

# Einfluss von Imatinib auf die molekularen Mechanismen der Neointimabildung im Mausmodell

Carol Seyboth

Aus der I. Medizinischen Klinik der Technischen Universität München

Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig

## **Einfluss von Imatinib auf die molekularen Mechanismen der Neointimabildung im Mausmodell**

**Carol Rebecca Seyboth**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.- Doz. Dr. D. Zohlhöfer
2. Univ.- Prof. Dr. K.- L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 29.03.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.12.2007 angenommen.

gewidmet  
Dr. Frieda Seyboth  
A 1909 Ω 1983

<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
<b>2 SCHRIFTTUM.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 KORONARE HERZKRANKHEIT .....</b>	<b>4</b>
2.1.1 PATHOGENESE .....	4
2.1.2 THERAPIE .....	5
<b>2.2 RESTENOSE.....</b>	<b>5</b>
2.2.1 PATHOGENESE .....	5
2.2.2 THERAPIE .....	7
<b>2.3 TIERMODELL.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 IMATINIB .....</b>	<b>9</b>
<b>3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1 ZIELSETZUNG UND VERSUCHSAUFBAU DER EIGENEN ARBEIT .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2 MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>11</b>
3.2.1 TIERVERSUCH.....	11
3.2.1.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	11
3.2.1.2 Gruppeneinteilung und Pharmakotherapie.....	12
3.2.1.3 Femoralisverletzungsmodell .....	13
3.2.1.4 Euthanasie und Probenentnahme.....	13
3.2.2 MORPHOMETRISCHE ANALYSE.....	13
3.2.2.1 Probenaufbereitung .....	13
3.2.2.2 Präparateherstellung und Färbung.....	13
3.2.2.3 Auswertung und statistische Analyse.....	14
3.2.3 GENEXPRESSIONSANALYSE .....	14
3.2.3.1 Probenaufbereitung .....	15
3.2.3.2 mRNA Isolierung .....	15
3.2.3.3 cDNA Synthese .....	15
3.2.3.4 Genexpressionsanalyse.....	17
3.2.3.5 Auswertung und statistische Analyse.....	19
3.2.4 VALIDIERUNG DURCH PCR .....	20
3.2.5 IMMUNHISTOCHEMIE .....	20
<b>3.3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>22</b>
3.3.1 MORPHOMETRIE .....	22
3.3.2 GENEXPRESSIONSANALYSE .....	24
3.3.2.1 Differentielle Regulierung nach 3 Tagen .....	25
3.3.2.2 Differentielle Regulierung nach 7 Tagen .....	28
3.3.2.3 Differentielle Regulierung nach 14 Tagen .....	33
3.3.2.4 Regulierung andere in Zusammenhang mit der Restenose beschriebener Gene.....	34
3.3.3 PCR.....	36
3.3.3.1 PDGF-R.....	37
3.3.3.3 MMP-14 .....	37
3.3.3.3 Alk1 und Alk5 .....	38
3.3.4 IMMUNHISTOCHEMIE .....	39
3.3.4.1 CD31 .....	40

3.3.4.2 sm-actin .....	41
3.3.4.3 SDF-1 .....	42
3.3.4.4 c-kit.....	43
3.3.4.5 Alk1 .....	44
<b><u>4 DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>45</u></b>
<b>4.1 BEURTEILUNG DES OPERATIVEN MODELLS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2 EINFLUß VON IMATINIB AUF DIE NEOINTIMABILDUNG .....</b>	<b>46</b>
<b>4.3 EINFLUß VON IMATINIB AUF DIE GENEXPRESSION .....</b>	<b>48</b>
4.3.1 EINFLUß VON IMATINIB AUF DIE EXPRESSION VON PDGF UND PDGF ASSOZIIERTER GENE .....	48
4.3.2 EINFLUß VON IMATINIB AUF DIE EXPRESSION VON GENEN DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX.....	49
4.3.3 EINFLUß VON IMATINIB AUF DIE EXPRESSION BEREITS BESCHRIEBENER NEOINTIMALER GENE.....	50
<b>4.4 EINFLUß VON IMATINIB AUF DIE STAMMZELLREKRUTIERUNG UND DIFFERENZIERUNG 51</b>	
4.4.1 ROLLE VON SDF-1 UND C-KIT .....	51
4.4.2 ROLLE VON ALK1 .....	52
<b><u>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>54</u></b>
<b><u>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>55</u></b>
<b><u>8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u></b>	<b><u>61</u></b>
<b><u>9 DANKSAGUNG .....</u></b>	<b><u>63</u></b>
<b><u>10 LEBENSLAUF .....</u></b>	<b><u>64</u></b>

# 1 EINLEITUNG

Im Jahr 2003 wurden in Deutschland rund 821 000 Patienten wegen ischämischer Herzkrankheiten, auch als koronare Herzerkrankung (KHK) bezeichnet, stationär behandelt. Im Jahr 2004 wurden 45% aller Todesfälle in Deutschland durch Herz-Kreislauf-erkrankungen verursacht (Statistisches Bundesamt 10/2005).

Seit der Einführung der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) 1977 durch Grüntzig (Grüntzig A 1979) und der Weiterentwicklung dieser Technik durch Einführung des Stents ab 1986 (Puel, Joffre et al. 1987) stellen interventionelle kardiologische Arbeitstechniken die Hauptmaßnahme in der Therapie der KHK da. So wurden im Jahr 2000 europaweit 726 000 Interventionen an den Koronarien durchgeführt, wobei 69% mittels Katheter und nur 31% herzchirurgisch vorgenommen wurden (Van Belle, Rosey et al. 2004). Bei 525 983 durchgeführten Angioplastien wurden 39 500 mal Stents verwendet (Balmer, Rotter et al. 2005). Dabei kommt es selbst unter Stentimplantation noch in 22-32% der Fälle zu einem Wiederverschluß des behandelten Gefäßes, zur so genannten Restenose (Serruys, de Jaegere et al. 1994). Trotz großer technologischer und wissenschaftlicher Fortschritte wie z.B. der Entwicklung medikamentenbeschichteter Stents sind die zur Restenose führenden pathophysiologischen Prozesse bisher noch nicht vollständig verstanden und behandelbar.

## 2 SCHRIFTTUM

### 2.1 Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit ist die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzarterien. Ihre Ursache ist in 90% (Bültmann, Kirkpatrick et al. 2001) ein zunehmender Verschluß der Koronararterien durch atherosklerotische Plaques, für deren Bildung als Risikofaktoren Zigarettenrauchen, arterielle Hypertonie, Dyslipidämien, Diabetes mellitus und familiäre Vorbelastung genannt werden. Die Einengung der Arterien führt durch verminderten Blutfluss zur Koronarinsuffizienz mit einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot an den Herzmuskel und seinem Sauerstoffbedarf.

#### 2.1.1 Pathogenese

In Bezug auf die Pathogenese der Atherosklerose hat sich die „reaction to injury“ Theorie etabliert. Die Atherosklerose nimmt ihren Ausgang von einer endothelialen Dysfunktion, die durch die erwähnten Risikofaktoren hervorgerufen werden kann. Nach Verletzung der Integrität der Endothelbarriere kann *low density lipoprotein* (LDL) in die Gefäßintima eintreten, wo es oxidiert wird. Zeitgleich wandern Monozyten in die Intima ein. Sie wandeln sich in Makrophagen um und nehmen über ihren scavenger-Rezeptor das oxidierte LDL-Cholesterin auf. Die Makrophagen werden zu so genannten Schaumzellen. Makroskopisch zeigen sich in diesem Stadium so genannte „fatty streaks“. Thrombozyten adhären an das geschädigte Endothel, um dann über die Produktion von *platelet derived growth factor* (PDGF) die Proliferation glatter Muskelzellen (SMCs) zu stimulieren. Die SMCs wandeln sich von einem ruhenden, kontraktilen in einen proliferierenden, sekretorischen Typ um und tragen zum weiteren Plaquewachstum bei. In diesem Stadium wird die Läsion als fibröse Plaque bezeichnet. In die Plaque werden weiterhin Lipide abgelagert, während Schaumzellen nekrotisch zerfallen. Es kommt zur Sklerosierung dieser Nekrosen und zur Verkalkung der Plaque. Am Ende ist mit einer so genannten komplexen Läsion das Vollbild der Atherosklerose erreicht. Innerhalb der Läsion sezernieren Makrophagen z.B. *interleukin-6* und *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF-  $\alpha$ ), die über eine Entzündungsreaktion und eine weitere Zellrekrutierung die Plaque destabilisieren. Zusätzlich bilden die Makrophagen Metalloproteinasen, die die extrazelluläre Matrix abbauen. All diese Prozesse schwächen die Plaque bis zur Ruptur. Durch Aktivierung der Gerinnungskaskade kommt es dann zu einer Thrombusbildung und einem akuten Gefäßverschluß, der sich im Bereich der Koronarien als Myokardinfarkt äußert (Roessner, Kirkpatrick et al. 2001).

### **2.1.2 Therapie**

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Problematik der Restenose als bedeutsamer Komplikation der interventionellen Kardiologie befasst, sei in Hinblick auf die medikamentöse und operative Therapie der KHK auf einschlägige Lehrbücher der Kardiologie und Chirurgie verwiesen.

Interventionell kardiologisch erfolgt die Rekanalisierung des betroffenen Gefäßes mit verschiedenen Techniken, wobei es sich um kathetergestützte Verfahren handelt. In Frage kommen hier neben selteneren Verfahren wie der Laserangioplastie (Choy 1988) und der Rotablation (Hansen, Auth et al. 1988) vor allem die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA). An Hauptkomplikationen sind in der Frühphase die Gefäßdissektion und der akute Gefäßverschluß zu nennen (Herold 2005), in der Spätphase die Restenose bei circa 30% der Patienten. Der Einsatz eines Stents zusätzlich zur PTCA zeigt in der BENESTENT I Studie eine signifikante Reduktion der Restenose von 32% auf 22% (Serruys, de Jaegere et al. 1994), in der BENESTENT II Studie mit Heparin beschichteten Stents sogar eine Reduktion von 31% auf 16% (Serruys, van Hout et al. 1998), ein Ergebnis das die STRESS Studie mit einer Reduktion der Restenose von 55% auf 34% bestätigt (Savage, Fischman et al. 1998). Zusätzlich senkte der Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern nach der Stentimplantation das Risiko thrombotischer Verschlüssen von bis zu 24% (Serruys, Strauss et al. 1991) auf unter 2% (Schomig, Neumann et al. 1996).

### **2.2 Restenose**

Als Restenose wird die Wiedereinengung im Bereich einer zuvor z.B. durch PTCA behandelten Gefäßstenose bezeichnet, wenn der Lumenverlust  $\geq 50\%$  des durch die Aufdehnung des ursprünglichen Verschlusses erreichten Gefäßdurchmessers beträgt oder in einer nachfolgenden Angiographie eine Stenose  $>50\%$  festgestellt wird (Bennett and O'Sullivan 2001).

Trotz einer Reduktion der Restenose Häufigkeit nach PTCA durch den Einsatz von Stents beträgt sie in verschiedenen Studien immer noch zwischen 22% bis 32% (Fischman, Leon et al. 1994), (Serruys, de Jaegere et al. 1994).

#### **2.2.1 Pathogenese**

Grundsätzlich handelt es sich bei der Restenose um einen komplexen, noch nicht bis ins Detail geklärten Prozess, der sich aus dem Zusammenspiel der im Anschluß genannten Faktoren ergibt.

### **Endotheliale Schädigung, Thrombose und Inflammation**

Das Aufblasen des PTCA Ballons verursacht den Verlust des Gefäßendothels (Li, Moore et al. 1995; Kong, Melo et al. 2004). Es kommt zur Aktivierung von Thrombozyten, die Wachstumsfaktoren wie PDGF freisetzen (Fingerle, Johnson et al. 1989), dem eine große Rolle bei der Neointimabildung zugeschrieben wird. Ohne das aus Thrombozyten freigesetzte PDGF kommt es zu einer deutlich geringeren Migration glatter Muskelzellen in die Neointima (Fingerle, Johnson et al. 1989). Direkt nach der Endotheldenudation lagern sich neben Thrombozyten auch inflammatorische Zellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten an der Gefäßverletzung ab. Sie werden über den von Endothelzellen und Leukozyten gebildeten TNF und über *interleukin-6* (IL-6) rekrutiert (Welt, Tso et al. 2003), wobei die Höhe der IL-6 Ausschüttung mit einem erhöhten Restenoserisiko einhergeht (Hojo, Ikeda et al. 2000). Die Anzahl der in die Läsion rekrutierten Monozyten steht mit der Dicke der sich entwickelnden Neointima in Beziehung (Rogers, Welt et al. 1996). Monozyten produzieren wie auch SMCs und Endothelzellen den *macrophage migration inhibitory factor* (MIF), dessen Hemmung im Experiment zu einer Reduktion der Neointima Bildung führt (Chen, Sakuma et al. 2004). Diese Prozesse werden begrenzt durch eine Regeneration des Endothels, die innerhalb der ersten 24h nach PTCA durch Proliferation und Migration endothelialer Zellen von den Enden der Verletzung her beginnt (Van Belle, Bauters et al. 1998) und nach 6-10 Wochen abgeschlossen ist. Eine schnelle und vollständige Endothelialisierung vermindert das Ausmaß der Restenose und lässt sich durch endotheliale Wachstumsfaktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) günstig beeinflussen (Asahara, Bauters et al. 1995).

### **Neointimale Hyperplasie**

Als Neointima wird das innerhalb der Lamina elastica interna eines verletzten Gefäßes entstehende Gewebe bezeichnet, das das Gefäßlumen einengt. Die Neointima Bildung ist vor allem auf das Wachstum von SMCs und auf deren Synthese extrazellulärer Matrix zurückzuführen und läuft im Mausmodell in einem Zeitraum von 1 bis 4 Wochen ab (Van Belle, Bauters et al. 2001). Eine Schlüsselrolle kommt hierbei PDGF zu, das neben Thrombozyten (Fingerle, Johnson et al. 1989) auch aus Endothelzellen, Makrophagen und SMCs selbst freigesetzt wird (Assoian, Grotendorst et al. 1984; Walker, Bowen-Pope et al. 1986; Wilcox, Smith et al. 1988; Thyberg, Hedin et al. 1990). Durch PDGF aktivierte glatte Muskelzellen wandeln sich von einem ruhenden, kontraktilen Typ in einen aktiven, sekretorischen Typ um (Thyberg, Hedin et al. 1990). Sie wandern aus der Media in die Neointima ein und proliferieren dort (Clowes, Reidy et al. 1983; Ferns, Raines et al. 1991; Deguchi, Namba et al. 1999). Weitere Wachstumsfaktoren, die die Proliferation glatter

Muskelzellen fördern sind der *basic fibroblast growth factor* (bFGF), der *insulin like growth factor* (IGF) und der *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) (Cercek, Fishbein et al. 1990; Lindner, Lappi et al. 1991; Nikol, Isner et al. 1992). Neben diesen Wachstumsfaktoren spielen auch hormonellen Faktoren, wie z.B. Angiotensin II, eine Rolle (Powell, Muller et al. 1990). Glatte Muskelzellen machen als zelluläre Komponente der Neointima nur 11 % ihres Volumens aus, der Rest ist extrazelluläre Matrix (Schwartz, Holmes et al. 1991), die unter anderem unter dem Einfluß von TGF- $\beta$  gebildet wird (Schlumberger, Thie et al. 1991). Eine weitere Rolle im Prozess der Neointimabildung kommt den Matrix Metalloproteinasen (MMP) zu, vor allem der MMP9 und der MMP14. Sie modulieren die extrazelluläre Matrix und unterstützen die Migration und Proliferation der SMCs (Newby 2005).

### **Negatives Remodeling**

Unter negativem Remodeling wird das Schrumpfen eines Gefäßes nach PTCA verstanden. Es kommt durch eine Fibrose der Adventitia zu einer bindegewebigen Schrumpfung des Gefäßes. Dieser Prozess wird durch TGF- $\beta$  beeinflusst (Ryan, Kotliansky et al. 2003) und kann durch einen Antagonisten gehemmt werden (Smith, Bryant et al. 1999).

### **Rekrutierung von Progenitorzellen**

Über die bereits beschriebenen lokalen Vorgänge hinaus zeichnet sich eine immer stärkere Rolle für zirkulierende Progenitorzellen im Prozeß der Restenose ab (Sata, Saiura et al. 2002). Dabei handelt es sich einerseits um endotheliale Vorläuferzellen, die unter dem Einfluß von TGF- $\beta$  ausdifferenzieren (Henrich, Hahn et al. 2004) und zur Reendothelialisierung beitragen (Asahara, Bauters et al. 1995). Andererseits werden c-kit<sup>+</sup> hämatopoetische Progenitorzellen beschrieben, die via *stromal derived factor 1* (SDF-1) an den Ort der Gefäßverletzung (Zernecke, Schober et al. 2005) rekrutiert werden und zu glatten Muskelzellen ausdifferenzieren. Während ihrer Differenzierung zu SMCs verlieren die Progenitorzellen c-kit und werden *smooth muscle actin* (sm-actin) positiv (Hibbert, Chen et al. 2004).

## **2.2.2 Therapie**

### **Systemische Pharmakotherapie**

Während der Einsatz gerinnungshemmender Medikamenten, wie Ticlopidin, Aspirin und Abciximab und ACE Hemmern (MERCATOR 1992) keinen Effekt auf die Restenoserate zeigte (Kastrati, Schuhlen et al. 1997; Ellis, Effron et al. 1999), konnte der Angiotensin II Rezeptor Blocker Valsartan in der VALVACE Studie die Neointimabildung begrenzen (Peters, Trummel et al. 2005). Erfolg versprechend war auch der die Glukokortikoidgabe in der IMPRESS Studie (Versaci, Gaspardone et al. 2002).

### **Molekulare Intervention**

Im Tierexperiment konnten Antagonisten von PDGF über Hemmung der Proliferation und Migration von SMCs die Restenose reduzieren (Deguchi, Namba et al. 1999). Auch eine Gentherapie mit VEGF konnte über eine schnellere Reendothelialisierung (Asahara, Bauters et al. 1995) die Neointimabildung begrenzen (Rutanan, Turunen et al. 2005).

### **Physikalische Therapie**

Auf Grund der schnellen Proliferation der Neointima bietet sich die Bestrahlung als Therapiealternative an. Im Rahmen der Restenoseverhütung wird sie als intraluminale  $\gamma$  – oder  $\beta$ -Strahlung mittels eines Katheters (Brachytherapie) eingesetzt. Sowohl  $\gamma$  (SCRIPPS, GAMMA I, WRIST) als auch  $\beta$ -Strahlung (PREVENT) konnten in randomisierten Studien die Restenose Häufigkeit nach PTCA von 50-60% auf 17-32% senken (Winslow, Sharma et al. 2005), wobei es im Zeitverlauf zum Nachlassen der Wirkung (Grise, Massullo et al. 2002) und zu einem spätem Gefäßverschluß durch Thrombose kommen konnte (Waksman, Bhargava et al. 2000).

### **Drug Eluting Stents**

Als wirkungsvolle Therapie haben sich Stents mit antiproliferativer Beschichtung erwiesen. Zu nennen ist hier die Beschichtung mit Paclitaxel, die in der TAXUS II Studie eine Reduktion der Restenoserate von 20% auf 6% bewirkte. Allerdings bleiben bislang Fragen offen, ob es unter Verwendung dieser Stents nicht zu einer späten Restenose auf Grund von chronischer Inflammation und mangelnder Endothelialisierung kommen kann (Farb, Heller et al. 2001; Liistro, Stankovic et al. 2002). Besonders viel versprechend war die Behandlung mit Rapamycin beschichteten Stents. Die SIRIUS Studie zeigte für diese Stents eine Reduktion der Restenoserate von 35% auf 3% nach 8 Monaten im Vergleich zu unbeschichteten Stents (Moses, Leon et al. 2003). Dieser Effekt bestätigte sich auch in einer follow up Untersuchung zwei Jahre später, wobei ein erhöhtes Risiko einer späten Thrombosebildung diskutiert werden muß (Schampaert, Moses et al. 2006; Williams, Abbott et al. 2006).

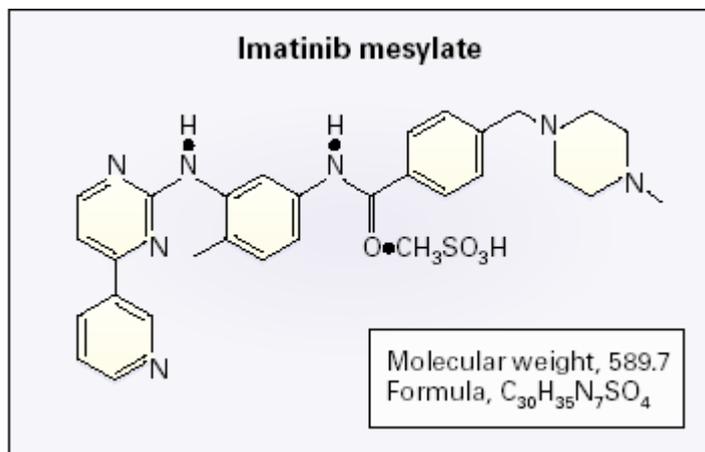
### **2.3 Tiermodell**

Als Versuchstier bietet sich die Maus, einerseits wegen ihres schnellen Generationszyklus und ihrer kosteneffizienten Haltung, aber vor allem auf Grund ihrer hohen genetischen Homologie von rund 86% zum Menschen an (Carmeliet, Moons et al. 1998). In der Untersuchung der vorliegenden Arbeit wird der 129/SvJ-Inzuchtstamm gewählt, der zuverlässig Neointima bildet (Sata, Maejima et al. 2000). Die Tiere werden nach einem von Sata et al. entwickelten Protokoll operiert, das der Ballonangioplastie ähnelt. Dieses Modell zeichnet sich durch die reproduzierbare Induktion einer glattmuskulären Neointima aus. Nach Endotheldenudation

kommt es nach 7 Tagen zur ersten Neointimabildung die ihre maximale Ausprägung nach 4 Wochen erreicht. Ein entscheidender Vorteil dieses Modells ist die postinterventionelle Wiederherstellung eines orthograden Blutflusses durch die Läsion. Es erlaubt damit auch die Untersuchung an die Verletzung adhärerender, zirkulierender Progenitorzellen.

## 2.4 Imatinib

Imatinib mesylate, auch bekannt als STI 571, ist ein spezifischer Tyrosinkinase Inhibitor der von der Firma Novartis unter dem Handelsnamen Gleevec vertrieben wird (Abb.1). Das für die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie und von gastrointestinalen Stromatumoren zugelassene Medikament hemmt neben dem bcr-abl Fusionsprotein des Philadelphiachromosoms auch spezifisch c-kit und den PDGF Rezeptor (Buchdunger, Cioffi et al. 2000; Savage and Antman 2002).



**Abbildung 1** Strukturformel von Imatinib (Savage and Antman 2002)

Der PDGF-Rezeptor ist eine Typ III Rezeptor Tyrosinkinase (Ullrich and Schlessinger 1990). Er besteht aus zwei Polypeptidketten, der A und der B Kette. Bindung seines Liganden PDGF führt zur Dimerisierung des Rezeptors und zur Tyrosinphosphorylierung (Heldin, Ertlund et al. 1989). Der c-kit Rezeptor gehört ebenso wie der PDGF Rezeptor zur Familie der Typ III Rezeptor Tyrosinkinasen. Die Bindung seines Liganden *stem cell factor* induziert die Homodimerisierung und die Phosphorylierung des Rezeptors am Tyrosinrest. Dadurch bildet sich eine Andockstelle für schwefelhaltige Signaltransduktionsmoleküle (Yarden, Kuang et al. 1987; Arakawa, Yphantis et al. 1991; Heldin 1995). Imatinib mesylate hemmt diese Signaltransduktion jeweils spezifisch und damit die Weiterleitung von Signalen der Proliferation und Differenzierung (Kolibaba and Druker 1997). Neben seinem Einsatz in der onkologischen Therapie konnte für Imatinib im Tiermodell eine Reduktion der Restenose

nachgewiesen werden (Myllarniemi, Frosen et al. 1999). Die Wirkung dieses Medikamentes auf die Restenose wird in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht.

## **3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

### **3.1 Zielsetzung und Versuchsaufbau der eigenen Arbeit**

Dem Prozess der koronaren Restenose liegen komplexe molekularbiologische Interaktionen zu Grunde, die bisher noch nicht in vollem Umfang beschrieben werden konnten. Die vorliegende Arbeit verfolgte daher das Ziel, einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der molekularen Mechanismen zu leisten.

Ein effektiver Ansatz war hierbei die Wahl eines in vivo Tiermodells, bei dem einer Maus eine Drahtverletzung der Arteria femoralis beigebracht wurde. Das gewählte operative Vorgehen ermöglichte die Wiederherstellung eines orthograden Blutflusses. Diese Versuchsanordnung bildet die tatsächlichen Verhältnisse im Patienten nach PTCA nach und erlaubte auch Beobachtungen zur Progenitorzellrekrutierung (Sata, Maejima et al. 2000). Zur genauen Dokumentation der Ereigniskette und des Zeitverlaufs, die zur Neointimabildung führten, wurden 3, 7, 14 und 28 Tage als Untersuchungszeitpunkte gewählt. Der morphologische Nachweis der Neointimabildung erfolgte durch die histologische Aufbereitung entnommener Gefäße. Das Ausmaß des resultierenden Gefäßverschlusses wurde durch morphometrische Analyse ermittelt. Es erfolgte eine statistische Auswertung zur Feststellung der Signifikanz.

Um die Entstehung der Restenose besser zu verstehen, bot sich die Untersuchung der im Zeitverlauf der Verletzung regulierten Gene an. Hier erlaubt die Genexpressionsanalyse die Erfassung eines breiten Spektrums potentiell beteiligter Gene. Genspezifische PCRs validierten die in der Genespressionsanalyse erhobenen Daten, während spezielle immunhistochemische Färbungen eine Bestätigung auf Proteinebene gewährleisteten.

Eine besondere Rolle in der Neointimabildung spielt PDGF, das einen stimulierenden Einfluss auf die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen ausübt. Die Inhibierung von PDGF kann zu einer Reduktion der Neointimabildung führen (Deguchi, Namba et al. 1999). Zusätzlich zur Proliferation glatter Muskelzellen lagern sich nach PTCA c-kit<sup>+</sup> Zellen an die Gefäßläsionen an und differenzieren dort zu sm-actin<sup>+</sup> glatten Muskelzellen (Hibbert, Chen et al. 2004). Imatinib ist in der Lage sowohl den PDGF-R als auch c-kit spezifisch zu hemmen. Daher untersuchte die vorliegende Arbeit die Wirkung von Imatinib auf die Restenose im Mausmodell. Darüber hinaus könnte die Inhibierung der bereits in der Restenose beschriebenen PDGF und c-kit abhängigen Mechanismen aber auch einen tieferen Einblick in bisher nicht bekannte Aspekte der multifaktoriellen Prozesse der Restenose geben.

### **3.2 Material und Methode**

#### **3.2.1 Tierversuch**

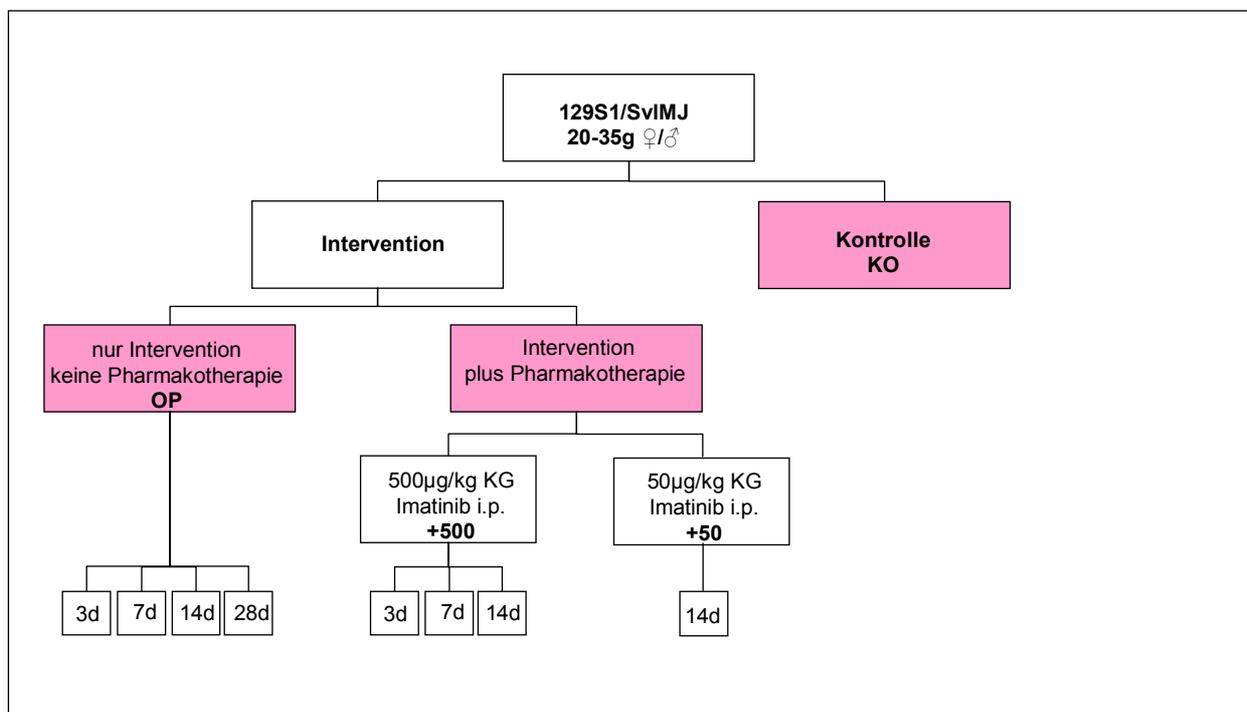
##### **3.2.1.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung**

Das Tierversuchsvorhaben wurde durch die Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 genehmigt.

Zum Tierversuch herangezogene Tiere waren männliche und weibliche Inzucht Mäuse des Stammes 129S1/SvIMJ (Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) die zum Zeitpunkt des Versuchs zwischen 20 und 35g wogen. Die Versuchstiere wurden im Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten. Hier erfolgte auch die Operation, Euthanasie und Probenentnahme. Die im Anschluss unter 3.2.1.2 und 3.2.1.3 beschriebenen Handlungen wurden durch die Tiermedizinerin Dr. Pamela Frank fachkundig durchgeführt.

### 3.2.1.2 Gruppeneinteilung und Pharmakotherapie

Es wurden 3 Hauptversuchsgruppen definiert (Abb. 2, rot hinterlegt). Imatinib Mesylate (Novartis, Deutschland GmbH) wurde den Versuchstieren in den Medikamentengruppen von drei Tagen vor Intervention bis zur Euthanasie alle 24 Stunden entweder in einer Dosis von 50 $\mu$ g/kg KG oder 500 $\mu$ g/kg KG intraperitoneal verabreicht (Gruppen +50 und +500). In der Gruppe OP wurden je sieben Tiere nach 3, 7, 14 und 28 Tagen euthanasiert, in der Gruppe +500 je sieben Tiere nach 3, 7, und 14 Tagen. Die Gruppe +50 fand zum Zeitpunkt 14 Tage Eingang in die morphometrische Analyse. Die Kontrollgruppe (KO) bestand aus Tieren, die nicht operiert wurden und als Ausgangswert dienen (Abb. 2).



**Abbildung 2** Gruppeneinteilung der Versuchstiere.

KO = keine Intervention, OP = nur Verletzung der Arteria femoralis, +500 = Verletzung der Arteria femoralis plus Therapie mit +500µg/kg KG Imatinib intra peritoneal, +50 = Verletzung der Arteria femoralis plus Therapie mit +50µg/kg KG Imatinib intra peritoneal. 3d = Euthanasie 3 Tage nach Operation, 7d = Euthanasie 7 Tage nach Operation, 14d = Euthanasie 14 Tage nach Operation, 28d = Euthanasie 28 Tage nach Operation. Die Gruppe +50 findet sich nur in der morphometrischen Analyse nach 14 Tagen wieder und wurde sonst nicht weiter verfolgt.

### 3.2.1.3 Femoralisverletzungsmodell

Die zur Durchführung der Drahtverletzung nötige Anästhesie wurde mit Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott, Billingstadt, Schweden) und der intraperitonealen Injektion von 0.05mg/kg Fentanyl (FENTANYL<sup>®</sup> CuraMED, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) gewährleistet.

Unter dem Operationsmikroskop (Carl Zeiss Deutschland) wurde nach dem Hautschnitt das femorale Gefäß-Nervenbündel dargestellt. Im nächsten Schritt erfolgte die Darstellung eines zwischen dem M. rectus femoris und M. vastus medialis liegenden Muskelastes der A. femoralis. Dieser Seitenast wurde eröffnet, so dass ein Draht („standard guidewire“ für Herzkatheter, Durchmesser: 0,014 inch) etwa 5mm weit in die A. femoralis eingeführt werden konnte, wo er eine Minute verblieb und das Gefäß dilatierte und denudierte. Der orthograde Blutfluss wurde nach Entfernen des Drahtes wieder hergestellt und der Seitenast wurde ligiert.

### 3.2.1.4 Euthanasie und Probenentnahme

Das Versuchstier wurde bis zum Eintritt der Reflexlosigkeit anästhesiert und durch Genickbruch euthanasiert. Thorakotomie und Spülung des Kadavers mit Ringerlösung (Ringer-Lösung Delta Select, Delta Select GmbH, Pfullingen) erfolgten auf Eis. Die A. femoralis wurde über eine Länge von 5 mm proximal des ligierten Seitenastes entnommen. Die Konservierung erfolgte durch sofortige Schockfrostung in flüssigem Stickstoff.

### 3.2.2 Morphometrische Analyse

Die im Folgenden beschriebenen Schritte zur morphometrischen Analyse wurden am Institut für Pathologie der Technischen Universität München durchgeführt.

#### 3.2.2.1 Probenaufbereitung

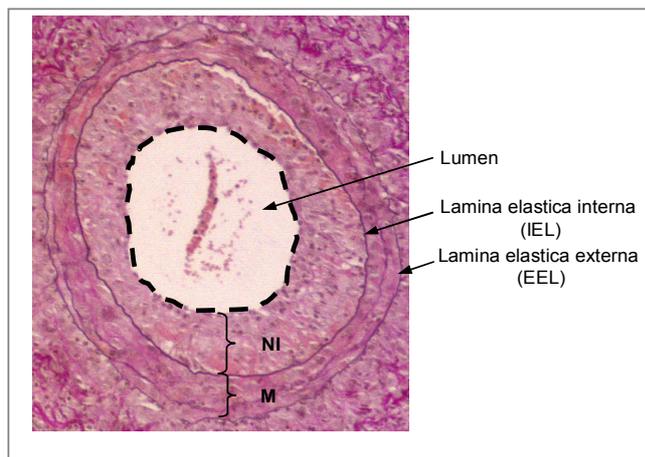
Das Resektat der A. femoralis wurde über Nacht in 6 prozentigem Formalin immersionsfixiert. Die Parafinierung erfolgte automatisch (Shandon Pathcentre<sup>®</sup>, Thermo Electron GmbH Deutschland).

#### 3.2.2.2 Präparateherstellung und Färbung

Ausgehend vom distalen Gefäßende wurde das in einen Parafinblock eingebettete Präparat der A. femoralis am Rotationsmikrotom (Mikrom HM 335 E, Mikrom GmbH, Walldorf) in 2µm dicke Schnitten geschnitten. Die gewählten Schnittebenen lagen im Abstand von jeweils 50µm. Auf diese Weise entstanden pro Gefäß etwa 20 Schnittebenen, die die Länge der Drahtverletzung abbilden. In einem Färbeautomaten (Tissue Stainer TST 30, Medite Medizintechnik, Burgdorf) wurde die Schnittserie nach Elastica-van-Gieson gefärbt.

### 3.2.2.3 Auswertung und statistische Analyse

Zur Auswertung wurden dieastica-van-Gieson gefärbten Schnitte bei 10facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Carl Zeiss Deutschland) mit entsprechender Softwareunterstützung (AxioVision 2.0 Zeiss, Carl Zeiss Vision GmbH Deutschland) fotografiert (siehe Abb. 3 als Beispiel) und mit ScionImagebeta 4.0 (Scion Corporation, Maryland, USA) ausgemessen. Beim Einbetten der Gefäße kam es gelegentlich durch Quetschung zur Entrundung des Gefäßes. Da hier von einem Artefakt auszugehen ist, werden die für Lumen, Lamina elastica interna (IEL) und Lamina elastica externa (EEL) gemessenen Strecken idealisiert als Umfang (U) eines Kreises betrachtet. Anhand der Formel  $U^2/4\pi$  konnte somit die Fläche des Restlumens, die durch die IEL eingeschlossene Fläche und die durch die EEL eingeschlossene Fläche in  $\mu\text{m}^2$  berechnet werden. Die Subtraktion der Fläche der Lamina elastica interna und des Lumens ergab die Neointimafläche. Die Subtraktion der Fläche der Lamina elastica externa und der Lamina elastica interna ergab die Mediafläche. Der Lumenverlust in Prozent ergab sich aus der Relation der Längen des Lumens und der Lamina elastica interna. Die jeweils 20 ersten Schnittebenen je Gefäß wurden statistisch ausgewertet. Für die Parameter Neointimafläche in  $\mu\text{m}^2$ , Mediafläche in  $\mu\text{m}^2$ , Lumenverlust in %, Media in % und Länge der Lamina elastica externa in  $\mu\text{m}$  wurde aus den 20 Ebenen je Probe ein Mittelwert gebildet. Aus den Mittelwerten einer Gruppe wurde ein Gruppenmittelwert ermittelt. Die Gruppenmittelwerte wurden im Computerprogramm SPSS 11.0 (SPSS11.0 für Windows, SPSS Inc. Chicago, USA) verglichen. Die Unterschiede der Gruppenmittelwerte wurden mittels ANOVA und t-Test auf ein Signifikanzniveau von  $p=0.05$  hin untersucht.



**Abbildung 3** Messgrößen der morphometrischen Analyse.

Als Lumen ist die innere freie Fläche des Gefäßes definiert. Daran schließt sich, begrenzt durch die IEL die Neointima (NI) an. Zwischen IEL und EEL liegt die Media (M).

### 3.2.3 Genexpressionsanalyse

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden am Institut für Experimentelle Erwachsenenherzkardiologie am Deutschen Herzzentrum in München durchgeführt.

### 3.2.3.1 Probenaufbereitung

Die in flüssigem Stickstoff gelagerte Probe wurde in 1 ml Lysis Buffer (Tab. 1) lysiert.

**Tab. 1** Puffer zur Lysierung der Gefäßabschnitte

<b>Lysis Binding Buffer</b>
100 mM TRIS/HCl pH 7,5
500 mM LiCl
10 mM EDTA pH 8,0
1 % LiDS
5 mM DTT

### 3.2.3.2 mRNA Isolierung

Zur Bindung der mRNA wurden 50µl paramagnetischer oligo-dT<sub>15</sub> Beads (Dynal Biotech, Hamburg), nach Waschen mit Waschpuffer A (Tab. 2), in ein Probengefäß pipetiert. Die Mischung wurde für 30 Minuten bei 4°C unter Rotation inkubiert (Duo Therm Hybridisierungsöfen OV5, Biometra, Göttingen). Im Anschluß wurden drei Waschschritte mit je 80µl Waschpuffer Igepal (WPI) (Tab. 2), Waschpuffer Tween (WPT) (Tab. 2) und zuletzt nochmals WPI durchgeführt.

**Tab. 2** Waschpuffer der mRNA Isolierung

<b>Waschpuffer A</b>	<b>Waschpuffer Igepal (WPI)</b>	<b>Waschpuffer Tween (WPT)</b>
100 mM TRIS/HCl pH 7,5	50 mM TRIS/HCl pH 8,0	50 mM TRIS/HCl pH 8,0
150 mM LiCl	75 mM KCl	75 mM KCl
1 mM EDTA pH 8,0	10 mM DTT	10 mM DTT
0,1 % LiDS	0,25 % Igepal	0,5 % Tween 20

### 3.2.3.3 cDNA Synthese

#### Reverse Transkription

Die Beads mit der gebunden mRNA wurden in 10µl Puffer L1 Mix (Tab. 3) resuspendiert. Nach 5 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 10 µl L2 Mix (Tab. 3). Der L1 Mix enthält den CFL5C Primer (Metabion, Martinsried), einen modifizierten Random Hexamer Primer der Sequenz 5'-(CCC)<sub>5</sub>GTCTAGA(NNN)<sub>2</sub>-3'. Die im L2 Mix enthaltene Reverse Transcriptase Superscript II<sup>TM</sup> RNase H<sup>-</sup> RT (Invitrogen, Karlsruhe) synthetisierte unter Verbrauch der im Mix enthaltenen Nucleotide - dATP, dGTP, dCTP, dTTP (MBI Fermentas, St. Leon Rot)- bei 44°C die cDNA am Primer.

**Tab. 3** Mixe für die Durchführung der reversen Transkription und cDNA Synthese

<b>L1-Mix</b>	<b>µl je Ansatz</b>	<b>L2-Mix</b>	<b>µl je Ansatz</b>
5 x First Strand Buffer	2	5 x First Strand Buffer	2
0,1 M DTT	1	0,1 M DTT	1
10 % Igepal	0,5	10 mM dNTP	1
166 µM CFL5C	6	H <sub>2</sub> O	5
H <sub>2</sub> O	0,5	Superscript II <sup>TM</sup> RNase H <sup>-</sup> RT	1

## Tailing

Die Beads mit dem an sie gebundenen mRNA/cDNA Hybrid wurden mit 80µl Tailing Waschpuffer (Tab. 4) gewaschen und anschließend in 10µl Tailing Mix (Tab. 4) resuspendiert. Nach Denaturierung und Lösung der cDNA (4 Minuten bei 94°C im Thermocycler (MultiCycler PTC 200, MJ Research, Biozym, Hess Oldendorf)) wurde die Tailing Reaktion unter Zugabe von 10 U terminale Desoxynucleotidtransferase TdT (MBI Fermentas, St. Leon Rot) durchgeführt (24 Minuten bei 37°C). Die synthetisierte cDNA wurde durch das Binden von ca 20 dGTPs am 3'-Ende durch die terminale Desoxynucleotidtransferase markiert und damit die Bindungsstelle für den CP2 Primer eingeführt.

**Tab. 4** Puffer und Mix zur Markierung der cDNA

<b>Tailing-Waschpuffer (TWP)</b>	<b>Tailing-Mix</b>	µl je Ansatz
50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0	25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,6
1 mM DTT	1mM DTT	1
0,25 % Igepal	2 mM dGTP	1
	200 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
	H <sub>2</sub> O	5,9

## Amplifikation

Nach der Inaktivierung der Transferase wurde 35µl PCR M1 Mix (Tab. 5) zugegeben. Die Probe wurde auf 78°C erwärmt (hot start). Bei Erreichen der Zieltemperatur wurden 4,75 µl PCR M2 Mix zugegeben. Der M2 Mix (Tab. 5) enthält den Amplifikationsprimer CP2 mit der Sequenz 5'TCA GAA TTC ATG (CCC)<sub>5</sub>-3', der an die im Tailing eingebauten dGTPs band.

**Tab. 5** Mixe zur Amplifikation der cDNA

<b>M1-Mix</b>	µl je Ansatz	<b>M2-Mix</b>	µl je Ansatz
Puffer 1	4	24 µM CP2 Primer	2,5
Formamid 20 %	7,5	10 mM dNTP	1,75
H <sub>2</sub> O	24	DNA Pol Mix (3,5 U/µl)	1,5

Die Amplifikation im Cycler lief in den folgenden Schritten ab:

Hot Start	78 °C für 30 sec
19 Zyklen	
Denaturierung	94 °C für 15 sec
Annealing	65 °C für 30 sec
Elongation	68 °C für 2 min
20 Zyklen	
Denaturierung	94 °C für 15 sec
Annealing	65 °C für 30 sec
Elongation	68 °C für 2min 30 sec + 10 sec/Zyklus
Finale Extension	68 °C für 7 min

## Erfolgskontrolle

Der Erfolg der cDNA Synthese und Amplifikation wurde durch genspezifische PCR überprüft. Zu diesem Zweck wurden die housekeeping Gene  $\beta$ -actin und *elongationfactor-1  $\alpha$*  (EF1- $\alpha$ ) (Tab. 6) gewählt, die von allen Proben stabil exprimiert wurden. 1  $\mu$ l der cDNA-Verdünnung und 24  $\mu$ l PCR Master Mix (Tab. 7) plus Primer durchliefen im Thermocycler folgende Schritte:

**Tab. 6** Primer für die Kontroll-PCR

Primer	Sequenz	Temperatur	Zyklen
$\beta$ -actin (Metabion, Martinsried)	5'GCTCGGTCAGGATCTTCATGAGG3' 5'ACCTTCAACACCCAGCCATG3'	55 °C	40
EF-1 $\alpha$ (Metabion, Martinsried)	5'TTTCAGTTTGTCTAAGACCCAGGC3' 5'CTCACATCAACATCGTCGTAATCG3'	55 °C	40

**Tab. 7** Mix zur Durchführung der PCR

PCR Master-Mix	$\mu$ l je Ansatz
PCR Puffer 10x	2,5
dNTPs 2mM	2,5
Primer 3'	0,5
Primer 5'	0,5
Taq DNA Polymerase (5u/ $\mu$ l)	0,15
H <sub>2</sub> O	18,85

Initiale Denaturierung	94 °C für 1 min
40 Zyklen	
Denaturierung	94 °C für 15 sec
Annealing	55 °C für 15 sec
Elongation	72 °C für 15 sec
Finale Extension	72 °C für 2 min

Das PCR Produkt wurde mit 3  $\mu$ l Loading Dye (aus Gene Ruler<sup>TM</sup> Ladder Mix, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) (Tab. 8) vermischt und auf ein 2 prozentiges Agarosegel (2 Gramm Agarose Seakem LE (Biozym, Hess Oldendorf), 100ml 1xTAE Puffer (Tab. 8), 8  $\mu$ l Ethidiumbromid 1% (Roth, Karlsruhe)) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zeigten sich unter UV-Licht die für die Gene typischen Banden galt die cDNA Synthese als erfolgreich.

**Tab. 8** Laufpuffer und Skalierungsmarker

50 x TAE Puffer
242 g TRIS
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O

Gene Ruler <sup>TM</sup> DNA Ladder Mix
Gene Ruler <sup>TM</sup> DNA Ladder Mix
100 $\mu$ l Loading Dye 6x
300 $\mu$ l H <sub>2</sub> O

### 3.2.3.4 Genexpressionsanalyse

Das Genexpressionsprofil der Proben wurde mit den Nylon Arrays mouse 1.2 und mouse 1.2.II der Firma Clontech (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) untersucht.

## Prähybridisierung der Arrays

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurden die Arrays über Nacht mit 50µg/ml Escherichia coli DNA (50µg, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in 6 Millilitern Dig-Easy-Hyb Hybridisierungslösung (Roche, Mannheim) bei 44 °C inkubiert.

## Dig-Label

Die cDNA aus der Synthese (3.2.3.3) wurde mit Digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim) markiert, das als Bindungsstelle für einen Antikörper diente, der über alkalische Phosphatase Chemolumineszenz erzeugt. 1 µl der 1:10 verdünnten Probe wurde mit Dig-Master-Mix (Tab. 9) reamplifiziert, der neben desoxyribo-Trinukleotiden auch Dig-11-dUTP enthielt.

**Tab. 9** Reagenzien des Dig-Labels

<b>Dig-Master-Mix</b>	<b>µl je Ansatz</b>	<b>1/7 dNTP Mix</b>
Puffer 1	5,0	8,3 mM dTTP
Formamid 20 % (v/v)	7,5	10 mM dATP
CP2 24 mM	5,0	10 mM dGTP
1/7 dNTP Mix	1,75	10 mM dCTP
Dig-dUTP 1 mM	2,5	
DNA Pol Mix (3,5 U/µl)	0,75	
DEPC H <sub>2</sub> O (DEPC:H <sub>2</sub> O=1:1)	27,5	
DNA	1,0	

## Reamplifikation

Im Thermocycler wurde die markierte cDNA in den folgenden Schritten reamplifiziert:

Initiale Denaturierung	94 °C für 2 min
15 Zyklen	
Denaturierung	94 °C für 15 sec
Annealing	63 °C für 15 sec
Elongation	68 °C für 2 min
10 Zyklen	
Denaturierung	94 °C für 15 sec
Annealing/Elongation	68 °C für 3 min + 5 sec/Zyklus
Finale Extension	68 °C für 7 min

Zur Reaktionskontrolle wurde der Nucleic acid dot Metric kit <sup>TM</sup> (Geno Technology Inc., St Louis, MO, USA) nach Herstellervorgaben verwendet.

## Hybridisierung

50µl der aus der unter 3.2.3.3 beschriebenen Tailing Reaktion gewonnen und mit dem Dig-Label markierten cDNA wurden, gemischt mit 50µl Herring sperm DNA in einer Konzentration von 10mg/ml (Invitrogen, Karlsruhe) in Hybridisierungsflaschen pipetiert. Darin wurden die Arrays bei 44°C für 48 Stunden im Hybridisierungssofen unter Rotation inkubiert.

## Waschen

Die Arrays wurden anschließend nach Maßgaben des Herstellers gewaschen. Anschließend wurden noch zwei Wachgänge in 0,1xSSC/0,1%SDS für jeweils 30 Minuten bei 68°C durchgeführt. Das sichtbar machen der gebundenen cDNA erfolgte mittels des Dig Luminescent Detection Kit (Roche, Mannheim) nach Herstellervorgaben. Dazu wurden 5 µl eines Anti-Dig-AP-Antikörper-Konjugat 150 in der Konzentration 1:1000 zugegeben, der an die Dig-dUTP Marker in der cDNA band.

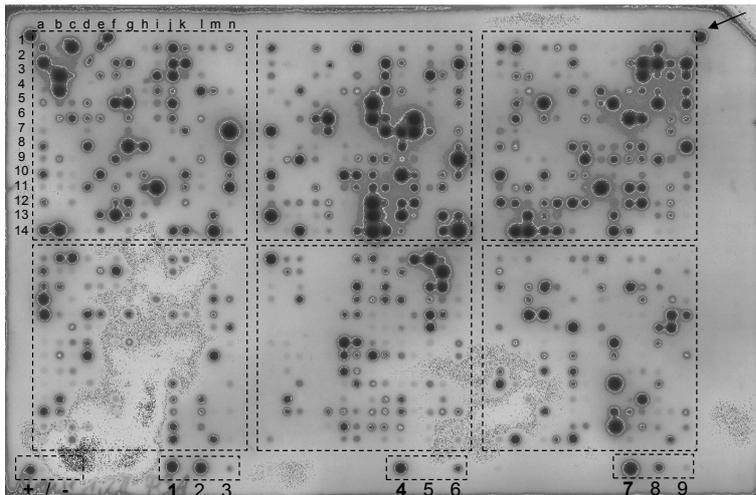
## Entwicklung

Um die, über den Antikörper an den Dig-Label gebundene alkalische Phosphatase zu aktivieren und Chemolumineszenz zu erzeugen, bedarf es als Substrat CSPD aus dem Dig Luminescent Detection Kit (Roche, Mannheim). Das CSPD wird durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert und zerfällt unter Lichtemission. Die Arrays wurden für 30 Minuten zusammen mit einem Röntgenfilm Bio Max ML (Kodak, Amersham Bioscience, Freiburg) in einer Röntgenkassette verschlossen. Die Lichtemission schwärzte den Film, der anschließend automatisch entwickelt wurde.

### 3.2.3.5 Auswertung und statistische Analyse

Die Röntgenfilme wurden eingescannt (Image Scanner, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) und mit der Software Array Vision™ 6.0 (Imaging Research Inc., Ontario, Kanada) ausgewertet. Das Programm erlaubte es, jedem Signal auf dem Array, abhängig von seiner Intensität, einen Wert zwischen 0,0 und 1,0 zuzuordnen. Zur Normierung wurde der Mittelwert der Signale der housekeeping Gene an Position 1,4 und 7 auf jedem Filter gebildet und gleich 1,0 gesetzt (Abb. 4). Dabei handelte es sich um die Gene *actin*, *beta*, *cytoplasmatic*, *glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase* und *ubiquitin B* die in jeder Probe stabil exprimiert wurden. Zusätzlich wurde die Signalstärke des Arrayhintergrundes zwischen den eigentlichen Signalen gemessen und von allen Messwerten als Nullwert subtrahiert. Aus n=5 Proben je Zeitpunkt und Versuchsgruppe (KO, 3dOP, 7dOP, 14dOP und 3d+500, 7d +500, 14d+500) wurde für jedes Gen ein Gruppenmedian gebildet. Zu den einzelnen Zeitpunkten (3d, 7d und 14d) wurde für jedes Gen zwischen OP und +500 der Quotient und die Differenz der Gruppenmediane gebildet. Der Unterschied der Gruppenmediane zwischen OP und +500 wurde mit der Software SPSS 11.0 (für Windows, SPSS Inc., Chicago, USA) zu den jeweiligen Zeitpunkte (3, 7 und 14 Tage) mittels Man-Whitney-U-Test auf Signifikanz geprüft. Ein Gen wurde als differentiell exprimiert angesehen, wenn der Vergleich seiner Gruppenmediane in OP und +500 zum untersuchten Zeitpunkt folgende Kriterien erfüllte:

Signifikanz des Unterschieds der Gruppenmediane	$p \leq 0,01$
Differenz (D) der Gruppenmediane	$D \leq - 0,1$ oder $D \geq + 0,1$
Quotient (Q) der Gruppenmediane	$Q \leq 0,4$ oder $Q \geq 2,5$



**Abbildung 4** Nylonarray der Genexpressionsanalyse

Die Abbildung zeigt einen eingescannten Röntgenfilm, der durch die Chemolumineszenz von CSPD an den Stellen geschwärzt wurde, an denen cDNA an die auf dem Filter gespotete DNA bindet. Das Koordinatensystem aus Buchstaben und Nummern dient zur Orientierung. Positiv- und Negativkontrolle (+/-). Die nummerierten spots sind die housekeeping Gene. Die spots in den oberen Ecken (Pfeil) dienen der Positionskontrolle.

### 3.2.4 Validierung durch PCR

Zur Ergebniskontrolle der Genexpressionsanalyse dienten genspezifische PCRs. Die Primer der gewählten Gene wurden mit der Software VectorNTI (InfoMax Inc., Frederick, MD, USA) spezifisch für die auf den Arrays aufgetragenen Zielsequenzen entworfen. Die PCRs wurden mit dem im Absatz Erfolgskontrolle beschriebenen PCR Master-Mix Standardansatz durchgeführt, solange der Guanin/Cytosin Anteil der Basen 55% nicht überschritt. Andernfalls wurde dem Ansatz DMSO (Sigma Aldrich, Taufkirchen) beigemischt. Folgende Primer kamen zum Einsatz (Tab. 10):

**Tab. 10** Primer der genspezifischen PCR

Primer	Sequenz	Temperatur	Zyklen
Alk1	[5'-ACC TGG GCG AGT CCA GTC TCA TC-3'] [5'-CAG GAA CCG CGC CAC ACC TCA C-3']	62 °C	30
Alk5	[5'-TGG TTC CGA GAG GCA GAG-3'] [5'-ATG TGA AGA TGG GCA AGA CC-3']	57 °C	35
CXCR-4	[5'- GAT GAT GAT GCA GTA ACA GGA GAG G -3'] [5'- ATA CCT GAC TTC ATC TTT GCC GAC G -3']	62 °C	30
SDF-1	[5'- TGG AAA GTC CTT TGG GCT GT -3'] [5'- CAA CGT CAA GCA TCT GAA AAT CC -3']	55 °C	25

### 3.2.5 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung der Gewebeschnitte diente der Validierung der in der Geneexpressionsanalyse erhobenen Daten auf Proteinebene. Hierzu wurden Färbungen auf die Antigene CD31, sm-actin, SDF-1, c-kit und Alk1 durchgeführt (Tab. 11).

**Tab. 11** Primärantikörper der Immunhistochemie: CD31, SDF-1, c-kit, Alk1, sm-actin

<b>CD31 (LSAB)</b>	
Primärantikörper	CD31 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)
Verdünnung	1:200
Sekundärantikörper	Anti-goat 1:100 (DakoCytomation GmbH, Hamburg)

<b>SDF-1 (LSAB)</b>	
Primärantikörper	SDF-1 (R&D Bioscience)
Verdünnung	1:100
Sekundärantikörper	Anti-mouse 1:100 (DakoCytomation GmbH, Hamburg)

<b>c-kit (ABC)</b>	
Primärantikörper	c-kit sc1494 (Santa Cruz)
Verdünnung	1:50
Sekundärantikörper	bio rabbit anti-goat (Vector Goat IgG kit)

<b>Alk1 (LSAB)</b>	
Primärantikörper	Zur Verfügung gestellt von Douglas A. Marchuk (Department of Molecular Genetics and Microbiology at Duke University Medical Center)
Verdünnung	1:400
Sekundärantikörper	5 µl anti-rabbit (anit-rabbit Vector kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingam)

<b>sm-actin (APAAP)</b>	
Primärantikörper	Mouse anti-human muscle actin (M0635, DakoCytomation GmbH, Hamburg)
Verdünnung	1:200
Sekundärantikörper	APAAP I Lösung (ChemMate™ Detection Kit APAAP, Mouse, DakoCytomation, Hamburg)

### **CD31 und SDF-1**

Die Schnitte wurden im Färbeautomat „Dako autostainer“ (DakoCytomation GmbH, Hamburg) nach der LSAB Methode gefärbt.

### **c-kit**

Die Färbung wurde als Handfärbung nach der ABC Methode nach den Maßgaben des Goat IgG kit (Vector Labs, Burlingam) durchgeführt.

### **Alk1**

Die Färbung auf Alk1 wurde als Handfärbung nach der LSAB Methode nach einem Protokoll von Marchuk et al. mit Hilfe des Streptavidin/Biotin Blocking Kit, #VEC-S-1000 (Vector Labs, Burlingam) durchgeführt.

### **sm-actin**

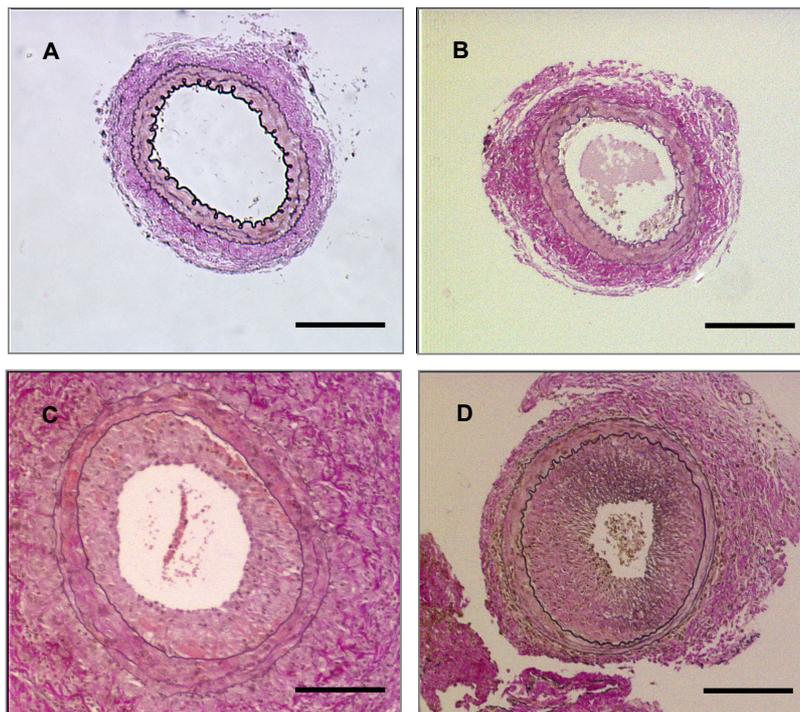
Die Färbung auf sm-actin wurde nach der APAAP Methode mit Hilfe des ChemMate™ Detection Kit APAAP, Mouse (DakoCytomation, Hamburg) durchgeführt.

Die gefärbten Zellen wurden manuell ausgezählt. Hierzu wurden die gefärbten Schnitte fotografiert, digitalisiert und in das Programm Adobe Photoshop 6.0 ( Adobe Systems Incorporated) geladen. Innerhalb der ausgezählten Gruppen wurden Mittelwerte gebildet.

### 3.3 Ergebnisse

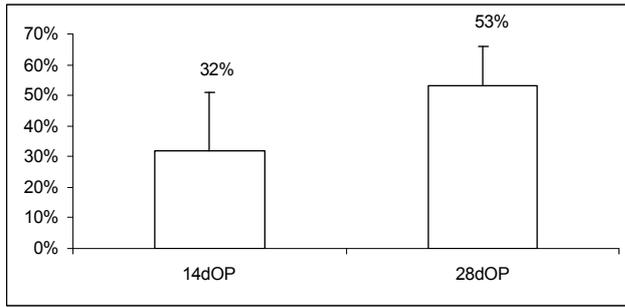
#### 3.3.1 Morphometrie

Als Zeitpunkte für die morphometrische Analyse wurden 7, 14 und 28 Tage (7dOP/7d+500, 14dOP/14d+50/14d+500 und 28dOP) gewählt. So ließ sich der Zeitverlauf des Lumenverlustes nach Verletzung abbilden. Nach 7 Tagen bildeten sich lose Zellaggregate. Auf Grund ihrer vulnerablen Struktur war nicht sicher nachzuvollziehen, ob es sich dabei um eine in vivo an der Gefäßwand adhärenente Neointima handelte, oder um frei flotierende Zellen. Daher wurde von einer Quantifizierung des 7 Tage Zeitpunkts abgesehen. Nach 14 Tagen zeigte sich eine solide Neointimabildung, die bis zum Endpunkt bei 28 Tagen noch weiter zunahm (Abb. 5 und 6). 14 Tage nach Intervention zeigte die Gruppe 14dOP einen durchschnittlichen Lumenverlust von 32%, während der Lumenverlust in der 14d+50 Gruppe 41% und in der 14d+500 Gruppe 57% betrug (Abb. 7 und 8). Die Unterschiede im Lumenverlust waren hierbei zwischen allen drei Gruppen signifikant. Eine Analyse des 28 Tage Zeitpunktes wurde in +500 nicht durchgeführt, da in der Imatinib Gruppe nach 14 Tagen bereits der maximale Lumenverlust der OP Gruppe überschritten wurde.



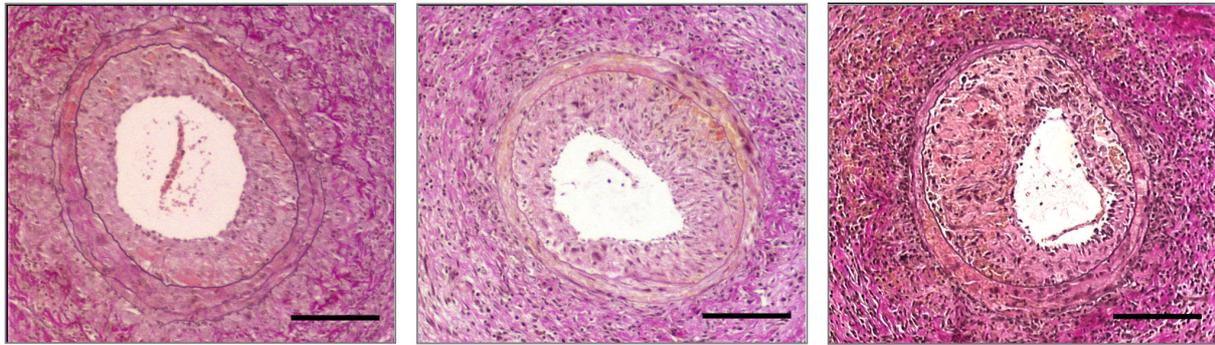
**Abbildung 5** Zeitverlauf der Neointimabildung nach Intervention in OP.

A 3 Tage, B 7 Tage C 14 Tage und D 28 Tage nach Drahtverletzung. E.-v.-G Färbung, Balken = 100µm

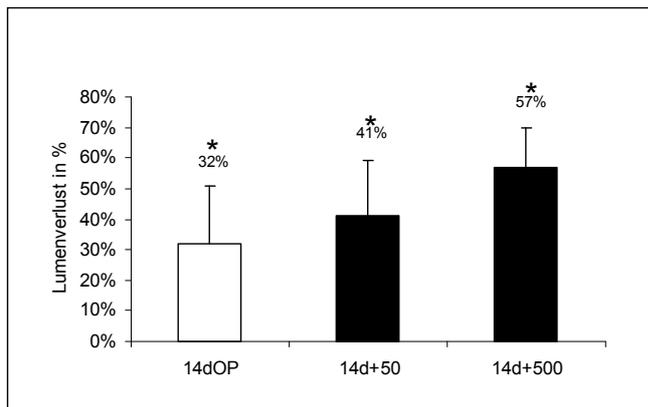


**Abbildung 6** Schematische Darstellung des Lumenverlustes in OP.

Nach 14 d zeigte sich ein Lumenverlust von 32% (Mittelwert aus n=7, Standardabweichung=19,3), nach 28 d von 53% (Mittelwert aus n=10, Standardabweichung=12,7).



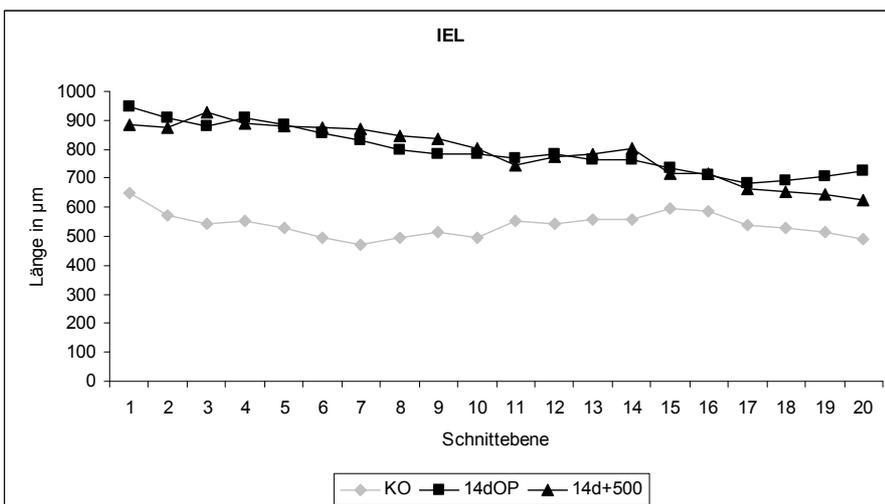
**Abbildung 7** Beispielhafte Gefäßquerschnitte 14d nach Drahtverletzung. Von links nach rechts: 14d OP, 14d +50, 14d +500. E.-v.-G Färbung, Balken = 100µm



**Abbildung 8** Vergleich des Lumenverlustes nach 14 Tagen in OP,+50 und +500.

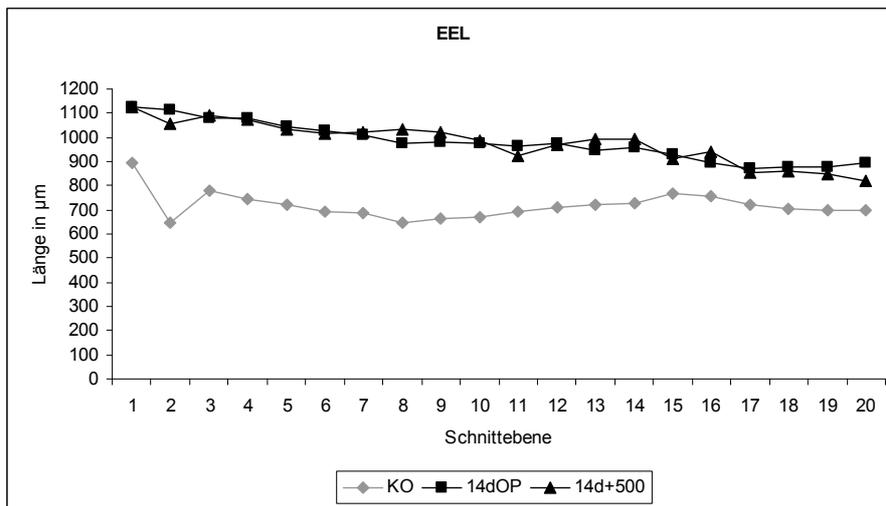
Es zeigte sich eine signifikante Zunahme des Lumenverlustes zwischen OP (Mittelwert aus n=7, Standardabweichung=19,3) und den Imatinib Gruppen und eine weitere, signifikante, dosisabhängige Zunahme des Lumenverlustes zwischen +50 (MW aus n=5 STABW=17,5) und +500 (MW aus n=8 STABW=13).  $p \leq 0,05$

Zur Untersuchung auf negatives remodelling als Ursache des Lumenverlustes, wurde in den Gruppen KO, 14dOP und 14d+500 die IEL und EEL je Schnittebene ausgemessen. Hierbei zeigte sich sowohl in OP als auch in +500 (Abb. 9 und 10) keine Schrumpfung des Gefäßes.



**Abbildung 9** Vergleich der Länge der Lamina elastica interna.

14 d nach Intervention in µm pro Ebene. Die Werte in den 14dOP (Mittelwert von n=7) und 14+500 (Mittelwert von n=8) waren ähnlich und lagen über dem Kontrollwert (Mittelwert n=4) eines unverletzten Gefäßes.

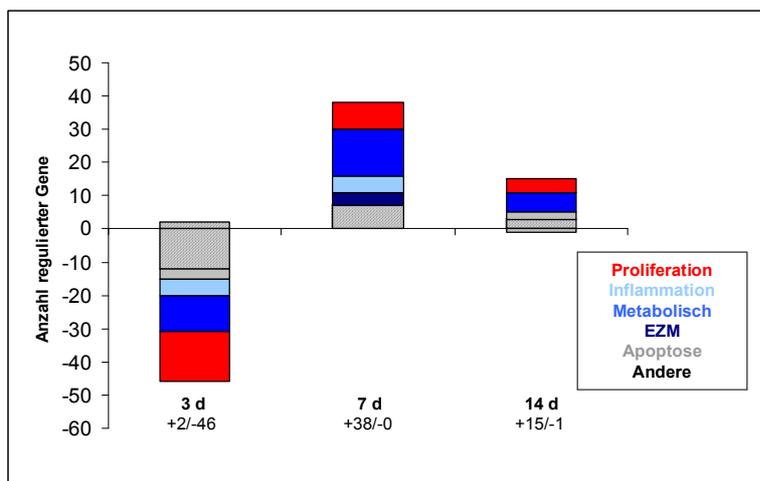


**Abbildung 10** Vergleich der Länge der Lamina elastica externa.

14 d nach Intervention, in µm pro Ebene. Die Werte in den Gruppen 14dOP (Mittelwert von n=7) und 14+500 (Mittelwert von n=8) waren ähnlich und lagen über dem Kontrollwert (Mittelwert n=4) eines unverletzten Gefäßes.

### 3.3.2 Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse wurde nach 3, 7 und 14 d in den Gruppen OP und +500 und in der unverletzten Gruppe KO durchgeführt. Die Gruppe +50 wurde nicht analysiert, da sich in der morphometrischen Analyse ein größerer Lumenverlust für +500 zeigte. An Hand der Kriterien einer differentiellen Expression (Signifikanz  $p \leq 0,01$ , Differenz der Mediane  $-0,1 \geq x$  oder  $x \geq +0,1$ , Quotient der Mediane  $0,4 \geq x$  oder  $x \geq 2,5$ ) wurden die Gruppen OP und +500 zu den Zeitpunkten 3, 7 und 14 Tagen verglichen. Es waren nach 3 Tagen 48, nach 7 Tagen 38 und nach 14 Tagen 16 Gene differentiell reguliert. Nach 3 Tagen waren 46 von 48 differentiell exprimierten Genen in +500 im Vergleich der Mediane zu OP herunter reguliert, nur 2 der Gene hatten in +500 einen höheren Median als in OP. Nach 7 Tage waren alle 38 differentiell exprimierten Gene in +500 nach oben reguliert. Nach 14 Tagen waren 15 von den 16 aufgeführten Genen in +500 herauf und eines herunterreguliert. Innerhalb der regulierten Gene ließen sich Gruppen bilden. Nach 3 Tagen waren vor allem Gene, die mit dem Zellstoffwechsel und der Proliferation in Zusammenhang gebracht werden in +500 im Vergleich zu OP supprimiert. Nach 7 Tagen zeigte sich eine verstärkte Expression dieser Gruppen in +500. Nach 14 Tagen waren vor allem Gene der zellulären Homöostase aktiv (Abb. 11).



**Abbildung 11** Einteilung der zu den jeweiligen Zeitpunkten zwischen den Gruppen OP und +500 differentiell exprimierten Gene in funktionelle Gruppen. Nach 3 Tagen waren in +500 46 Gene herunter und 2 Gene herauf reguliert; es waren Gene der Proliferation und des Zellstoffwechsels. Nach 7 Tagen waren in +500 38 Gene herauf reguliert; es waren Gene der Proliferation, des Zellstoffwechsels und der extrazellulären Matrix. Nach 7 Tagen waren in +500 15 Gene herauf und eines herunter reguliert; reguliert waren v.a. Gene der Apoptose.

### 3.3.2.1 Differentielle Regulierung nach 3 Tagen

Abbildung 12 zeigt die Mediane der Expressionswerte der zwischen den Gruppen OP und +500 differentiell exprimierten Genen. Insgesamt waren die in OP gemessenen Expressionswerte erhöht im Vergleich zu den Ausgangswerten der Gruppe KO, die zwar mit aufgeführt sind, aber nicht in die statistische Auswertung eingingen. In +500 fielen die Werte im Vergleich zu OP deutlich ab, zum Teil sogar unter den Kontrollwert. Unter den differentiell exprimierten Genen waren vor allem Gene des Zellstoffwechsels und der Proliferation (Abb. 12).

#### Andere Gene

Diese Gruppe enthält Gene, die keiner der anderen in Abbildung 11 definierten Gruppen zugeordnet werden konnten. Das *vasodilator-stimulated phosphoprotein*, welches bei der Hemmung der Plättchenaggregation eine Rolle spielt, konnte immunhistochemisch in neointimalen SMCs nach Ballonverletzung der Arteria carotis bei der Ratte nachgewiesen werden (Monks, Lange et al. 1998). Im vorliegenden Modell zeigte sich eine Hochregulierung nach 3 d in OP, während der Expressionswert +500 noch unter den Kontrollwert fiel.

#### Apoptose

In dieser Gruppe finden sich 3 Gene mit folgendem Expressionsmuster: Das bereits in Zusammenhang mit der Restenose beschriebene *clusterin* (Miyata, Biro et al. 2001) war in OP stabil im Vergleich zu KO exprimiert. Das Gen *Bcl2 homologous antagonist/killer* war schwach hochreguliert während der *Bcl-associated death promoter* eine deutliche Zunahme der Expression zum Zeitpunkt 3 d zeigte. Es fanden sich für diese Gene eine deutliche Herunterregulierung in +500 im Vergleich zu OP.

#### Inflammation

Alle dieser Gruppe zugeordneten Gene wiesen das gleiche Expressionsmuster auf: Eine Hochregulierung in OP im Vergleich zu KO und eine Herunterregulierung in +500 im Vergleich zu OP. In diese Gruppe mit eingeordnet findet sich auch die *interleukin 1 receptor-associated kinase*, ein Gen dem anti-inflammatorische Eigenschaften zugeordnet werden. Es war ebenfalls in der beschriebenen Weise reguliert. Hervorzuheben sind *lectin, galactose binding, soluble 3*, auch bekannt als MAC2 und der *macrophage migration inhibitory factor*, kurz MIF. MAC2, ein von Makrophagen sezerniertes Protein, wird mit der Morphogenese endothelialer Zellen in Verbindung gebracht (Nangia-Makker, Honjo et al. 2000) und konnte nach Ballondilatation in der Aorta hypercholesterinämischer Hasen nachgewiesen werden (Arar, Gaudin et al. 1998). Während MAC2 in KO nicht exprimiert wurden, zeigte sich in OP ein deutlicher Anstieg nach 3 d. Nach 7 d in OP waren die Werte etwas reduziert, stiegen aber nach 14 d wieder an. In +500 stieg die Expression von MAC2 zwar auch nach 3 d an, allerdings nicht auf so hohe Werte wie in OP. Nach 7 d überstiegen die Werte in +500 dann aber die Werte in OP und blieben konstant erhöht (Abb.13). MIF war im vorliegenden Modell nach 3 d differentiell exprimiert. Im weiteren

Zeitverlauf fiel die Expression von MIF in OP nach 14 d wieder auf den Kontrollwert ab, während sie in +500 nach 7 und 14 d erhöht blieb (Abb.14). Eine experimentelle Blockade von MIF, ein die Makrophagenaktivität modulierendes proinflammatorisches Zytokin, geht nach Dilatation der Arteria carotis bei der Maus mit einer reduzierten Neointmabildung einher (Chen, Sakuma et al. 2004).

### Zellmetabolismus

Die 11 dem Zellstoffwechsel zugeordneten Gene waren in +500 im Vergleich zu OP nach 3 d alle herunterreguliert. Hierbei handelte es sich um Gene des zellulären Energiestoffwechsels wie z.B die *cytochrom c* Oxidasen oder die *hydroxylacyl-Coenzyme A dehydrogenase* und um zelluläre Enzyme wie *carboxypeptidase E* oder Enzyme die Schutz vor oxidativem Streß bieten wie z.B die *superoxide dismutase 1*.

### Proliferation

Bei den mit Proliferation assoziierten Genen zeigte sich eine Hochregulierung zwischen KO und OP und eine Herunterregulierung zwischen OP und +500. In diese Gruppe eingeteilt wurden Transkriptions- (*activating transcription factor 3*, *FBJ osteosarcoma oncogene* und *transcription factor E3*) und Wachstumsfaktoren wie z.B. das *insulin-like growth factor binding protein 2* oder *neurotrophin 3*. Es finden sich auch Proteinkinasen z.B. die *MAP kinase-activated protein kinase 2* und Partner der DNA Synthese wie die *ribonucleotide reductase M1*, die *uridine phosphorylase* oder *cell division cycle 45 homolog (S. cerevisiae)-like*. Vor dem Hintergrund der Neointimabildung ist die *AXL receptor tyrosine kinase* hervorzuheben. Nach Ballondilatation der Arteria carotis der Ratte ließ sich ein Zunahme der Expression dieses Gens nachweisen (Konishi, Aizawa et al. 2004). Mit dem *cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57)* war auch ein Inhibitor der Transkription und somit negativer Regulator der Proliferation differentiell exprimiert. Für dieses Gen konnte eine PDGF abhängige Expression in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Xu, Wang et al. 2001). Zusätzlich hemmt p57, induziert von TGF- $\beta$ , in Kultur die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen (Scandura, Boccuni et al. 2004). In +500 war p57 im Gegensatz zu OP herunter reguliert um erst im weiteren Verlauf wieder auf der Gruppe OP vergleichbare Werte anzusteigen (Abb. 15).

**Abbildung 12** Mediane der Intensitäten der Expression der 48 zum Zeitpunkt 3 Tage zwischen +500 und OP differentiell exprimierten Gene, sortiert nach funktionellen Gruppen.

Kriterien der differentiellen Expression sind: Signifikanz  $p \leq 0,01$  im Man-Whitney-U Test, Differenz der Mediane  $x \leq -0,1$  oder  $x \geq +0,1$  und Quotient der Mediane  $x \leq 0,4$  oder  $x \geq 2,5$ . Darstellung der Mediane von  $n=7$  anhand einer Intensitätsskala. Die Gruppe KO ist nur zur Veranschaulichung dargestellt und geht nicht in die statistische Auswertung mit ein.



### 3d Gruppen

Gene	Gruppen	KO	OP	+500
apolipoprotein C1	Andere			
diazepam binding inhibitor	Andere			
enabled homolog (Drosophila)	Andere			
fos-like antigen 1	Andere			
Genomic DNA	Andere			
leucine arylaminopeptidase 1, intestinal	Andere			
NADH dehydrogenase flavoprotein 1	Andere			
RAB3A, member RAS oncogene family	Andere			
retinol binding protein 4, plasma	Andere			
semaphorin 3B	Andere			
ubiquitin c-terminal hydrolase related polypeptide	Andere			
upstream transcription factor 2	Andere			
vasodilator-stimulated phosphoprotein	anti Gerinnung			
interleukin 1 receptor-associated kinase	anti Inflammation			
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)	anti Proliferation			
clusterin	Apoptose			
Bcl2 homologous antagonist/killer	Apoptose			
Bcl-associated death promoter	Apoptose			
serine protease inhibitor, Kunitz type 2	Fibrinolyse			
lectin, galactose binding, soluble 3	Inflammation			
macrophage migration inhibitory factor	Inflammation			
peptidoglycan recognition protein	Inflammation			
serum amyloid A 3	Inflammation			
adenine phosphoribosyl transferase	metabolisch			
annexin A11	metabolisch			
carboxypeptidase E	metabolisch			
cytochrome c oxidase, subunit Vb	metabolisch			
cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 1	metabolisch			
epoxide hydrolase 1, microsomal	metabolisch			
hydroxylacyl-Coenzyme A dehydrogenase	metabolisch			
lysosomal membrane glycoprotein 2	metabolisch			
phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta	metabolisch			
solute carrier family 31, member 2	metabolisch			
superoxide dismutase 1, soluble	metabolisch			
activating transcription factor 3	Proliferation			
AXL receptor tyrosine kinase	Proliferation			
cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	Proliferation			
cell division cycle 45 homolog (S. cerevisiae)-like	Proliferation			
FBJ osteosarcoma oncogene	Proliferation			
insulin-like growth factor binding protein 2	Proliferation			
MAP kinase-activated protein kinase 2	Proliferation			
neurotrophin 3	Proliferation			
ribonucleotide reductase M1	Proliferation			
signal sequence receptor, delta	Proliferation			
SRY-box containing gene 18	Proliferation			
thymidylate kinase	Proliferation			
transcription factor E3	Proliferation			
uridine phosphorylase	Proliferation			

Gen			Median OP	Median +500		Signifikanz
<b>MAC2</b>	KO	0,00				
	3d		0,61	0,22		0,00
	7d		0,16	0,69		0,06
	14d		0,57	0,65		0,04

**Abbildung 13** Darstellung der Genexpressionanalyse für MAC2.

Dargestellt sind die zu den jeweiligen Zeitpunkten für das Gen gemessenen Mediane (n=7) der Intensitätswerte der Expression (Zahlen und Farbkästchen; zur Intensitätsskala siehe Abb. 12 ) und die im Man-Whitney-U Test ermittelte Signifikanz. Die Gruppe KO ist nur zur Veranschaulichung dargestellt und geht nicht in die statistische Auswertung mit ein.  $p \leq 0,05$ .

Gen			Median OP	Median +500		Signifikanz
<b>MIF</b>	KO	0,77				
	3d		0,81	0,26		0,01
	7d		1,02	0,96		0,27
	14d		0,75	0,99		0,00

**Abbildung 14** Darstellung der Genexpressionanalyse für MIF. (Erklärung wie Abb. 13)

Gen			Median OP	Median +500		Signifikanz
<b>P57</b>	KO	0,00				
	3d		0,48	0,00		0,01
	7d		0,44	0,20		0,33
	14d		0,51	0,56		0,28

**Abbildung 15** Darstellung der Genexpressionanalyse für p57. (Erklärung wie Abb. 13)

### 3.3.2.2 Differentielle Regulierung nach 7 Tagen

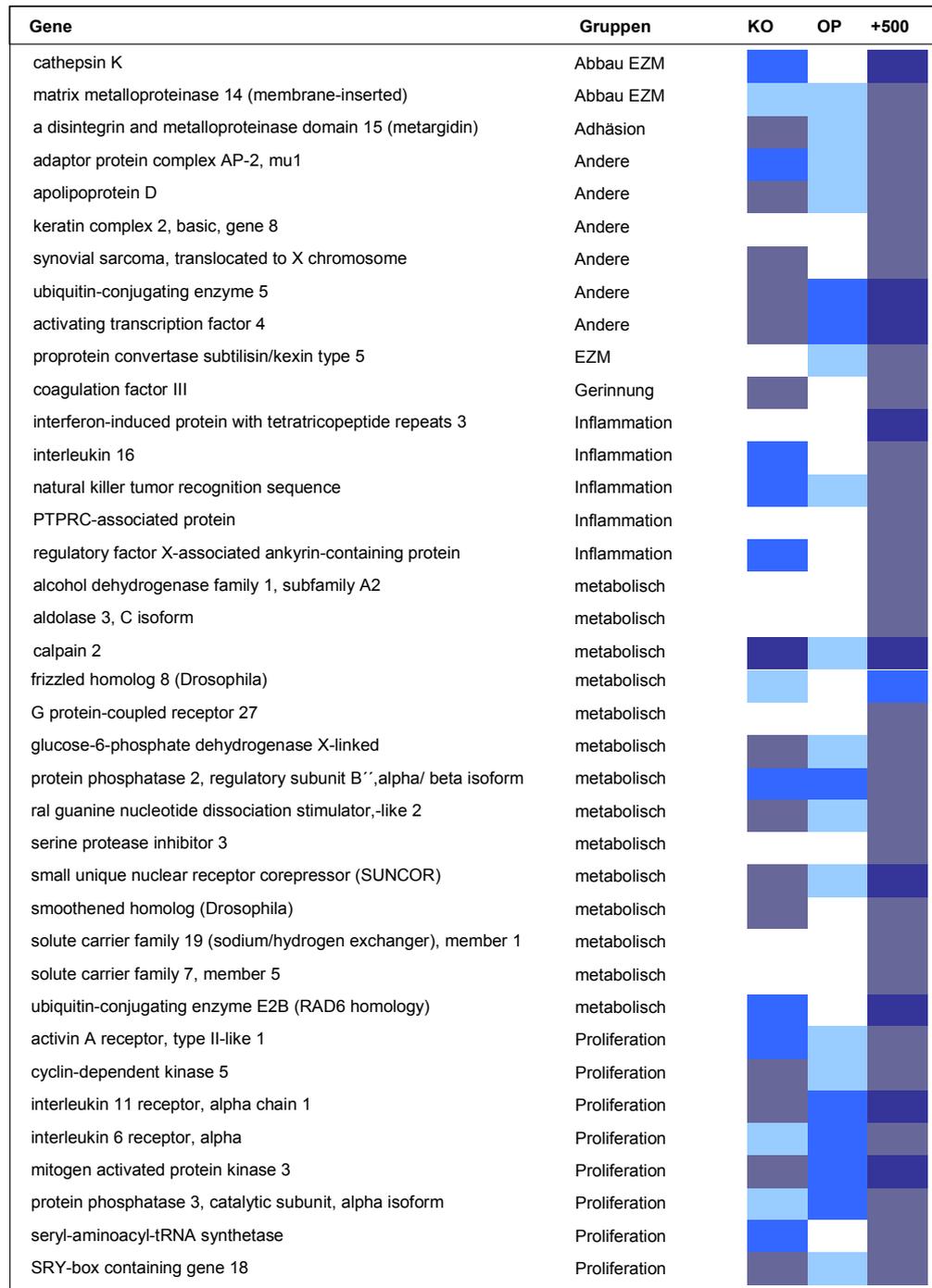
Differentiell regulierte Gene (Abb. 16) in +500 waren im Vergleich zu OP herauf reguliert und überstiegen ihren Ausgangswert in KO. Ihre Expression war in OP im Vergleich zu KO reduziert. Neben Genen der Inflammation waren nach 7 Tagen vor allem Gene der Proliferation und des Zellmetabolismus reguliert. Für sie wurden in +500 erhöhte Werte im Vergleich zu OP und auch zu KO gemessen. Die Regulierung nach 7 Tagen war der nach 3 Tagen entgegengesetzt.

#### Extrazelluläre Matrix

Bei den mit der EZM assoziierten Genen zeigte sich eine Hochregulierung in +500. So z.B. bei *cathepsin K*, das einerseits am Knochenstoffwechsel beteiligt ist, dem darüber hinaus als potenter Elaste die Fähigkeit zugeschrieben wird, extrazelluläre Matrix abzubauen und damit Anteil am vaskulärem remodeling und dem Übertritt glatter Muskelzellen von der Media in die Neointima zu haben (Sukhova, Shi et al. 1998). Wie in Abbildung 17 ersichtlich stieg die Expression von

*cathepsin K* in OP bereits nach 3 Tagen an, in +500 erst nach 7 Tagen. Der 7 Tage OP Wert ist auf Grund seines starken Abfalls kritisch zu beurteilen. Wird aber von einer auf dem Niveau der 3 und 14 Tage Werte liegenden Expression ausgegangen so zeigt sich, vor allem auch im Vergleich zu KO, eine weitere Steigerung in +500 (Abb.17).

## 7d Gruppen



**Abbildung 16** Mediane der Intensitäten der Expression der 38 zum Zeitpunkt 7 Tage zwischen +500 und OP differentiell exprimierten Gene, sortiert nach funktionellen Gruppen. (Erklärung wie Abb. 12)

Gen		Median OP	Median +500		Signifikanz
<b>cathK</b>	KO	0,38			
	3d	0,86	0,50		0,02
	7d	0,00	0,93		0,01
	14d	0,85	0,82		0,27

**Abbildung 17** Darstellung der Genexpressionanalyse für cathepsin K. (Erklärung wie Abb. 13)

Im selben Zusammenhang wird die auch differentiell exprimierte *matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)* (MMP14) beschrieben (Jenkins, Crow et al. 1998), deren Aktivierung eng mit der im Abschnitt Proliferation beschriebenen *mitogen activated protein kinase 3* (MAPK3) verbunden ist (Tanimura, Asato et al. 2003). Die Expression der MMP14 stieg in OP nach 3 Tagen an und fiel, abgesehen vom Wert nach 7 Tagen, wieder ab. In +500 stieg die Expression nach 7 Tagen an, erreichte dabei aber ein wesentlich höheres Niveau als in OP und lag auch nach 14 Tagen sowohl über dem Wert in OP als auch über dem in KO (Abb.18).

Gen		Median OP	Median +500		Signifikanz
<b>MMP14</b>	KO	0,07			
	3d	0,68	0,03		0,04
	7d	0,19	0,79		0,01
	14d	0,35	0,69		0,06

**Abbildung 18** Darstellung der Genexpressionanalyse für MMP14. (Erklärung wie Abb. 13)

Ein weiterer Aktivator der MMP14 (Stawowy, Meyborg et al. 2005) und ein über die extrazelluläre Matrix mit der Neointimablindung in Verbindung gebrachtes Gen ist die *proprotein convertase subtilisin/kexin type 5* (pc5). Sie ist nach Ballonverletzung im Tiermodell hoch reguliert und trägt durch Aktivierung von Integrinen und Matrix Metalloproteinasen zur Rekrutierung glatter Muskelzellen in die Neointima bei (Stawowy and Fleck 2005). Gleichzeitig aktiviert pc5 auch die TGF- $\beta$  Kaskade mit seinem Effektor Alk1 (Sluijter, Verloop et al. 2005). Alk1 wird unter der Überschrift Proliferation näher besprochen. Während KO einen Nullwert für das pc5 Gen zeigte, lag nach 7 Tagen der Wert in +500 deutlich über dem Wert in OP. Bei der Betrachtung der 3 und 14 Tage Werte fällt auf, dass in OP ein Anstieg bereits nach 3 Tagen stattfand. Hier fielen die Werte dann auch zügig wieder ab; dies kann auch bei niedrigem 7 Tage Wert am Endwert nach 14 Tagen abgelesen werden. In +500 hingegen blieben die Werte auch nach 14 Tagen noch deutlich erhöht (Abb.19).

Gen		Median OP	Median +500		Signifikanz
pc5	KO	0,00			
	3d	0,60	0,21		0,02
	7d	0,17	0,75		0,00
	14d	0,06	0,52		0,19

**Abbildung 19** Darstellung der Genexpressionanalyse für pc5. (Erklärung wie Abb. 13)

### Inflammation

Die hier aufgeführten Gene waren nach 7 Tagen in +500 sowohl gegenüber OP als auch gegenüber KO hoch reguliert. Das Genprodukt der *natural killer tumor recognition sequence* ist ein Rezeptor an tumortoxischen Lymphozyten, während die *protein tyrosine phosphatase, receptor type, C polypeptide-associated protein* (PTPRC-associated protein) an der Aktivierung von Lymphozyten via CD45 beteiligt ist. Das *regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein* spielt eine Rolle bei der Transkription von MHC Klasse II Molekülen. Das *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3* ist ein in Abhängigkeit von Interferon exprimiertes Protein, *interleukin 16* ein proinflammatorisches Zytokin.

### Zellmetabolismus

In dieser Gruppe, deren Gene ebenfalls in +500 hochreguliert waren, finden sich zelluläre Enzyme wie *alcohol dehydrogenase family 1, subfamily A2, aldolase 3, C isoform, calpain 2* oder auch die *glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked* und Transporter für Stoffwechselsubstrate (*solute carrier family 19 (sodium/hydrogen exchanger), member 1* und *solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5*). Auch Gene der intrazellulären Kommunikation (*protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B'' (PR72), alpha isoform and (PR 130), beta isoform* und *frizzled homolog 8 (Drosophila)*) und Signaltransduktion (*G protein-coupled receptor 27* und *ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 2*), sind hier aufgeführt. Der *small unique nuclear receptor corepressor* (SUNCOR) ist ein Modifikator der DNA Synthese und *ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homology)* ein Enzym der postreplikativen DNA Reparatur.

### Proliferation

Hier finden sich Gene der Proteinsynthese (*seryl-aminoacyl-tRNA synthetase*) und Gene zur Induktion der Transkription (*protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform* und *SRY-box containing gene 18*). Die Gruppe Proliferation beinhaltet die *mitogen activated protein kinase 3* (MAPK3) ein Regulator des Zellzyklus. Die MAPK3 ist in ballonverletzter Rattenaorta hochreguliert (Ge, Zeng et al. 2003). Gleichzeitig konnte auch nachgewiesen werden, dass PDGF seinen Einfluß auf die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen unter anderem durch MAPK3 ausübt (Kingsley and Plopper 2005). Das Gen der MAPK3 war nach 3

Tagen in OP hochreguliert und blieb, mit einem Einbruch nach 7 Tagen, erhöht. In +500 zeigte sich nur nach 7 Tagen eine Hochregulierung, sonst lagen die Werte auf dem Niveau von KO (Abb. 20).

Gen	Median OP	Median +500	Signifikanz
MAPK3 KO 0,50			
3d	0,82	0,26	0,03
7d	0,31	0,82	0,00
14d	0,63	0,46	0,42

**Abbildung 20** Darstellung der Genexpressionanalyse für MAPK3. (Erklärung wie Abb. 13)

Gleichzeitig beeinflusst die Aktivität von Matrix Metalloproteinasen, unter anderem der auch zu diesem Zeitpunkt regulierten MMP14, die am Abbau extrazellulärer Matrix bei der Migration glatter Muskelzellen nach Ballonverletzung beteiligt sind, die Expression der MAPK3 (Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004).

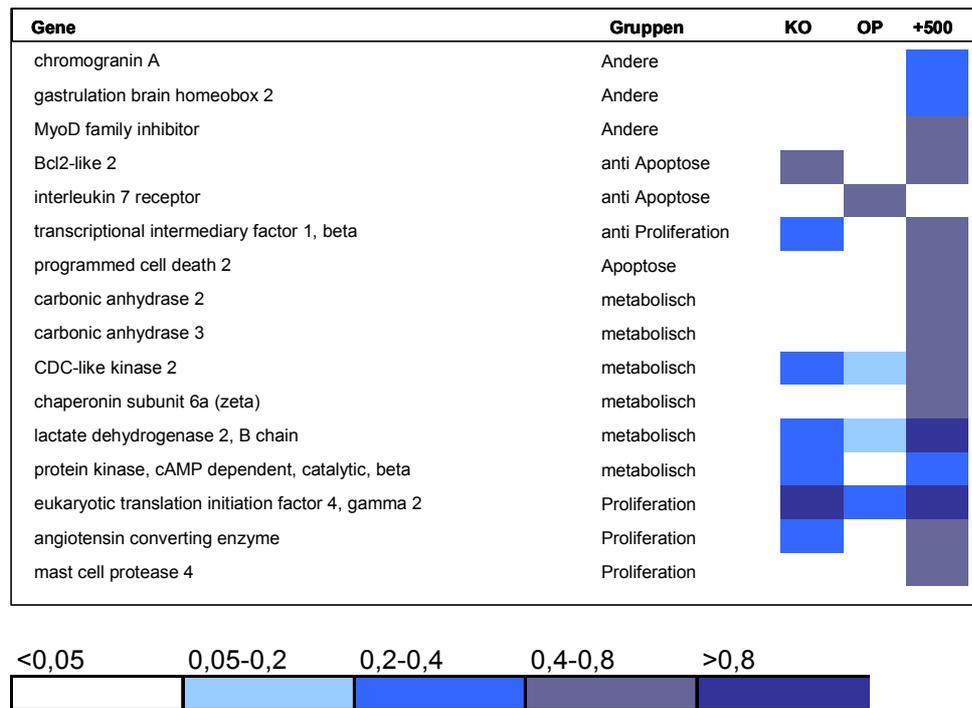
Proliferativen Einfluß auf zellulärer Ebene haben die Liganden der hier regulierten IL-6 und IL-11 Rezeptoren. IL-6 und IL-11 werden mit der Proliferation hämatopoetischer Zellen in Zusammenhang gebracht (Weissenbach, Clahsen et al. 2004) (Jacobsen, Keller et al. 1995). Zusätzlich agiert IL-11 als Gegenspieler zu TGF- $\beta$ , einem Hemmfaktor der Proliferation hämatopoetischer Progenitorzellen (Lemoli, Fogli et al. 1995). Im Zusammenhang mit TGF- $\beta$  steht auch das differentiell exprimierte Gen *activin A receptor, type II-like*, das einen TGF- $\beta$  Zelloberflächenrezeptor kodiert. Alk1 fungiert als Gegenspieler von transforming growth factor receptor beta 1 (Alk5), ebenfalls ein TGF- $\beta$  Rezeptor. Während über Alk1 Signale zur Proliferation und gegen die Zelldifferenzierung gegeben werden, gilt für Alk5 das Gegenteil (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2003). Zusätzlich ist für Alk5 die Induktion der Differenzierung von Vorläuferzellen in glatte Muskelzellen beschrieben (Sinha, Hoofnagle et al. 2004). Auf Grund dieser Zusammenhänge könnte die Regulierung von Alk1 eine Rolle in der Neointimabildung spielen. Alk1 war nach 3 Tagen sowohl in OP als auch in +500 hochreguliert, stieg aber in +500 zum Zeitpunkt 7 Tage noch über den Wert 3 Tage OP an um dann in beiden Gruppen abzufallen (Abb. 21).

Gen	Median OP	Median +500	Signifikanz
Alk1 KO 0,39			
3d	0,71	0,60	0,28
7d	0,17	0,77	0,01
14d	0,50	0,58	0,50

**Abbildung 21** Darstellung der Genexpressionanalyse für Alk1. (Erklärung wie Abb. 13)

### 3.3.2.3 Differentielle Regulierung nach 14 Tagen

Nach 14 Tagen waren 16 Gene differentiell exprimiert. Davon waren 15 in +500 hochreguliert, eines nach unten. Dabei handelte es sich um den *interleukin 7 receptor*, für den in OP ein Wert gemessen werden konnte, während er in +500 nicht exprimiert war. Bei den hoch regulierten Genen lagen alle in +500 gemessenen Werte deutlich über OP und auch KO, bis auf das Gen *eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 2*, das in +500 und OP ähnliche Werte aufwies (Abb. 22).



**Abbildung 22** Mediane der Intensitäten der Expression der 16 zum Zeitpunkt 14 Tage zwischen +500 und OP differentiell exprimierten Gene, sortiert nach funktionellen Gruppen. (Erklärung wie Abb. 12)

Bei einem Vergleich der Werte von KO und OP fällt auf, dass 8 der 16 in +500 hoch regulierten Gene in KO und OP gar nicht exprimiert waren. Bei den restlichen 7 Genen (außer *eukaryotic translation initiation factor 4*) lagen die Werte in OP jeweils unter den Werten in KO; die Messungen in +500 überstiegen hier jedoch die Ausgangswerte. Abgesehen von der größten Gruppe der hier differentiell exprimierten Gene, die mit dem Zellstoffwechsel in Zusammenhang stehen, finden sich zum Zeitpunkt 14 Tage vor allem Gene der Apoptose und Antiapoptose. Im Einzelnen zeigt sich die in Abbildung 22 dargestellte Verteilung.

#### Apoptose

Diese Gruppe beinhaltet 3 anti-apoptotische Gene und *programmed cell death 2* als proapoptotisches Gen. Der *interleukin 7 receptor* gewährt T-Zellen Schutz vor Apoptose, während *Bcl2-like 2* myeloische Zellen vor dem programmierten Zelltod bewahrt. Der *IL-7 receptor* war in +500 als einziges Gen nach 14 Tagen herunter reguliert. Die Werte für *Bcl2-like 2* waren

zwar in +500 gegenüber OP erhöht, unterschieden sich aber nur unwesentlich von ihrem Ausgangswert in KO, somit ist eher von einer Herunterregulierung in OP auszugehen.

### Zellmetabolismus

In diese Gruppe wurden intrazellulär aktive Gene eingeordnet, wie die ubiquitär vorhandenen Enzyme *carbonic anhydrase*, *lactate dehydrogenase 2*, *B chain* oder Kinasen wie die *CDC-like kinase 2* oder die *protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta*, die die Phosphorylierung intrazellulärer Proteine kontrolliert und zur Signaltransduktion beiträgt. Mit der *chaperonin subunit 6a (zeta)* findet sich hier auch ein Gen des Aminosäurestoffwechsels.

### Proliferation

In dieser Gruppe sind 3 Gene enthalten, die allesamt in +500 gegenüber den beiden anderen Gruppen hochreguliert waren, wobei das *angiotensin converting enzyme* und der *transcriptional intermediary factor 1, beta* in OP nach 14 d nicht exprimiert waren und sich für die *mast cell protease 4* sowohl in KO als auch in OP zu allen Zeitpunkten Nullwerte fanden (Abb. 23). Mit dem *transcriptional intermediary factor 1, beta* war ein Repressor der Transkription reguliert, während dem *angiotensin converting enzyme* und der *mast cell protease 4* stimulierende Effekte auf die Proliferation glatter Muskelzellen nach Ballonverletzung zugeschrieben werden (Takai and Miyazaki 2002). Dabei bewirken beide Enzyme die Konversion von Angiotensin I zu Angiotensin II (Saito, Muto et al. 2003). Die *mast cell protease 4* aktiviert darüber hinaus noch die *matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)* (Tchougounova, Lundequist et al. 2005), die in der Neointimabildung beschrieben wurde (Ge, Shen et al. 2005).

Gen	Median OP	Median +500		Signifikanz
<b>mast cell</b> KO	0,00			
<b>protease 4</b> 3d	0,00	0,44		0,01
7d	0,00	0,49		0,08
14d	0,00	0,59		0,01

**Abbildung 23** Darstellung der Genexpressionanalyse für mast cell protease 4. (Erklärung wie Abb. 13)

#### 3.3.2.4 Regulierung anderer in Zusammenhang mit der Restenose beschriebener Gene

Die hier beschriebenen Gene waren im direkten Vergleich der Zeitpunkte anhand der gewählten Kriterien Quotient, Differenz und Signifikanz nicht differentiell exprimiert. Sie sind aber einerseits bereits in der Neointimabildung beschrieben und stehen andererseits in Zusammenhang mit den im vorliegenden Modell regulierten Genen. Vergleicht man diese Gene anhand der Unterschiede der Mediane mit dem Man-Whitney-U Test auf das in der Literatur übliche Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$  hin, ergeben sich zum Teil durchaus signifikante Ergebnisse.

## PDGF

Der *platelet derived growth factor* fördert das Wachstum und die Migration glatter Muskelzellen, weshalb ihm im Rahmen der Neointimabildung eine große Rolle zugeschrieben wird. Darüber hinaus steht er mit anderen, im vorliegenden Modell regulierten Genen, wie z.B. p57 und MAPK3, in Zusammenhang. Des Weiteren ist der PDGF Rezeptor einer der spezifischen Angriffspunkte von Imatinib. In OP zeigte sich zum Zeitpunkt 3 Tage ein deutlicher Anstieg der PDGF Expression, in +500 erst nach 7 Tagen. Während sich die Werte in OP im Verlauf wieder dem Ausgangswert annäherten, blieben die Werte in +500 erhöht. PDGF war bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  zum Zeitpunkt 3 Tage differentiell exprimiert, auch die übrigen Signifikanzkriterien wurden erfüllt. Damit folgt PDGF dem Profil der frühen Herunterregulierung mit anschließender überschießender Expression in +500 (Abb.24), das sich auch für die anderen zu diesem Zeitpunkt differentiell exprimierten Gene zeigt.

Gen	Median OP	Median +500	Signifikanz
PDGF- $\beta$ KO 0,25			
3d	0,62	0,00	0,03
7d	0,27	0,76	0,05
14d	0,34	0,52	0,21

**Abbildung 24** Darstellung der Genexpressionanalyse für PDGF. (Erklärung wie Abb. 13)

Gleichzeitig soll auch die Expression des PDGF-Rezeptors (PDGF-R) beleuchtet werden, an den Imatinib spezifisch bindet. Der Rezeptor war nach 3 Tagen in OP auf Ausgangsniveau um dann abzufallen. In +500 war seine Expression nach 3 Tagen supprimiert. Die Hochregulierung in +500 folgte nach 7 Tagen, nach 14 Tagen waren die Werte weiterhin erhöht. Damit folgte auch der PDGF-R dem Profil der frühen Herunterregulierung mit anschließender überschießender Expression in +500. Auf ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  und auch nach den Kriterien Quotient und Differenz war der PDGF-R nach 3 Tagen zwischen OP und +500 differentiell exprimiert (Abb. 25).

Gen	Median OP	Median +500	Signifikanz
PDGF-R KO 0,54			
3d	0,53	0,07	0,03
7d	0,26	0,50	0,05
14d	0,00	0,46	0,56

**Abbildung 25** Darstellung der Genexpressionanalyse für den PDGF-R. (Erklärung wie Abb. 13)

### c-kit

Ein weiterer spezifischer Bindungspartner für Imatinib ist c-kit, ein ebenfalls in Zusammenhang mit der Neointimabildung beschriebenes Gen (Hibbert, Chen et al. 2004). Für c-kit konnte keine differentielle Expression festgestellt werden. Die gemessenen Werte in OP und +500 verhielten sich gleichsinnig. Sie stiegen nach 7 Tagen an und blieben dann erhöht, während c-kit in KO gar nicht exprimiert war (Abb. 26).

Gen		Median OP	Median +500		Signifikanz
c-kit	KO	0,00			
	3d	0,00	0,00		0,5
	7d	0,34	0,54		0,21
	14d	0,44	0,55		0,42

**Abbildung 26** Darstellung der Genexpressionanalyse für c-kit. (Erklärung wie Abb. 13)

### TGF- $\beta$

Die Wirkung des *transforming growth factor*  $\beta$  ist in Bezug auf die Neointimabildung nach Gefäßverletzung ausführlich untersucht. Darüber hinaus wird er mit einigen hier differentiiell exprimierten Genen, wie z.B. p57, IL-11 und Alk1 in Zusammenhang gebracht. Ähnlich wie bei PDGF zeigte sich zum Zeitpunkt 3 Tage in OP ein deutlicher Anstieg, der sich in +500 erst nach 7 Tagen zeigte, dann aber die Werte in 3dOP überstieg. Setzt man ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  voraus, sind die Unterschiede der Werte zwischen OP und +500 für TGF- $\beta$  zu den Zeitpunkten 3 und 7 Tage signifikant. Allerdings lag der Quotient stets zwischen 2,5 und 0,4, womit ein weiteres Kriterium der differentiellen Expression nicht erfüllt war. Dasselbe gilt für die Differenz nach 14 Tagen, da sie zwischen den Werten 0,1 und -0,1 lag (Abb. 27).

Gen		Median OP	Median +500		Signifikanz
TGF- $\beta$	KO	0,25			
	3d	0,68	0,30		0,02
	7d	0,54	0,84		0,03
	14d	0,62	0,54		0,5

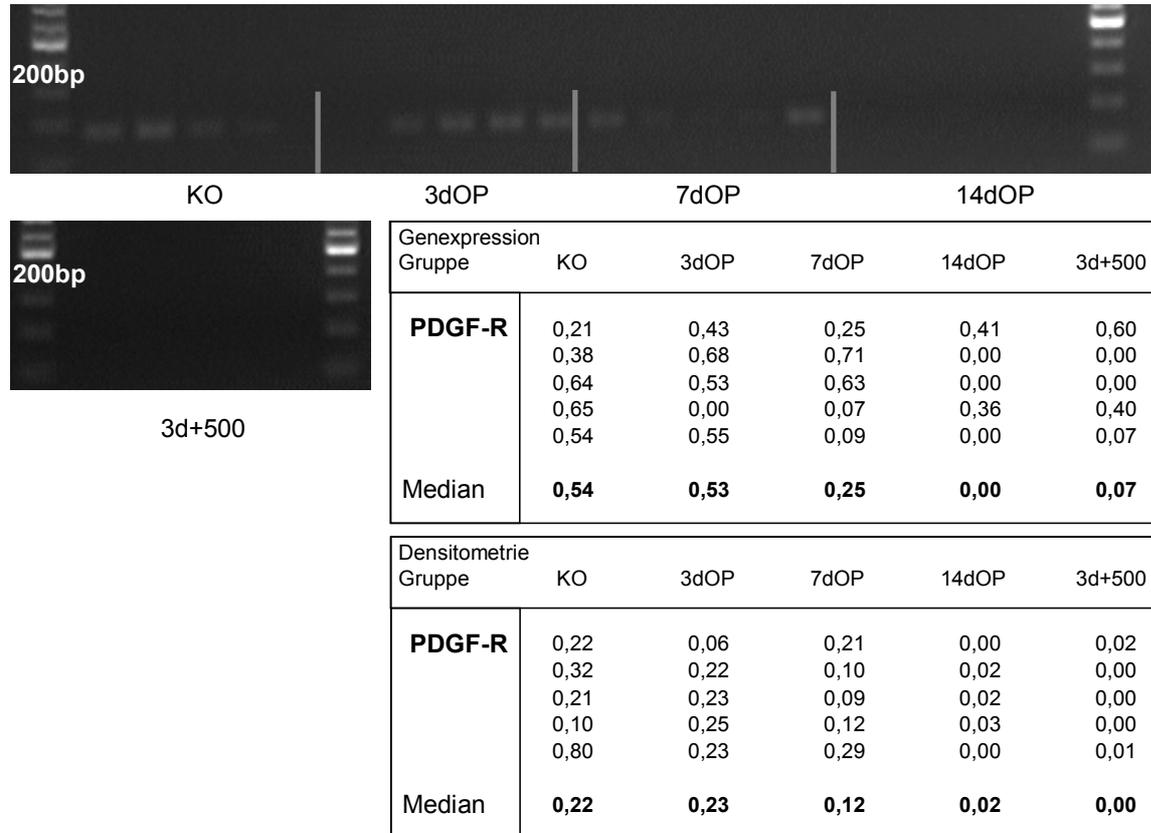
**Abbildung 27** Darstellung der Genexpressionanalyse für TGF- $\beta$ . (Erklärung wie Abb. 13)

### 3.3.3 PCR

Die PCR dient der Verifizierung der Daten aus der Genexpressionsanalyse auf Proteinebene. Es wurden einerseits Gene validiert, die bereits in Zusammenhang mit der Neointimabildung in der Literatur beschrieben wurden, und in der Genexpressionsanalyse differentiiell exprimiert waren. Andererseits sollte auch die Expression für die spätere Diskussion relevanter Gene verifiziert werden, die noch nicht im Zusammenhang der Restenose beschrieben wurden.

### 3.3.3.1 PDGF-R

Die Expression des PDGF-Rezeptors ließ sich in OP und zum Zeitpunkt seiner differentiellen Regulierung durch Imatinib nach 3 Tagen in +500 durch PCR validieren. (Abb. 28).

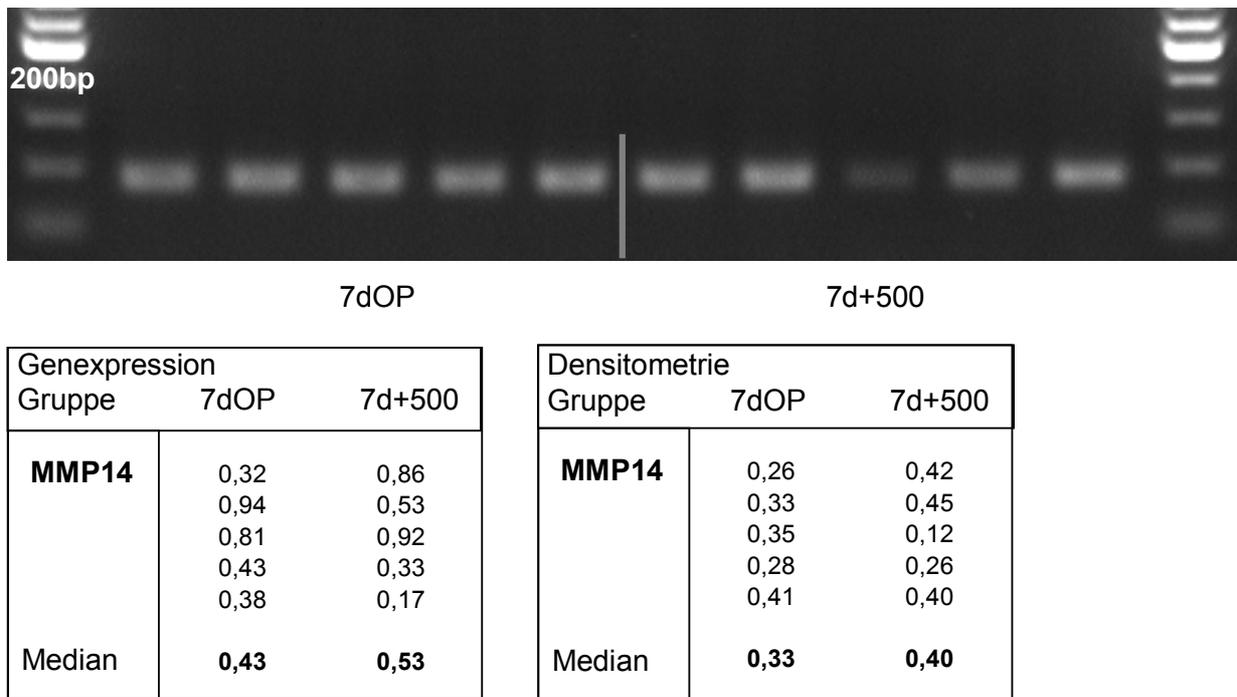


**Abbildung 28** Genspezifische PCR für den PDGF Rezeptor.

Die densitometrische Messung der Banden (untere Tabelle) zeigte eine gute Korrelation mit den in der Genexpressionsanalyse erhobenen Expressionswerten. In den Tabellen finden sich die jeweiligen Einzelwerte (n=5) der Densitometrie und der Genexpression und der Gruppenmedian.

### 3.3.3.2 MMP14

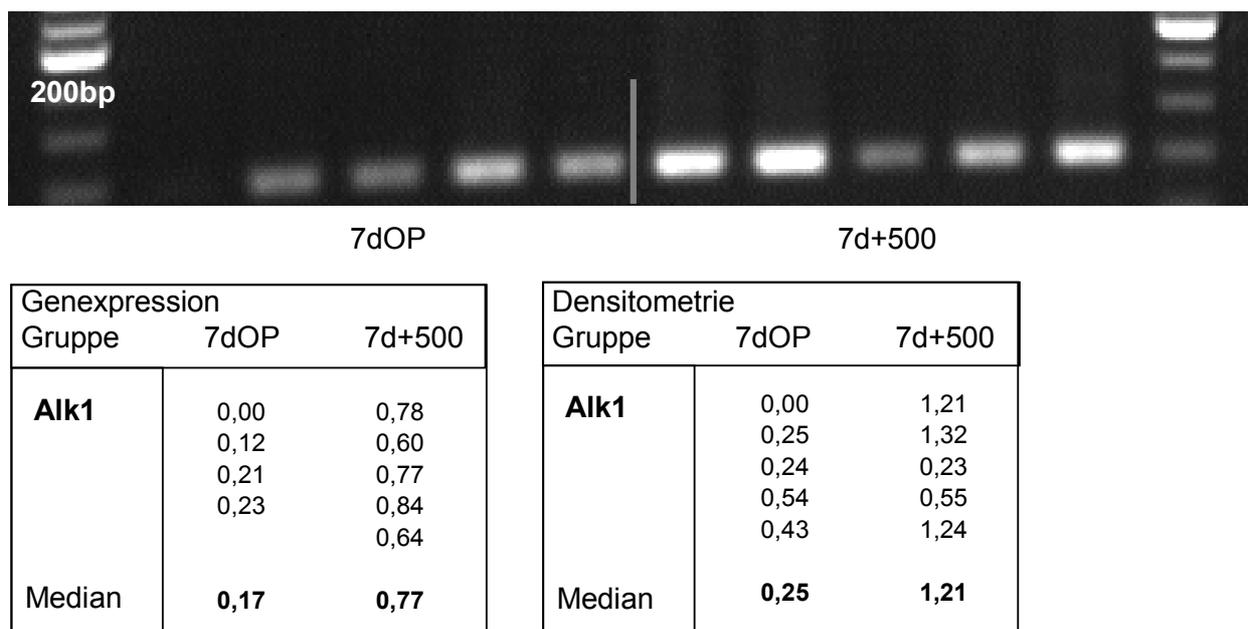
Der Modulation der extrazellulären Matrix wird in der Literatur eine immer wichtigere Rolle bei der Neointimabildung zugeschrieben. Unter anderem wird dabei die MMP14 impliziert, die zum Zeitpunkt 7d in der vorliegenden Untersuchung reguliert war. Das Ergebnis der Genexpressionsanalyse konnte durch eine zum Zeitpunkt der differentiellen Regulierung durchgeführte PCR bestätigt werden (Abb. 29).



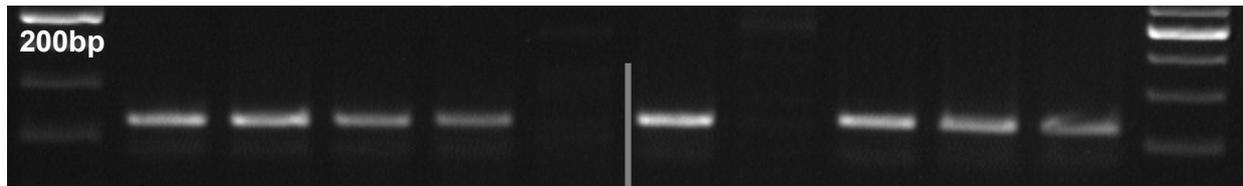
**Abbildung 29** Genspezifische PCR für MMP14. (Erklärung wie Abb. 28)

### 3.3.3.3 Alk1 und Alk5

Die Hochregulierung von *activin A receptor, type II-like 1* (Alk1), ein Rezeptor von TGF- $\beta$ , nach 7 Tagen in +500 könnte eine Erklärung für die verstärkte Neointimabildung in +500 liefern. Daher wurde seine Expression durch eine PCR validiert (Abb. 30), wobei sich eine gute Korrelation zwischen PCR und Genexpression zeigte. Alk1 benötigt für seine Funktion die Koaktivierung des *transforming growth factor receptor beta 1* (Alk5) (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2003). Alk5 war zum Zeitpunkt der Regulierung von Alk1 ebenfalls durch PCR nachweisbar (Abb. 31).



**Abbildung 30** Genspezifische PCR für Alk1. (Erklärung wie Abb. 29)



Densitometrie		7dOP	7d+500
Gruppe		7dOP	7d+500
<b>Alk5</b>		0,33	0,58
		0,41	0,00
		0,23	0,47
		0,25	0,23
		0,00	0,18
<b>Median</b>		<b>0,25</b>	<b>0,23</b>

**Abbildung 31** Genspezifische PCR für Alk5.

Die PCR zeigt eine stabile Expression von Alk5 nach 7 Tagen zum Zeitpunkt der differentiellen Expression von Alk1 sowohl in OP als auch in +500. In der Tabelle finden sich die jeweiligen Einzelwerte (n=5) der Densitometrie und der Gruppenmedian. Werte aus der Genexpression liegen nicht vor, da Alk5 nicht auf die verwendeten Arrays gespottet war.

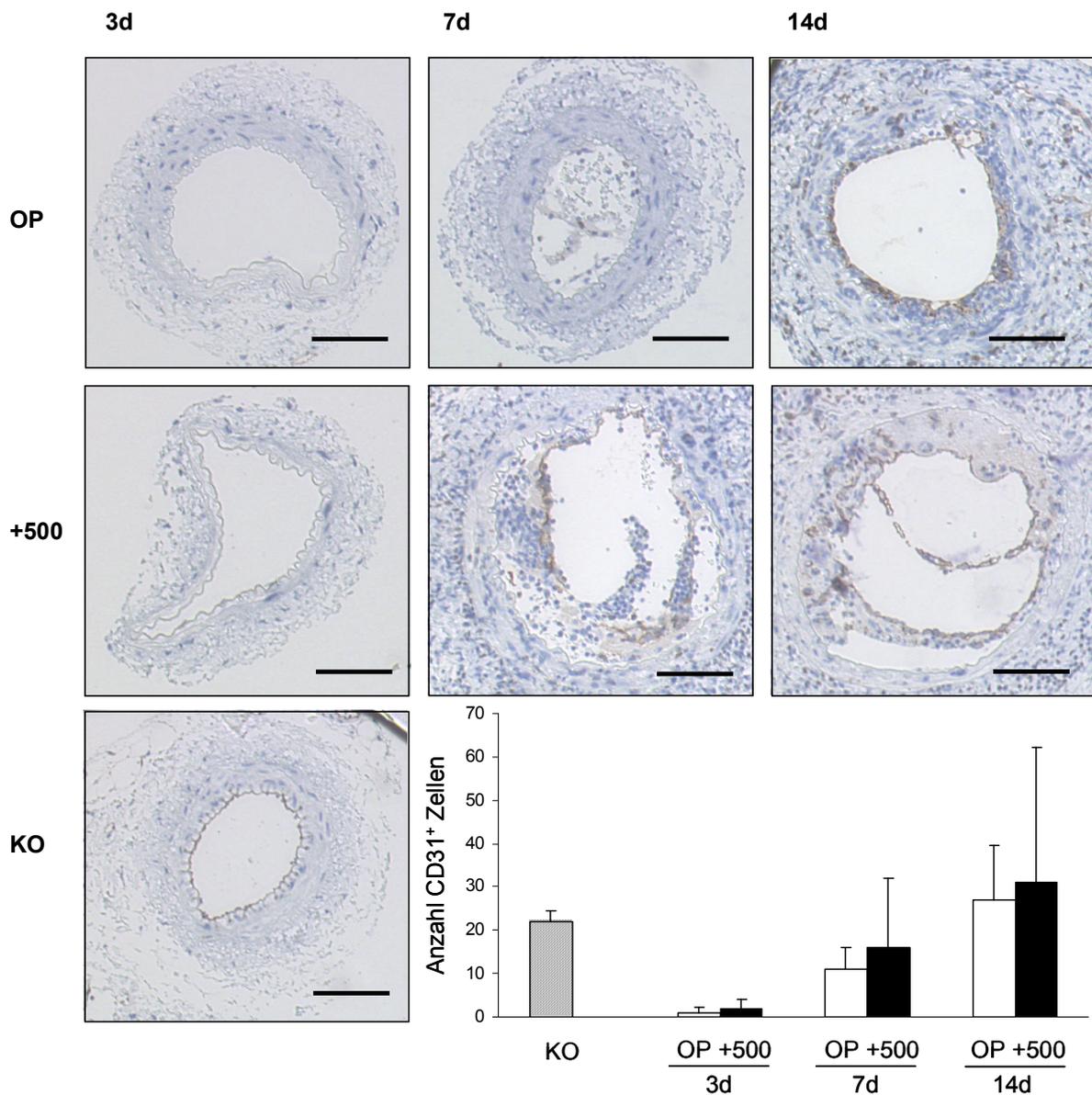
### 3.3.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung der Gefäßschnitte soll folgende Fragen weiter klären:

- Kam es bei der im Modell herbeigeführte Gefäßverletzung wie bei der PTCA zum Verlust des Endothels? Dazu wurde mittels Färbung auf CD31, einem Marker für Endothelzellen, überprüft, ob es zu einer Denudierung des Gefäßes gekommen war.
- Handelt es sich bei dem das Gefäß nach der Verletzung einengenden Gewebe tatsächlich um Neointima? Da die zelluläre Komponente humaner Neointima zum größten Teil aus glatten Muskelzellen besteht, wurde eine Färbung auf sm-actin, dem Filament der SMCs durchgeführt.
- Können in der Neointima hämatopoetische Progenitorzellen nachgewiesen werden und differenzieren sie aus? Als Indikatoren für Progenitorzellrekrutierung in die Neointima dienen SDF-1 und c-kit. Gleichzeitig ist c-kit ein Indikator für den Differenzierungsgrad der Progenitorzellen.
- Können neue, bisher im Zusammenhang mit der Neointimabildung noch nicht publizierte, aber potentiell involvierte Genprodukte nachgewiesen werden? Zur Klärung dieser Frage wurde Alk1 weiter verfolgt.

### 3.3.4.1 CD31

Direkt nach der Drahtverletzung verringerte sich die Anzahl der CD31<sup>+</sup> Zellen (Abb. 32). Nach 7 Tagen näherte sich die Anzahl positiver Zellen wieder an den Ausgangswert an um ihn dann nach 14 Tagen zu überschreiten. Dabei verhielt sich die Zellzahl sowohl in OP als auch in +500 gleich.

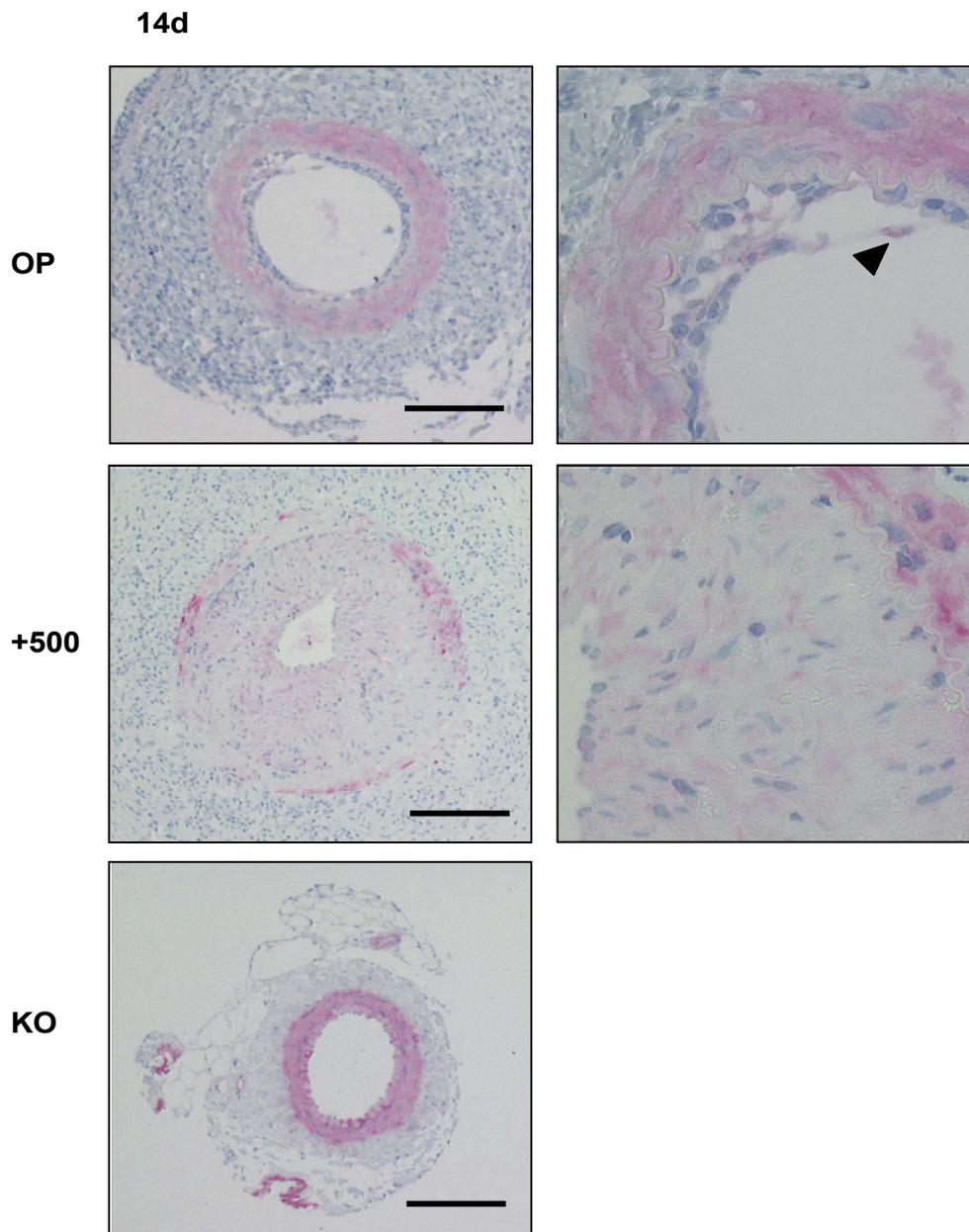


**Abbildung 32** Immunhistochemische Färbung auf CD31 nach der LSAB-Methode.

Die das Protein exprimierenden Zellen sind braun angefärbt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert der jeweils pro Gruppe und Zeitpunkt manuell ausgezählten Zellen an. Dabei verhielt sich die Zellzahl in OP und +500 ähnlich, nach einem starken initialen Abfall erreichten die Werte in beiden Gruppen nach 14 Tagen den Ausgangswert in KO. Balken=100μm

### 3.3.4.2 sm-actin

Die zelluläre Komponente der Neointima besteht großteils aus glatten Gefäßmuskelzellen. Um Evidenz zu sammeln, dass es sich bei den die Gefäße verschließenden Zellen tatsächlich um Neointima handelt, wurde eine Färbung auf smooth muscle cell actin (Komatsu, Ueda et al. 1998), das Muskelfilament der glatten Muskelzellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Neointima in ihrer vollen Ausprägung nach 4 Wochen Zellen enthielt, die sich positiv anfärbten und damit als glatte Gefäßmuskelzellen gelten konnten (Abb. 33).

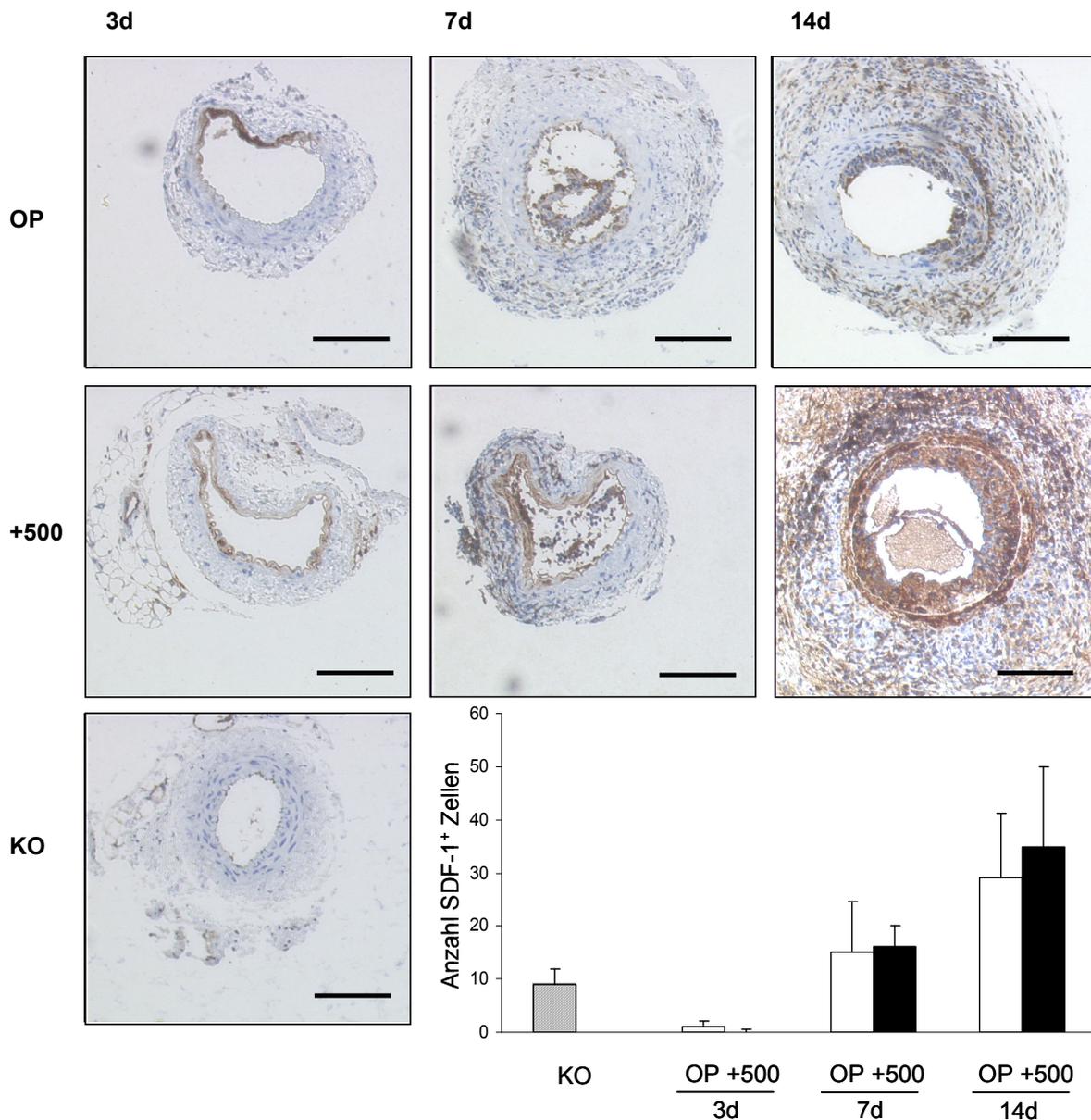


**Abbildung 33** Immunhistochemische Färbung auf sm-actin nach der APAAP-Methode.

Positive Zellen sind rot. Während sich nach 14 Tagen in der Ausschnittsvergrößerung in OP einzelne positive Zellen finden (Pfeil) zeigt sich in +500 eher eine diffuse Färbung. Balken=100µm

### 3.3.4.3 SDF-1

Neben glatten Gefäßmuskelzellen wird in der Neointimabildung auch eine Rolle für hämatopoetische Progenitorzellen diskutiert, die unter anderem durch das von den SMCs gebildete Chemokin SDF-1 rekrutiert werden (Schober, Knarren et al. 2003). Daher wurde eine Färbung auf SDF-1 durchgeführt. Sowohl in OP als auch in +500 konnten positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 34), die sich nach 7 Tagen verstärkt zeigten und zum Endpunkt nach 14 Tagen hin zunahm.

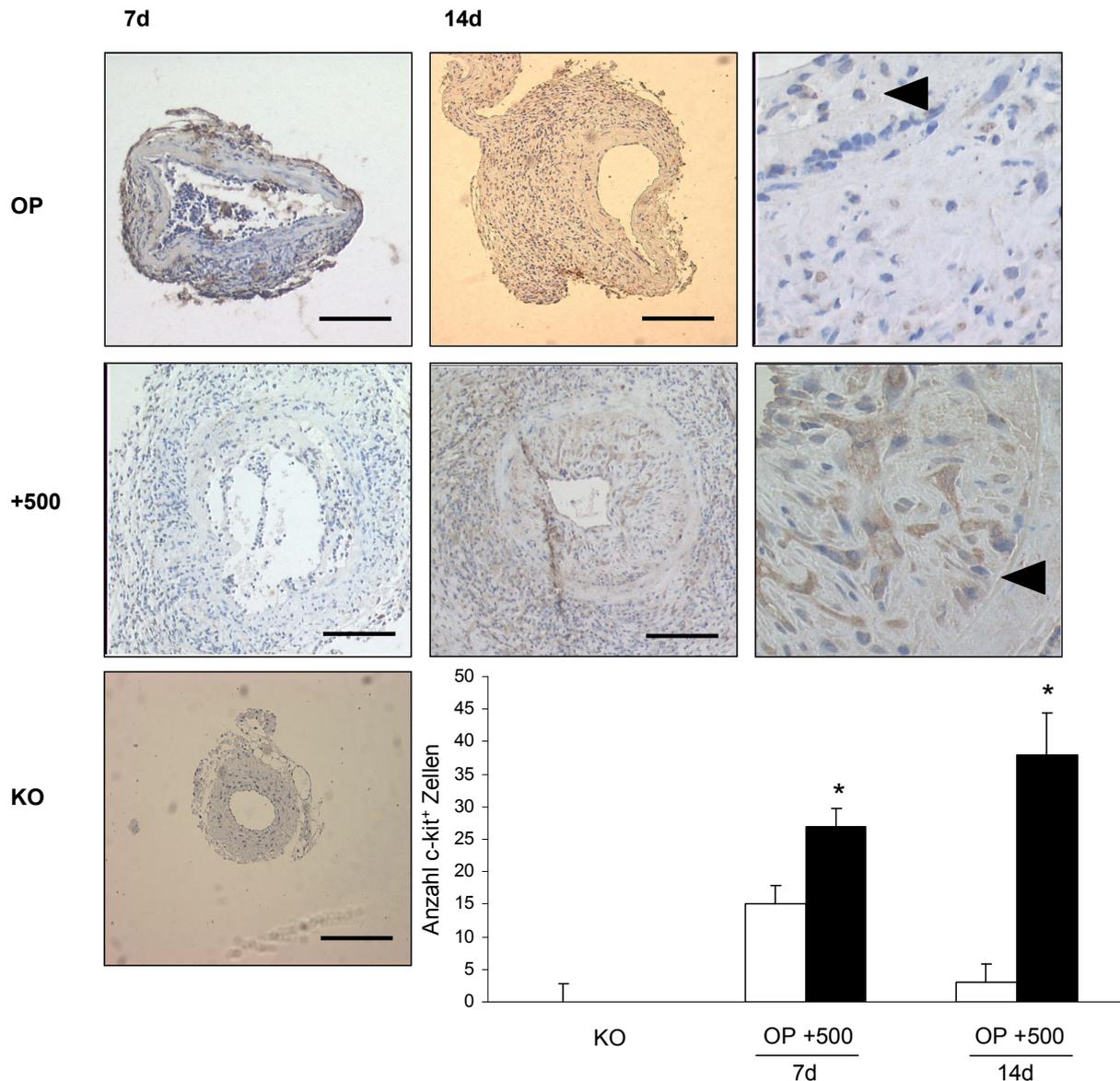


**Abbildung 34** Immunhistochemische Färbung auf SDF-1 nach der LSAB-Methode.

Positive Zellen sind braun. Das Diagramm zeigt den Mittelwert positiver Zellen pro Gruppe und Zeitpunkt. Die Zellzahl war in OP und +500 ähnlich. Nach 7 Tagen überschritt die Zahl positiver Zellen den Kontrollwert und stieg zum Zeitpunkt 14 Tage hin weiter an. Balken=100µm

### 3.3.4.4 c-kit

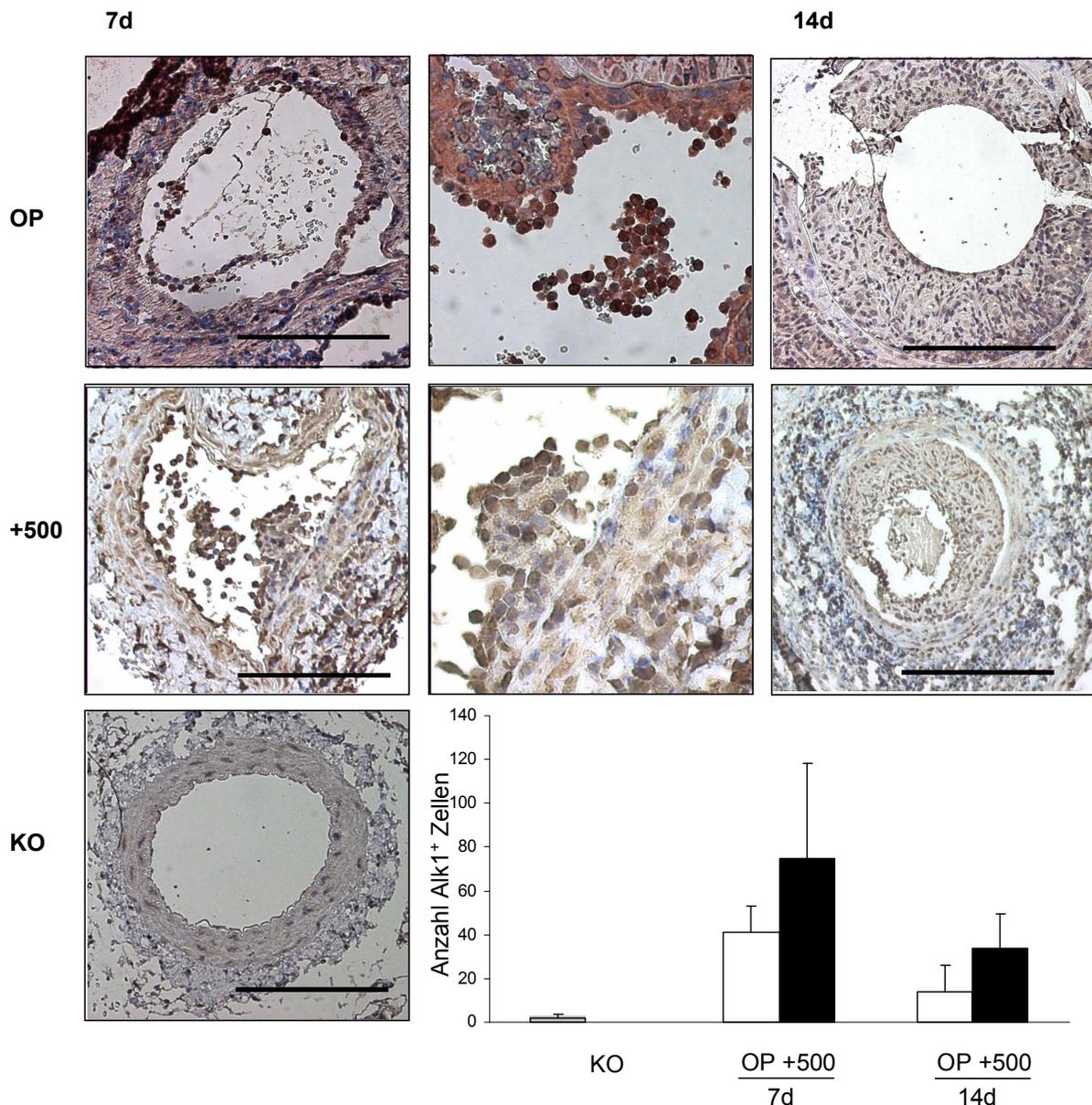
C-kit positive Zellen konnten in neointimalem Gewebe nachgewiesen werden, wobei sie als Vorläuferzellen glatter Muskelzellen angesehen wurden (Hibbert, Chen et al. 2004). C-kit positive Zellen fanden sich nach 7 und nach 14 Tage sowohl in OP als auch in +500, wobei ihre Anzahl in +500 signifikant größer war. Nach 14 Tagen war die Anzahl c-kit positiver Zellen in OP rückläufig, während sie in +500 noch deutlich anstieg (Abb. 35).



**Abbildung 35** Immunhistochemische Färbung auf c-kit nach der LSAB-Methode. Positive Zellen sind braun. Das Diagramm zeigt den Mittelwert der pro Gruppe und Zeitpunkt positiven Zellen. In KO fanden sich keine positiven Zellen, zum Zeitpunkt 7 Tage waren sie in OP und in +500 vorhanden. In +500 waren die Werte signifikant höher als in OP. c-kit<sup>+</sup> Zellen zeigen eine sternförmiger Morphologie. Pfeil=IEL. Balken=100µm. p≤0,05.

### 3.3.4.5 Alk1

Alk1 ist ein Rezeptor für TGF- $\beta$ , einen in der Restenose bereits beschriebenen Wachstumsfaktor (Van Belle, Bauters et al. 2001). Alk1 ist in der Lage, Einfluß auf die Differenzierung und Proliferation sowohl glatter Muskelzellen als auch Endothelzellen zu nehmen (Sinha, Hoofnagle et al. 2004), ((Henrich, Hahn et al. 2004). Die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigten sowohl in OP als auch in +500 zum Zeitpunkt 7 Tage die höchste Anzahl positiver Zellen (Abb. 36). Nach 14 Tagen waren die Werte bereits rückläufig. Die Anzahl positiver Zellen lag zu jedem Zeitpunkt in +500 über der in OP.



**Abbildung 36** Immunhistochemische Färbung auf Alk1 nach der LSAB-Methode.

Positive Zellen sind braun. Das Diagramm zeigt den Mittelwert der jeweils pro Gruppe und Zeitpunkt positiven Zellen. Die Anzahl positiver Zellen war dabei in +500 deutlich höher als in OP, vor allem zum Zeitpunkt 7 Tage. Balken=100  $\mu$ m

## 4 DISKUSSION

Um der Restenose nach PTCA, einem der führenden Probleme der interventionellen Kardiologie beizukommen, stellen sich zwei Hauptaufgaben:

- Gewinnung eines weiter vertieften Verständnisses der zu Grunde liegenden Pathophysiologie
- Entwicklung neuer, sich aus diesem Verständnis ergebender therapeutischer Ansätze

Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen ein Mausmodell der Restenose herangezogen, das die morphometrische, immunhistochemische und genexpressionsbasierte Analyse der Neointima gestattet. Das gewählte Modell erlaubt durch die Wiederherstellung eines orthograden Blutflusses nach Intervention auch die Beurteilung putativ an der Restenose beteiligter Progenitorzellen. Zum anderen wurde eine Pharmakotherapie mit Imatinib durchgeführt.

Die dabei gemachten Beobachtungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Das gewählte Modell war zuverlässig in der Lage, eine glattmuskuläre Neointima unter Beteiligung von Progenitorzellen zu produzieren
- Der durch die Operation entstehende Lumenverlust basierte dabei tatsächlich auf neointimaler Proliferation und nicht auf negativem Remodelling
- Unter Therapie mit Imatinib kam es zu einer dosisabhängigen, verstärkten Neointimabildung
- Dennoch war Imatinib in der Lage, die Expression von PDGF und PDGF-abhängigen Genen zu beeinflussen
- Die verstärkte Neointimabildung unter Imatinib war am ehesten zurückzuführen auf
  - eine verstärkte Proliferation, vor allem nach initialer Hemmung (escape Phänomen), wobei sich eine, bisher in diesem Umfang noch nicht beschriebene, Rolle für Gene der extrazellulären Matrix und ihre Beeinflussung durch PDGF abzeichnete
  - einen pro-proliferativen und anti-differentiellen Effekt auf Progenitorzellebene
- Der Effekt auf Progenitorzellebene war unter anderem auf die Beteiligung von Alk1, einem bisher in Zusammenhang mit der Neointimabildung noch nicht beschriebenen Gen, zurückzuführen

So gelang es, durch die Therapie mit Imatinib, die Vorgänge der Neointimabildung jenseits von PDGF zu beleuchten und ein vertieftes Verständnis der Progenitorzelldifferenzierung im Prozess der Restenose zu gewinnen.

#### **4.1 Beurteilung des operativen Modells**

Der Verlauf der Neointimabildung im Drahtverletzungsmodell nach Sata et al. konnte reproduziert werden. Wie beschrieben zeigte sich eine erste lockere Zellanlagerung nach 7 Tagen, eine deutliche, konzentrische Lumeneinengung von 32% nach 14 Tagen und eine weitere Einengung auf 53 % nach 28 Tagen (Sata, Maejima et al. 2000). Um zu beweisen, dass es sich bei dem entstehenden Gewebe tatsächlich um Neointima handelt, wurde eine immunhistochemische Färbung auf sm-actin erfolgreich durchgeführt, die die Zellen der Neointima als glatte Muskelzellen identifizieren konnte.

Durch die Operation kam es, gemessen an der IEL und der EEL, zu einer Zunahme des Umfanges der behandelten Gefäße. Negatives remodeling des verletzten Gefäßes als Ursache für den Lumenverlust ist damit auszuschließen. Somit ist das Modell auch in Hinblick auf die in-Stent Restenose aussagekräftig, da hier die Neointimabildung als Ursache des Lumenverlusts im Vergleich zum negativen remodeling im Vordergrund steht (Mintz, Popma et al. 1996; Gaspardone and Versaci 2005).

#### **4.2 Einfluß von Imatinib auf die Neointimabildung**

Die Behandlung mit Imatinib zeigte weder in der +50 noch in der +500 Gruppe eine Reduktion der Neointimabildung. Die Neointimabildung in den Medikamentengruppen lag nach 14 Tagen signifikant über dem Wert der OP Gruppe und überstieg zu diesem Zeitpunkt in der +500 Gruppe sogar den Lumenverlust nach 28 Tagen in OP. Daher wurde aus Gründen des Tierschutz und der Kosteneffizienz auf die Erstellung einer 28d +500 Gruppe verzichtet. Obwohl weitere Effekte durch die Pharmakotherapie nach 28 Tagen nicht auszuschließen sind, kann die Wahl des Endpunktes nach 14 Tagen in Bezug auf die Proliferation glatter Muskelzellen als aussagekräftig angenommen werden (Majesky, Schwartz et al. 1987). Darüber hinaus zeigte der Vergleich der +50 und der +500 Gruppen auch noch eine signifikante Dosisabhängigkeit des Lumenverlustes. So war der Lumenverlust mit 57% in der +500 Gruppe nach 14 Tagen noch einmal signifikant größer als in der +50 Gruppe mit 41%.

Während sich in der sm-actin Färbung in OP vereinzelt eindeutig positiv angefärbte Zellen nachweisen ließen, fand sich in +500 eher eine diffuse Färbung. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob es sich in +500 bereits um glatte Muskelzellen oder um undifferenzierte Vorstufen handelt. Zu überprüfen ist hier die Hypothese, ob die frühe Wirkung von Imatinib die Migration glatter Muskelzellen aus der Media zu hemmen vermag, sodass der Rekrutierung zirkulierender Progenitorzellen ein Übergewicht zukommt. Bemerkenswert ist auch die spindel- bis sternförmige Struktur der diffus angefärbten Zellen, die ein weiteres Zeichen für ihre Unreife sein könnte (Hibbert, Chen et al. 2004).

Als Grund für den in +500 verstärkten Lumenverlust muß auch eine geringere Reendothelialisierung nach der Gefäßverletzung diskutiert werden. Im vorliegenden Modell kam es zum Verlust des Endothels mit seinen CD31<sup>+</sup> Zellen (Sata, Maejima et al. 2000), wobei sich der Grad der nachfolgenden Reendothelialisierung auf den Grad der Neointimabildung auswirkt (Bauters and Isner 1997). Die CD31 Immunhistochemie zeigte 3 Tage nach Verletzung sowohl in der OP als auch in der +500 Gruppe kaum CD31<sup>+</sup> Zellen. Im weiteren Verlauf nahm die Zahl der CD31<sup>+</sup> Zellen als Zeichen der Reendothelialisierung wieder zu. Nach 14 Tagen wurde der Ausgangswert eines unverletzten Gefäßes sowohl in OP als auch in +500 erreicht, eine Beobachtung die diesen Zeitpunkt zusätzlich als Endpunkt der morphometrischen Analyse validiert. Damit scheidet die verlangsamte Reendothelialisierung als Erklärung für die verstärkte Neointimabildung in +500 aus.

Die Beobachtung, dass Imatinib nicht in der Lage war, die Restenose zu begrenzen, bestätigt auch eine randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte klinische Studie von Zohlhøfer et al.. Sie konnten für die orale Therapie mit 600 mg/d Imatinib keine Reduktion der angiographischen Re-Restenoserate nach PTCA einer bereits bestehenden restenotischen Läsion nachweisen (Zohlhøfer, Hausleiter et al. 2005). Im Gegensatz dazu zeigten Myllarniemi et al. in ihrem Modell der Ballonverletzung der Aorta thoracica der Ratte eine Reduktion der Neointimabildung unter Therapie mit Imatinib. Dabei handelte es sich um ein Modell mit einer zweizeitigen Verletzung, bei dem Imatinib allerdings erst bei der zweiten Verletzung die Neointimabildung reduzierte (Myllarniemi, Frosen et al. 1999). Bei der ersten Gefäßverletzung zeigte sich, gemessen an der Anzahl Bromodeoxyuridine positiver (BrdU<sup>+</sup>) Zellen, ein Maximum der Proliferation nach 7 Tagen, ein Zeitpunkt zu dem sich in der vorliegenden Untersuchung bereits das escape Phänomen eingestellt hatte. Bei der zweiten Verletzung des Gefäßes durch Myllarniemi et al. zeigte sich das Maximum der Proliferation allerdings schon nach 3 Tagen, eine Konstellation die der in 3d OP gleicht. Betrachtet man die Genexpression der vorliegenden Untersuchung in der +500 Gruppe zu diesem Zeitpunkt, so waren fast alle Gene supprimiert. 3 Tage nach Wiederverletzung zeigte sich dann auch bei Myllarniemi et al. ein Effekt von Imatinib, basierend auf der Abnahme der Anzahl der BrdU<sup>+</sup> Zellen und dem Verhältnis der Intima- und Mediafläche. Diese Feststellung deckt sich auch mit einer Untersuchung von Leppanen et al. (Leppanen, Rutanen et al. 2004). Obwohl sich die Kinetik der Proliferation und ihrer Regulierung durch Imatinib nach 3 Tagen in beiden Modellen ähnelt, konnte Imatinib bei einer einzeitigen Verletzung sowohl im vorliegenden Modell als auch bei Myllarniemi et al. lediglich nach 3 Tagen die Expression proliferativer Gene hemmen, nicht aber die Neointimabildung reduzieren.

### **4.3 Einfluß von Imatinib auf die Genexpression**

Der Haupteinfluss von Imatinib auf die Genexpression zeigte sich in einer Herunterregulierung v.a. von Genen der Proliferation und EZM nach 3 Tagen. Nach 7 Tagen kam es dann allerdings zu einer überschießenden Hochregulierung dieser Gene, die als escape Phänomen gedeutet werden muß und eine Ursache für die verstärkte Neointimabildung unter Therapie mit Imatinib sein könnte.

#### **4.3.1 Einfluß von Imatinib auf die Expression von PDGF und PDGF assoziierter Gene**

Im vorliegenden Modell zeigte sich in der OP Gruppe bereits nach 3 Tagen eine Heraufregulierung proliferationsfördernder Gene. Demgegenüber stand die Herunterregulierung fast aller dieser Gene in der +500 Gruppe. Für diesen Zeitpunkt sind in der Literatur folgende Vorgänge beschrieben: die Proliferation medialer glatter Muskelzellen ist bereits 24 Stunden nach der Gefäßverletzung nachweisbar und dauert etwa 2 Wochen an (Majesky, Schwartz et al. 1987). Die aktivierten glatten Muskelzellen aus der Media wandeln sich vom ruhenden, kontraktilen Typ zum aktivierten sekretorischen Typ (Van Belle, Bauters et al. 2001). Sie migrieren durch die Lamina elastica interna in die sich entwickelnde Neointima (Guiteras, Bourassa et al. 1987), wo etwa die Hälfte von ihnen weiter proliferiert (Hinohara, Robertson et al. 1992). Bei der Migration glatter Muskelzellen aus der Media wird PDGF eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Sie wird dadurch unterstrichen, dass blockierende Antikörper gegen PDGF in der Lage sind, diesen Prozess zu hemmen (Ferns, Raines et al. 1991). Da Imatinib PDGF spezifisch hemmt, sollten sich zu diesem Zeitpunkt Effekte durch die Pharmakotherapie nachweisen lassen. Tatsächlich war eine statistisch signifikante Herunterregulierung für PDGF- $\beta$  und den PDGF-Rezeptor in +500 nachweisbar.

Ein in Zusammenhang mit der Neointima über PDGF reguliertes Gen ist MIF. Chen et al. beschreiben seine verstärkte Expression in der Media der Arteria carotis der Ratte nach Verletzung, ein Effekt der sich durch einen monoklonalen Antikörper hemmen lässt und zur Reduktion der Neointimabildung führt. In vitro konnten Chen et al. eine Stimulierung der MIF Freisetzung aus glatten Muskelzellen durch PDGF nachweisen (Chen, Sakuma et al. 2004). In +500 kam es zu einer Herunterregulierung von MIF, die in Zusammenhang mit der Suppression von PDGF stehen könnte. Ein weiteres PDGF abhängig exprimiertes Gen ist p57 (Xu, Wang et al. 2001). Es wird in glatten Muskelzellen gebildet und ist ein negativer Regulator der Proliferation, dessen Überexpression die Neointimabildung nach Ballondilatation der Arteria carotis des Hasen vermindern kann (Takagi 2002). P57 ist in +500 herunterreguliert, am ehesten verursacht durch die Hemmung von PDGF durch Imatinib. Daher ist in diesem Zusammenhang wegen der Herunterregulierung von p57 eher

eine Förderung der Neointimabildung zu erwarten, wie sie in der vorliegenden Untersuchung beschrieben wird. In Einklang mit der Theorie, Imatinib könnte nur im frühen Stadium einen hemmenden Einfluß ausüben (Myllarniemi, Frosen et al. 1999; Leppanen, Rutanen et al. 2004) zeigte sich nach 7 Tagen eine Hochregulierung aller Gene in +500 im Vergleich zu OP. Diese Beobachtung spricht für das postulierte escape Phänomen, bei dem es nicht nur zu einer Aufhebung des suppressiven Effekts von Imatinib kommt, sondern zu einer eventuellen überschießenden Gegenregulierung. Das Phänomen zeigt sich z.B. an der Regulierung von PDGF- $\beta$ , der zuerst supprimiert war, um dann nach 7 Tagen wieder anzusteigen. Auch andere Gene der Proliferation, wie die MAPK3, die nach Ballonverletzung der Rattenaorta exprimiert wird (Ge, Zeng et al. 2003) und durch PDGF reguliert wird (Kingsley and Plopper 2005), zeigten dieses Expressionsprofil. Ge et al. beschreiben die stärkste Hochregulierung 3 Tage nach der Intervention, was sich in der Gruppe OP in der vorliegenden Arbeit deutlich nachvollziehen ließen. In +500 kam es erst nach 7 Tagen zu einem deutlichen Anstieg, der dann allerdings die selben Werte wie in OP erreichte. Die erhöhte, verzögerte Expression von MAPK3 könnte ein Indikator für den Verlust der Hemmung von PDGF durch Imatinib sein. Insgesamt also belegt die Regulierung von PDGF und PDGF abhängiger Gene die Wirksamkeit von Imatinib im vorliegenden Modell.

#### **4.3.2 Einfluß von Imatinib auf die Expression von Genen der extrazellulären Matrix**

Neben der Proliferation glatter Muskelzellen wird auch der extrazellulären Matrix eine große Rolle bei der Neointimabildung zugeschrieben. Der Prozess der Bildung der extrazellulären Matrix beginnt bereits in der ersten Woche nach Ballonverletzung (Boyd, Kniep et al. 1988) und deckt sich mit dem Zeitpunkt der Hochregulierung vieler EZM-Genen in der vorliegenden Genexpression.

Regulierte Gene der extrazellulären Matrix sind z.B. cathepsin K, das durch Abbau der Matrix die Migration glatter Muskelzellen erleichtern soll (Sukhova, Shi et al. 1998) und die MMP14, die zum Zeitpunkt 7 Tage in der Neointimabildung beschrieben wurde (Sluijter, Verloop et al. 2005). Beide Gene waren nach 3 Tagen in +500 herunter reguliert um dann nach 7 Tagen im Sinne des escape Phänomens herauf reguliert zu werden. Die MMP14 trägt zur Proliferation glatter Muskelzellen nach Gefäßverletzung bei (Newby 2005). Aktiviert wird die MMP14 zum einen durch die bereits unter 4.3.1 beschriebene MAPK3 (Tanimura, Asato et al. 2003), zum anderen durch die pc5 (Sluijter, Verloop et al. 2005). Die pc5 aktiviert die MMP14 nicht nur direkt sondern zusätzlich auch über die TGF- $\beta$  Signalkaskade (Sluijter, Verloop et al. 2005). TGF- $\beta$  amplifiziert in Rückkopplung pc5 und damit die MMP-14 (Stawowy, Margeta et al. 2004). In Einklang mit diesem Wirkmechanismus zeigte sich nach 7



Untersuchung seine Expression nach Operation stabil; dennoch zeigte sich auch für dieses Gen eine deutliche Herunterregulierung durch Imatinib nach 3 Tagen.

Das beschriebene escape Phänomen sorgte auch nach 14 Tagen noch für proliferative Aktivität. Dies zeigt die Expression des *angiotensin converting enzymes* das Angiotensin I in Angiotensin II spaltet (Saito, Muto et al. 2003) und damit eine proliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen nach Ballonverletzung ausübt (Ohishi, Ueda et al. 1997). Versuche mit Agenzien, die die Bindung von Angiotensin II an seinen Rezeptor hemmen, beschreiben eine Reduktion der Restenose (Meurice, Bauters et al. 2001). Das ACE zeigte im vorliegenden Modell erst nach 14 Tagen in +500 eine deutliche Abweichung vom Kontrollwert. In der OP Gruppe fand sich, anders als in der Literatur beschrieben, keine signifikante Erhöhung.

#### **4.4 Einfluß von Imatinib auf die Stammzellrekrutierung und Differenzierung**

##### **4.4.1 Rolle von SDF-1 und c-kit**

Neben glatten Muskelzellen aus der Media (Clowes, Reidy et al. 1983) sollen auch hämatopoetische Progenitorzellen an der Neointimabildung beteiligt sein (Sata, Saiura et al. 2002). Nach Gefäßverletzung kommt es zur Apoptose in der Gefäßmedia, die die Expression des Chemokines SDF-1 in glatten Muskelzellen der Media fördert. Über die Bindung von SDF-1 an seinen Rezeptor CXCR-4 kommt es zur Rekrutierung von PDGF-R<sup>+</sup>c-kit<sup>-</sup>SCA<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> Progenitorzellen, die unter dem Einfluß von PDGF-β zu glatten Muskelzellen ausdifferenzieren (Zernecke, Schober et al. 2005). Da im vorliegenden Modell eine apoptotische Reaktion in der Media beschrieben wurde (Sata, Maejima et al. 2000) und gleichzeitig ein orthograde Blutfluß wiederhergestellt wird, sind die Voraussetzungen für die Progenitorzellrekrutierung durch SDF-1 gegeben. Es zeigten sich sowohl in OP als auch in +500 SDF-1<sup>+</sup> Zellen sowohl in der Media als auch in der Neointima als Anzeichen der Progenitorzellrekrutierung. Zernecke et al. beschreiben SDF-1 als relevant vor allem im Zusammenhang mit der Rekrutierung, während sie die Differenzierung der adhärenz Zellen eher PDGF-β zuschreiben. Somit müsste die Behandlung mit Imatinib durch Blockade des PDGF-R zwar zu einer weniger differenzierten Neointima mit weniger sm-actin positiven Zellen führen, aber nicht notwendigerweise zu weniger Neointimabildung, da sich die Menge der rekrutierten Zellen nicht verändert. Allerdings erklärt eine geringere Differenzierung durch die Hemmung von PDGF nicht die beobachtete verstärkte Neointimabildung in +500. Geht man davon aus, dass es, wie in der Genexpression beschrieben, ab 7 Tagen zu einem überschießenden PDGF-abhängigen Effekt durch Wirkungsverlust von Imatinib kommt, dürfte man unter einem dann verstärkten Differenzierungsdruck höchstens eine gleichstarke Neointimabildung erwarten.

Während Zerneck et al. die Rekrutierung von PDGF-R<sup>+</sup>c-kit<sup>-</sup>SCA<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> Progenitorzellen in Abhängigkeit von SDF-1 beschreiben, identifizieren Sata et al. und Hibbert et al. c-kit<sup>+</sup>SCA<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> Vorläuferzellen als die Zellen, die an den Ort einer Gefäßverletzung adhären und unter Verlust von c-kit in glatte Muskelzellen ausdifferenzieren (Sata, Saiura et al. 2002; Hibbert, Chen et al. 2004). Daher soll die immunhistochemische Färbung auf c-kit, zusammen mit den Ergebnissen der sm-actin Färbung, klären, ob ein Unterschied in der Anzahl c-kit<sup>+</sup> Zellen zwischen OP und +500 eine Beurteilung des Reifegrads der Neointima ermöglicht, der als Wirkung von Imatinib gedeutet werden könnte. Während sich in KO keine c-kit<sup>+</sup> Zellen nachweisen ließen, stieg ihre Zahl nach 7 Tagen in OP deutlich an, um nach 14 Tagen wieder rückläufig zu sein, eine Beobachtung, die sich am ehesten als Rekrutierung mit anschließender Differenzierung werten lässt. In +500 war die nach 7 Tagen beobachtete Zahl positiver Zellen erheblich größer als in OP, ein Unterschied der nach 14 Tagen noch deutlicher war. Zusammen mit der nur geringen Anfärbbarkeit für sm-actin könnte es bedeuten, dass es sich in +500 um undifferenziertere Neointima handelt. Ein Hinweis darauf, dass es sich bei den c-kit<sup>+</sup> Zellen tatsächlich um Vorläuferzellen glatter Muskelzellen handelt, findet sich in ihrer Morphologie. Hibbert et al. beschreiben für die c-kit<sup>+</sup> Zellen der restenostischen Läsion eine sternförmige Morphologie, die sich auch im vorliegenden Modell fand. Gleichzeitig konnten Hibbert et al. eine Ko-Expression von sm-actin für eben diese Zellen nachweisen und folgerten unter anderem daraus das Ausreifen dieser Zellen zu SMCs (Hibbert, Chen et al. 2004). Die Tatsache, dass sich im vorliegenden Modell sm-actin in +500 nicht streng einzelnen Zellen zuordnen ließ wie in OP, spricht zusätzlich für die undifferenzierte Natur der Zellen. Die signifikant hohe Anzahl c-kit positiver Zellen in +500 nach 14 Tagen könnte zwei Erklärungen haben: Entweder kommt es zu einer anhaltenden Rekrutierung von Zellen bei fehlender Differenzierung, oder die primär rekrutierten, nicht differenzierten Zellen proliferieren. Beide Hypothesen könnten eine Erklärung dafür liefern, weshalb sich in +500 eine verstärkte Neointimabildung zeigt. Da die Reendothelialisierung, gemessen an der Anzahl von CD31<sup>+</sup> Zellen, nach 14 Tagen in +500 ihren Abschluss gefunden hatte, ist eher von einer ortsständigen Proliferation als von einer weiteren Rekrutierung auszugehen. Die Therapie mit Imatinib hat also nicht zu einer Reduktion in der Anzahl c-kit<sup>+</sup> Zellen geführt, aber unter Umständen ihre Differenzierung und Proliferation beeinflusst.

#### **4.4.2 Rolle von Alk1**

Die Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen in der Neointimabildung wird unter anderem von TGF- $\beta$  beeinflusst, das im vorliegenden Modell nach 7 Tagen in +500

hochreguliert war (Stouffer and Owens 1994). Dabei ist die Wirkung von TGF- $\beta$  abhängig von seinen Rezeptoren. Der Rezeptor Alk5 bewirkt eine Hemmung der Proliferation und eine Förderung der Differenzierung von Progenitorzellen, während die Aktivierung des Rezeptors Alk1 genau gegenteilig wirkt (Goumans, Valdimarsdottir et al. 2003; Sinha, Hoofnagle et al. 2004). Alk1 war nach 7 Tagen in +500 hochreguliert. Gleichzeitig ließ sich immunhistochemisch v.a. nach 7 Tagen eine größere Zahl von Alk1<sup>+</sup> Zellen in +500 als in OP nachweisen. Unter Therapie mit Imatinib könnte die Hochregulierung von Alk1 zu einer geringeren Differenzierung und einer verstärkten Proliferation c-kit<sup>+</sup> rekrutierter Progenitorzellen führen. Damit könnte die Expression von Alk1 eine mögliche Erklärung für die unter Imatinib beobachtete verstärkte Bildung einer c-kit<sup>+</sup> reichen und sm-actin armen, morphologisch unreifen Neointima liefern.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Restenose durch Neointimabildung nach PTCA und Stentimplantation der Koronarien stellt mit einer Häufigkeit von 30% die Hauptkomplikation der interventionellen Kardiologie dar. Nach PTCA kommt es, unter Einwirkung von PDGF, durch Migration und Proliferation glatter Muskelzellen aus der Media zur Neointimabildung. Zusätzlich adhären c-kit<sup>+</sup> Progenitorzellen an die Läsion und tragen durch ihre Differenzierung zu glatten Muskelzellen zur Neointimabildung bei. Durch eine Drahtverletzung mit anschließender Wiederherstellung eines orthograden Blutflusses wurde in der A. femoralis von 129S1/SvIMJ Mäusen eine glattmuskuläre Neointima unter Beteiligung rekrutierter Progenitorzellen induziert. Mit dem Ziel, einerseits die Neointimabildung zu hemmen und andererseits einen tieferen Einblick in die PDGF unabhängigen Prozesse der Neointimabildung zu gewinnen, erhielten die Hälfte der Tiere das Medikament Imatinib. Imatinib ist ein Tyrosinkinase Inhibitor, der selektiv sowohl den PDGF Rezeptor als auch c-kit hemmt. Unter Pharmakoherapie zeigte sich eine dosisabhängige Zunahme der Neointimabildung nach 14 Tagen. In der durchgeführten Genexpressionsanalyse waren Gene der Proliferation nach 3 Tagen Therapie herunter reguliert, nach 7 Tagen herauf, so dass nach einer anfänglichen Hemmung durch Imatinib von einem anschließenden Wirkungsverlust, hier als escape Phänomen bezeichnet, mit überschießender Gegenregulierung auszugehen ist. Dies zeigte sich deutlich an der Regulierung von PDGF und PDGF assoziierten Gene, die die Wirksamkeit von Imatinib belegt. Zusätzlich zeigte sich eine Regulierung einer Vielzahl von Genen der extrazellulären Matrix (EZM), die in bisher noch nicht publiziertem Umfang einen Überblick über die Rolle der EZM in der Neointimabildung erlaubt. Nach 7 Tagen fand sich unter Imatinib die Hochregulierung von Alk1, einem bisher in der Neointima noch nicht beschriebenen TGF- $\beta$  Rezeptor. Die Aktivierung von Alk1 fördert die Proliferation und hemmt die Differenzierung von Progenitorzellen in glatte Muskelzellen. Alk1 ließ sich, ebenso wie c-kit und SDF-1, ein in der Progenitorzellrekrutierung impliziertes Chemokin, immunhistochemisch nachweisen. Die Anfärbbarkeit für c-kit war in der Imatinibgruppe signifikant größer, bei gleichzeitig verminderter Anfärbbarkeit für sm-actin. Daher könnte eine geringere Differenzierung rekrutierter Progenitorzellen in glatte Muskelzellen und ihre vermehrte Proliferation, eventuell vermittelt durch Alk1, eine Ursache der verstärkten Neointimabildung unter Imatinib Therapie sein. Somit gelang es in der vorliegenden Untersuchung erstmals, Vorgänge der Restenose in einer gewissen Unabhängigkeit von PDGF zu untersuchen und damit die Progenitorzelldifferenzierung und die Bildung der EZM als weitere Schlüsselfaktoren der Neointimabildung besser zu verstehen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Arakawa, T., D. A. Yphantis, J. W. Lary, L. O. Narhi, H. S. Lu, S. J. Prestrelski, C. L. Clogston, K. M. Zsebo, E. A. Mendiaz and J. Wypych (1991). "Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure." *J Biol Chem* **266**(28): 18942-8.
- Arar, C., J. C. Gaudin, L. Capron and A. Legrand (1998). "Galectin-3 gene (LGALS3) expression in experimental atherosclerosis and cultured smooth muscle cells." *FEBS Lett* **430**(3): 307-11.
- Asahara, T., C. Bauters and C. Pastore (1995). "Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries." *Circulation* **91**: 2793-2801.
- Assoian, R. K., G. R. Grotendorst and D. M. Miller (1984). "Cellular transformation by coordinate action of three peptide growth factors in human platelets." *Nature* **309**: 804-806.
- Auge, N., F. Maupas-Schwalm, M. Elbaz, J. C. Thiers, A. Waysbort, S. Itoharu, H. W. Krell, R. Salvayre and A. Negre-Salvayre (2004). "Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation." *Circulation* **110**(5): 571-8.
- Balmer, F., M. Rotter, M. Togni, D. Pfiffner, A. M. Zeiher, W. Maier and B. Meier (2005). "Percutaneous coronary interventions in Europe 2000." *Int J Cardiol* **101**(3): 457-63.
- Bauters, C. and J. M. Isner (1997). "The biology of restenosis." *Prog Cardiovasc Dis* **40**(2): 107-16.
- Bennett, M. R. and M. O'Sullivan (2001). "Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy." *Pharmacol Ther* **91**(2): 149-66.
- Boyd, C. D., A. C. Kniep, R. A. Pierce, C. Karboski, D. C. Miller, M. I. Parker, J. W. Mackenzie, J. Rosenbloom and G. E. Scott (1988). "Increased elastin mRNA levels associated with surgically induced intimal injury." *Connect Tissue Res* **18**(2): 65-78.
- Buchdunger, E., C. L. Cioffi, N. Law, D. Stover, S. Ohno-Jones, B. J. Druker and N. B. Lydon (2000). "Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors." *J Pharmacol Exp Ther* **295**(1): 139-45.
- Bültmann, B. D., C. J. Kirkpatrick, A. Roessner and J. Schneider (2001). koronare Herzkrankheit. *Pathologie*. D. Böcker, Heitz, Urban&Fischer: 449-50.
- Carmeliet, P., L. Moons and D. Collen (1998). "Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis." *Cardiovasc Res* **39**(1): 8-33.
- Cercek, B., M. Fishbein and J. S. Forrester (1990). "Induktion of insulin-like growth factor I messenger RNA in rat aorta after balloon denudation." *Circ Res* **66**: 1755-1760.
- Chen, Z., M. Sakuma, A. C. Zago, X. Zhang, C. Shi, L. Leng, Y. Mizue, R. Bucala and D. Simon (2004). "Evidence for a role of macrophage migration inhibitory factor in vascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(4): 709-14.
- Choy, D. S. (1988). "History of lasers in medicine." *Thorac Cardiovasc Surg* **36 Suppl 2**: 114-7.
- Clowes, A. W., M. A. Reidy and M. M. Clowes (1983). "Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium." *Lab Invest* **49**: 327-333.
- Deguchi, J., T. Namba, H. Hamada, T. Nakaoka, J. Abe, O. Sato, T. Miyata, M. Makuuchi, K. Kurokawa and Y. Takuwa (1999). "Targeting endogenous platelet-derived growth factor B-chain by adenovirus-mediated gene transfer potently inhibits in vivo smooth muscle proliferation after arterial injury." *Gene Ther* **6**(6): 956-65.
- Ellis, S., M. B. Effron and H. K. Gold (1999). "Acute platelet inhibition with abciximab does not reduce in-stent restenosis (ERASER study)." *Circulation* **100**: 799 – 806
- Farb, A., P. F. Heller, S. Shroff, L. Cheng, F. D. Kolodgie, A. J. Carter, D. S. Scott, J. Froehlich and R. Virmani (2001). "Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent." *Circulation* **104**(4): 473-9.
- Ferns, G. A., E. W. Raines, K. H. Sprugel, A. S. Motani, M. A. Reidy and R. Ross (1991). "Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF." *Science* **253**(5024): 1129-32.
- Fingerle, J., R. Johnson and A. W. Clowes (1989). "Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid arterie." *Proc Natl Acad Sci U S A*(86): 8412-8416.
- Fischman, D. L., M. B. Leon, D. S. Baim, R. A. Schatz, M. P. Savage, I. Penn, K. Detre, L. Veltri, D. Ricci and M. Nobuyoshi (1994). "A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators." *N Engl J Med* **331**(8): 496-501.
- Gaspardone, A. and F. Versaci (2005). "Coronary stenting and inflammation." *Am J Cardiol* **96**(12A): 65L-70L.
- Ge, H., D. Y. Zeng, W. H. Zhao and G. X. Qi (2003). "[Expression of mitogen-activated protein kinase in vascular tissues after coronary artery balloon injury in rat]." *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* **15**(8): 469-71.

- Ge, J., C. Shen, C. Liang, L. Chen, J. Qian and H. Chen (2005). "Elevated matrix metalloproteinase expression after stent implantation is associated with restenosis." *Int J Cardiol*.
- Goumans, M. J., G. Valdimarsdottir, S. Itoh, F. Lebrin, J. Larsson, C. Mummery, S. Karlsson and P. ten Dijke (2003). "Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling." *Mol Cell* **12**(4): 817-28.
- Grise, M. A., V. Massullo, S. Jani, J. J. Popma, R. J. Russo, R. A. Schatz, E. M. Guarneri, S. Steuterman, D. A. Cloutier, M. B. Leon, P. Tripuraneni and P. S. Teirstein (2002). "Five-year clinical follow-up after intracoronary radiation: results of a randomized clinical trial." *Circulation* **105**(23): 2737-40.
- Gruentzig A, S. A., Siegenthaler W. (1979). "Nonoperative dilation of coronary artery stenosis: persutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA)." *N Engl J Med* **1979** **301**: 61-8.
- Guiteras, V. P., M. G. Bourassa and P. R. David (1987). "Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: the Montreal Heart Institute experience." *Am J Cardiol* **60**: 50B-55B.
- Hansen, D. D., D. C. Auth, M. Hall and J. L. Ritchie (1988). "Rotational endarterectomy in normal canine coronary arteries: preliminary report." *J Am Coll Cardiol* **11**(5): 1073-7.
- Heldin, C. H. (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." *Cell* **80**(2): 213-23.
- Heldin, C. H., A. Ertlund, C. Rorsman and L. Ronnstrand (1989). "Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation." *J Biol Chem* **264**(15): 8905-12.
- Henrich, D., P. Hahn, M. Wahl, K. Wilhelm, E. Dernbach, S. Dimmeler and I. Marzi (2004). "Serum derived from multiple trauma patients promotes the differentiation of endothelial progenitor cells in vitro: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165." *Shock* **21**(1): 13-6.
- Herold, G. (2005). *Innere Medizin*, Dr. med. Gerd Herold.
- Hibbert, B., Y. X. Chen and E. R. O'Brien (2004). "c-kit-immunopositive vascular progenitor cells populate human coronary in-stent restenosis but not primary atherosclerotic lesions." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(2): H518-24.
- Hinohara, T., G. C. Robertson, M. R. Selmon, J. W. Vetter, M. H. Rowe, L. J. Braden, B. J. McAuley, D. J. Sheehan and J. B. Simpson (1992). "Restenosis after directional coronary atherectomy." *J Am Coll Cardiol* **20**: 623-632.
- Hojo, Y., U. Ikeda, T. Katsuki, O. Mizuno, H. Fukazawa, K. Kurosaki, H. Fujikawa and K. Shimada (2000). "Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis." *Heart* **84**: 83-87.
- Jacobsen, F. W., J. R. Keller, F. W. Ruscetti, O. P. Veiby and S. E. Jacobsen (1995). "Direct synergistic effects of IL-4 and IL-11 on proliferation of primitive hematopoietic progenitor cells." *Exp Hematol* **23**(9): 990-5.
- Jenkins, G. M., M. T. Crow, C. Bilato, Y. Gluzband, W. S. Ryu, Z. Li, W. Stetler-Stevenson, C. Nater, J. P. Froehlich, E. G. Lakatta and L. Cheng (1998). "Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries." *Circulation* **97**(1): 82-90.
- Kastrati, A., H. Schühlen, J. Hausleiter, H. Walter, E. Zitzmann-Roth, M. Hadamitzky, S. Elezi, K. Ulm, J. Dirschinger, F. J. Neumann and A. Schomig (1997). "Restenosis after coronary stent placement and randomization to a 4-week combined antiplatelet or anticoagulant therapy: six-month angiographic follow-up of the Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen (ISAR) Trial." *Circulation* **96**(2): 462-7.
- Kingsley, K. and G. E. Plopper (2005). "Platelet-derived growth factor modulates rat vascular smooth muscle cell responses on laminin-5 via mitogen-activated protein kinase-sensitive pathways." *Cell Commun Signal* **3**(1): 2.
- Kolibaba, K. S. and B. J. Druker (1997). "Protein tyrosine kinases and cancer." *Biochim Biophys Acta* **1333**(3): F217-48.
- Komatsu, R., M. Ueda, T. Naruko, A. Kojima and A. E. Becker (1998). "Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses." *Circulation* **98**(3): 224-33.
- Kong, D., L. G. Melo, M. Gnecci, L. Zhang, G. Mostoslavsky, C. C. Liew, R. E. Pratt and V. J. Dzau (2004). "Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries." *Circulation* **110**(14): 2039-46.
- Konishi, A., T. Aizawa, A. Mohan, V. A. Korshunov and B. C. Berk (2004). "Hydrogen peroxide activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* **279**(27): 28766-70.
- Lemoli, R. M., M. Fogli, A. Fortuna and S. Tura (1995). "Interleukin-11 (IL-11) and IL-9 counteract the inhibitory activity of transforming growth factor beta 3 (TGF-beta 3) on human primitive hematopoietic progenitor cells." *Haematologica* **80**(1): 5-12.
- Leppanen, O., J. Rutanen, M. O. Hiltunen, T. T. Rissanen, M. P. Turunen, T. Sjoblom, J. Bruggen, G. Backstrom, M. Carlsson, E. Buchdunger, D. Bergqvist, K. Alitalo, C. H. Heldin, A. Ostman and S. Yla-

- Herttua (2004). "Oral imatinib mesylate (STI571/gleevec) improves the efficacy of local intravascular vascular endothelial growth factor-C gene transfer in reducing neointimal growth in hypercholesterolemic rabbits." *Circulation* **109**(9): 1140-1146.
- Li, Z., S. Moore and M. Z. Alavi (1995). "Mitogenic factors released from smooth muscle cells are responsible for neointimal cell proliferation after balloon catheter deendothelialization." *Exp Mol Pathol* **63**(2): 77-86.
- Liistro, F., G. Stankovic, C. Di Mario, T. Takagi, A. Chieffo, S. Moshiri, M. Montorfano, M. Carlino, C. Briguori, P. Pagnotta, R. Albiero, N. Corvaja and A. Colombo (2002). "First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome." *Circulation* **105**(16): 1883-6.
- Lindner, V., D. A. Lappi, A. Baird, R. A. Majack and M. A. Reidy (1991). "Role of the basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation." *Circ Res* **68**: 106-113.
- Majesky, M. W., S. M. Schwartz and M. M. Clowes (1987). "Heparin regulates smooth muscle S phase entry in the injured-rat carotid artery." *Circ Res* **61**: 296-300.
- MERCATOR (1992). "Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty? Results of the MERCATOR study: a multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. Multicenter European Research Trial with Cilazapril after Angioplasty to Prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis (MERCATOR) Study Group." *Circulation* **86**(1): 100-10.
- Meurice, T., C. Bauters, X. Hermant, V. Codron, E. VanBelle, E. P. Mc Fadden, J. Lablanche, M. E. Bertrand and P. Amouyel (2001). "Effect of ACE inhibitors on angiographic restenosis after coronary stenting (PARIS): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Lancet* **357**(9265): 1321-4.
- Mintz, G. S., J. J. Popma, A. D. Pichard, K. M. Kent, L. F. Satler, C. Wong, M. K. Hong, J. A. Kovach and M. B. Leon (1996). "Arterial remodeling after coronary angioplasty: a serial intravascular ultrasound study." *Circulation* **94**(1): 35-43.
- Miyata, M., S. Biro, H. Kaieda, H. Eto, K. Orihara, T. Kihara, H. Obata, N. Matsushita, T. Matsuyama and C. Tei (2001). "Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury." *Circulation* **104**(12): 1407-12.
- Monks, D., V. Lange, R. E. Silber, T. Markert, U. Walter and V. Nehls (1998). "Expression of cGMP-dependent protein kinase I and its substrate VASP in neointimal cells of the injured rat carotid artery." *Eur J Clin Invest* **28**(5): 416-23.
- Moses, J. W., M. B. Leon, J. J. Popma, P. J. Fitzgerald, D. R. Holmes, C. O'Shaughnessy, R. P. Caputo, D. J. Kereiakes, D. O. Williams, P. S. Teirstein, J. L. Jaeger and R. E. Kuntz (2003). "Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery." *N Engl J Med* **349**(14): 1315-23.
- Myllarniemi, M., J. Frosen, L. G. Calderon Ramirez, E. Buchdunger, K. Lemstrom and P. Hayry (1999). "Selective tyrosine kinase inhibitor for the platelet-derived growth factor receptor in vitro inhibits smooth muscle cell proliferation after reinjury of arterial intima in vivo." *Cardiovasc Drugs Ther* **13**(2): 159-68.
- Nangia-Makker, P., Y. Honjo, R. Sarvis, S. Akahani, V. Hogan, K. J. Pienta and A. Raz (2000). "Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis." *Am J Pathol* **156**(3): 899-909.
- Newby, A. C. (2005). "Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates." *Cardiovasc Res*.
- Nikol, S., J. M. Isner, J. G. Pickering, M. Kearney, G. Leclerc and L. Weir (1992). "Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Is Increased in Human Vascular Restenosis Lesions." *J Clin Invest* **90**: 1582-1592.
- Ohishi, M., M. Ueda, H. Rakugi, A. Okamura, T. Naruko, A. E. Becker, K. Hiwada, A. Kamitani, K. Kamide, J. Higaki and T. Ogihara (1997). "Upregulation of angiotensin-converting enzyme during the healing process after injury at the site of percutaneous transluminal coronary angioplasty in humans." *Circulation* **96**(10): 3328-37.
- Peters, S., M. Trummel, W. Meyners, B. Koehler and K. Westermann (2005). "Valsartan versus ACE inhibition after bare metal stent implantation--results of the VALVACE trial." *Int J Cardiol* **98**(2): 331-5.
- Powell, J. S., R. K. Muller, M. Rouge, H. Kuhn, F. Hefti and H. R. Baumgartner (1990). "The proliferative response to vascular injury is suppressed by angiotensin-converting enzyme inhibition." *J Cardiovasc Pharmacol* **16 Suppl 4**: S42-9.
- Puel, J., F. Joffre, H. Rousseau, J. L. Gueronprez, B. Lancelin, M. C. Morice, B. Valeix, C. Imbert and J. P. Bounhoure (1987). "[Self-expanding coronary endoprosthesis in the prevention of restenosis following transluminal angioplasty. Preliminary clinical study]." *Arch Mal Coeur Vaiss* **80**(8): 1311-2.
- Roessner, A., C. J. Kirkpatrick and J. Schneider (2001). Atherosklerose. *Pathologie*. W. Böcker, H. Denk and P. U. Heitz, Urban&Fischer.
- Rogers, C., F. G. Welt, M. J. Karnovsky and E. R. Edelman (1996). "Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits: Coupled inhibitory effects of heparin." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**: 1312-1318.

- Rutanen, J., A. M. Turunen, M. Teittinen, T. T. Rissanen, T. Heikura, J. K. Koponen, M. Gruchala, M. Inkala, S. Jauhiainen, M. O. Hiltunen, M. P. Turunen, S. A. Stacker, M. G. Achen and S. Yla-Herttuala (2005). "Gene transfer using the mature form of VEGF-D reduces neointimal thickening through nitric oxide-dependent mechanism." Gene Ther **12**(12): 980-7.
- Ryan, S. T., V. E. Kotliansky, P. J. Gotwals and V. Lindner (2003). "Transforming Growth Factor-Beta-Dependent Events in Vascular Remodeling following Arterial Injury." J Vasc Res **40**(1): 37-46.
- Saito, K., T. Muto, Y. Tomimori, S. Imajo, H. Maruoka, T. Tanaka, K. Yamashiro and Y. Fukuda (2003). "Mouse mast cell protease-1 cleaves angiotensin I to form angiotensin II." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 773-7.
- Sata, M., Y. Maejima, F. Adachi, K. Fukino, A. Saiura, S. Sugiura, T. Aoyagi, Y. Imai, H. Kurihara, K. Kimura, M. Omata, M. Makuuchi, Y. Hirata and R. Nagai (2000). "A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia." J Mol Cell Cardiol **32**(11): 2097-104.
- Sata, M., A. Saiura, A. Kunisato, A. Tojo, S. Okada, T. Tokuhisa, H. Hirai, M. Makuuchi, Y. Hirata and R. Nagai (2002). "Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis." Nat Med **8**(4): 403-9.
- Savage, D. G. and K. H. Antman (2002). "Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy." N Engl J Med **346**(9): 683-93.
- Savage, M. P., D. L. Fischman, R. Rake, M. B. Leon, R. A. Schatz, I. Penn, M. Nobuyoshi, J. Moses, J. Hirshfeld, R. Heuser, D. Baim, M. Cleman, J. Brinker, S. Gebhardt and S. Goldberg (1998). "Efficacy of coronary stenting versus balloon angioplasty in small coronary arteries. Stent Restenosis Study (STRESS) Investigators." J Am Coll Cardiol **31**(2): 307-11.
- Scandura, J. M., P. Boccuni, J. Massague and S. D. Nimer (2004). "Transforming growth factor beta-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(42): 15231-6.
- Schampaert, E., J. W. Moses, J. Schofer, M. Schluter, A. H. Gershlick, E. A. Cohen, D. A. Palisaitis, G. Breithardt, D. J. Donohoe, H. Wang, J. J. Popma, R. E. Kuntz and M. B. Leon (2006). "Sirolimus-eluting stents at two years: a pooled analysis of SIRIUS, E-SIRIUS, and C-SIRIUS with emphasis on late revascularizations and stent thromboses." Am J Cardiol **98**(1): 36-41.
- Schlumberger, W., M. Thie, J. Rauterberg and H. Robenek (1991). "Collagen synthesis in cultured aortic smooth muscle cells. Modulation by collagen lattice culture, transforming growth factor- $\beta$ 1, and epidermal growth factor." Arterioscler Thromb **11**: 1660-1666.
- Schober, A., S. Knarren, M. Lietz, E. A. Lin and C. Weber (2003). "Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **108**(20): 2491-7.
- Schomig, A., F. J. Neumann, A. Kastrati, H. Schühlen, R. Blasini, M. Hadamitzky, H. Walter, E. M. Zitzmann-Roth, G. Richardt, E. Alt, C. Schmitt and K. Ulm (1996). "A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents." N Engl J Med **334**(17): 1084-9.
- Schwartz, R. S., D. R. Holmes and J. E. Topol (1991). "The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms." J Am Coll Cardiol **20**: 1284-1293.
- Serruys, P. W., P. de Jaegere, F. Kiemeneij, C. Macaya, W. Rutsch, G. Heyndrickx, H. Emanuelsson, J. Marco, V. Legrand and P. Materne (1994). "A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group." N Engl J Med **331**(8): 489-95.
- Serruys, P. W., B. H. Strauss, K. J. Beatt, M. E. Bertrand, J. Puel, A. F. Rickards, B. Meier, J. J. Goy, P. Vogt and L. Kappenberger (1991). "Angiographic follow-up after placement of a self-expanding coronary-artery stent." N Engl J Med **324**(1): 13-7.
- Serruys, P. W., B. van Hout, H. Bonnier, V. Legrand, E. Garcia, C. Macaya, E. Sousa, W. van der Giessen, A. Colombo, R. Seabra-Gomes, F. Kiemeneij, P. Ruygrok, J. Ormiston, H. Emanuelsson, J. Fajadet, M. Haude, S. Klugmann and M. A. Morel (1998). "Randomised comparison of implantation of heparin-coated stents with balloon angioplasty in selected patients with coronary artery disease (Benestent II)." Lancet **352**(9129): 673-81.
- Sinha, S., M. H. Hoofnagle, P. A. Kingston, M. E. McCanna and G. K. Owens (2004). "Transforming growth factor-beta1 signaling contributes to development of smooth muscle cells from embryonic stem cells." Am J Physiol Cell Physiol **287**(6): C1560-8.
- Sluijter, J. P., R. E. Verloop, W. P. Pulsken, E. Velema, J. M. Grimbergen, P. H. Quax, M. J. Goumans, G. Pasterkamp and D. P. de Kleijn (2005). "Involvement of furin-like proprotein convertases in the arterial response to injury." Cardiovasc Res **68**(1): 136-43.
- Smith, J. D., S. R. Bryant, L. L. Couper, C. P. Vary, P. J. Gotwals, V. E. Kotliansky and V. Lindner (1999). "Soluble transforming growth factor-beta type II receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth." Circ Res **84**: 1212-1222.

- Statistisches Bundesamt (10/2005). Erkrankungen des Kreislaufsystems weiterhin Haupttodesursache, statistisches Bundesamt.
- Stawowy, N. B., C. Margeta, H. Kallisch, N. Seidah, M. Chretien, E. Fleck and K. Graf (2004). "Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF- $\beta$ 1 involves furin-convertingase." Cardiovascular Research **63**: 87-97.
- Stawowy, P. and E. Fleck (2005). "Proprotein convertases furin and PC5: targeting atherosclerosis and restenosis at multiple levels." J Mol Med **83**(11): 865-75.
- Stawowy, P., H. Meyborg, D. Stibenz, N. B. Stawowy, M. Roser, U. Thanabalasingam, J. P. Veinot, M. Chretien, N. G. Seidah, E. Fleck and K. Graf (2005). "Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis." Circulation **111**(21): 2820-7.
- Stouffer, G. A. and G. K. Owens (1994). "TGF- $\beta$  promotes proliferation of cultured SMC via both PDGF-AA-dependent and PDGF-AA-independent mechanisms." J Clin Invest **93**(5): 2048-55.
- Sukhova, G. K., G. P. Shi, D. I. Simon, H. A. Chapman and P. Libby (1998). "Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells." J Clin Invest **102**(3): 576-83.
- Takagi, Y. (2002). "Adenovirus-mediated overexpression of a cyclin-dependent kinase inhibitor, p57Kip2, suppressed vascular smooth muscle cell proliferation." Hokkaido Igaku Zasshi **77**(3): 221-30.
- Takai, S. and M. Miyazaki (2002). "Effect of chymase inhibitor on vascular proliferation." Jpn J Pharmacol **90**(3): 223-7.
- Tanimura, S., K. Asato, S. H. Fujishiro and M. Kohno (2003). "Specific blockade of the ERK pathway inhibits the invasiveness of tumor cells: down-regulation of matrix metalloproteinase-3/-9/-14 and CD44." Biochem Biophys Res Commun **304**(4): 801-6.
- Tchougounova, E., A. Lundquist, I. Fajardo, J. O. Winberg, M. Abrink and G. Pejler (2005). "A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloproteinase-9 and pro-matrix metalloproteinase-2." J Biol Chem **280**(10): 9291-6.
- Thyberg, J., U. Hedin and M. Sjölund (1990). "Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells." Arteriosclerosis **10**: 966-990.
- Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." Cell **61**(2): 203-12.
- Van Belle, E., C. Bauters, T. Asahara and J. M. Isner (1998). "Endothelial regrowth after arterial injury: from vascular repair to therapeutics." Cardiovasc Res **38**(1): 54-68.
- Van Belle, E., C. Bauters and J. M. Isner (2001). The biology of restenosis. Textbook of cardiovascular medicine. J. E. Topol. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 1993-2015.
- Van Belle, E., G. Rosey, C. Bauters and J. M. Lablanche (2004). "[Restenosis and vascular response after angioplasty: physiopathological data]." Pathol Biol (Paris) **52**(4): 176-9.
- Versaci, F., A. Gasparone, F. Tomai, F. Ribichini, P. Russo, I. Proietti, A. S. Ghini, V. Ferrero, L. Chiariello, P. A. Gioffre, F. Romeo and F. Crea (2002). "Immunosuppressive Therapy for the Prevention of Restenosis after Coronary Artery Stent Implantation (IMPRESS Study)." J Am Coll Cardiol **40**(11): 1935-42.
- Waksman, R., B. Bhargava, G. S. Mintz, R. Mehran, A. J. Lansky, L. F. Satler, A. D. Pichard, K. M. Kent and M. B. Leon (2000). "Late total occlusion after intracoronary brachytherapy for patients with in-stent restenosis." J Am Coll Cardiol **36**(1): 65-8.
- Walker, L. N., D. F. Bowen-Pope and R. Ross (1986). "Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury." Proc Natl Acad Sci U S A **83**: 7311-7315.
- Weissenbach, M., T. Clahsen, C. Weber, D. Spitzer, D. Wirth, D. Vestweber, P. C. Heinrich and F. Schaper (2004). "Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration." Eur J Immunol **34**(10): 2895-906.
- Welt, F. G., C. Tso, E. R. Edelman, M. A. Kjelsberg, J. F. Paolini, P. Seifert and C. Rogers (2003). "Leukozyte recruitment and gene expression of chemokines following different forms of vascular injury." Vasc Med **8**: 1-7.
- Wilcox, J. N., K. M. Smith and L. T. Williams (1988). "Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization." J Clin Invest **82**: 1134-1143.
- Williams, D. O., J. D. Abbott and K. E. Kip (2006). "Outcomes of 6906 patients undergoing percutaneous coronary intervention in the era of drug-eluting stents: report of the DEScover Registry." Circulation **114**(20): 2154-62.
- Winslow, R. D., S. K. Sharma and M. C. Kim (2005). "Restenosis and drug-eluting stents." Mt Sinai J Med **72**(2): 81-9.
- Xu, D., M. Wang and Y. Liu (2001). "[The role of cyclin-dependent kinase inhibitors in hyperplasia and hypertrophy of vascular smooth muscle cells]." Zhonghua Yi Xue Za Zhi **81**(11): 680-3.

- Yarden, Y., W. J. Kuang, T. Yang-Feng, L. Coussens, S. Munemitsu, T. J. Dull, E. Chen, J. Schlessinger, U. Francke and A. Ullrich (1987). "Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand." Embo J **6**(11): 3341-51.
- Zernecke, A., A. Schober, I. Bot, P. von Hundelshausen, E. A. Liehn, B. Mopps, M. Mericskay, P. Gierschik, E. A. Biessen and C. Weber (2005). "SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells." Circ Res **96**(7): 784-91.
- Zohlhofer, D., J. Hausleiter, A. Kastrati, J. Mehilli, C. Goos, H. Schuhlen, J. Pache, G. Pogatsa-Murray, U. Heemann, J. Dirschinger and A. Schomig (2005). "A randomized, double-blind, placebo-controlled trial on restenosis prevention by the receptor tyrosine kinase inhibitor imatinib." J Am Coll Cardiol **46**(11): 1999-2003.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
+500	Therapie mit 500µg/kg KG Imatinib pro Tag intra peritoneal
°C / C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A.	Arteria
AB	antibody
ACE	angiotensin converting enzyme
ADAM15	a disintegrin and metalloproteinase domain 15
Alk1	activin A receptor, type II-like
Alk5	transforming growth factor receptor beta 1
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
bFGF	basic fibroblast growth factor
BrdU	Bromodeoxyuridine
CAS	casein
CD31	platelet-endothelial cell adhesion molecule 1
cdk	cyclin dependent kinase
cDNA	complimentary desoxyribonucleic acid
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo[3.3.1.1.3,7]decan-4yl) phenylphosphate
CXCR-4	Chemokine, Cxc Motif, receptor 4
d	Tag(e)
DAB	3,3 Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DNA	desoxy ribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E.-v.-G.	Elastica van Giesson
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEL	Lamina elastica externa
EF1-α	elongationfactor-1 α
EZM	extrazelluläre Matrix
Fc Fragment	konstantes Fragment
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
i.p.	intraperitoneal
IEL	Lamina elastica interna
IGF	insulin like growth factor
IL	Interleukin
IL-6	interleukin-6
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzerkrankung
KO	Kontrollgruppe ohne Operation

LDL	low density lipoprotein
LiCl	Lithiumchlorid
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
LSAB	Labeled Strept-Avidin-Biotin
MAC2	lectin, galactose binding, soluble 3
MAP	mitogen activated protein
MAPK3	mitogen activated protein kinase3
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MIF	macrophage migration inhibitory factor
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	messenger ribonucleic acid
mV	Millivolt
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
OP	Tiere nach Intervention ohne Pharmakotherapie
p57	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
PBS	phosphate buffered saline
pc5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PDGF-R	platelet derived growth factor receptor
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
SDF-1	stromal derived factor 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
sm-actin	smooth muscle actin
SMC	glatte Muskelzellen
SSC	saline-sodium citrate
TAE	Trisacetat-EDTA
Taq	Termus aquaticus
TdT	Terminale Desoxyribonucleotidtransferase
TGF-β	transforming growth factor β
TNB	Tris NaCl Blocking
TNF- α	tumornecrosis factor α
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
VEGF	vascular endothelium growth factor
X	Zyklen

## 9 DANKSAGUNG

An erster Stelle geht mein Dank an Frau PD Dr. Dietlind Zohlhörer, ohne deren Fachkenntnis, Weitblick und Geduld diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Darüber hinaus möchte ich mich vor allem auch bei Dr. Pamela Frank bedanken, die in enger persönlicher Zusammenarbeit den tierexperimentellen Teil dieser Arbeit durchgeführt hat.

Ich danke auch den technischen Assistenten Frau Anja Huth und Herrn Falko Sorge für die Weitergabe ihres Fachwissens und ihre Unterstützung. Das Selbe gilt für die weiteren Mitarbeiter der AG Zohlhörer.

Am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Brandl für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, bei Herrn Dr. med. Thomas Richter und bei Frau Renate Hegenloh für die Einarbeitung und Unterstützung bedanken.

Ein großer Dank geht an meine Eltern Janet und Dr. Peter Seyboth für ihren moralischen, infrastrukturellen und kulinarischen Beistand und an meinen Bruder Stephan Seyboth, der mich immer wieder motiviert hat.

Besondere Erwähnung soll auch noch die Unterstützung durch Dr. Reinhard Wichels junior finden, dessen Liebe mir die Kraft gegeben hat, diese Arbeit immer wieder voran zu treiben.

# 10 LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

---

<b>Name</b>	<b>Carol Rebecca Seyboth</b>
Geburtstag/Ort	23. Mai 1978, München
Staatsangehörigkeit	Deutsch

## AUSBILDUNG

---

seit Februar 2006	Assistentin an der chirurgischen Klinik des Klinikum der Ludwigs-Maximilians-Universität München, Großhadern
November 2005	Approbation als Ärztin
November 2005	3. Staatsexamen Medizin Note 1,0 Gesamtnote 1,49
Juni-August 2005	3. Tertial praktisches Jahr Innere Medizin Klinikum Traunstein, Traunstein
April/Mai 2005	2. Tertial praktisches Jahr Kardiovaskuläre Chirurgie Texas Heart Institute, Houston Texas, USA
Februar/März 2005	2. Tertial praktisches Jahr Viszeral- und Unfallchirurgie Krankenhaus München Schwabing, München
Oktober 2004 - Februar 2005	1. Tertial praktisches Jahr Anästhesiologie Klinik für Anästhesiologie Klinikum der Universität München, Großhadern
März 2004	2. Staatsexamen Medizin Note 1,6
März 2002	1. Staatsexamen Medizin Note 2,0
Juli 2000	Physikum Note 1,6
Seit 1998	Studium der Medizin Ludwig-Maximilians-Universität, München
1997-1998	Studium der Biologie Ludwig-Maximilians-Universität, München
1988-1997	Albert-Einstein-Gymnasium, München Abiturnote 1,7

---

## VERÖFFENTLICHUNGEN

---

Aktuelle Weiterentwicklungen zur Tumorangiogenese und anti-angiogenetischen Therapie  
 Carol Seyboth und Christiane J. Bruns  
 Onkologie heute 06/2006

Effects of Imatinib treatment on neointima composition and progenitor cell recruitment  
 Seyboth C., Frank P., Nührenberg T., Yuan L., Zohlhöfer D.  
 1. Medizinische Klinik und Deutsches Herzzentrum der TU München  
 European Society of Cardiology Congress, August 2005 Stockholm

Rapamycin Attenuates Recruitment Progenitor Cell after Vascular Injury in Mice  
 Zohlhöfer D., Frank P., Hähnel I., Stemmer B., Seyboth C., Nührenberg T., Seidl S., Schömig A.  
 I. Medizinische Klinik und Deutsches Herzzentrum, Institut für Experimentelle Onkologie, Institut für Pathologie, Technischen Universität München  
 European Society of Cardiology Congress, August 2005 Stockholm

Genexpressionsanalyse im zeitlichen Verlauf der Neointimaformation: Zusammenspiel von Entzündung und Proliferation im Mausmodell  
 Frank P, Nührenberg TG, Seyboth C, Rudelius M, Zohlhöfer D  
 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung  
 15. - 17. April 2004, Mannheim

Gene Expression Analysis in a Time Course of Neointima Formation  
 Frank P, Nührenberg TG, Seyboth C, Zohlhöfer D  
 Berichtskolloquium des GRK 438, 12.Dezember 2003, München

## PRAKTIKA/FAMULATUREN

---

August - Oktober 2004	Associate Intern bei McKinsey Management Consulting Projektarbeit im Gesundheitssektor
Juli/August 2003	Innere Medizin Gesundheitsministerium der Seychellen, Mahe Mahe, Seychellen
August 2002	Herzchirurgie Deutsches Herzzentrum München Klinikum der Technischen Universität München, München
September/Oktober 2001	Anästhesiologie Klinikum für Anästhesie der Ludwig-Maximilians-Universität, München
August 2001	Gynäkologie und Geburtshilfe, plastische Chirurgie Frauenklinik Prien, Prien am Chiemsee
Februar/März 2001	Kardiologie Praxis Drs. Brand, Weingartner, Brüggemann München

## STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

---

Seit 2002	Mitglied im Graduiertenkolleg vaskuläre Biologie der Deutschen Forschungsgemeinschaft
-----------	--