

Aus dem Charité Centrum für Therapieforschung  
Institut für Pharmakologie/ Center for Cardiovascular Research (CCR)  
Direktor: Professor Dr. med. Thomas Unger

## **Habilitationsschrift**

### **Beeinflussung *Platelet-derived Growth Factor*-induzierter Aktivierung glatter Gefäßmuskelzellen und okklusiver, vaskulärer Gewebeumbauprozesse**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Pharmakologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Kai Kappert**  
**geboren am 28.06.1973 in Marburg/ Lahn**

Eingereicht: Januar 2009

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann, Göttingen
2. Gutachter: Prof. Dr. Regine Heller, Jena

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b> .....	4
<b>1.1. Vaskuläre Umbauprozesse</b> .....	4
1.1.1. Klinische Bedeutung okklusiver Gefäßveränderungen.....	4
1.1.2. Zelluläre Mechanismen der Atherosklerose und Restenose.....	4
1.1.3. Molekulare Mechanismen veränderter Zellfunktionen im Rahmen okklusiver Gefäßveränderungen.....	5
<b>1.2. Das <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> (PDGF)-System</b> .....	6
1.2.1. PDGF-Isoformen und ihre verwandten Rezeptoren.....	6
1.2.2. PDGF-induzierte Signaltransduktionswege und Zellfunktionen.....	7
1.2.3. PDGF und vaskuläre, okklusive Umbauprozesse.....	7
<b>1.3. Östrogene</b> .....	8
1.3.1. Östrogene und vaskuläre, okklusive Umbauprozesse.....	8
<b>1.4. Hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART)</b> .....	9
1.4.1. HAART und vaskuläre, okklusive Umbauprozesse.....	9
<b>1.5. Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs)</b> .....	10
1.5.1. Einteilung von PTPs.....	10
1.5.2. Regulation von PTPs.....	11
1.5.3. PTPs und vaskuläre, okklusive Umbauprozesse.....	11
<b>2. Zielsetzung</b> .....	12

---

<b>3. Relevante Originalarbeiten</b> .....	13
3.1. Beeinflussung der PDGF $\beta$ -Rezeptor-Signaltransduktion in glatten Gefäßmuskelzellen <i>in vitro</i> durch Östrogen (Originalarbeit 1) "17 $\beta$ -Estradiol attenuates PDGF signaling in vascular smooth muscle cells at the postreceptor level".....	14
3.2. Interferenz mit der PDGF-BB-induzierten Signaltransduktion und mit nachgeschalteten Zellfunktionen in glatten Gefäßmuskelzellen durch Ritonavir (Originalarbeit 2) "Ritonavir exhibits anti-atherogenic properties on vascular smooth muscle cells".....	24
3.3. Einfluss von HAART auf die Re-Endothelialisierung und Neointimaentwicklung <i>in vivo</i> (Originalarbeit 3) "Highly Active Antiretroviral Therapy Attenuates Re-Endothelialization and Alters Neointima Formation in the Rat Carotid Artery After Balloon Injury".....	34
3.4. Identifizierung von PTPs als Determinanten der PDGF $\beta$ -Rezeptor-Aktivierung <i>in vivo</i> (Originalarbeit 4) „Dynamic changes in the expression of DEP-1 and other PDGF receptor-antagonizing PTPs during onset and termination of neointima formation".....	45
3.5. Pharmakologische Beeinflussung der PTP-Aktivität im Rahmen der Neointimaentwicklung <i>in vivo</i> (Originalarbeit 5) "Antioxidants Relieve Phosphatase Inhibition and Reduce PDGF Signaling in Cultured VSMCs and in Restenosis".....	58
<b>4. Diskussion und therapeutische Aspekte</b> .....	73
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	76
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	77
<b>7. Danksagung</b> .....	82
<b>8. Erklärung</b> .....	83

## 1. Einleitung

### 1.1. Vaskuläre Umbauprozesse

Vaskuläre Umbauprozesse umfassen strukturelle Veränderungen bereits bestehender Gefäße.<sup>1</sup> Darunter wird ein physiologischer als auch pathologischer Umbau der Gefäßwand sowie das Wachstum und die Regression von Gefäßen gefasst. Dieser Gewebeumbau ist ein aktiver Prozess, der zelluläre Mechanismen wie Apoptose, Proliferation, Invasion, Migration und Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix mit einschließt. Vaskuläre Umbauprozesse beinhalten zum einen Vorgänge, die mit veränderter Genexpression verknüpft sind, zum anderen eine Änderung der zellulären Zusammensetzung in der Gefäßwand. Dies kann zu einer Lumeneinengung oder Vergrößerung des Lumenquerschnitts des Gefäßes führen.<sup>2</sup>

Ursachen vaskulärer Umbauprozesse sind Atherosklerose, Thrombose und Thrombusorganisation, Gefäßwandverletzung durch interventionelle Verfahren, Restenose, Shearstress, Bestrahlung, Umstellung von fetalem auf adulten Kreislauf, angeborene Gefäßveränderungen (Aneurysmen, fibromuskuläre Hyperplasie, Stenosen in Kollateralen), Verlust eines funktionell intakten Kapillarbets und systemische und pulmonale Hypertension.

#### 1.1.1 Klinische Bedeutung okklusiver Gefäßveränderungen

In der westlichen Welt stellen Gefäß- und ihre Folgeerkrankungen die häufigste Todesursache dar. Hierbei stehen insbesondere Gefäßverengungen (Stenosen) auf dem Boden einer Atherosklerose im Vordergrund. Auch wenn durch modernste medizinische Techniken (unter anderem interventionelle Ballondilatation, operative Bypass-Verfahren) und pharmakologische Strategien die Beschwerdesymptomatik und das Überleben von Patienten deutlich verbessert werden konnte, stellen u.a. das häufige Wiederauftreten von Gefäßverengungen (Restenosen) und ungünstige Stenose-Lokalisationen therapeutische Schwierigkeiten dar. So wird die koronare Herzkrankheit und der Hirninfarkt zurzeit als Todesursache Nummer Eins im aktuellen Bericht des Jahres 2008 der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgelistet<sup>3</sup>. Allein in Europa verursachen kardiovaskuläre Erkrankungen über 4 Millionen Todesfälle jährlich und sie stellen die Hauptursache reduzierter Lebenserwartung aufgrund frühzeitigen Todes dar.

Zur Entwicklung geeigneter therapeutischer Konzepte ist die genaue Kenntnis der zugrunde liegenden Vorgänge der Atherosklerose und der Restenose unverzichtbar. Dies beinhaltet die Charakterisierung sowohl der zellulären als auch molekularen Mechanismen der veränderten Zellfunktionen im Rahmen okklusiver Gefäßveränderungen.

#### 1.1.2. Zelluläre Mechanismen der Atherosklerose und Restenose - Übersicht

Die Atherosklerose stellt eine multifaktorielle chronisch-inflammatorische Erkrankung dar, an deren Pathogenese eine Reihe unterschiedlicher Zelltypen wie Makrophagen, T-Lymphozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen beteiligt sind, die auf molekularer Ebene miteinander kommunizieren.<sup>4, 5</sup> Nach einer initialen Schädigung des Endothels durch mechanische, entzündliche, toxische oder immunologische Reize kommt es zu einer Endothelzell dysfunktion und -aktivierung. Es folgt die Adhäsion und Transmigration von Monozyten und Lymphozyten am bzw. durch das Endothel und Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen im Gefäß. Diese Makrophagen nehmen modifiziertes und oxidiertes *Low Density Lipoprotein* (LDL) auf und bilden so genannte Schaumzellen (*foam cells*). Proliferative und promigratorische Faktoren bewirken die Migration glatter Gefäßmuskelzellen von der Gefäßmedia in die Intima mit konsekutiver Bildung der Neointima, wo Gefäßmuskelzellen proliferieren und zu einer fibrosierenden Verdickung der Gefäßwand beitragen. Die Apoptose von Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen kann zur Ausbildung nekrotischer lipidreicher Kerne (Plaques) führen.

Die zellulären und mechanischen Konsequenzen einer vaskulären Intervention, beispielsweise durch eine Angioplastie, gegen atherosklerotische Gefäßveränderungen führt zu einer charakteristischen und spezifischen Gefäßantwort, die in restenotischen Änderungen münden kann.<sup>6</sup> Diese Prozesse resultieren in einem raschen aber anscheinend selbstlimitierenden Umbauprozess, der zelluläre Proliferation, vaskulären Umbau und variable luminale Stenose mit einschließt. Nach einer durch eine vaskuläre Intervention initiierten Verletzung kann es als Resultat zu endothelialer Denudation, der Exposition thrombogenen Sub-Endothels, Thrombose, inflammatorischen Änderungen sowie oxidativem Stress und möglicherweise Adventitia-abhängiger Lumenrestriktion kommen.<sup>7</sup> Die Restenose ist nicht durch eine chronische, punktuelle Progression – die typisch für atherosklerotische Veränderungen ist – gekennzeichnet.<sup>7</sup> Vielmehr ist ein wichtiges Charakteristikum der Restenose die neointimale Hyperplasie, die auf der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und der Produktion von extrazellulären Matrixproteinen basiert.<sup>8</sup> Neben der Endothelzell-assoziierten Denudation und der Einwanderung von Monozyten/ Lymphozyten sind adventitielle Zellen und vor allem glatte Gefäßmuskelzellen an der Entstehung und Progression restenotischer Gefäßveränderungen beteiligt. Im Gegensatz zur Atherosklerose ist die Restenose nicht von der Anreicherung oder dem Aufbau atherogener Plasmalipide abhängig. Zudem zeichnet sich die Restenose, verglichen mit der Atherosklerose, durch höhere zeitliche Vorhersagbarkeit der Umbauprozesse aus.<sup>7</sup>

### 1.1.3. Molekulare Mechanismen der Atherosklerose und Restenose - Übersicht

Aktivierte, dysfunktionale Endothelzellen exprimieren verstärkt Adhäsionsmoleküle wie u.a. das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül VCAM-1, interzelluläres Adhäsionsmolekül ICAM-1, E-Selektin und bestimmte Integrine. Stimulierend bei der Aktivierung von Endothelzellen wirken auch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowie oxidiertes LDL und möglicherweise C-reaktives Protein.<sup>9,10</sup>

Die Adhäsion und Transmigration der Monozyten werden unter anderem durch Monozyten Chemotaktisches Protein-1 (MCP-1), Interleukin 8 (IL-8) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) vermittelt. Freigesetzte vasoaktive Substanzen, Zytokine und Wachstumsfaktoren wirken auto/parakrin auf umliegendes Gewebe und induzieren über Aktivierung der Zellmigration, Regulation der Apoptose, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Veränderung der Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix die Progression atherosklerotischer Plaques und restenotischer Gefäßveränderungen.<sup>11</sup>

Im Rahmen einer endothelialen Denudation setzen adhären und aggregierte Thrombozyten den Wachstumsfaktor *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) frei. PDGF wirkt pro-migratorisch für Monozyten/ Makrophagen und glatte Gefäßmuskelzellen. Auch aktivierte Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Makrophagen sind in der Lage, PDGF zu synthetisieren. Darüber hinaus übt PDGF einen starken proliferativen Reiz auf glatte Gefäßmuskelzellen aus. Auch andere mitogene bzw. chemotaktische Wachstumsfaktoren wie der *Fibroblast Growth Factor* (FGF), der *Epidermal Growth Factor* (EGF), der *Insulin-like Growth Factor* (IGF) und der *Transforming Growth Factor-beta* (TGF $\beta$ ) werden von Thrombozyten bzw. vaskulären Zellen produziert und tragen zum Gewebeumbauprozess im Rahmen von Gefäßveränderungen bei.<sup>7</sup> Die aktivierten glatten Gefäßmuskelzellen induzieren eine komplexe Extrazellulärmatrix und sezernieren zusammen mit Endothelzellen und Monozyten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), welche eine Destruktion der extrazellulären Matrix bewirken können.<sup>4</sup> MMPs können zur Ausdünnung der fibrinösen Membran und zur Degradation von Matrixproteinen führen, was die Instabilität von Plaques und ihre Ruptur mit konsekutiver klinischer Symptomatik zur Folge haben kann.

## 1.2. Das Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)-System

Der Plättchen-freigesetzte Wachstumsfaktor (PDGF) wurde ursprünglich, dem Namen entsprechend, aus Thrombozyten isoliert. So konnte PDGF zunächst als Granula in Thrombozyten nachgewiesen werden. Die proliferativen Eigenschaften auf unterschiedliche Zellarten wurden frühzeitig entdeckt.<sup>12, 13</sup>

Mittlerweile ist bekannt, dass neben Thrombozyten zahlreiche weitere Zellen PDGF produzieren können und durch PDGF in ihren Zellfunktionen verändert werden. Darunter fallen auch physiologische und pathologische Zellen der Gefäßwand wie glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen bzw. Monozyten/ Makrophagen. Auch Endothelzellen exprimieren PDGF, das parakrin glatte Gefäßmuskelzellen und Monozyten/ Makrophagen aktiviert. Auf dem Boden der starken proliferativen und chemotaktischen Eigenschaft von PDGF für glatte Gefäßmuskelzellen besitzt dieser Wachstumsfaktor besondere pathologische Bedeutung im Rahmen von okklusiven Gefäßveränderungen.

### 1.2.1. PDGF-Isoformen und ihre verwandten Rezeptoren

PDGF-Rezeptoren gehören in die Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen.<sup>14</sup> Die PDGF  $\alpha$ - und PDGF  $\beta$ -Rezeptoren sind, zusammen mit ihren Liganden, potente Regulatoren von Fibroblasten, Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen. Vier unterschiedliche PDGF-Isoformen wurden identifiziert, die im menschlichen Genom kodiert werden: PDGF-A, -B, -C und -D. Diese Isoformen homo- oder heterodimerisieren zu PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC und PDGF-DD. PDGF-AA, -AB, -BB und -CC induzieren  $\alpha\alpha$ -Rezeptor Homodimere, PDGF-AB und -BB induzieren  $\alpha\beta$ -Rezeptor Heterodimere und PDGF-BB sowie -DD führen zu  $\beta\beta$ -Rezeptor Homodimeren.<sup>15</sup> Dabei assoziiert jede Einheit der dimeren Liganden mit einem Rezeptorsubtyp und führt damit zur Aneinanderlagerung zweier Rezeptoreinheiten (Abbildung 1).

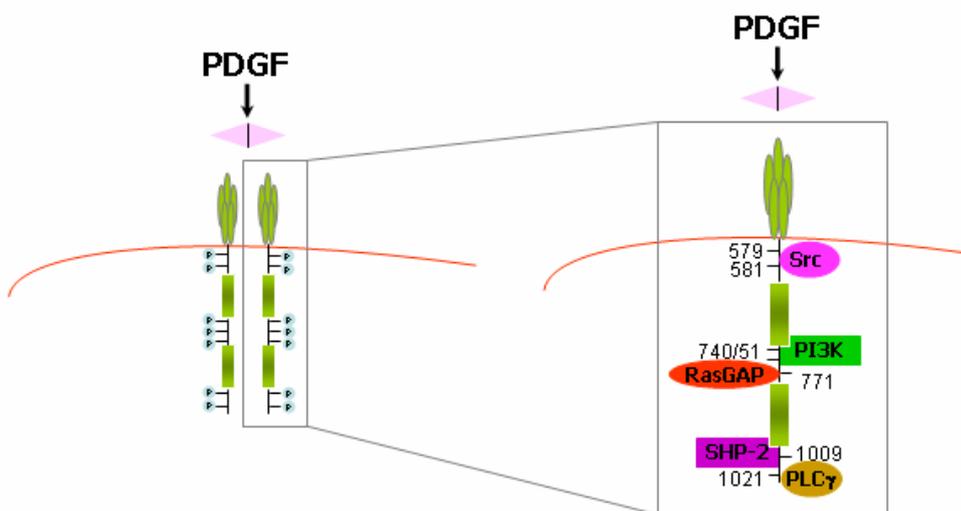


Abbildung 1: Schematische Darstellung der PDGF-induzierten Aktivierung von PDGF-Rezeptoren anhand des PDGF  $\beta$ -Rezeptors. Die Bindung von homo- oder heterodimeren Liganden (PDGF) führt zur Dimerisierung des Rezeptors mit konsekutiver Autophosphorylierung an intrazellulären Tyrosinresten, deren Aminosäurepositionen im rechten Schema gekennzeichnet sind (die Dimerisierung ist zur Vereinfachung rechts nicht dargestellt). Daran schließt sich die Rekrutierung zellulärer Proteine an den phosphorylierten Rezeptor mit Aktivierung spezifischer Signalwege an (rechte Darstellung).

### 1.2.2. PDGF-induzierte Signaltransduktionswege und Zellfunktionen

PDGF-Rezeptoren kontrollieren eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Prozesse wie Zellteilung, Differenzierung, Migration und das Überleben von Zellen. PDGF-Rezeptoren werden durch die Bindung ihrer extrazellulären Liganden aktiviert. Diese Liganden entfalten ihre biologische Wirksamkeit über die PDGF-Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinaktivität. Die induzierte Rezeptordimerisierung führt zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinasedomänen und konsekutiv zur Autophosphorylierung des Rezeptors. Spezifische Proteine des Zytoplasmas, darunter Src-Kinasen, Untereinheiten der Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase, RasGAP, die Phosphatase *Src-homology Region 2-containing Protein Tyrosine Phosphatase* (SHP)-2 und Phospholipase C (PLC)- $\gamma$ , binden mit hoher Affinität an den phosphorylierten Rezeptor, sie binden aber nicht im nicht-phosphorylierten Zustand des Rezeptors (Abbildung 1).

### 1.2.3. PDGF und vaskuläre, okklusive Umbauprozesse

PDGF-Liganden und -Rezeptoren werden in atherosklerotischen Plaques sowie restenotischen Läsionen verstärkt exprimiert<sup>16-18</sup> und die Inhibierung der Signaltransduktion von PDGF-Rezeptoren durch spezifische Antikörper oder durch Tyrosinkinase-Inhibitoren konnte die Atherogenese und Restenose in unterschiedlichen experimentellen Untersuchungen wirksam reduzieren.<sup>19, 20</sup> Unter den verschiedenen PDGF-Isoformen und den Rezeptor-Subtypen sind insbesondere PDGF  $\beta$ -Rezeptor-vermittelte Signale im Rahmen der Neointimaentwicklung nach vaskulärer Schädigung von Bedeutung.<sup>20-22</sup> Der Einfluss von PDGF bei der Atherogenese wird auch dadurch unterstützt, dass die Heraufregulierung und Aktivierung von PDGF  $\beta$ -Rezeptoren in LDL-Rezeptor /glatten Gefäßmuskelzell-spezifischen *receptor-related protein* (LRP) 1-Mäusen mit deutlicher Atherosklerose assoziiert ist.<sup>23</sup> Diese pro-atherosklerotische Entwicklung konnte durch Inhibierung von PDGF-Rezeptoren mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor ST1571/Imatinib wirksam blockiert werden.<sup>23</sup>

### 1.3. Östrogene

Östrogene (Follikelhormone) gehören als Sexualhormone in die Klasse der Steroidhormone und besitzen als Grundgerüst ein Estran (13 $\beta$ -Methyl-Gonan). Das wirksamste natürlich vorkommende Östrogen 17 $\beta$ -Östradiol (E2) wird vorwiegend in den Ovarien produziert, daneben kann es lokal aus Testosteron gebildet werden. Neben sexualspezifischen Funktionen besitzen Östrogene eine Reihe sexualunspezifischer Wirkungen. Die Sekretionsrate von Östrogenen ist während der Zyklusphase der Frau bzw. während der Schwangerschaft großen Schwankungen unterworfen. Mit der Postmenopause wird die Östrogenproduktion deutlich gemindert. Damit verbundene klimakterische Beschwerden können eine Indikation für eine Hormonersatztherapie darstellen.

#### 1.3.1. Östrogene und vaskuläre, okklusive Umbauprozesse

Die spätere Entstehung und die niedrigere Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Frauen im Vergleich zu Männern sind möglicherweise mit vaskuloprotektiven Eigenschaften von Östrogenen in prämenopausalen Frauen assoziiert. Damit einhergehend konnte eine Reduktion der Neointimaentwicklung nach Ballon-induzierter Gefäßverletzung durch Östrogen-Applikation *in vivo* demonstriert werden.<sup>24, 25</sup> Weiterhin wurden in *in vitro* Untersuchungen direkte atheroprotektive Eigenschaften von Östrogenen auf zellulärem Niveau nachgewiesen<sup>26-30</sup>, die zumindest teilweise die vorteilhaften Effekte für das kardiovaskuläre Risiko und die Reduktion der ischämischen Ereignisse wie Myokardinfarkt, Hirninfarkt und periphere vaskuläre Erkrankung erklären können. Auch wenn einige protektive Effekte von Östrogenen wie die Beeinflussung der Plasmalipide, die Inhibierung der Plättchen-Aggregation, Herunterregulierung von Angiotensin AT1-Rezeptoren und die Inhibierung der Angiotensin II-induzierten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen beschrieben wurden<sup>28, 29, 31-33</sup>, sind die molekularen und zellulären Mechanismen der Östrogen-vermittelten atheroprotektiven Effekte noch lange nicht vollständig verstanden.

Die starke proliferative und chemotaktische Eigenschaft von PDGF auf glatte Gefäßmuskelzellen ist gut dokumentiert.<sup>18</sup> Vor dem Hintergrund der Bedeutung von PDGF im Rahmen der Atherosklerose und Restenose sowie der reduzierten Neointimaentstehung durch E2<sup>24, 34</sup> nahmen wir an, dass E2 möglicherweise die PDGF-Rezeptor-Signaltransduktion und PDGF-induzierte Zellfunktionen, wie die Proliferation und die Migration glatter Gefäßmuskelzellen, abschwächen kann und dadurch die Gefäßwand vor restenotischen Umbauprozessen schützt (3.1., Originalarbeit 1).

## 1.4. Hochaktive antiretrovirale Therapie

Seit der Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie, HAART, zur Behandlung von Patienten mit Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) in den Jahren 1996/1997 konnte sowohl die Mortalität als auch das Auftreten opportunistischer Infektionen deutlich gesenkt werden.<sup>35, 36</sup> So gewinnen kardiovaskuläre Ereignisse, die unmittelbar mit der HIV-Infektion bzw. der Therapie durch HAART verbunden sind, zunehmend an Bedeutung, da die Lebensdauer von HIV-positiven Patienten verlängert wurde. Kardiovaskuläre Erkrankungen besitzen einen wesentlichen Anteil an der HIV-assoziierten Mortalität. So variieren die Inzidenzraten für kardiovaskuläre Ereignisse in den jeweiligen klinischen Untersuchungen zwischen 4 und 9 pro 1000 Personen-Jahre, so dass diese Ereignisse nach Einführung der HAART einen wichtigen Anteil der Mortalität und Morbidität bei Patienten mit HIV-Infektion darstellen.<sup>37, 38</sup>

### 1.4.1. Hochaktive antiretrovirale Therapie und vaskuläre, okklusive Umbauprozesse

Die HIV-Infektion selbst als auch HAART wurden mit zahlreichen direkten und indirekten pro-atherogenen Effekten in Verbindung gebracht. Diese wurden sowohl in experimentellen als auch klinischen Untersuchungen analysiert. Dabei stellen metabolische Veränderungen wie Dyslipidämien, Diabetes mellitus und das Alter der Patienten indirekte vaskuläre und potentiell pro-atherogene Faktoren dar; Interferenz mit der Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen, pro-inflammatorischen Zytokinen, vasoaktiven Substanzen oder Wachstumsfaktor-vermittelten Zellfunktionen sind als direkte vaskuläre Faktoren unmittelbar mit der Pathogenese der Atherosklerose und Restenose verknüpft.

Ob diese zellulären und metabolischen Veränderungen in einem gesteigerten Risiko für pro-atherogene Gefäßumbauprozesse und kardiovaskuläre Ereignisse resultieren, ist strittig und wurde in Untersuchungen unterschiedlich dokumentiert bzw. diskutiert. Eine Reihe von klinischen Studien zeigte ein erhöhtes Risiko für HIV-positive bzw. HAART-behandelte Patienten<sup>39-42</sup>, andere Untersuchungen konnten demgegenüber keine Korrelation nachweisen.<sup>43, 44</sup>

Die Behandlung nach HAART-Schema beinhaltet die Kombination unterschiedlicher antiretroviraler Pharmaka, wobei sich das gewählte pharmakologische Regime international unterscheidet und am individuellen Patienten orientiert ist. Zurzeit werden fünf verschiedene Substanzklassen therapeutisch angewendet. So stehen nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI), nukleotidanalogue Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NtRTI), nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), Proteaseinhibitoren (PI) und ein Fusionsinhibitor zur Verfügung. Üblicherweise beinhaltet die Kombinationstherapie nach HAART zwei verschiedene NRTI sowie einen NNRTI oder einen PI. Durch die gleichzeitige Gabe des PI Ritonavir wird die Verstoffwechslung anderer PI durch Inhibition des Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 gehemmt und deren Wirkspiegel gesteigert (Prinzip der *Boosterung*).

Neben metabolischen Veränderungen wurden direkte Effekte von PI auf zellulärer Ebene nachgewiesen. Darunter fallen pro-apoptotische Einflüsse auf Adipozyten<sup>45</sup> sowie die reduzierte Zellviabilität von humanen Endothelzellen.<sup>46</sup> Damit übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von PI zur endothelialen Dysfunktion in Patienten führte<sup>47</sup>, die als früher Indikator für atherosklerotische Gefäßveränderungen gelten kann. Umgekehrt wurde allerdings berichtet, dass neben diesen negativen Effekten auch vorteilhafte Veränderungen mit der Gabe von PI verknüpft sein können. So wurden reduzierte endotheliale Marker (Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1) unter antiretroviraler Therapie gemessen.<sup>48</sup>

Wegen der Bedeutung des Wachstumsfaktors PDGF im Rahmen von okklusiven Gefäßveränderungen und der in einigen Studien dokumentierten gesteigerten kardiovaskulären Ereignisse in HAART-behandelten Patienten<sup>39-42</sup> stellten wir die Hypothese auf, dass antiretrovirale Pharmaka die PDGF-Signaltransduktion in glatten Gefäßmuskelzellen direkt verändern (3.2., Originalarbeit 2), sowie dass HAART zur Steigerung der Neointimaentwicklung *in vivo* (3.3., Originalarbeit 3) führt.

### 1.5. Protein-Tyrosin-Phosphatasen

Als endogene Antagonisten von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs)<sup>14</sup> im Allgemeinen und von PDGF-Rezeptoren im Speziellen stellen Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) regulatorische Enzyme dar, denen neuerdings signifikante Bedeutung für das Ausmaß der zellulären Tyrosin-Phosphorylierung zugeschrieben wird.<sup>49-53</sup> So bestimmt die Aktivität bzw. Expression von PTPs maßgeblich die Tyrosinphosphorylierung von RTKs und konsekutiv die nachgeschaltete Signaltransduktion.<sup>54</sup>

#### 1.5.1. Einteilung von PTPs

Im menschlichen Genom sind 107 PTPs bekannt, denen allen eine katalytische Domäne mit Phosphohydrolase-Aktivität gemein ist. Auf der Aminosäuren-Sequenz der katalytischen Domäne basierend werden 4 Sub-Gruppen mit gewisser Substratspezifität klassifiziert. Die Klasse I Cystein-basierten PTPs subsumieren die klassischen PTPs mit ausschließlicher Phospho-Tyrosin-Spezifität. Diese Gruppe von 38 PTPs wird in Rezeptor-ähnliche PTPs (RPTPs) und Nicht-Rezeptor-ähnliche PTPs (NRPTPs) unterteilt (Abbildung 2).<sup>55-56</sup> Die vorliegende Habilitationsschrift beschäftigt sich mit diesen „klassischen“ PTPs, die im Weiteren lediglich als 'PTPs' bezeichnet werden.

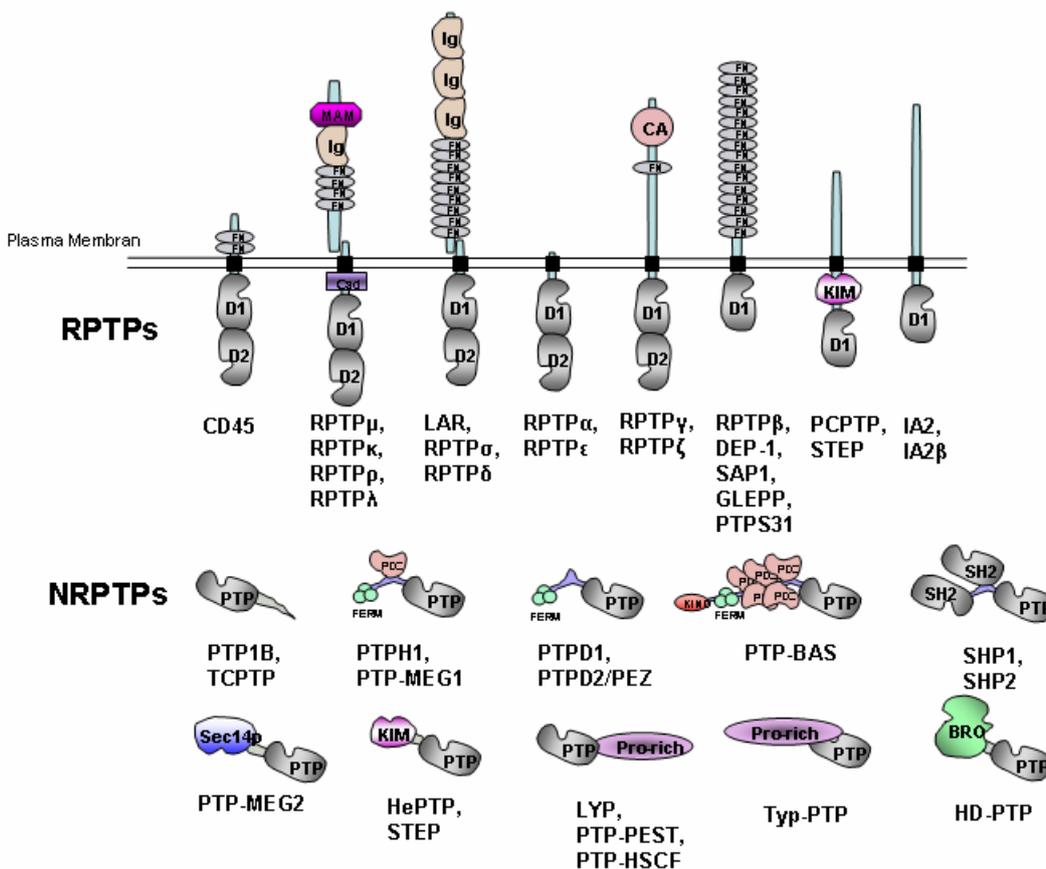


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur klassischer PTPs (nach Östman und Kappert<sup>56</sup>, modifiziert nach Alonso et al.<sup>55</sup>). Abk.: RPTPs, Rezeptor-ähnliche PTPs; NRPTPs, nicht-Rezeptor-ähnliche, zytosolische PTPs; D1, Domäne 1; D2, Domäne 2; FN, Fibronectin-ähnlich; Ig, Immunglobulin-ähnlich; KIM, Kinaseninteraktionsmotif; PDZ, postsynaptische Densitäten-95/Discs large/Z01 Homologie; SH2, src homology 2; BRO, Baculovirus BRO Homologie; Pro-rich, Proline-reich; FERM, Band 4.1/Ezrin/Radixin/Moesin Homologie; KIND, Kinase N Lappen-ähnliche Domäne; Sec14p, Sec14p Homologie (oder CRAL/TRIO).

### 1.5.2. Regulation von PTPs

Neben dem regulatorischen Einfluss von PTPs auf die zelluläre Netto-Tyrosinphosphorylierung sind PTPs ihrerseits einer Reihe von Mechanismen unterworfen, welche die Phosphatasen-Aktivität beeinflussen. So führt die Phosphorylierung von PTPs an Tyrosin-, Serin- und Threonin-Resten bzw. die Bindung von extrazellulären Liganden entweder zur Erhöhung oder zur Inhibierung der Phosphatasen-Aktivität. Die Dimerisierung von RPTPs und die Stimulus-getriggerte proteolytische Spaltung sind zusätzliche Mechanismen zur Modulation der PTP-Aktivität.<sup>54</sup> Kürzlich konnte die inhibitorische Oxidation des Cysteinrestes in der *active-site* der katalytischen Domäne als ein weiterer Modifizierungsmechanismus etabliert werden. Hierbei wurde in eigenen Arbeiten eine Antikörper-basierte Methode zum Nachweis oxidierter PTPs entwickelt.<sup>57, 58</sup> Neben diesen post-translationalen Regulationen von PTPs sind Veränderungen der Expression sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen beschrieben worden.<sup>59-61</sup>

### 1.5.3. PTPs und vaskuläre, okklusive Umbauprozesse

Die Bedeutung von PTPs im Rahmen von vaskulären, okklusiven Umbauprozessen ist weitgehend ungeklärt. Zudem muss hervorgehoben werden, dass die Rolle von PTPs für die PDGF-Rezeptor-Signaltransduktion in erster Linie bislang in nicht-vaskulären Zellen untersucht wurde. Seki et al. konnten allerdings eine positive Beziehung zwischen SHP-2 Expression und Bromodeoxyuridin-Aufnahme in glatten Gefäßmuskelzellen nach PDGF-Stimulation nachweisen.<sup>62</sup> Darüber hinaus beschrieben diese Autoren einen Anstieg der SHP-2 Expression in der Rattenaorta nach experimentell induzierter Neointimaentwicklung, was auf eine wichtige Rolle dieser PTP im Rahmen der Restenose hinweist.<sup>62</sup> Daneben wurde gezeigt, dass FAP-1 und PTP1B in glatten Gefäßmuskelzellen in Aa. carotides communes der Ratte während der Neointimaentwicklung deutlich heraufreguliert wurden.<sup>63</sup> In einem In-Gel Ansatz konnte die Interaktion von vier unterschiedlichen PTPs mit dem PDGF  $\beta$ -Rezeptor nachgewiesen werden: PTP-PEST, SHP-2, PTP1B und TC-PTP.<sup>64</sup> Dabei besteht die klarste Evidenz für eine antagonistische Wirkung auf die PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Signaltransduktion für TC-PTP, einer ubiquitär exprimierten zytosolischen PTP.<sup>65</sup> Eine weitere PTP, die als negativer Regulator von PDGF  $\beta$ -Rezeptoren beschrieben wurde, ist DEP-1. Es wurde gezeigt, dass die Transfektion von DEP-1 in PDGF  $\beta$ -Rezeptor-exprimierende Zellen zu einer Reduzierung der Liganden-induzierten Rezeptor-Phosphorylierung und zellulären Antworten führte.<sup>66, 67</sup>

Um die Bedeutung von PTPs im Rahmen von okklusiven Gefäßveränderungen zu beschreiben, analysierten wir die transkriptionelle Regulation von PDGF  $\beta$ -Rezeptor-bindenden PTPs in einem experimentellen Modell der Neointimaentwicklung (3.4., Originalarbeit 4). Zudem wurde der Versuch unternommen, PTPs als molekulare Zielstrukturen durch pharmakologische Intervention in ihrer Aktivität zu beeinflussen und dadurch restenotische Gefäßveränderungen abzuschwächen (3.5., Originalarbeit 5).

## 2. Zielsetzung

Die Neointimaentwicklung und vaskuläre Umbauprozesse sind häufige Komplikationen in Patienten nach durchgeführter interventioneller Ballondilatation mit oder ohne damit verbundenem „Stenting“ des Gefäßes. Die zellulären Mechanismen, die zu dieser post-angioplastischen Restenose führen, gleichen in mehreren Aspekten denen der Atherosklerose. Darunter fällt die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen, die Neointimaentwicklung sowie eine Veränderung der extrazellulären Matrix.<sup>68</sup> Experimentelle Daten stützen die Annahme, dass die PDGF-Signaltransduktion zentralen Stellenwert bei diesen Prozessen hat. Die vorteilhafte therapeutische Beeinflussung der PDGF-induzierten zellulären Signale konnte in mehreren Untersuchungen bestätigt werden<sup>69-71</sup>, wobei auch negative Daten publiziert wurden.<sup>72</sup>

Generell wurden Veränderungen der Produktion von PDGF und PDGF-bindenden Rezeptoren und ihrer Tyrosinkinase-Signaltransduktion in einer Reihe von vaskulär-pathologischen Prozessen, einschließlich der Atherosklerose und Restenose, beschrieben.<sup>69</sup> In dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte restenotischer Gewebeumbauprozesse, insbesondere Komponenten der PDGF-Signaltransduktion in glatten Gefäßmuskelzellen, untersucht.

Im Einzelnen wurden analysiert:

- Der Einfluss von 17-beta Östradiol auf die PDGF-induzierte Signaltransduktion und Zellfunktionen in glatten Gefäßmuskelzellen (3.1., Originalarbeit 1).
- Der Einfluss des antiretroviralen Pharmakons Ritonavir auf die PDGF-induzierte Signaltransduktion und Zellfunktionen in glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* (3.2., Originalarbeit 2).
- Die Bedeutung einer antiretroviralen Kombinationstherapie für vaskuläre Umbauprozesse *in vivo* (3.3., Originalarbeit 3).
- Die Funktion und Regulation von PDGF  $\beta$ -Rezeptor-antagonisierenden Protein-Tyrosin-Phosphatasen im Rahmen der induzierten Neointimaentwicklung (3.4., Originalarbeit 4).
- Die pharmakologische Beeinflussbarkeit von Protein-Tyrosin-Phosphatasen in einem Modell der experimentellen Neointimaentwicklung (3.5., Originalarbeit 5).

Ziel dieser Arbeit ist es, zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen und der Beeinflussbarkeit PDGF-abhängiger Zellfunktionen in glatten Gefäßmuskelzellen beizutragen. Dies schließt insbesondere die Charakterisierung von endogenen antagonistischen Protein-Tyrosin-Phosphatasen und deren Etablierung als molekulare Zielstrukturen im Rahmen okklusiver, vaskulärer Gewebeumbauprozesse mit ein.

**3. Relevante Originalarbeiten**

- 3.1.** Kai Kappert, Evren Caglayan, Michael Huntgeburth, Anselm T. Bäumer, Jan Sparwel, Manuela Uebel, Stephan Rosenkranz (2006):  $17\beta$ -Estradiol attenuates PDGF signaling in vascular smooth muscle cells at the postreceptor level. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 290: Seiten H538-H546
- 3.2.** Kai Kappert, Evren Caglayan, Anselm T. Bäumer, Michael Südkamp, Gerd Fätkenheuer, Stephan Rosenkranz (2004): Ritonavir exhibits anti-atherogenic properties on vascular smooth muscle cells. *AIDS* 18: Seiten 403-411
- 3.3.** Kai Kappert, Olli Leppänen, Janna Paulsson, Masao Furuhashi, Mari-Anne Carlsson, Carl-Henrik Heldin, Gerd Fätkenheuer, Stephan Rosenkranz, Arne Östman (2006): Highly Active Antiretroviral Therapy Attenuates Re-Endothelialization and Alters Neointima Formation in the Rat Carotid Artery After Balloon Injury. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* 43: Seiten 383-392
- 3.4.** Kai Kappert, Janna Paulsson, Jan Sparwel, Olli Leppänen, Carina Hellberg, Arne Östman, Patrick Micke (2007): Dynamic changes in the expression of DEP-1 and other PDGF receptor-antagonizing PTPs during onset and termination of neointima formation. *The FASEB Journal* 21: Seiten 523-534
- 3.5.** Kai Kappert, Jan Sparwel, Åsa Sandin, Alexander Seiler, Udo Siebolts, Olli Leppänen, Stephan Rosenkranz, Arne Östman (2006): Antioxidants Relieve Phosphatase Inhibition and Reduce PDGF Signaling in Cultured VSMCs and in Restenosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26: Seiten 2644-2651

### 3.1. Beeinflussung der PDGF $\beta$ -Rezeptor-Signaltransduktion in glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* durch Östrogen (Originalarbeit 1)

**“17 $\beta$ -Estradiol attenuates PDGF signaling in vascular smooth muscle cells at the postreceptor level”**

**Kai Kappert**, Evren Caglayan, Michael Huntgeburth, Anselm T. Bäumer, Jan Sparwel, Manuela Uebel, Stephan Rosenkranz

*American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*  
290: H538-H546, 2006

Östrogene besitzen möglicherweise einen vaskuloprotektiven Einfluss in prämenopausalen Frauen. Die starken proliferativen und chemotaktischen Wirkungen des *Platelet-derived Growth Factors* (PDGF) auf glatte Gefäßmuskelzellen sowie die Bedeutung von PDGF im Rahmen der Atherosklerose und Restenose sind gut dokumentiert. Vor dem Hintergrund der reduzierten Neointimaentstehung durch 17 $\beta$ -Östradiol (E2) nahmen wir an, dass E2 die PDGF-Rezeptor-Signaltransduktion und PDGF-BB-induzierte Zellfunktionen inhibitorisch beeinflusst und dadurch die Gefäßwand vor restenotischen Umbauprozessen schützt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass E2 die PDGF-BB-induzierte DNA-Synthese und Migration glatter Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta *in vitro* signifikant inhibiert. Die Liganden-abhängige Phosphorylierung sowie die Expression des PDGF  $\beta$ -Rezeptors waren dabei unverändert. Zudem wurde die Rekrutierung der Rezeptor-assoziierten intrazellulären Bindungsproteine SHP-2, PLC- $\gamma$ , p85 und RasGAP nicht beeinflusst. Vielmehr zeigte sich eine signifikante und konzentrationsabhängige Reduzierung der Expression sowie der PDGF-BB-induzierten Aktivierung des kleinen G-Proteins rac-1. Die Bedeutung von rac-1 für die PDGF-BB-abhängige Migration glatter Gefäßmuskelzellen konnte in Inhibierungsversuchen durch *Clostridium sordellii lethal toxin* und Überexprimierung von dominant-negativem rac-1 (rac-N17) demonstriert werden.

Diese Daten zeigen, dass E2 PDGF-abhängige Zellfunktionen in glatten Gefäßmuskelzellen *downstream* des PDGF  $\beta$ -Rezeptors durch Beeinflussung von rac-1 abschwächen kann. Vor dem Hintergrund der Bedeutung von PDGF-abhängigen Zellfunktionen für atherogene und restenotische vaskuläre Umbauprozesse bieten diese Daten eine mögliche molekulare Erklärung der vaskuloprotektiven Effekte von Östrogenen.

### 3.2. Interferenz mit der PDGF-BB-induzierten Signaltransduktion und mit nachgeschalteten Zellfunktionen in glatten Gefäßmuskelzellen durch Ritonavir (Originalarbeit 2)

#### “Ritonavir exhibits anti-atherogenic properties on vascular smooth muscle cells”

**Kai Kappert**, Evren Caglayan, Anselm T. Bäumer, Michael Südkamp, Gerd Fätkenheuer, Stephan Rosenkranz

*AIDS*

18: 403-411, 2004

Die Einführung der hochaktiven antiretroviralen Therapie, HAART, zur Behandlung von Patienten mit Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) konnte sowohl die Mortalität als auch das Auftreten opportunistischer Infektionen deutlich senken. Die HIV-Infektion selbst als auch HAART wurde mit direkten und indirekten pro-atherogenen Effekten in Verbindung gebracht. Auf dem Boden des Einflusses des Wachstumsfaktors *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) im Rahmen von okklusiven Gefäßveränderungen und der in einigen Studien dokumentierten gesteigerten kardiovaskulären Ereignisse durch HAART wurde der Hypothese nachgegangen, dass antiretrovirale Pharmaka die PDGF-Signaltransduktion in glatten Gefäßmuskelzellen direkt verändern.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung glatter Gefäßmuskelzellen der Rattenaorta mit Ritonavir, einem Proteaseinhibitor und Standardbestandteil einer antiretroviralen Therapie, die PDGF-BB-induzierte DNA-Synthese und Migration *in vitro* signifikant inhibiert. Der inhibitorische Einfluss war dabei nicht das Resultat zytotoxischer oder apoptotischer Effekte. Die Liganden-abhängige Phosphorylierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors wurde konzentrationsabhängig gehemmt, während die Expression des Rezeptors unverändert blieb. Verbunden damit bestand eine Reduktion der Phosphorylierung der *mitogen-activated protein* (MAP) Kinase p42/44 an Threonin<sup>202</sup>/ Tyrosin<sup>204</sup>.

Diese Daten demonstrieren, dass Ritonavir direkte Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen *in vitro* ausübt. Während Ritonavir möglicherweise das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen durch metabolische Nebenwirkungen erhöht, bestehen auch protektive Eigenschaften auf einer zellulären und funktionellen Ebene in glatten Gefäßmuskelzellen.

### 3.3. Einfluss von HAART auf die Re-Endothelialisierung und Neointimaentwicklung *in vivo* (Originalarbeit 3)

#### “Highly Active Antiretroviral Therapy Attenuates Re-Endothelialization and Alters Neointima Formation in the Rat Carotid Artery After Balloon Injury”

**Kai Kappert**, Olli Leppänen, Janna Paulsson, Masao Furuhashi, Mari-Anne Carlsson, Carl-Henrik Heldin, Gerd Fätkenheuer, Stephan Rosenkranz, Arne Östman

*Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*  
43: 383-392, 2006

Die hochaktive antiretrovirale Therapie, HAART, ist mit metabolischen Nebenwirkungen wie Hyperlipidämie und Hyperglykämie assoziiert, die möglicherweise zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen. Darüber hinaus konnten direkte Effekte von HAART auf zellulärer Ebene beschrieben werden, die atherosklerotische und restenotische Umbauprozesse begünstigen könnten. Der Einfluss von HAART in einem experimentellen Modell der Neointimaentwicklung wurde bislang nicht untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HAART (Kombination aus Lopinavir, Ritonavir, Lamivudin und Zidovudin) die Neointimaentwicklung – gemessen anhand des Verhältnisses der Neointima zur Media – in einem experimentellen Modell in *Aa. carotides communes* in Sprague-Dawley Ratten signifikant steigerte. Zudem war in Tieren, die mit HAART behandelt wurden, die regenerative Kapazität des Endothels reduziert. Dies wurde durch digitale Vermessung des Auswachsens von Endothelzellen von angrenzenden nicht-intervenierten Gefäßen quantifiziert.

Diese Daten demonstrieren, dass HAART möglicherweise zu einem gesteigerten Risiko neointimaler Umbauprozesse führen kann, wie sie nach perkutanen vaskulären Interventionen beobachtet werden.

### 3.4. Identifizierung von PTPs als Determinanten der PDGF $\beta$ -Rezeptor-Aktivierung *in vivo* (Originalarbeit 4)

**“Dynamic changes in the expression of DEP-1 and other PDGF receptor-antagonizing PTPs during onset and termination of neointima formation”**

**Kai Kappert**, Janna Paulsson, Jan Sparwel, Olli Leppänen, Carina Hellberg, Arne Östman, Patrick Micke

*The FASEB Journal*  
21: 523-534, 2007

Während zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten zur Regulation von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) bei der Entstehung der Neointima nach interventioneller Therapie publiziert wurden, ist weitgehend unbekannt, welche Rolle Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) als endogene Antagonisten von RTKs besitzen.

In dieser Arbeit wurde in einem tier-experimentellen Ansatz mit Hilfe des Verfahrens der *Laser Capture Microdissection* entgegen der vorherrschenden Annahme der Dominanz der transkriptionellen Regulation von RTKs und ihrer Liganden vielmehr die maßgebliche Rolle von PTPs generell und insbesondere von DEP-1 (*density-enhanced protein tyrosine phosphatase-1*) im Rahmen der Neointimabildung und ihrer Terminierung demonstriert. Darüber hinaus wurde dadurch eine dynamische transkriptionelle Regulation von PTPs *per se* bei Gewebeumbauprozessen beschrieben. Eine verstärkte generelle PTP-Aktivität korrelierte mit einer Abschwächung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und der Beendigung der Neointimabildung. Einhergehend damit zeigten kultivierte DEP-1<sup>-/-</sup> *mouse embryo fibroblasts* (MEFs) und glatte Gefäßmuskelzellen nach DEP-1-Herunterregulierung eine verstärkte Liganden-induzierte Phosphorylierung des *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF)  $\beta$ -Rezeptors. Zudem waren DEP-1<sup>-/-</sup> MEFs durch eine erhöhte PDGF-BB-induzierte Chemotaxis charakterisiert.

Die Resultate demonstrieren eine bislang unerkannte Rolle von PDGF  $\beta$ -Rezeptor-antagonisierenden PTPs bei der Neointimabildung. Zudem stützen die Daten die Vorstellung einer transkriptionellen Regulation von PTPs als einen wichtigen Mechanismus zur Kontrolle von vaskulären Umbauprozessen.

### 3.5. Pharmakologische Beeinflussung der PTP-Aktivität im Rahmen der Neointimaentwicklung *in vivo* (Originalarbeit 5)

#### “Antioxidants Relieve Phosphatase Inhibition and Reduce PDGF Signaling in Cultured VSMCs and in Restenosis”

**Kai Kappert**, Jan Sparwel, Ása Sandin, Alexander Seiler, Udo Siebolts, Olli Leppänen, Stephan Rosenkranz, Arne Östman

*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*  
26: 2644-2651, 2006

Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) beeinflussen als endogene Antagonisten der Tyrosin-Signaltransduktion maßgebliche Funktionen vaskulärer Zellen. Dabei ist unbekannt, ob PTPs möglicherweise therapeutische Zielstrukturen bei restenotischen und atherogenen Gefäßveränderungen darstellen. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie  $H_2O_2$ , werden sowohl im Rahmen von Gefäßläsionen als auch physiologisch als Botenstoff von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) produziert. Als intrazelluläre Zielstruktur von ROS wurden PTPs identifiziert, die am *active-site* Cystein in der katalytischen Domäne oxidiert und damit inaktiviert werden. Ziel war es, durch PTP-Reaktivierung ROS- und RTK-vermittelte Signale zu inhibieren und konsekutiv der Neointimabildung entgegenzuwirken.

*In vitro* wurde der Einfluss der Antioxidantien Tempol und N-Acetyl-Cystein (NAC) auf die PTP-Aktivität, die  $H_2O_2$ - und *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF)-Signalvermittlung und auf Zellantworten in glatten Gefäßmuskelzellen analysiert. *In vivo* wurden Tempol und NAC an Sprague-Dawley-Ratten appliziert und 14 Tage nach Endothel-Denudierung der A. carotis communis die PTP-Expression und -Aktivität, die Phosphorylierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors sowie die Neointimabildung analysiert. NAC verhinderte die  $H_2O_2$ -induzierte Verminderung der PTP-Aktivität in glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro*. Zudem wurde in NAC-behandelten glatten Gefäßmuskelzellen die  $H_2O_2$ -induzierte Signalvermittlung gehemmt, inklusive der Phosphorylierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors sowie von *downstream* gelegenen Signalmolekülen wie Erk und Akt. Schließlich inhibierten Tempol und NAC konzentrationsabhängig die PDGF-BB-induzierte Migration und BrdU-Inkorporation signifikant. *In vivo* führte die Behandlung mit Tempol und NAC zu einer erhöhten PTP-Aktivität in restenotischen Gefäßen. Damit einhergehend lag bei gleicher Rezeptor- und PDGF-B-Liganden-Expression im Gefäß eine niedrigere Phosphorylierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors in der Neointima bei Tempol- und NAC-behandelten Tieren vor. Schließlich führten Tempol und NAC zur signifikanten Inhibierung der Neointimabildung.

Die Reaktivierung der PTP-Aktivität durch Antioxidantien besitzt deutlichen Einfluss auf die PDGF-Signalvermittlung und die Neointimabildung. Insbesondere die niedrigere PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Phosphorylierung in Verbindung mit einer erhöhten totalen PTP-Aktivität *in vivo* weisen auf eine Wirkung auf PDGF  $\beta$ -Rezeptor-antagonisierende PTPs durch Antioxidantien hin. Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass PTPs therapeutische Zielstrukturen bei okklusiven, vaskulären Umbauprozessen darstellen.

#### 4. Diskussion und therapeutische Aspekte

Verschiedene Aspekte vaskulärer, okklusiver Umbauprozesse wurden in dieser Habilitationsschrift behandelt. Vor dem Hintergrund der Wichtigkeit glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen dieser Prozesse wurde hierbei zum einen die Aktivierung bzw. die Beeinflussung der Rezeptortyrosinkinase PDGF  $\beta$ -Rezeptor durch 17-beta Östradiol und Ritonavir untersucht (Originalarbeiten 1 und 2). Die Originalarbeit 3 vertiefte dabei den Aspekt der Modifizierung vaskulärer, okklusiver Umbauprozesse durch antiretrovirale Pharmaka *in vivo*. Zum anderen wurde die Rolle PDGF  $\beta$ -Rezeptor-antagonisierender PTPs für die Rezeptortyrosinsignaltransduktion einschließlich neointimaler Prozesse untersucht (Originalarbeiten 4 und 5).

Die vorliegende Habilitationsschrift untersuchte die Rolle der Tyrosinsignaltransduktion bei Gewebeumbauprozessen. Hierunter fallen die Signaltransduktion des PDGF  $\beta$ -Rezeptors (Originalarbeiten 1 und 2) als im vaskulären Gewebe relevanter Rezeptortyrosinkinase und der Einfluss von PDGF  $\beta$ -Rezeptor bindenden oder antagonisierenden PTPs (Originalarbeiten 4 und 5). Obgleich die Wichtigkeit von PDGF-Rezeptoren im Rahmen der Atherosklerose und Restenose insbesondere durch experimentelle Befunde gut belegt ist, gestalteten sich therapeutische Ansätze, die den PDGF-Rezeptor als Zielstruktur verfolgten, bislang als schwierig. So konnte im kardiovaskulären Bereich kein Vorteil durch einen Inhibitor des PDGF  $\beta$ -Rezeptors (STI571/Imatinib) in Bezug auf die Restenose von In-Stent-Restenosen in einer randomisierten Placebo-kontrollierten Studie an 180 Patienten dokumentiert werden.<sup>72</sup> Die Ergebnisse einer klinischen Untersuchung im Rahmen der pulmonalen Hypertonie (ClinicalTrials.gov Identifikationsnummer: NCT00477269) bleiben abzuwarten. Auch wenn klinische Wirksamkeit im Rahmen anti-tumoröser Therapie durch Inhibierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors belegt ist, muss das signifikante Nebenwirkungsprofil benannt werden.<sup>73, 74</sup> Die Entwicklung von Tyrosinkinase-Inhibitoren mit verbessertem Wirkungsprofil bei reduzierter Nebenwirkungsrate ist daher eine Herausforderung der kommenden Jahre.

Während experimentelle Befunde auf einen kardiovaskulo-protectiven Effekt von Östrogenen hinweisen, einschließlich der Originalarbeit 1, kann auf dem Boden der derzeitigen klinischen Datenlage keine Hormonersatztherapie zur Prophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse generell empfohlen werden. So geht zwar in epidemiologischen Untersuchungen eine Behandlung mit Östrogenen zur Therapie typischer Postmenopausen-Beschwerden mit günstigen Effekten auf die koronare Herzkrankheit einher, prospektive, randomisierte Interventionsstudien ergaben demgegenüber keinen Nutzen bzw. Schutz gegenüber kardiovaskulären Ereignissen durch Östrogentherapie. Allerdings wurden bisherige Studien als „sekundäre“ Interventionsstudien durchgeführt (Ersatztherapie in der Regel > 10 Jahre postmenopausal). Das Konzept einer Primärprävention wurde hingegen bislang nicht ausreichend getestet. Durch die noch nicht abgeschlossenen KEEPS-<sup>75</sup> und ELITE-Studien (ClinicalTrials.gov Identifikationsnummern: NCT00114517 und NCT00154180) wird gerade diese Fragestellung näher gehend bearbeitet.

Die Rezeptortyrosinkinasen-induzierte Signaltransduktion wird neben der Ligandenexposition und der Rezeptorexpression zudem maßgeblich durch PTPs beeinflusst. Daher stellen auch PTPs als Komponenten der Tyrosinsignaltransduktion einen möglichen Ansatz zur sinnvollen therapeutischen Beeinflussung dar. Derzeitige Bestrebungen im Rahmen der PTP-Forschung beinhalten zum einen die bessere Charakterisierung der PTP-Aktivität bei pathophysiologischen Gewebeumbauprozessen, so bei der vaskulären Restenose<sup>59</sup> (Originalarbeit 4) und beim Tumorwachstum.<sup>76</sup> Zum anderen stellt der kürzlich identifizierte Mechanismus der post-translationalen Oxidation des *active-site* Cysteins in der katalytischen Domäne von PTPs einen weiteren Forschungsschwerpunkt dar.<sup>77, 78</sup> In der Reaktivierung von durch Oxidation inhibierten PTPs liegt zudem ein potentieller Ansatz zur Verhinderung pathophysiologischer Gewebeumbauprozesse. Dies wurde in der Originalarbeit 5 in einem Modell der Restenose nach vaskulärer Schädigung untersucht.<sup>79</sup> Möglicherweise besteht damit ein neues therapeutisches Konzept beim Diabetes mellitus, wobei allerdings auch widersprüchliche Befunde vorliegen.<sup>80</sup> Unbestritten stellen PTPs endogene Enzyme dar, die zur Behandlung des Diabetes mellitus therapeutisch beeinflusst werden könnten.<sup>81</sup> Eine Reihe akademischer und industrieller Ansätze

versuchen, wirksame und selektive PTP-Inhibitoren mit anti-diabetischen Effekten durch Aktivierung der Insulin-Signaltransduktion zu entwickeln. Voraussetzung dafür ist eine genauere Kenntnis der Regulation von Insulinrezeptor-antagonisierenden PTPs *in vivo*.

Ein PTP-Aktivator oder auch PTP-Inhibitor im kardiovaskulären Bereich ist bislang nicht verfügbar. Der einzige sich zurzeit in klinischer Anwendung befindender PTP-Inhibitor ist Stibogluconat, der im Rahmen der Leishmaniose eingesetzt wird<sup>82</sup> und hierbei als SHP-1-Hemmstoff fungiert.<sup>83</sup> Die vorliegende Habilitationsschrift konnte experimentelle Evidenz erbringen, dass die (Re-)Aktivierung von PTPs pharmakologisch gelingen kann und dies mit einer Reduktion der Neointimaentwicklung vergesellschaftet ist (Originalarbeit 5).<sup>79</sup> Die (Re-)Aktivierung wurde hierbei über den Umweg der antioxidativen Wirkung erlangt. Direkte PTP-Aktivatoren stellen aber eine zukunftsreiche Strategie bei proliferativen Gewebeumbauprozessen dar, nicht zuletzt bei okklusiven, vaskulären Veränderungen.

Umgekehrt sind drei weitere therapeutische Ansätze denkbar:

- Sinnvoll erscheint erstens die Inhibition von solchen PTPs, die positiv auf die Tyrosinkinase-Signaltransduktion wirken, beispielsweise SHP-2. Hierbei könnte durch Inhibitoren ein therapeutischer anti-proliferativer Effekt erreicht werden.
- Vor dem Hintergrund der mit der Atherosklerose und Restenose assoziierten endothelialen Dysfunktion, die mit einem reduzierten Endothelzell-Überleben verknüpft sein kann, sind zweitens solche Ansätze geeignet, die die Proliferation und die Migration von Endothelzellen verbessern. Darunter fallen PTP-Inhibitoren, die gegen jene PTPs gerichtet sind, die antagonistisch gegen Rezeptortyrosinkinasen, beispielsweise *Vascular Endothelial Growth Factor-2* Rezeptoren als maßgebliche Endothelzell-Rezeptortyrosinkinasen, gerichtet sind, um die Aktivität dieser Rezeptoren zu steigern.
- Drittens ist die Beeinflussung des Wachstums von Kollateralen denkbar, die eine Gewebeischämie auf dem Boden okklusiver, vaskulärer Gefäßveränderungen kompensieren könnten. Aufgrund der maßgeblichen Rolle von Monozyten/ Makrophagen, Endothelzellen und von glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen des Kollateralwachstums, sollten PTP-Inhibitoren gegen PTPs, die den Aktivitätszustand von Rezeptortyrosinkinasen dieser Zellen beeinflussen, zu einem wirksamen Gefäßwachstum führen mit evtl. Ausgleich der Gewebeischämie.

Ein weiterer Aspekt veränderter PDGF  $\beta$ -Rezeptor-abhängiger Funktionen glatter Gefäßmuskelzellen bzw. die Beeinflussung okklusiver, vaskulärer Umbauprozesse wurde in den Originalarbeiten 2 und 3 behandelt. So wurde in Zellkulturexperimenten die Hemmung des Liganden-aktivierten PDGF  $\beta$ -Rezeptors in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen durch Ritonavir, einer Komponente von HAART, nachgewiesen (Originalarbeit 2). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Kombinationstherapie antiretroviraler Pharmaka zur Progression der Neointimaentwicklung und Hemmung der endothelialen Regenerationsfähigkeit in einem experimentellen Modell vaskulärer Schädigung führt (Originalarbeit 3). Somit wurde in letzterer Arbeit eine Beeinflussung okklusiver, vaskulärer Umbauprozesse durch HIV-Therapeutika selbst – ohne HIV-Infektion – nachgewiesen. Auch mehrere klinische Untersuchungen stützen die Annahme, dass HAART sowie HIV selbst mit einer Steigerung kardiovaskulärer Ereignisse verknüpft sind.<sup>39-42</sup> Neben direkten vaskulären Effekten sind daran vermutlich ebenso metabolische Veränderungen (Dyslipidämien, Insulinresistenz) beteiligt, die eine indirekte vaskuläre Beeinflussung darstellen. Daher bleibt ein komplementärer Ansatz bei der HIV-Therapie eine große interdisziplinäre Herausforderung zur bestmöglichen Morbiditäts- und Mortalitätsreduktion von Patienten mit HIV und HAART. Hierbei sollten die direkten und indirekten vaskulären Effekte von HIV und HAART mit berücksichtigt werden.

Zusammengefasst stellen Komponenten der Tyrosinsignaltransduktion – Rezeptortyrosinkinasen und Protein-Tyrosin-Phosphatasen – bereits heutzutage oder aber künftige potentielle therapeutische Zielstrukturen bei Gewebeumbauprozessen dar, einschließlich der in dieser Habilitationsschrift behandelten vaskulären Umbauprozesse. Insbesondere die Modifizierung der Aktivität von PTPs könnte sich als wirksame Strategie zur therapeutischen Beeinflussung lumen-reduzierender vaskulärer Pathologien erweisen.

## 5. Zusammenfassung

Gefäß- und ihre Folgeerkrankungen stellen die häufigste Todesursache in der westlichen Welt dar. Daher sind Strategien zur Reduzierung stenosierender, vaskulärer Umbauprozesse therapeutisch wünschenswert. Dies schließt die genaue Kenntnis der zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen von Gefäßerkrankungen, wie der Atherosklerose und der Restenose, mit ein. Experimentelle Daten stützen die Annahme, dass die *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF)-Signaltransduktion von zentraler Bedeutung im Rahmen dieser Prozesse ist. Verschiedene Aspekte stenosierender, vaskulärer Gewebeumbauprozesse, insbesondere Komponenten der PDGF-Signaltransduktion, wurden in der vorliegenden Habilitationsschrift untersucht.

So konnte in der Originalarbeit 1 gezeigt werden, dass 17-beta Östradiol die PDGF-BB-induzierte Signaltransduktion und Zellfunktionen in glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro* signifikant beeinflusst. Während ein Einfluss auf die PDGF  $\beta$ -Rezeptor Expression, Liganden-induzierte Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung sowie Rekrutierung zytosolischer Bindungsproteine ausgeschlossen wurde, bestand eine konzentrationsabhängige Reduktion der PDGF-BB-induzierten DNA-Synthese und Zellmigration. Dieser inhibitorische Effekt durch 17-beta Östradiol wurde *downstream* des PDGF  $\beta$ -Rezeptors durch Verminderung der Aktivierung des kleinen GTP-bindenden Proteins rac-1 vermittelt. So führte auch die transiente Überexprimierung von dominant-negativem rac-1 sowie ein rac-1 Inhibitor zur Hemmung der PDGF-BB-induzierten Migration glatter Gefäßmuskelzellen. Diese Daten bieten eine mögliche molekulare Erklärung vaskuloprotektiver Effekte von Östrogenen.

Die Bedeutung antiretroviraler Therapeutika für Zellfunktionen glatter Gefäßmuskelzellen *in vitro* sowie im Rahmen experimentell induzierter vaskulärer Gewebeumbauprozesse *in vivo* wurde in den Originalarbeiten 2 und 3 untersucht. Während die Analyse der direkten Effekte von Ritonavir auf glatte Gefäßmuskelzellen eine Interferenz mit PDGF-BB-induzierter Tyrosinphosphorylierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors sowie der DNA-Synthese sowie Zellmigration und damit einen Wachstum-inhibierenden Einfluss von Ritonavir außerhalb von zytotoxischen und pro-apoptotischen Effekten zeigte (Originalarbeit 2), bestand eine Progression der vaskulären Umbauprozesse und eine Hemmung endothelialer Regenerationskapazität durch HAART in einem Tiermodell vaskulärer Schädigung (Originalarbeit 3). Somit stehen potentiell direkte, protektive Effekte *in vitro* unerwünschten Effekten *in vivo* gegenüber. Diese Daten zeigen, dass zum einen anti-restenotische Eigenschaften von Ritonavir auf einer zellulären und funktionellen Ebene bestehen, zum anderen, dass HAART möglicherweise negativen Einfluss auf den endothelialen Heilungsprozess bzw. den vaskulären Umbau nach Gefäßverletzung besitzt.

Neben der Liganden-Exposition wird die Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen wie dem PDGF  $\beta$ -Rezeptor maßgeblich durch Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) reguliert. Dies beinhaltet auch die Beeinflussung der nachgeschalteten Signaltransduktion sowie zellulärer Funktionen. Die Bedeutung von PTPs in stenosierenden, vaskulären Umbauprozessen wurde in Modellen der vaskulären Schädigung *in vivo* analysiert. Zum einen konnte gezeigt werden, dass PTPs zeit- und schicht-spezifisch während der Neointimaentwicklung reguliert wurden und dass dies die Aktivität des PDGF  $\beta$ -Rezeptors beeinflusste. Hierbei scheint insbesondere die transiente Herunterregulierung der PTP DEP-1 von Bedeutung zu sein (Originalarbeit 4). Zum anderen wurde die Hypothese getestet und bestätigt, dass die Applikation von Antioxidantien durch Hemmung der Oxidation des *active-site* Cysteins in der katalytischen Domäne PTPs (re-)aktiviert, was zur Antagonisierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors *in vivo* führte und konsekutiv die Neointimaentwicklung nach Gefäßverletzung reduzierte (Originalarbeit 5). Hierin liegt möglicherweise ein therapeutischer Ansatz zur Modifizierung von dysregulierten Gewebeumbauprozessen, die mit gesteigerter Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen vergesellschaftet sind.

**6. Literaturverzeichnis**

1. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994;330(20):1431-1438.
2. Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Klein KP. Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates. *JAMA.* 1994;271(4):289-294.
3. Mirzaei M, Truswell S, Taylor R, Leeder SR. Coronary Heart Disease (CHD) epidemics: not all the same. *Heart.* 2008.
4. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005;111(25):3481-3488.
5. Ross R. Atherosclerosis - An inflammatory disease - Reply. *New England Journal of Medicine.* 1999;340(24):1929-1929.
6. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans - Macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation.* 1998;98(3):224-233.
7. Orford JL, Selwyn AP, Ganz P, Popma JJ, Rogers C. The comparative pathobiology of atherosclerosis and restenosis. *American Journal of Cardiology.* 2000;86(4B):6H-11H.
8. Austin GE, Ratliff NB, Hollman J, Tabei S, Phillips DF. Intimal proliferation of smooth muscle cells as an explanation for recurrent coronary artery stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1985;6(2):369-375.
9. Hurlimann D, Weber R, Enseleit F, Luscher TF. [HIV infection, antiretroviral therapy, and endothelium]. *Herz.* 2005;30(6):472-480.
10. Libby P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2006;83(2):456s-460s.
11. Rosenkranz S, Schneider CA, Erdmann EH. *Prävention atherosklerotischer Erkrankungen.* Vol 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006.
12. Heldin CH, Westermark B, Wasteson A. Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(8):3722-3726.
13. Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. Platelet Alpha-Granules Contain a Growth-Factor for Fibroblasts. *Blood.* 1979;53(6):1043-1052.
14. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000;103(2):211-225.
15. Heldin CH, Eriksson U, Ostman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys.* 2002;398(2):284-290.
16. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362(6423):801-809.
17. Giese NA, Marijjanowski MM, McCook O, Hancock A, Ramakrishnan V, Fretto LJ, Chen C, Kelly AB, Koziol JA, Wilcox JN, Hanson SR. The role of alpha and beta platelet-derived growth factor receptor in the vascular response to injury in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(4):900-909.
18. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(4):237-254.
19. Fishbein I, Waltenberger J, Banai S, Rabinovich L, Chorny M, Levitzki A, Gazit A, Huber R, Mayr U, Gertz SD, Golomb G. Local delivery of platelet-derived growth factor receptor-specific tyrophostin inhibits neointimal formation in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(3):667-676.
20. Leppanen O, Janjic N, Carlsson MA, Pietras K, Levin M, Vargeese C, Green LS, Bergqvist D, Ostman A, Heldin CH. Intimal hyperplasia recurs after removal of PDGF-AB and -BB inhibition in the rat carotid artery injury model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(11):E89-95.
21. Klinghoffer RA, Mueting-Nelsen PF, Faerman A, Shani M, Soriano P. The two PDGF receptors maintain conserved signaling in vivo despite divergent embryological functions. *Mol Cell.* 2001;7(2):343-354.

22. Banai S, Wolf Y, Golomb G, Pearle A, Waltenberger J, Fishbein I, Schneider A, Gazit A, Perez L, Huber R, Lazarovich G, Rabinovich L, Levitzki A, Gertz SD. PDGF-receptor tyrosine kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine. *Circulation*. 1998;97(19):1960-1969.
23. Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RGW, Herz J. LRP: Role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science*. 2003;300(5617):329-332.
24. Akishita M, Ouchi Y, Miyoshi H, Kozaki K, Inoue S, Ishikawa M, Eto M, Toba K, Orimo H. Estrogen inhibits cuff-induced intimal thickening of rat femoral artery: effects on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1997;130(1-2):1-10.
25. Dubey RK, Jackson EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280(3):F365-388.
26. Barchiesi F, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Fingerle J, Dubey RK. Methoxyestradiols mediate estradiol-induced antimitogenesis in human aortic SMCs. *Hypertension*. 2002;39(4):874-879.
27. Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med*. 1997;336(25):1769-1775.
28. Laufs U, Adam O, Strehlow K, Wassmann S, Konkol C, Laufs K, Schmidt W, Bohm M, Nickenig G. Down-regulation of Rac-1 GTPase by Estrogen. *J Biol Chem*. 2003;278(8):5956-5962.
29. Nickenig G, Baumer AT, Grohe C, Kahlert S, Strehlow K, Rosenkranz S, Stablein A, Beckers F, Smits JF, Daemen MJ, Vetter H, Bohm M. Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo. *Circulation*. 1998;97(22):2197-2201.
30. Zacharia LC, Gogos JA, Karayiorgou M, Jackson EK, Gillespie DG, Barchiesi F, Dubey RK. Methoxyestradiols mediate the antimitogenic effects of 17beta-estradiol: direct evidence from catechol-O-methyltransferase-knockout mice. *Circulation*. 2003;108(24):2974-2978.
31. Dubey RK, Gillespie DG, Imthurn B, Rosselli M, Jackson EK, Keller PJ. Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999;33(1 Pt 2):177-182.
32. Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK, Szklo M. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *N Engl J Med*. 1993;328(15):1069-1075.
33. Sasaki T, Ohno Y, Otsuka K, Suzawa T, Suzuki H, Saruta T. Oestrogen attenuates the increases in blood pressure and platelet aggregation in ovariectomized and salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens*. 2000;18(7):911-917.
34. Oparil S, Levine RL, Chen SJ, Durand J, Chen YF. Sexually dimorphic response of the balloon-injured rat carotid artery to hormone treatment. *Circulation*. 1997;95(5):1301-1307.
35. Bonnet F, Morlat P, Chene G, Mercie P, Neau D, Chossat I, Decoin M, Djossou F, Beylot J, Dabis F. Causes of death among HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy, Bordeaux, France, 1998-1999. *HIV Med*. 2002;3(3):195-199.
36. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338(13):853-860.
37. Bozzette SA, Ake CF, Tam HK, Chang SW, Louis TA. Cardiovascular and cerebrovascular events in patients treated for human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 2003;348(8):702-710.
38. Kwong GP, Ghani AC, Rode RA, Bartley LM, Cowling BJ, da Silva B, Donnelly CA, van Sighem AI, Cameron DW, Danner SA, de Wolf F, Anderson RM. Comparison of the risks of atherosclerotic events versus death from other causes associated with antiretroviral use. *AIDS*. 2006;20(15):1941-1950.

39. Currier JS, Taylor A, Boyd F, Dezii CM, Kawabata H, Burtcel B, Maa JF, Hodder S. Coronary heart disease in HIV-infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;33(4):506-512.
40. Friis-Moller N, Weber R, Reiss P, Thiebaut R, Kirk O, d'Arminio Monforte A, Pradier C, Morfeldt L, Mateu S, Law M, El-Sadr W, De Wit S, Sabin CA, Phillips AN, Lundgren JD. Cardiovascular disease risk factors in HIV patients--association with antiretroviral therapy. Results from the DAD study. *AIDS*. 2003;17(8):1179-1193.
41. Holmberg SD, Moorman AC, Williamson JM, Tong TC, Ward DJ, Wood KC, Greenberg AE, Janssen RS. Protease inhibitors and cardiovascular outcomes in patients with HIV-1. *Lancet*. 2002;360(9347):1747-1748.
42. Sabin CA, Worm SW, Weber R, Reiss P, El-Sadr W, Dabis F, De Wit S, Law M, Monforte AD, Friis-Moller N, Kirk O, Pradier C, Weller I, Phillips AN, Lundgren JD, Grp DS. Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors and risk of myocardial infarction in HIV-infected patients enrolled in the D : A : D study: a multi-cohort collaboration. *Lancet*. 2008;371(9622):1417-1426.
43. Chironi G, Escaut L, Gariepy J, Cogny A, Teicher E, Monsuez JJ, Levenson J, Simon A, Vittecoq D. Brief report: carotid intima-media thickness in heavily pretreated HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003;32(5):490-493.
44. Kingsley LA, Cuervo-Rojas J, Munoz A, Palella FJ, Post W, Witt MD, Budoff M, Kuller L. Subclinical coronary atherosclerosis, HIV infection and antiretroviral therapy: Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS*. 2008;22(13):1589-1599.
45. Lenhard JM, Furfine ES, Jain RG, Ittoop O, Orband-Miller LA, Blanchard SG, Paulik MA, Weiel JE. HIV protease inhibitors block adipogenesis and increase lipolysis in vitro. *Antiviral Res*. 2000;47(2):121-129.
46. Zhong DS, Lu XH, Conklin BS, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C. HIV protease inhibitor ritonavir induces cytotoxicity of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(10):1560-1566.
47. Stein JH, Klein MA, Bellehumeur JL, McBride PE, Wiebe DA, Otvos JD, Sosman JM. Use of human immunodeficiency virus-1 protease inhibitors is associated with atherogenic lipoprotein changes and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2001;104(3):257-262.
48. Wolf K, Tsakiris DA, Weber R, Erb P, Battegay M. Antiretroviral therapy reduces markers of endothelial and coagulation activation in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*. 2002;185(4):456-462.
49. Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*. 1991;253(5018):401-406.
50. Walton KM, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem*. 1993;62:101-120.
51. Neel BG, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(2):193-204.
52. Tonks NK, Neel BG. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell*. 1996;87(3):365-368.
53. Mustelin T, Feng GS, Bottini N, Alonso A, Kholod N, Birle D, Merlo J, Huynh H. Protein tyrosine phosphatases. *Front Biosci*. 2002;7:d85-142.
54. Ostman A, Bohmer FD. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol*. 2001;11(6):258-266.
55. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004;117(6):699-711.
56. Östman A, Kappert K. Protein Tyrosine Phosphatases. In: Aird W, ed. *The Endothelial Cell*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
57. Persson C, Kappert K, Engstrom U, Ostman A, Sjoblom T. An antibody-based method for monitoring in vivo oxidation of protein tyrosine phosphatases. *Methods*. 2005;35(1):37-43.
58. Persson C, Sjoblom T, Groen A, Kappert K, Engstrom U, Hellman U, Heldin CH, den Hertog J, Ostman A. Preferential oxidation of the second phosphatase domain of receptor-like PTP-alpha revealed by an antibody against oxidized protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):1886-1891.

59. Kappert K, Paulsson J, Sparwel J, Leppanen O, Hellberg C, Ostman A, Micke P. Dynamic changes in the expression of DEP-1 and other PDGF receptor-antagonizing PTPs during onset and termination of neointima formation. *FASEB J*. 2007;21(2):523-534.
60. Ostman A, Yang Q, Tonks NK. Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(21):9680-9684.
61. Berset TA, Hoier EF, Hajnal A. The *C. elegans* homolog of the mammalian tumor suppressor Dep-1/Sccl1 inhibits EGFR signaling to regulate binary cell fate decisions. *Genes Dev*. 2005;19(11):1328-1340.
62. Seki N, Hashimoto N, Suzuki Y, Mori S, Amano K, Saito Y. Role of src homology 2-containing tyrosine phosphatase 2 on proliferation of rat smooth muscle cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2002;22(7):1081-1085.
63. Wright MB, Seifert RA, Bowen-Pope DF. Protein-tyrosine phosphatases in the vessel wall - Differential expression after acute arterial injury. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2000;20(5):1189-1198.
64. Markova B, Herrlich P, Ronnstrand L, Bohmer FD. Identification of protein tyrosine phosphatases associating with the PDGF receptor. *Biochemistry*. 2003;42(9):2691-2699.
65. Persson C, Savenhed C, Bourdeau A, Tremblay ML, Markova B, Bohmer FD, Haj FG, Neel BG, Elson A, Heldin CH, Ronnstrand L, Ostman A, Hellberg C. Site-selective regulation of platelet-derived growth factor beta receptor tyrosine phosphorylation by T-cell protein tyrosine phosphatase. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24(5):2190-2201.
66. Kovalenko M, Denner K, Sandstrom J, Persson C, Gross S, Jandt E, Vilella R, Bohmer F, Ostman A. Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(21):16219-16226.
67. Jandt E, Denner K, Kovalenko M, Ostman A, Bohmer FD. The protein-tyrosine phosphatase DEP-1 modulates growth factor-stimulated cell migration and cell-matrix adhesion. *Oncogene*. 2003;22(27):4175-4185.
68. Booth RF, Martin JF, Honey AC, Hassall DG, Beesley JE, Moncada S. Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation. *Atherosclerosis*. 1989;76(2-3):257-268.
69. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22(10):1276-1312.
70. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*. 1991;253(5024):1129-1132.
71. Serruys PW, Banz K, Darcis T, Mignot A, van Es GA, Schwicker D. Results of a Meta-Analysis of Trapidil, a PDGF Inhibitor N A Sufficient Reason for a Second Look to the Pharmacological Approach to Restenosis. *J Invasive Cardiol*. 1997;9(8):505-512.
72. Zohlnhofer D, Hausleiter J, Kastrati A, Mehilli J, Goos C, Schuhlen H, Pache J, Pogatsa-Murray G, Heemann U, Dirschinger J, Schomig A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial on restenosis prevention by the receptor tyrosine kinase inhibitor imatinib. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(11):1999-2003.
73. Sankhala KK, Papadopoulos KP. Future options for imatinib mesilate-resistant tumors. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007;16(10):1549-1560.
74. Reardon DA, Egorin MJ, Quinn JA, Rich JN, Gururangan S, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Sathornsumetee S, Provenzale JM, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, Badruddoja MA, McLendon RE, Lagattuta TF, Kiczielinski KP, Dresemann G, Sampson JH, Friedman AH, Salvado AJ, Friedman HS. Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2005;23(36):9359-9368.
75. Harman SM, Brinton EA, Cedars M, Lobo R, Manson JE, Merriam GR, Miller VM, Naftolin F, Santoro N. KEEPS: The Kronos Early Estrogen Prevention Study. *Climacteric*. 2005;8(1):3-12.
76. Ostman A, Hellberg C, Bohmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):307-320.

77. Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han YH, Yu DY, Park HS, Kim KY, Lee JS, Choi C, Bae YS, Lee BI, Rhee SG, Kang SW. Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature*. 2005;435(7040):347-353.
78. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(11):833-846.
79. Kappert K, Sparwel J, Sandin A, Seiler A, Siebolts U, Leppanen O, Rosenkranz S, Ostman A. Antioxidants relieve phosphatase inhibition and reduce PDGF signaling in cultured VSMCs and in restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2644-2651.
80. Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes*. 2005;54(2):311-321.
81. Kasibhatla B, Wos J, Peters KG. Targeting protein tyrosine phosphatase to enhance insulin action for the potential treatment of diabetes. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007;8(10):805-813.
82. Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2002;15(6):593-598.
83. Pathak MK, Yi T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J Immunol*. 2001;167(6):3391-3397.

## 7. Danksagung

Herrn Professor Dr. Thomas Unger danke ich für die umfassende wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Arbeit an der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Dabei danke ich insbesondere für die Ermöglichung und Begleitung des Aufbaus einer eigenen Arbeitsgruppe im Institut für Pharmakologie am Center for Cardiovascular Research.

Herrn Professor Dr. Kristof Graf verdanke ich die Einführung in das Forschungsgebiet der vaskulären Umbauprozesse. Er ermöglichte mir den ersten experimentell-wissenschaftlichen Kontakt. Dabei danke ich auch Professor Dr. Eckart Fleck, PD Dr. Philipp Stawowy, Dr. Florian Blaschke und Dr. Oliver Hintz, die mir bei einem unkomplizierten und erfolgreichen wissenschaftlichen Einstieg am Deutschen Herzzentrum Berlin behilflich waren.

Herrn PD Dr. Stephan Rosenkranz danke ich für die Integration in seine Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Köln. Er bot mir ein wissenschaftliches, finanzielles und freundschaftliches Umfeld, in dem ich viel gelernt habe. Entscheidend dazu beigetragen haben Frau Manuela Uebel, Dr. Marius Vantler und Dr. Evren Caglayan; nicht zuletzt danke ich Herrn Professor Dr. Erland Erdmann, der durch seine ruhige, faire und zuverlässige Art mir als jungen Kollegen große Freiheiten gab. Herr PD Dr. Stephan Rosenkranz half mir auch entscheidend bei der erfolgreichen Einwerbung von drei Forschungsstipendien und den ersten eigenen Drittmitteln.

Herrn Professor Arne Östman danke ich für die Einführung in sein Forschungsgebiet der Protein-Tyrosin-Phosphatasen während meiner dreijährigen Zeit als Post-Doktorand am Ludwig Institute for Cancer Research in Uppsala und am Cancer Centrum Karolinska in Stockholm. Durch seine ganz eigene, besondere Art trug er durch die mir gegebene Entfaltungsmöglichkeit maßgeblich zur Entstehung dieser Habilitationsschrift bei. Zahlreiche Kolleginnen und Kollegen halfen mir emotional, wissenschaftlich und rein freundschaftlich während meiner Zeit in Schweden. Stellvertretend für sie möchte ich meinem Freund Docent Dr. Patrick Micke danken.

Abschließend sei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, Center for Cardiovascular Research, Charité-Universitätsmedizin gedankt, die dazu beitrugen, dass ich mit großer Freiheit meine Forschungsschwerpunkte weitertreiben konnte. Stellvertretend danke ich Herrn Professor Dr. Ulrich Kintscher für seine wissenschaftlichen Anregungen und die Kollegialität, die nun schon seit unserer gemeinsamen Zeit am Deutschen Herzzentrum andauert.

Ich danke ganz besonders Frau Sabine Schmidt und unserem Sohn Mats Frederik Kappert für ihre liebevolle Unterstützung und ihre Toleranz.

Die vorliegende Arbeit wurde umfassend von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Universitätsklinikum Köln, dem Karolinska Institut in Stockholm, dem Deutschen Herzzentrum Berlin sowie durch die Charité-Universitätsmedizin Berlin unterstützt.

**8. Erklärung**

## § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift