar nach der Isolation aus der Aorta in der Zellkultur kultiviert. Für jeden weiteren Versuch wurde lediglich nur junge Passage von drei bis sechs von mASMCs benutzt.

##### 4.12.1. Isolation glatter Gefäßmuskelzellen aus der murinen Aorta

Die zu untersuchenden Mäusen wurden mit Pentobarbital euthanasiert. Nach Öffnen der Haut über dem Thorax und dem Abdomen, wurden die Lungen freigelegt. Dann wurde die Aorta durch eine Punktion der linken Herzkammer mit PBS gespült und von Geweberesten gesäubert. Zudem wurden die *Adventitia* und das Fettgewebe entfernt. Dann wurde die Aorta in der Petrischale vertikal durchgeschnitten und in kleinere Teile zerteilt. Im Anschluss folgte ein enzymatischer Verdau des Kollagens der EZM durch Kollagenase II im Penicillin-Streptomycin-Glutamin und Fungizone enthaltenden DMEM-Medium. Sobald sich Zellen aus dem Gewebe gelöst hatten, wurden diese abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, um eine Schädigung dieser Zellen durch die Kollagenase zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen durch Resuspendieren der Zellpellets mit Kulturmedium, wurden die isolierten Zellen bei 400 g in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 700  $\mu$ l Kulturmedium resuspendiert und in eine 48-Well-Platte zur weiteren Kultivierung ausgesät.

##### 4.12.2. Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz wurden pFAK,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) und Calponin von mASMCs detektiert.

#### **4.12.2.1. Detektion nach pFAK**

Die kultivierten mASMCs (isoliert aus WT- und KO-Mäusen) wurden auf Deckgläschen ausgesät. Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung verlief wie bei den humanen Zellen. Das  $\alpha\beta3$  Peptid (BL562) bzw. das  $\alpha5\beta1$  Peptidomimetikum (FR237) wurde zusätzlich zu den Zellen gegeben, um die Inhibition der fokalen Adhäsion zu testen.

#### **4.12.2.2. Detektion nach $\alpha$ -smooth muscle actin und Calponin**

Um die Kontaminationen durch Fibroblasten oder Perizyten während der Isolation bzw. die Kultivierung der Zellen auszuschließen, wurden die kultivierten mASMCs (Passage drei bis sechs) nach den typischen Zellmarkern von GMZs charakterisiert. Calponin und  $\alpha$ -SMA sind zwei wesentliche Zellmarker für GMZs, die während der Embryonalentwicklung und in Erwachsenen reichlich exprimiert werden<sup>[93]</sup>. Bevor die wichtigen Experimente durchgeführt wurden, wurden die zwei Zellmarker mittels IF nachgewiesen.

Die Visualisierung von  $\alpha$ -SMA und Calponin mittels IF in mASMCs (WT- und KO-Mäusen) wurde ähnlich wie für pFAK durchgeführt. Nach dem Blocken wurde jeweils der primäre Antikörper Mouse anti  $\alpha$ -Aktin (1:50) und Rabbit anti Calponin (1:50) auf die Zellen gegeben. Danach folgten die Waschschrte mit PBS und die Zugabe des sekundären Antikörpers (1:50). Beide sekundären Antikörper waren mit FITC gekoppelt. Die Fluoreszenz wurde unter dem Mikroskop überprüft.

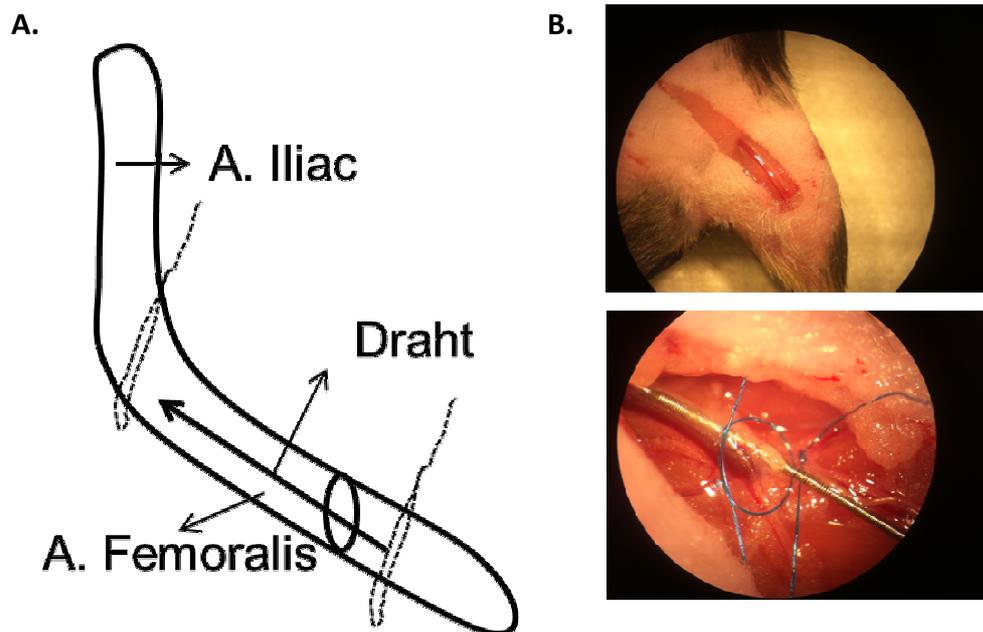
#### **4.12.3. $\beta$ -Gal Färbung *in vitro***

Die mASMCs in 60mm Petrischale wurden zunächst mit PBS gewaschen und mit 3 ml „Fixation solution“ des X-Gal Solution Kits für 10 Min. fixiert. Danach wurden die fixierten mASMCs dreimal mit PBS gewaschen und abschließend mit 2,5 ml „Staining solution“ inkubiert. Das darin enthaltende X-Gal sollte von der  $\beta$ -Galaktosidase innerhalb von zwei Stunden bei 37 °C in ein blaues Produkt umgesetzt werden. Der Anteil an blau gefärbten mASMCs zeigte die erfolgte Rekombination und somit die Deletion des  $\beta1$  Integrin Gens an.

### **4.13. Arteria femoralis Verletzungen**

Für diesen Eingriff wurden ca. 28-30 g schwere Mäuse (WT und Itg $\beta1$ <sup>+ /Pdgfrb-Cre</sup>) durch eine voll antagonistische, intraperitoneale Injektionsanästhesie narkotisiert. Es wurden folgende

Anästhetika zur Narkose verwendet: Midazolam (5,0 mg/kg KG), Medetomidin (0,5 mg/kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG). Zusätzlich erhielten die Mäuse vor der Injektionsanästhesie peroral Novalgin. Die Narkosetiefe wurde anhand des Verlustes des Zwischenzehenreflexes überprüft. Während der gesamten Narkosedauer wurden die Mäuse mit Sauerstoff versorgt und auf einer Wärmematte gelagert. Nach einer Rasur der Haut und Desinfektion wurde unter dem OP-Mikroskop mittels einer kleinen Hautinzision am medialen Oberschenkel das *Arteria (A.) femoralis* Gefäß-Nervenbündel freigelegt. Dann wurde die *A. femoralis* in der Leiste präpariert und mit einem 7/0 Polyethylenfaden ein Stau um die *A. femoralis* vorgelegt, aber noch nicht angezogen. Der distale Gefäßabgang der *A. femoralis* diente dabei als Zugang für den Draht, mit dem eine Verletzung in der Arterie herbeigeführt wurde. Nach Freipräparation des *Nervus femoralis* wurde der Gefäßast distal ligiert und proximal abgeschnürt (7-0 Polyethylenfaden). Mittels Mikrodissektor wurde nach Anlegen des Staus ein Loch geschnitten und anschließend der Draht („Standard guidewire“ für den Herzkatheter, Durchmesser 0,014 inch) eingeführt und in die *A. femoralis* proximal ca. 5 mm vorgeschoben. Der Draht verblieb für eine Min. im Gefäß. Nach Zurückziehen des Drahtes wurde der Seitenast permanent proximal ligiert (Abb. 12). Damit wurde die arterielle Gefäßwand angereizt, was eine arterielle Denudation und einen unmittelbaren Proliferationsanreiz der EZs in diesem Gefäßabschnitt erzeugte.



**Abbildung 12: A. femoralis Verletzungsmodell.** A. Schema der femoralen Verletzung. Distal und proximal wurde die A. femoralis mit OP-Fäden ligiert. B. An der präparierten Einschnittsstelle (B oben, der distal befindliche Gefäßabgang des A. femoralis) wurde ein Draht proximal 5 mm in das Gefäß eingeführt und hierdurch für 1 Min. eine endotheliale Denudation induziert (B unten).

#### 4.14. Vergleich der Morphologie der A. femoralis zwischen Wildtyp und Knockout-Mäusen

Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch Anästhesierung mit Isofluran bis zur Reflexlosigkeit und darauffolgenden Genickbruch. Der Brustkorb der untersuchten Mäuse wurde geöffnet und jeweils PBS und Fixierungslösung wurde in den linken Herzventrikel injiziert. Anschließend erfolgte eine Fixierung der frei präparierten A. femoralis-Gefäße über Nacht bei 4°C in 0,2%ige Glutaraldehyd Lösung. Danach wurde die Gewebeprobe dreimal für 30 Min. mit dem Detergens Puffer gewaschen. Schließlich wurde das Gewebe in einer Alkoholreihe entwässert (Tab. 2). Am nächsten Tag wurden die Gefäße in 60°C heißes Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Schlittenmikrotomes wurden 6 µM dicke Paraffinschnitten des Präparats in transversaler Richtung angefertigt und anschließend auf speziellen Objektträgern für spätere histologische Färbung aufgebracht. Die am Seitenast verbliebenen Ligaturen des Gefäßes dienten als Orientierungshilfe für die Anfertigung der seriellen histologischen Schnitte.

**Tabelle. 2: Entwässerung.**

<b>2 x 30 Min. 70% Ethanol</b>
<b>2 x 30 Min. 96% Ethanol</b>
<b>2 x 30 Min. 100% Ethanol</b>
<b>2 x 30 Min. 100% Xylol</b>

**4.14.1. Histologische Färbung**

Die Schnitte wurden über Nacht bei 60 °C im Brutschrank getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in der folgenden Alkoholreihe entparaffiniert.

**Tabelle. 3: Entparaffinieren.**

• <b>2 x 5 Min. 100% Xylol</b>
• <b>1 x 5 Min. 100% Ethanol</b>
• <b>1 x 5 Min. 96% Ethanol</b>
• <b>1 x 5 Min. 80% Ethanol</b>
• <b>1 x 5 Min. 70% Ethanol</b>
• <b>1 x 5 Min. dd H<sub>2</sub>O</b>

**4.14.1.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Vor der Färbung wurden die Gewebe mit Aceton fixiert, damit sie vor autolytischen Vorgängen geschützt wurden und in möglichst natürlichen Zustand verblieben. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol. Der Zellkern mit der enthaltenen DNA und das raue endoplasmatische Retikulum wurden durch Hämaun blau gefärbt. Zugleich wurden alle acidophilen und basischen Strukturen wie Zytoplasmaproteine und die extrazelluläre Matrix rot gefärbt.

**Tabelle. 4: HE-Färbung.**

• <b>1 x 3 Min. Hämaun</b>
• <b>1 x 5 Min. dd H<sub>2</sub>O</b>
• <b>1 x 10 Min. 0,1%iges Eosin</b>
• <b>1 x 5 Min. dd H<sub>2</sub>O</b>
• <b>1 x 5 Min. 70% Ethanol</b>

- 1 x 5 Min. 80% Ethanol
- 1 x 5 Min. 96% Ethanol
- 1 x 5 Min. 100% Ethanol
- 2 x 5 Min. 100% Xylol

Danach wurde ein Tropfen Eukitt auf jedes Präparat gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die HE-Färbungen wurden lichtmikroskopisch ausgewertet.

#### **4.14.1.2. Elastica-Van-Gieson Färbung**

Um die *Media tunica* und *Intima tunica* in Gefäßen zu analysieren, wurde die Elastica Van Gieson (EvG) Färbung auf den histologischen Gewebeschnitten durchgeführt. Nach dem Entparaffinieren (vergleiche. 4.14.1) wurden die Paraffinschnitte wie folgt inkubiert:

**Tabelle. 5: EvG-Färbung.**

- |   |
|---|
| • 1 x 10 Min. Resorsinfuchsin Lösung (Merck KGaA) |
| • 1 x 5 Min. Leitungswasser                       |
| • 1 x 3 Min. Hämaalaun                            |
| • 1 x 5 Min. Leitungswasser                       |
| • 1 x 5 Min. Pikrofuchsin Lösung (Merck KGaA)     |
| • 1 x 5 Min. dd H <sub>2</sub> O                  |
| • 1 x 5 Min. 70% Ethanol                          |
| • 1 x 5 Min. 80% Ethanol                          |
| • 1 x 5 Min. 96% Ethanol                          |
| • 1 x 5 Min. 100% Ethanol                         |
| • 2 x 5 Min. 100% Xylol                           |

Durch den Resorsinfuchsin Farbstoff wurden die Kollagenfasern rosa angefärbt und die elastischen Fasern (interne-, IEF und externe elastische Fasern, EEF) schwarzviolett. Der Zellkern zeigte aufgrund der Hämaalaune eine braun-schwarze Färbung. Durch das saure Pikrofuchsin wurde das Zytoplasma gelb-braun angefärbt. Danach wurde ein Tropfen Eukitt auf jedes Präparat gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die EvG-Färbungen wurden lichtmikroskopisch ausgewertet.

#### **4.14.1.3. In vivo X-Gal Färbung**

Das frisch präparierte *A. femoralis* Stück von WT- und KO-Mäusen wurden über Nacht in Fixierungslösung (0,2% Glutaraldehyd in PBS) inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Proben dreimal 30 Min. in Detergens-Puffer bei 37°C inkubiert, um verbliebenes Fixans wegzuwaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit X-Gal-Substrat (1:40) bei RT über Nacht. Zum Schluss wurde das Gefäß wie oben (4.14) beschrieben zur Anfertigung von Paraffinschnitten verwendet.

#### **4.14.2. Analyse der Morphologie der *A. femoralis***

Die Abschnitte nach EvG Färbung wurden in 400-facher Vergrößerung mikroskopiert. Die wichtigsten Parameter des vaskulären Systems wurden mit einer histologischen Auswertung bestimmt. Aufgrund der deutlich sichtbaren Lamina nach der EvG-Färbung konnte IEL-, EEL- und Lumen Fläche der Gefäße mithilfe von einem Software Programm „Cell<sup>^</sup>F“ vermessen werden. Anhand der folgenden mathematischen Formeln konnten die weiteren Parameter der Gefäße berechnet werden:

**Intima Fläche=IEL Fläche-Lumen Fläche**

**Media Fläche=EEL Fläche- IEL Fläche**

**Stenose%=100\*Intima Fläche/IEL Fläche%**

#### **4.15. Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde das Statistik-Programm „SPSS statistics 21“ verwendet. Statistische Unterschiede wurden durch einen T-Test berechnet. Die Beurteilung der Werte erfolgte über die Irrtumswahrscheinlichkeit (p). Als statistisch signifikant galt ein p-Wert kleiner als 0,05.

#### **4.16. RGD-Peptide/Peptidomimetika**

In Bezug auf die Biokompatibilität hängt die Effizienz der Modifikation einer Stentoberfläche mit verschiedenen RGD-Peptiden/Peptidomimetika von mehreren Faktoren ab: Effektivität der Zelladhäsion, Zellproliferation und Zellmigration, Selektivität für wichtigsten Zelltypen im vaskulären System (Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Blutplättchen), preiswerte Synthese der RGD-Peptiden/Peptidomimetika und ihre Stabilität gegenüber dem Verfahren der Sterilisation.

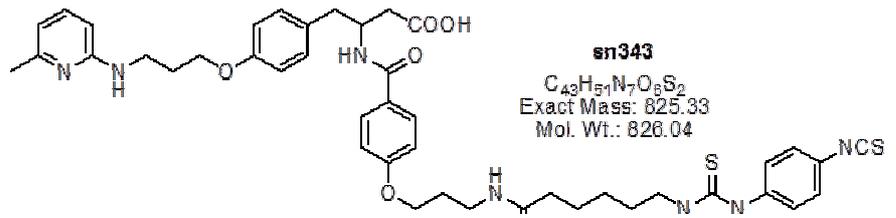
Für den Adhäsions Assay (s. 4.4) wurden  $\alpha\beta_3$  Peptidomimetika SN438 und SN343 (Abb. 13) synthetisiert, die mit einer Isothiocyanat Gruppe ohne Verlust ihrer Aktivität für  $\alpha\beta_3$  Integrin funktionalisiert wurden. Die Peptidomimetika wurden zusätzlich noch mit verschiedenem Lipophile-Profil (Ahx, Hegas und Proline) modifiziert, um eine optimale Länge, Lipophile und Rigidität des Spacers für die Adhäsion der Endothelzellen zu untersuchen<sup>[94]</sup>.

Für die Proliferation-, Migrations Assays und intrazelluläre Untersuchung von EZ und GMZ (s. 4.2, 4.3 und 4.9) wurden  $\alpha\beta_3$  Peptid BL562,  $\alpha\beta_3$  Peptidomimetikum SN503 und  $\alpha_5\beta_1$  Peptidomimetikum FR237 synthetisiert (Abb. 13).

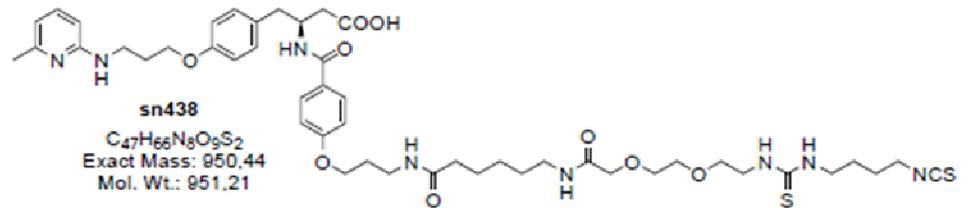
Der hoch aktive  $\alpha\beta_3$ -Ligand Cilengitide bindet unselektiv mit geringerer Aktivität an  $\alpha_5\beta_1$  Integrin. Ein Derivat c(RGDfNMeNal) mit höherer Selektivität, nämlich BL562, wurde in allen *in vitro* Versuchen dieser Arbeit eingesetzt. Die inhibitorische Wirkung von c(RGDfNMeNal) auf die Proliferation von GMZ und die Bildung der Neointima in einem Kaninchen-Modell wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Organische Chemie der Technischen Universität München (Prof. Kessler) publiziert<sup>[95]</sup>.

Für die selektivere Bindung an  $\alpha\beta_3$  Integrin wurde SN503 im Vergleich BL562 verwendet. FR237 wurde als  $\alpha_5\beta_1$ -selektiver Ligand verwendet, welcher eine subnanomolare Aktivität für  $\alpha_5\beta_1$  ( $IC_{50} = 0.86$  nM) mit einer beachtenswerten Selektivität gegenüber  $\alpha\beta_3$  ( $IC_{50} = 9600$  nM) vereint und erstmals von Heckmann et al. beschrieben wurde<sup>[96]</sup>.

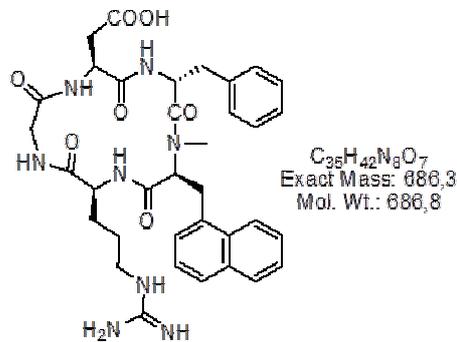
SN343



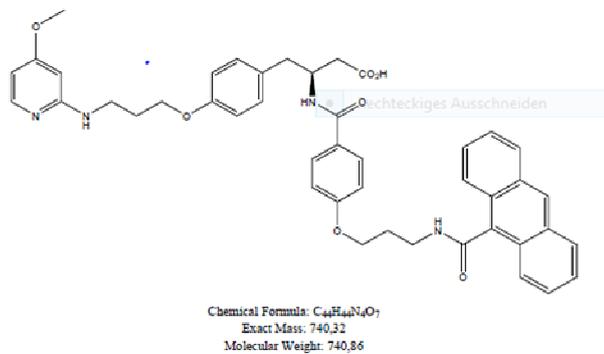
SN438



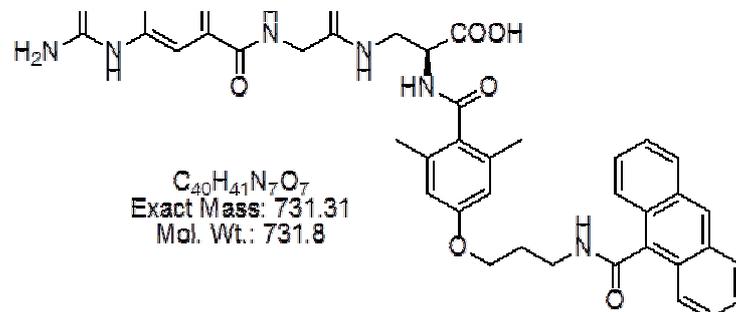
BL562



SN503



FR237



**Abbildung 13:** Struktur von  $\alpha v\beta 3$  Peptidomimetikum SN343, SN438, SN503,  $\alpha v\beta 3$  Peptid BL562 und  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum FR237.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Studiendesign des humanen Projekts

Die Integrinesubtypen  $\alpha\beta3$  und  $\alpha5\beta1$  wurden in CAECs und CASMCs untersucht. Dabei wurden die synthetischen Integrin Liganden RGD-Peptide/Peptidomimetika hinzugegeben. Je nach dem zeitlichen Einfluss der Integrin Liganden und der Stimulation von WFs wurden phosphorylierte FAK und SRC, Adhäsion, Expression der  $\alpha\beta3$ -,  $\alpha5\beta1$  Integrin und ILK, Stentbesiedlung von CAECs, Proliferation und Migration im Detail analysiert (Abb. 14).

Unmittelbarer Effekt: (90 Min.)

Phosphorylierung von FAK und SRC (Replating Assay) sowie Adhäsion

Mittelfristiger Effekt: (3 h)

Regulation von  $\alpha\beta3$ - und  $\alpha5\beta1$  Integrin (FACS)  
Expression von ILK (WB)

Langfristiger Effekt: (Tag 1, Tag 2 und Tag 3)

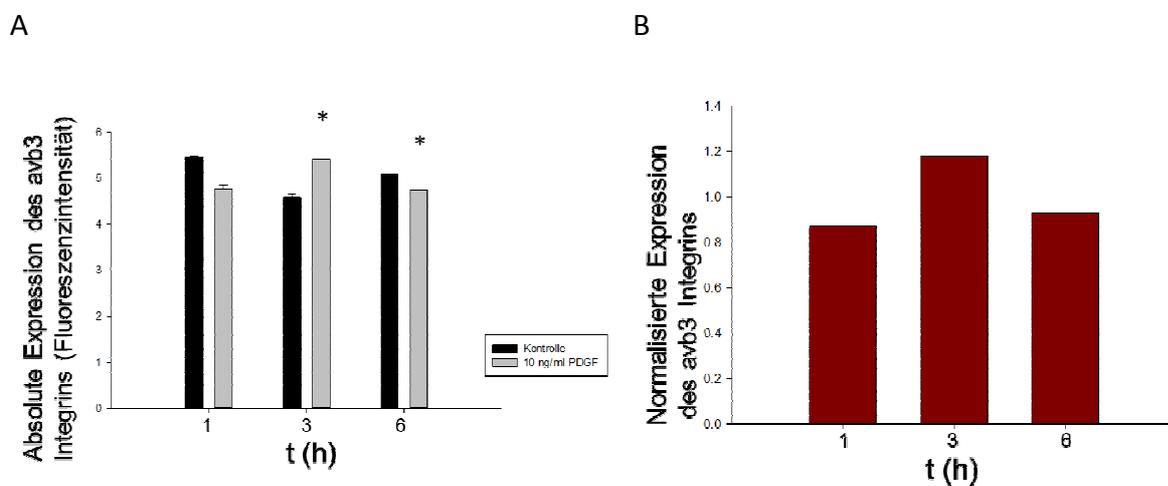
Stentbesiedlung, Proliferation und Migration

**Abbildung 14: Studiendesign für humane primäre Zellen (CAECs und CASMCs).** Die oben beschriebenen Versuche sollten die zellbiologische Funktion von zwei Integrinsubtypen ( $\alpha\beta3$  und  $\alpha5\beta1$ ) in den wichtigsten humanen koronaren Zellen (CAECs und CASMCs) aufklären. Zunächst wurde die sich sehr schnell bildende fokale Adhäsion durch die Phosphorylierung von FAK und SRC 90 Min. nach der Aussaat detektiert. Zur Untersuchung der Stimulation durch spezifische WF für beide Zelltypen wurde die differentielle Expression der o.g. Integrinsubtypen bestimmt. Langfristige Effekte, die durch diese Integrinsubtypen beeinflusst werden, wurden durch Versuche zur Besiedelung von Stents durch CAECs, Proliferationsrate und Zellmigration in Zeitreihen bis zu Tag 3 untersucht.

### 5.2. Integrin Expressionsmuster auf stimulierten CAECs und CASMCs

Assays zur Bestimmung der Proliferationsrate und Zellmigration dienen die Anordnung, welche Integrinsubtypen einen Effekt auf CAECs und CASMCs auszuüben. Es war notwendig, zuerst das Integrin Expressionsmuster durch die Stimulation von WF, die nach PTCA zellspezifisch wirken, zu untersuchen. Die FACS Analyse ermöglichte es, die Expression der aktiven Integrine auf der Zellmembran zu bestimmen.

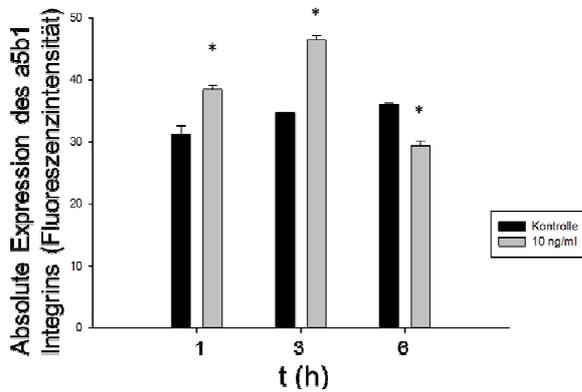
In Abb. 15 A und B wurden die absolute- und die normalisierte Expression des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins gezeigt. Die normalisierte Expression betrug nach einer, drei und sechs Stunden 0,87, 1,18 und 0,93. Die Ergebnisse zeigten, dass die höchste Expression des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins auf CASMCs durch die Stimulation mit 10 ng/ml PDGF nach drei Stunden erfolgte.



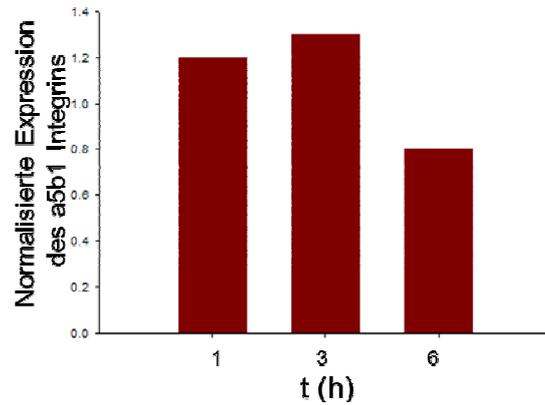
**Abbildung 15:  $\alpha v\beta 3$  Expression auf CASMCs nach PDGF Stimulation.** Expression des  $\alpha v\beta 3$  Integrins nach einer, drei und sechs Stunden. A. Absolute Expression. B. Normalisierte Expression des  $\alpha v\beta 3$  Integrins nach einer, drei und sechs Stunden. \* statistisch signifikant,  $p < 0.05$ .

Ebenfalls wurde die Expression des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins auf CASMCs bestimmt (Abb. 16). Die normalisierte Expression von  $\alpha 5\beta 1$  Integrins war deutlich höher als die des  $\alpha v\beta 3$  Integrins. Nach einer und drei Stunden betrug diese 1,23 bzw. 1,34. Nach sechs Stunden PDGF Stimulation war die Expression des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins 0,81.

A.



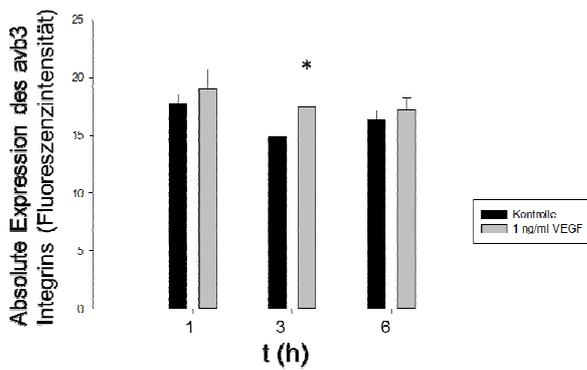
B.



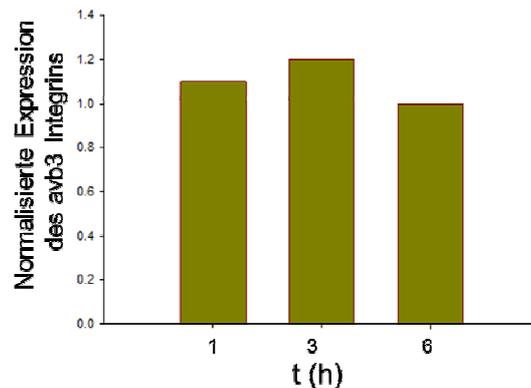
**Abbildung 16:  $\alpha 5\beta 1$  Expression auf CSMCs nach PDGF Stimulation.** A. Absolute Expression des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins nach einer, drei und sechs Stunden. B. Normalisierte Expression des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins nach einer, drei und sechs Stunden. \* statistisch signifikant,  $p < 0.05$ .

Nach dem gleichen Prinzip wurde die Expression beider Integrinsubtypen auf CAECs nach VEGF Stimulation untersucht (Abb. 17 A und B). Nach einer, drei und sechs Stunden Stimulation wurden  $\alpha v\beta 3$  Integrine jeweils um das 1,12-, 1,19- und 1,06-fache verglichen zur unstimulierten Kontrolle. Die normalisierte Expression des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins betrug nach einer, drei und sechs Stunden jeweils 1,04, 1,08 und 1,04 (Abb. 17 C und D).

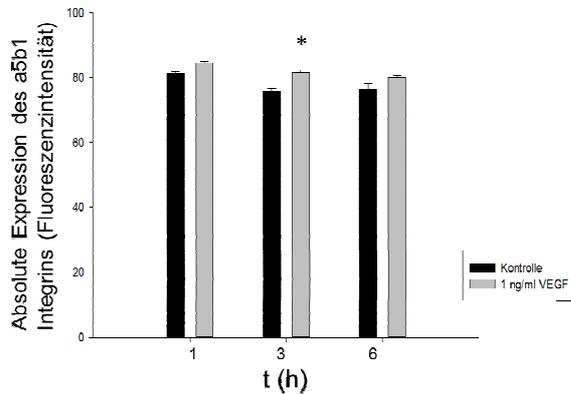
A.



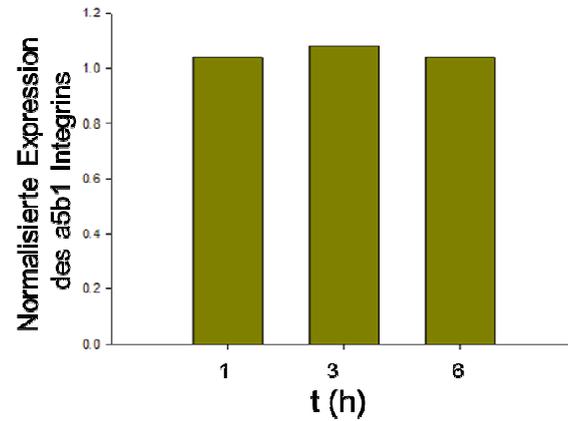
B.



C.



D.



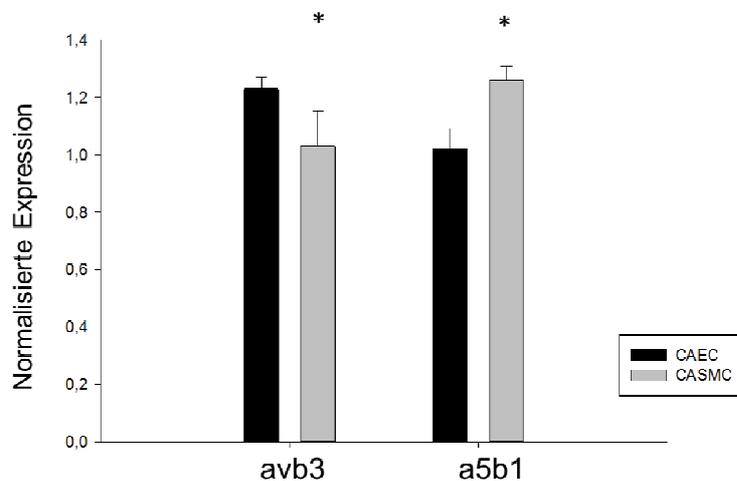
**Abbildung 17: Expression der Integrine  $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha 5\beta 1$  auf CAECs nach VEGF Stimulation.**

Expression des  $\alpha v\beta 3$  Integrins. A. Absolute Expression. B. Normalisierte Expression. Expression des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins. C. Absolute Expression. D. Normalisierte Expression.

\* statistisch signifikant,  $p < 0.05$ .

Es zeigte sich die Tendenz, dass die Integrin Expression beider Zelltypen bei der Stimulation von WF nach drei Stunden am höchsten reguliert war. Die FACS Experimente wurden mit dreistündiger Stimulationszeit, 1 ng/ml VEGF für CAECs und 10 ng/ml PDGF für CASMCs, wiederholt (Abb. 18).

Die Hochregulation des  $\alpha v\beta 3$  Integrins auf CAECs (1,23) war höher als die auf CASMCs (1,03) nach der Stimulation mit spezifischen WF. Das  $\alpha v\beta 3$  Integrin auf CASMCs ließ sich nach Zugabe von PDGF kaum regulieren (Abb. 18, linke zwei Balken). Im Gegensatz zu  $\alpha v\beta 3$  Integrin war die Expression des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins auf CASMCs höher (1,26) als auf CAECs (1,02) (Abb. 18, rechte zwei Balken).



**Abbildung 18: Normalisierte Expression der Integrinsubtypen  $\alpha\beta3$  und  $\alpha5\beta1$ .** \* statistisch signifikant,  $p < 0.05$ .

Es ließ sich kaum Regulation des  $\alpha5\beta1$  Integrins auf CAECs (1,02) und des  $\alpha\beta3$  Integrins auf CASMCs (1,03). Durch VEGF Stimulation wurden 23% mehr  $\alpha\beta3$  Integrine auf CAECs und durch PDGF Stimulation 26% mehr  $\alpha5\beta1$  Integrine auf CASMCs exprimiert.

### **5.3. Inhibition der Proliferationsrate beider Zelltypen**

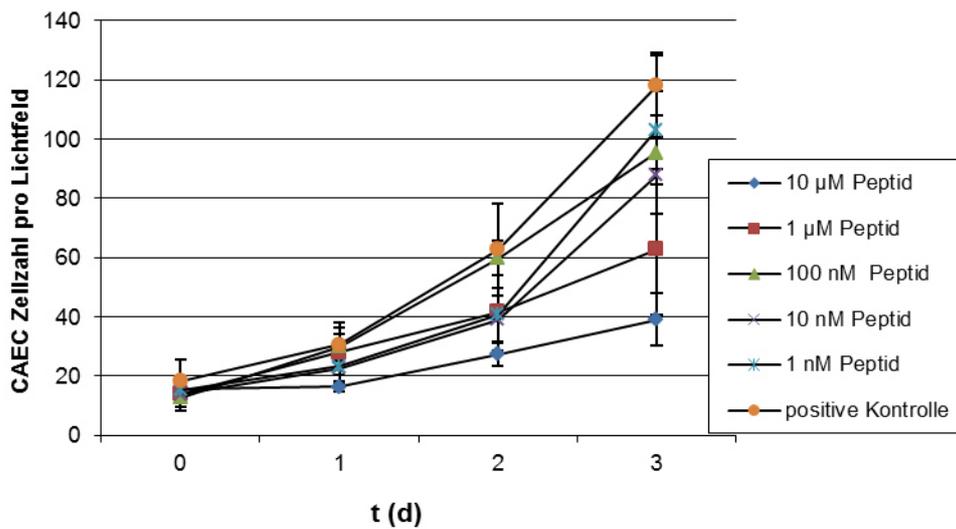
Die Inhibition der Proliferationsrate beider Zelltypen wurde durch die Zugabe der RGD-Peptide/Peptidomimetika getestet.

#### **5.3.1. Proliferationsrate von CAECs und CASMCs bei unterschiedlichen Konzentrationen von Peptiden/Peptidomimetika**

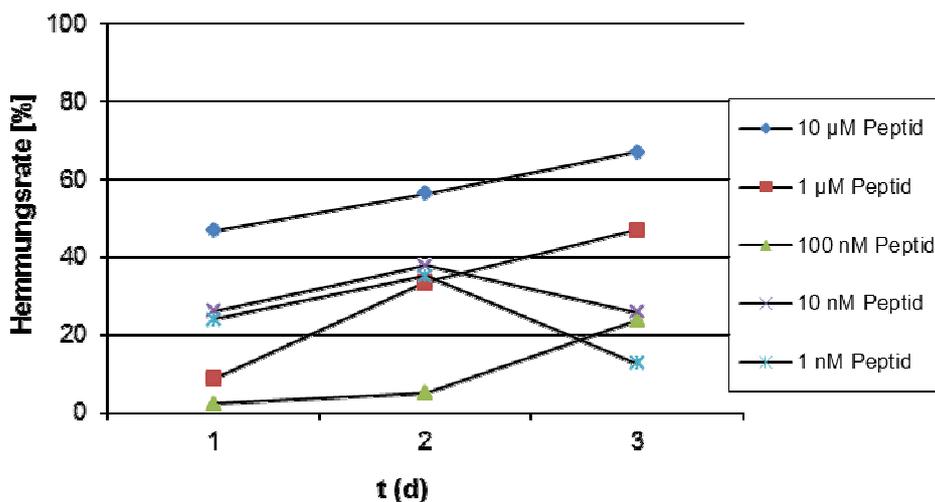
In Proliferations Assays wurden zuerst die Proliferationsrate von humanen koronaren arteriellen Zellen (CAECs und CASMCs) nach Zugabe von  $\alpha\beta3$  Peptid und  $\alpha5\beta1$  Peptidomimetikum (BL562 und FR237) getestet. Nach Anhaften der Zellen auf der Kulturflasche wurden die Peptidlösungen (100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 100 nM, 10 nM und 1 nM) und Kontrolle (nur Medium) aufgebracht. In Abb. 19 wurde die Proliferationsrate von CAECs mit dem  $\alpha\beta3$  Peptid (BL562) vom Tag 0 bis Tag 3 gezeigt.

In Abb. 19 A proliferierten die CAECs nach Zugabe aller getesteten BL562 Konzentration. Wenn man die Kontrolle als Maßstab betrachtet, wuchsen die CAECs proportional zur absteigenden Konzentration an Peptid. Um diese Tendenz anschaulich darzustellen, wurde in Abb. 19 B die Hemmungsrates berechnet. Hier wurde vom Tag 1 bis Tag 3 eine steigende Inhibition mit zunehmender Peptidkonzentration (10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 100 nM) beobachtet. Die Inhibition der Proliferationsrate von CAECs durch 10  $\mu\text{M}$  BL562 war nahezu ab ersten Tag über 50%.

A.



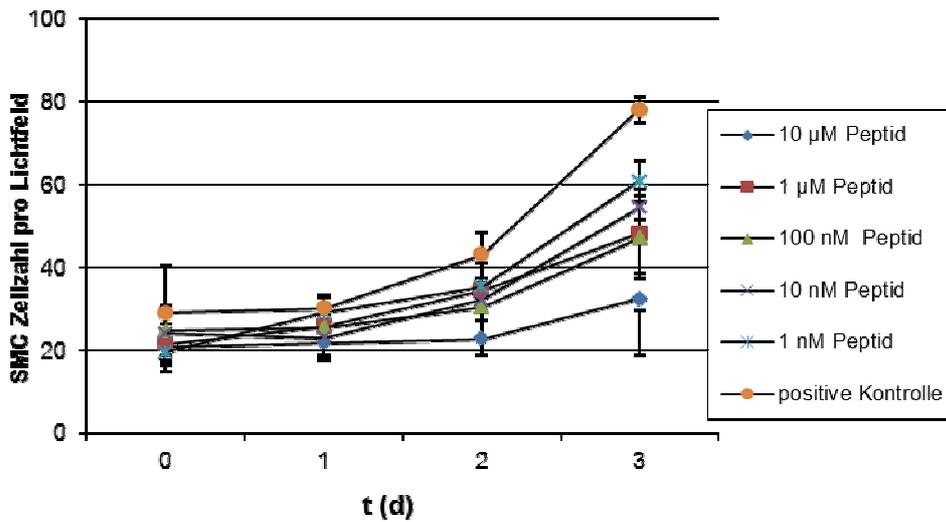
B.



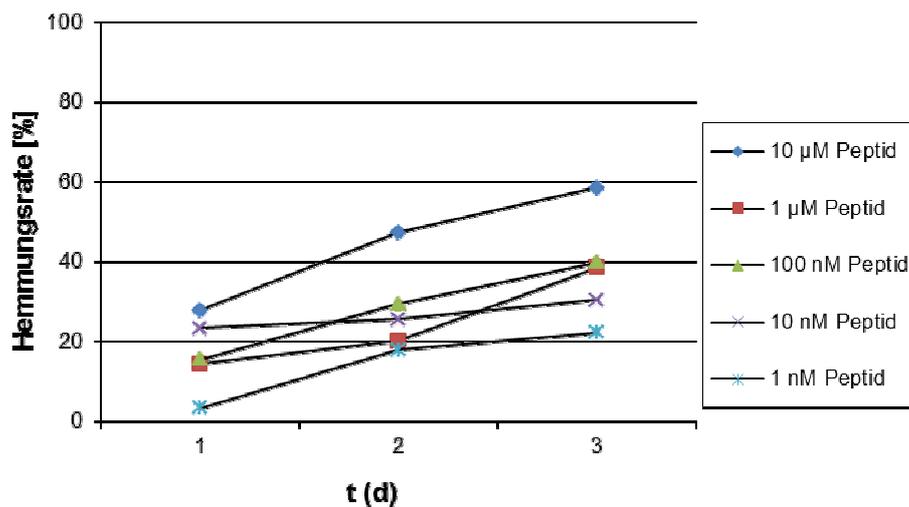
**Abbildung 19: Proliferationsrate und Hemmungsrate von CAECs nach Zugabe verschiedener Konzentration an  $\alpha\beta 3$  Peptid BL562.** A. Darstellung mit der absoluten Zellzahl. B. Darstellung mit der relativen Hemmungsrate im Vergleich zur Kontrolle.

In gleicher Methodik wurde für die Proliferationsrate von CASMCs nach Zugabe von  $\alpha\beta 3$  Peptid (BL562) bestimmt. In Abb. 20 zeigt die Kontrolle am höchsten ansteigende Wachstumskurve. Mit 10  $\mu\text{M}$  BL562 wurde die Proliferationsrate am stärksten inhibiert. Des Weiteren war die Hemmungsrate in allen Ansätzen von BL562 über drei Tagen hinweg steigend. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  BL562 war die Inhibition von CASMCs geringer als die von CAECs (Abb. 20 B vs. Abb. 19 B).

A.



B.



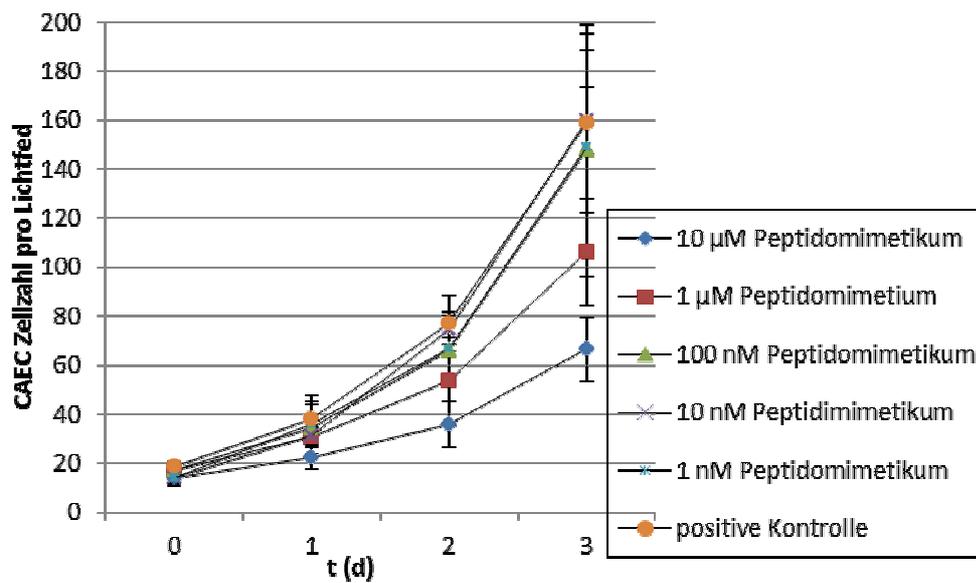
**Abbildung 20: Proliferationsrate und Hemmungsrate von CASMCs nach Zugabe verschiedener Konzentration an  $\alpha\beta 3$  Peptid BL562.** A. Darstellung mit der absoluten Zellzahl. B. Darstellung mit der relativen Hemmungsrate im Vergleich zur Kontrolle.

Die Proliferationsrate beider Zelltypen wurde ebenfalls nach Zugabe von 100 µM BL562 analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Zellen lösten sich bei Zugabe der Peptidlösung sofort von der Zellkulturflasche ab. Die entsprechenden Überstände waren in Lactatdehydrogenase (LDH) Assay negativ. LDH ist ein zelluläres Enzym und gleichzeitig Indikator für die Toxizität der Zellen. In diesem Fall bedeutete es, dass die Konzentration 100 µM von BL562 beider Zelltypen nicht toxisch war.

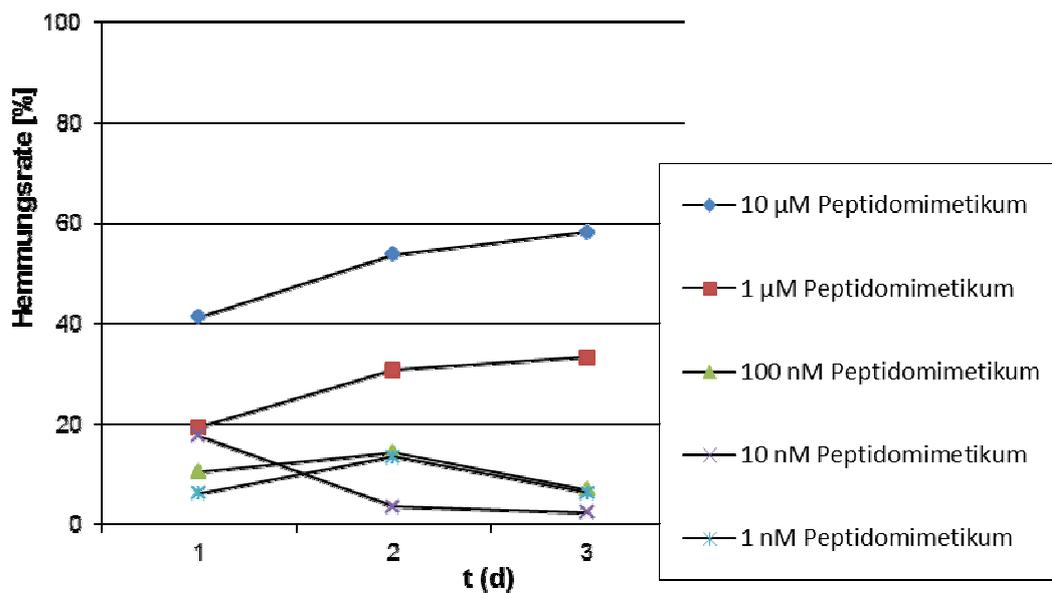
Desweiteren wurde die Proliferationsrate und Hemmungsrate von humanen koronaren Zellen nach Zugabe von  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum (FR237) getestet.

Man konnte in diesem Versuch auch eine starke Tendenz zur Inhibition von CAECs durch Peptidomimetikum FR237 sehen. Die Hemmungsrate von CAECs stieg sowohl nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  FR237 (Abb. 21 B) von Tag 1 bis Tag 3.

A.



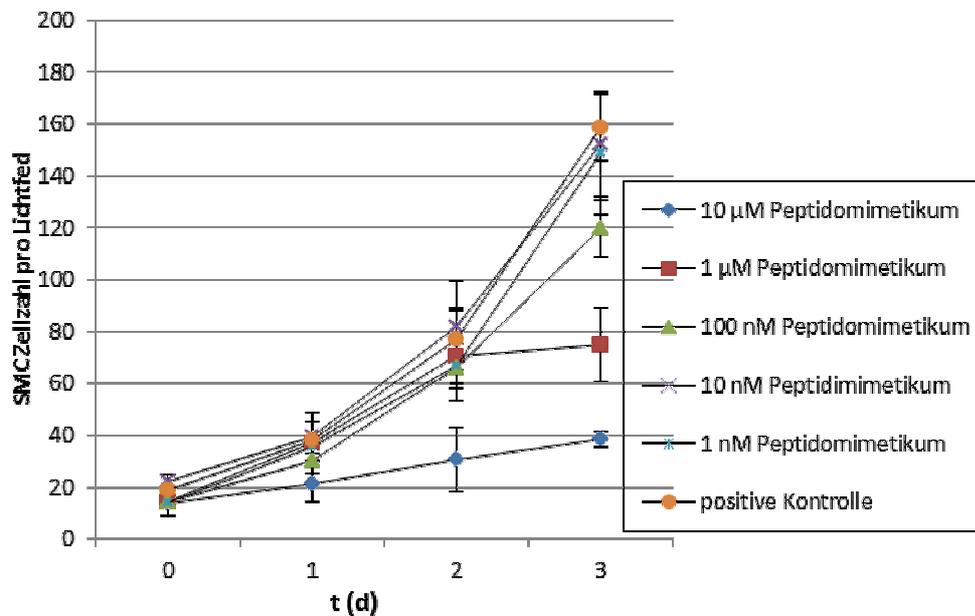
B.



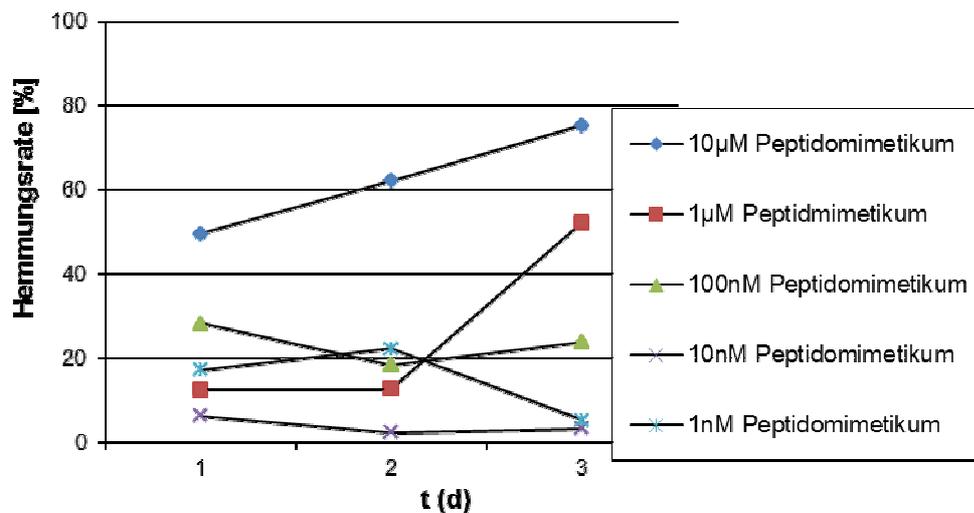
**Abbildung 21: Proliferationsrate und Hemmungsrate von CAECs nach Zugabe verschiedener Konzentration an  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum FR237.** A. Darstellung mit der absoluten Zellzahl. B. Darstellung mit der relativen Hemmungsrate im Vergleich zur Kontrolle.

Zusätzlich wurde der Wachstumsablauf von CASMCs mit  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum (FR237) untersucht. Die Hemmungsrate der CASMCs stieg nach Zugabe von  $\alpha \nu \beta 3$  Peptid (BL562) über alle unterschiedlichen Konzentrationen hinweg an (im vorigen Test, Abb. 20). Im Gegensatz dazu zeigte FR237 (Abb. 22 B) nur bei der Konzentration 10  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  eine kontinuierliche steigende Hemmung der CASMCs von Tag 1 bis Tag 3. Die inhibitorische Wirkung von 10  $\mu\text{M}$  FR237 war allerdings über drei Tage hinweg stärker auf CASMCs als auf CAECs.

A.



B.



**Abbildung 22: Proliferationsrate und Hemmungsrate von CASMCs nach Zugabe verschiedener Konzentration an  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum (FR237).** A. Darstellung mit der absoluten Zellzahl. B. Darstellung mit der relativen Hemmungsrate im Vergleich zur Kontrolle.

Um die inhibitorische Wirkung verschiedener RGD-Peptide/Peptidomimetika auf beider Zelltypen (CAECs und CASMCs) zu repräsentieren, wurde in den folgenden Versuchen die Konzentration 10  $\mu\text{M}$  ausgewählt, um den Effekt in drei unabhängigen Experimenten zu reproduzieren.

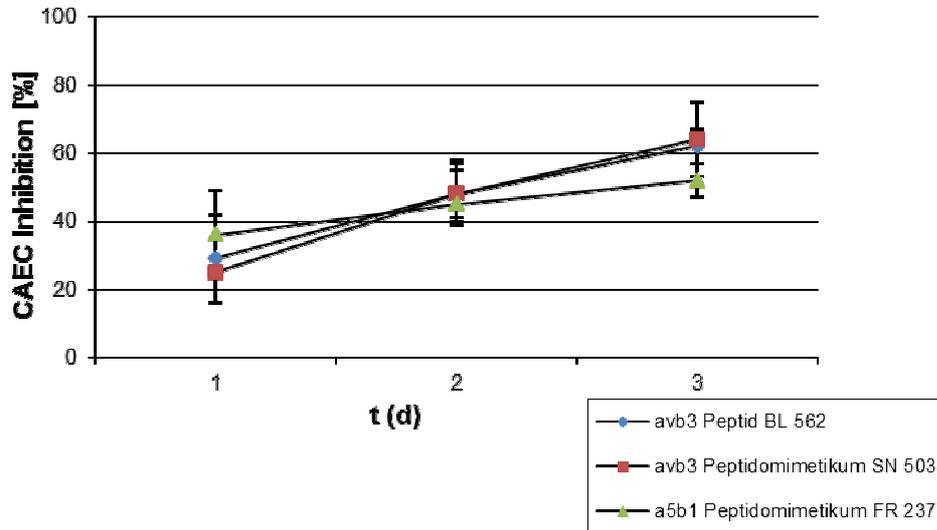
### 5.3.2. Einfluss von 10 $\mu\text{M}$ RGD-Peptide/Peptidomimetika auf die Proliferationsrate von CAECs und CASMCs

Neben  $\alpha\beta 3$  Peptid (BL562) und  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum (FR237) wurde das zusätzlich neu synthetisierte  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetikum (SN503) untersucht. Die berechnete Hemmungsrate für CAECs und CASMCs mit drei RGD-Peptide/Peptidomimetika wurde in Triplikaten bestimmt.

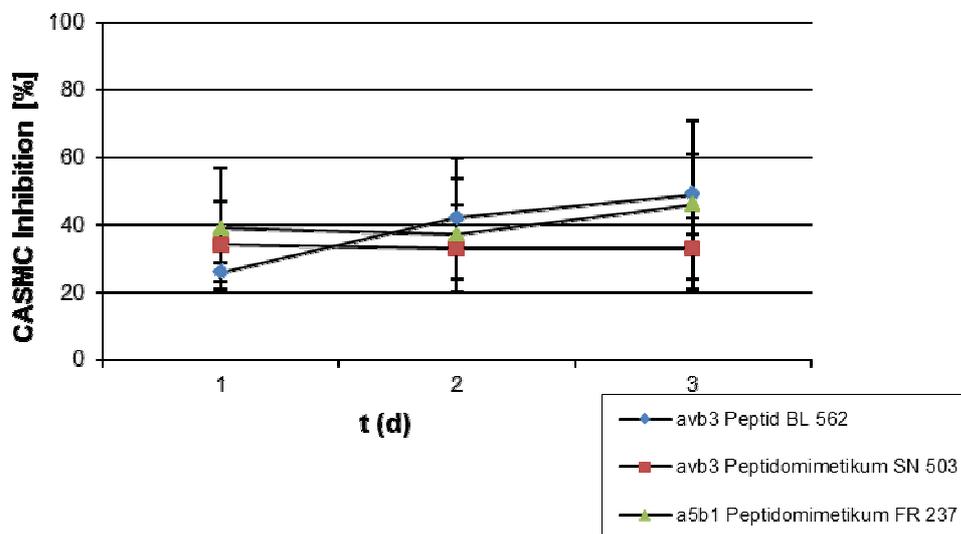
Abb. 23 A zeigt eine relativ heterogene Inhibition der Proliferation von CAECs durch RGD-Peptide/Peptidomimetika. Während zwei  $\alpha\beta 3$  Peptide/Peptidomimetika (BL562 und SN503) eine ansteigende Inhibition bis 64% bzw. 62% am dritten Tag zeigten, war die Inhibition der Proliferationsrate von CAECs durch  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum (FR237) nicht so ausgeprägt (lediglich bis 52% am dritten Tag). CAECs schienen im Proliferations Assay spezifisch durch  $\alpha\beta 3$  Peptid/Peptidomimetikum stärker gehemmt zu werden. Es zeigte sich kaum ein Unterschied zwischen BL562 und SN503 in Bezug auf die Hemmung der Proliferationsrate.

Die drei Kurven der Proliferation von CASMCs (Abb. 23 B) zeigten eine Hemmungsrate unter 50% und waren untereinander nicht signifikant unterschiedlich. Die Inhibition von SN503 auf CASMCs war über drei Tagen unverändert, während die Inhibition von BL562 und FR237 auf CASMCs leicht steigend sich zeigte.

A.



B.



**Abbildung 23: Inhibition der Proliferationsrate von CAECs und CASMCs nach Zugabe von 10  $\mu$ M RGD-Peptiden/Peptidomimetika. A. CAECs. B. CASMCs.**

#### **5.4. Inhibition der Zellmigration von CAECs und CASMCs durch RGD-Peptide/Peptidomimetika**

Die Zellmigration von CAECs und CASMCs wurden durch die Zugabe von mehreren Konzentrationen Peptiden/Peptidomimetika getestet. Gemessen wurden acht, 24 und 48 Stunden nach Zugabe der Integrin Liganden.

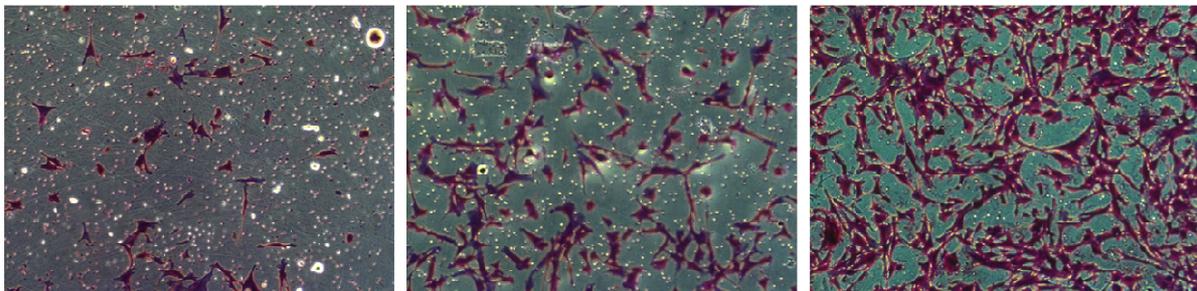
Abb. 24 A zeigt migrierte CAECs auf der unteren Membran eines Inserts nach Kristallviolett-Färbung, nachdem die oben auf der Membran nicht migrierten Zellen durch ein Wattestäbchen weggewischt wurden. Tendenziell zeigte sich in beiden Ansätzen eine Zunahme der migrierten Zellen über die Zeit. Mit 10  $\mu\text{M}$   $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  Peptid (BL562) waren wegen der inhibitorischen Bindung an Integrine eindeutig weniger Zellen zur Migration fähig als in der Kontrolle.

Abb. 24 B zeigt einen Anstieg der Migrationsrate von CAECs bei der Kontrolle und dem Ansatz mit 10  $\mu\text{M}$  BL562. Insgesamt war die Migration mit BL562 an allen Messpunkten geringer als die der Kontrolle.

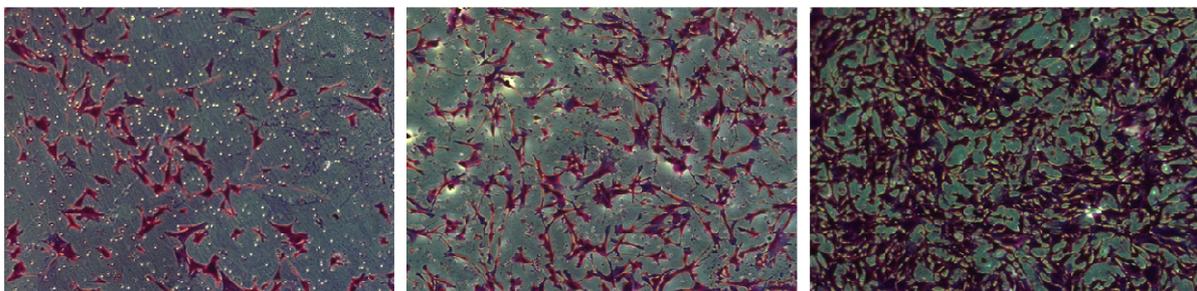
Betrachtet man die Kontrolle ohne Peptid als 100% Zellmigration, führte die Zugabe von BL562 zu einer Hemmungsrate von 21%, 41% und 47% bei der Zellmigration von CAECs zum Zeitpunkt acht, 24 und 48 Stunden.

A.

#### 10 $\mu\text{M}$ Peptid



#### Kontrolle

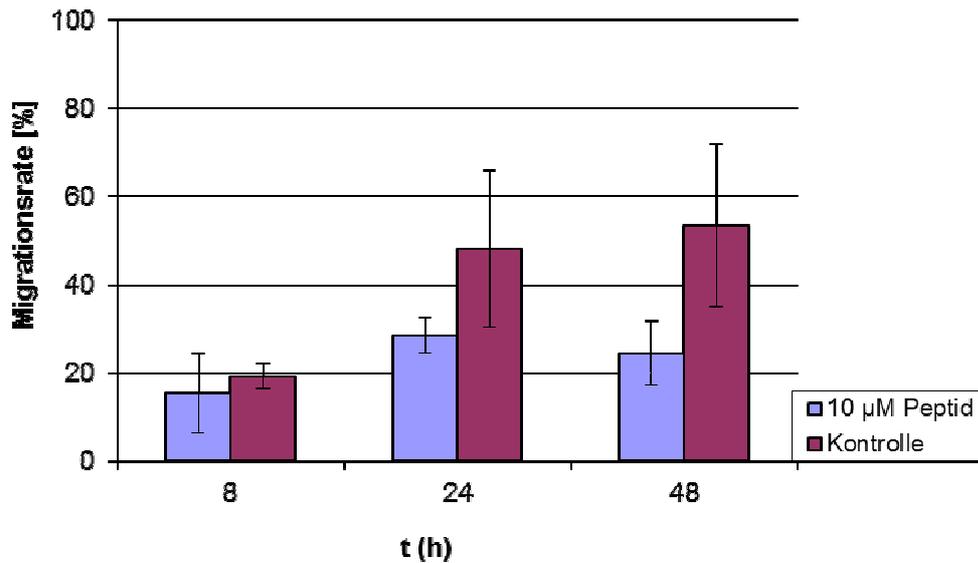


8 h

24 h

48 h

B.



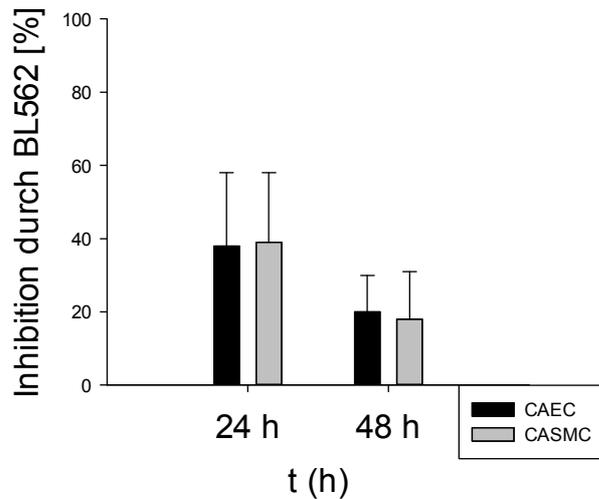
**Abbildung 24: Inhibition der Zellmigration von CAECs nach Zugabe von 10 µM BL562. A. Kristallviolett Färbung. B. Migrationsrate.**

Obwohl eine Inhibition durch 10 µM BL562 zu sehen war, wurde mit einer höheren Konzentration von 50 µM versucht, den Effekt zu steigern. Mit 50 µM BL562 wurde eine Hemmungsrate von 100%, 59% und 36% zum Zeitpunkt acht, 24 und 48 Stunden erreicht (Daten nicht gezeigt). Um einen Kompromiss zu finden, wurde in den folgenden Versuchen die Konzentration von 50 µM gewählt, aber nur nach 24- und 48 Stunden gemessen.

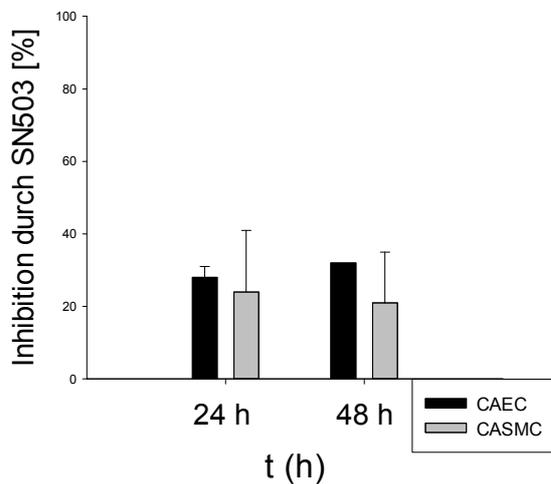
In Abb. 25 sind die Inhibitionsrate der Peptiden/Peptidomimetika für CAECs und CASMCs dargestellt. Bezogen auf die zelltypspezifische Inhibition hatten  $\alpha\beta 3$  Peptid BL562 und  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum FR237 keinen Effekt (Abb. 25 A und C). Zwischen beiden Zelltypen (CAECs und CASMCs) war die Inhibitionsrate nach 24 und 48 Stunden nahezu gleich. Das  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetikum SN503 inhibierte an beiden Zeitpunkten die Zellmigration von CAECs stärker als die von CASMCs.

Die Peptidomimetika SN503 und FR237 zeigten eine konstante Inhibition für beide Zelltypen: die Inhibitionsrate stieg von 24 bis 48 Stunden (außer SN503 für CASMCs) an. Das  $\alpha\beta 3$  Peptid BL562 hatte eine relative höhere Inhibition nach 24 Stunden als die beiden anderen getesteten Peptidomimetika, aber diese Wirkung fiel nach 48 Stunden ab.

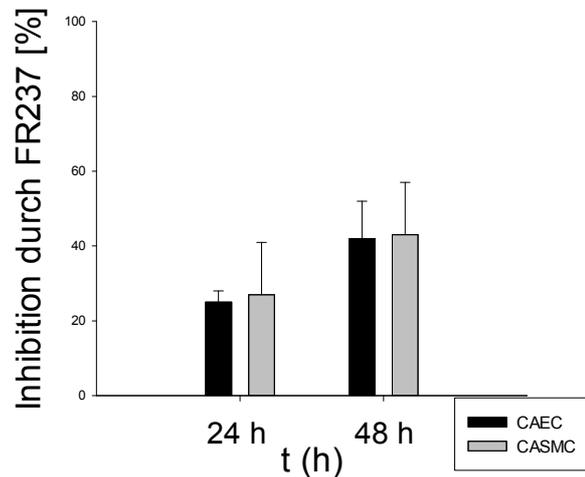
A.



B.



C.



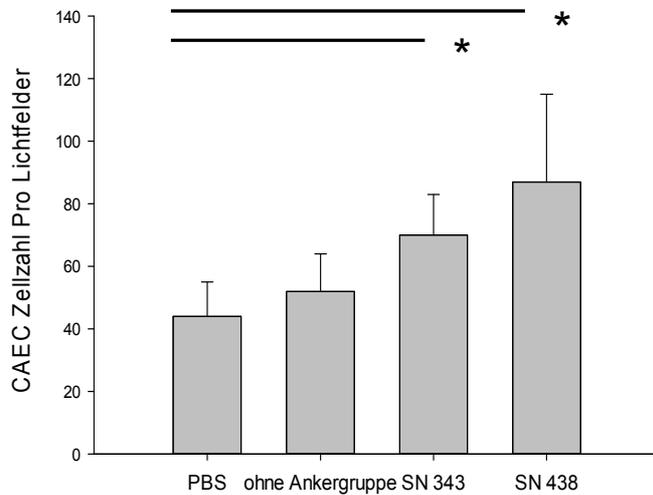
**Abbildung 25: Inhibition der Zellmigration von CAECs und CASMCs nach Zugabe von 50 $\mu$ M RGD-Peptiden/Peptidomimetika. A. BL562. B. SN 503. C. FR237.**

### 5.5. Erhöhte Adhäsion von CAECs

In Adhäsions Assays wurden in drei Serien synthetisierte Peptidomimetika getestet. Dabei wurden sie zuerst aufgrund der Isothiocyanat Gruppe an der Aminogruppe von Chitosan oder Silan auf den Glasplättchen irreversibel gebunden. Mit der synthetisierten  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetika SN438 und SN343 wurde die beste Adhäsionszeit getestet. SN438 ist wegen der Polyethylenglycol (PEG) Gruppe wasserlöslicher als SN343. Nach 90 Min. war die stärkste Adhäsion der CAECs zu beobachten.

Abb. 26 illustriert die absolute Zellzahl von adhärenen CAECs. Man konnte eine deutlich steigende Zellzahl durch SN438 und SN343 im Vergleich zu beiden Kontrollen sehen. Das

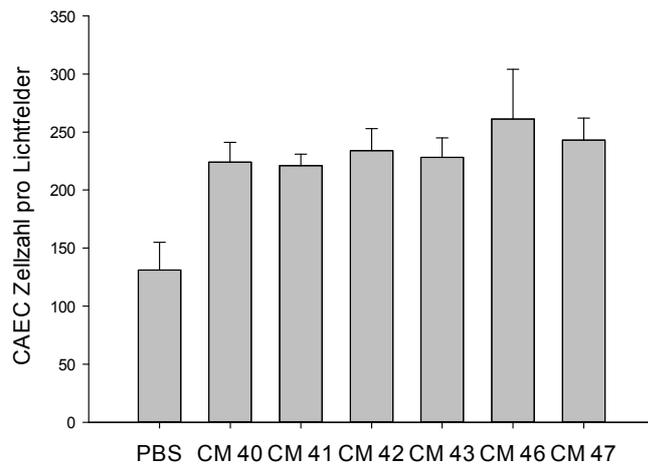
hydrophile SN438 war besser geeignet für CAEC Adhäsion als SN343, aber statistisch war der Unterschied zwischen beider Peptidomimetika nicht signifikant.



**Abbildung 26: Adhäsions Assay von CAECs.** Die Glasplättchen wurde davor über Nacht mit 100  $\mu\text{M}$   $\alpha\beta 3$  Peptidomimetikum SN438 und SN343 beschichtet. Es gab zwei Kontrollen, eine nur mit PBS. Die andere Kontrolle war mit dem RGD-Peptidomimetikum beschichtet, aber die Oberfläche auf den Glasplättchen wurde nicht behandelt, hier als ohne Ankergruppe bezeichnet. \* statistisch signifikant,  $p < 0.05$ .

In der zweiten Serie von Adhäsions Assays wurden verschiedene Spacer Ahx und Hegas in die Grundstruktur gefügt, um zu sehen, ob der räumliche Abstand die sterisch anspruchsvolle Adhäsion verbesserte. In Abb. 27 ist ihre chemische Struktur gezeigt.



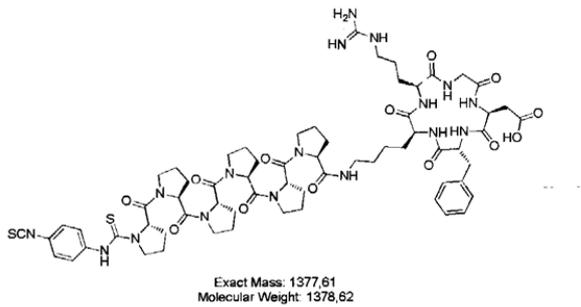


**Abbildung 28: Adhäsions Assay von CAECs.** Die Glasplättchen wurde über Nacht mit 100  $\mu\text{M}$   $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  Spacer Peptidomimetikum beschichtet. Ein Ansatz mit PBS diente als Kontrolle. Alle Spacer Peptidomimetika hatten statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle mit PBS.

Die oben analysierten zwei Adhäsion Assays verwendeten mit Chitosan behandelte Oberfläche auf den Glasplättchen. In der letzten Serie ging es um mit Silan behandelte Oberflächen auf den Glasplättchen, die statt Chitosan an Isothiocyanat binden sollte. Das RGD-Peptidomimetikum hatte diesmal Prolin als Spacer. Die entsprechende Struktur ist in der Abb. 29 gezeigt.

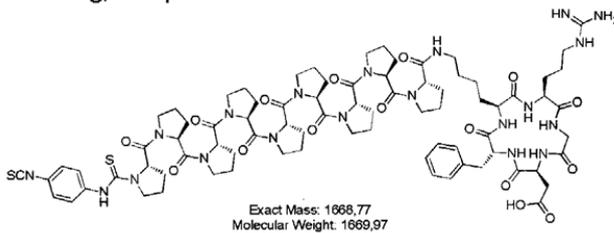
AB423  $\approx$  Ab 385

2.06 mg, 1.5  $\mu$ mol



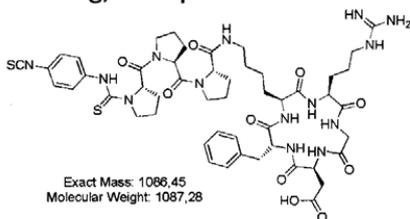
AB424

1.86 mg, 1.1  $\mu$ mol



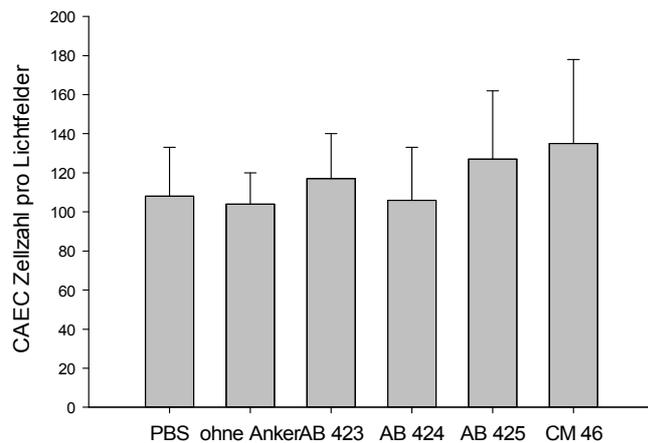
AB425

0.94 mg, 0.87  $\mu$ mol



**Abbildung 29: Chemische Struktur von  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetika mit dem Spacer Prolin.** AB423, AB424 und AB425 hat jeweils sechs, neun und drei Prolin-Reste.

Abb. 30 zeigt die Ergebnisse der CAEC Adhäsion auf den mit Silan vorbehandelten Glasplättchen. Nach Zugabe der Spacer-gekoppelten  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetika AB423, AB424 und AB425. Dabei wurde das zuvor am besten getestete Spacer RGD-Peptidomimetikum CM46 (1 Hegas) mitgetestet. Es war zu sehen, dass AB423, AB425 und CM46 geringfügig mehr CAECs als die Kontrolle auf Silan Glasplättchen brachte. Je kürzer der Prolin-Spacer der RGD-Peptidomimetika konstruiert war, desto mehr war die Adhäsion der Zellen. Unter dem Strich zur Begünstigung der Adhäsion von CAECs war die Silan Glasplättchen schlechter Chitosan Glasplättchen.

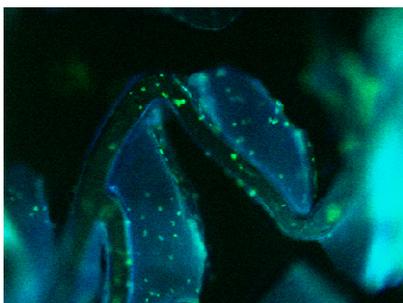


**Abbildung 30: Adhäsions Assay von CAECs.** Die Glasplättchen wurde davor über Nacht mit  $100 \mu\text{M}$   $\alpha\beta 3$  Spacer (Prolin) Peptidomimetikum beschichtet. Diesmal wurde Glasplättchen mit Silan statt mit Chitosan vorbehandelt.

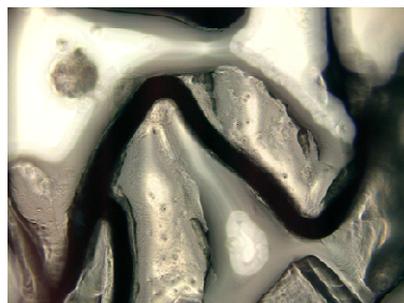
### 5.6. Besiedlung von CAECs auf Stent

Getestet wurde das durch Isothiocyanat funktionalisierte  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetikum SN438. Dazu wurde ein Stent (mit Chitosan behandelte Oberfläche) mittels eines Besprühverfahrens mit SN438 beschichtet. Es wurde die Kolonisation von CAECs auf dem Stent untersucht. Abb. 31 A zeigt auf dem Stent gewachsene CAECs nach 48 Stunden, die in der Zellkolonie auftraten. Ein Kontrolle Ansatz zeigt eher geringen Bewuchs auf einem entsprechenden Kontrolle-Stent (Abb. 31 B).

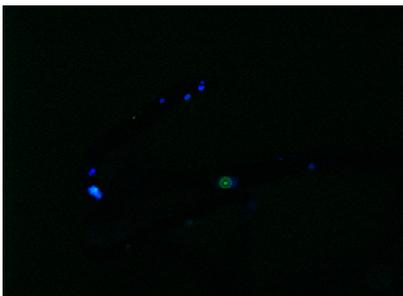
#### A. Overlay\_Dapi\_Phalloidin488



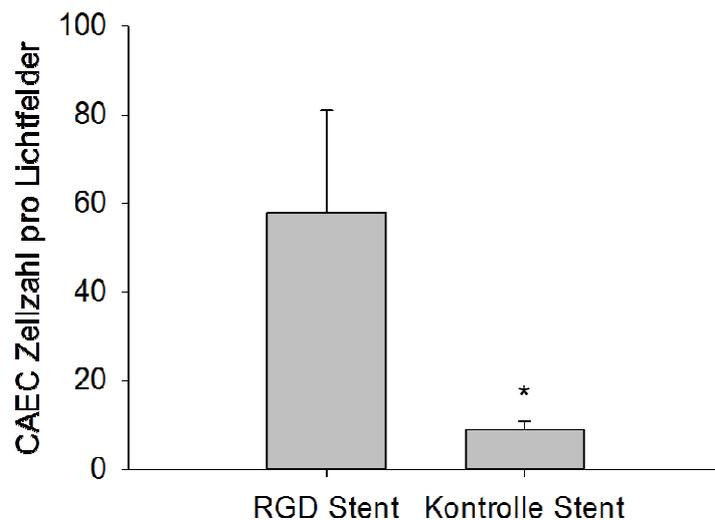
#### Dunkelfeld\_Stent



#### B.



C.



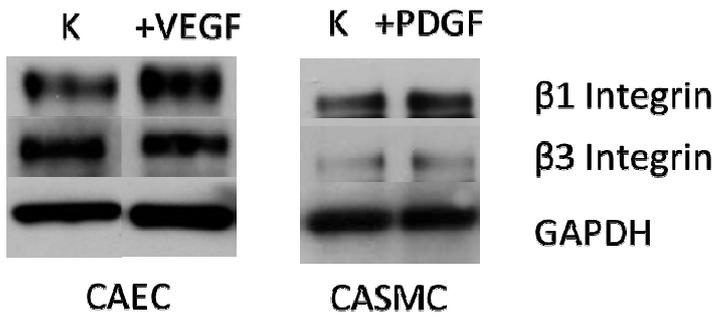
**Abbildung 31: CAEC Besiedlung auf dem Stent.** A. Stent, der mit dem RGD-Peptidomimetikum SN438 beschichtet wurde. B. Kontrolle Stent. Auf der linken Seite sind IF Bilder, wobei die Kernfärbung (blau) mit der Aktinzytoskelett Markierung überlappt wird, auf der rechten Seite ist die Mikroskopie im Dunkelfeld. Auf der rechten Seite von Abb. A und B ist die Dunkelfeldlicht Mikroskopie an der gleicher Position des Stents wie die IF Mikroskopie (links), um das Stent Gerüst im Kontrast zu zeigen. C. Zellzahlung der besiedelten CAECs auf dem Stent. Das Diagramm C ist semiquantitativ über das Resultat der Besiedlung des Stents durch CAECs in beider Variante. \* statistisch signifikant,  $p < 0.05$ .

## 5.7. Veränderte Proteinen-Expression

Die durch Integrin vermittelte Aktivierung von ILK nach WF-Stimulation und eine mögliche Inhibition der über Integrin nachgeschalteten Proteinkinase FAK und SRC durch RGD-Peptide/Peptidomimetika wurden mittels WB untersucht.

### 5.7.1. ILK Regulation nach VEGF- und PDGF Stimulation

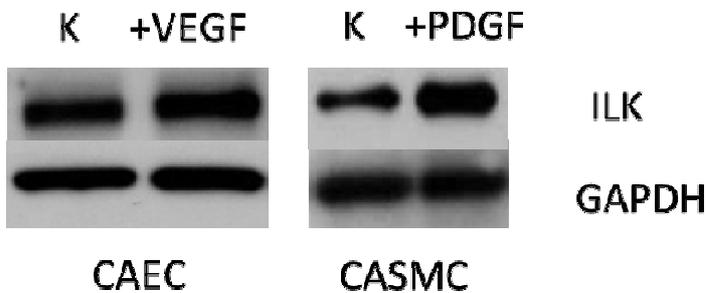
In einem Pilotversuch wurden CAECs und CSMCs jeweils mit VEGF und PDGF stimuliert. Anschließend wurden die Expression von  $\beta 1$ - und  $\beta 3$  Integrin im Lysat mittels WB bestimmt. In Abb. 32 ist zu sehen, dass die Proteinmengen von  $\beta 1$ - und  $\beta 3$  Integrin kaum Veränderung durch die WF Stimulation zeigen. Für die vorliegende Arbeit war es wichtig, die Regulation des kompletten  $\alpha \beta 3$ - und  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin Heterodimers zu erfassen. Es wurde deshalb die Messung der Proteinexpression geteilt: nach Stimulation wurde Integrin Expression mithilfe von FACS (5.2.) und vom gleichen Protein-Lysat die ILK Expression mithilfe von WB gemessen.



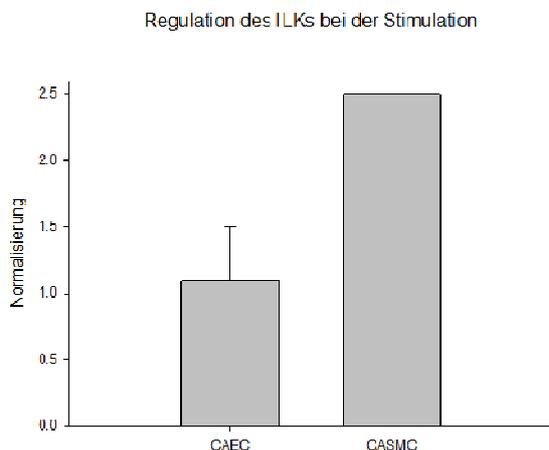
**Abbildung 32: Western Blot der PDGF Stimulation von CASMCs und der VEGF Stimulation von CAECs.** Dabei wurden  $\beta 1$  und  $\beta 3$  Integrin von der gleichen Membran detektiert. „Housekeeping“ Gen GAPDH diente als Ladekontrolle.

Die folgenden Abbildungen zeigt jeweils die ILK Expression nach einer dreistündigen Stimulation von CAECs durch 1 ng/ml VEGF und nach einer dreistündigen Stimulation von CASMCs durch 10 ng/ml PDGF (Abb. 33 A). Während die Stimulation durch VEGF kaum zu Änderungen der ILK Expression führte, erhöhte die Stimulation mit PDGF die Expression von ILK auf das zweieinhalb fache. In FACS Analyse war eine Hochregulation von  $\alpha 5\beta 1$  Integrine von CASMCs in gleicher Stimulation durch PDGF zu sehen (5.2.).

**A.**



**B.**



**Abbildung 33: Western Blot für ILK bei der WF Stimulation.** A. Links, VEGF Stimulation für CAECs. A. Rechts, PDGF Stimulation für CASMCs. ILK Banden sind auf dem ersten Zeile und GAPDH auf der zweiten Zeile. Von jedem Blot ist die Kontrolle auf der linken Spalte, die stimulierte Probe auf der rechten Spalte. B. Normalisierte Expression von ILK für CAECs und CASMCs. ILK: 50 KD, GAPDH: 36 KD.

### 5.7.2. Nachweis der Expression von pFAK und pSRC im Replatings Assay

Um die Inhibition des durch Integrin nachgeschalteten Signals nach Zugabe von RGD-Peptiden/Peptidomimetika zu überprüfen, wurden die Phosphorylierung der wichtigsten Proteinkinasen FAK und SRC mittels WB detektiert. Ihre Phosphorylierung gilt als Indikator für die Aktivierung der Signalkaskade. Dabei wird FAK an Tyr397 und SRC an Tyr426 phosphoryliert. Wie bei den Zellaktivitätstests wurden das  $\alpha\beta3$  Peptid BL562,  $\alpha\beta3$  Peptidomimetikum SN503 und  $\alpha5\beta1$  Peptidomimetikum FR237 in Zellsuspension gegeben. In Abb. 34 ist beispielhaft je ein Blot eines Replatings Assays von CAECs und CASMCs dargestellt. Das RGD-Peptid/Peptidomimetikum wurde in einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  hinzugegeben. In den mit RGD-Peptiden/Peptidomimetika behandelten Proben waren deutlich reduzierte pFAK<sub>397</sub> Banden und pSRC<sub>418</sub> Banden zu sehen.

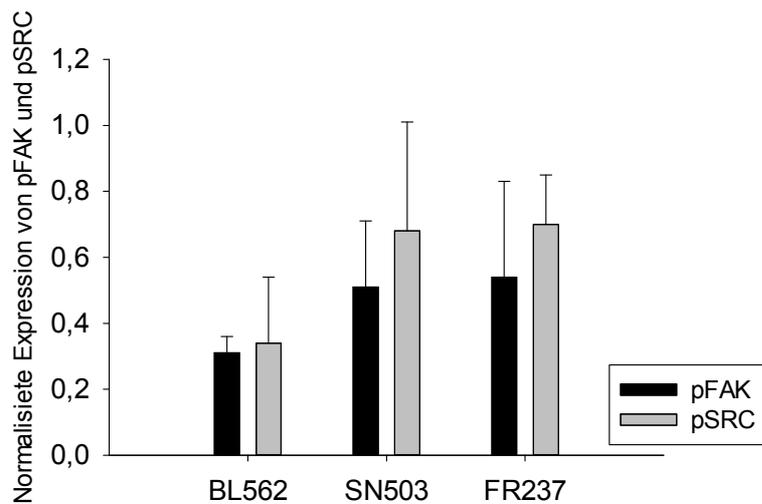
Abb. 34 C zeigt die normalisierte Regulation von pFAK und pSRC in CAECs, wenn die der Kontrolle auf 1 gesetzt wird. Tendenziell wurde pFAK und pSRC bis zu 54% durch  $\alpha\beta3$ - (SN503) beziehungsweise bis zu 70% durch  $\alpha5\beta1$  Peptidomimetikum (FR237) herab reguliert. Durch Zugabe von  $\alpha\beta3$  Peptid BL562 wurde jeweils 69% weniger pFAK und 66% weniger pSRC in CAECs verglichen mit der Kontrolle exprimiert. Alle drei RGD-Peptide/Peptidomimetika haben stärkere Inhibition an pFAK als pSRC in CAECs.

A. CAECs

B. CASMCs



C.



**Abbildung 34: Expression von pFAK und pSRC beim Replating Assay.** Replatings Assay von A. CAECs. B. CASMCs. In der ersten Spalte wurden jeweils Kontrollen ohne RGD-Peptid/Peptidomimetikum im Blot aufgetragen. C. Normalisierte Expression von pFAK und pSRC in CAECs.

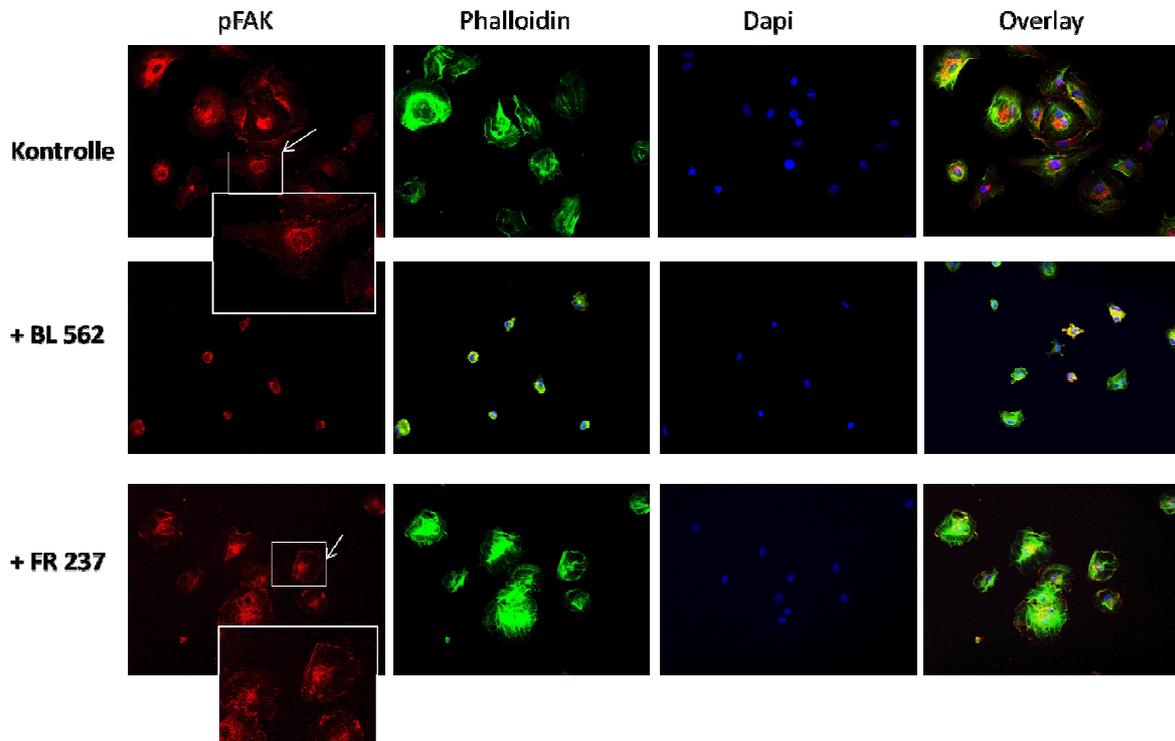
Es gab keine ausreichende Anzahl von Replatings Assays von CASMCs, um eine Aussage über die Inhibition der Proteinkinase vergleichend zwischen beiden Zelltypen durch RGD-Peptide/Peptidomimetika zu machen. Die Daten von WB zeigten, dass die Phosphorylierung von FAK und SRC durch die drei getesteten RGD-Peptide/Peptidomimetika beeinträchtigt wurde.

### 5.8. Nachweis von pFAK mittels Immunfluoreszenz

Mithilfe von Immunofluoreszenz (IF) wurden pFAK, F-Aktin und die nukleäre DNA von CAECs und CASMCs gefärbt, um anhand der wichtigsten Komponenten fokale Adhäsionen nachzuweisen. Es wurden synthetisiertes  $\alpha\beta3$  Peptid BL562 und  $\alpha5\beta1$  Peptidomimetikum FR237 dazugegeben.

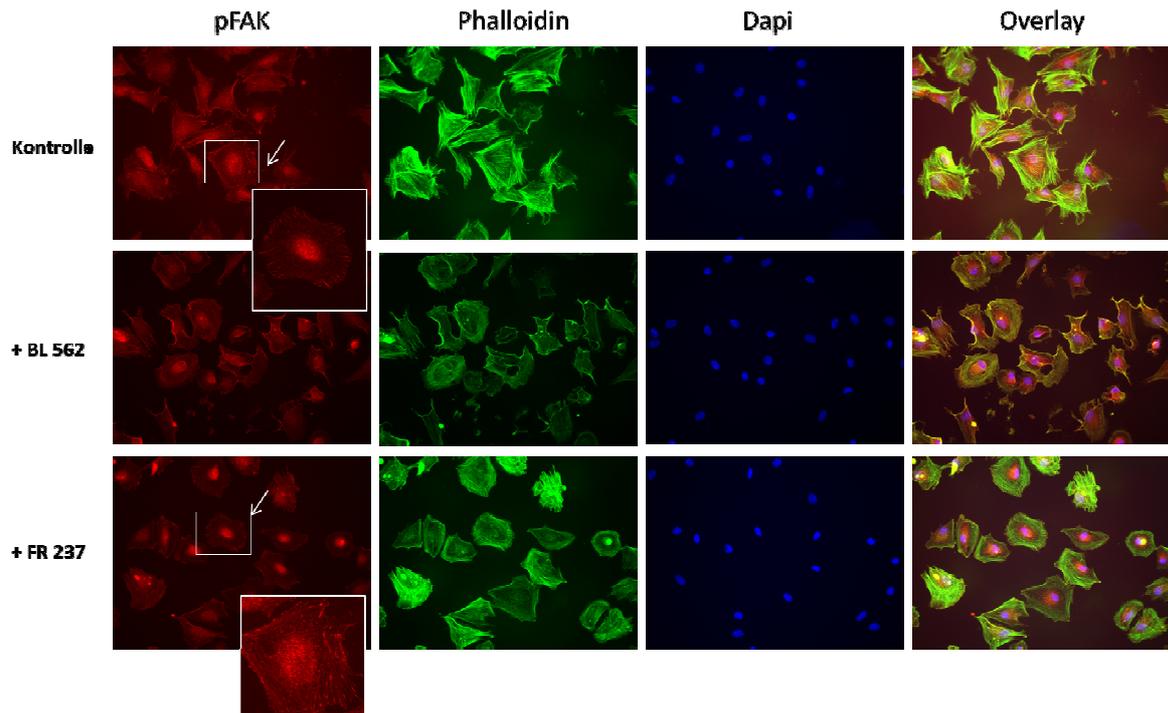
Die positive Färbung von pFAK<sub>397</sub>, ein Zeichen für die erfolgreiche fokale Adhäsion ist in Abb. 35 bei der Kontrolle und mit FR237 inkubierter CAECs zu sehen. Punktartige rote Färbungen von FAK um die Zellen wurden in der Abb. 35 (links oben und unten) mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Der Zellkern wurde durch die Autofluoreszenz unspezifisch ebenfalls rot gefärbt. In Anwesenheit von BL562 waren die CAECs abgerundet und hatten kein pFAK<sub>397</sub>. Die Zytoskelette F-Aktine durch die Phalloidin Färbung schrumpften bei der mit BL562

behandeten CAECs im Vergleich (zweites Bild in der mittleren Zeile) zu den anderen zwei Ansätzen.



**Abbildung 35: Fokale Adhäsion von CAECs.** pFAK<sub>397</sub> wird mittels weißen Pfeils gekennzeichnet. Phalloidin färbt F-Aktin und dadurch wird der Zellkörper sichtbar. Die nukleare DNA wird durch die Dapi-Färbung markiert. In der letzten Spalte ist das überlagerte Bild der drei Färbungen dargestellt. Zu CAECs wurden BL562 (zweite Zeile) und FR237 (dritte Zeile) Peptidlösung zugegeben. 400-fache Vergrößerung.

Die pFAK<sub>397</sub> wurde durch solche punktförmige (Abb. 36, oben links mit weißem Pfeil gezeigt) Markierung am Rand der Zellmembran charakterisiert. Bei der Kontrolle waren fast alle Zellen pFAK aktiv. Nach Zugabe von  $\alpha\beta 3$  Peptid BL562 wurde kaum pFAK<sub>397</sub> beobachtet. Mit  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum FR237 reduzierte die Phosphorylierung von FAK<sub>397</sub> und war noch in wenigen Zellen detektierbar (Abb. 36, unten links, mit weißem Pfeil gekennzeichnet).



**Abbildung 36: Fokale Adhäsion von CASMCs.** Auf pFAK<sub>397</sub> wird mittels weißen Pfeils gekennzeichnet. Phalloidin färbt F-Aktin und dadurch wird der Zellkörper sichtbar. Die nukleare DNA wird durch Dapi-Färbung markiert. In der letzten Spalte ist das überlagerte Bild der drei Färbungen dargestellt. Zu CASMCs wurde BL562 (zweite Zeile) und FR237 (dritte Zeile) Peptidlösung zugegeben. 400-fache Vergrößerung.

## 5.9. Studiendesign des murinen Projekts

Im Mausprojekt wurde einerseits die veränderte Zellaktivität untersucht, nachdem das  $\beta 1$  Integrin mittels Cre/LoxP Rekombinationssystem konditional in GMZs delegiert wurde. Andererseits wurde die Neointima Bildung nach femoraler Verletzung zwischen WT- und KO-Mäuse morphologisch verglichen.

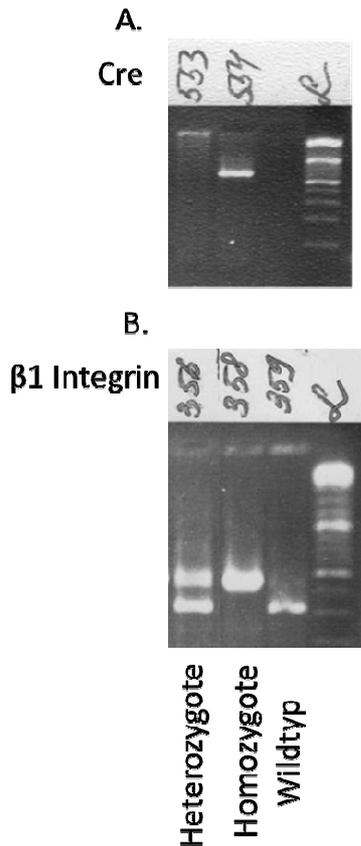


**Abbildung 37: Studiendesign für  $\beta 1$  Integrin Knockout-Mäuse.** Im Cre/LoxP Rekombinationssystem wurden die Genotypen der Mäuse mithilfe von PCR und X-Gal Färbung charakterisiert und überprüft. Unterschiedliche zellbiologische Parameter wie Proliferationsrate und Zellmigration wurden bei WT- und KO-Mäuse untersucht. Zusätzlich wurde der Prozess der Restenose nach femoraler Verletzung durch histomorphometrischen Parameter analysiert.

## 5.10. Genotypisierung von Cre und $\beta 1$ Integrin

Die Genotypen der untersuchten Mauslinien wurden mittels PCR ermittelt. Dabei wurden die Banden von Cre und  $\beta 1$  Integrin detektiert. In Abb. 38 A wurde eine Cre-Bande (Nr. 534) hingewiesen. Sie besaß eine Cre-Rekombinase mit einer Größe von 650 bp. Währenddessen war die andere Mauslinie (Nr. 553) Cre negativ. Bei der Detektion der  $\beta 1$  Integrin-Banden zeigten sich alle drei Genotypen: jeweils ein Wildtyp, eine Heterozygote und eine

Homozygote (Abb. 38 B). Die Cre positiven und  $\beta 1$  Integrin Homozygoten wurden in den Versuchen aussortiert, wobei diese keine X-Gal Färbung aufwiesen. Die X-Gal Färbung diente als Indikator für den Erfolg des Ausschneidens des  $\beta 1$  Integrin-Genabschnitts durch den Reporter  $\beta$ -Galaktosidase. Die folgenden zwei Mauslinien wurden vergleichend untersucht: Wildtyp der Kontroll-Maus und die Cre positive,  $\beta 1$  Integrin heterozygote ( $Itg\beta 1^{+/Pdgfrb-Cre}$ ) Knockout-Maus.



**Abbildung 38: Cre- und  $\beta 1$  Integrin Gelbanden.** Detektion der Gelbande von A. Cre; B.  $\beta 1$  Integrin. Es gibt je nach Maustypen drei verschiedene Banden von  $\beta 1$  Integrin. Es wurde in der letzten Geltasche eine DNA-Leiter (L) aufgetragen, um die Größe der amplifizierten Genabschnitte bestimmen zu können.

## 5.11. Zellkulturen der mASMCs

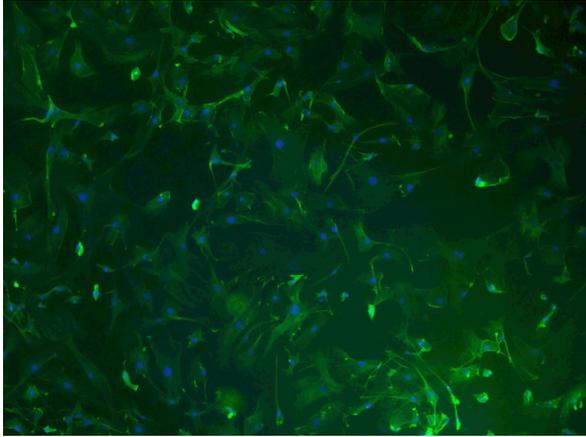
mASMCs von WT- und KO-Mäuse wurden nach der Kultivierung für die Charakterisierung der GMZs, die Überprüfung des Knockouts von  $\beta 1$  Integrin und die Zellaktivität verwendet.

### 5.11.1. Identifizierung von Calponin und $\alpha$ -smooth muscle actin

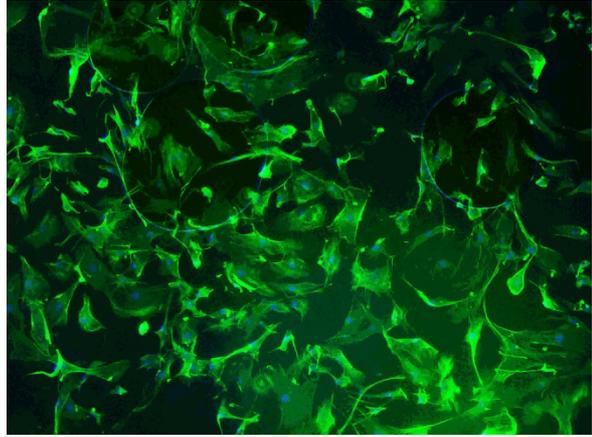
Die Calponin- und  $\alpha$ -SMA Färbungen der isolierten mASMCs waren alle positiv. Das deutete darauf hin, dass es sich bei kultivierten Zellen nach Isolation aus der nativen Aorta

ausschließlich um GMZs handelte. Eine potentielle Zellkontamination konnte somit ausgeschlossen werden. Nichtsdestotrotz wurde aufgrund einer möglichen Dedifferenzierung der mASMCs über die Zeit nur die Passagen drei bis sechs verwendet.

A.



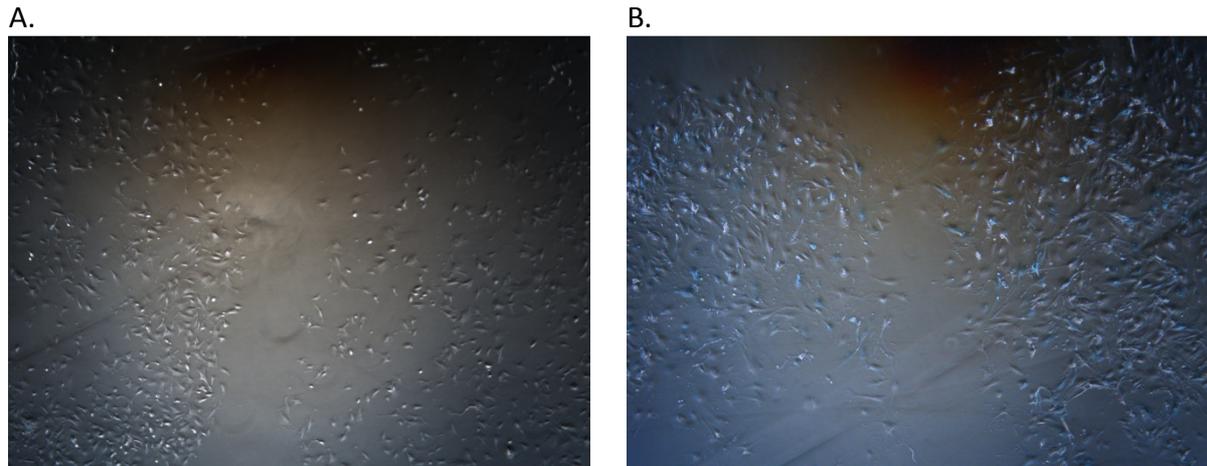
B.



**Abbildung. 39: Immunfluoreszenz von Zellmarkern der GMZs.** A. Calponin. B.  $\alpha$ -SMA. Nach Bindung des primären Antikörpers an beide Zellmarker wurde die Fluoreszenz mit dem gleichen sekundären Antikörper detektiert. Die DNA im Zellkern wurde mittels Dapi blau angefärbt. 100-fache Vergrößerung.

### 5.11.2. Überprüfung des Knockouts von $\beta$ 1 Integrin mittels X-Gal-Färbung

Der gelungene Knockout des  $\beta$ 1 Integrins wurde in Zellkultur mittels X-Gal Färbung identifiziert. Wie in Abb. 40 A dargestellt waren Wildtypzellen in der X-Gal Färbung negativ. Dahingegen waren  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs (Abb. 40 B) zum großen Teil blau angefärbt, wobei der Genabschnitt des  $\beta$ 1 Integrins von nur einem Allel durch die Cre-Rekombinase ausgeschnitten wurde. Die Cre+ homozygoten Mutanten wurden bezüglich der negativen X-Gal Färbung aussortiert. Mit späterer Passage verloren  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs ihren Anteil an  $\beta$ 1 Integrin negativen Zellen. Aufgrund dieser Beobachtung wurden in den folgenden zellbiologischen Assays nur die jungen Passagen (drei bis sechs) versendet. Es wurden  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs mit über 50% positiver X-Gal Färbung ausgewählt.

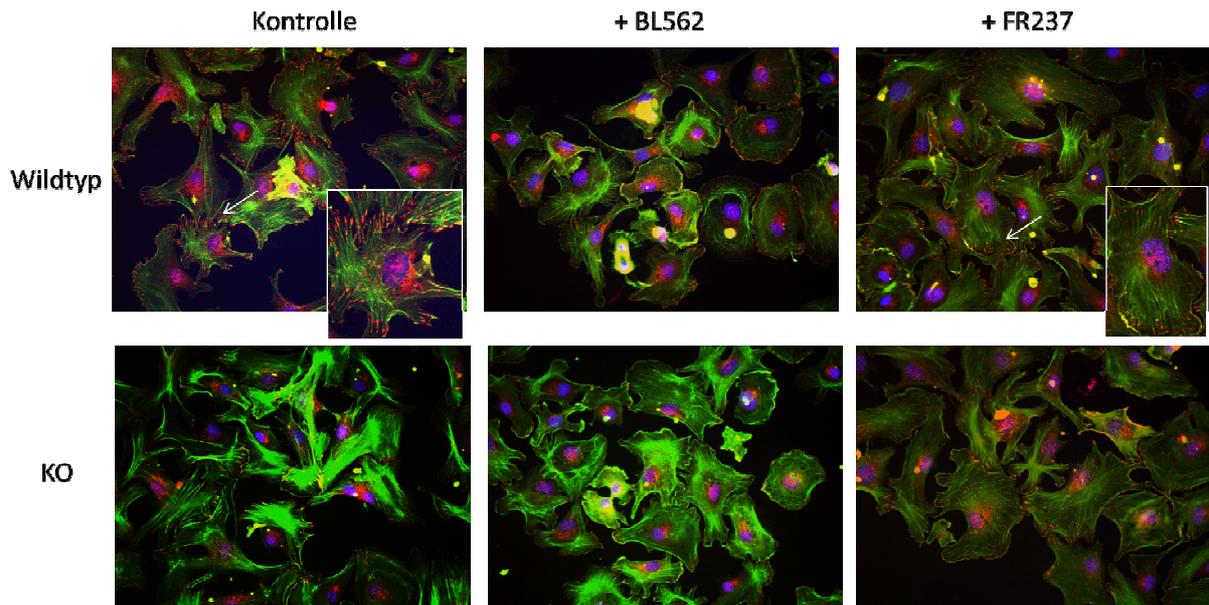


**Abbildung 40: X-Gal Färbung der mASMCs.** A. WT. B.  $\text{Itg}\beta 1^{+/Pdgfrb-Cre}$ . Die Zellen mit positivem Knockout des  $\beta 1$  Integrins zeigten eine blaue X-Gal Färbung. Mithilfe von Dunkelfeldmikroskopie und Phasenkontrasts wurden die Bilder dokumentiert. 40-fache Vergrößerung.

### 5.11.3. Veränderte phosphorylierte Focal Adhesion Kinase Färbung

Zuerst wurden die Bildung von fokalen Adhäsionen durch die Färbung von pFAK und der Aktinfilamente überprüft. Zusätzlich wurden zu beiden Zelltypen RGD-Peptide/Peptidomimetika hinzugegeben.

Die Wildtypzellen (Abb. 41 oben links) zeigten am Rand der Aktinfilamente (grün) eine Phosphorylierung an Tyr397 von FAK (rot, s. Pfeil). Nach Zugabe von BL562 war diese Phosphorylierung reduziert. Nach Zugabe von FR237 blieb pFAK<sub>397</sub> unverändert. Diese Tendenz stimmte mit der Beobachtung von CSMCs überein (s. 5.8. Abb. 36).  $\text{Itg}\beta 1^{+/Pdgfrb-Cre}$  mASMCs (Abb. 41 unten links als KO bezeichnet) hatten kaum pFAK<sub>397</sub>. Die pFAK<sub>397</sub> blieb durch die Zugabe der RGD-Peptide/Peptidomimetika (BL562 und FR237) ebenfalls negativ.



**Abbildung 41: Immunofluoreszenz der pFAK (rot) und die Aktinfilamente (grün).** Die Zellkerne wurden mittels Dapi blau angefärbt. Zu den mASMCs der WT- und der KO-Mäuse wurden zusätzlich RGD-Peptide/Peptidomimetika hinzugegeben. In der zweiten Spalte sind die überlagerten Bilder nach Zugabe des  $\alpha\beta 3$  Peptids BL562, und in der dritten Spalte des  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikums FR237 abgebildet. 40-fache Vergrößerung. pFAK<sub>397</sub> wird mittels weißen Pfeils gekennzeichnet.

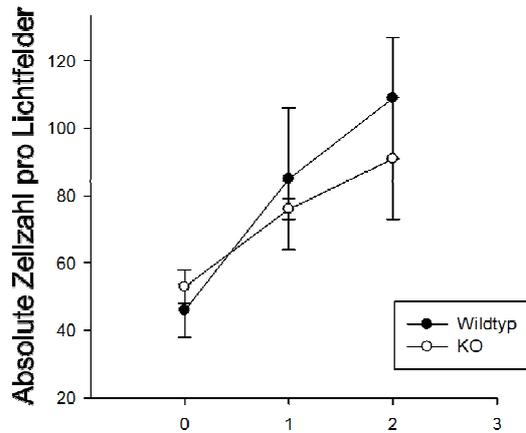
Aufgrund der hohen Proliferationsrate der nicht-KO mASMCs war es schwierig, die pFAK von  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs präzise nachzuweisen. Deshalb wurden alternativ nach dem gelungenen Knockout des  $\beta 1$  Integrins zuerst die X-Gal Färbung und anschließend die pFAK<sub>397</sub> analysiert. Eine X-Gal und pFAK<sub>397</sub> Doppelfärbung führte zu keinem Erfolg (Daten nicht gezeigt). Es lag höchstwahrscheinlich an der zerstörten Struktur des Epitops für pFAK<sub>397</sub> nach X-Gal Färbung. Die einzigen blau angefärbten  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs waren extrem abgerundet und zeigten keine ausgestreckte Aktinfilamente und keine pFAK<sub>397</sub>. Durch die Färbung der Aktinfilamente war zu sehen, dass einige  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs außergewöhnlich polygonale Fortsätze aufwiesen.

### 5.12. Verminderte Proliferationsrate von $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$

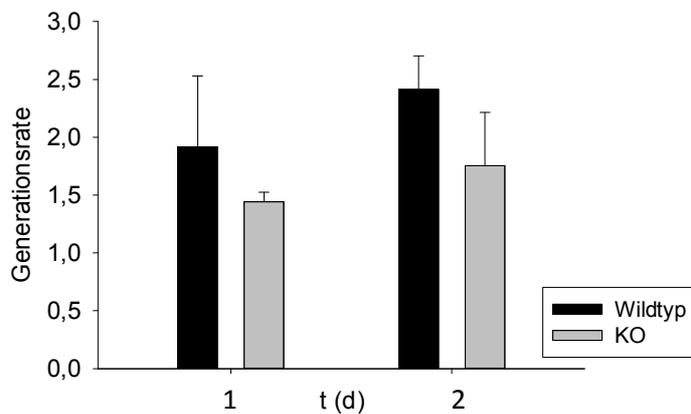
Wie beim Proliferations Assay der humanen Zellen wurde hier das Zellwachstum der Wildtypzellen und  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs bis 48 Stunden beobachtet.

In Abb. 42 A ist zu sehen, dass die Wildtypzellen schneller als die  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs wuchsen. In Abb. 42 B ist die Generationszeit dargestellt, wobei die  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs langsamer als der Wildtypzellen proliferierten.

A.



B.

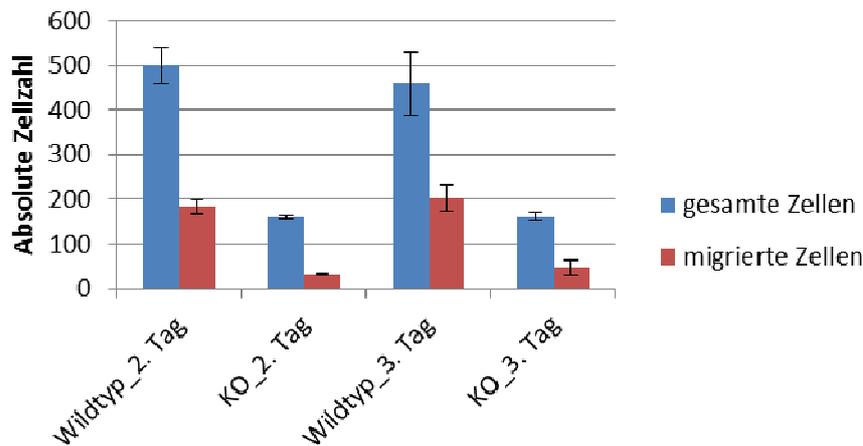


**Abbildung 42: Proliferationsrate von mASMCs.** A. Absolute Zellzahl. B. Generationszeit.

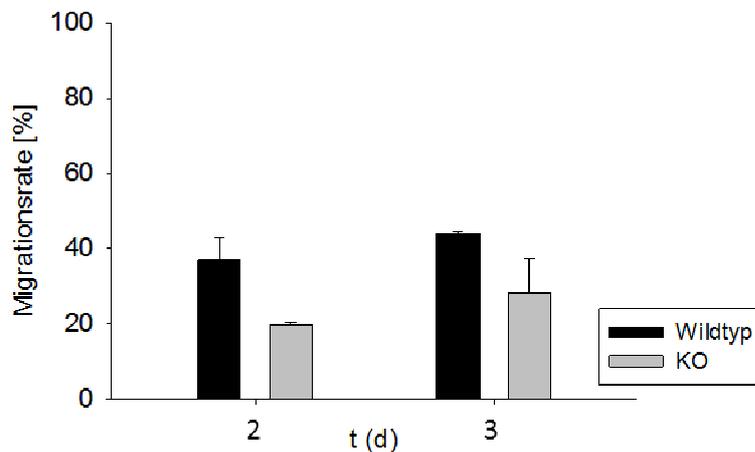
### 5.13. Verminderte Zellmigration von $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$

Die Zellmigration von Wildtypzellen und  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs wurde nach Tag 2 und Tag 3 verglichen. In diesem Versuch führte das Fehlen des  $\beta 1$  Integrins (bei den KO-Mäusen) zu einer reduzierten Migration innerhalb von 48 Stunden (Abb. 43). Die Migrationsrate der Wildtypzellen war höher als die der  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs und betrug am zweiten Tag 37% versus 20% und am dritten Tag 44% versus 27%.

A.



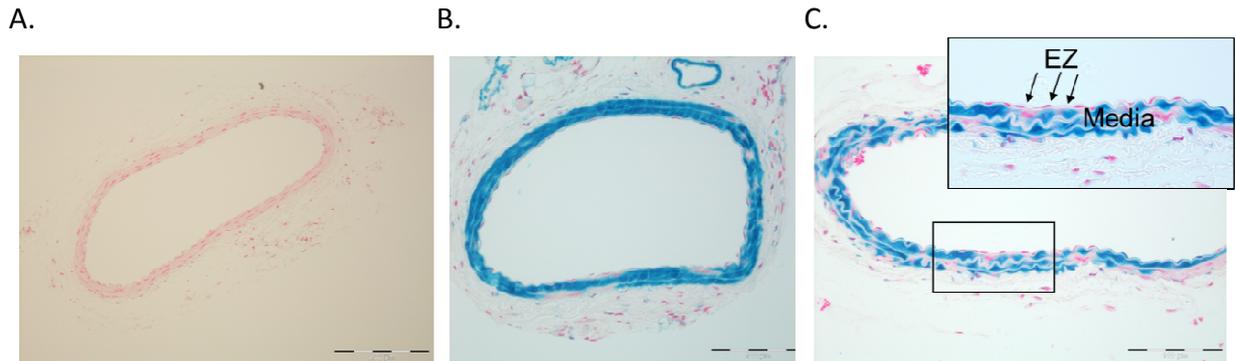
B.



**Abbildung 43: Migrations Assay von mASMCs.** A. Absolute Zellzahl. B. Migrationsrate. Im Diagramm A ist die gesamte und migrierte Zellzahl (WT und KO) nach Tag 2 und Tag 3 dargestellt. Im Diagramm B ist die Migrationsrate in Prozent angegeben.

### 5.14. Überprüfung des Knockouts von $\beta 1$ Integrin mittels X-Gal Färbung

Im Gegensatz zum ungefärbten femoralen Gefäßabschnitt in den WT-Mäusen nach der X-Gal Färbung war in den KO-Mäusen eine blaue Färbung detektierbar. Diese Färbung war überwiegend in der Mediaschicht vorhanden. Die Endothelschicht (Abb. 44, C oben, vergrößertes Bild) blieb aufgrund des gewebespezifischen Knockouts des  $\beta 1$  Integrins ungefärbt. Durch die histologische Färbung ließ sich noch einmal bestätigen, dass der Knockout des  $\beta 1$  Integrins mittels Cre/LoxP-System nur gewebespezifisch in GMZs der KO-Mäuse auftrat.



**Abbildung 44: *In vivo* X-Gal Färbung.** A. WT-Mäuse. B. KO-Mäuse. C. femorale Arterien Gefäße von KO-Mäusen mit einem vergrößerten Abschnitt der laminalen Seite abgedeckt mit EZs. 100 fache Vergrößerung.

### 5.15. Morphologischer Vergleich von *Arteria femoralis* Gefäßen zwischen Wildtyp und Knockout Mäuse

21 Tage nach der femoralen Verletzung der WT- und KO-Mäuse wurden die denudierten Gefäßabschnitte durch Elastika-van-Gieson (EvG) Färbung morphologisch analysiert. Dabei wurden wichtige Parameter wie Lumen-, Intima-, Media-, interne-, externe elastische Lamina Fläche und Stenose mithilfe vom Programm „Cell^F“ vermessen.

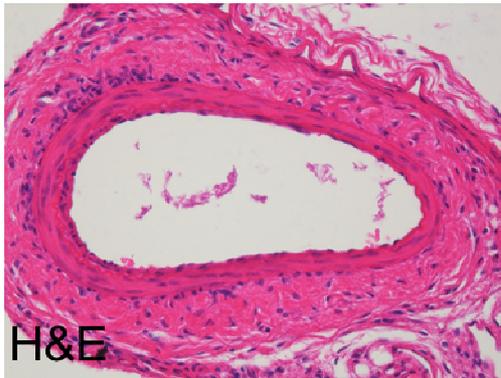
#### 5.15.1. Lumen Fläche

Die Lumen Fläche der *A. femoralis* Gefäße der KO-Mäuse war deutlich größer als die der WT-Mäuse. Die *A. femoralis* Verletzung führte zu einer Reduktion der Lumen Fläche. Allerdings wurde die Reduktion der Lumen Fläche ohne  $\beta 1$  Integrin bei  $Itg\beta 1^{+/Pdgfrb-Cre}$  verhindert.

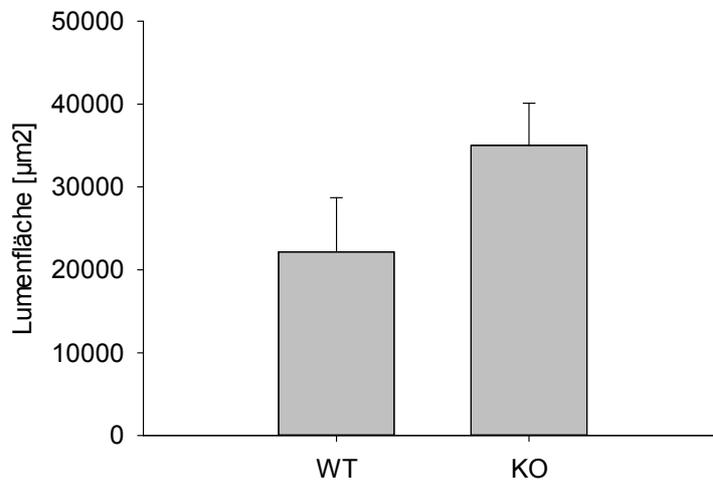
A.

WT-Maus

KO-Maus



B.



C.

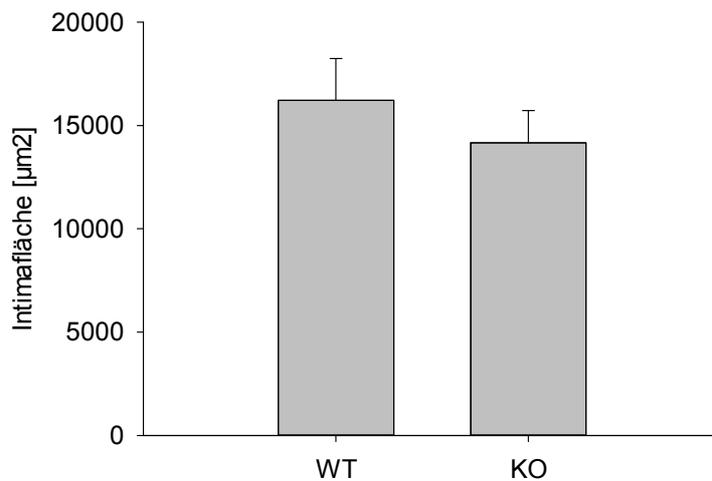
Maustypen	n	Lumen Fläche in $\mu\text{m}^2$	p-Wert
Wildtyp	9	22165,3 ± 6551,0	
KO	15	35020,2 ± 5074,7	0,1351

**Abbildung 45: Auswertung der Lumen Fläche von WT- und KO-Mäusen.** A. *femoralis* Gefäße, 21 Tage nach Verletzung A. Gefäßabschnitt, H&E- und EvG Färbung. In der ersten Spalte: WT-Mäuse, in der zweiten Spalte: KO-Mäuse. 400-fache Vergrößerung B. Auswertung der Lumen Fläche. C. Tabellarische Werte zur Lumen Fläche. n: Zahl der ausgewerteten Paraffinschnitte.

### 5.15.2. Intima Fläche

Die Intima Fläche stellte hier einen unentbehrlichen Maßstab für die Beurteilung der klinisch relevanten Neointima dar. Nach der murinen femoralen Denudation wurde eine der wichtigsten Gefäßwandveränderung, hier Intima Fläche, gemessen. In diesem Fall war die Intima Fläche der WT-Mäusen größer als die der KO-Mäuse ( $16217,8 \pm 2015,6 \mu\text{m}^2$  versus  $14158,2 \pm 1561,8 \mu\text{m}^2$ ).

A.



B.

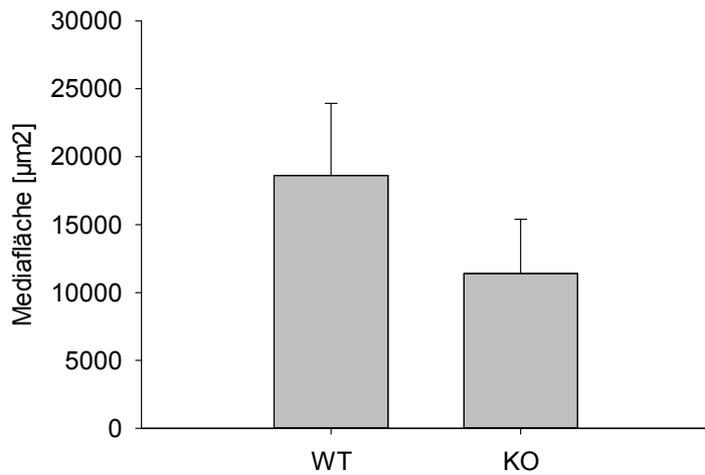
Maustypen	n	Intimal Fläche in $\mu\text{m}^2$	p-Wert
Wildtyp	9	$16217,8 \pm 2015,6$	
KO	15	$14158,2 \pm 1561,8$	0,4278

**Abbildung 46: Intima Fläche der murine A. femoralis Gefäße.** A. Auswertung der Intimafläche. B. Tabellarische Werte zur Intima Fläche. n: Zahl der ausgewerteten Paraffinschnitte.

### 5.15.3. Media-, interne elastische Lamina- und externe elastische Lamina Fläche

Die Mediafläche der WT-Mäuse war mit  $18615,8 \pm 5310,6 \mu\text{m}^2$  größer als die der KO-Mäuse mit  $11402,7 \pm 3982,9 \mu\text{m}^2$  (Abb. 47).

A.



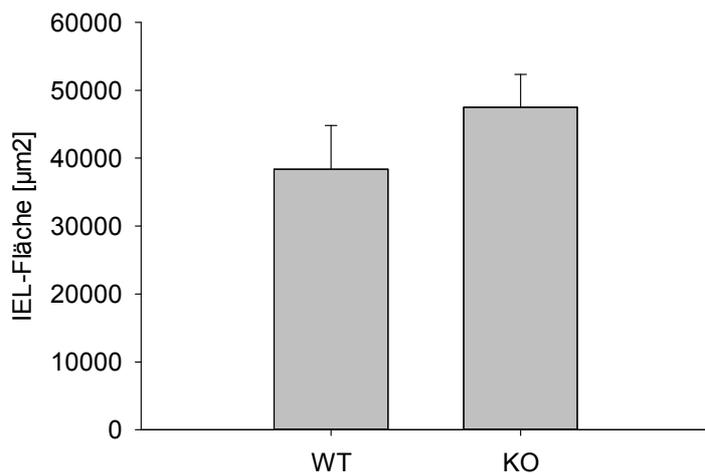
B.

Maustypen	n	Media Fläche in µm <sup>2</sup>	p-Wert
Wildtyp	9	18615,8 ± 5310,6	
KO	15	11402,7 ± 3982,9	0,2885

**Abbildung 47: Media Fläche der murinen *A. femoralis* Gefäße.** A. Auswertung der Media Fläche. B. Tabellarische Werte zur Media-Fläche. n: Zahl der ausgewerteten Paraffinschnitte.

Die IEL Fläche ist die Summe der Intima- und Lumen Fläche. Die WT-Mäuse hatten eine deutlich kleinere IEL Fläche ( $38383,3 \pm 6438,1 \mu\text{M}^2$ ) als die KO-Mäuse ( $47507,3 \pm 4828,6 \mu\text{M}^2$ ). Die EEL Fläche beider Maustypen war ähnlich groß (Abb. 48).

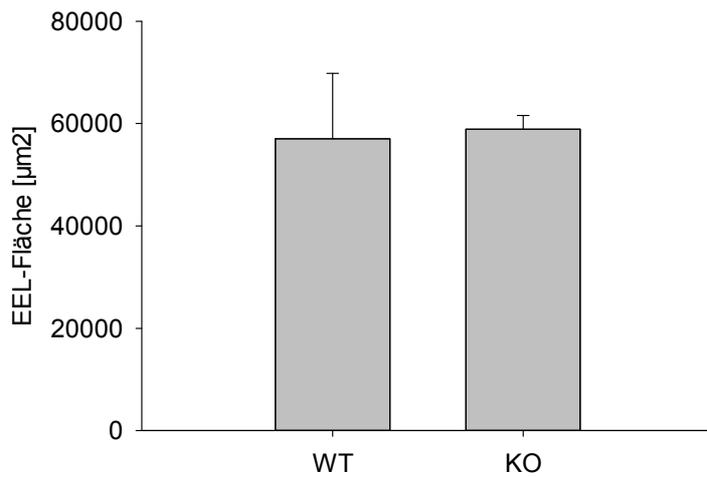
A.



B.

Maustypen	n	IEL Fläche in µm <sup>2</sup>	p-Wert
Wildtyp	9	38383,3 ± 6438,1	
KO	15	47507,3 ± 4828,6	0,2686

C.



D.

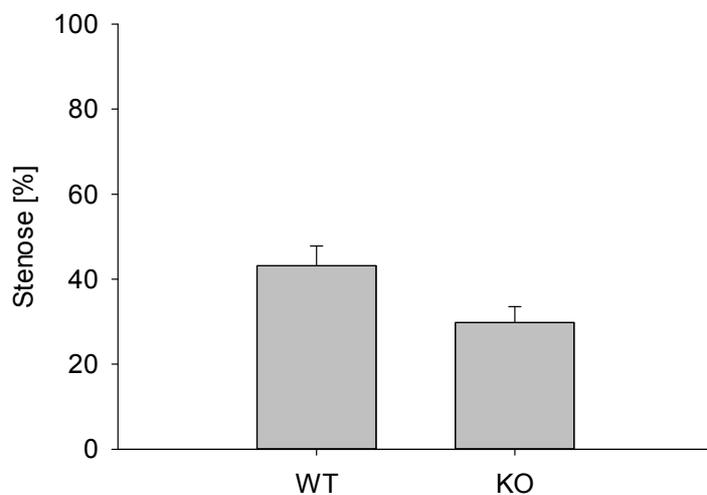
Maustypen	n	EEL Fläche in µm <sup>2</sup>	p-Wert
Wildtyp	9	56998,9 ± 12824,2	
KO	15	58910,0 ± 2649,7	0,6692

**Abbildung 48:** Interne elastische Lamina- und externe elastische Lamina Fläche A. Auswertung der IEL Fläche. B. Tabellarische Werte zur IEL Fläche. C. Auswertung der EEL Fläche. D. Tabellarische Werte zur EEL Fläche. n: Zahl der ausgewerteten Paraffinschnitte.

#### 5.15.4. Prozentuale Stenose

In dem hier etablierten Mausmodell der *A. femoralis* Verletzung war ein deutlicher Unterschied bezüglich Stenose bei den zwei Maus-Genotypen zu beobachten. Bei den WT-Mäusen lag die Stenose bei  $43,1 \pm 4,7\%$ . Nach konditionalem Knockout des  $\beta 1$  Integrins in der KO-Mäusen sank die Stenose auf  $29,8 \pm 3,7\%$ .

A.



B.

Maustypen	n	Stenose in %	p-Wert
Wildtyp	9	43,1 ± 4,7	
KO	15	29,8 ± 3,7	<b>0,0382</b>

**Abbildung 49: Stenose in Prozent der murinen *A. femoralis* Gefäße.** A. Prozentuale Stenose.

B. Tabellarische Werte zur Stenose. n: Zahl der ausgewerteten Paraffinschnitte.  $p < 0,05$ .

## 6. Diskussion

### 6.1. Expression der Integrine nach der Stimulation mit VEGF und PDGF

Im FACS Versuch wurden CAECs und CASMCs durch ihre jeweils spezifischen Wachstumsfaktoren (WF) VEGF und PDGF stimuliert. Dabei wurde eine Gefäßverletzung *in vitro* simuliert, bei der die beiden WF in großer Menge freigesetzt wurden. Die typische Folge der Gefäßverletzung ist die durch PDGF vermittelte Migration der GMZs in die *Tunica intima*, wodurch eine Neointima gebildet wird, die zu einer Verengung der Gefäße führt. Viele Forschungsgruppen haben die Phosphorylierung der Wachstumsfaktorrezeptoren im „Crosstalk“ zwischen Integrinen und WF untersucht <sup>[97]</sup>. In Abwesenheit von EGF führte die Aktivierung der  $\alpha\beta3$  Integrine zu einer Phosphorylierung von EGFR <sup>[98]</sup>. Unabhängig von PDGF wurde auch eine Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors nach der Aktivierung der  $\beta1$  Integrine in Fibroblasten gezeigt <sup>[99]</sup>. Umgekehrt beeinflussen WF viele Integrin-vermittelte Zellaktivitäten wie Proliferation, Migration und Überleben. Die vorliegende Arbeit war auf eine veränderte Expression der intakten Integrine auf der Zellmembran bei *in vitro* Läsion durch Stimulation mit WF fokussiert. Denn dieses „Crosstalk“ bzw. die nachgeschalteten Signale beeinflussen und entscheiden das breite Spektrum der Zellaktivität, die als biomolekulare Erklärung der Restenose nach der Gefäßverletzung darstellt. Außerdem wurde die differentielle Expression der Integrinsubtypen in CAECs und CASMCs untersucht, damit man im Stentbeschichtungssystem durch die Bindung der RGD-Peptide/Peptidomimetika an Integrine zelltypspezifisch CAECs und CASMCs aktivieren und inhibieren kann.

Die Bilanz für das Expressionsmuster der Integrine bei dreistündiger Stimulation war, dass  $\alpha\beta3$  Integrine von CAECs zu 23% und  $\alpha5\beta1$  Integrine von CASMCs zu 26% hochreguliert wurden. Dahingegen war die Expression der  $\alpha5\beta1$  Integrine von CAECs und der  $\alpha\beta3$  Integrine von CASMCs nahezu unverändert. Diese Beobachtung schien zuerst widersprüchlich zum Resultat anderer Publikationen zu sein, in denen eine enge Korrelation zwischen PDGF und  $\alpha\beta3$  Integrine der GMZs gezeigt wurde <sup>[100]</sup>. PDGF-R $\beta$  und VEGF-R2 sollten demnach mit der Expression von  $\alpha\beta3$  Integrinen, aber nicht mit der Expression von  $\beta1$  Integrinen assoziiert sein. Es wurde zudem berichtet, dass mehr  $\alpha\beta3$  Integrine von CASMCs nach einer *in vivo* Verletzung der Mediaschicht detektiert wurden <sup>[18]</sup>. In diesem Fall

bezog es sich eher auf eine dedifferenzierte Form der CASMCs. Die Regulation der Integrine ist unter verschiedenen Mechanismen hoch gewebespezifisch. Es könnte durchaus sein, dass beide Integrinsubtypen ( $\alpha\beta3$  und  $\alpha5\beta1$ ) mit einer zeitlich getrennten Expression Einfluss auf die CASMCs nach der vaskulären Verletzung haben.

Im hier beschriebenen Versuch wurden die Zellen für den FACS-Versuch mit Biotase statt mit Trypsin vereinzelt. Das war ein wichtiger Schritt, intakte Integrine durch die schonende Enzymwirkung abzulösen. In einem Vorversuch für die Expression der  $\alpha5\beta1$  Integrine von CASMCs konnte gezeigt werden, dass die Expression der Integrine nach Behandlung mit Biotase höher war als die mit Trypsin. (1,6-facher  $\alpha5\beta1$  Integrine detektiert durch Biotase als durch Trypsin, Daten nicht gezeigt).

Wie oben erwähnt, wurde die stärkste Regulation beider Integrinsubtypen nach drei Stunden Behandlung mit VEGF (für CAECs) bzw. PDGF (für CASMCs) beobachtet. Es gab eine zeitlich abgestimmte Regulation der Integrine. *In vivo* ist zeitliche Regulation aufgrund der multifaktoriellen Einflüsse noch komplexer. Bei der Migration von GMZs spielen andere Mitogene wie FGF, EGF, IGF und TGF- $\beta$  ebenfalls eine große Rolle. Sie werden nicht nur von den Blutplättchen, sondern auch von EZs, Monozyten und Makrophagen freigesetzt <sup>[101a]</sup>. Daher sollte man künftig diese differentielle Regulation der Integrine *in vivo* in Zeitkinetik überprüfen.

Darüber hinaus gab es nicht nur eine zeitliche Sättigungskurve der Expression intakter Integrine bei der Stimulation, sondern auch in Bezug auf die Konzentration von WF. Die wirksame Konzentration von WF zur Regulation der Expression von Integrinen war relativ gering: für CAECs lag VEGF bei etwa 1 ng/ml. Die VEGF Stimulation (1 ng/ml) für CAECs hatte die beste Wirkung für die Regulation der  $\alpha\beta3$  Integrine. Mit 10 ng/ml VEGF war die Regulation der Expression von Integrine kaum zu sehen. Allerdings war diese Konzentration von VEGF (10 ng/ml) beim Replatings Assay für die Phosphorylierung von FAK wirksam. Mit 100 ng/ml VEGF wurde kein pFAK detektiert (Daten nicht gezeigt). Laut Ivaska's Hypothese könnte ein Überschuss der WF zu einer Internalisierung der jeweiligen Rezeptoren in das Zellinnere führen <sup>[102]</sup>. Durch die Inaktivierung des Rezeptors von WF wird das Signal im „Crosstalk“ zwischen Integrinen und WF unterbrochen.

Ein im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter FACS Versuch zeigte, dass  $\alpha\beta3$  Integrine von CAECs nach der VEGF Stimulation und  $\alpha5\beta1$  Integrine von CASMCs nach der PDGF-Stimulation hochreguliert wurden. Es gibt einen Hinweis, wie die Integrinsubtypen ( $\alpha\beta3$

und  $\alpha 5\beta 1$ ) in CAECs und CASMCs nach der simulierten Läsion der Verletzung durch ihre spezifische WF aktiviert werden. Es sollte eine differentielle Regulation der Integrinsubtypen nach der koronaren Gefäßverletzung geben.

## **6.2. RGD-Peptide/Peptidomimetika, ihre Auswirkung auf die Proliferationsrate, Zellmigration und Zelladhäsion**

In der vorliegenden Arbeit wurden RGD-Peptide/Peptidomimetika als Integrin-Agonist und ebenfalls als Integrin-Antagonist untersucht. Bei der Adhäsion wurden  $\alpha \beta 3$  Peptidomimetika als Agonist auf den Glasplättchen immobilisiert, um CAECs zu binden. In den anderen Versuchen (wie im Proliferations-, Migrations- und Replatings Assay) wurden RGD-Peptide/Peptidomimetika als Integrin-Antagonist auf die Zellen aufgebracht, um ihre Inhibition zu testen.

Die bisherigen bekannten RGD-Peptide haben meistens biselektive Bindung an Integrinsubtypen. In den natürlichen Integrin-Liganden der EZM variiert die RGD-Sequenz zwischen verschiedenen Konformationen. Dementsprechend erweitern sie die Affinität und die Selektivität zu Integrinsubtypen. Von diesem Hintergrund entwickelte sich der Ansatz, hochspezifisches  $\alpha \beta 3$  Peptidomimetikum SN503 bzw.  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum FR237 zu synthetisieren.

Im Proliferations Assay wurde die Inhibition von drei Peptiden/Peptidomimetika für die beiden humanen koronaren Zelltypen (CAECs und CASMCs) analysiert. Die Proliferation von CAECs wurde deutlicher durch  $\alpha \beta 3$  Peptide/Peptidomimetika (BL562 und SN503) als durch  $\alpha 5\beta 1$  RGD-Peptidomimetikum (FR237) inhibiert. Die Inhibition durch RGD-Peptide/Peptidomimetika bei CASMCs war vergleichsweise schwächer.

Interessanterweise wurde in vielen Versuchen eine erhöhte Proliferationsrate mit der nanomolaren Konzentration der RGD-Peptide/Peptidomimetika wie schon berichtet <sup>[104]</sup>. Im millimolaren Bereich der RGD-Peptide/Peptidomimetika sinkt infolge einer kompetitiven Bindung die Affinität der Integrine zu natürlichen EZM-Liganden. Im nanomolaren Bereich jedoch fungiert das RGD-Peptid/Peptidomimetikum eher als Integrin-Agonist. Deshalb wird im Stentbeschichtungssystem versucht, das  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum FR237 vom Stent möglichst verzögert freizusetzen, damit die Dosis im inhibitorischen millimolaren Bereich zu migrierender CASMCs bleibt.

Die RGD-Peptide/Peptidomimetika als Antagonist wurden ebenfalls in Migrations Assay getestet. Im „Boyden chamber“ System adhärten die Zellen zuerst auf der Oberfläche des

Inserts. Nach einstündiger Adhäsion wurden die Peptide/Peptidomimetika zugegeben und sie interagierten mit den Zellen. Gleichzeitig migrierten die Zellen durch eine 8  $\mu\text{m}$  Pore auf einer Membran entlang eines FCS-Gradients. Dieses Testmodell der Zellmigration imitiert den Zustand der Zellmigration von CASMCs von der Mediaschicht zur luminalen Intimaseite nach einer vaskulären Verletzung. Hier wurden drei Peptide/Peptidomimetika zur Inhibition der Zellmigration von CAECs und CASMCs getestet. Damit konnte man das beste Peptid/Peptidomimetikum aussuchen, um die CASMCs in der Migration zu hemmen und gleichzeitig die CAECs aufgrund der zelltypspezifischen Unterbindung nicht zu beeinflussen. Es stand noch die Frage aus, welche Integrinsubtypen in diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielten. Die ermittelte Migrationsrate definierte den Anteil der migrierten Zellen und die prozentuale Inhibitionsrate gab einen Maßstab, inwiefern die Zellmigration durch RGD-Peptide/Peptidomimetika inhibiert wurde. Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass das  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetikum SN503 CAECs (28% und 32% nach 24- und 48 Stunden) im Vergleich zur CASMCs (24% und 21% nach 24- und 48 Stunden) effektiver inhibierte. Diese zelltypspezifische Inhibition durch SN503 stimmte auch mit den Ergebnissen im Proliferations Assay überein. Es ließ vermuten, dass das  $\alpha\beta 3$  Integrin von CAECs sowohl in der Proliferationsrate als auch in der Zellmigration wichtig war.

Eine zelltypspezifische Inhibition durch  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum FR237 und  $\alpha\beta 3$  Peptid BL562 war nicht erkennbar. Nach 24 Stunden war die Inhibition der Zellmigration durch BL562 am stärksten (38% für CAECs und 39% für CASMCs). Aber diese Wirkung war nicht dauerhaft, nach 48 Stunden sank die Inhibition wieder. Nach 48 Stunden war die stärkste Inhibition beider Zelltypen durch FR237 zu beobachten (42% für CAECs und 43% für CASMCs). Der hemmende Effekt durch FR237 stieg konstant von 24 bis 48 Stunden in CAECs und CASMCs.

Im Adhäsions Assay wurde zunächst das beste Beschichtungsmittel auf Glasplättchen bzw. die beste Bedingung für die Adhäsion von CAECs herausgefunden. Im Vorversuch zeigte sich, dass die Glasplättchen mit 100  $\mu\text{M}$  Peptidomimetika über Nacht beschichtet werden sollten. Eine basische Lösung (pH=9) von Peptidomimetika hatte den besten Effekt zur Beschichtung der Oberfläche der Glasplättchen, da die basischen Bedingungen die Reaktion der Isothiocyanat Gruppe von Peptidomimetika mit Aminogruppe in Chitosan und Silan begünstigte. Im zweiten Schritt wurden Isothiocyanat funktionalisierte  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetika mit verschiedenen Spacern im Adhäsions Assay getestet. Durch die

chemische Spacer-Gruppe wurde eine optimale Distanz zwischen den verschiedenen Materialien und den Liganden ermittelt (hier zwischen Glasplättchen und RGD-Peptidomimetika). Durchschnittlich hatten CAECs eine relative Adhäsionsquote von 1,8, das heißt, dass 80% mehr CAECs durch RGD-Peptidomimetika auf den Glasplättchen angelockt wurden. Unter den drei Peptidomimetika mit verschiedenen Spacern hatten CAECs durch CM 46 (1 Hegas) eine relative Adhäsionsquote von 1,5.

In allen drei Spacer-Varianten (Ahx, Hegas und Proline) führten die RGD-Peptidomimetika mit zunehmender Anzahl von Spacer nicht zu der besten Adhäsion. Es entstand eine bestimmte Distanz zwischen der Biomaterialoberfläche und der Bindungsstelle an Zellen durch RGD-Sequenz <sup>[105]</sup>. In diesem Fall brachte die gewonnene Länge der RGD-Peptidomimetika auf den Glasplättchen die Flexibilität, vernachlässigte jedoch eine rigide Oberflächenanbindung der Integrine.

Der Hintergrund für diesen Versuch war, *in vitro* eine optimale biochemische Verknüpfung zwischen Oberfläche des Stents und CAECs zu schaffen. Damit sollte eine beschleunigte Endothelialisierung nach der Stent-Implantation durch eine verbesserte Adhäsion der CAECs mittels  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetika ermöglicht werden. Dazu wurden die Glasplättchen wie der Stent mit der gleichen chemischen Oberfläche ausgestattet. Das Isothiocyanat funktionalisierte RGD-Peptidomimetikum verknüpfte CAECs mit der Oberfläche der Glasplättchen. Die anspruchsvolle Synthese der Isothiocyanat funktionalisierten RGD-Peptidomimetika wurde schon in dieser Kooperation des Projekts patentiert <sup>[106]</sup>. Chitosan als ein synthetisches Polymer ist gewebsverträglich. Bei der Beschichtung wurden zusätzlich Polylactid und Sirolimus in verdünnter Essigsäure aufgesprüht. Der damit behandelte Stent stellt sich als ein biokompatibles Implantat dar.

Der nachfolgende Versuch mit Stentbesiedlung von CAECs sollte dazu dienen, das Konzept der Beschichtung auf den Glasplättchen zu überprüfen. Der gelungene Entwurf der Isothiocyanat funktionalisierten Peptidomimetika auf den Glasplättchen für die Adhäsion von CAECs ließ sich gut auf die Stentbesiedlung übertragen. Mithilfe von  $\alpha\beta 3$  Peptidomimetikum SN438 traten mehr CAECs ins Gestell des Stents als in der Kontrollgruppe. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Abdeckung des Stents mit CAECs, die eine Schlüsselrolle bei der Reendothelialisierung nach der PTCA spielt.

### 6.3. ILK Regulation und Phosphorylierung von FAK und SRC nach Bindung von Integrin Liganden

In der Arbeit wurde die Regulation von ILK nach der VEGF-Stimulation von CAECs und nach der PDGF-Stimulation von CASMCs mittels Western Blot (WB) detektiert. Es wurde eine zweieinhalbfache Erhöhung von ILK bei der PDGF-Stimulation der CASMCs gezeigt. Dagegen stand nur eine 1,1 fache Erhöhung von ILK bei VEGF-Stimulation von CAECs. Es gab eine große Korrelation zwischen ILK (150% hochreguliert in WB) und  $\alpha 5\beta 1$  Integrin in CASMCs (30% hochreguliert in FACS). Das stand im Einklang mit einer ähnlichen Beobachtung, wobei ILK von der zytoplasmatischen  $\beta 1$  Domäne reguliert wurde <sup>[107]</sup>. Die ILK von CAECs schien dahingegen im „Crosstalk“ zwischen Integrin und VEGF kaum eine Rolle zu spielen. Nach dem hier gezeigten dualen Stentbeschichtungssystem sollte das  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetikum vom Stent freigesetzt werden, damit wurde die ILK-Aktivierung nach der Bindung des  $\alpha 5\beta 1$  Integrins von dem selektiven Peptid-Inhibitor unterbunden. Die CASMCs verloren an Adhäsion und Migration und gingen in Apoptose.

Als Kontrolle wurde im WB das GADPH verwendet. Das oft verwendete  $\beta$ -Aktin sollte in Experimenten mit Integrinen eher nicht als Standard verwendet werden, da Integrine Einfluss auf die Aktinfilamente nehmen können.

Beim Replatings Assay führte die Integrinaktivierung zu einer transienten Phosphorylierung von FAK und SRC, die als prominente Proteinkinasen für die fokale Adhäsion und das Überleben von Zellen viel studiert wurden. Die fokale Adhäsion der EZs ist für den Prozess der Reendothelialisierung nach der vaskulären Verletzung von wesentlicher Bedeutung. SRC ist eine der wichtigsten Proteinkinasen bei der Transduktion des Zelltodes, der früheste Zellevent bei der Neointimabildung <sup>[108]</sup>. Durch die Untersuchung von pFAK und pSRC in der Signaltransduktion nach der Integrinbindung sollte sich ein Hinweis auf den Einfluss auf die Zellaktivität geben. Es wäre zudem interessant zu untersuchen, ob  $\alpha \beta 3$ - und  $\alpha 5\beta 1$  Integrine jeweils einen eigenen Signalweg mit FAK und SRC haben.

Aufgrund der mangelnden Versuchszahl beim Replatings Assay von CASMCs war es in dieser Arbeit leider nicht möglich, die Inhibition der RGD-Peptide/Peptidomimetika von pFAK und pSRC zwischen CAECs und CASMCs zu vergleichen.

Wie die verschiedenen natürlichen Integrin Liganden von EZM löst die Bindung der RGD-Peptide/Peptidomimetika an Integrine eine Konformationsänderung hervor und beeinflusst somit den Signalweg. Nach Zugabe der  $\alpha \beta 3$  Peptidomimetika SN503 auf CAECs wurden

pFAK bis zu 51% und pSRC bis zu 68% herabreguliert. Nach Zugabe der  $\alpha 5\beta 1$  Peptidomimetika FR237 auf CAECs wurden pFAK bis zu 54% und pSRC bis zu 70% herabreguliert. Die starke Inhibition der Phosphorylierung beider Proteinkinasen durch  $\alpha\beta 3$  Peptid BL562 lag an deren unselektiver Bindung an Integrinsubtypen in CAECs. Dies deutete darauf hin, dass alle drei RGD-Peptide/Peptidomimetika durch die Bindung an Integrine von CAECs die Aktivierung von pFAK und pSRC effektiv inhibieren könnten. Die reduzierte Expression von pFAK durch beide Peptidomimetika (SN503 und FR237) war höher als die von pSRC.

#### **6.4. Ausblick im humanen Projekt der Integrinforschung**

In einem parallelen Ansatz wurde ein GMZ-selektive Peptidomimetikum unter der Verwendung des Stentbeschichtungssystems im deutschen Herzzentrum München auf Metallstents aufgebracht und in Bezug auf Beschichtungsmenge und Freisetzungsprofil optimiert. Bevor das *in vitro* am besten getestete RGD-Peptid/Peptidomimetikum im etablierten Tiermodell weiterhin überprüft wurde, war eine Freisetzungskinetik anzufertigen. Da die effektivste Konzentration des RGD-Peptid/Peptidomimetikums in der millimolaren Konzentration lag, sollte ihre Freisetzung möglichst zeitlich verzögert werden. Es konnte in einem Vorversuch eine Peptidkonzentration auf der Stentoberfläche von 100  $\mu\text{g}$  pro 1 ml mit einem Elutionsprofil von bis zu sieben Tagen erreicht werden. Darüber hinaus führten die verbleibenden Peptidomimetika nach der Elution vom Stent zu einer nahezu vollständigen Hemmung der GMZ-Proliferation.

Verschiedene Materialien wurden bereits zur Beschichtung ausprobiert, um das bioaktive RGD-Peptid/Peptidomimetikum zeitlich- und Dosis-kontrolliert freizusetzen <sup>[109]</sup>. In der Generation von DES kamen schon Phosphorylcholin und biokompatible, biodegradierbare und bioabsorbierte Polymer zum Einsatz, um vor dem Thrombose und der Inflammation im vaskulären System zu schützen <sup>[8]</sup>.

#### **6.5. *In vitro* Versuche der $\beta 1$ Integrin Knockout Mauslinie im Cre-LoxP System**

Die Ergebnisse mittels Immunfluoreszenz (Capolnin,  $\alpha$ -SMA und pFAK), X-Gal Färbung und Zellaktivitätstests (Proliferationsrate und Zellmigration) zeigten einen großen Unterschied zwischen Wildtypzellen und  $\text{Itg}\beta 1^{+/Pdgfrb-Cre}$  mASMCs.

Vor den wichtigsten Experimenten wurden die mASMCs nach Capolnin-,  $\alpha$ -SMA- und X-Gal Färbung charakterisiert. In der Zellkultur waren die typischen Zellmarker der GMZs (Capolnin

und  $\alpha$ -SMA) nach der Zellisolation aus WT- und KO-Mäusen positiv. Es gab keinen Unterschied zwischen beiden Zelltypen in Bezug auf die Expression von Capolnin und  $\alpha$ -SMA. Abraham et al. <sup>[110]</sup> postulierte, dass  $\alpha$ -SMA der  $\beta$ 1 Integrin Mutante nicht wie die der Wildtypzellen polarisiert in einer angeordneten Schicht an der Zellmembran erschien. Diese Erkenntnisse wurden anschließend mittels Immunhistochemie nach  $\alpha$ -SMA untersucht und vervollständigt.

Es war bei der Doppelfärbung mit Phalloidin kaum pFAK<sub>397</sub> von Itg $\beta$ 1<sup>+/Pdgfrb-Cre</sup> mASMCs zu sehen. Die Itg $\beta$ 1<sup>+/Pdgfrb-Cre</sup> mASMCs zeigten eine runde Zellform, die mit einer Beobachtung einer murinen  $\beta$ 1 Integrin Mutante übereinstimmte <sup>[110]</sup>. In Wildtypzellen bildete sich pFAK<sub>397</sub> und die Aktine des Zytoskeletts zeigten eine lang ausgestreckte Anordnung.

Auf Wildtypzellen wurden noch RGD-Peptide/Peptidomimetika zugegeben. Nach Zugabe von  $\alpha$ v $\beta$ 3 Peptid BL562 verminderte sich die Färbung der pFAK. Allerdings blieb die fokale Adhäsion nach Zugabe des  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Peptidomimetikums FR237 konstant. Die Tendenz zur fokalen Adhäsion auf mASMCs bei der Interaktion beider RGD-Peptide/Peptidomimetika war ähnlich der humanen Zellen (CASMCS).

Im Gegensatz zu Wildtypzellen wurden die Proliferationsrate und die Zellmigration von Itg $\beta$ 1<sup>+/Pdgfrb-Cre</sup> mASMCs aufgrund des Knockouts von  $\beta$ 1 Integrin abgeschwächt.  $\beta$ 1 Integrin spielt eine gute Rolle bei der Proliferation und Migration der mASMCs.

## **6.6. Arterielle Verletzungsmodelle und histomorphometrische Färbung der murinen Gefäße nach femoraler Verletzung**

Die vergleichsweise kleinen murinen Arterien sind weder für eine Stentimplantation noch für eine Ballondilatation geeignet. Das Erzeugen einer Verletzung der Arterien der Großtiere kann daher nicht einfach auf den Mäusen übertragen werden. Es stellt also eine große Herausforderung dar, ein reproduzierbares System für eine murine arterielle Verletzung herzustellen.

Das Verletzungsmodell ist hauptsächlich extra- und transluminal. Die arterielle Ligatur <sup>[111]</sup>, die periarterielle Manschettenplatzierung <sup>[112]</sup> und die elektronische Stimulation <sup>[113]</sup> in der ersten Kategorie verursachen leider keine klinisch relevante Läsion. Unter transluminalen Bedingungen kann man allerdings die Endothelschicht denudieren. Volkhard Lindner gelang es erstmals, mit einem sogenannten flexiblen Draht (0,35 mm Durchmesser) die Karotisarterie zu denudieren. Unter der Rotation des Drahtes wurde das Gefäß dreimal

mechanisch belastet. Die komplette Reendothelialisierung war innerhalb von drei Wochen abgeschlossen. Die wesentliche Neointimabildung begann ab der zweiten Woche <sup>[111, 114]</sup>.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf das Verletzungsmodell bei der A. femoralis. Je nach der Art der Verletzung (wie die Zahl der Draht-Durchgänge zur Denudation, die Verletzungsfläche und die Zerstörung der Mediaschicht) variierte sich die Neointimabildung. Im etablierten murinen femoralen Verletzungsmodell dieser Arbeit (ein Durchgang des Drahts) wurde eine reduzierte Stenose in  $\beta 1$  Integrin KO-Mäusen herausgefunden. Dies zeigte, dass  $\beta 1$  Integrin eine zentrale Rolle im Prozess der Neointimabildung nach der Endothel-Denudation zu spielen schien.

Das elastische Recoil, die Neointima und das arterielle „Remodelling“ tragen zur Stenose bei. Das elastische Recoil führte zudem zu einer Regression der Lumenfläche. Allerdings zeigte sich dieses Phänomen unmittelbar nach der Ballondilatation und wurde in dieser Arbeit im Verletzungsmodell der A. femoralis nicht berücksichtigt. Die Neointima kommt durch die Migration der GMZs und die Überexpression der EZM zu Stande. Bei der In-Stent-Restenose spielt die Neointima eine Hauptrolle, weshalb sie als Schwerpunkt im murinen Verletzungsmodell untersucht wurde. Dabei wurde die Endothelschicht durch einen Katheter mechanisch belastet. Die Neointima-Schicht war bei den KO-Mäusen unwesentlich dünner als bei den WT-Mäusen nach der Wanderung der mASMCs in die luminalen Arterien. Ohne  $\beta 1$  Integrine waren  $Itg\beta 1^{+/Pdgrfb-Cre}$  mASMCs nicht in der Lage, auf die *Tunica intima* zu landen.

Das arterielle Remodelling wird vom Blutfluss, dem Blutdruck und der akuten Verletzung beeinflusst <sup>[115]</sup>. Unter vielen histomorphometrischen Parametern wird die Mediafläche häufig als Maßstab für das arterielle Remodelling gemessen. In einer anderen untersuchten femoralen Verletzung Studie <sup>[67b]</sup>, war zu sehen, dass die Mediafläche zwischen zwei und vier Wochen wesentlich vermindert wurde. Es lag laut den Autoren an der in Richtung der Intima migrierten und in der Mediaschicht unter Apoptose und Nekrose vorhandenen GMZs <sup>[96]</sup>.

Die prozentuale Stenose war in der Gefäßheilung nach der simulierten *in vitro* Verletzung am aussagekräftigsten. Die KO-Mäuse zeigten eine geringere Stenose  $29,8 \pm 3,7\%$ , wohingegen sie bei den WT-Mäusen  $43,1 \pm 4,7\%$  betrug ( $p=0,0382$ ). Der Knockout der  $\beta 1$  Integrine führte zu einer Abnahme der Stenose.

## 7. Zusammenfassung

In-Stent-Restenose stellt ein großes Problem nach der PTCA bei der Behandlung der koronaren arteriosklerotischen Läsionen dar. Obwohl das Medikament auf dem konventionellen DES eine antiproliferative, antikoagulatorische und antiinflammatorische Wirksamkeit hat, allerdings unselektiv an der vaskulären Endothelzellen, weshalb eine Re-Endothelialisierung nach der Stentimplantation beeinträchtigt wird und folglich am Entstehen der Stentthrombose beteiligt. Integrin, ein Transmembranprotein, dient nicht nur als Adhäsionsrezeptor, sondern ist auch an verschiedenen Prozessen wie Zellmigration, Signaltransduktion und Überleben beteiligt. Zwischen der Zellen und der extrazellulären Matrix wird Integrin durch die RGD-Sequenz erkannt. Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, ein innovatives duales Stentbeschichtungssystem zu evaluieren. Dazu wurden Stents mit Integrin-aktivierende und inhibierenden RGD-Peptide/Peptidomimetika beschichtet, um eine Neointimabildung zu hemmen und gleichzeitig eine unverzögertete Endothelialisierung zu erzielen.

Die Expression und Regulation der Integrinsubtypen ließ sich im Verletzungsmodell nach der Stimulation der korrespondierenden WF mithilfe von FACS Analysen untersuchen. Dabei wurde ein Expressionsmuster der Integrine bestimmt. Die differentielle Expression und Regulation der Integrinsubtypen boten einen Anhaltspunkt für künftig *in vitro* und *in vivo* Versuchen an.  $\alpha\beta3$  Integrin spezifisches Peptidomimetikum SN503 führte nach Tag 1 und Tag 2 zu einer stärkeren Hemmung des Proliferations- und Migrationsverhaltens von CAECs verglichen mit CASMCs. Die Besiedlung der Stents durch CAECs ließ Rückschlüsse auf die Effektivität der luminalen irreversiblen Beschichtung mit Isothiocyanat funktionalisiertem  $\alpha\beta3$  Peptidomimetikum.

Im Integrin-vermittelten Signalweg wurden pFAK<sub>397</sub>, pSRC<sub>426</sub> und ILK untersucht. pFAK<sub>397</sub> und pSRC<sub>426</sub> in CAECs und CASMCs wurden in gleichem Maß nach Zugabe der RGD-Peptidomimetika (SN503 und FR237) inhibiert. Nach PDGF Stimulation wurde ILK von CASMCs zweieinhalb fache hochreguliert.

Im zweiten  $\beta1$  Integrin Knockout Maus Projekt wurde zuerst ein Cre/LoxP-System für eine Mauslinie etabliert. Der Knockout des  $\beta1$  Integrins wurde in der Zellkultur und mittels immunhistologischen Färbung der murinen Aorta glatter Gefäßmuskelzellen überprüft. Cre positive  $\beta1$  Integrin Heterozygoten der KO-Mäuse zeigten eine verminderte

Proliferationsrate, Zellmigration und Adhäsion im Vergleich zum Wildtyp. Durch ein femorales Verletzungsmodell wurde eine Simulation der Stenose nach der Denudation der Endothelschicht auf der präklinischen Ebene eingeleitet. Im Vergleich zu den WT-Mäusen wiesen die KO-Mäuse 21 Tage nach der femoralen Verletzung eine reduzierte Neointima auf. Zudem zeigte sie eine dünnere Mediaschicht und eine deutlich abnehmende Stenose.

Die aktuelle Studie konzentrierte sich auf zwei Intergrinsubtypen der wichtigsten koronaren Zellen (CAECs und CASMCs) durch RGD-Peptide/Peptidomimetika zu regulieren, die in der dualen Stentbeschichtungssystem beschichtet wurden, um das Problem der In-Stent-Restenose zelltypspezifisch zu beheben. Die vorliegende Arbeit mit synthetischen RGD-Peptiden/Peptidomimetika und dem murinen Verletzungsmodell lieferte Hinweise, dass  $\beta 1$  Integrin die Migration der GMZs zur Neointima initialisierte. Neben der Inhibition der GMZs war es gleichzeitig gelungen, parallel durch die Isothiocyanat funktionalisierten RGD-Peptidomimetika die Reendothelialisierung zu fördern.

- [1] S. Mendis, P. Puska, B. Norrving, *World Health Organization* **2011**, 1-155.
- [2] R. G. Favaloro, *International Journal of Cardiology* **1983**, *4*, 331-344.
- [3] A. R. Gruntzig, A. Senning, W. E. Siegenthaler, *The New England Journal of Medicine* **1979**, *301*, 61-68.
- [4] O. F. Bertrand, R. Sipehia, R. Mongrain, J. Rodés, J. C. Tardif, L. Bilodeau, G. Côté, M. G. Bourassa, *Journal of the American College of Cardiology* **1998**, *32*, 562-571.
- [5] U. Sigwart, J. Puel, V. Mirkovitch, F. Joffre, L. Kappenberger, *The New England Journal of Medicine* **1987**, *316*, 701-706.
- [6] M. Horlitz, U. Sigwart, J. Niebauer, *International Journal of Cardiology* **2002**, *83*, 199-205.
- [7] M. S. Chen, J. M. John, D. P. Chew, D. S. Lee, S. G. Ellis, D. L. Bhatt, *American Heart Journal* **2006**, *151*, 1260-1264.
- [8] P. W. Serruys, M. J. Kutryk, A. T. Ong, *The New England Journal of Medicine* **2006**, *354*, 483-495.
- [9] a. S. O. Marx, T. Jayaraman, L. O. Go, A. R. Marks, *Circulation Research* **1995**, *76*, 412-417; b. C. M. Matter, I. Rozenberg, A. Jaschko, H. Greutert, D. J. Kurz, S. Wnendt, B. Kuttler, H. Joch, J. Grünenfelder, G. Zund, F. C. Tanner, T. F. Lüscher, *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **2006**, *48*, 286-292.
- [10] A. Shakhovich, *Coronary Artery Disease* **1994**, *5*, 583-589.
- [11] B. E. Stähli, G. G. Camici, J. Steffel, A. Akhmedov, K. Shojaati, M. Graber, T. F. Lüscher, F. C. Tanner, *Circulation Research* **2006**, *99*, 149-155.
- [12] R. A. Byrne, M. Joner, A. Kastrati, *European Heart Journal*, **2015**, *36*, 3320-3331.
- [13] M. R. Bennett, M. O'Sullivan, *Pharmacology & Therapeutics* **2001**, *91*, 149-166.
- [14] a. D. R. Holmes, Jr., R. E. Vlietstra, H. C. Smith, G. W. Vetrovec, K. M. Kent, M. J. Cowley, D. P. Faxon, A. R. Gruentzig, S. F. Kelsey, K. M. Detre *et al.*, *American Journal of Cardiology* **1984**, *53*, 77C-C81; b. P. W. Serruys, P. de Jaegere, F. Kiemeneij, C. Macaya, W. Rutsch, G. Heyndrickx, H. Emanuelsson, J. Marco, V. Legrand, P. Materne, *et al.*, *The New England Journal of Medicine* **1994**, *331*, 489-495.
- [15] J. Thyberg, U. Hedin, M. Sjölund, L. Palmberg, B. A. Bottger, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **1990**, *10*, 966-990.
- [16] a. M. A. Reidy, J. Fingerle, V. Lindner, *Circulation* **1992**, *86*, III43-46; b. J. Varadarajulu, M. Laser, M. Hupp, R. Wu, C. R. Hauck, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *331*, 404-412.
- [17] P. Libby, D. Schwartz, E. Brogi, H. Tanaka, S. K. Clinton, *Circulation* **1992**, *86*, III47-52.
- [18] G. A. Stouffer, Z. Hu, M. Sajid, H. Li, G. Jin, M. T. Nakada, S. R. Hanson, M. S. Runge, *Circulation* **1998**, *97*, 907-915.
- [19] D. W. Losordo, J. M. Isner, L. J. Diaz-Sandoval, *Circulation* **2003**, *107*, 2635-2637.
- [20] M. Joner, A. V. Finn, A. Farb, E. K. Mont, F. D. Kolodgie, E. Ladich, R. Kutys, K. Skorija, H. K. Gold, R. Virmani, *Journal of the American College of Cardiology* **2006**, *48*, 193-202.
- [21] R. Virmani, F. D. Kolodgie, A. Farb, *American Heart Hospital Journal* **2004**, *2*, 85-88.
- [22] S. Garg, P. W. Serruys, *Journal of the American College of Cardiology*, **2010**, *56*, S1-42.
- [23] T. Palmerini, G. Biondi-Zoccai, D. Della Riva, C. Stettler, D. Sangiorgi, F. D'Ascenzo, T. Kimura, C. Briguori, M. Sabate, H. S. Kim, A. De Waha, E. Kedhi, P. C. Smits, C. Kaiser, G. Sardella, A. Marullo, A. J. Kirtane, M. B. Leon, G. W. Stone, *The Lancet* **2012**, *379*, 1393-1402.

- [24] N. Foin, R. D. Lee, R. Torii, J. L. Guitierrez-Chico, A. Mattesini, S. Nijjer, S. Sen, R. Petraco, J. E. Davies, C. Di Mario, M. Joner, R. Virmani, P. Wong, *International Journal of Cardiology*, **2014**, *177*, 800-808.
- [25] R. Pytela, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Cell* **1985**, *40*, 191-198.
- [26] J. W. Tamkun, D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, R. O. Hynes, *Cell* **1986**, *46*, 271-282.
- [27] M. Hoefling, H. Kessler, K. E. Gottschalk, *Angewandte Chemie International Edition in English* **2009**, *48*, 6590-6593.
- [28] P. E. Hughes, F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J. A. McDonald, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, *The Journal of biological chemistry* **1996**, *271*, 6571-6574.
- [29] a. M. A. Müller, L. Brunie, A. S. Bächer, H. Kessler, K. E. Gottschalk, U. Reuning, *Cellular Signalling* **2014**, *26*, 2493-2503; b. M. A. Muller, J. Opfer, L. Brunie, L. A. Volkhardt, E. K. Sinner, D. Boettiger, A. Bochen, H. Kessler, K. E. Gottschalk, U. Reuning, *Journal of Molecular Biology* **2013**, *425*, 2988-3006.
- [30] S. K. Sastry, A. F. Horwitz, *Current Opinion Cell Biology* **1993**, *5*, 819-831.
- [31] C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2010**, *10*, 753-768.
- [32] M. Shimaoka, J. Takagi, T. A. Springer, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2002**, *31*, 485-516.
- [33] a. L. A. Martinez-Lemus, X. Wu, E. Wilson, M. A. Hill, G. E. Davis, M. J. Davis, G. A. Meininger, *Journal of Vascular Research* **2003**, *40*, 211-233; b. M. J. Humphries, *Biochemical Society Transactions* **2000**, *28*, 311-340; c. M. A. Schwartz, *Trends in Cell Biology* **2001**, *11*, 466-470.
- [34] E. Ruoslahti, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1996**, *12*, 697-715.
- [35] J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, *294*, 339-345.
- [36] J. O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout, R. Liddington, *Cell* **1995**, *80*, 631-638.
- [37] a. M. Barczyk, S. Carracedo, D. Gullberg, *Cell and Tissue Research* **2010**, *339*, 269-280; b. S. J. Shattil, C. Kim, M. H. Ginsberg, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2010**, *11*, 288-300.
- [38] A. I. Rojas, A. R. Ahmed, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **1999**, *10*, 337-358.
- [39] a. R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11-25; b. M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H.J. Wester, *Accounts of Chemical Research* **2009**, *42*, 969-980.
- [40] C. Vinciguerra, J. C. Bordet, G. Beaune, C. Grenier, M. Dechavanne, C. Négrier, *Platelets* **2001**, *12*, 486-495.
- [41] K. R. Legate, R. Fässler, *Journal of Cell Science* **2009**, *122*, 187-198.
- [42] a. S. M. Albelda, C. A. Buck, *The FASEB Journal: The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **1990**, *4*, 2868-2880; b. D. G. Stupack, X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard, D. A. Cheresh, *The Journal of Cell Biology* **2001**, *155*, 459-470; c. B. P. Eliceiri, D. A. Cheresh, *Molecular Medicine* **1998**, *4*, 741-750.
- [43] a. R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673-687; b. P. Koistinen, M. Ahonen, V. M. Kähäri, J. Heino, *International Journal of Cancer* **2004**, *112*, 61-70; c. R. A. Clark, M. G. Tonnesen, J. Gailit, D. A. Cheresh, *The American Journal of Pathology* **1996**, *148*, 1407-1421.
- [44] a. J. J. Calvete, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **1995**, *208*, 346-360; b. A. E. May, T. Kalsch, S. Massberg, Y. Herouy, R. Schmidt, M. Gawaz, *Circulation* **2002**, *106*, 2111-2117.

- [45] a. S. Kim, K. Bell, S. A. Mousa, J. A. Varner, *The American Journal of Pathology* **2000**, *156*, 1345-1362; b. J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresch, *Nature Reviews Cancer* **2010**, *10*, 9-22.
- [46] K. Kappert, F. Blaschke, W. P. Meehan, H. Kawano, M. Grill, E. Fleck, W. A. Hsueh, R. E. Law, K. Graf, *Basic Research in Cardiology* **2001**, *96*, 42-49.
- [47] G. Barillari, L. Albonici, S. Incerpi, L. Bogetto, G. Pistrutto, A. Volpi, B. Ensoli, V. Manzari, *Atherosclerosis* **2001**, *154*, 377-385.
- [48] a. M. Moser, K. R. Legate, R. Zent, R. Fässler, *Science* **2009**, *324*, 895-899; b. B. H. Luo, T. A. Springer, *Current Opinion Cell Biology* **2006**, *18*, 579-586.
- [49] K. L. Wegener, A. W. Partridge, J. Han, A. R. Pickford, R. C. Liddington, M. H. Ginsberg, I. D. Campbell, *Cell* **2007**, *128*, 171-182.
- [50] S. Miyamoto, H. Teramoto, J. S. Gutkind, K. M. Yamada, *The Journal of Cell Biology* **1996**, *135*, 1633-1642.
- [51] A. E. Aplin, S. M. Short, R. L. Juliano, *The Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 31223-31228.
- [52] G. E. Hannigan, C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M. G. Coppolino, G. Radeva, J. Filmus, J. C. Bell, S. Dedhar, *Nature* **1996**, *379*, 91-96.
- [53] G. E. Hannigan, P. C. McDonald, M. P. Walsh, S. Dedhar, *Oncogene* **2011**, *30*, 4375-4385.
- [54] a. S. A. Wickström, A. Lange, E. Montanez, R. Fässler, *The EMBO Journal* **2010**, *29*, 281-291; b. A. Lange, S. A. Wickström, M. Jakobson, R. Zent, K. Sainio, R. Fässler, *Nature* **2009**, *461*, 1002-1006.
- [55] J. Kalra, C. Warburton, K. Fang, L. Edwards, T. Daynard, D. Waterhouse, W. Dragowska, B. W. Sutherland, S. Dedhar, K. Gelmon, M. Bally, *Breast Cancer Research* **2009**, *11*, R25, 1-16.
- [56] B. Ho, G. Hou, J. G. Pickering, G. Hannigan, B. L. Langille, M. P. Bendeck, *The American Journal of Pathology* **2008**, *173*, 278-288.
- [57] M. D. Schaller, J. T. Parsons, *Current Opinion Cell Biology* **1994**, *6*, 705-710.
- [58] a. X. Zhang, A. Chattopadhyay, Q. S. Ji, J. D. Owen, P. J. Ruest, G. Carpenter, S. K. Hanks, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 9021-9026; b. H. C. Chen, J. L. Guan, *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 31229-31233; c. M. D. Schaller, J. D. Hildebrand, J. D. Shannon, J. W. Fox, R. R. Vines, J. T. Parsons, *Molecular and Cellular Biology* **1994**, *14*, 1680-1688.
- [59] D. D. Schlaepfer, T. Hunter, *Cell Structure and Function* **1996**, *21*, 445-450.
- [60] S. M. Thomas, J. S. Brugge, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **1997**, *13*, 513-609.
- [61] H. Oppermann, A. D. Levinson, H. E. Varmus, L. Levintow, J. M. Bishop, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1979**, *76*, 1804-1808.
- [62] E. G. Arias-Salgado, S. Lizano, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 29699-29707.
- [63] a. D. J. Sieg, C. R. Hauck, D. Ilic, C. K. Klingbeil, E. Schaefer, C. H. Damsky, D. D. Schlaepfer, *Nature Cell Biology* **2000**, *2*, 249-256; b. B. P. Eliceiri, R. Paul, P. L. Schwartzberg, J. D. Hood, J. Leng, D. A. Cheresch, *Molecular Cell* **1999**, *4*, 915-924.
- [64] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1984**, *81*, 5985-5988.
- [65] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30-33.
- [66] J. D. Humphries, A. Byron, M. J. Humphries, *Journal of Cell Science* **2006**, *119*, 3901-3903.

- [67] a. E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, 21785-21788; b. M. Roque, J. T. Fallon, J. J. Badimon, W. X. Zhang, M. B. Taubman, E. D. Reis, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **2000**, 20, 335-342.
- [68] D. Cox, M. Brennan, N. Moran, *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, 9, 804-820.
- [69] R. Haubner, H. J. Wester, U. Reuning, R. Senekowitsch-Schmidtke, B. Diefenbach, H. Kessler, G. Stöcklin, M. Schwaiger, *The Journal of Nuclear Medicine* **1999**, 40, 1061-1071.
- [70] R. Haubner, W. A. Weber, A. J. Beer, E. Vabuliene, D. Reim, M. Sarbia, K. F. Becker, M. Goebel, R. Hein, H. J. Wester, H. Kessler, M. Schwaiger, *PLOS Medicine* **2005**, 2, 0244-0252.
- [71] I. Laitinen, A. Saraste, E. Weidl, T. Poethko, A. W. Weber, S. G. Nekolla, P. Leppänen, S. Ylä-Herttuala, G. Hölzlwimmer, A. Walch, I. Esposito, H. J. Wester, J. Knuuti, M. Schwaiger, *Circulation. Cardiovascular Imaging* **2009**, 2, 331-338.
- [72] I. Laitinen, J. Notni, K. Pohle, M. Rudelius, E. Farrell, S. G. Nekolla, G. Henriksen, S. Neubauer, H. Kessler, H. J. Wester, M. Schwaiger, *EJNMMI Research* **2013**, 3, 38.
- [73] S. Neubauer, F. Rechenmacher, A. J. Beer, F. Curnis, K. Pohle, C. D'Alessandria, H. J. Wester, U. Reuning, A. Corti, M. Schwaiger, H. Kessler, *Angewandte Chemie International Edition in English* **2013**, 52, 11656-11659.
- [74] S. L. Goodman, M. Picard, *Trends in Pharmacological Sciences* **2012**, 33, 405-412.
- [75] G. D. Hartman, M. S. Egbertson, W. Halczenko, W. L. Laswell, M. E. Duggan, R. L. Smith, A. M. Naylor, P. D. Manno, R. J. Lynch, G. Zhang, et al., *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, 35, 4640-4642.
- [76] V. W. Engleman, G. A. Nickols, F. P. Ross, M. A. Horton, D. W. Griggs, S. L. Settle, P. G. Ruminski, S. L. Teitelbaum, *The Journal of Clinical Investigation* **1997**, 99, 2284-2292.
- [77] J. Luna, T. Tobe, S. A. Mousa, T. M. Reilly, P. A. Campochiaro, *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **1996**, 75, 563-573.
- [78] a. D. A. Reardon, K. L. Fink, T. Mikkelsen, T. F. Cloughesy, A. O'Neill, S. Plotkin, M. Glantz, P. Ravin, J. J. Raizer, K. M. Rich, et al., *Journal of Clinical Oncology* **2008**, 26, 5610-5617; b. M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, 42, 3033-3040; c. R. Stupp, M. E. Hegi, B. Neyns, R. Goldbrunner, U. Schlegel, P. M. Clement, G. G. Grabenbauer, A. F. Ochsenbein, M. Simon, P. Y. Dietrich, et al., *Journal of Clinical Oncology* **2010**, 28, 2712-2718.
- [79] R. Stupp, M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y. K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, D. Grujcic, et al., *The Lancet Oncology* **2014**, 15, 1100-1108.
- [80] *Merck KGaA Press Release February 25, 2013*.
- [81] O. L. Chinot, *The Lancet Oncology* **2014**, 15, 1044-1045.
- [82] a. W. Wang, G. Camenisch, D. C. Sane, H. Zhang, E. Hugger, G. L. Wheeler, R. T. Borchardt, B. Wang, *Journal of Controlled Release* **2000**, 65, 245-251; b. G. M. Pauletti, S. Gangwar, T. J. Siahaan, J. Aubé, R. T. Borchardt, *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, 27, 235-256.
- [83] K. E. Shannon, J. L. Keene, S. L. Settle, T. D. Duffin, M. A. Nickols, M. Westlin, S. Schroeter, P. G. Ruminski, D. W. Griggs, *Clinical and Experimental Metastasis* **2004**, 21, 129-138.
- [84] F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. Polleux, C. Mas-Moruno, M. De Simone, E. A. Cavalcanti-Adam, J. P. Spatz, R. Fässler, H. Kessler, *Angewandte Chemie International Edition in English* **2013**, 52, 1572-1575.
- [85] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *The Journal of Biological Chemistry* **1951**, 193, 265-275.

- [86] Y. Le, B. Sauer, *Molecular Biotechnology* **2001**, *17*, 269-275.
- [87] N. Sternberg, D. Hamilton, *Journal of Molecular Biology* **1981**, *150*, 467-486.
- [88] B. Sauer, N. Henderson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, *85*, 5166-5170.
- [89] a. S. Liu, S. W. Xu, K. Blumbach, M. Eastwood, C. P. Denton, B. Eckes, T. Krieg, D. J. Abraham, A. Leask, *Journal of Cell Science* **2010**, *123*, 3674-3682; b. T. R. Carlson, H. Hu, R. Braren, Y. H. Kim, R. A. Wang, *Development* **2008**, *135*, 2193-2202.
- [90] R. Fässler, M. Meyer, *Genes Dev* **1995**, *9*, 1896-1908.
- [91] K. Rajewsky, H. Gu, R. Kühn, U. A. Betz, W. Müller, J. Roes, F. Schwenk, *The Journal of Clinical Investigation* **1996**, *98*, 600-603.
- [92] A. Pechisler, *The Science Creative Quarterly*, **2004**.
- [93] a. J. L. Duband, M. Gimona, M. Scatena, S. Sartore, J. V. Small, *Differentiation* **1993**, *55*, 1-11; b. S. S. Rensen, P. A. F. M. Doevendans, G. J. J. M. van Eys, *Netherlands Heart Journal* **2007**, *15*, 100-108.
- [94] F. Rechenmacher, S. Neubauer, C. Mas-Moruno, P.M. Dorfner, J. Polleux, J. Guasch, B. Conings, H.-G. Boyen, A. Bochen, T. R. Sobahi, R. Burgkart, J. P. Spatz, R. Fässler, H. Kessler, *Chemistry- A European Journal*. **2013**, *19*, 9218-9223.
- [95] F. Rechenmacher, K. Steigerwald, B. Laufer, S. Neubauer, T. G. Kapp, L. Li, C. Mas-Moruno, M. Joner, H. Kessler, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1-7.
- [96] D. Heckmann, A. Meyer, B. Laufer, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1397-1407.
- [97] a. E. Borges, Y. Jan, E. Ruoslahti, *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 39867-39873; b. K. A. DeMali, E. Balciunaite, A. Kazlauskas, *The Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 19551-19558; c. M. Schneller, K. Vuori, E. Ruoslahti, *The EMBO Journal* **1997**, *16*, 5600-5607; d. R. Soldi, S. Mitola, M. Strasly, P. Defilippi, G. Tarone, F. Bussolino, *The EMBO Journal* **1999**, *18*, 882-892.
- [98] L. Moro, L. Dolce, S. Cabodi, E. Bergatto, E. Boeri Erba, M. Smeriglio, E. Turco, S. F. Retta, M. G. Giuffrida, M. Venturino, et al., *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 9405-9414.
- [99] C. Sundberg, K. Rubin, *The Journal of Cell Biology* **1996**, *132*, 741-752.
- [100] A. S. Woodard, G. Garcia-Cardena, M. Leong, J. A. Madri, W. C. Sessa, L. R. Languino, *Journal of Cell Science* **1998**, *111*, 469-478.
- [101] a. G. A. Ferns, E. W. Raines, K. H. Sprugel, A. S. Motani, M. A. Reidy, R. Ross, *Science* **1991**, *253*, 1129-1132; b. P. Libby, S. J. Warner, R. N. Salomon, L. K. Birinyi, *The New England Journal of Medicine* **1988**, *318*, 1493-1498.
- [102] J. Ivaska, J. Heino, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2011**, *27*, 291-320.
- [103] K. Kappert, G. Schmidt, G. Doerr, B. Wollert-Wulf, E. Fleck, K. Graf, *Hypertension* **2000**, *35*, 255-261.
- [104] D. F. Legler, G. Wiedle, F. P. Ross, B. A. Imhof, *Journal of Cell Science* **2001**, *114*, 1545-1553.
- [105] J. H. Beer, K. T. Springer, B. S. Coller, *Blood* **1992**, *79*, 117-128.
- [106] A. Borck, M. Gratz, H. Kessler, M. Joner, F. Rechenmacher, S. Neubauer, Veröffentlichungsnummer US20140222134 A1.
- [107] J. Mulrooney, K. Foley, S. Vineberg, M. Barreuther, L. Grabel, *Experimental Cell Research* **2000**, *258*, 332-341.
- [108] Q. Xu, *The American Journal of Pathology* **2004**, *165*, 1-10.
- [109] W. J. van der Giessen, A. M. Lincoff, R. S. Schwartz, H. M. van Beusekom, P. W. Serruys, D. R. Holmes, S. G. Ellis, E. J. Topol, *Circulation* **1996**, *94*, 1690-1697.
- [110] S. Abraham, N. Kogata, R. Fässler, R. H. Adams, *Circulation Research* **2008**, *102*, 562-570.

- [111] A. Kumar, V. Lindner, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **1997**, *17*, 2238-2244.
- [112] M. Moroi, L. Zhang, T. Yasuda, R. Virmani, H. K. Gold, M. C. Fishman, P. L. Huang, *The Journal of Clinical Investigation* **1998**, *101*, 1225-1232.
- [113] P. Carmeliet, L. Moons, J. M. Stassen, M. De Mol, A. Bouché, J. J. van den Oord, M. Kockx, D. Collen, *The American Journal of Pathology* **1997**, *150*, 761-776.
- [114] V. Lindner, J. Fingerle, M. A. Reidy, *Circulation Research* **1993**, *73*, 792-796.
- [115] K. Pels, M. Labinaz, E. R. O'Brien, *Japanese Circulation Journal* **1997**, *61*, 893-904.