

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin, klinische Chemie und Pathobiochemie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) als  
interventionelle Zielstrukturen der Arteriogenese*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Hackbusch  
aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Abstract.....	2
1. Einleitung und Zielstellung .....	3
2. Material und Methoden .....	4
2.1. Tiermodelle und Studiendesign .....	4
2.2. Immunhistochemie (IHC) und Proximity Ligation Assay (PLA).....	5
2.3. Zellkultur.....	5
2.4. Expressionsanalysen .....	5
2.5. Proteinbiochemische Analysen .....	5
2.6. Mikrosphärenperfusion und Mikro-CT Analysen .....	6
2.7. Statistische Auswertung .....	6
3. Ergebnisse .....	6
3.1. Knockout von Density Enhanced Phosphatase (DEP)-1 vermindert die zerebrovaskuläre Reservekapazität in einem Arteriogenesemodell der Maus (Publikation 1 [P1], Erstautor) .....	6
3.2. Inhibierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen steigert das kollaterale Gefäßwachstum in der Ratte (Publikation 2 [P2], Erstautor (geteilt)) .....	8
3.3. Adventitielle Regulation von Protein-Tyrosin-Phosphatasen bei der Neointimabildung in der Ratte (Publikation 3 [P3], Ko-Autor).....	9
4. Diskussion .....	10
Literaturverzeichnis .....	22
Eidesstattliche Versicherung.....	I
Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen .....	II
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen .....	IV
Lebenslauf .....	VII
Komplette Publikationsliste .....	IX
Liste der ausgewählten Publikationen.....	X
Danksagung.....	XI

## Zusammenfassung

Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) gelten als gegen-regulatorische Enzymgruppe von Tyrosinkinase und sind entscheidend an der Phosphotyrosin-abhängigen Signaltransduktion beteiligt. Klassische PTPs bilden dabei eine Gruppe sowohl membranassoziierter als auch zytosolischer Hydrolasen, die sich durch ihre exklusive Phosphotyrosin-Substratspezifität auszeichnet. In der vorliegenden Arbeit wurden PTPs als potentiell therapeutische Zielstrukturen zur Beeinflussung der Kollateralisierung (Arteriogenese) untersucht. Durch die Proliferation präexistenter Gefäße und konsekutive Gefäßdurchmesserzunahme ist die Arteriogenese in der Lage, der durch eine stenotische Erkrankung hervorgerufene Minderversorgung entgegenzuwirken.

In zwei funktionellen Tiermodellen, der Maus und der Ratte, wurde durch operative Modifikation der Blutflussdynamik (Karotisligatur (CCAO) bzw. 3-Gefäßverschluss (3-VO)) zerebrales Kollateralwachstum induziert. In einem konventionellen *knockout* der Maus bzw. durch pharmakologische Behandlung in der Ratte wurde anschließend die Bedeutung von PTPs für die Arteriogenese untersucht. Mäuse mit einem *knockout* der PTP *Density-Enhanced Phosphatase* (DEP)-1 zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren nach Arteriogenese-induzierender CCAO-Operation eine signifikant reduzierte zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC). Demgegenüber war eine morphologische Zunahme der Durchmesser zerebraler Gefäße in DEP-1 *knockout*-Tieren nicht nachweisbar. Genexpressionsanalysen in arteriellem Zielgewebe (*Arteria cerebri anterior*, ACA) zeigten eine signifikante Abnahme von *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF)-B-Transkripten in DEP-1 *knockout*-Mäusen. *In vitro*-Experimente bestätigten eine transkriptionelle Abnahme von PDGF-B nach einem *knockdown* von DEP-1 in kultivierten Endothelzellen. Die Analyse eines potentiellen Effektes auf das periphere Kollateralwachstum konnte beim Vergleich von Wildtyp- und DEP-1 *knockout*-Mäusen nicht festgestellt werden.

Die Bedeutung einer pharmakologischen pan-PTP-Inhibierung und die spezifische Hemmung der PTPs *Src homology 2 domain tyrosine phosphatase* (SHP)-1 und PTP1B erfolgte im 3-VO Modell der Ratte. Die Inhibierung der pan-PTP- und PTP1B-Aktivität führte, insbesondere in der posterioren Zerebralarterie (PCA), zu einer gesteigerten Gefäßproliferation und signifikant erhöhten Gefäßdurchmesserzunahme. Die PTP1B-Inhibierung resultierte zudem in einer funktionell verbesserten CVRC. Die

pan-PTP- und die PTP1B-Hemmung führten zusätzlich zu einer Hyperphosphorylierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors. Zusammenfassend konnten die hier erarbeiteten Daten erstmals eine generelle Relevanz von PTPs beim Kollateralwachstum zeigen. Insbesondere PTP1B wurde dabei als negativer Regulator und potentielle therapeutische Zielstruktur zur vorteilhaften Beeinflussung der Arteriogenese identifiziert.

## **Abstract**

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) are considered as a primarily opposing enzyme group to tyrosine kinases and are therefore in particular antagonizing intracellular phosphotyrosine dependent signaling events. The group of classical PTPs is composed of membrane associated as well as cytosolic enzymes with a solely phosphotyrosine substrate specificity. Here we analyzed the impact of PTP-inhibition on collateral growth (arteriogenesis). By the proliferation of pre-existing arterioles, arteriogenesis as a vascular remodeling process is leading to the development of fully functional arterial vessels to overcome ischemic related circulatory deficits. In the present work, we therefore determined the potential of PTPs as pharmacological targets to therapeutically enhance collateral growth - arteriogenesis.

Using two animal models of cerebral hypoperfusion in mice (permanent occlusion of the common carotid artery (CCAO)) and rats (three-vessel-occlusion (3-VO)), cerebral collateral growth was evaluated. Based on these models of induced arteriogenesis the relevance of individual PTPs was examined via conventional PTP knockout or pharmacological intervention. In mice deficient for the receptor-like PTP *density-enhanced phosphatase* (DEP)-1, a significantly reduced cerebrovascular reserve capacity (CVRC) was detected compared to wild-type animals. However, morphological changes, assessed by measuring the cerebral vessel diameters, were not detected. Gene expression analysis in target tissues (*Arteria cerebri anterior*, ACA) revealed a significant reduction in platelet-derived growth factor (PDGF)-B transcripts in DEP-1 knockout mice compared to wild-type animals. Additionally, *in vitro* experiments in cultured endothelial cells confirmed reduced PDGF-B expression after DEP-1 knockdown. Examining a peripheral vascular effect after femoral artery ligation did not show significant alterations comparing knockout and wild-type mice.

Pan-PTP-inhibition and specific inhibition of Src homology 2 domain tyrosine phosphatase SHP-1 and PTP1B was performed in a 3-VO model in rats. Inhibition of both pan-PTP- and PTP1B-activity resulted in significantly elevated cerebrovascular diameter gain, particularly in the posterior cerebral artery (PCA). PTP1B-inhibition furthermore led to improved CVRC. Under pan-PTP- and PTP1B-inhibition a hyperphosphorylation of the PDGF  $\beta$ -receptor was detected. Our analysis did not reveal a significant impact of SHP-1 in cerebral collateral growth. Taken together, our data point towards a to date unrecognized relevance of PTPs during the vascular remodeling process of arteriogenesis. Especially PTP1B was identified as a negative regulator and potential therapeutical target in pharmacological induced arteriogenesis.

## 1. Einleitung und Zielstellung

Jedes Jahr erleiden etwa 16 Millionen Menschen weltweit einen Schlaganfall bei 30%iger Mortalitätsrate. Weitere fünf Millionen tragen bleibende Behinderungen als Folgeerscheinung davon [1]. Die Arteriogenese beschreibt den physiologischen Prozess des Kollateralwachstums präexistenter, arterieller Gefäße und stellt einen potentiell präventiven, wie auch therapeutisch nutzbaren Mechanismus zur Behandlung ischämischer Erkrankungen dar. Durch die Bildung eines endogenen Bypasses können vaskuläre Verschlüsse, Stenosen und die damit verbundenen Defizite einer Minderdurchblutung ggfs. umgangen und die Aufrechterhaltung des Struktur- und Funktionsstoffwechsels gewährleistet werden [2]. Die dem Gefäßwachstum zugrunde liegenden Mechanismen der Proliferation, Differenzierung und Migration von vaskulären und nicht-vaskulären Zellen werden u.a. durch eine Vielzahl von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) reguliert [3]. Beim vaskulären *Remodeling* und der daran beteiligten Signaltransduktion sind insbesondere der *Platelet Derived Growth Factor beta* (PDGF  $\beta$ )-Rezeptor und der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) 2-Rezeptor von Bedeutung [3]. Die Rezeptoraktivierung mündet nach der Phosphotyrosyl-Modifikation der zytosolischen Rezeptordomänen und der Aktivierung und Amplifizierung über Signalproteine in einer spezifischen Zellantwort [4]. Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) unterbinden bzw. reduzieren durch die Hydrolyse des Phosphorsäureesters die RTK-vermittelte Signaltransduktion [5]. Eine Reihe von PTPs, darunter PTP1B und DEP-1, wurden als VEGF- und PDGF  $\beta$ -Rezeptor

antagonisierende Phosphatasen beschrieben [6]. *In vivo*- und *in vitro*-Studien haben gezeigt, dass der funktionelle Verlust dieser PTPs in der Hyperphosphorylierung von RTKs und erwartungsgemäß in gesteigerter Proliferation und Migration von vaskulären Zellen resultiert [7-11].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von PTPs beim vaskulären *Remodeling*, insbesondere der Arteriogenese, untersucht. Durch genetische Ablation oder pharmakologische Intervention wurden ausgewählte PTPs (DEP-1, SHP-1 und PTP1B) auf ihr Potential als therapeutische Zielstrukturen in operativ induzierten Arteriogenesemodellen der Ratte und Maus hinsichtlich des zerebralen bzw. peripheren Kollateralwachstums analysiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tiermodelle und Studiendesign

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von PTPs bei der Arteriogenese wurden in zwei unabhängigen *in vivo*-Studien durchgeführt.

Die Bedeutung der PTP DEP-1 (PTPRJ, CD148) für das periphere und zerebrale Kollateralwachstum wurde in einem konventionellen *knockout*-Modell in der Maus (25-30g) untersucht. Nach Verpaarung heterozygoter Geschwistertiere wurden männliche DEP-1<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäuse (C57BL/6; Deltagen; Stamm: Ptprij (t736)) einem permanenten Verschluss der rechten *Arteria femoralis* (*femoral artery occlusion*; FAO) bzw. der linksseitigen *Arteria carotis communis* (*left common carotid artery occlusion*; CCAO) unterzogen.

Die pharmakologische Inhibition von PTPs wurde in einem zerebralen 3-Gefäßverschlussmodell (*3-vessel-occlusion*, 3-VO) der Ratte (~300g) untersucht. Nach Okklusion der beiden Vertebralarterien und der linken *Arteria carotis communis* wurden männliche Sprague–Dawley Ratten über 7 Tage mit einem Lösungsmittel (0,9 % NaCl) bzw. ausgewählten PTP-Inhibitoren (SHP-1-Inhibitor: Natrium-Stiboglukonat (SSG, Chalbiochem), pan-PTP-Inhibitor: Bis-maltolato-oxovanadium (BMOV, ORGANICA Feinchemie GmbH Wolfen), PTP1B-Inhibitor: AS279 (Merck)) behandelt.

## 2.2. Immunhistochemie (IHC) und Proximity Ligation Assay (PLA)

Gewebsschnitte von 5 µm Schichtdicke wurden auf Superfrost Objektträger (Thermo Scientific) aufgebracht. Die Detektion ausgewählter Zielstrukturen erfolgte nach Standardprotokollen mittels Diaminobenzidin (DAB)-Färbungen (Vector) bzw. Oligonukleotid-konjugierten Sekundärantikörper (Duolink®, Sigma-Aldrich) und anschließender mikroskopischer Visualisierung (Keyence BZ9000).

## 2.3. Zellkultur

Kommerziell erworbene murine Endothel- (ATCC: CRL-2181) und mittels klassischer Explant-Technik gewonnene primäre aortale glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) aus der Ratte wurden in Subkonfluenz kultiviert. In RNAi-Experimenten erfolgte die Transfektion von DEP-1 siRNA und non-targeting siRNA (Dharmacon) mittels Lipofectamin® RNAiMAX (Invitrogen). Zur Untersuchung des PDGF-BB-abhängigen Zellverhaltens glatter Gefäßmuskelzellen wurde rekombinantes PDGF-BB (PeproTech) verwendet.

## 2.4. Expressionsanalysen

Die Isolierung von RNA (RNAeasy Mini Kit, Qiagen) und die Reversetranskriptase-Polymerase-Kettenreaktion (SuperScript® II, Invitrogen) unter Verwendung von oligo dT Primern erfolgte nach Standardprotokollen. Die Genexpressionsanalyse (quantitative-PCR; qPCR) ausgewählter Gene erfolgte mittels SybrGreen (Applied Biosystems) unter Verwendung von *Lightcycler* des Typs Mx3000P (Stratagene; Agilent Technologies, La Jolla, CA).

## 2.5. Proteinbiochemische Analysen

Die Extraktion von Proteinen erfolgte unter nativen Bedingungen in der Gegenwart von Proteaseinhibitoren (*complete mini*, Roche). Die Probenpräparation, Präzipitation mittels *wheat germ agglutinin* (WGA)-Sephrose, *Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), Proteintransfer auf Nitrozellulose- bzw. Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membranen und anschließende Immundetektion erfolgte nach Standardprotokollen.

## *2.6. Mikrosphärenperfusion und Mikro-CT Analysen*

Die Mikro-CT-Messung erfolgte nach Adenosin-induzierter maximaler Vasodilatation und anschließender Injektion von Microfil (MV-122, Flow Tech, Carver, MC, USA). Nach PET/CT wurde das Gefäßnetzwerk und die Gefäßdurchmesseranalyse mittels Amira 5.5.5 Software dargestellt und ausgewertet. Die Mikrosphärenperfusion der peripheren Gefäße erfolgte mit Fluorochrom-konjugierten Mikrosphären bei unterschiedlichen Druckintensitäten. Nach enzymatischem Verdau des muskulären Hinterlaufgewebes wurde die Anzahl immobilisierter Mikrosphären durchflusszytometrisch analysiert.

## *2.7. Statistische Auswertung*

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe der Software IBM SPSS Statistics (Version 12, IBM) statistisch ausgewertet.

# **3. Ergebnisse**

## *3.1. Knockout von Density Enhanced Phosphatase (DEP)-1 vermindert die zerebrovaskuläre Reservekapazität in einem Arteriogenesemodell der Maus (Publikation 1 [P1], Erstautor)*

Zur Bestimmung der Relevanz von DEP-1 beim Kollateralwachstum wurde die zerebrale Arteriogenese mittels CCAO und die periphere Arteriogenese mittels FAO untersucht. Die Charakterisierung des CCAO-Modells bestätigte eine deutliche Induktion des zerebralen Kollateralwachstums, wobei der größte externe Diameterzuwachs bei der *Arteria cerebri anterior* (ACA) vermerkt werden konnte ([P1], Abb.1A und 1B). Zur molekularen Charakterisierung wurden Expressionsanalysen durchgeführt, bei denen das Hauptaugenmerk auf Signalmolekülen mit pro-proliferativen Effekten in Endothelzellen und VSMCs lag. Anhand der aus dem Zielgewebe (ipsilaterale ACA) gewonnenen Genexpressionsdaten konnten keine statistisch relevanten Kandidatengene identifiziert werden, die im Vergleich zu nicht operierten Wildtyp-Tieren differenziell reguliert waren ([P1], Abb. 1C). Sieben Tage nach CCAO waren die Transkriptlevel des PDGF  $\beta$ -Rezeptors und der beiden Liganden PDGF-B und PDGF-D unverändert. Der VEGF2-Rezeptor und VEGF-A zeigten eine



tendenziell reduzierte, jedoch nicht signifikant verminderte Expression. Zusätzlich wurden PTPs in die Analyse mit einbezogen, die als RTK-antagonisierend beschrieben wurden und denen eine gegenregulatorisch Wirkung der PDGF  $\beta$ -Rezeptor- bzw. der VEGF2-Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung zugeschrieben wird. *Vascular endothelial* (VE)-PTP-, SHP-2-, DEP-1- und T-Cell (TC)-PTP-Transkripte waren im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert. Einzig die Expression von PTP1B war in CCAO-Tieren vermindert, allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Das Fehlen einer Regulation von DEP-1 schließt eine generelle Bedeutung beim Kollateralwachstum jedoch nicht aus. Vor diesem Hintergrund und einer bereits beschriebenen PDGF  $\beta$ -Rezeptor bzw. VEGF2-Rezeptor-antagonisierenden Funktion von DEP-1 wurde die Bedeutung von DEP-1 bei der Arteriogenese in einem DEP-1 *knockout*-Modell in C57BL/6 Mäusen untersucht ([P1], Abb. 2A und 2B).

Beim Vergleich von Wildtyp-CCAO und DEP-1<sup>-/-</sup>-CCAO Mäusen konnte kein Einfluss auf das Kollateralwachstum festgestellt werden. Der Durchmesser der untersuchten Gefäße des Circulus Willisi, insbesondere der ACA, war von keinem Zuwachs in den DEP-1<sup>-/-</sup> Mäusen gekennzeichnet ([P1], Abb. 2C). Bei transkriptionellen Untersuchungen in der ACA zeigte sich demgegenüber eine signifikant reduzierte PDGF-B mRNA-Expression. Alle anderen zuvor in der CCAO-Charakterisierung untersuchten Gene blieben 7 Tage nach CCAO beim Vergleich von DEP-1<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Tieren unverändert ([P1], Abb. 2D). Die vaskuläre Expression von PDGF-B als parakrinem Wachstums- und Differenzierungsfaktor von VSMCs erfolgte unter anderem in den lumenauskleidenden Endothelzellen [12]. Vor diesem Hintergrund wurde die Ursache der vaskulär verminderten PDGF-B Expression durch den *knockdown* von DEP-1 in kultivierten Endothelzellen untersucht ([P1], Abb. 3A). Nach erfolgreicher RNA-Interferenz (RNAi) zeigte sich bei unterdrückter DEP-1 Expression *in vitro* ebenso eine verminderte PDGF-B Expression ([P1], Abb. 3B und 3C). Die funktionelle Analyse der CVRC in DEP-1<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte einen signifikant verminderten zerebrovaskulären Blutfluss. Nach Acetazolamid-induzierter maximaler Vasodilatation in Wildtyp- und DEP-1<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte eine signifikante Modulation der zerebrovaskulären Reservekapazität nachgewiesen werden ([P1], Abb. 2D und 2E).

Die weitere Analyse zum Einfluss des DEP-1 *knockouts* auf das periphere Kollateralwachstum erfolgte durch den Vergleich von Kontroll- und DEP-1<sup>-/-</sup>-Tieren nach Mikrosphärenperfusionsanalyse und mikro-CT-Aufnahmen des betreffenden

Hinterlaufes. Auf der Basis der mikro-CT-Daten wurde der Hinterlauf softwarebasiert dreidimensional dargestellt und die Durchmesser der potentiell proliferierenden Gefäße erfasst. Bei der Auswertung beider Analyseverfahren wurde kein Unterschied zwischen Wildtyp- und DEP-1<sup>-/-</sup>-Tieren detektiert ([P1], Abb. 4A-C).

### 3.2. *Inhibierung von Protein-Tyrosin-Phosphatasen steigert das kollaterale Gefäßwachstum in der Ratte (Publikation 2 [P2], Erstautor (geteilt))*

Die funktionelle Bedeutung von PTPs und insbesondere von SHP-1 und PTP1B beim zerebralen Kollateralwachstum wurde in einem 3-VO-Modell der Ratte untersucht. Das 3-VO induzierte Gefäßwachstum wurde zeitabhängig hinsichtlich morphologischer, funktioneller und molekularer Marker charakterisiert. 3-VO operierte Ratten zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren bis zum Tag 21 nach 3-VO einen anhaltend induzierten Durchmesserzuwachs in der posterioren Zerebralarterie (PCA) und der Arteria communicans posterior (PComA, Daten nicht gezeigt) ([P2], Abb. 1). Alle anderen untersuchten Gefäße des *Circulus arteriosus (cerebri)* zeigten kein signifikant induziertes Gefäßwachstum. Die detektierte Durchmesserzunahme ging bis Tag 7 mit einer erhöhten Expression des Proliferationsmarkers PCNA in der ipsilateralen PCA einher ([P2], Abb. 2A und 2B). Am Tag 21 nach 3-VO und darüber hinaus konnte keine weitere proliferative Aktivität nachgewiesen werden. Funktionelle Untersuchungen zeigten eine anfänglich (3 bis 7 Tage nach 3-VO) aufgehobene zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC). 21 Tage nach 3-VO erreichte die CVRC etwa 50 % des Ausgangsniveaus nicht operierter Tiere ([P2], Abb. 2C). Zur pharmakologischen Intervention wurde Tag 7 als Zeitpunkt gewählt, um sowohl potentiell positive als auch negative Effekte der PTP-Inhibition auf das 3-VO-induzierte Gefäßwachstum detektieren zu können. Da die Durchmesserzunahme in der ipsilateralen PCA am größten war, erfolgte die weitere Evaluation ebenfalls anhand dieses Gefäßes.

Im Folgeexperiment wurden Ratten nach 3-VO-Operation einmal täglich für 7 Tage mit dem pan-PTP-Inhibitor BMOV, dem SHP-1-Inhibitor Natrium Stiboglukonat (SSG), dem PTP1B-Inhibitor AS279 oder einem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Die Analyse der ipsilateralen PCA-Durchmesser zeigte jeweils eine signifikante 15 %ige Zunahme unter BMOV- und einen 22 %igen Durchmesserzuwachs unter PTP1B-Inhibition im Vergleich zu kontrolloperierten Tieren. Die Behandlung mit SSG resultierte in keiner signifikanten Steigerung des Kollateralwachstums ([P2], Abb. 3A und 3B).

Immunhistologisch konnte in Übereinstimmung mit den Gefäßdurchmesserdaten eine mehr als verdoppelte PCNA-Expression in BMOV- und AS279-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren nachgewiesen werden ([P2], Abb. 4A und 4B). Zur funktionellen Analyse wurde die CVRC gemessen, wobei die Tiere der 3-VO-Kontrollgruppe 7 Tage nach 3-VO über nahezu keine zerebrale Reservekapazität verfügten. Die vaskuläre Reservekapazität der AS279-behandelten Tiere zeigte im Vergleich zu 3-VO-Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg und erreichte mit 69 % wiederhergestellter CVRC nahezu das Niveau nicht-operierter Tiere. Die CVRC der SSG-Gruppe und der BMOV-behandelten 3-VO-Ratten zeigte mit ca. 30% wiederhergestellter Reservekapazität keinen signifikanten Unterschied zur 3-VO-Kontrollgruppe ([P2], Abb. 4C). PLA-Untersuchungen ([P2], Abb. 5B und 5C) und konventionelle immunhistologische Bestimmungen ([P2], Abb. 5A) der PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Phosphorylierung an dem Tyrosinrest (Tyr) 751 zeigten zudem eine Hyperphosphorylierung in BMOV- und AS279-behandelten 3-VO-Tieren. Zusätzliche *in vitro* Dephosphorylierungs-Assays bestätigten, dass PTP1B den PDGF  $\beta$ -Rezeptor beeinflusst und sowohl die totale Tyrosin-Phosphorylierung des Rezeptors als auch die seitenspezifische Phosphorylierung an dem Tyrosinrest 751 reduziert ([P2], Abb. 5D). PTP-Aktivitätsbestimmungen aus Herzlysaten zeigten zudem eine um 39 % reduzierte pan-PTP-Aktivität in BMOV-Tieren und eine 45 % herabgesetzte PTP1B-Aktivität in AS279-behandelten Tieren ([P2], Abb. 4D). Aktivitätsbestimmungen von SHP-1 in SSG-behandelten Tieren konnte keine reduzierte PTP-Aktivität nachweisen. Um die Gewebespezifität der verwendeten Inhibitoren zu untersuchen, wurde außerdem in der ipsilateralen PCA von SSG-, BMOV- und AS279-behandelten 3-VO-Tieren die pan-PTP-Aktivität gemessen. In der BMOV-Behandlungsgruppe konnte eine signifikant reduzierte PTP-Aktivität detektiert werden, wohingegen die der SSG- und der AS279-behandelten Tiere im Vergleich zu 3-VO-Kontrolltieren nicht signifikant reduziert waren ([P2], Abb. 4E).

### *3.3. Adventitielle Regulation von Protein-Tyrosin-Phosphatasen bei der Neointimabildung in der Ratte (Publikation 3 [P3], Ko-Autor)*

Die Expression von PTPs wurde bereits in Analysen des Endothels, der *Tunica media* und dem vaskulären Gesamtgewebe beschrieben. Die Existenz und funktionelle Bedeutung von PTPs in der Adventitia ist hingegen unzureichend untersucht. Vor diesem Hintergrund wurde nach Ballon-induzierter Gefäßverletzung der *Arteria carotis*

*communis* in der Ratte die transkriptionelle Regulierung von PDGF-Rezeptoren, PDGF-Liganden und PDGF-Rezeptor-bindenden PTPs nach 8 und 14 Tagen in der Adventitia untersucht. Durch morphometrische Analysen wurde eine graduelle Lumenverringernung nach 8 und 14 Tagen im Vergleich zu nicht verletzten Kontrolltieren festgestellt ([P3], Abb. 1A und 1B). Immunhistologische Untersuchungen der zellulären Proliferation zeigten eine Zunahme der PCNA-Expression nach 8 Tagen. Nach 14 Tagen befand sich die PCNA-Expression wieder auf dem Niveau von Kontrolltieren ([P3], Abb. 2A). Zur genexpressionellen Analyse mittels quantitativer *Real-time* PCR wurde die Adventitia der Carotis durch Laser-Capture-Mikrodissektion isoliert. In Übereinstimmung mit den immunhistologischen Daten wurde nach 8 Tagen eine verstärkte mRNA-Expression des Proliferationsmarkers Ki67 gemessen, die nach 14 Tagen wieder auf ein initiales Niveau reduziert war ([P3], Abb. 2B). PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Transkripte zeigten eine deutlich Zunahme nach 8 Tagen und eine moderate Erhöhung nach 14 Tagen ([P3], Abb. 2A). PDGF-C- und PDGF-D-Transkripte waren nach 8 Tagen erhöht und zeigten nach 14 Tagen ein basales Niveau. Für PDGF-A wurde keine expressionelle Regulation festgestellt. Die PDGF-B mRNA-Level waren hingegen nach 8 und 14 Tagen im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich reduziert ([P3], Abb. 2B). Die PDGF  $\beta$ -Rezeptor-bindenden PTPs DEP-1, TC-PTP und SHP-2 zeigten nach 8 Tagen ein erhöhtes Expressionsniveau. Nach 14 Tagen konnte bezüglich dieser PTPs keine differentielle Expression in der Adventitia detektiert werden. Die PTP1B-Expression war zu keinem der gemessenen Zeitpunkte verändert ([P3], Abb. 2C). Die immunhistologische Analyse des adventitiellen Gewebes zur Untersuchung der PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Aktivierung 8 und 14 Tage nach Endothelverletzung zeigte keine signifikante Veränderung auf den Phosphorylierungsstatus des PDGF  $\beta$ -Rezeptors am Tyrosinrest 1021 ([P3], Abb. 4A und 4B).

#### **4. Diskussion**

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall gelten in den Industrieländern als Zivilisationskrankheit und führen die Statistik der häufigsten Todesursachen an [1].

Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille ist, unter idealisierten Bedingungen, die weitestgehend für das Blutgefäßsystem zutreffen, der Volumendurchfluss von der vierten Potenz des Gefäßdurchmessers abhängig (Abb. 1). Damit haben bereits kleinste Änderungen des Gefäßdurchmessers einen bedeutenden Einfluss auf den Blutstrom. Da sich die gängige klinische Praxis besonders bei der Behandlung von zerebralen Stenosen als problematisch erweist, stellt das pharmakologisch induzierte Kollateralwachstum, Arteriogenese, zur Bildung von endogenen Umgehungskreisläufen ein vielversprechendes Prinzip zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung von stenotischen Erkrankungen und der Vermeidung der mit ihnen verbundenen Risiken dar.

$\dot{V} = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot \Delta p}{8 \cdot \mu \cdot l}$	<b><u>Variable</u></b>	<b><u>Bedeutung</u></b>	<b><u>Si-Einheit</u></b>
	$\dot{V}$	Volumenstrom	$m^3/s$
	$r$	Rohrinnenradius	$m$
	$\Delta p$	Druckdifferenz zwischen Rohranfang und Rohrende	$Pa$
	$\mu$	dynamische Viskosität der Flüssigkeit	$Pa \cdot s$
	$l$	Länge des Rohres	$m$

---

**Abb. 1 : Gesetz von Hagen-Poiseuille**

In der vorliegenden Arbeit kamen sowohl einwärts- (Ballon-induzierte Gefäßverletzung) als auch auswärtsgerichtete (CCAO, 3-VO, FAO) Modelle des vaskulären Gefäßumbaus zum Einsatz. Dabei handelt es sich um einen lumenverkleinernden bzw. einen lumenvergrößernden vaskulären Umbauprozess, der in beiden Fällen u.a. durch die Proliferation von VSMCs geprägt ist. Die Bedeutung von PTPs bei diesen Umbauprozessen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die adventitielle Rolle des PDGF  $\beta$ -Rezeptors, der PDGF-Liganden, sowie der PDGF  $\beta$ -Rezeptor-bindenden PTPs bei der Neointimabildung wurde in einem Rattenmodell nach Ballon-induzierter Gefäßverletzung analysiert. Acht und 14 Tage nach der Gefäßverletzung wurde mittels Laser-Capture-Mikrodissektion die Adventitia der *A. carotis communis* zur Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene isoliert. Die Detektion des Proliferationsmarkers PCNA und die repräsentative PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Phosphorylierung (Tyr1021) erfolgte durch zusätzliche immunhistologische Aufarbeitung.

Der Adventitia wird primär Anker- und Stützfunktion beigemessen. Die adventitielle Genexpression von PDGF-Signalkomponenten und gegenregulatorischen PTPs während der Neointimabildung sollte Gegenstand dieser Untersuchungen sein.

In Übereinstimmung mit der Fachliteratur kam es nach Gefäßverletzung zu einer Lumenverkleinerung und analog zu den Beobachtungen in der *Tunica media* und der *Tunica neointima* zeigten adventitielle Zellen ein zeitabhängiges Proliferationsverhalten nach induzierter Neointimabildung [10]. Die differentielle Expression von PDGF-Liganden in der *Tunica intima* und der *Tunica media* wurde bereits beschrieben [10, 13]. Die Expressionsanalyse in mikrodisseziertem adventitiellem Gewebe zeigte eine dynamische Regulation des PDGF  $\beta$ -Rezeptors und von PDGF  $\beta$ -Rezeptorbindenden PTPs. Die Expression des PDGF  $\beta$ -Rezeptors, sowie von PDGF-C und PDGF-D war in der Frühphase (8 Tage nach der Gefäßverletzung) erhöht und nahm nach 14 Tagen wieder ab. Diese Beobachtungen stimmen mit den erhobenen Proliferationsdaten (PCNA und Ki67) adventitieller Zellen überein. Immunhistologische PCNA-Färbungen und genexpressionelle Analysen der Ki67-mRNA deuten auf eine maximale Proliferation 8 Tage nach der Gefäßverletzung hin. Die PDGF-A-Expression zeigte keine Veränderung auf mRNA-Ebene und legt nahe, dass dieser Ligand bei der Proliferation adventitieller Zellen von geringer Bedeutung ist. Diese Annahme wird durch frühere Publikationen gestützt, in der PDGF-AA im Vergleich zu PDGF-BB einen geringeren mitogenen Effekt auf VSMCs zeigte bzw. ebenfalls von geringer Expression gekennzeichnet war [14, 15]. Interessanterweise wurde in dem von uns untersuchten Modell eine verminderte PDGF-B-Expression nach 8 und 14 Tagen festgestellt. Im Gegensatz dazu beschreibt eine frühere Publikationen in einem Schweinmodell eine induzierte PDGF-B-Expression nach Gefäßverletzung [16]. Die naheliegende Ursache für diese Beobachtung könnten Speziesunterschiede sein. Darüber hinaus wäre ein migratives abwandern PDGF-B exprimierender Zellen aus der Adventitia in die Media bzw. Intima denkbar, was zu dem beobachteten Phänomen in dem hier untersuchten Modell führte.

PDGF-CC und PDGF-DD sind die jüngsten entdeckten Vertreter innerhalb der PDGF-Familie. Beide Liganden waren in der Frühphase, 8 Tage nach Gefäßverletzung, auf mRNA-Ebene erhöht. Übereinstimmend mit den hier gezeigten Daten wurden beim vaskulären *Remodeling* bereits erhöhte Transkriptlevel von PDGF-D in der Adventitia beschrieben [16, 17]. Funktionell weisen primäre glatte Gefäßmuskelzelle in

Abhängigkeit von PDGF-DD ein verstärktes Proliferations- und Migrationsverhalten auf [17]. PDGF-DD induziert die Dimerisierung und Tyrosin-Phosphorylierung der  $\beta$ -Rezeptoruntereinheiten des PDGF-Rezeptors. Dabei wurde im Hinblick auf glatte Gefäßmuskelzellen insbesondere die PDGF  $\beta$ -Rezeptor-abhängige Proliferation, Migration und Dedifferenzierung beschrieben [18, 19]. Vor diesem Hintergrund wurde ein etwaiger Einfluss der erhöhten adventitiellen Ligandenexpression auf die PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Phosphorylierung beispielhaft anhand des Tyrosinrestes 1021 untersucht. Es konnte jedoch keine zeitabhängige Veränderung der PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Phosphorylierung festgestellt werden. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Rezeptoraktivierung zu einem früheren als hier untersuchten Zeitpunkt des Gefäßumbaus von Relevanz ist. Zudem ist denkbar, dass andere nicht untersuchte Phospho-Tyrosinreste einen bedeutenderen Einfluss auf die *Remodeling*-relevante Signaltransduktion haben.

Die Präsenz verschiedener PTPs ist bereits in der Gefäßwand beschrieben worden [6]. Deren dynamische Expressionsänderung beim vaskulären *Remodeling* deutet zudem auf eine funktionelle Bedeutung bei Gefäßumbauprozessen hin. In *in vivo*- und *in vitro*-Experimenten wurde die Gegenwart von PTPs zudem explizit in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben [6]. Durch Mikrodissektion der *Tunica adventitia* konnten die PDGF  $\beta$ -Rezeptor-bindenden PTPs DEP-1, PTP1B, TC-PTP und SHP-2 in diesem Teil der Gefäßwand erstmals nachgewiesen werden. Die in dieser Studie untersuchten PTPs wurden zuvor als v.a. regulatorische Komponenten der PDGF-Signalweiterleitung beschrieben [10, 20-22]. Durch Experimente mit DEP-1- und TC-PTP-*knockout*-Zellen konnte der Tyrosinrest 1021 des PDGF  $\beta$ -Rezeptors als Target dieser PTPs identifiziert werden [10, 20].

Die beobachtete verstärkte Expression der beschriebenen PTPs in der *Tunica adventitia* am Tag 8 könnte daher über eine Dephosphorylierung von RTKs einen gegenregulatorischen Mechanismus einleiten, welcher zu dem beobachteten Normalniveau hinsichtlich proliferativer Marker und der PDGF-Expression nach 14 Tagen führte.

Auf der Grundlage dieser Arbeit und anderer Publikationen, in denen die vaskuläre Expression von PTPs in der *Tunica intima*, *media* und *adventitia* nachgewiesen wurde und deren differentielle Expressionsdynamik auf eine funktionelle Relevanz beim

vaskulären *Remodeling* hindeutet, wurde in der ersten und zweiten Publikation u.a. das pharmakologische Potential von PTPs beim Kollateralwachstum zur Bildung von Umgehungskreisläufen untersucht. Durch operative Modifikation der Blutflussdynamik mittels CCAO und FAO in der Maus und durch 3-VO in der Ratte wurde zerebrales bzw. peripheres Kollateralwachstum induziert. Die Effektivität der operativen Prozeduren zur Induktion zerebraler Arteriogenese durch 3-VO bzw. CCAO wurde zu Experimentbeginn mittels Angiographie bestätigt. In Übereinstimmung mit Buschmann *et al.* wurde die ipsilaterale PCA als die maßgeblich von der 3-VO-Operation beeinflusste Zerebralarterie identifiziert [23]. Analoge Untersuchungen im CCAO-Modell der Maus identifizierten die ipsilaterale ACA als die Arterie mit dem größten Diameterzuwachs. In beiden Fällen wurde innerhalb von 7 Tagen eine signifikant gesteigerte Gefäßdurchmesserzunahme detektiert. Auf dieser Basis wurde die Relevanz von PTPs auf die Kollateralisierung im Allgemeinen und die der PTPs SHP-1 und PTP1B im Speziellen durch pharmakologische Inhibierung in der 3-VO Ratte und die Rolle von DEP-1 in CCAO-operierten DEP-1<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht.

In der Charakterisierungsphase des CCAO-Modells konnte ein induziertes Kollateralwachstums morphologisch bestätigt werden. Da für den VEGF2-Rezeptor und für VEGF-A keine differenzielle Expression detektiert wurde, konnten Hypoxie-induzierte Effekte und angiogenes Gefäßwachstum ausgeschlossen werden [24].

Der *knockout* von DEP-1 in der CCAO-Maus zeigte weder peripher noch zerebral signifikante morphologische Gefäßveränderungen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Ein erkennbarer Einfluss der DEP-1-Defizienz wurde hingegen auf funktioneller Ebene detektiert. In DEP-1 *knockout*-Mäusen wurde eine verminderte vaskuläre PDGF-B Expression einhergehend mit einer verminderten CVRC nachgewiesen. Die positiv regulierende Wirkung von PDGF-B auf die zerebrovaskuläre Vasodilatation wurde bereits in Kaninchen nachgewiesen [25]. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass DEP-1 über einen Einfluss auf die PDGF-B Expression als positiver Regulator der CVRC fungiert. Einen Einfluss auf das periphere Kollateralwachstum hingegen konnte mit den angewandten Methoden der Mikrosphärenperfusion und mikro-CT-basierten Gefäßdurchmesserbestimmung nicht detektiert werden. Eine bedeutende Rolle der weiterhin untersuchten Rezeptoren (PDGF  $\beta$ -Rezeptor, VEGF2-Rezeptor), Liganden (PDGF-D, VEGF-A, TGF $\beta$ 1, FGF-2) und PTPs (VE-PTP, TC-PTP, SHP-1) konnte in dem hier untersuchten Modell nicht



festgestellt werden, wenngleich sie bei vaskulären Umbauprozessen als relevant bzw. als RTK-antagonisierend beschrieben wurden [2, 6]. Eine differenzielle Expression der hier untersuchten Gene zu früheren Zeitpunkten des *Remodeling*-Prozesses (vor 7 Tagen) ist jedoch möglich. Eine generelle Bedeutung und Relevanz dieser Liganden und PTPs in der Frühphase der Arteriogenese kann daher nicht ausgeschlossen werden.

DEP-1 ist eine ubiquitär detektierte PTP, deren Expression gewebsabhängig stark variieren kann [26]. Dabei haben *in situ* Hybridisierungs-Analysen gezeigt, dass die vaskuläre Expression von DEP-1 in Endothelzellen besonders stark, in VSMCs hingegen relativ gering ausgeprägt ist [26]. Nichts desto trotz konnte in früheren Studien beobachtet werden, dass VSMCs durch den *knockdown* von DEP-1 ein proliferatives und –migratives Zellverhalten zeigen [10]. Da sich jedoch kein solcher positiver Effekt hinsichtlich morphologischer oder funktioneller Parameter beobachten ließ, ist in dem untersuchten DEP-1 *knockout*-CCAO-Modell ein direkter, über glatte Gefäßmuskelzellen vermittelter Effekt mit untergeordneter Rolle denkbar. Die nachgewiesene Reduktion von PDGF-B in DEP-1<sup>-/-</sup>-Tieren impliziert, im Zusammenhang mit der beschriebenen hohen Expression von DEP-1 in Endothelzellen, dass der gezeigte Effekt einer verminderten CVRC in Folge einer modifizierten Endothelzellfunktion beobachtet wird.

In Abhängigkeit der Gewebsherkunft bzw. der vaskulären Lokalisation wurden bereits phänotypische Unterschiede von Endothelzellen beschrieben [27, 28]. Vergleichende Untersuchungen in humanen Primärzellen haben gezeigt, dass Endothelzellen peripheren bzw. zerebralen Ursprungs Unterschiede hinsichtlich Morphologie, Zellproliferation und Proteinsynthese aufweisen und auf endogene Faktoren unterschiedlich reagieren [29]. Insbesondere die Rolle der Endothelzellen bei der Funktion der Blut-Hirn-Schranken weist deutlich auf diese endotheliale Zellheterogenität hin [30, 31]. Vor diesem Hintergrund wäre der in dieser Arbeit gezeigte Unterschied hinsichtlich der peripheren (FAO) und zerebralen (CCAO) Perfusionsdaten, zumindest partiell, durch zellphänotypische Divergenz innerhalb der untersuchten Gefäßbetten zu erklären. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass *Remodeling*-relevante Rezeptoren und Liganden in phänotypisch unterschiedlichen Endothelzellen verschiedene basale Expressionslevel aufweisen. Darüber hinaus sind lokalisations- bzw. operationsbedingte Unterschiede der Blutflussdynamik denkbar, die zu

unterschiedlichen morphologischen und funktionellen Ergebnissen führen. Die zerebralen und peripheren morphologischen Daten weisen zusammenfassend jedoch nicht auf einen Einfluss von DEP-1 auf das Gefäßwachstum hin.

Die funktionelle Rolle von PTP1B wurde in einem 3-VO-induzierten Arteriogenesemodell der Ratte untersucht. Die pharmakologische Inhibition von PTP1B mittels AS279 resultierte in einer gesteigerten intravaskulären Proliferation (gemessen als PCNA-Expression), welche zu einem gesteigerten Zerebralgefäßwachstum führte. Die CVRC war bei diesen Tieren 7 Tage nach 3-VO ebenfalls signifikant erhöht und mit 69 % gegenüber unbehandelten Wildtyp-Tieren nahezu wieder hergestellt. Eine vergleichbar verbesserte CVRC wurde zuvor in der Charakterisierung des 3-VO Modells in unbehandelten Tieren nach 21 Tagen beobachtet. Die Inhibition von PTP1B führt somit sowohl zu einer beschleunigten Gefäßproliferation, als auch zu einer raschen Wiederherstellung der Gefäßfunktionalität.

Die Wirksamkeit des Inhibitors wurde durch radioaktiv-basierte und somit sensitive Dephosphorylierungsmethodik bestimmt. Da die Proteinmenge, die aus den Gefäßen der PCA isoliert werden kann, nicht zur Bestimmung der spezifischen PTP1B-Aktivität ausreichte, wurde die Phosphatase-Aktivität alternativ im Herzgewebe analysiert. Unter der Annahme, dass die Zufuhr und Aufnahme des Inhibitors (AS279) in kardiale Zellen dem von Gefäßen ähnelt, wurde die Bestimmung in linksventrikulärem Herzgewebe durchgeführt. Die spezifische PTP1B-Aktivitätsbestimmung im Herzen bestätigte die Funktionalität des PTP1B-Inhibitors in AS279-behandelten 3-VO-Tieren. In Übereinstimmung mit dem pro-arteriogenen Gefäßwachstum wurde mittels PLA und IHC eine erhöhte PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Phosphorylierung am Aminosäurerest 751 detektiert. In diesem Zusammenhang konnten die *in vitro* Beobachtungen von Richard *et al.* bestätigt werden, laut denen PTP1B die PDGF  $\beta$ -Rezeptor-Phosphorylierung an Tyrosinrest 751 ebenso wie die Total-Phosphorylierung des Rezeptors hydrolysiert und somit vermindert [32]. Die kumulative Phosphorylierung der Tyrosinrest 751 und 740 ist strukturell für die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PI3K/PKB)-Signalweges notwendig [33]. Kultivierte VSMCs zeigen ein signifikant reduziertes PDGF  $\beta$ -Rezeptor-abhängiges Proliferationsverhalten, wenn ihnen zur Stimulation mit PDGF-BB der PI3K-Inhibitor LY294002 verabreicht wird [34]. Die Hyperphosphorylierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors am Tyrosinrest 751 impliziert daher, in Übereinstimmung mit früheren Publikationen, einen

potentiellen Mechanismus, der durch induzierte VSMC-Proliferation zum beobachteten zerebralen Kollateralwachstum führte. Die Beobachtung einer stark verminderten Total-Tyrosinphosphorylierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptor in der *in vitro* Dephosphorylierungsanalyse deutet darauf hin, dass die Inhibierung von PTP1B mittels AS279 amplifizierenden Einfluss auf weitere PDGF  $\beta$ -Rezeptor-vermittelte Signalwege hat.

Die Präsenz und Akkumulation von Monozyten, insbesondere in der Frühphase der Arteriogenese, wurde bereits beschrieben [35, 36]. Zusätzlich deutet das beeinträchtigte Kollateralwachstum nach Monozyten-Depletion auf die positive Bedeutung dieser Zellen bei der Arteriogenese hin [35]. *Viable motheaten* Mäuse zeigen bei zugrunde liegender SHP-1-Defizienz eine Hyperproliferation von Monozyten/Makrophagen [37, 38]. Die postulierte Wirkung von SSG zielte daher v.a. auf die induzierte Proliferation von Monozyten ab. Die SHP-1-Inhibierung in 3-VO operierten Tieren zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf morphologische, funktionelle und molekulare Parameter. Aktivitätsbestimmungen konnten zudem keine Reduktion der SHP-1-Aktivität unter SGG-Behandlung nachweisen. Die in der Studie gewählten Behandlungsdosen entsprachen denen, die zuvor in Nagetieren Effekte bei der Behandlung von Leishmaniose gezeigt hatten [39, 40]. Da SSG als reversibler PTP-Inhibitor fungiert, ist es denkbar, dass durch den Prozess der Gewebeaufarbeitung von SSG-behandelten Tieren bis hin zur Aktivitätsbestimmung kein inhibiertes SHP-1 mehr vorlag, sodass keine PTP-Aktivitätsreduktion detektiert werden konnte. Unter der Annahme einer generellen, ggfs. kurzzeitigen Wirksamkeit des Inhibitors konnte SHP-1 keine relevante Bedeutung beim zerebralen Kollateralwachstum beigemessen werden. Eine potentielle funktionelle Bedeutung von SHP-1 beim Kollateralwachstum zu früheren Zeitpunkten als den gemessenen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Der Transfer unseres experimentellen Ansatzes in ein *viable motheaten*-CCAO-Mausmodell könnte über einen etwaigen pro-arteriogenen Effekt von SHP-1 Auskunft geben, ist jedoch vor dem Hintergrund des Belastungsgrades der SHP-1-Defizienz ethisch kritisch zu betrachten.

Durch die pharmakologische Intervention mittels BMOV sollte die Eingangsthese bestätigt werden, dass PTPs negative Regulatoren der Arteriogenese darstellen. BMOV wirkt als unspezifischer PTP-Inhibitor auf alle 38 klassischen PTPs hemmend [41]. *In vivo*-Studien mit BMOV konnten bereits zeigen, dass die RTK-bedingte Signaltransduktion verstärkt und die VEGF-abhängige Endothelzellproliferation und

Insulinsensitivität in Ratten gesteigert werden [42, 43]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter pan-PTP-Inhibierung eine erhöhte zerebrale Gefäßproliferation und Gefäßdurchmesserzunahme nach 3-VO beobachtet. Die Hyperphosphorylierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors (Tyr751) unter BMOV-Behandlung impliziert, in Analogie zu den Beobachtungen der PTP1B-Inhibition, einen möglichen zugrunde liegenden Mechanismus zur beobachteten gesteigerten Arteriogenese. Dieser könnte aufgrund der Ergebnisse in AS279-behandelten Tieren zumindest partiell durch die Inhibierung von PTP1B hervorgerufen sein. Die BMOV-Tiere zeigten gegenüber der Kontrollgruppe eine nicht signifikant erhöhte CVRC. Da die CVRC im DEP-1 *knockout*-Modell reduziert war und DEP-1 ebenfalls ein potentiell Zielmolekül von BMOV darstellt, könnte die nicht signifikant gesteigerte CVRC unter BMOV-Behandlung teilweise auf eine reduzierte DEP-1-Aktivität zurückzuführen sein. Interessanterweise beschreibt eine frühere Publikation eine verbesserte periphere CVRC nach 2-4 wöchiger Behandlung bei niedrigerer BMOV-Dosis [42]. Im Vergleich der beiden Studien könnten die Dosis-Unterschiede sowie die Behandlungsdauer Ursache für die divergierenden Resultate sein. Bei geringerer Dosierung ist davon auszugehen, dass die Anzahl potentiell inhibierter PTPs abnimmt und eventuell die Funktion positiv regulatorischer PTPs weniger stark beeinträchtigt wird. Eine über die hier gewählten 7 Tage hinausgehende Behandlung hätte eventuell in einer signifikant verbesserten CVRC resultiert, zumal die Mittelwerte der BMOV Gruppe bereits eine entsprechend positive Tendenz erkennen lassen. Außerdem könnte in Übereinstimmung mit den Daten des DEP-1 *knockouts* in der CCAO-Maus die Lokalisation des vaskulären Bettes (zerebral *versus* peripher) von Bedeutung sein.

PTPs werden aufgrund ihrer generellen Enzymfunktion als überwiegend negativ regulatorisch beschrieben. In der Tat konnten zahlreiche Studien die Antagonisierung von RTKs bestätigen. Die funktionelle PTP-Inaktivierung in verschiedenen Modellen führt zur Hyperphosphorylierung der betreffenden RTKs und konsekutiv gesteigerter Signaltransduktion [10, 42-45]. Obwohl die Expression spezifischer PTPs in Zellen der Gefäßwand bekannt ist und in relevanten Signalwegen als funktionell gegenregulatorisch beschrieben wurde, ist die Rolle von PTPs insbesondere beim zerebralen Kollateralwachstum neben den hier vorgestellten Daten unbekannt.

Da eine Vielzahl von RTKs wachstumsstimulierend wirken und PTPs diese direkt antagonisieren, verspricht die Inhibierung von PTPs eine signaltransduktorisch

amplifizierende Wirkung. Insbesondere die Rezeptoren der VEGF- und der PDGF-Familie haben einen Einfluss auf die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen, die den Großteil der zellulären Gefäßstruktur ausmachen [3].

Die Liganden-vermittelte Aktivierung einer RTK ist insbesondere *in vivo* kein isolierter Prozess. Zellen reagieren auf eine Vielzahl gleichzeitig eintreffender intra- und extrazelluläre Stimuli. Dabei akkumulieren sie zentrale Schlüsselenzyme zur Signalweiterleitung, die sich ggfs. unabhängig vom ursprünglichen initiierten Signalweg gegenseitig beeinflussen können. Dieser *Cross-talk* ist zum Beispiel zwischen dem Insulin- und dem PDGF  $\beta$ -Rezeptor bekannt [46] und auch solcher zwischen hier nicht untersuchten RTKs wäre denkbar. Die Aktivierung des PDGF  $\beta$ -Rezeptors initiiert mehrere Signalkaskaden [47], die sich ebenfalls gegenseitig beeinflussen. Exemplarisch ist die Wechselwirkung zwischen dem PI3K/Akt- und dem Ras/MEK/Erk1/2-Signalweg belegt [48, 49]. Zudem existieren Tyrosinphosphorylierungen, die funktionell inhibierende Wirkung zeigen und ebenfalls von PTPs antagonisiert werden. In diesem Fall wirken PTPs regulatorisch positiv auf die Signalweiterleitung. Beispielhaft bewirkt SHP-2 eine Dephosphorylierung des GRB2-associated-binding protein (Gab)-1. Diese verhindert die Bindung von RasGAP und führt so zur dauerhaften Aktivierung des Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweges [50, 51]. Eine andere Studie zeigt, dass die ERBb2-abhängige Aktivierung der Kinase c-Src und konsekutive Zellproliferation von PTP1B positiv reguliert wird [52]. Die Funktion von PTP1B kann folglich Zellkontext-abhängig auch positiv sein. Darüber hinaus bestehen negative *Feedback*-Regulierungen. So konnte belegt werden, dass die Kinase Akt/PKB die Tyrosinphosphatase PTP1B phosphoryliert und so dessen PTP-Aktivität hemmt [53]. Zusätzlich wurde bereits gezeigt, dass der *knockdown* von DEP-1 in Endothelzellen zwar zu einer Hyperphosphorylierung des VEGF-Rezeptors führt, welche sich jedoch nicht in einer verstärkten Akt und c-Src Aktivierung widerspiegelte [54, 55]. Die vorangestellten Beispiele zeigen die Komplexität der intrazytosolischen Signalweiterleitung und deren Vernetzung auf, die durch PTP-Inhibierung potentiell modifiziert werden können. Vor diesem Hintergrund kann die funktionelle Bedeutung von Phosphorsäureester-hydrolysierenden PTPs zellkontextabhängig sowohl positiv als auch negativ sein [5, 6].

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass PTPs therapeutisch relevante Zielstrukturen zur vorteilhaften Beeinflussung der Arteriogenese darstellen. Die unter BMOV-Behandlung erhobenen Daten implizieren eine übergeordnet negative-regulatorische Funktion von PTPs beim zerebralen Kollateralwachstum. Durch die Betrachtung der untersuchten PTPs, bei der sich DEP-1 als funktionell positiv regulatorisch und PTP1B auf morphologischer und funktioneller Ebene als negativ regulatorisch darstellt, erscheint vor dem Hintergrund einer therapeutischen Nutzung von PTPs jedoch eine differenzierte Betrachtung dieser Enzymgruppe angemessen. Neben der pharmakologischen PTP-spezifischen Adressierung deuten insbesondere die Ergebnisse der CVRC-Messung aus dem DEP-1-*knockout*-Modell darauf hin, dass die Lokalisation des Gefäßbettes bei der Arteriogenese von zusätzlicher Bedeutung ist. Die Induktion einwärts- bzw. auswärtsgerichteter Gefäßproliferation in der Ratte und der Maus erfolgte durch einen experimentellen operativen Eingriff. Diese damit verknüpften Stimuli zum Gefäßumbau sind daher artifiziell und somit nur bedingt in der Lage, die tatsächliche pathophysiologische Situation, die bspw. im erkrankten menschlichen Organismus besteht, darzustellen.

Da im humanen Genom strukturell und funktionell identische, homologe Proteine identifiziert wurden, kann eine ähnliche Relevanz von PTPs insbesondere beim zerebralen Kollateralwachstum grundsätzlich auch im Menschen angenommen werden. Allerdings haben Studien in der Vergangenheit gezeigt, dass Anwendung und Funktion von tierexperimentell erhobenen Daten nicht unkritisch auf den Menschen übertragbar sind. Außerdem ist bei Patienten mit relevanter klinischer Symptomatik eine eventuell vorhandene zusätzliche Medikation einzubeziehen, deren Wechselwirkung mit dem Krankheitsverlauf einhergehen und ebenfalls Einfluss auf das durch PTP-Inhibition induzierte Kollateralwachstum haben könnte [56]. Vor diesem Hintergrund und der potentiellen klinischen Nutzung von PTPs als therapeutische Zielstrukturen wäre die weitere Relevanz dieser Ergebnisse in humanen Studien zu prüfen.

In der vorliegenden Arbeit führte die PTP1B-Inhibierung in einem Ratten-Modell zu gesteigertem zerebralen Gefäßwachstum und funktionell erhöhter CVRC. Wünschenswert wäre daher eine weitergehende Analyse in PTP1B-defizienten Tieren. Die hier gezeigten Ergebnisse mittels pharmakologischer Inhibierung deuten jedoch

bereits darauf hin, dass PTP1B eine potentielle therapeutische Zielstruktur zur Verbesserung des kollateralen Wachstums darstellt.

## Literaturverzeichnis

1. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, Moran AE, Sacco RL, Anderson L, Truelsen T, O'Donnell M, Venketasubramanian N, Barker-Collo S, Lawes CM, Wang W, Shinohara Y, Witt E, Ezzati M, Naghavi M and Murray C. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2014;**383**:245-54.
2. Cai W and Schaper W. Mechanisms of arteriogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;**40**:681-92.
3. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;**6**:389-95.
4. Hubbard SR and Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* 2000;**69**:373-98.
5. Bohmer F, Szedlacsek S, Taberero L, Ostman A and den Hertog J. Protein tyrosine phosphatase structure-function relationships in regulation and pathogenesis. *FEBS J* 2013;**280**:413-31.
6. Kappert K, Peters KG, Bohmer FD and Ostman A. Tyrosine phosphatases in vessel wall signaling. *Cardiovasc Res* 2005;**65**:587-98.
7. Nakamura Y, Patrushev N, Inomata H, Mehta D, Urao N, Kim HW, Razvi M, Kini V, Mahadev K, Goldstein BJ, McKinney R, Fukai T and Ushio-Fukai M. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circ Res* 2008;**102**:1182-91.
8. Kovalenko M, Denner K, Sandstrom J, Persson C, Gross S, Jandt E, Vilella R, Bohmer F and Ostman A. Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem* 2000;**275**:16219-26.
9. Jandt E, Denner K, Kovalenko M, Ostman A and Bohmer FD. The protein-tyrosine phosphatase DEP-1 modulates growth factor-stimulated cell migration and cell-matrix adhesion. *Oncogene* 2003;**22**:4175-85.
10. Kappert K, Paulsson J, Sparwel J, Leppanen O, Hellberg C, Ostman A and Micke P. Dynamic changes in the expression of DEP-1 and other PDGF receptor-antagonizing PTPs during onset and termination of neointima formation. *FASEB Journal* 2007;**21**:523-34.
11. Barr AJ. Protein tyrosine phosphatases as drug targets: strategies and challenges of inhibitor development. *Future Med Chem* 2010;**2**:1563-76.
12. Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y, Miyazono K and Miyazawa K. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *Journal of Cell Science* 2005;**118**:3759-68.
13. Myllarniemi M, Frosen J, Calderon Ramirez LG, Buchdunger E, Lemstrom K and Hayry P. 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* 1999;**13**:159-68.
14. Barrett TB and Benditt EP. Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and normal artery wall. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;**85**:2810-4.
15. Resink TJ, Scott-Burden T, Hahn AW, Rouge M, Hosang M, Powell JS and Buhler FR. Specific growth stimulation of cultured smooth muscle cells from



- spontaneously hypertensive rats by platelet-derived growth factor A-chain homodimer. *Cell Regul* 1990;**1**:821-31.
16. Scott NA, Cipolla GD, Ross CE, Dunn B, Martin FH, Simonet L and Wilcox JN. Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;**93**:2178-87.
  17. Chen J, Han Y, Lin C, Zhen Y, Song X, Teng S, Chen C, Chen Y, Zhang Y and Hui R. PDGF-D contributes to neointimal hyperplasia in rat model of vessel injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;**329**:976-83.
  18. Lindahl P, Hellstrom M, Kalen M, Karlsson L, Pekny M, Pekna M, Soriano P and Betsholtz C. Paracrine PDGF-B/PDGF-Rbeta signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development* 1998;**125**:3313-22.
  19. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes and Development* 1994;**8**:1888-96.
  20. Persson C, Savenhed C, Bourdeau A, Tremblay ML, Markova B, Bohmer FD, Haj FG, Neel BG, Elson A, Heldin CH, Ronnstrand L, Ostman A and 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**:2190-201.
  21. Zhuang D, Pu Q, Ceacareanu B, Chang Y, Dixit M and Hassid A. Chronic insulin treatment amplifies PDGF-induced motility in differentiated aortic smooth muscle cells by suppressing the expression and function of PTP1B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;**295**:H163-73.
  22. Markova B, Herrlich P, Ronnstrand L and Bohmer FD. Identification of protein tyrosine phosphatases associating with the PDGF receptor. *Biochemistry* 2003;**42**:2691-9.
  23. Buschmann IR, Busch HJ, Mies G and Hossmann KA. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* 2003;**108**:610-5.
  24. Liu Y, Cox SR, Morita T and Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995;**77**:638-43.
  25. Zhang Z, Nagata I, Kikuchi H, Xue JH, Sakai N, Sakai H and Yanamoto H. Broad-spectrum and selective serine protease inhibitors prevent expression of platelet-derived growth factor-BB and cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: vasospasm caused by cisternal injection of recombinant platelet-derived growth factor-BB. *Stroke* 2001;**32**:1665-72.
  26. Borges LG, Seifert RA, Grant FJ, Hart CE, Distechi CM, Edelhoff S, Solca FF, Lieberman MA, Lindner V, Fischer EH, Lok S and Bowen-Pope DF. Cloning and characterization of rat density-enhanced phosphatase-1, a protein tyrosine phosphatase expressed by vascular cells. *Circ Res* 1996;**79**:570-80.
  27. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007;**100**:158-73.
  28. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007;**100**:174-90.
  29. Thorin E, Shatos MA, Shreeve SM, Walters CL and Bevan JA. Human vascular endothelium heterogeneity. A comparative study of cerebral and peripheral cultured vascular endothelial cells. *Stroke* 1997;**28**:375-81.

30. Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol* 2005;**30**:57-70.
31. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2005;**2**:3-14.
32. Klinghoffer RA and Kazlauskas A. Identification of a putative Syp substrate, the PDGF beta receptor. *J Biol Chem* 1995;**270**:22208-17.
33. Caglayan E, Vantler M, Leppanen O, Gerhardt F, Mustafaov L, Ten Freyhaus H, Kappert K, Odenthal M, Zimmermann WH, Tallquist MD and Rosenkranz S. Disruption of platelet-derived growth factor-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma 1 activity abolishes vascular smooth muscle cell proliferation and migration and attenuates neointima formation in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2011;**57**:2527-38.
34. Choi KH, Kim JE, Song NR, Son JE, Hwang MK, Byun S, Kim JH, Lee KW and Lee HJ. Phosphoinositide 3-kinase is a novel target of piceatannol for inhibiting PDGF-BB-induced proliferation and migration in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2010;**85**:836-44.
35. Fung E and Helisch A. Macrophages in collateral arteriogenesis. *Front Physiol* 2012;**3**:353.
36. Waltenberger J. Stress testing at the cellular and molecular level to unravel cellular dysfunction and growth factor signal transduction defects: what Molecular Cell Biology can learn from Cardiology. *Thromb Haemost* 2007;**98**:975-9.
37. Nakayama K, Takahashi K, Shultz LD, Miyakawa K and Tomita K. Abnormal development and differentiation of macrophages and dendritic cells in viable motheaten mutant mice deficient in haematopoietic cell phosphatase. *Int J Exp Pathol* 1997;**78**:245-57.
38. Lyons BL, Smith RS, Hurd RE, Hawes NL, Burzenski LM, Nusinowitz S, Hasham MG, Chang B and Shultz LD. Deficiency of SHP-1 protein-tyrosine phosphatase in "viable motheaten" mice results in retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;**47**:1201-9.
39. Pathak MK and Yi T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J Immunol* 2001;**167**:3391-7.
40. Sen G, Mandal S, Roy SS, Mukhopadhyay S and Biswas T. Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis. *Free Radical Biology and Medicine* 2005;**38**:1257-1264.
41. Scior T, Mack HG, Garcia JA and Koch W. Antidiabetic Bis-Maltolato-OxoVanadium(IV): conversion of inactive trans- to bioactive cis-BMOV for possible binding to target PTP-1B. *Drug Des Devel Ther* 2009;**2**:221-31.
42. Carr AN, Davis MG, Eby-Wilkens E, Howard BW, Towne BA, Dufresne TE and Peters KG. Tyrosine phosphatase inhibition augments collateral blood flow in a rat model of peripheral vascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**287**:H268-76.
43. Winter CL, Lange JS, Davis MG, Gerwe GS, Downs TR, Peters KG and Kasibhatla B. A nonspecific phosphotyrosine phosphatase inhibitor, bis(maltolato)oxovanadium(IV), improves glucose tolerance and prevents diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;**230**:207-16.
44. Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins S, Loy AL, Normandin D, Cheng A, Himms-Hagen J, Chan CC, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay ML and Kennedy BP. Increased insulin sensitivity and obesity

- resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999;**283**:1544-8.
45. Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger PE, White DW, Jirousek MR and Trevillyan JM. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol* 2002;**195**:109-18.
  46. Ricort JM, Tanti JF, Van Obberghen E and Le Marchand-Brustel Y. Cross-talk between the platelet-derived growth factor and the insulin signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1997;**272**:19814-8.
  47. Montmayeur JP, Valius M, Vandenheede J and Kazlauskas A. The platelet-derived growth factor beta receptor triggers multiple cytoplasmic signaling cascades that arrive at the nucleus as distinguishable inputs. *Journal of Biological Chemistry* 1997;**272**:32670-8.
  48. Mendoza MC, Er EE and Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011;**36**:320-8.
  49. Wang CC, Cirit M and Haugh JM. PI3K-dependent cross-talk interactions converge with Ras as quantifiable inputs integrated by Erk. *Mol Syst Biol* 2009;**5**:246.
  50. Shi ZQ, Yu DH, Park M, Marshall M and Feng GS. Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity. *Mol Cell Biol* 2000;**20**:1526-36.
  51. Cunnick JM, Dorsey JF, Munoz-Antonia T, Mei L and Wu J. Requirement of SHP2 binding to Grb2-associated binder-1 for mitogen-activated protein kinase activation in response to lysophosphatidic acid and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 2000;**275**:13842-8.
  52. Arias-Romero LE, Saha S, Villamar-Cruz O, Yip SC, Ethier SP, Zhang ZY and Chernoff J. Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells. *Cancer Res* 2009;**69**:4582-8.
  53. Ravichandran LV, Chen H, Li Y and Quon MJ. Phosphorylation of PTP1B at Ser(50) by Akt impairs its ability to dephosphorylate the insulin receptor. *Mol Endocrinol* 2001;**15**:1768-80.
  54. Chabot C, Spring K, Gratton JP, Elchebly M and Royal I. New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival. *Molecular and Cellular Biology* 2009;**29**:241-53.
  55. Spring K, Chabot C, Langlois S, Lapointe L, Trinh NT, Caron C, Hebda JK, Gavard J, Elchebly M and Royal I. Tyrosine phosphorylation of DEP-1/CD148 as a mechanism controlling Src kinase activation, endothelial cell permeability, invasion, and capillary formation. *Blood* 2012;**120**:2745-56.
  56. Duelsner A, Gatzke N, Hillmeister P, Glaser J, Zietzer A, Nagorka S, Janke D, Pfitzner J, Stawowy P, Meyborg H, Urban D, Bondke Persson A and Buschmann IR. PPARgamma activation inhibits cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. *Acta Physiol (Oxf)* 2013;10.1111/apha.12179

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Daniel Hackbusch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) als interventionelle Zielstrukturen der Arteriogenese“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

## Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Daniel Hackbusch hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Hackbusch D**, Dülsner A, Gatzke N, Krüger J, Hillmeister P, Nagorka S, Blaschke F, Ritter Z, Thöne-Reineke C, Böhmer FD, Buschmann I, Kappert K. Knockout of Density-Enhanced Phosphatase-1 impairs cerebrovascular reserve capacity in an arteriogenesis model in mice., Biomed Res Int, 2013

Beitrag im Einzelnen:

- Planung und inhaltliche Mitkonzeption der Studie
- Morphologische und molekularbiologische *in vivo* (Genexpression RT-PCR, Western Blot, Micro-CT-Auswertung) und *in vitro* (RNAi, Genexpression RT-PCR, Western Blot) Analysen
- Datenauswertung und Mitverfassen des Manuskripts

Publikation 2: Buschmann I\*, **Hackbusch D\***, Gatzke N\*, Dülsner A, Trappiel M, Dagnell M, Östman A, van Huijsduijnen RH, Kappert K. Inhibition of protein-tyrosine-phosphatases enhances cerebral collateral growth in rats., J Mol Med, [online, vor Druck]

\* geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen:

- Planung der Studie und Behandlung der Versuchstiere
- Morphologische und molekularbiologische *in vivo* (Immunohistochemie) und *in vitro* (Dephosphorylierungsversuche, Western Blot) Analysen
- Datenauswertung und Mitverfassen des Manuskripts

Publikation 3: Micke P, **Hackbusch D**, Mercan S, Stawowy P, Tsuprykov O, Unger T, Ostman A, Kappert K. Regulation of tyrosine phosphatases in the adventitia during vascular remodelling., Biochem Biophys Res Commun, 2009

Beitrag im Einzelnen:

- Kritische Überarbeitung und Mitverfassen des Manuskripts

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## **Druckexemplare der ausgewählten Publikationen**

Publikation 1:

**Knockout of Density-Enhanced Phosphatase-1 impairs cerebrovascular reserve capacity in an arteriogenesis model in mice.**

Hackbusch D, Dülsner A, Gatzke N, Krüger J, Hillmeister P, Nagorka S, Blaschke F, Ritter Z, Thöne-Reineke C, Böhmer FD, Buschmann I, Kappert K., Biomed Res Int. 2013;2013:802149. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/802149>

Publikation 2:

**Inhibition of protein-tyrosine-phosphatases enhances cerebral collateral growth in rats.**

Buschmann I\*, Hackbusch D\*, Gatzke N\*, Dülsner A, Trappiel M, Dagnell M, Östman A, van Huijsduijnen RH, Kappert K., J Mol Med (Berl). 2014 Sep;92(9):983-94.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00109-014-1164-z>



Publikation 3:

**Regulation of tyrosine phosphatases in the adventitia during vascular remodelling.**

Micke P, Hackbusch D, Mercan S, Stawowy P, Tsuprykov O, Unger T, Ostman A, Kappert K., *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 May 15;382(4):678-84.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.078>

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Komplette Publikationsliste

Buschmann I\*, **Hackbusch D\***, Gatzke N\*, Dülsner A, Trappiel M, Dagnell M, Ostman A, van Huijsduijnen RH, Kappert K. Inhibition of protein tyrosine phosphatases enhances cerebral collateral growth in rats. *J Mol Med (Berl)*. 2014 May 27. [online, vor Druck] \* geteilte Erstautorenschaft

**Hackbusch D**, Dülsner A, Gatzke N, Krüger J, Hillmeister P, Nagorka S, Blaschke F, Ritter Z, Thöne-Reineke C, Böhmer FD, Buschmann I, Kappert K. Knockout of density-enhanced phosphatase-1 impairs cerebrovascular reserve capacity in an arteriogenesis model in mice. *Biomed Res Int*. 2013 Aug 20;2013:802149.

Micke P, **Hackbusch D**, Mercan S, Stawowy P, Tsuprykov O, Unger T, Ostman A, Kappert K. Regulation of tyrosine phosphatases in the adventitia during vascular remodelling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 May 15;382(4):678-84.

Caglayan E, Romeo GR, Kappert K, Odenthal M, Südkamp M, Body SC, Shernan SK, **Hackbusch D**, Vantler M, Kazlauskas A, Rosenkranz S. Profilin-1 is expressed in human atherosclerotic plaques and induces atherogenic effects on vascular smooth muscle cells. *PLoS One*. 2010 Oct 25;5(10):e13608.

## Liste der ausgewählten Publikationen

### Publikation 1:

**Hackbusch D**, Dülsner A, Gatzke N, Krüger J, Hillmeister P, Nagorka S, Blaschke F, Ritter Z, Thöne-Reineke C, Böhmer FD, Buschmann I, Kappert K. Knockout of Density-Enhanced Phosphatase-1 impairs cerebrovascular reserve capacity in an arteriogenesis model in mice. *Biomed Res Int*. 2013 August 20 2013:802149.

Impact Factor: 2,880

(Titel des Journals formals: Journal of Biomedicine and Biotechnology)

### Publikation 2:

Buschmann I\*, **Hackbusch D\***, Gatzke N\*, Dülsner A, Trappiel M, Dagnell M, Östman A, van Huijsduijnen RH, Kappert K. Inhibition of protein-tyrosine-phosphatases enhances cerebral collateral growth in rats. *J Mol Med* (im Druck)

\* geteilte Erstautorenschaft

Impact Factor: 4,768

### Publikation 3:

Micke P, **Hackbusch D**, Mercan S, Stawowy P, Tsuprykov O, Unger T, Ostman A, Kappert K. Regulation of tyrosine phosphatases in the adventitia during vascular remodelling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 May 15;382 (4):678-84.

Impact Factor: 2,406

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank an all jene richten, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit begleitet haben. Mein herzlicher Dank geht an den Direktor des Instituts für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie Professor Dr. med. Rudolf Tauber und den Direktor des Center for Cardiovascular Research Professor Dr. med. Ulrich Kintscher. Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Professor Dr. med. Kai Kappert. Ohne seinen wertvollen akademischen Rat wäre die Arbeit in dieser Form nicht entstanden. Meinen Kollegen und Ko-Autoren danke ich für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit. Darüber hinaus bedanke ich mich für die fachlichen und außerfachlichen Diskussionen und Momente, die zu einem erinnerungswürdigen Entstehungsprozess dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meiner Familie, meinen Großeltern und meinen Freunden.