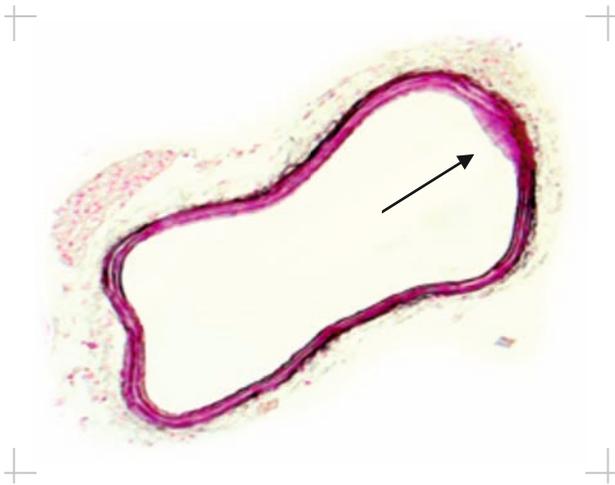


RESTENOSEPHÄNOMENE IN ARTERIEN

Die besondere Rolle von Insulinrezeptorsubstrat-2
in glatten Muskelzellen

Nicole Blank



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär -Anatomie, -Histologie und -Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

und

„Zentrum für Endokrinologie, Diabetologie und Präventivmedizin“
der Universität zu Köln

Betreuer: PD Dr. Markus Schubert

RESTENOSEPHÄNOMENE IN ARTERIEN

DIE BESONDERE ROLLE VON INSULINREZEPTORSUBSTRAT-2 IN GLATTEN MUSKELZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Nicole Blank geb. Müller

Tierärztin aus Chemnitz

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold
2. PD Dr. Markus Schubert

Tag der Disputation: 24.05.2016

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Der medizinische Hintergrund	1
1.2. Der Aufbau der arteriellen Blutgefäße	2
1.3. Die Atherosklerose	3
1.4. Die Ballonangioplastie (PTA).....	3
1.5. Die Restenose in Arterien nach Ballondilatation	4
1.6. Die Restenose beim Diabetes mellitus Patienten:- eine besondere Herausforderung.....	5
1.7. Der Stand der Forschung zur Neointimabildung	6
1.8. Die Signaltransduktionswege des Insulin- und des IGF-1-Rezeptors.....	8
1.8.1. Die IRS-Proteine.....	9
1.8.2. Der Phosphatidylinositol-3 (PI3) Kinase Signalweg	10
1.8.3. Der Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinase Signalweg.....	11
1.8.4. mTOR	11
1.9. Die Fragestellung.....	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Material	14
2.1.1. Gerät.....	14
2.1.2. Pharmaka	15
2.1.3. Operationsbesteck.....	16
2.1.4. Verbrauchsmaterialien	16
2.1.5. Chemikalien.....	17
2.1.6. Puffer und Lösungen	19
2.1.7. (Färbe-) Lösungen	20
2.1.8. Primer, Enzyme, Inhibitoren und Zubehör	21
2.1.9. Antikörper	22
2.1.9.1. Primärantikörper	22
2.1.9.2. Sekundärantikörper	22
2.1.10. Kits.....	23
2.1.11. Software	23
2.2. Methoden.....	24
2.2.1. Mauslinie	24
2.2.2. Genotypisierung.....	26
2.2.3. Metabolische Charakterisierung	28
2.2.4. Echokardiografie.....	29

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.5.	<i>In vivo</i> Signaling.....	29
2.2.6.	Organlyse	30
2.2.7.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.2.8.	Western Blot	31
2.2.9.	Perkutane Transluminale Angioplastie (PTA) der ACC	32
2.2.9.1.	mittels Ballonkatheter	32
2.2.9.2.	mittels Führungsdrahtes	34
2.2.10.	Transkardiale Perfusion.....	36
2.2.11.	Präparation der Arteria Carotis Communis sowie anderer Organe.....	36
2.2.12.	Nachfixierung.....	37
2.2.13.	Histologie.....	37
2.2.13.1.	Paraffineinbettung.....	37
2.2.13.2.	Silanisierung der Objektträger	38
2.2.13.3.	Anfertigen der Schnitte	38
2.2.13.4.	Entparaffinierung	38
2.2.13.5.	Färbungen	39
2.2.13.5.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	39
2.2.13.5.2.	Resorcinfuchsinfärbung nach Weigert.....	39
2.2.13.5.3.	van-Gieson-Lösung (Pikrofuchsin)	40
2.2.13.5.4.	Rhodamine Wheat Germ Agglutinin Färbung.....	40
2.2.14.	Isolierung von Primärzellen	41
2.2.15.	Zelllyse	42
2.2.16.	Western Blot (siehe oben)	42
2.2.17.	Proliferationsassay	42
2.2.18.	Statistik	43
3.	ERGEBNISSE	44
3.1.	Nachweis der Expression des Transgens	44
3.1.1.	eGFP und IRS-2 in ausgewählten Organen	44
3.1.2.	<i>In vivo</i> Signaling.....	46
3.1.3.	eGFP und IRS-2 in Zelllysaten	48
3.2.	Charakterisierung der IRS-2^{OE}-Maus im Vergleich zur CO^{OE}-Maus	49
3.2.1.	Körpergewicht.....	49
3.2.2.	Die histologische Untersuchung ausgewählter innerer Organe	50
3.2.3.	Die Überprüfung der Glukose- und Insulintoleranz	51
3.2.4.	Der Nachweis eines vergrößerten Herzens in IRS-2 ^{OE} -Mäusen.....	52
3.2.5.	Die Morphologie der Arterien.....	56
3.3.	Die Auswirkung einer Ballondilatation auf die ACC von IRS-2^{OE}- und CO^{OE}-Mäusen nach 2 Wochen.....	58
3.4.	Die Auswirkung einer Gefäßwandverletzung mittels eines Führungsdrahtes auf die ACC von IRS-2^{OE}- und CO^{OE}-Mäusen nach 4 Wochen	64

3.5. Charakterisierung von isolierten VSMC	65
3.5.1. Proliferationsassay	66
3.5.2. Western Blot Analysen	68
4. DISKUSSION	72
4.1. Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse	72
4.2. Die Auswahl des Tiermodells: Vorteile und Grenzen	72
4.3. Das Verhalten isolierter IRS-2-überexprimierender VSMC	74
4.4. <i>In vivo</i> Ergebnisse	75
4.4.1. Die Histologie ausgewählter Organe	76
4.4.1.1. Kardialer Phänotyp	76
4.4.2. Der Aufbau von Aorta und Carotiden in IRS-2 ^{OE} -Mäusen.....	77
4.4.3. Die Auswirkungen einer Arterien Dilatation in IRS-2 ^{OE} -Mäusen.....	78
4.5. Die Diskrepanz zwischen den <i>in vivo</i> und den <i>in vitro</i> Befunden - mögliche Erklärungen	81
4.6. Die mögliche klinische Relevanz	84
5. ZUSAMMENFASSUNG	88
6. SUMMARY	89
7. LITERATURVERZEICHNIS	90
8. DANKSAGUNG	113
9. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	114

Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ACC	Arteria carotis communis
AKT	PKB = Proteinkinase B
APS	Ammoniumpersulfat
BrdU	2-Bromo-5-desoxyuridin
BSA	bovine serumalbumin, Rinderserumalbumin
cm	Zentimeter
CO ^{OE} -Maus	Kontrollmaus zur IRS-2 ^{OE} -Maus (exprimiert SM22-Cre) (Details siehe 2.2.1.)
CXCL12	CXC-motiv-chemokin 12
DAPI	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
DES	drug eluting stents
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium; high-glucose DMEM enthält 4,5 g Glukose/l
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein (verstärkt grün fluoreszierendes Protein)
EPO	Erythropoetin
ERK1/2	extracellular signal-regulated-kinase-1/-2
FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
FoxO	forkhead box transcription factors
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GDP	Guanosindiphosphat
GLUT-4	Glukosetransporter 4
GRB-2	growth factor receptor binding protein 2
GSK-3 β	glycogen synthase kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
GTT	Glukosetoleranztest
G β L	G-protein β -subunit like protein
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
HG	Herzgewicht
Hz	Hertz
IDF	international diabetes federation
I.E.	internationale Einheit
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1-Rezeptor
IL-4	Interleukin-4
i.p.	intra peritoneal
IR	Insulinrezeptor
IRS-1	Insulinrezeptorsubstrat 1
IRS-1-KO	Insulinrezeptorsubstrat 1 Knockout
IRS-2	Insulinrezeptorsubstrat 2
IRS-2-KO	Insulinrezeptorsubstrat 2 Knockout
IRS-2 ^{OE} -Maus	IRS-2 in glatten Muskelzellen überexprimierende Maus (Details siehe 2.2.1.)
ITT	Insulintoleranztest
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
KO	Knockout
KRLB	kinase regulatory loop binding
LST8	lethal with sec thirteen 8

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LV	linker Ventrikel
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated Protein-Kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHz	Megahertz
min.	Minuten
ml	Milliliter
mLST8/GβL	mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein
mM	Millimolar
Mr	Molekularmasse
mSIN1	mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1
mTOR	mechanistic target of Rapamycin (früher: <i>mammalian target of Rapamycin</i> , <i>Ziel des Rapamycins im Säugetier</i>)
mTORC1	mTOR complex 1
mTORC2	mTOR complex 2
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NO	Stickoxid
OP	Operation
pAKT	phosphoryliertes AKT an Ser ⁴⁷³
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphat buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PDK-1/2	phosphoinositide-dependent protein kinase
pERK	phosphoryliertes ERK an Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴
PFA	Paraformaldehyd
pGSK-3α/β	phosphoryliertes GSK-3α/β an Ser ²¹ /Ser ⁹
PH	pleckstrin homology
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pmol	Pikomol

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTB	phosphotyrosinbindend
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
P/S	Penicillin/Streptomycin
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma / rat fibrosarcoma
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
RAS	rat sarcoma protein
Rheb	RAS homolog enriched in brain
Rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
R-WGA	Rhomdamine Wheat Germ Agglutinin
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde
sham	schein operiert
SHP2	Tyrosin Phosphatase
Silan	3-Aminopropyltriethoxysilan
SMC	smooth muscle cells (glatte Muskelzellen)
SOS	son of sevenless
SP	Sammelgelpuffer
TBS	TRIS-buffered saline buffer, TRIS-gepufferter Salzpuffer
TBS-T	TRIS-gepufferter Salzpuffer mit Polysorbit-Zusatz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TL	Tibiallänge
TMB	Tetramethylbenzidin
TP	Trenngelpuffer
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TSC-1	Hamartin
TSC-2	Tuberin
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	vascular smooth muscle cells (glatte Gefäßmuskelzellen)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

wo	Wochen
WTK-1	Wildtypmaus von IRS-1-KO Mäusen
WTK-2	Wildtypmaus von IRS-2-KO Mäusen
μm	Mikrometer, 10^{-6}
4E-BP	eukaryotic translation initiation factor 4E-1A-binding protein

Abbildungsverzeichnis

EINLEITUNG

Abb. 1: Drug eluting stents (DES).....	1
Abb. 2: Wandaufbau der Arterie	2
Abb. 3: perkutane transluminale Angioplastie (PTA).....	4
Abb. 4: Neointimabildung	7
Abb. 5: Signaltransduktionsweg des IR und des IGF-1R.....	8
Abb. 6: Vergleich der IRS-Proteine.....	9

MATERIAL UND METHODEN

Abb. 7: IRS-2 Konstrukt, eingefügt in den ROSA26 Lokus	25
Abb. 8: LacZ-Färbung	26
Abb. 9: Sonographiebilder des Mäuseherzens.....	29
Abb. 10: schematische Darstellung des Katheters sowie der Operation.....	33
Abb. 11: Operationsfeld in situ	35
Abb. 12: Operationsfeld mit Insertion des Ballonkatheter	35

ERGEBNISSE

Abb. 13: eGFP in Organlysaten	45
Abb. 14: IRS-2 in der Aorta	45
Abb. 15: <i>in vivo</i> Signaling	46
Abb. 16: <i>in vivo</i> Signaling	47
Abb. 17: eGFP in Zelllysaten	48
Abb. 18: IRS-2 in Zelllysaten	48
Abb. 19: Körpergewicht der Mäuse	49
Abb. 20: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte repräsentative Schnitte verschiedener Organe von IRS-2 ^{OE} und CO ^{OE} Mäusen	50
Abb. 21: Glukose- und Insulintoleranztest.....	51
Abb. 22: LV/KG	52
Abb. 23: LV/TL	52
Abb. 24: Sonographiebilder (M-Mode) des Mäuseherzens.....	53
Abb. 25: Enddiastolische Myokarddicke	53
Abb. 26: Pikrofuchsin Färbung des Herzgewebes einer IRS-2 ^{OE} -Maus	54
Abb. 27: Pikrofuchsin Färbung des Herzgewebes einer CO ^{OE} -Maus	54
Abb. 28: WGA-Färbung des Herzgewebes einer IRS-2 ^{OE} -Maus	55

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 29: WGA-Färbung des Herzgewebes einer CO ^{OE} -Maus	55
Abb. 30: Elastika-Färbung der Aorta und der A. carotis communis	56
Abb. 31: Wandstärkendurchschnitt der Aorta und der ACC.....	57
Abb. 32: Histologische Bilder von Arterien	58
Abb. 33: Kontroll-ACC einer IRS-2 ^{OE} -Maus.....	59
Abb. 34: operierte ACC einer IRS-2 ^{OE} -Maus.....	59
Abb. 35: Kontroll-ACC einer CO ^{OE} -Maus.....	60
Abb. 36: operierte ACC einer CO ^{OE} -Maus.....	60
Abb. 37: operierte A. carotis communis (ACC) von IRS-2 ^{OE} -Mäusen (1. OP bis 5. OP).....	61
Abb. 38: operierte A. carotis communis (ACC) von CO ^{OE} -Mäusen (6. OP bis 10. OP).....	62
Abb. 39: Sham- operierte A. carotis communis (ACC).....	63
Abb. 40: tabellarische Aufzeichnung der OP-Tiere mit Beurteilung der Neointimabildung	63
Abb. 41: 4 Wochen alte operierte A. carotis communis (ACC) einer ♂ IRS-2 ^{OE} -Maus sowie einer ♂ CO ^{OE} -Maus	64
Abb. 42: Intima-Media-Ratio von ACC 4 Wochen nach Operation	65
Abb. 43: Proliferationsassay mit IRS-2 ^{OE} -Zellen	66
Abb. 44: Proliferationsassay mit KO-VSMC	67
Abb. 45: IRS-1/IRS-2 Western Blot	68
Abb. 46: pAKT ^{Ser473} /pERK ^{Thr202/Tyr204} Western Blot	69
Abb. 47: pAKT ^{Ser473} /pERK ^{Thr202/Tyr204} Western Blot	70
Abb. 48: pGSK3α/β ^{Ser21/Ser9} /PTEN Western Blot.....	71

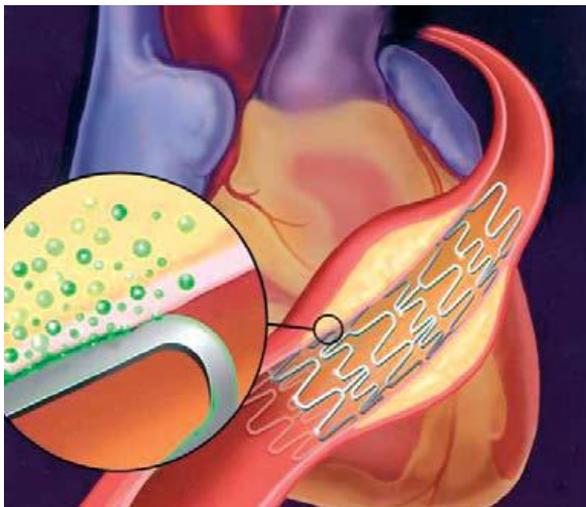
DISKUSSION

Abb. 49: Die Zelladhäsionskaskade	84
---	----

1. Einleitung

1.1. Der medizinische Hintergrund

Die Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind ein wichtiger Teilaspekt der Inneren Medizin. Sie sind die Todesursache Nr.1 in modernen Industrienationen; weltweit werden etwa 30 % der Todesfälle dieser Erkrankung zugeschrieben (Beaglehole, R. et al., 2004). Fast 90 % bis 95 % aller arteriellen Erkrankungen entstehen durch eine Atherosklerose mit Ausbildung von Engstellen (Stenosen) oder Verschlüssen. Dazu zählt die koronare Herzkrankheit (KHK), die mit einer kathetervermittelten Dilatation von intraarteriellen Stenosen therapiert werden kann. Die minimalinvasiven Maßnahmen zur Revaskularisierung sind jedoch durch einen hohen Prozentsatz von Wiederverschlüssen der betroffenen Gefäße gekennzeichnet. Bei 30 % bis 50 % der Patienten, die eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) erhalten haben, kommt es bereits in den ersten Monaten nach dem Eingriff zur Restenose der dilatierten Gefäße (Nobuyoshi, M. et al., 1988); (Serruys, P. W. et al., 1988). Die deswegen entwickelten Gefäßprothesen (Stents) verhindern zwar das unmittelbare Wiederzusammenziehen des Gefäßes nach Angioplastie (elastisches Recoil). Sie verstärken jedoch die Zellvermehrung (Proliferation) und Zellwanderung (Migration) medialer glatter Muskelzellen (SMC) in die Intima. Somit sind sie immer noch mit einer inakzeptablen hohen Anzahl an Restenoseraten (~30 %) behaftet (Kuntz, R. E. et al., 2000). Durch die klinische Einführung von drug eluting stents (DES) konnte das Restenoserisiko



beim Durchschnittspatientengut verbessert werden (Liistro, F. et al., 2010). DES sind implantierbare Gefäßstützen die antiproliferativ wirkende Arzneistoffe wie den mTOR-Inhibitor Sirolimus (Rapamycin) oder das Zytostatikum Paclitaxel freisetzen. Neben diesen Patienten fallen Risikopatienten auf, wie z.B. Diabetes mellitus Patienten. Diese weisen trotz der Verwendung von DES eine erhöhte Rate an Restenosen auf.

Abb. 1: Drug eluting stents (DES)

Die Metallröhrchen sind mit einem Polymer beschichtet, welches kontrolliert antiproliferative und/oder antientzündliche Wirkstoffe freisetzt (Boston Scientific, Deutsches Ärzteblatt, Jg. 104, Heft 3, 19. Januar 2007).

1.2. Der Aufbau der arteriellen Blutgefäße

Die Wand einer Arterie besteht aus drei konzentrischen Schichten. Innen befindet sich die Tunica intima (Intima), deren Hauptbestandteile das an das Lumen grenzende Endothel, eine zarte subendotheliale Bindegewebsschicht sowie die Membrana elastica interna sind. In der Wandmitte liegt die Tunica media (Media), die vor allem aus überwiegend zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen und Bindegewebsfasern besteht. Außen befindet sich die Tunica adventitia (Adventitia, Tunica externa), die überwiegend aus längs verlaufenden Kollagenfibrillen, zahlreichen elastischen Fasern sowie Fibroblasten besteht und die ohne scharfe Grenze in das benachbarte lockere Bindegewebe übergeht (Welsch, Lehrbuch Histologie).

Bei den Arterien unterscheidet man zwei Gefäßtypen; den elastischen Typ, zu dem z.B. die Aorta gehört, und den muskulären Typ. Im herznahen Kreislaufbereich befinden sich Arterien vom elastischen Typ, welche zahlreiche Elastinlamellen aufweisen, die vorwiegend in der Media zu finden sind. Diese Lamellen sind durch Lücken unterbrochen, was zu einer vermehrten Elastizität führt. Da es aufgrund des Wechsels von Systole und Diastole zu großen Druckschwankungen kommt, sind diese besonders wichtig. Die Media weist darüber hinaus eine geringere Zahl an glatten Muskelzellen auf (Welsch, Lehrbuch Histologie). Bei den Arterien des muskulären Typs dagegen findet man eine sehr ausgeprägte Media mit vielen glatten Muskelzellen. Diese dienen nicht nur als kontraktile Elemente zur Regulation

des Blutdrucks und der Blutverteilung, sondern spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Produktion von Kollagenfasern, des Elastins und der Proteoglykane (Welsch, Lehrbuch Histologie).

Der Übergang allerdings zwischen den Arterientypen ist fließend. So nimmt die A. carotis eine Intermediärstellung hinsichtlich ihrer Wandstruktur ein. Die Anzahl der Elastinlamellen ist geringer als in der Aorta, die Ausprägung der glatten Muskelzellen hingegen ist höher als in anderen mittelgroßen oder kleineren Gefäßen.

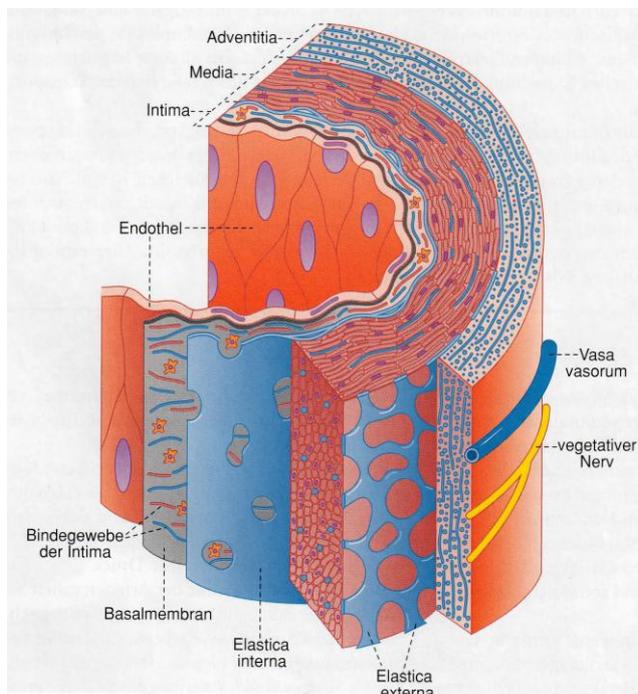


Abb. 2: Wandaufbau der Arterie

Schematische Darstellung einer Arterie vom muskulären Typ (Welsch, Lehrbuch Histologie, München 2003, Seite 212).

1.3. Die Atherosklerose

„Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine krankhafte Veränderung der Arterien, welche mit Verhärtung, Verdickung und Elastizitätsverlust der Arterienwand einhergeht (Pschyrembel - klinisches Wörterbuch 1998, de Gruyter).“

Mit der Entstehung der Atherosklerose werden verschiedenste Erkrankungen und Prädispositionen in Verbindung gebracht. Einer der Risikofaktoren ist die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus (Baynes, J. W. et al., 1999). Er ist gekennzeichnet durch Hyperglykämie und im Falle eines Typ-2-Diabetes einer Insulinresistenz; beide können zu arteriellen Dysfunktionen führen. Unter anderem inhibiert eine Hyperglykämie die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch Blockade der endothelialen NO-Synthaseaktivität (De Vriese, A. S. et al., 2001). NO ist ein Vasodilatator, der unter anderem auch die Plättchenaktivierung oder inflammatorische Reaktionen hemmt.

Im Rahmen eines sogenannten metabolischen Syndroms treten zusätzlich zum Diabetes mellitus Typ 2 eine arterielle Hypertonie, eine Hyperlipoproteinämie und eine Hyperurikämie auf. Sie stellen weitere Risikofaktoren der Atherosklerose dar, wie auch Tabakkonsum, Übergewicht und Bewegungsmangel (Burke, L. E. et al., 1997). Diese Faktoren führen zur Schädigung oder zur Dysfunktion des Endothels, zur Thrombozytenaktivierung, zur chronischen Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Leukozyten und zur Aktivierung und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (SMC). Eine Komplikation stellt die Ausbildung von Stenosen und gegebenenfalls Verschlüssen dar.

1.4. Die Ballonangioplastie (PTA)

Die Ballonangioplastie ist heute der Standard der Behandlung von arteriellen Gefäßverengungen oder Gefäßverschlüssen. Es handelt sich dabei um ein minimalinvasives Verfahren, das auch als *Perkutane Transluminale Angioplastie*, kurz PTA, bezeichnet wird. Dabei kommt es zur Erweiterung oder Wiedereröffnung der Gefäße mittels Ballondilatation. Andreas Roland Grüntzig, ein deutscher Angiologe und Kardiologe, führte 1977 erstmals eine erfolgreiche Ballondilatation zur Aufdehnung verengter Herzkranzgefäße in Zürich durch (Grüntzig, A. R. et al., 1979). Im Jahre 2008 wurden in Deutschland bereits 303.832 Patienten mit einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) behandelt, davon erhielten 271.329 Patienten eine Stentimplantation (25. Bericht über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore). Die Methode zählt damit mittlerweile zu den kardiologischen Routineeingriffen. Bei der PTCA wird die Erweiterung des Gefäßlumens mit Hilfe eines Ballonkatheters durchgeführt, der durch die Applikation eines intraluminalen Drucks von bis zu 15 bar dilatiert wird.

Die Erweiterung wird durch das Einreißen der atherosklerotischen Plaques, eine



Überdehnung der Gefäßwand einschließlich der Media und der Adventitia sowie der Kompression von eventuell vorhandenem atherothrombotischen Material erreicht. Neben akuten Komplikationen bei der PTCA ist die wichtigste chronische Komplikation die Restenose. Sie stellt nach wie vor eine der Hauptprobleme der perkutanen koronaren Revaskularisationstherapie dar (Califf, R. M. et al., 1991); (Gruberg, L. et al., 2000). Sie entwickelt sich ohne weitere Therapie innerhalb der ersten 6 Monate in 30 % bis 40 % der Fälle.

Abb. 3: perkutane transluminale Angioplastie (PTA)

Bei einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA) durchgeführte Katherisierung (1) mit anschließender Ballondilatation (2) und Stentimplantation (3) (www.pd-dr-herrman.de).

1.5. Die Restenose in Arterien nach Ballondilatation

Eine Restenose ist eine Wiedereinengung im Bereich einer zuvor behandelten Stenose eines Blutgefäßes oder eines anderen Hohlorgans. So gibt es Restenosen beispielsweise nach Angioplastie von Koronarstenosen oder im Rahmen einer pAVK (periphere arterielle Verschlusskrankheit) in Becken- oder Beinarterien. Es liegt *per definitionem* eine Restenose vor, wenn ein Lumenverlust von $\geq 50\%$ der ursprünglichen durch die Angioplastie erreichten Zunahme des Gefäßdurchmessers besteht bzw. eine Stenose von über 50 % bei einer nachfolgenden Angiographie vorliegt (Bennett, M. R. et al., 2001).

Die Pathophysiologie der Restenose ist komplex und noch nicht endgültig geklärt. Folgende Mechanismen werden diskutiert, die zu ihrer Ausbildung führen:

- das elastische Recoil des Gefäßes (Block, P.C., 1990)
- die Neointimaformation aufgrund von Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen (SMC) und Myofibroblasten sowie der Produktion von extrazellulärer Matrix – sogenanntes arterielles Remodeling

Das elastische Recoil des Gefäßes stellt das unmittelbare Zusammenziehen der elastischen Fasern des Gefäßes nach Angioplastie dar. Es kann zu einem Lumenverlust von bis zu 50% der maximal erreichbaren Fläche direkt nach der Ballondeflation kommen (Rensing, B. J. et al., 1991). Dies kann durch die Implantation von Stents verhindert werden. Allerdings können Stents aufgrund des chronischen Reizes die Entzündungsreaktion in der Gefäßwand sowie

die Proliferation von medialen glatten Gefäßmuskelzellen verstärken (Kuntz, R. E. et al., 2000).

Unter arteriellem Remodeling versteht man strukturelle und morphologische Veränderungen eines arteriellen Gefäßes innerhalb der Lamina elastica externa. Es werden zwei Hauptformen des arteriellen Remodelings unterschieden. Das positive arterielle Remodeling geht mit einer Größenzunahme des Gefäßes einher, während das negative arterielle Remodeling eine Reduktion der Gefäßgröße beinhaltet (Ward, M. R. et al., 2000). Das negative arterielle Remodeling kann bei pathologischen Prozessen bis zum Verschluss führen. Als wichtige Pathomechanismen sind hier Intimahyperplasie, Mediahyperplasie oder Thrombusbildung nach Plaqueruptur sowie eine andauernde Vasokonstriktion zu nennen (Ward, M. R. et al., 2000); (Zubilewicz, T. et al., 2001). Die intimale Hyperplasie oder Neointimabildung, die als wichtigste Ursache für die Restenose gilt, wird initiiert durch die Verletzung der Gefäßwand während des Eingriffs, z.B. bei einer Ballonangioplastie. Dadurch werden zelluläre Mediatoren und Wachstumsfaktoren freigesetzt, die eine Migration glatter Muskelzellen von der Media in die Intima bewirken und ihre Proliferation fördern. Zu diesen Wachstumsfaktoren zählt der *platelet derived growth factor* (PDGF) (Grotendorst, G. R. et al., 1981); (Blank, R. S. et al., 1990); (Majesky, M. W. et al., 1990); (Jawien, A. et al., 1992). Sowohl die Plättchen als auch die Thrombusformation sind in den Prozess der Restenose verwickelt (Ip, J. H. et al., 1991). Eine wichtige Rolle spielt auch die Inflammation. Im Menschen erfolgt circa 15 min. nach einer PTCA ein Anstieg von Neutrophilen-, Monozyten-, und Plättchenadhäsionsmolekülen (Serrano, C. V., Jr. et al., 1997). Inflammatorische Zellen sind wichtige Mediatoren im Prozess der Restenose nach Gefäßverletzung (Welt, F. G. et al., 2000). Während dieses Vorgangs dedifferenzieren die glatten Muskelzellen (SMC) vom kontraktilen zum sogenannten synthetisierenden (sekretorischen) Phänotyp, was mit dem Verlust von Markermolekülen der VSMC, wie z.B. α -Aktin, verstärkter Proliferation und der Möglichkeit zur Migration verbunden ist (Thyberg, J. et al., 1997). Allerdings haben die VSMC in der Neointima nicht nur ihren Ursprung in der Media des Gefäßes. Sowohl im murinen als auch im humanen System konnten hämatopoetische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark nachgewiesen werden, die nach Verletzung der Gefäßwand im geschädigten Bereich adhären und dort phänotypisch zu glatten Muskelzellen und Endothelzellen differenzieren (Sata, M. et al., 2002); (Simper, D. et al., 2002).

1.6. Die Restenose beim Diabetes mellitus Patienten: - eine besondere Herausforderung

Der Diabetes mellitus stellt eine der häufigsten chronischen Erkrankungen dar. In Deutschland ist heute schätzungsweise jeder 13. Einwohner an Diabetes erkrankt. Weltweit

gab es im Jahr 2010 nach IDF-Angaben (*international diabetes federation*) 285 Millionen Menschen im Alter von 20 bis 79 Jahren mit Diabetes, das sind 6,6 % der Weltbevölkerung (www.dzd.ev.de/diabetes-die-krankheit/zahlen/index.html, abgerufen Mai 2013).

Der Begriff Diabetes mellitus umfasst verschiedene Formen chronischer Stoffwechselerkrankungen, die mit einer verminderten Insulinbildung oder Insulinwirkung einhergehen. Gemeinsames Leitsymptom bei unbehandelten Patienten ist die Hyperglykämie. Diabetes mellitus Typ 1 und 2 sind die beiden Hauptformen dieser Erkrankung. Dem Diabetes mellitus Typ 1 liegt ein Insulinmangel zugrunde. Dies ist eine Folge der Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas. Sie wird in der Regel durch Autoimmunprozesse ausgelöst, denen häufig ein Virusinfekt vorausgeht. Bei circa 95 % aller Diabeteserkrankungen handelt es sich jedoch um den Diabetes mellitus Typ 2, der durch eine gestörte Insulinantwort am Erfolgsorgan entsteht. In der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 spielen die periphere Insulinresistenz und die Dysfunktion der insulinproduzierenden Betazellen des Pankreas eine entscheidende Rolle (Reaven, G. M., 1984). Es handelt sich dabei zunächst um einen relativen Insulinmangel durch die periphere Insulinresistenz, welcher zu Beginn mit einer gesteigerten körpereigenen Insulinproduktion ausgeglichen werden kann. Ist dieser Kompensationsmechanismus erschöpft, manifestiert sich die Erkrankung im Rahmen einer chronischen Hyperglykämie.

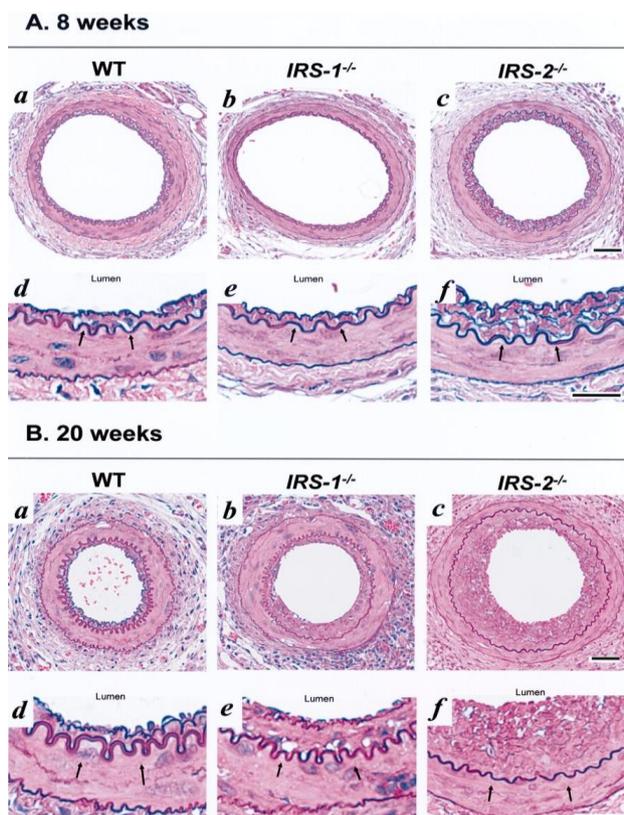
Personen mit gestörter Glukosetoleranz und vor allem solche mit manifestem Diabetes mellitus Typ 2 weisen ein zwei- bis vierfach erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Haffner, S. M. et al., 1992) und ein deutlich erhöhtes Restenoserisiko nach erfolgter Therapie der koronaren Herzkrankheit auf (Kastrati, A. et al., 1997). Welche Wirkung die Hyperinsulinämie bzw. Insulinresistenz auf glatte Gefäßmuskelzellen hat und inwieweit sie damit zur vermehrten Ausbildung einer Restenose in Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 beiträgt, ist nicht bekannt.

1.7. Der Stand der Forschung zur Neointimabildung

Die bisher publizierten Ergebnisse der Grundlagenforschung legen unter anderem eine wichtige Rolle des *platelet derived growth factor* (PDGF) nahe (Grotendorst, G. R. et al., 1981); (Blank, R. S. et al., 1990); (Majesky, M. W. et al., 1990); (Jawien, A. et al., 1992). PDGF ist ein Wachstumsfaktor, der die Neointimabildung verstärkt und die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima fördert. Des Weiteren sind metabolische Faktoren von besonderem Interesse. So kann Insulin die PDGF-Wirkung verstärken und somit auch die Neointimabildung (Pu, Q. et al., 2009); (Zhuang, D. et al., 2008). Andererseits weisen Versuchstiere mit einer Insulinresistenz ebenso eine im Vergleich zu Kontrolltieren verbreiterte Neointima nach dilatationsinduziertem

Endothelschaden auf (Jonas, M. et al., 2005). Ferner fördern der *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) (Bayes-Genis, A. et al., 2000); (Khorsandi, M. J. et al., 1992); (Zhu, B. et al., 2001) sowie Erythropoetin (Epo) (Reddy, M. K. et al., 2007); (Janmaat, M. L. et al., 2010) die Neointimabildung. Die bisherigen Erkenntnisse deuten auf eine Schlüsselposition der Insulinrezeptorsubstrate (IRS, unter 1.8.1. näher erläutert) in der Pathophysiologie der Restenose: Sie integrieren die Signale des Insulinrezeptors (IR), des IGF-1-Rezeptors und des Epo-Rezeptors und regulieren den MAPK-Weg und den PI3K-Weg (White, M. F., 2003); (Verdier, F. et al., 1997). Beide letztgenannten Signalwege, die unter den Punkten 1.8.2. bzw. 1.8.3. näher beschrieben werden, spielen eine wichtige Rolle bei der Neointimaformation (Proctor, B. M. et al., 2008); (Shi, Z. D. et al., 2010); (Duan, C. et al., 2000); (Furgeson, S. B. et al., 2010). Sie führen beide zu einer Aktivierung von mTOR (Oudit, G. Y. et al., 2004); (Astrinidis, A. et al., 2005), dessen Hemmung mittels DES derzeit mit die besten klinischen Ergebnisse bei der Vermeidung von Restenosen erzielt (Moses, J. W. et al., 2003).

Kubota et al. beschrieben eine vermehrte Neointimabildung in *IRS-1^{-/-}*- und *IRS-2^{-/-}*- Mäusen. Es handelte sich jeweils um einen konventionellen Knockout. Dies führte zu metabolischen Auffälligkeiten. Beide Mausstämme zeigten zum Zeitpunkt des Experimentes (Mäuse sind 8



oder 20 Wochen alt) eine Insulinresistenz, eine Hyperlipidämie sowie einen erhöhten arteriellen systolischen Blutdruck, wobei die *IRS-2^{-/-}*- Mäuse stärker betroffen waren (Kubota, T. et al., 2003). Dies sind bekannte Risikofaktoren der Restenose und somit ist nicht eindeutig bestimmt, was die verstärkte Neointimabildung bedingt. Eine genaue Kenntnis der in die Neointimabildung involvierten pathophysiologischen Zusammenhänge bzw. der Rolle von IRS-2-Protein in diesem Zusammenhang könnte besser abgestimmte Therapiemöglichkeiten, z.B. mit neuen DES, ermöglichen.

Abb. 4: Neointimabildung

Cuff-induzierte Neointimabildung der Arteria femoralis in *IRS-1^{-/-}*- und *IRS-2^{-/-}*- Knockout-Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Maus (WT) (Kubota, T. et al., 2003).

1.8. Die Signaltransduktionswege des Insulin- und des IGF-1-Rezeptors

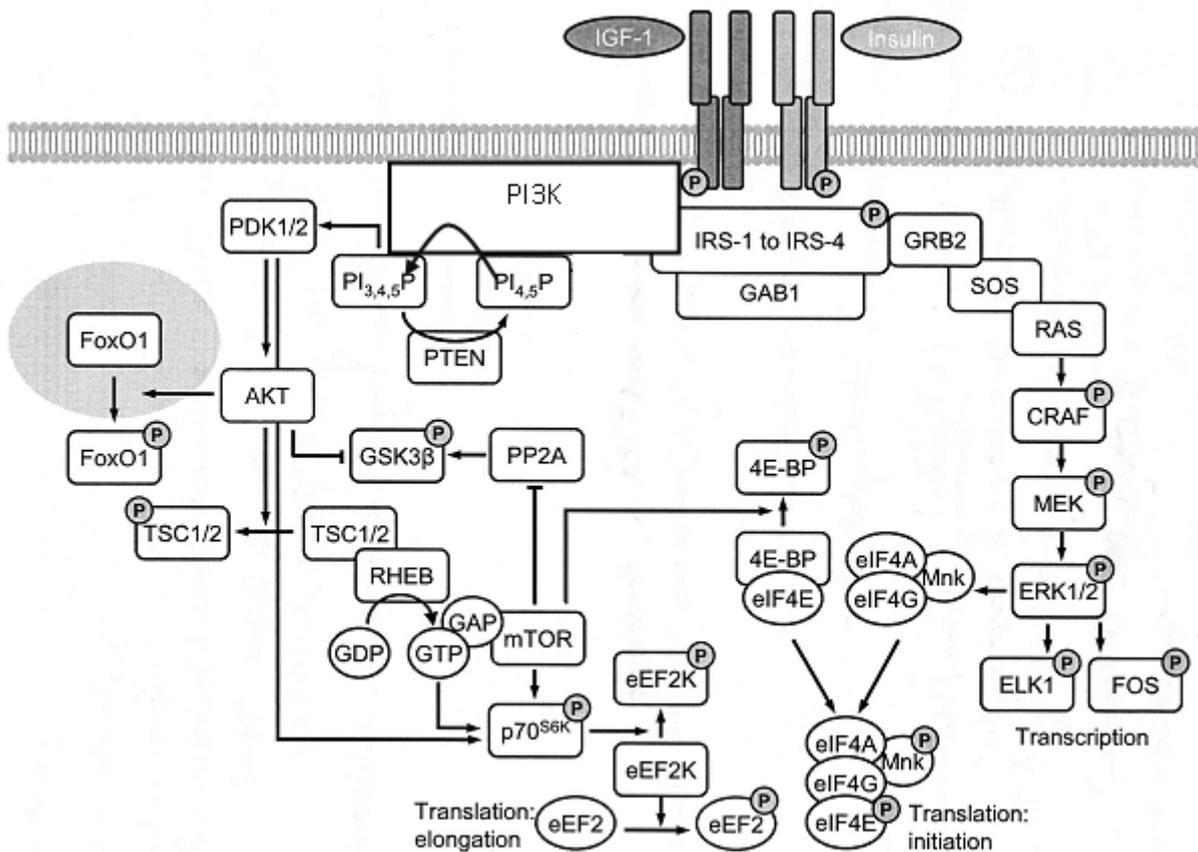


Abb. 5: Signaltransduktionsweg des IR und des IGF-1R

Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege des Insulin- (IR) und des Insulinlike-growth-factor-1 Rezeptors (IGF-1R). (Freude S. & Schubert M.: Insulin receptor signaling in the central nervous system. Nova Science Publishers Inc. New York)

Der Insulin- bzw. der IGF-1-Rezeptor ist ein transmembranäres Glykoprotein, das aus je zwei sogenannten α - und β - Untereinheiten besteht. Die zwei α -Untereinheiten stellen die extrazelluläre Bindungsstelle des Insulins bzw. des IGF-1 dar, die zwei β -Untereinheiten beinhalten die intrazelluläre Rezeptortyrosinkinase (Rosen, O. M., 1987); (Kahn, C. R. et al., 1985). Die Bindung von IGF-1 bzw. Insulin induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors und aktiviert die Tyrosinkinaseaktivität der β -Untereinheiten, was wiederum zu einer gegenseitigen Phosphorylierung der intrazellulären β -Untereinheiten führt (Kahn, C. R. et al., 1985). Die tyrosinphosphorylierten β -Untereinheiten des IR/IGF-1R rekrutieren bzw. phosphorylieren Tyrosinreste der intrazellulär lokalisierten Insulinrezeptorsubstrate (IRS).

1.8.1. Die IRS-Proteine

Die Familie der IRS-Proteine besteht aus mindestens vier verschiedenen Proteinen, IRS-1 bis IRS-4, wobei 3 der 4 IRS-Proteine in der Maus sowie im Menschen gefunden wurden. Zu diesen zählen IRS-1 und IRS-2, welche ubiquitär im Organismus exprimiert werden und IRS-4, welches limitiert im Thymus, Gehirn und Niere und wahrscheinlich in den β -Zellen des Pankreas exprimiert wird (White, M. F., 2002). Bei Nagetieren findet man zusätzlich IRS-3, welches im Wesentlichen nur im Fettgewebe nachgewiesen werden konnte (Sciacchitano, S. et al., 1997). Charakteristisch für alle IRS-Proteine ist eine pleckstrin homology (PH-) Domäne. An die PH-Domäne schließt sich eine phosphotyrosinbindende (PTB-) Domäne an, der eine regulatorische Einheit am c-terminalen Ende folgt. Diese ist bei allen IRS-Proteinen unterschiedlich lang. Dort befinden sich an mehreren, variablen Stellen Serin und Tyrosin, die jeweils phosphoryliert werden können. Die Phosphorylierung von Serin wirkt regulatorisch, während phosphorylierte Tyrosinstellen mit der SH2-Domäne von Effektorproteinen wie der p85-Untereinheit der PI3K, Grb2 oder SHP-2 aktivierend wirken (White, M. F., 2002). IRS-3 fehlt die Grb2- und IRS-4 die SHP2- Bindestelle. IRS-1 und IRS-2 sind weitgehend homolog. IRS-2 verfügt im Gegensatz zu IRS-1 über die sogenannte KRLB (kinase regulatory loop binding) Domäne welche die Kinasefunktion des Insulinrezeptors blockieren kann (Sawka-Verhelle, D. et al., 1997).

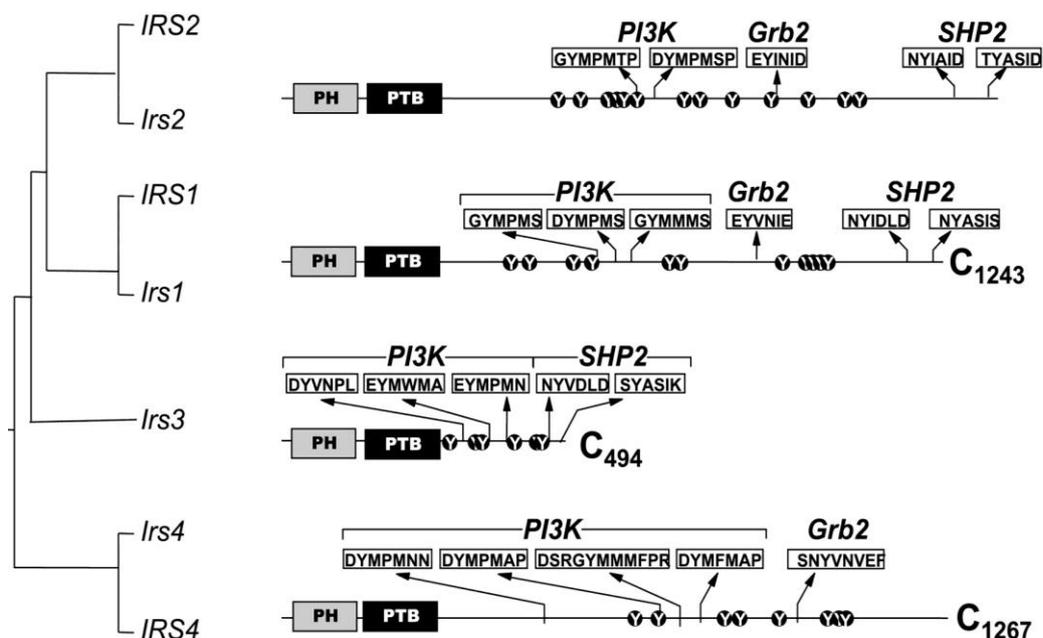


Abb. 6: Vergleich der IRS-Proteine

Potentielle Tyrosinstellen des C-terminalen Endes sind mit Y gekennzeichnet. Bekannte Phosphorylierungsstellen sind anhand der Aminosäuresequenz dargestellt, die zur Aktivierung bestimmter Enzyme (PI3K, Grb2 oder SHP2) führt (White, M. F., 2002).

Zusätzlich wurden zwei weitere, der IRS-Familie zu schreibbare Proteine identifiziert: IRS-5/DOK4 und IRS-6/DOK5 (Cai, D. et al., 2003). Sie weisen eine geringere Sequenzhomologie zu IRS-1 auf als IRS-2, IRS-3 und IRS-4. Eine Funktion in der Insulinsignalkaskade wird bezweifelt (Versteyhe, S. et al., 2010).

1.8.2. Der Phosphatidylinositol-3 (PI3) Kinase Signalweg

Phosphatidylinositol-3 Kinasen (PI3 Kinasen) sind Lipidkinasen und werden in drei Klassen (I, II und III) eingeteilt. Diese bestehen aus insgesamt acht Isoformen. Sie phosphorylieren die 3'-OH-Position des Inositolrings von Inositol-Phospholipiden in der Plasmamembran. Die Produkte der PI-3 Kinasen fungieren als „*second messenger*“, indem sie zelluläre Zielproteine binden und/oder aktivieren. Diese Ereignisse bilden den Start einer Signalkaskade. Die Klasse I A besteht aus einer katalytischen Untereinheit p110 und der regulatorischen Untereinheit p85.

Nach der Aktivierung der IRS-Proteine durch Phosphorylierung binden sie unter anderem an die p85-Untereinheit der Klasse I A PI-3 Kinasen. Die PI3 Kinase aktiviert über *phosphoinositide-dependent protein kinase* (PDK-1/2) die Proteinkinase B (PKB = AKT) (Toker, A. et al., 2000). AKT wiederum phosphoryliert *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK-3β), Tuberin (TSC-2) (Oudit, G. Y. et al., 2004) sowie die *forkhead box transcription factors* (FoxO) (Burgering, B. M., 2008). GSK-3β ist eine konstitutiv aktive Kinase, die durch Phosphorylierung inaktiviert wird. Sie reguliert die Transkription von Genen und die Proteinsynthese negativ; ihre Inaktivierung ist mit Proliferation und Hypertrophie verknüpft. FoxO-Transkriptionsfaktoren führen zu einem Proliferationsstopp sowie zur Apoptose und werden nach Phosphorylierung durch AKT aus dem Nukleus ausgeschleust (Accili, D. et al., 2004). TSC-2 (Tuberin) formt mit TSC-1 (Hamartin) einen Komplex, der Rheb (*RAS homolog enriched in brain*) inhibiert. Dieser Komplex wird durch die Phosphorylierung von TSC-2 durch AKT instabil. Rheb seinerseits aktiviert das *mechanistic target of Rapamycin* (mTOR), das über die Phosphorylierung von p70S6-Kinase und das *eukaryotic translation initiation factor 4E-1A-binding protein* (4E-BP) zur Steigerung der Proteinsynthese, zur Hypertrophie und zur Proliferation führt (Astrinidis, A. et al., 2005). Außerdem vermittelt die Aktivierung von AKT die insulinabhängige Glykogensynthese sowie die insulinabhängige Translokation des Glukosetransporters 4 (GLUT-4) an die Plasmamembran, was zur Aufnahme von Glukose in die Zelle führt (Whiteman, E. L. et al., 2002).

1.8.3. Der Mitogen-aktivierten Protein (MAP) Kinase Signalweg

Nach Stimulation mit Insulin oder IGF-1 binden die IRS-Proteine auch an SH-2-Domänen verschiedener Adapterproteine wie das *growth factor receptor binding protein 2* (GRB-2) (Myers, M. G. Jr et al., 1993); (Hanke, S. et al. 2008). Es folgt eine Interaktion mit dem GDP/GTP-Austauschfaktor SOS (*son of sevenless*), welche zu einer Aktivierung des G-Proteins RAS (*rat sarcoma protein*) führt (Molina, J. R. et al., 2006). Dies wiederum führt dazu, dass RAF sich an die Plasmamembran anlagert. RAF gehört ebenfalls zur Familie der Serin/Threoninkinasen und seine Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung letztendlich der ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase-1/-2*), was sie aktiviert. ERK1/2 phosphorylieren und aktivieren eine Vielzahl von Zelltranskriptionsfaktoren und fördern die Translation (Molina, J. R. et al., 2006). ERK1/2 phosphorylieren wie AKT TSC-2, so dass auch auf diesem Weg mTOR aktiviert wird (Astrinidis, A. et al., 2005). Die Aktivierung von ERK1/2 ist mit verstärkter Proliferation und Neointimabildung verknüpft (McCubrey, J. A. et al., 2007).

1.8.4. mTOR

Beide beschriebenen Signalwege aktivieren unter anderem mTOR (*mechanistic target of Rapamycin*). mTOR liegt in zwei Komplexen mit anderen Proteinen vor: Zum einen ist das der mTOR complex 1 (mTORC1), welcher aus mTOR, Raptor (*regulatory associated protein of mTOR*), mLST8/GβL (*mammalian LST8/G-protein β-subunit like protein*) und LST8 (*lethal with sec thirteen 8*) besteht (Loewith, R. et al., 2002). Er vermittelt Proliferation und ist *downstream* vieler Rezeptortyrosinkinasen verortet, unter anderem des bereits erwähnten Insulinrezeptors, des IGF-1 Rezeptors und des PDGFRβ. Die Aktivierung von mTOR erfolgt durch die Aktivierung von AKT und ERK1/2, was wiederum die Phosphorylierung von TSC-2 zur Folge hat. TSC-2 formt mit TSC-1 einen Komplex der Rheb inhibiert. Durch die Phosphorylierung von TSC-2 durch AKT wird dieser Komplex instabil und Rheb kann den mTORC1 aktivieren. mTORC1 wiederum phosphoryliert zwei Schlüsselproteine, welche die Translation von Proteinen positiv regulieren: 4E-BP (*eukaryotic translation factor 4E-1A-binding protein*) und p70S6K. Beide steigern die Proteinsynthese, führen zur Hypertrophie und zur Proliferation (Astrinidis, A. et al., 2005). Der mTORC1 wird durch Rapamycin gehemmt.

Zum anderen bildet mTOR den mTOR complex 2 (mTORC2) vor, welcher aus mTOR, Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*), GβL und mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*) besteht (Loewith, R. et al., 2002). mTORC-2 wird nicht bei kurzzeitiger, sondern nur bei längerfristiger Exposition durch Rapamycin gehemmt

(Lamming, D. W. et al., 2012). Dieser Komplex wird durch Insulin PI3K-abhängig aktiviert (Sarbasov, D. D. et al., 2011), vermittelt über die Acetylierung von Rictor (Glidden, E. J. et al., 2012). Er phosphoryliert AKT an der Phosphorylierungsstelle Ser473, was einen der beiden notwendigen Schritte zur vollständigen Aktivierung von AKT darstellt (Humphrey, S. J. et al., 2013). PDK-1 phosphoryliert AKT an Thr308 was wiederum zur Phosphorylierung des mTORC2 an mSIN1 Thr86 und dies letztendlich zur Phosphorylierung von AKT an Ser473 führt. Es gibt somit eine AKT-abhängige positive Rückkopplung (Humphrey, S. J. et al., 2013), die die vollständige Aktivierung von AKT bewirkt. Die Relevanz von mTORC2 bei der Ausbildung einer VSMC-getragenen Pathologie ist am Beispiel der pulmonalarteriellen Hypertonie vor Kurzem gezeigt worden (Goncharov, D. A. et al., 2014); (Krymskaya, V. P. et al., 2011). Somit führt die Aktivierung von mTORC1 zu einer direkten Steigerung der Proteinsynthese, welche sich in Proliferation und Hyperthrophie äußert und die Aktivierung von mTORC2 zu einer Phosphorylierung von AKT, welches sich indirekt ebenfalls in einer Steigerung der Proteinsynthese zeigen kann.

Des Weiteren regulieren sowohl mTORC1 als auch mTORC2 die Zellmigration. mTORC1 hat über die S6-Kinase Einfluss auf eine Neuausrichtung von F-Aktin und die Ausbildung von Adhäsionspunkten, die die Zelle mit der Umgebung interagieren lassen, und mTORC2 ist notwendig zur polaren Ausrichtung des Zytoskeletts, um eine gerichtete Fortbewegung möglich zu machen (Liu, L. et al., 2011).

Es gibt DES, die mit Rapamycin beschichtet sind, und die klinisch eine gute Wirksamkeit bei der Verhinderung einer Neointimabildung zeigen. Dieser Effekt ist bedingt durch die Proliferationshemmung der glatten Gefäßmuskelzellen (Liistro, F. et al., 2010); (Lavigne, M. C. et al., 2012). Rapamycin hemmt, wie oben beschrieben, mTORC1 – aber bei längerfristiger Einwirkung auch mTORC2 (Lamming, D. W. et al., 2012). Des Weiteren gibt es negative Rückkopplungsmechanismen zu IRS-1. Diese führen bei einem starken mTORC1/S6K1 Signal zu multiplen Phosphorylierungen an IRS-1 (Zhande, R. et al., 2002); (Tzatsos, A. 2009) und somit zu dessen Degradation. In pathologischem Ausmaß kann das eine Insulinresistenz bewirken (Um, S. H. et al., 2004). Auch für mTORC2 gibt es beschriebene negative Rückkopplungsmechanismen, die zur Degradation von IRS-1 und somit zur Schwächung des Insulin-Signales führen (Kim, S. J. et al., 2012); (Destefano, M. A. et al., 2013). Ähnliche Mechanismen sind laut Literatur für IRS-2 bisher unbekannt (Tzatsos, A. 2009). Die zitierten Publikationen legen in ihrer Gesamtheit nahe, dass eine Überexpression von IRS-2, die zu einer verstärkten Aktivierung sowohl von mTORC1 als auch von mTORC2 führen sollte, eine vermehrte Proliferation der VSMC und damit eine Zunahme der Neointimabildung nach sich ziehen sollte.

1.9. Die Fragestellung

IRS-2 aktiviert, soweit in der Literatur bekannt (Pu, Q. et al., 2009); (Zhuang, D. et al., 2008); (Bayes-Genis, A. et al., 2000); (Khorsandi, M. J. et al., 1992); (Zhu, B. et al., 2001), Signalwege, die eine Neointimabildung fördern. Andererseits wurde in der IRS-2 Knockout-Maus vermehrt Neointima beschrieben (Kubota, T. et al. 2003) und Patienten mit einer Insulinresistenz erleiden verstärkt Restenosen nach Dilatationen. Eine Schlüsselrolle in diesem Prozess stellt das Protein IRS-2 dar.

Kann IRS-2 im vorliegenden Modell einer transgenen Maus in glatten Gefäßmuskelzellen überexprimiert werden? Und zeigt sich lokal in den Gefäßen somit eine dauerhafte Stimulation des Insulin-Signalweges? Welche Auswirkungen hätte dann eine übermäßige Expression von IRS-2 in den Arterien auf den gesamten Organismus und insbesondere auf die Gefäße? Könnte eine stärkere Konzentration von IRS-2 die Neointimabildung fördern?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Gerät

- BioTek™ PowerWave 340
 - BioTek™ Bad Friedrichshall, Deutschland
- Biowizard Golden Line Sterilbank
 - KOJAIR® TECH OY Vilppula, Finnland
- Blotting Kammer Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell
 - Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop Fluorescence Microscope Eclipse E800
 - Nikon Instech Co., Ltd. Kanagawa, Japan
- Fotofilmentwickler, Curix 60
 - AGFA Mortsel, Belgien
- Fully Enclosed Tissue Processor Leica ASP300 S
- Heated Paraffin Embedding Module Leica EG1150 H
- Cold Plate for Modular Tissue Embedding System Leica EG1150 C
- Fully Automated Rotary Microtome Leica RM2255
 - Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
- Gewebe-Homogenisator
- Glaszylinder (manueller Gewebehomogenisator), Zylinder aus Borosilikatglas
- PTFE-Pistill mit Edelstahl-Schaft
 - VWR® International GmbH Darmstadt, Deutschland
- GlucoMen® (Blutzuckermessgerät)
 - A. Menarini diagnostics Berlin-Chemie Neuss, Deutschland
- iCycler Thermocycler
 - Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
- Minigel-Twin Gel Electrophoresis Apparatus, Minigel-Twin
 - Biometra GmbH Göttingen, Deutschland
- Microplate reader Mithras LB 940 multimode microplate reader
 - Berthold Technologies GmbH & Co. KG Bad Wildbad, Deutschland
- NanoDrop NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000
 - Thermo Fischer Scientific Bonn, Deutschland
- Philips iE33 Ultraschall Gerät
- L15-io7-Sonde (15 MHz Linear Array mit einer Bildrate von 270 Hz)

- Royal Philips Electronics Amsterdam, Niederlande
- Powerpac Biometra Standard Power Pack P25
 - Biometra GmbH Goettingen, Deutschland
- Research Microscope Olympus BX51
- Research Microscope Olympus CKX41
 - Olympus Deutschland GmbH Hamburg, Deutschland
- Sanyo CO₂ Inkubator
 - LMS Consult GmbH & Co. KG Brigachtal, Deutschland
- SteREO Discovery.V8 Mikroskop
- Kaltlichtquelle CL1500 ECO
 - Carl Zeiss MicroImaging GmbH Göttingen, Deutschland
- Thermomixer
 - Eppendorf Hamburg, Deutschland
- Tischzentrifuge Heraeus Biofuge, Fresco
 - Thermo Fischer Scientific Bonn, Deutschland
- Wasserbad Modell WNB22
 - Memmert GmbH & Co. KG Schwabach, Deutschland

2.1.2. Pharmaka

- Actrapid® Penfill® 100 I.E. ml Injektionslösung, Insulin human (r-DNS)
 - Novo Nordisk A/S Bagsværd, Dänemark
- Ampho-Moronal® Suspension 30 ml (Amphotericin B)
 - Dermapharm AG Grünwald, Deutschland
- Avertin (2,2,2-Tribromoethanol) T48402 – 97 %
 - Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
- Bepanthen® Augen- und Nasensalbe 5 g (5 % Dexpanthenol)
 - Bayer Vital Leverkusen, Deutschland
- Diazepam-ratiopharm 10 mg/2 ml Injektionslösung
 - Ratiopharm® GmbH Ulm, Deutschland
- Glucose-Lösung 20 % Infusionslösung
 - DeltaSelect GmbH Dreieich, Deutschland
- Isotone Natriumchlorid-Lösung 0,9 % Injektionslösung
 - Berlin-Chemie AG Berlin, Deutschland
- Ketanest®S 25 mg/ml Injektionslösung
 - Pfizer Pharma GmbH Berlin, Deutschland
- Metamizol-Natrium 1 H₂O 500 mg/20 Tropfen

- HEXAL® Holzkirchen, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin 100 x Solution (10000 Units)
 - Life Technologies GmbH Darmstadt, Deutschland
- Plica Enthaarungscreme
 - DMV - Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co. KG Bad Pyrmont, Deutschland
- Refobacin® 80 mg Injektionslösung (Gentamicinsulfat)
 - Merck Pharma GmbH Darmstadt, Deutschland
- Rompun® 2 % Injektionslösung (Xylazin)
 - Bayer Vital GmbH Leverkusen, Deutschland

2.1.3. Operationsbesteck

- Abbott Vascular Santa Clara, CA USA
 - 20/30 Indeflator®
- ETHICON a Johnson & Johnson Medical GmbH Norderstedt, Deutschland
 - Prolene, Polypropylen 6-0, C-1, 8706 H
- F S T® (Fine Science Tools) Heidelberg, Deutschland
 - Iris Scissors - Large Loops gerade 14040-10
 - Iris Scissors - Delicate Pattern Sharp/Blunt gerade 14028-10
 - Colibri Retractor 17000-03
 - Dumont #45 Forceps - Dumoxel 11245-30
 - Vannas Spring Scissors – 2,5 mm Blades abgewinkelt zur Seite 15002-08
 - Non-Sterile Silk Suture Thread 18020-60 6/0
 - Non-Sterile Silk Suture Thread 18020-30 3/0
 - Castroviejo Needle Holder - with Lock Tungsten Carbide 14 cm 12565-14
- SCHWAGER MEDICA Winterthur, Schweiz
 - Ballonkatheter mit 0,85 mm Durchmesser und 5 mm Länge 085-005-015
- VYGON Ecoen, Frankreich
 - Führungsdraht des Arterienkatheters nach Seldinger mit 0,9 mm Durchmesser 115.798

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

- 3M Medica Durapore™ Silkpflaster
 - 3M Deutschland GmbH, 3M Medica Neuss, Deutschland
- BD Plastipak™ 1 ml Spritzen
- BD Microlance™ 3 Einmalkanülen

- BD Medical Heidelberg, Deutschland
- Blotting Membran Immun-Blot PVDF Membrane für Protein Blotting
 - Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
- Blotting Papier Whatman® Gel Blotting Paper
- Trockenblock 556 (50 Blatt)
 - Schleicher & Schuell MicroScience Dassel, Deutschland
- Cell Scraper® 25LL
 - Sarstedt GmbH Sarstedt, Deutschland
- Deckgläser 24 x 50 mm
 - VWR® International GmbH Darmstadt, Deutschland
- Gewebekulturschalen 145 mm, 100 mm, 60 mm
 - Greiner Bio One Frickenhausen, Deutschland
- Histosette 2 M493-2
 - Simport Beloeil, Kanada
- Leica-Paraplast PLUS, 8 x 1 kg/cs 39602004
 - Leica Microsystems Wetzlar, Deutschland
- Molding Trays, 12 x 16 x 5 mm 27306
 - PLANO GmbH Wetzlar, Deutschland
- Neolus 26 G x ½ Einmalkanülen
 - Terumo® Leuven, Belgien
- Objektträger ca. 76 x 26 mm geputzt/gebrauchsfertig, geschnitten, Mattrand
 - Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH Edermünde, Deutschland
- Photopapier Amersham Hyperfilm™ ECL
 - GE Healthcare UK Ltd, England
- Venofix® Safety 21 G
 - Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
- Zellkulturtestplatte 96F
 - TPP Techno Plastic Products AG Trasadingen, Schweiz

2.1.5. Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis-acrylamid (30 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5/1)	
Agarose	Invitrogen Corporation Carlsbad CA, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

Benzamidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Bradfordreagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Bromophenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
96 % Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
D-Mannitol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Entellan®	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,9 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Glukoselösung 20 %	Delta Select Dreieich, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) -ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Isopropanol 99,7 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methanol 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Nonidet® P40 Substitute	FLUKA Chemie AG Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (10 x PBS)	Invitrogen Corporation Carlsbad CA, USA
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
(3-Aminopropyl)triethoxysilane	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sodium orthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Tris-Acetat-EDTA (TAE)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylen- Diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TritonX-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
TWEEN 20®	Caesar and Lorentz GmbH Bonn, Deutschland

Vectashield® (incl. DAPI) VECTOR Laboratories Burlingame CA, USA
 Xylol AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.6. Puffer und Lösungen

Organlysepuffer	50 mM HEPES (pH 7,4) 50 mM NaCl 1 % Triton X-100 10 mM EDTA + 0,1 M NaF 17 µg/ml Aprotinin 2 mM Benzamidin 0,1 % SDS 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 10 mM Na ₃ VO ₄
Sammelgelpuffer 4 x (SP)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,8 % SDS
SDS-PAGE-Laufpuffer (pH 8,3)	194 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % SDS
6 x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris-HCL (pH 6,8) 200 mM DTT 40 % Glycerol 12 % SDS 0,01 % Bromophenolblau
Strippinglösung	62,5 mM Tris-HCL (pH 6,8) 100 mM β-Mercaptoethanol 2 % SDS
Taillysepuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,5) 5 mM EDTA 0,2 % (w/v) SDS 0,2 M NaCl 500 mg/ml Proteinase K

TBS-Puffer (pH 7,6)	137 mM NaCl 20 mM Tris
TBS-T-Puffer (pH 7,6)	137 mM NaCl 20 mM Tris 0,1 % Tween 20 [®]
Trenngelpuffer 4 x (TP)	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,8 % SDS
Western Blot Antikörperlösung	137 mM NaCl 20 mM Tris 5 % Western Blocking Reagent
Western Blot Blockinglösung	137 mM NaCl 20 mM Tris 10 % Western Blocking Reagent
Western Blot Transferpuffer	194 mM Glycin 25 mM Tris 20 % Methanol (99 %) 0,05 % SDS
Zellysepuffer	50 mM NaCl 50 mM Tris-HCL (pH 7,4) 5 mM EDTA 1 % Nonidet [®] P40 Substitute

2.1.7. (Färbe-) Lösungen

- DMEM High Glucose (4,5 g/l) + l-Glutamine E15-810
 - PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
- ECL, Amersham ECL[™] Western Blotting Detection Reagents
 - GE Healthcare UK Ltd, England
- Eosin, gelblich, wasserlöslich 100 g IB-425
 - Waldeck GmbH & Co. KG Münster, Deutschland
 - 0,5 % Eosin in Aqua dest. / pro 100 ml 1 Tropfen Essigsäure

- Fetales Kälberserum (FCS)
 - Invitrogen GmbH Darmstadt, Deutschland
- Hämalanlösung sauer nach Mayer 2,5 l T865.3
 - Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
- Kernechtrot-Aluminiumsulfatlösung N069.1
 - Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder
 - Fermentas GmbH St.Leon-Rot, Deutschland
- Pikro-Fuchsin Lösung van Gieson 2E-050
 - Waldeck GmbH & Co. KG Münster, Deutschland
- Resorcin-Fuchsin Lösung nach Weigert X877.1
 - Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
- Rhodamine Wheat Germ Agglutinin RL-1022
 - VECTOR Laboratories Burlingame CA, USA
- Western Blocking Reagent
 - Roche Diagnostik GmbH, Deutschland

2.1.8. Primer, Enzyme, Inhibitoren und Zubehör

- | | |
|---|---|
| ▪ Aprotinin | Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland |
| ▪ Kollagenase | Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland |
| from Clostridium histolyticum | |
| ▪ DNase | Invitrogen Corporation, Carlsbad CA, USA |
| ▪ dNTPs | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland |
| ▪ Elastase from porcine pancreas | SERVA Electrophoresis Heidelberg, Deutschland |
| ▪ GoTaq® Hot Start Polymerase | Promega Corporation, Madison, USA |
| ▪ GoTaq® reaction buffer | Promega Corporation, Madison, USA |
| ▪ LY 294002 5 mg #V1201 | Promega Mannheim, Deutschland |
| ▪ MgCl ₂ | Promega Corporation, Madison, USA |
| ▪ PD 98,059 P215 | Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland |
| ▪ Proteinase K | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland |
| ▪ Trysin | Roche Mannheim, Deutschland |
| ▪ Trypsininhibitor | Sigma-Aldrich GmbH Steinheim, Deutschland |
| from Glycine max (soybean) | |
| ▪ Primer (diverse Sequenzen,
siehe PCR-Protokolle) | Eurofins MWG Operon Ebersberg, Deutschland |

2.1.9. Antikörper

2.1.9.1. Primärantikörper

α Smooth Muscle Monoclonal Anti-Actin Antikörper; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA;

A 5228; Western Blot: Verdünnung 1:1000

AKT Antikörper; polyclonal rabbit antibody; Cell Signaling Technology, Inc., USA;

9272; Western Blot: Verdünnung 1:1000

ERK Antikörper; polyclonal rabbit antibody; Cell Signaling Technology, Inc., USA;

9102; Western Blot: Verdünnung 1:1000

GAPDH (14C10) Antikörper; monoclonal rabbit antibody; Cell Signaling Technology, Inc., USA; # 2118; Western Blot: Verdünnung 1:1000

GFP (D5.1) Antikörper; monoclonal rabbit antibody; Cell Signaling Technology, Inc., USA;

2956; Western Blot: Verdünnung 1:1000

GSK-3- β Antikörper; monoclonal rabbit antibody; Cell Signaling Technology, Inc., USA;

9315; Western Blot: Verdünnung 1:1000

IRS-1 Antikörper; polyclonal rabbit antibody; Cell Signaling Solutions, USA;

06-248; Western Blot: Verdünnung 1:1000

IRS-2 Antikörper; polyclonal rabbit antibody; Cell Signaling Technology, Inc., USA;

4502; Western Blot: Verdünnung 1:1000

Phospho-AKT (Ser473) Antikörper; polyclonal rabbit antibody; Cell Signaling Technology, Inc., USA; # 9271; Western Blot: Verdünnung 1:1000

Phospho-ERK (Thr202/Tyr204) Antikörper, polyclonal rabbit antibody; Cell Signaling Technology, Inc., USA; # 4377; Western Blot: Verdünnung 1:1000

Phospho-GSK-3 α/β (Ser21)/(Ser9) Antikörper; polyclonal rabbit antibody; Cell Signaling Technology, Inc., USA; # 9327; Western Blot: Verdünnung 1:1000

PTEN Ab-3 Antikörper; polyclonal mouse antibody; NeoMarkers Fremont, USA;

MS-1250-PD; Western Blot: Verdünnung 1:1000

RASGAP (171) Antikörper; polyclonal rabbit antibody; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA;

sc-425; Western Blot: Verdünnung 1:1000

2.1.9.2. Sekundärantikörper

Anti Mouse IgG; Sigma-Aldrich, USA; Item # A9917; Western Blot: Verdünnung 1:10000

Anti Rabbit IgG; Sigma-Aldrich, USA; Item # A6154; Western Blot: Verdünnung 1:1000

2.1.10. Kits

- Cell proliferation ELISA BrdU (colorimetric), Roche Applied Science Mannheim, Deutschland

2.1.11. Software

- Cell^D Programm – Olympus, Lichtmikroskop
- CellSens Dimension XV Image Processing – Olympus, Fluoreszenzmikroskop
- ImageJ – Computerprogramm
- KC₄ – Programm – Proliferationsmessung
- Philips DICOM Viewer Echokardiografie – Computerprogramm
- Qlab Cardiac Analysis – Ultraschall
- GraphPad PRISM - Datenauswertung

2.2. Methoden

2.2.1. Mauslinie

Die Tierhaltung der Mäuse erfolgte unter klimatisierten Raumbedingungen (Lufttemperatur: 22 bis 24 °C) bei zwölfstündigem Tag-Nacht-Rhythmus. Wasser und standardisiertes Nagerdiätfutter wurde ad libitum bereitgestellt. Die Haltung und der Tierversuch wurden von der zuständigen Behörde (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, 45659 Recklinghausen) genehmigt und nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Die Mäusezucht wurde mit heterozygoten IRS-2 transgenen Mäusen und SM22-Cre Mäusen angesetzt. Zieltiere dieser Arbeit waren Mäuse, die mithilfe des Cre/LoxP-Systems selektiv in glatten Gefäßmuskelzellen IRS-2 überexprimierten (IRS-2^{OE}-Mäuse). Kontrolltiere waren die Mäuse, die IRS-2 transgen negativ waren aber trotzdem positiv in der SM22-Cre Expression (CO^{OE}-Mäuse).

Die IRS-2 transgenen Knock-In Mäuse wurden von Dr. rer. nat. Michael Udelhoven entworfen und diesem Projekt zur freien Verfügung gestellt. Das IRS-2 Konstrukt (siehe Abb. 7), bestehend unter anderem aus dem Insulinrezeptorsubstrat 2, der Stopkassette und der IRES (internal ribosomal entry site) befand sich im ROSA26-Genlocus (reverse orientation splice acceptor β -gal), der auf dem Chromosom 6 der Maus liegt. Er wurde 1997 erstmals von der Gruppe um Philippe Soriano beschrieben, die nach unterschiedlich regulierten Genen während der Embryonalentwicklung der Maus gesucht hatten. Sie hatten einen Genort gefunden, der unter allen untersuchten Bedingungen abgelesen wurde. Obwohl drei verschiedene ROSA26-Transkripte beschrieben wurden, führte die Unterbrechung der ROSA26-Wildtypsequenz durch den Knock-In eines Transgens nicht zu phänotypischen Veränderungen in diesen Mäusen (Zambrowicz, B. P. et al. 1997). In dem vorliegenden Genkonstrukt wurde die Expression des Transgens durch die Verwendung des chicken β -actin- CMV- Hybridpromoters (CAG) verstärkt (Alexopoulou, A. N. et al. 2008). Zwischen dem Promoter und der proteincodierenden Sequenz ist eine loxP sites flankierte Westphal-Stop-Kassette (WSS) eingefügt. Diese besteht unter anderem aus der SV40-Polyadenylierungssequenz, die einen Abbruch der Transkription bewirkt, Splice-Stellen, die zu verstümmelten mRNA's führen und einem aberrant platzierten Translations-Start-Codon, das eine fehlerhafte Proteinbildung zur Folge hat (Lakso, M. et al. 1992). In Zellen, in denen die Cre-Rekombinase exprimiert wird, wird die Westphal-Stop-Kassette ausgeschnitten und es kommt zur ungehinderten Expression der vom Transgen codierten Proteine. Diese sind im vorliegenden Fall IRS-2 und als Markerprotein eGFP (enhanced green fluorescent protein). Beide sind durch eine internal ribosomal entry site (IRES) getrennt, so dass auf

einem gemeinsamen Transkript jeweils ein eigener Translationsstartpunkt für IRS-2 und eGFP vorliegt. Es werden von den Ribosomen also zwei voneinander getrennte Proteine gebildet.

Das Genotypisierungsprotokoll stammt von Frau Dr. rer. nat. Jessika Drake (Dissertation Drake, 2013).

IRS-2 Konstrukt

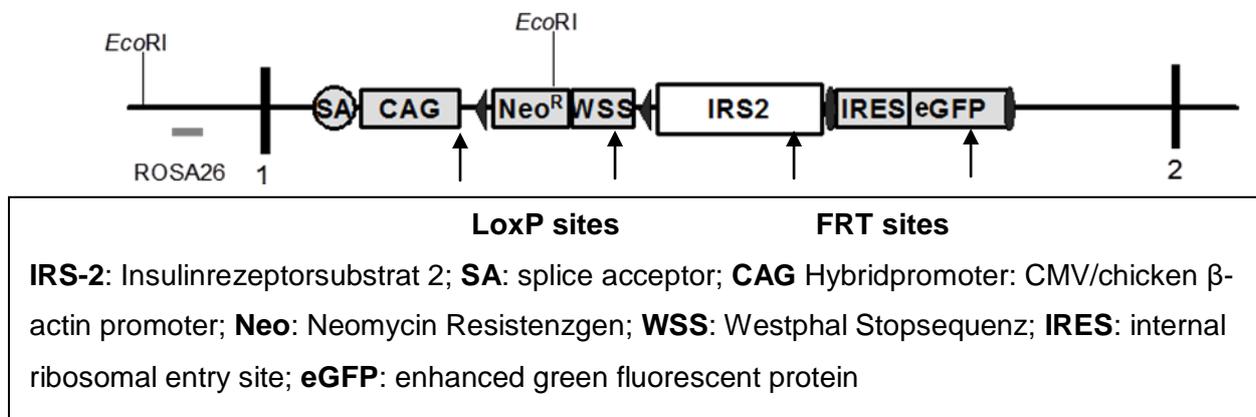


Abb. 7: IRS-2 Konstrukt, eingefügt in den ROSA26 Lokus

Die SM22-Cre Mäuse, sowie das Genotypisierungsprotokoll stammen von Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA. Der SM22 α Promoter ist spezifisch für die Expression in glatten Muskelzellen sowie in Herzmuskelzellen. Dies wurde mittels einer lac-Z Färbung von SM22-Cre/RosaR26 β -gal Maus von Malhowski, et al. gezeigt. Auf der Abb. 8 sieht man eine deutliche Blaufärbung der Gefäße in den einzelnen Organen. Das Herz stellt sich komplett blau dar.

Die beiden genannten Mauslinien wurden miteinander verpaart. Nachkommen, die sowohl das IRS-2-Transgen als auch das SM22-Cre-Gen trugen, exprimierten das IRS-2-Transgen in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC).

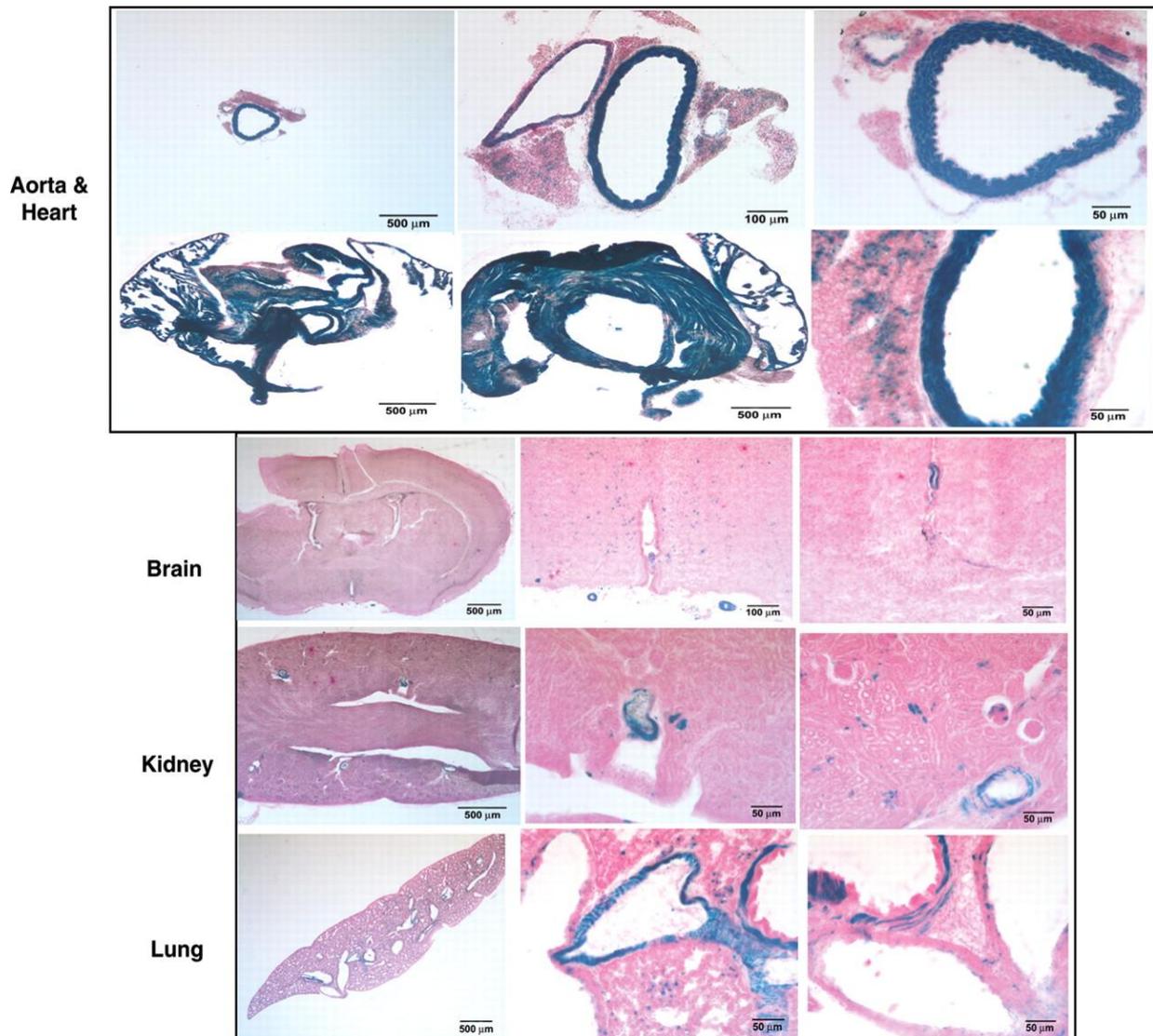


Abb. 8: LacZ-Färbung

LacZ-Färbung von einzelnen Organen (Aorta, Herz, Gehirn, Niere und Lunge) der SM22-Cre/Rosa26 β -gal Maus, (Malhowski, A. J. et al., 2011).

2.2.2. Genotypisierung

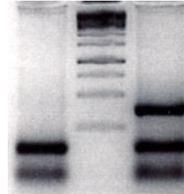
Die Versuchstiere wurden in einem Alter von 4 Wochen von den Muttertieren getrennt, mittels Ohrlochsystem markiert und anhand einer Schwanzspitzenbiopsie genotypisiert. Diese Schwanzspitze wurde mit 500 μ l Taillysepuffer sowie mit 5 μ l Proteinase K versetzt. Sie inkubierte über Nacht bei 55 °C im Thermomixer bei leichter Schüttelbewegung. Die freigesetzte DNA wurde dann mit 500 μ l Isopropanol gefällt und 15 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und der Bodensatz mit 150 μ l 70 % Ethanol versetzt. Wieder wurde 15 min. bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und über Nacht verdampfte das restliche Ethanol bei 55 °C. Anschließend wurde die DNA in 30 μ l 100 mM Tris-HCl (pH 8) resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des

Nanodrop® ND-100 UV Spektrophotometer bei 260 nm gemessen. Die DNA-Replikation wurde im iCycler® (Thermocycler) durchgeführt. Für die Reaktion benötigte man 100 ng Proben-DNA, 25 pmol von dem jeweiligen Primer, 25 µM dNTP Mix, 4 mM MgCl₂, 10 % DMSO, 1 x goTaq Reaktionspuffer und 1 Unit der goTaq-DNA-Polymerase in 50 µl Gesamtvolumen.

IRS-2 TG

Primer Name	Primersequenz (5´-3´)
IRS2-rev1	ggtgtagtggcgatcaggctactgtg
FLAG-fwd	gactacaaagatgacgacgataa
ROSA rev3	ggtagcctttaagcctgcccagaa
ROSA fwd3	aataccttctgggagttctctgctg

WT 1kb IRS^{tg}
Ladder



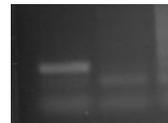
Programm

Cycle 1 (1 x):	Step 1: 95 °C für 5 min.
Cycle 2 (35 x):	Step 1: 95 °C für 1 min. Step 2: 60 °C für 90 sec. Step 3: 72 °C für 30 sec.
Cycle 3 (1 x):	Step 1: 72 °C für 10 min.
Cycle 4 (1 x):	Step 1: 4 °C für ∞

SM22-Cre

Primer Name	Primersequenz (5´-3´)
oIMR1084	gcggctctggcagtaaaaactatc
oIMR1085	gtgaaacagcattgctgtcactt

CRE WT



Programm

Cycle 1 (1 x):	Step 1: 94 °C für 3 min.
Cycle 2 (12 x):	Step 1: 94 °C für 20 sec. Step 2: 64 °C für 30 sec. Step 3: 72 °C für 35 sec.
Cycle 3 (25 x)	Step 1: 94 °C für 20 sec. Step 2: 58 °C für 30 sec. Step 3: 72 °C für 35 sec.
Cycle 4 (1 x):	Step 1: 4 °C für ∞

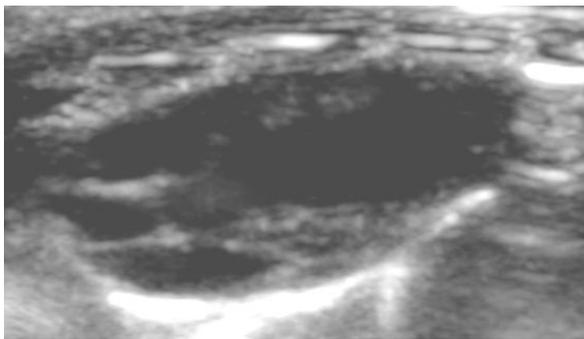
Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in einem 2 % Agarose Gel (1 x TAE, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen und bei 120 V separiert.

2.2.3. Metabolische Charakterisierung

Für die metabolische Charakterisierung dieses Genotyps wurden ein Glukosetoleranztest sowie ein Insulintoleranztest durchgeführt. Die ausgewählten Versuchstiere wurden dazu für 16 h nüchtern gesetzt. Für den Glukosetoleranztest wurde den Tieren 2 g/kg KG (Körpergewicht) Glukoselösung i.p. (intra peritoneal) injiziert und im Verlauf des Versuches jeweils Messungen vor und 15, 30, 60 sowie 120 min. nach der Injektion durchgeführt. Dabei wurde der Blutzuckerwert mittels Blutprobe aus der Schwanzvene und mit Hilfe des Blutzuckermessgerätes GlucoMen[®] gemessen. Für den Insulintoleranztest wurde den Tieren 0,75 U/kg KG Insulin i.p. injiziert und ebenfalls vor der Injektion bzw. 15, 30 und 60 min. danach der Blutzuckerwert ermittelt.

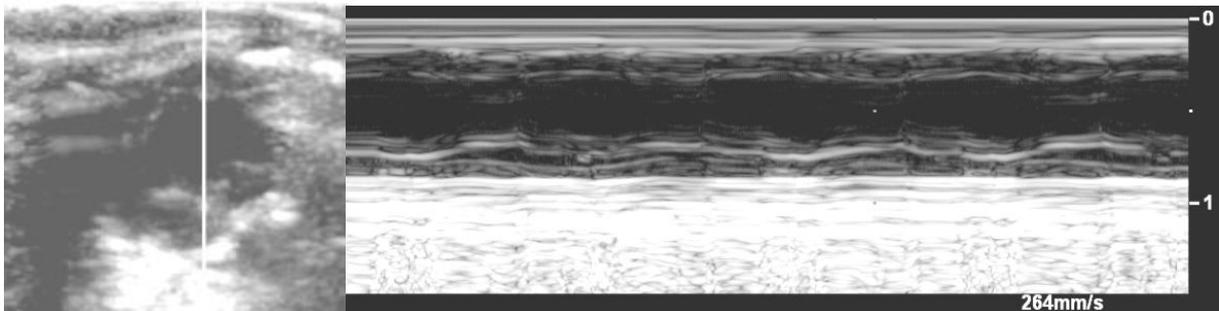
2.2.4. Echokardiografie

Für die Echokardiografie wurden die Tiere mit 5 mg/kg KG Diazepam und 100 mg/kg KG Ketamin leicht sediert (<http://vsc.stanford.edu/policies/mice.html>). Anschließend wurde die linke thorakale Seite mittels Enthaarungscreme enthaart, Ultraschallgel aufgetragen und das Herz sonographiert. Die Bilder wurden sowohl im 2D-Mode als auch im M-Mode dargestellt und konnten dann mit dem Philips DICOM Viewer bearbeitet werden. Die Vermessung der Hinter- und Vorderwand erfolgte während der Diastole des Herzens.



2D-Echtzeitmodus –(2D-realtime)

Hier wird ein zweidimensionales Schnittbild des Mäuseherzens (längs) dargestellt.



M-Mode oder TM-Mode (englisch für (time) motion)

Der linke Ventrikel ist in der kurzen Achse, also parallel zur Klappenebene, angeschnitten (siehe Bild links). Dabei markiert der weiße Strich den Ausschnitt des Bildes links, dessen zeitliche Veränderung im rechten Bild von links nach rechts dargestellt wird.

Abb. 9: Sonographiebilder des Mäuseherzens

2.2.5. *In vivo* Signaling

Die ausgewählten Versuchstiere wurden für 16 h nüchtern gesetzt und anschließend jeweils mit Insulin (0,75 U/kg KG) oder NaCl (0,01 ml/g KG) stimuliert. Die Substanzen wurden i.p. injiziert und nach 10 min. wurde das Versuchstier euthanasiert. Es folgte die Präparation von Aorta, Herz und Gehirn sowie die Entnahme der Schwanzspitze für eine Nachgenotypisierung. Die Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$

schockgefroren. Anschließend wurden die präparierten Organe im Tiefkühlschrank bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung der Probe zwischengelagert.

2.2.6. Organlyse

Zur Proteingewinnung wurden die Organproben auf Eis langsam aufgetaut. Ein Teilstück brauchbarer Größe wurde abgeschnitten. Dieses Teilstück wurde mit 1000 µl Organlysepuffer versetzt und mittels eines elektrischen Homogenisators lysiert. Eine Ausnahme stellten hier die kleinen Proben der Aorta dar, die manuell mittels Glaszylinderhomogenisator und einem geringeren Organlysepuffervolumen (250 µl) lysiert wurden. Anschließend inkubierte die Probe 30 min. auf Eis. Die Probe wurde komplett in ein Eppendorf-Gefäß umgefüllt und 30 min. bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford®

Die Bradford®-Probe dient der Proteinkonzentrationsbestimmung. Die Proben wurden auf Eis gelagert und jeweils dreifach je 1 µl pro Loch auf eine 96 Lochplatte pipettiert. Zur Kalibrierung wurde eine BSA-Standardreihe angesetzt. Es wurde jeweils 0 µl, 1 µl, 2,5 µl, 5 µl und 10 µl der 1:10 verdünnten BSA – Stocklösung aufgetragen. Das Bradfordreagenz wurde 1:5 verdünnt und dann jeweils pro Loch auf 100 µl aufgefüllt. Es wurde ein Farbumschlag von braun zu blau sichtbar. Die Extinktion bei 600 nm konnte photometrisch mittels BioTek™ PowerWave 340 bestimmt werden und ist proportional zur Proteinkonzentration. Die Daten wurden in dem KC₄ Programm angegeben, danach in Microsoft Excel exportiert und anschließend die Proteinkonzentration anhand der Eichkurve bestimmt.

2.2.7. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die in den Lysaten vorhandenen Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Damit können Proteingemische getrennt und die relativen Molekularmassen bestimmt werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, das stark an Proteine bindet und sie gleichzeitig denaturiert. Im Überschuss an SDS binden etwa 1,4 g Detergens pro 1 g Protein, so dass alle Proteine eine beständige negative Ladung pro Masseneinheit tragen; deshalb wandern während der Elektrophorese alle Protein-SDS-Komplexe zur Anode. Infolge der Molekularsiebeigenschaften des Gels sind die Beweglichkeiten dem log₁₀ der relativen Molekularmasse (Mr) umgekehrt proportional. Die relative Molekularmasse der zu

untersuchenden Proteine kann dann durch Vergleich mit Wanderungsgeschwindigkeiten von Proteinen mit bekannter Größe bestimmt werden (Laemmli, U.K., 1970).

100 µg Proteinmenge (50 µg Proteinmenge bei der Aorta) der Organlysate wurden mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzt, 3 min. bei 95 °C erhitzt und anschließend bei 13000 rpm 1 min. zentrifugiert. Die jeweils verwendeten Gele wurden nach folgendem Schema erstellt:

Trenngel	8 %	10 %	12 %	15 %	Sammelgel	4 %
H ₂ O	2,9 ml	2,5 ml	2,1 ml	1,75 ml	H ₂ O	1,85 ml
PAA 30 %	1,6 ml	2 ml	2,4 ml	2,6 ml	PAA 30 %	0,4 ml
4 x TP	1,5 ml				4 x SP	0,75 ml
APS 10 %	60 µl				APS 10 %	30 µl
TEMED	6 µl				TEMED	3 µl

Die verschiedenen Konzentrationen der Gele sind abhängig von der molekularen Größe der zur untersuchenden Proteine. Ein 8 % Gel wird bei Proteinen mit einem großen molekularen Gewicht benutzt, im Gegensatz dazu ein 15 % Gel bei kleinen Proteinen. Die einzelnen Proben und 10 µl PageRuler™ Proteinleiter kamen in die einzelnen Taschen des SDS-Sammelgels. In der Minigel-Twin Gel Electrophorese Apparatur wurden die Proben bei 80 V aufgetrennt.

2.2.8. Western Blot

Unter einem Western Blot versteht man die Übertragung von separierten Proteinen auf eine Trägermembran (PVDF(Polyvinylidenfluorid) Membran). Es wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Somit wandern die Proteine aus dem Gel auf die Membran. Die Proteine bleiben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membranoberfläche haften, das Muster bleibt bei der elektrophoretischen Auftrennung (*Semidry-Blot-System*) erhalten.

Zuerst legte man drei Whatman® Papiere (7 x 9 cm) in den Transferpuffer und platzierte sie dann in die Blotting Kammer (Trans-Blot®). Darauf legte man die in 99 %igen Methanol getauchte PVDF-Membran (7 x 9 cm) und darauf das SDS-Gel. Als letztes platzierte man wieder drei mit Transferpuffer getränkte Whatman® Papiere (7 x 9 cm) auf das SDS-Gel. Mittels einer Plastikpipette wurden die Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen durch rollenden Druck entfernt. Anschließend wurde die Blotting Kammer fest verschlossen und der Transfer fand bei 200 Milliampere (mA) statt. Die Dauer des Transfers richtet sich nach der Proteingröße. Der Transfer von Proteinen bis zu einer Größe von 100 kDA dauert 1 h. Dagegen werden größere Proteine 1 h 30 min. transferiert. Nach dem Transfer kam die

PVDF-Membran kurz in 99 %igen Methanol und anschließend in Blockinglösung (10 % Western Blocking Lösung in 1 x TBS) über Nacht bei 4 °C bei leichter Schüttelbewegung. Hier wurden unspezifische Proteinbindestellen gesättigt. Anschließend kam die Membran in den Primäantikörper der Wahl (Antikörper in 5 % Western Blocking Lösung in 1 x TBS) wieder über Nacht bei 4 °C bei leichter Schüttelbewegung. Danach wurde der überschüssige Primäantikörper entfernt und die Membran 3 x 15 min. mit 1 x TBS mit 0,1 % TWEEN 20® (TBS-T) gewaschen. Der passende Sekundäantikörper wurde dann für 2 h dazugegeben und anschließend wieder 3 x 15 min. mit TBS-T gewaschen. Dies geschah alles bei Raumtemperatur und leichter Schüttelbewegung. Um die Antikörper, die an die jeweiligen Proteine gebunden hatten, jetzt visuell sichtbar zu machen, wurde das enhanced chemiluminescence (ECL) von Amersham ECL™ Protokoll benutzt. Dabei inkubierte die Lösung 1 min. auf der Membran und wurde dann in eine Entwicklerkassette mittels Plastikfolie gelegt. In der Dunkelkammer wurde Fotopapier (Amersham Hyperfilm™ ECL) aufgelegt und für 10 min. belichtet, bis es im Fotofilmentwickler (Curix 60) entwickelt werden konnte. Anschließend konnte die Membran nach 3 x 15 min. waschen in TBS-T gestriipt werden. Hier wurden alle Antikörper von den Proteinen entfernt. Die Membran kam für 20 min. bei 60 °C in ein leicht schüttelndes Wärmebad in den Strippingpuffer. Dieser musste wieder 3 x 15 min. mit TBS-T entfernt werden. Anschließend konnte die Membran erneut verwendet werden, wobei zu beachten war, dass die Phosphorylierung von Proteinen durch den Strippingvorgang zerstört wurde.

2.2.9. Perkutane Transluminale Angioplastie (PTA) der ACC

2.2.9.1. mittels Ballonkatheter

Für den Versuch wurden 10 bis 12 Wochen alte, ca. 25 g schwere, männliche Mäuse verwendet. Es gab 4 verschiedene Gruppen zu je 5 Tieren.

1. Gruppe : Zieltiere (IRS-2^{OE}-Mäuse) – Ballonkatheter
2. Gruppe : Kontrolltiere (CO^{OE}-Mäuse) – Ballonkatheter
3. Gruppe : Zieltiere (IRS-2^{OE}-Mäuse) – sham-OP
4. Gruppe : Kontrolltiere (CO^{OE}-Mäuse) – sham-OP

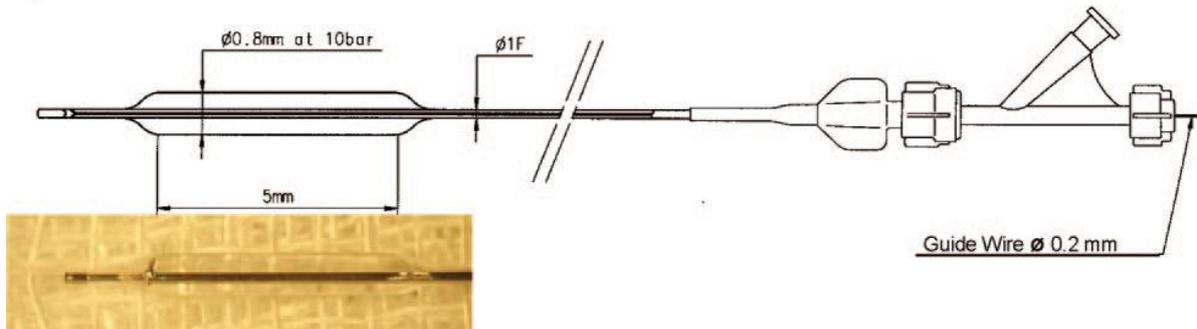
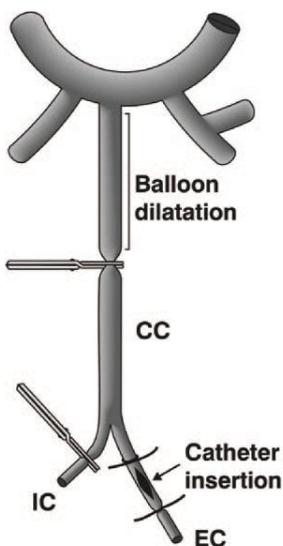


Abb. 10: schematische Darstellung des Katheters sowie der Operation (Matter, C. M. et al., 2006)



Die zu operierende Maus wurde in Narkose gelegt (10 mg/kg Xylazin, 84 mg/kg Ketamin, verdünnt durch NaCl, i.p. injiziert) und bis zum Ausfall des Zwischenzehenreflexes in ihrem Käfig belassen. Zur Operationsvorbereitung gehörten die Fixation des Tieres mittels Heftpflaster auf die Operationsunterlage, die Enthaarung der ventralen Halsseite bis zum Sternum mit Enthaarungscreme (Plica Enthaarungscreme), die Verabreichung der Augensalbe und das Überspannen des Kopfes und dessen Fixierung mittels eines Fadens an den oberen Incisivi. Die enthaarte Hautstelle wurde mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Der Hauteinschnitt begann am oberen Sternumansatz. Das Unterhautgewebe wurde stumpf bis zum Kinn freipräpariert und

somit konnte der Hautschnitt bis kurz vor das Kinn fortgeführt werden. Die Operationsunterlage wurde jetzt unter das Mikroskop (Research Microscope Olympus CKX41) verlegt. Mit Hilfe von zwei Pinzetten wurden die zwei Lappen der Schilddrüse stumpf voneinander getrennt. Der Isthmus der Schilddrüse wurde durchgeschnitten. Der M. sternocleidomastoideus dexter wurde zur Seite mobilisiert. Ein Wundspreizer hielt die Schilddrüsenlappen, das Muskelgewebe und die Haut aus dem Operationsfeld. Die Arteria carotis communis (ACC) wurde auf der rechten Halsseite von dem N. vagus und dem Venengeflecht der V. jugularis stumpf freipräpariert. Um das proximale Ende der ACC wurde eine temporäre Schlaufe gelegt. So weit wie möglich am distalen Ende der A. carotis externa wurde eine permanente Ligatur gelegt und damit die komplette A. carotis in diesem Stück gespannt. Eine weitere permanente Ligatur wurde um den Seitenast der A. carotis externa gebunden. An der A. carotis interna wurde der Blutfluss temporär durch Anlegen einer Schlaufe und Verdrehung des Fadens unterbrochen (siehe Abb. 11).

Eine Ligatur wurde am proximalen Ende um die A. carotis externa vorbereitet, aber noch nicht verschlossen. Es folgte die Inzision der A. carotis externa und die Insertion des Ballonkatheters. Er wurde bis zur proximalen Schlaufe der ACC vorgeschoben, die Schlaufe

wurde geöffnet, und er konnte weiter bis in den Aortenbogen vorgeschoben werden, so dass der Ballon in der ACC zu liegen kam. Er wurde für 1 min. auf 10 bar mittels eines Indeflator[®]s dilatiert (siehe Abb. 12).

Die Entfernung des Ballonkatheters erfolgte schrittweise. Zuerst zog man ihn über die gelöste Schlaufe der ACC zurück, verschloss diese wieder und führte dann den Katheter komplett aus der ACC. Die vorgefertigte proximale Ligatur der A. carotis externa wurde verschlossen. Anschließend konnten beide temporären Schlaufen geöffnet werden und der Blutfluss über die ACC und die A. carotis interna wurde sichtbar. Die Haut und das Unterhautgewebe wurden durch Einzelknopfnähte verschlossen.

Der Vorgang für die sham-OP war identisch, bis zur Insertion des Ballonkatheters. Diese wurde hier nicht durchgeführt.

2.2.9.2. mittels Führungsdrahtes

Hierzu wurde der Führungsdraht eines Arterienkatheters nach Seldinger anstatt des Ballonkatheters in die A. carotis communis eingeführt. Die Entfernung erfolgte auf dem gleichen Wege wie die Entfernung des Ballonkatheters. Die Benutzung eines Führungsdrahtes führt durch die Reibung zu einer stärkeren Verletzung der Intima eventuell sogar der Media im Vergleich zur schonenderen Ballonkatheterisierung.

Für die Nachsorge der Tiere wurden diese separiert und in einstreufreien Käfigen auf Zellulose gehalten. Für die ersten 24 h wurden die Käfige unter Rotlicht (1 m Abstand) gestellt. Dem Trinkwasser wurde für 3 Tage Metamizol-Natrium (10 Tropfen auf 250 ml) zugeführt (Unsöld, B. et al., 2013).

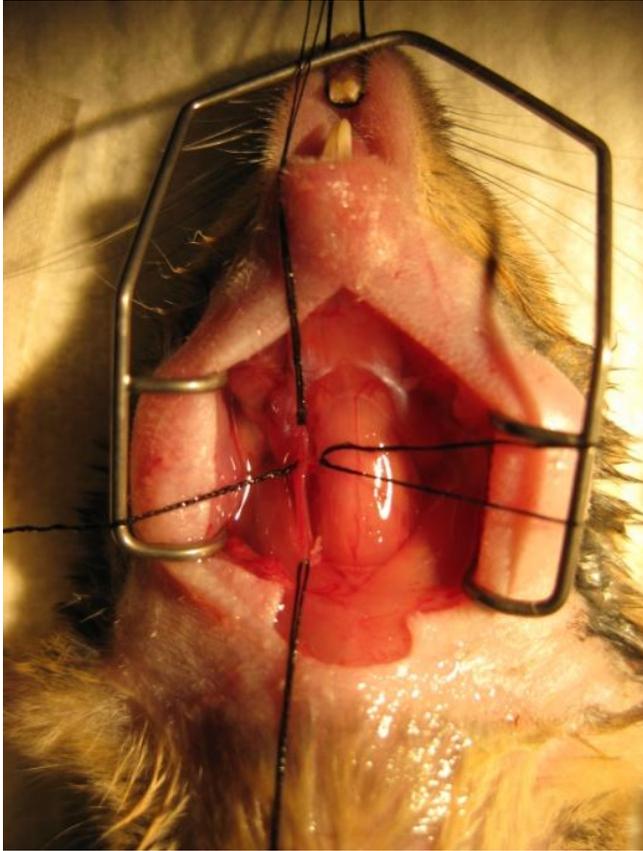


Abb. 11: Operationsfeld in situ

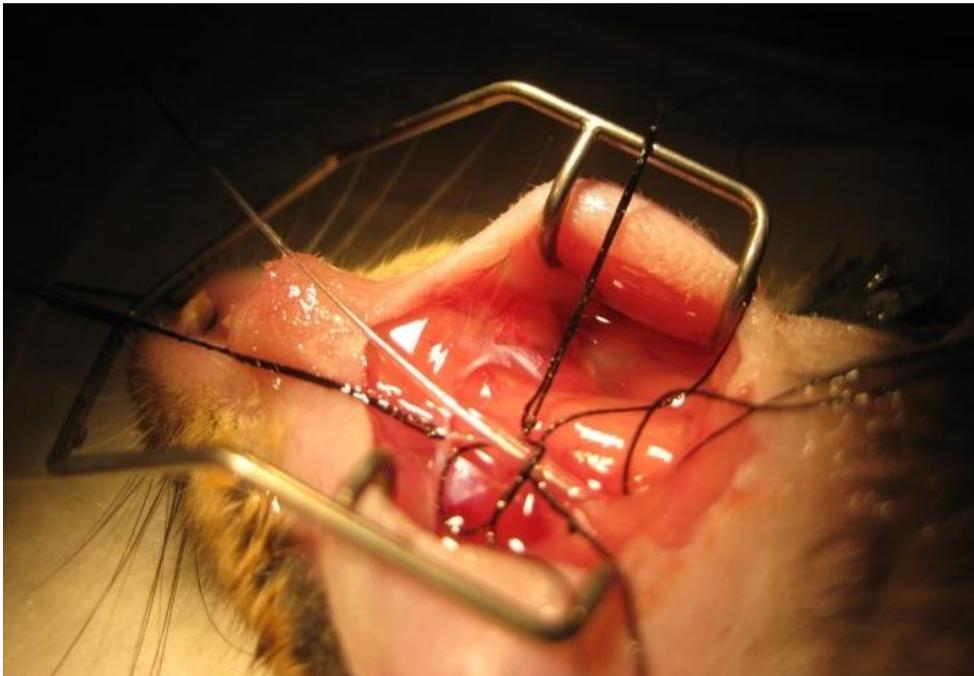


Abb. 12: Operationsfeld mit Insertion des Ballonkatheter

2.2.10. Transkardiale Perfusion

Die transkardiale Perfusion dient der optimalen Gewebefixierung für morphologische Untersuchungen. So bleiben durch die Fixierung die Gewebeverbände erhalten und können mittels Färbungen optisch dargestellt werden.

Die operierten Tiere wurden nach Ablauf der Beobachtungszeit perfundiert. Zur Einleitung der Narkose wurde den Tieren 240 mg/kg KG 2,2,2-Tribromoethanol (Avertin) i.p. injiziert (Papaioannou, V. E. et al., 1993) und diese wurden bis zur völligen Ausschaltung des Zwischenzehenreflexes im Käfig belassen. Anschließend wurde die Maus mittels Heftpflaster auf den Perfusionsplatz fixiert und mit 70 %igem Ethanol besprüht. Zuerst erfolgte die Eröffnung des Abdomens medial über der Blase. Mittels v - förmigem Einschnitt wurde Richtung Diaphragma die Bauchdecke durchtrennt. Durch die Inzidierung des Diaphragmas auf der rechten und linken Seite des Thorax sowie der Rippendurchtrennung Richtung Vordergliedmaßen wurde ein Pneumothorax gesetzt. Am freipräparierten Herz wurde das rechte Herzohr entfernt und der linke Ventrikel wurde mit der Perfusionskanüle perforiert. Durch hydrostatischen-Perfusionsdruck (ca. 2 m Wassersäule) wurde Phosphatlösung (pH 6,8) bis zur Anämie durch den Körper gespült. Anschließend wurde die Maus mit 4 %iger PFA-Lösung 20 min. perfundiert.

2.2.11. Präparation der Arteria Carotis Communis sowie anderer Organe

Bei der Präparation wurden beide Carotiden entnommen, sowohl die operierte als auch die linke nicht operierte zur Kontrolle. Die nach obigem Schema perfundierten Tiere wurden auf einer Korkunterlage fixiert und das Thoraxschild entfernt. Der Hals wurde ventral eröffnet und die Haut zu beiden Seiten aufgeklappt. Die Schilddrüse wurde entfernt, ebenso das umliegende Bindegewebe. Oberhalb des Herzens wurden der Aortenbogen sowie der Abgang der Carotiden sichtbar. Rostral des Abganges konnte man die Clavicula mittels einer Schere durchtrennen und leicht zur Seite präparieren. Nun sind beide Carotiden deutlich erkennbar. Sie wurden kurz hinter dem Abgang vom Aortenbogen durchtrennt sowie rostral hinter der letzten Ligatur auf der operierten Seite oder auf der Kontrollseite so weit wie möglich rostral.

Nach der Präparation der Carotiden wurden die folgenden Organe entnommen: Leber, Pankreas, Milz, Nieren, Lunge, Herz, Aorta, Gehirn und Skelettmuskulatur.

2.2.12. Nachfixierung

Nach der Präparation der Organe incl. der Carotiden wurden diese in 4 %iger PFA-Lösung bei 4 °C für 24 h nachfixiert. Anschließend erfolgte die Umbettung des Gewebes in Histosetten®. Diese wurden in 70 %igen Ethanol umgelagert. Um ein Abschwimmen der Kleinstteile während der Paraffinierung zu verhindern, wurden die Histosetten® bei den Carotiden mit einem Filterpapier (Trockenblock 556) ausgelegt.

2.2.13. Histologie

2.2.13.1. Paraffineinbettung

Bei der Paraffinierung, d.h. bei der Durchtränkung mit Paraffin wurden die PFA fixierten Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und anschließend mit Paraffin durchtränkt.

Leica Gewebeinfiltration über Nacht (13 h und 25 min)

1.	Formalin 4 %	15 min. 45 °C
2.	Ethanol 70 %	30 min. 45 °C
3.	Isopropanol 100 %	30 min. 45 °C
4.	Isopropanol 100 %	30 min. 45 °C
5.	Isopropanol 100 %	30 min. 45 °C
6.	Isopropanol 100 %	30 min. 45 °C
7.	Isopropanol 100 %	60 min. 45 °C
8.	Isopropanol 100 %	60 min. 45 °C
9.	Isopropanol 100 %	60 min. 45 °C
10.	Isopropanol 100 %	60 min. 45 °C
11.	Paraffin	120 min. 65 °C
12.	Paraffin	120 min. 65 °C
13.	Paraffin	120 min. 65 °C

Anschließend wurden die paraffinierten Präparate aus den Histosetten® entnommen. Dabei wurden die Organe in Metallförmchen eingebettet und die Carotiden in Förmchen (Molding Trays) mit Paraplast (65 °C) liegend eingebettet. Auf der Kühlplatte (4 °C) kühlte das Paraplast mit dem Präparat aus und erhärtete sich. Dann konnte man den Paraplastblock aus dem Förmchen entfernen. Um Querschnitte der Carotiden zu erhalten, wurde der Block

auf vorgefertigte Holzblöcke aufgestellt, kurz am unteren Ende erhitzt und eingebettet. Die Carotiden standen nun senkrecht und konnten geschnitten werden.

2.2.13.2. Silanisierung der Objektträger

Bevor man die einzelnen Schnitte der Carotiden anfertigen konnte, wurden die handelsüblichen Objektträger silanisiert. Durch die Silanisierung der Objektträger kommt es zur Beschichtung der Oberfläche und damit zur Haftvermittlung durch die verwendeten Silane. Dadurch werden die Präparate nicht in weiteren Färbefahren abgeschwemmt.

1. 100 % Aceton 10 min.
2. 2 % Silan in Aceton 10 min.
3. 100 % Aceton 10 min.
4. Aqua dest 10 min.
5. trocknen (abgedeckelt) 24 h

2.2.13.3. Anfertigen der Schnitte

Die Schnitte wurden mit einem Rotationsmikrotom angefertigt. Bei allen Präparaten sind sie 10 µm dick. Bei den Carotiden wurden Serienschnitte angefertigt. Die einzelnen Schnitte wurden auf die Oberfläche eines Wärmebades (55 °C) zur Entfaltung gegeben und anschließend auf die silanisierten Objektträger gezogen. Zur Trocknung kamen die angefertigten Schnitte für 24 h in einen Inkubator bei 37 °C.

2.2.13.4. Entparaffinierung

Alle zuvor hergestellten Paraffinschnitte mussten vor einer Färbung entparaffiniert werden. Erfolgt dies nicht vollständig, kann es zur Artefaktbildung kommen. Im ersten Schritt wurden sie 20 min. entparaffiniert und in den weiteren Schritten durch eine absteigende Alkoholreihe rehydratisiert. Der Grad der Rehydratisierung hängt von der nachfolgenden Färbemethode ab.

1. Xylol₁ 10 min.
2. Xylol₂ 10 min.
3. 100 % Ethanol 5 min.
4. 96 % Ethanol 5 min.
5. 80 % Ethanol 5 min.

- | | | |
|----|--------------|--------|
| 6. | 70 % Ethanol | 5 min. |
| 7. | 40 % Ethanol | 5 min. |
| 8. | Aqua dest. | 5 min. |

2.2.13.5. Färbungen

2.2.13.5.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, kurz H.E.-Färbung genannt ist eine Übersichtsfärbung. Sie ist eine Routinefärbemethode für morphologische Untersuchungen und färbt mittels zwei Farbkomponenten jede Zelle spezifisch an. Das Hämatoxylin nach Mayer färbt basophile Strukturen, wie z.B. die DNA der Zellkerne oder das endoplasmatische Retikulum violett-blau an. Das Eosin färbt die azidophilen Strukturen, wie z.B. Zellplasmaproteine rot an. Nach der Färbung wurden die Schnitte entwässert, um anschließend mit Entellan[®] eingebettet zu werden. Bei dieser Färbemethode wird eine vollständige Entparaffinierung durchgeführt.

- | | | |
|-----|----------------------------------|---------------------------|
| 1. | Hämatoxylin nach Mayer | 7 min. |
| 2. | Aqua dest. | 30 sec. |
| 3. | Leitungswasser (fließend) | 15 min. |
| 4. | Aqua dest. | 30 sec. |
| 5. | Eosin | 2 min. |
| 6. | Aqua dest. | 30 sec. |
| 7. | 70 % Ethanol | 30 sec. |
| 8. | 96 % Ethanol | 30 sec. |
| 9. | 100 % Ethanol | 30 sec. |
| 10. | Xylol ₁ | 5 min. |
| 11. | Xylol ₂ | 2 min. |
| 12. | Entellan [®] + Deckglas | 12 - 24 h trocknen lassen |

2.2.13.5.2. Resorcinfuchsinfärbung nach Weigert

Die Resorcinfuchsinfärbung nach Weigert ist eine Spezialfärbung. Sie färbt mittels des Resorcin-Fuchsins die elastischen Fasern in den Geweben blau-violett an. Als Gegenfärbung wird das Kernechtrot benutzt, welches die Kerne rot anfärbt. Bei dieser Färbung wurde die Entparaffinierung nur bis zum 80 %igen Ethanol durchgeführt, da das Resorcin-Fuchsin den basisch und positiv geladenen Farbstoff Diamantfuchsin in alkoholischer Lösung enthält.

1.	Resorcin-Fuchsin (nach Weigert)	1 h bei 42 °C
2.	Leitungswasser	1 min.
3.	Kernechtrot	10 min.
4.	Aqua dest.	2 x kurz
5.	96 % Ethanol	2 x kurz
6.	100 % Ethanol	30 sec.
7.	Xylol ₁	5 min.
8.	Xylol ₂	2 min.
9.	Entellan [®] + Deckglas	12 - 24 h trocknen lassen

2.2.13.5.3.van-Gieson-Lösung (Pikrofuchsin)

Die van-Gieson-Lösung besteht aus zwei Farbstoffen: zum einen die feindisperse Pikrinsäure, die in alle Gewebestrukturen eindringen kann und eine Gelbfärbung hervorruft, zum anderen aus grobdispersen Säurefuchsin, welches aufgrund der Struktur und der kurzen Einwirkzeit nur in grobstrukturierte Fasern eindringen kann. Es färbt kollagenes Bindegewebe rot an. Bei dieser Färbemethode wurde eine vollständige Entparaffinierung durchgeführt.

1.	van-Gieson-Lösung	30 sec.
2.	Aqua dest.	30 sec.
3.	70 % Ethanol	30 sec.
4.	96 % Ethanol	30 sec.
5.	100 % Ethanol	30 sec.
6.	Xylol ₁	5 min.
7.	Xylol ₂	2 min.
8.	Entellan [®] + Deckglas	12 - 24 h trocknen lassen

2.2.13.5.4.Rhodamine Wheat Germ Agglutinin Färbung

Bei der Färbung mit Rhodamine Wheat Germ Agglutinin, kurz WGA-Färbung genannt, wurden die Paraffinschnitte vollständig entparaffiniert. Das R-WGA bindet an N-Acetylglycosaminstrukturen auf der Plasmamembran. Das Exzitationsmaximum liegt bei 550 nm, das Emissionsmaximum bei 575 nm. Kerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Emissionsmaximum 461 nm) angefärbt.

1. Blocking (Blocking Solution) 1 h
2. R-WGA 1:100 über Nacht, lichtgeschützt, 4 °C
3. waschen mit PBS 3 x 5 min.
4. Vectashield® (incl. DAPI) + Deckglas

2.2.14. Isolierung von Primärzellen

Für die enzymatische VSMC (vascular smooth muscle cells – glatte Gefäßmuskelzellen) Isolation aus der Aorta der Maus benötigte man folgende Lösungen:

1. Enzymlösung für 8 bis 10 Aorten (37 °C):
 - 24 mg Kollagenase Typ 1
 - 8 mg Elastase
 - 8 mg Trypsininhibitor
 - 24 ml DMEM (incl. 20 % FCS)
2. DMEM (20 % FCS, 1 % P/S, 1 % Gentamycin, 1 % Amphotericin B) (37 °C)
3. 1 x PBS mit 1 % P/S (4 °C)

Die ausgewählten Versuchstiere (weiblich, zwischen 2 bis 6 Monate alt) wurden euthanasiert und auf einer Präparationsunterlage fixiert. Die Maus wurde mit 70 %igen Ethanol besprüht und zügig das Abdomen sowie der Thorax, wie im Perfusionsprotokoll beschrieben, eröffnet. Das Diaphragma wurde auf der linken anliegenden Rippenseite von den Rippen freipräpariert bis zur Aorta. Die Bauchorgane wurden zur rechten Seite umgelagert. Nun wurde die Aorta stumpf von der Wirbelsäule getrennt und am Aortenbogen sowie an der abdominalen Aufzweigung durchtrennt. Sofort nach der Entnahme der Aorta wurde diese in gekühltes PBS überführt und unter dem Mikroskop mittels zweier Pinzetten stumpf vom umliegenden Bindegewebe freipräpariert. Die Aorta wurde nun in 1 ml Enzymlösung überführt und für ca. 20 min. bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde sie wieder in gekühltes PBS überführt, weitere bindegewebige Reste und Blut wurden entfernt und die Aorta wurde mit der Schere klein geschnitten. Erneut wurden die Kleinteile der Aorta in 1 ml Enzymlösung gegeben und für 1 h 15 min. im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Enzymlösung incl. der Aortenzellen bei 5000 rpm, 2 min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Bodensatz in 1 ml DMEM (20 % FCS, 1 % P/S, 1 % Gentamycin, 1 % Amphotericin B) resuspendiert. Diese Lösung wurde nun in einer 3 cm großen Zellkulturschale ausgesät. Die Behandlung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach in der Regel 6 bis 8 Tagen war die Schale konfluent bewachsen und konnte zur weiteren Passagierung trypsiniert werden.

2.2.15. Zellyse

Für die Gewinnung eines Zelllysates benötigte man pro Genotyp jeweils eine 80 %ige konfluent bewachsene 15 cm Petrischale. Diese wurde für 16 h serumfrei gesetzt (Nährmedium mit P/S ohne FCS) und dann für weitere 24 h mit 20 % FCS, P/S Nährmedium angestimmt.

Die weitere Gewinnung der Zelllysate wurde nun unter unsterilen Bedingungen auf Eis durchgeführt. Das Nährmedium wurde entfernt und die Petrischale 2 x mit PBS gespült. Anschließend wurden 100 µl Zelllysepuffer dazugegeben und mittels Cell Scraper® die adhären Zellen von der Petrischalenoberfläche abgelöst und in ein Eppendorf Gefäß überführt. Dort wurden die Zellen mittels einer Pipette mit dem Puffer resuspendiert und 5 min. auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Lysate 5 min., bei 13000 rpm, bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Lysate wurden in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren. Die entstandenen Zelllysate wurden im Tiefkühlschrank bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung der Probe zwischengelagert.

2.2.16. Western Blot (siehe oben)

Die Behandlung von Zelllysaten ist identisch zu der Behandlung von Organlysaten.

2.2.17. Proliferationsassay

Für den Proliferationsassay wurde pro Genotyp jeweils eine 15 cm große Zellkulturschale verwendet. Diese Schale wurde zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in ein Falcon überführt und anschließend bei 900 rpm für 4 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5 ml Nährmedium (10 % FCS, P/S) resuspendiert. Diese erhaltenen Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärben mit Trypanblau ausgezählt. Es wurden 10^4 Zellen pro Loch in einer 96 Lochplatte ausgesät. Die Zellen wuchsen 24 h im Inkubator (37 °C) an und wurden dann für 16 h serumfrei gesetzt, um die Zellproliferation zu stoppen (Nährmedium mit P/S ohne FCS). Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h mit 100 µl Nährmedium (mit 20 % FCS und P/S) pro Loch stimuliert. Nach 8 h wurde je 10 µl 10-fach konzentriertes BrdU pro Loch hinzu pipettiert. Das Thymidinanalogon 2-Bromo-5-desoxyuridin (BrdU) wird während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA sich teilender Zellen eingebaut. Um das BrdU makroskopisch mittels gekoppeltem Sekundärantikörper sowie dem TMB (Tetramethylbenzidin) Substrat sichtbar

zu machen, wurde nach der Gebrauchsanweisung des Kits vorgegangen (Cell proliferation ELISA BrdU, Roche).

In einem Teil der Versuche wurden Inhibitoren der PI3-Kinase (LY 294002) bzw. der MAP-Kinase (PD 98,095) eingesetzt. Da beide in DMSO gelöst sind, wurden Lösungsmittelkontrollen mit einem äquivalenten DMSO-Anteil mitgeführt. Die Zugabe erfolgte zusammen mit dem Stimulationsmedium mit 20 % FCS.

2.2.18. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte bei ausreichend großem Stichprobenumfang mit dem t-Test. Zur Auswertung der Neointimadaten wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und der Standardfehler (SEM standard error of mean). Verwendet wurde die Software GraphPad PRISM.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis der Expression des Transgens

3.1.1. eGFP und IRS-2 in ausgewählten Organen

Die ersten Versuche dienten dem Nachweis, dass das Transgen in diesem Mausmodell selektiv in den erwarteten Organen exprimiert wird. Die lacZ-Expression unter dem SM22-Promoter ist mehrfach beschrieben worden (Malhowski, A. J. et al., 2011); (Hassane, S. et al., 2011); (Holtwick, R. et al., 2002); (Milton, I. et al., 2012); (El-Bizri, N. et al., 2008); (Umans, L. et al., 2007). Es wurde gezeigt, dass SM22-Promoter-gesteuerte Expression in glatten Gefäßmuskelzellen sowie in Herzmuskelzellen vorliegt. Widersprüchliche Angaben finden wir in der Literatur bezüglich des Gehirns. Umans et al. zeigten eine lacZ-markierende Blaufärbung, El-Bizri et al. dagegen nicht. In unserem Modell konnte gezeigt werden, dass das Transgen, bestehend aus dem IRS-2- und dem eGFP-Gen, nach Rekombination in Cre-bildenden Zellen exprimiert wurde. Hierfür sind Western Blot Analysen durchgeführt worden. Einzelne Organe, darunter die Aorta, das Herz, die Lunge und das Gehirn von CO^{OE}- und IRS-2^{OE}-Mäusen wurden hinsichtlich der Konzentration an IRS-2-Protein als auch eGFP untersucht. eGFP ist ein Protein, welches unter physiologischen Bedingungen nicht in einer Säugetierzelle vorliegt und kann somit zuerst mal als Expressionsmarker eingesetzt werden. Das IRS-2 Konstrukt (siehe Abb. 7) besteht unter anderem aus dem Promoter, dem IRS-2- und dem eGFP- Gen. Die Translation erfolgt wegen der IRES (internal ribosomal entry site), die zwischen den beiden Genen liegt, getrennt. Mehrfach wurde eGFP im selben System als Expressionsmarker genutzt (Mesaros, A. et al, 2008); (Tovar, S. et al, 2013); (Zemva, J. et al 2012). Somit kann es als Expressionsmarker des IRS-2 Transgens eingesetzt werden.

eGFP (siehe Abb. 13) konnte nicht in Gehirnlysaten sowohl bei den IRS-2^{OE}-Mäusen als auch bei den CO^{OE}-Mäusen nachgewiesen werden. Im Herzen und in der Aorta lag dagegen eine starke Konzentration bei den IRS-2^{OE}-Mäusen im Gegensatz zu den CO^{OE}-Mäusen vor. In der Lunge der IRS-2^{OE}-Mäuse zeigte sich, entsprechend dem geringen Anteil von glatten Muskelzellen, nur eine geringe Konzentration von eGFP. Die oberen Banden bei den IRS-2^{OE}-Mäusen als auch bei den CO^{OE}-Mäusen in Herz-, Aorten- und Lungenlysaten sind unspezifische Signale des GFP-Antikörpers und stellen nicht eGFP dar.

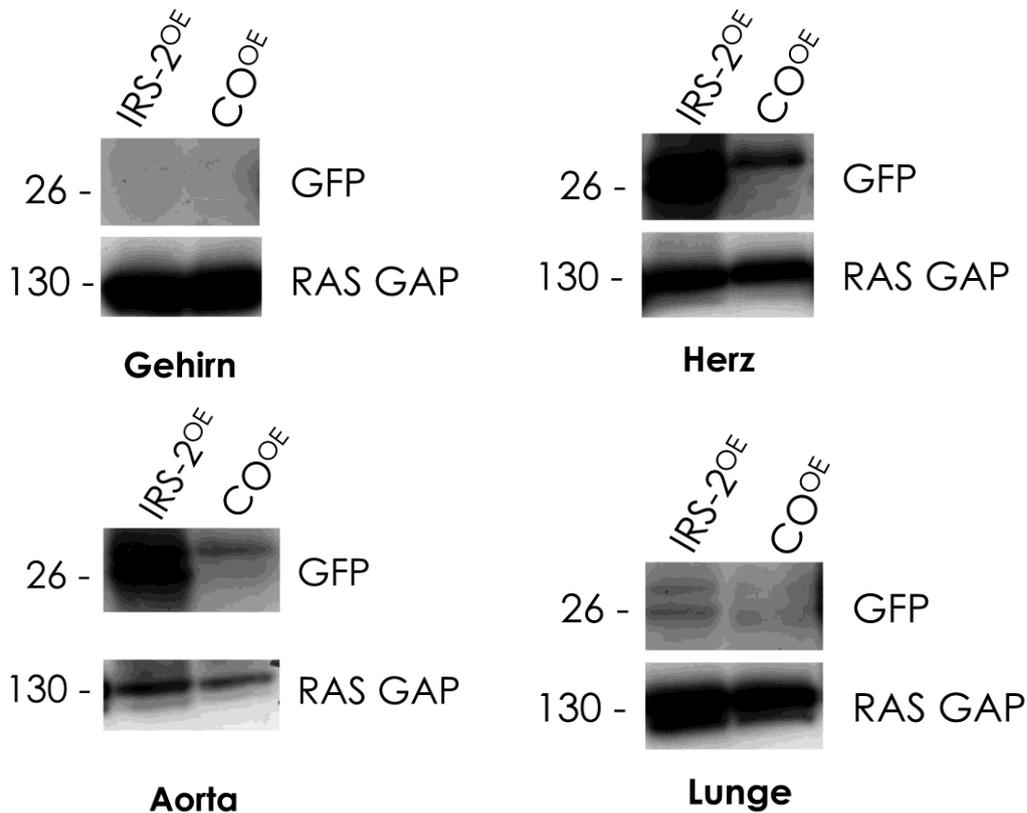
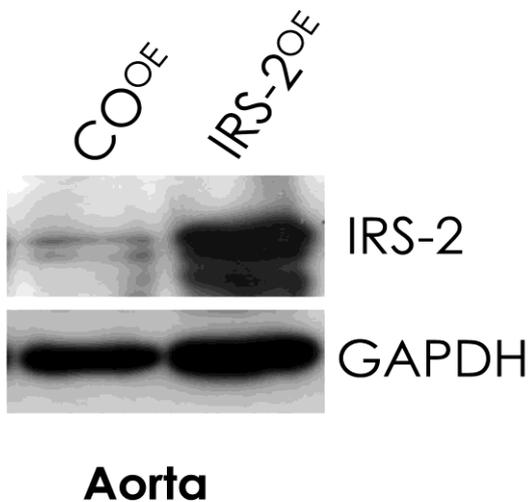


Abb. 13: eGFP in Organlysaten

Nachweis von eGFP (26 kDa) mittels Western Blot aus Organlysaten von Gehirn, Herz, Aorta und der Lunge. (n = 3)



In der Aorta von IRS-2^{OE}-Mäusen konnten höhere Konzentrationen von IRS-2-Protein (170 kDa) dargestellt werden im Vergleich zu CO^{OE}-Mäusen.

Abb. 14: IRS-2 in der Aorta

Nachweis von IRS-2-Protein mittels Western Blot aus Aortenlysat. (n = 5)

3.1.2. *In vivo* Signaling

Es stellte sich die Frage, ob diese Überexpression in VSMC funktionell wirksam ist, d.h. dass ein Insulin-/IGF-1-Signal verstärkt intrazellulär vermittelt wird.

Um dies untersuchen zu können, wurden ca. 3 Monate alte, männliche Mäuse für 16 h nüchtern gesetzt. Anschließend wurde physiologische Kochsalzlösung (Kontrolle) oder Insulin intraperitoneal injiziert. Nach 10 min. wurde die Aorta entnommen und zur Proteinanalyse mittels Western Blot vorbereitet. In der folgenden Grafik (siehe Abb. 15) wechseln sich Aortenlysate von CO^{OE}-Mäusen mit Aortenlysaten von IRS-2^{OE}-Mäusen ab. Die ersten vier Proben waren von Tieren, die physiologische Kochsalzlösung erhalten hatten, d.h. der Signaltransduktionsweg von IGF-1 und Insulin wurde nicht angeregt. Die restlichen vier Proben stammten von insulinstimulierten Tieren. Bei dem IRS-2-Proteinnachweis sieht man deutlich die Überexpression von IRS-2-Protein. eGFP stellt eine erneute Genotypkontrolle der Mäuse dar und nur IRS-2^{OE}-Mäuse zeigen eGFP.

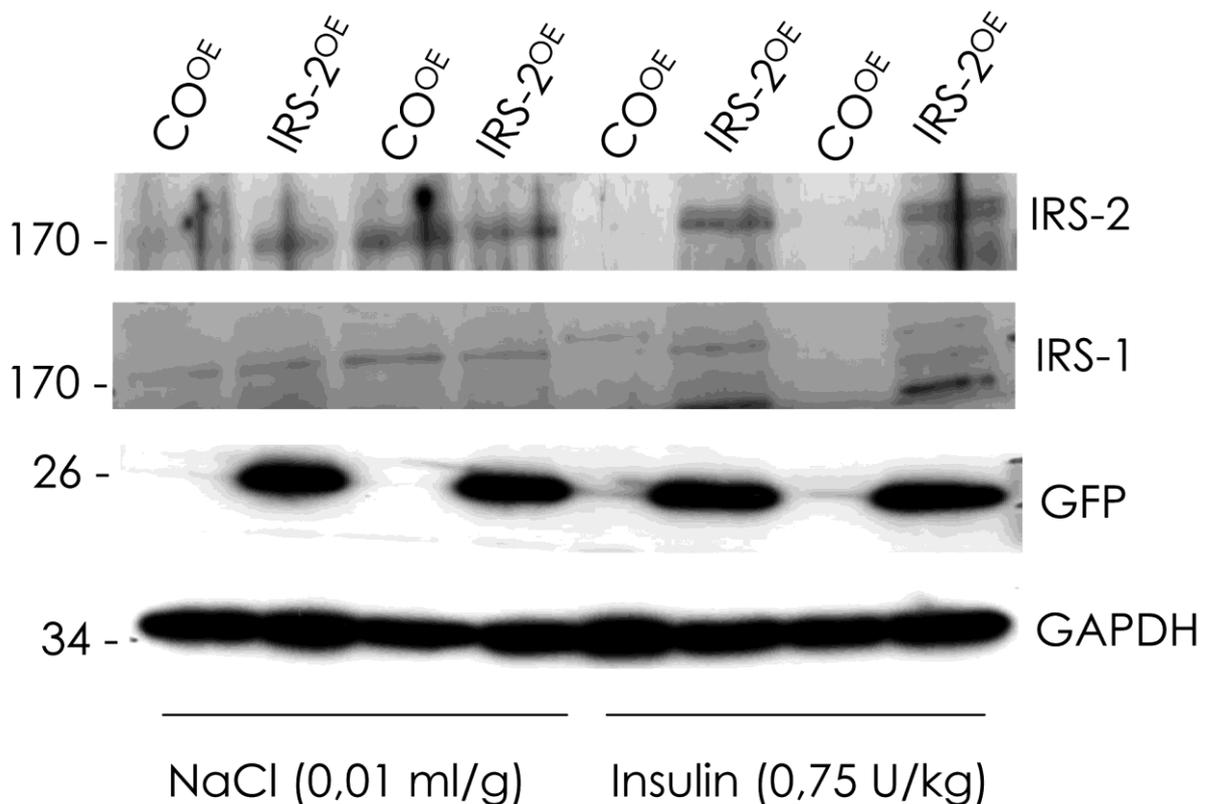


Abb. 15: *in vivo* Signaling

Western Blot Analyse von Aortenlysate nach physiologischer Kochsalzlösung oder Insulin Gabe von IRS-2^{OE}-Mäusen sowie von CO^{OE}-Mäusen: Darstellung von IRS-2 (170 kDa), IRS-1 (170 kDa) und eGFP (26 kDa).

Die IRS-Proteine stellen die ersten intrazellulären Proteine in der Zelle dar, die auf eine Stimulation des IGF-1- oder Insulinrezeptors reagieren. Verfolgt man die Signaltransduktionskette in der Zelle weiter, gibt es nachgeschaltet wichtige Kinasen, die bezüglich ihrer Phosphorylierung untersucht wurden. Dazu zählen AKT (Proteinkinase B) und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*). AKT ist ein Teil des PI3-Kinase-Weges und ERK ein Teil des MAPK-Weges. Die phosphorylierten Proteine (pAKT^{Ser474}/pERK^{Thr202/Tyr204}) stellen in diesem Fall die aktivierte Form des Proteins dar.

Auffallend war (siehe Abb. 16) die basal verstärkte Phosphorylierung von AKT und ERK in den IRS-2^{OE}-Mäusen. Nach der Insulingabe lag in Aorten von CO^{OE}-Mäusen, aber nicht von IRS-2^{OE}-Mäusen, ein verstärktes pAKT- und pERK-Signal vor. Die Gesamtmenge von AKT ist in allen acht Proben vergleichbar, die von ERK ist in IRS-2^{OE}-Mäusen vermehrt.

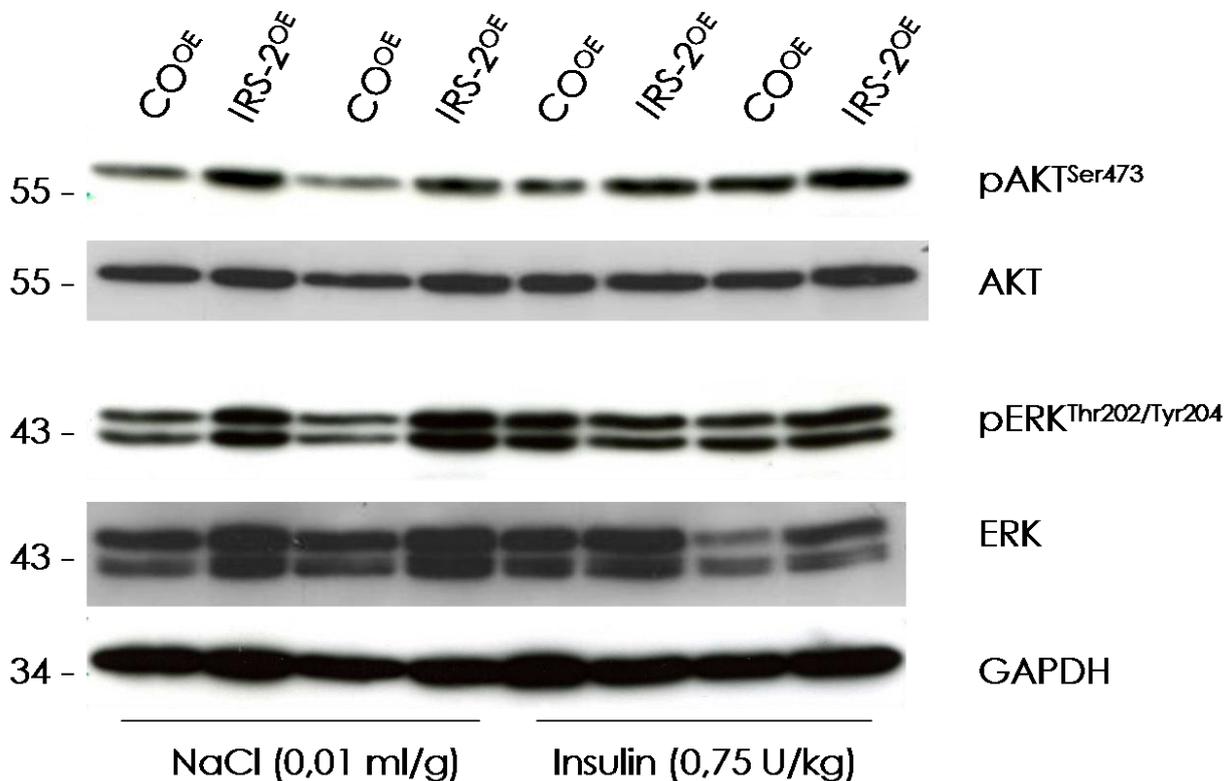
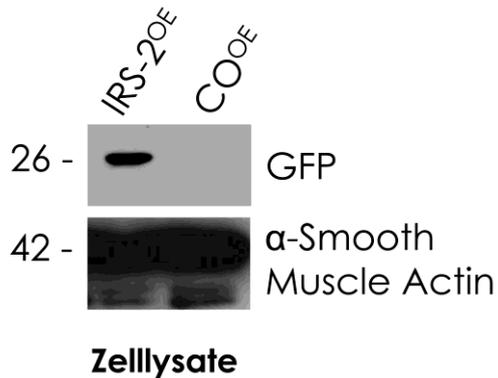


Abb. 16: *in vivo* Signaling

Western Blot Analyse aus Aortenlysat nach physiologischer Kochsalzlösung oder Insulin Gabe von IRS-2^{OE}-Mäusen sowie von CO^{OE}-Mäusen: Darstellung von pAKT^{Ser473} und AKT sowie pERK^{Thr202/Tyr204} und ERK.

Dieses Experiment zeigt deutlich, dass Aorten *in vivo* Insulin-stimulierbar sind und somit glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) zu den Insulin-sensitiven Zellen gehören.

3.1.3. eGFP und IRS-2 in Zelllysaten



In den IRS-2^{OE}-VSMC zeigte sich ein eindeutiges eGFP Signal, welches den CO^{OE}-VSMC fehlt. α -smooth muscle actin diente als Ladekontrolle und ist zum anderen ein Marker glatter Gefäßmuskelzellen (siehe Abb. 17).

Abb. 17: eGFP in Zelllysaten

Nachweis von eGFP (26 kDa) mittels Western Blot in IRS-2^{OE}- aber nicht CO^{OE}-VSMC.

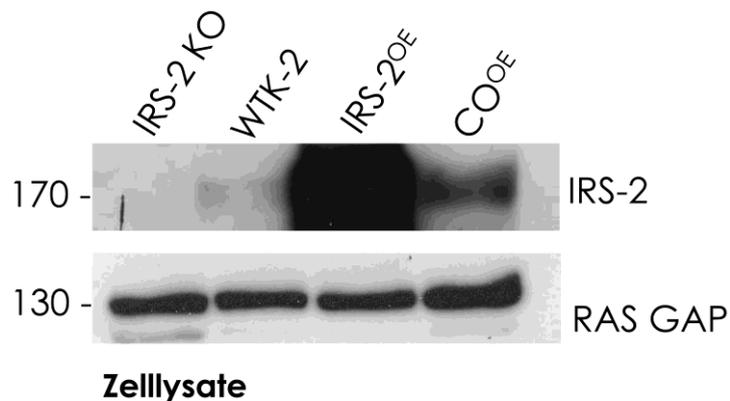


Abb. 18: IRS-2 in Zelllysaten

Nachweis von IRS-2-Protein (170 kDa) mittels Western Blot in IRS-2^{OE}- und in CO^{OE}-VSMC sowie in IRS-2-KO-VSMC und deren Wildtyp (WTK-2) Kontrolle (siehe 3.5.). (n = 5)

In den IRS-2-KO-VSMC zeigte sich keine IRS-2-Proteinbande im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (WTK-2). Dagegen wurde in den Zelllysaten der IRS-2^{OE}-VSMC eine eindeutige Überexpression dargestellt.

3.2. Charakterisierung der IRS-2^{OE}-Maus im Vergleich zur CO^{OE}-Maus

Im täglichen Umgang konnte man die IRS-2^{OE}-Mäuse nicht von den CO^{OE}-Mäusen unterscheiden. Sie verhielten und entwickelten sich unauffällig.

3.2.1. Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde bei den weiblichen und männlichen Mäusen im Alter von 2 bis 4 Monaten ermittelt. Je Gruppe gab es 8 Tiere. Im Körpergewicht fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den IRS-2^{OE}-Mäusen, ob männlich oder weiblich, zu den CO^{OE}-Mäusen (t-Test).

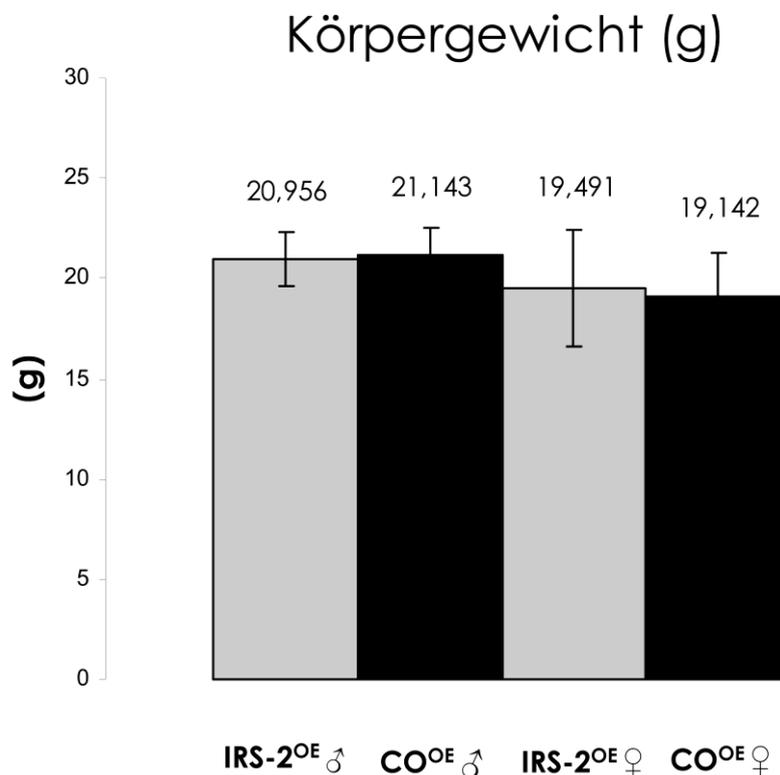


Abb. 19: Körpergewicht der Mäuse

Körpergewicht (g) der 2 bis 4 Monate alten Mäuse. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte +/- Standardfehler der Gruppe (n = 8 pro Gruppe).

3.2.2. Die histologische Untersuchung ausgewählter innerer Organe

Während der Präparation der einzelnen Organe waren diese makroskopisch nicht unterscheidbar, nur das Herz der IRS-2^{OE}-Mäuse stellte sich im Vergleich zu dem Herzen der CO^{OE}-Mäuse vergrößert dar. Deswegen wird es weiter unten gesondert behandelt.

Es wurden die Niere, die Milz und die Lunge, da diese viele Blutgefäße besitzen, aber auch Pankreas, Leber und Skelettmuskulatur als insulinsensitive Organe sowie das Gehirn (hier ist das Cerebellum repräsentativ dargestellt) präpariert. Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte von den einzelnen Organen der IRS-2^{OE}-Maus und der CO^{OE}-Maus wurden lichtmikroskopisch untersucht. Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede (siehe Abb. 20).

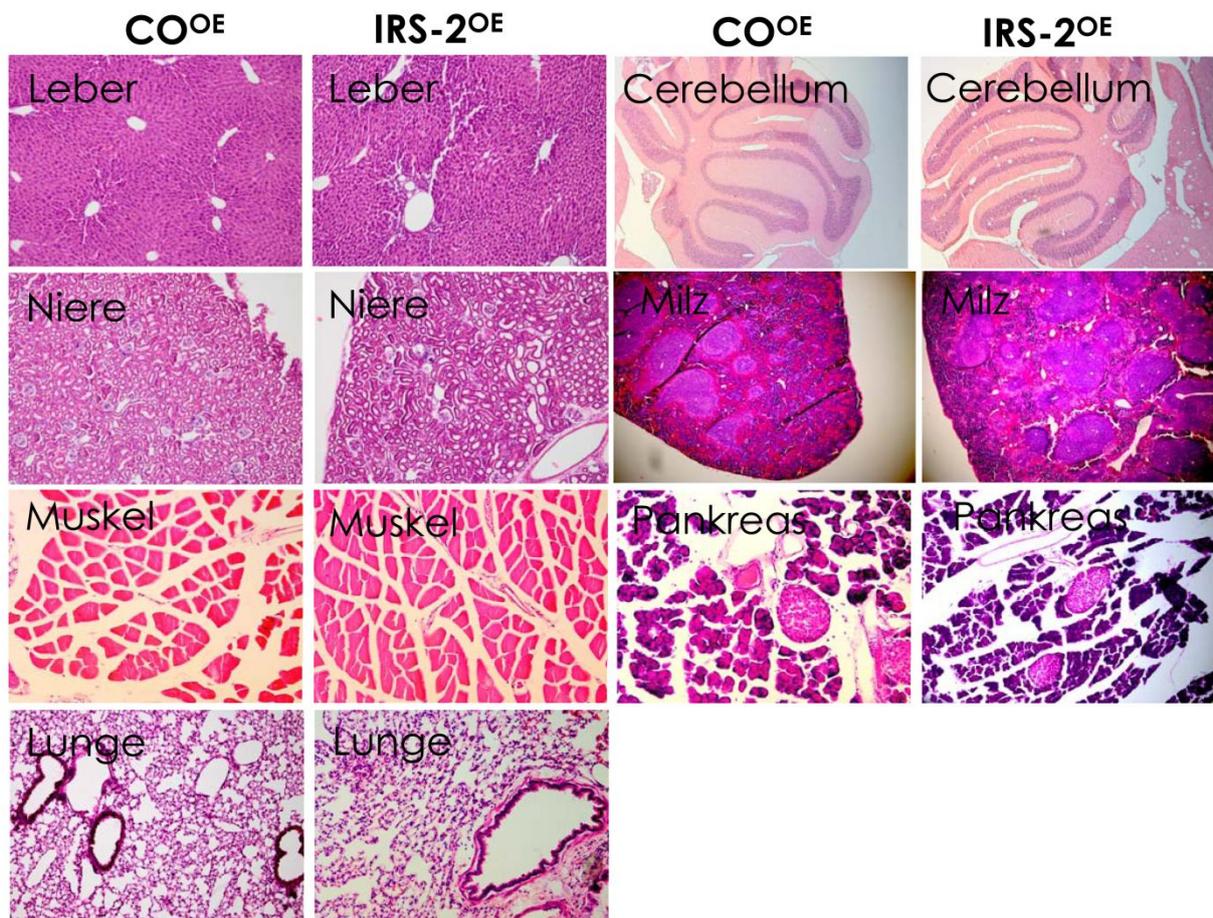


Abb. 20: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte repräsentative Schnitte verschiedener Organe von IRS-2^{OE}- und CO^{OE}-Mäusen

3.2.3. Die Überprüfung der Glukose- und Insulintoleranz

Bei dem Glukose- und Insulintoleranztest wurden sowohl weibliche, als auch männliche Mäuse getestet. Die Gruppengröße schwankte zwischen 10 bis 15 Mäusen je Geschlecht und Genotyp. Der Glukosetoleranztest zeigte nicht unterscheidbare Kurven, sowohl bei den männlichen, wie auch bei den weiblichen Tieren. Auch beim Insulintoleranztest fanden sich keine (geschlechtsunabhängig) signifikanten Unterschiede.

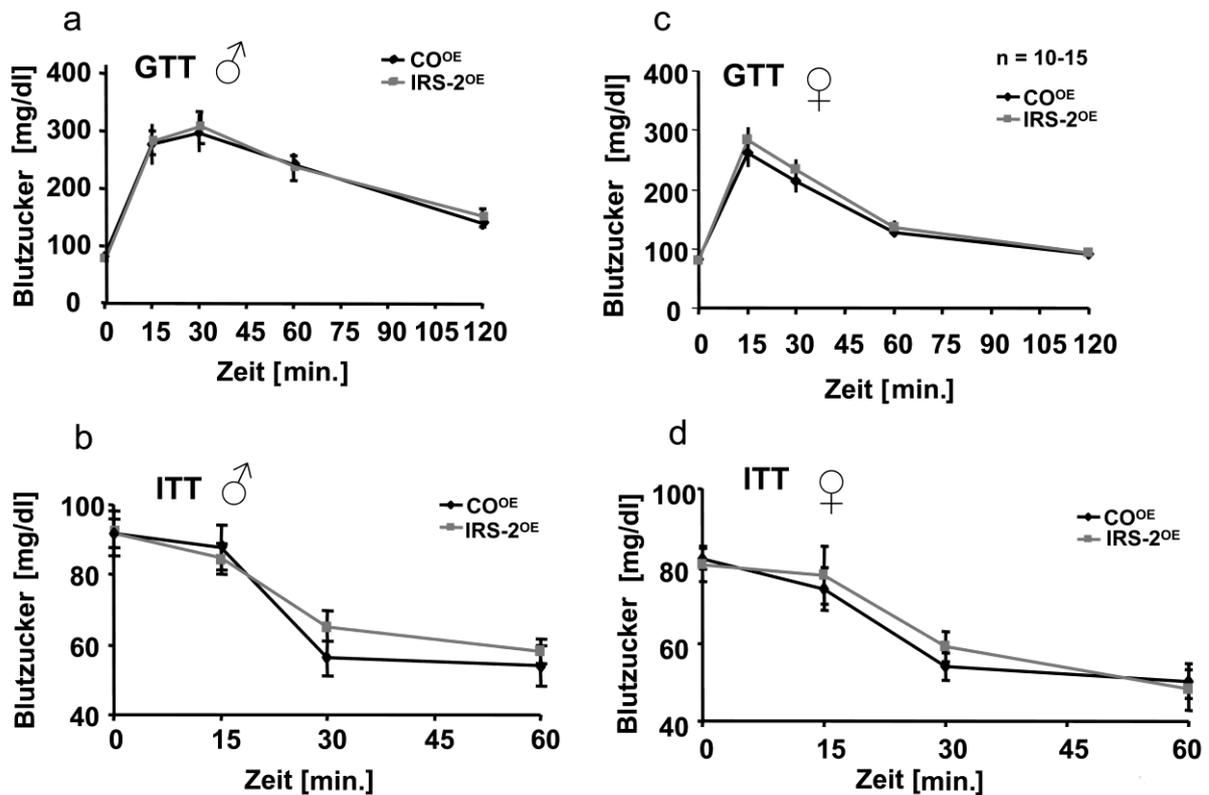


Abb. 21: Glukose- und Insulintoleranztest

Glukose- (a & c) und Insulintoleranztest (b & d) von weiblichen (c & d) und männlichen (a & b) IRS-2^{OE}-Mäusen, sowie den CO^{OE}-Mäusen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte +/- Standardfehler der Gruppe (n = 10 bis 15 pro Gruppe).

3.2.4. Der Nachweis eines vergrößerten Herzens in IRS-2^{OE}-Mäusen

Da der SM22-Promoter bekannterweise in Herzmuskelzellen aktiv ist, ist von einer Expression des Transgens in diesen auszugehen. Es wurde auch eGFP im Herzen nachgewiesen (siehe 3.1.1., Abb. 13). Bei der Organpräparation fiel ein makroskopisch vergrößertes Herz auf. Um dies besser beurteilen zu können, wurde bei männlichen Mäusen der linke Ventrikel des Herzens präpariert und gewogen. Dieses Gewicht wurde in Relation zum Körpergewicht (siehe Abb. 22) bzw. zur Tibiallänge (siehe Abb. 23) gesetzt und anschließend die IRS-2^{OE}-Mäuse mit den CO^{OE}-Mäusen verglichen. Dabei zeigten die IRS-2^{OE}-Mäuse einen schwereren linken Ventrikel im Vergleich zu den CO^{OE}-Mäusen.

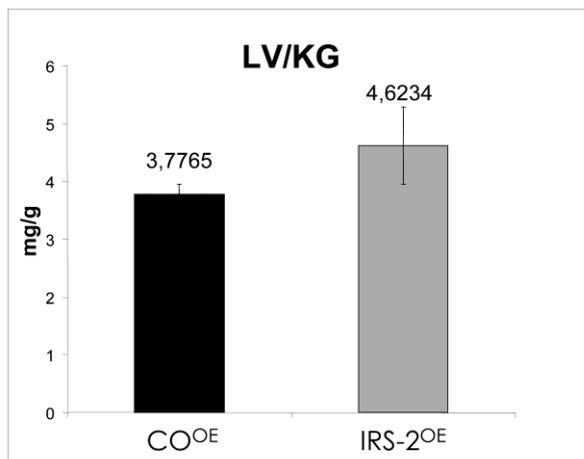


Abb. 22: LV/KG
Verhältnis des linken Ventrikels (mg) zum Körpergewicht (g) der ♂ Maus.
 Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte +/- Standardfehler der Gruppe (n = 5 pro Gruppe). (p = 0,121)

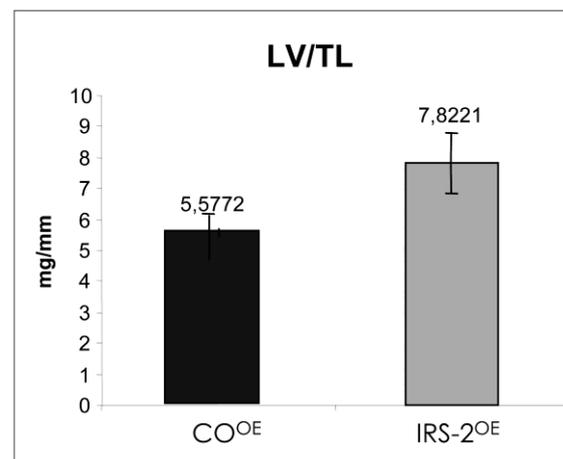


Abb. 23: LV/TL
Verhältnis des linken Ventrikels (mg) zur Länge der Tibia (mm) der ♂ Maus.
 Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte +/- Standardfehler der Gruppe (n = 5 pro Gruppe). (p = 0,013)

Die physiologischen oder pathologischen Auswirkungen eines schwereren linken Ventrikels sowie die Ausmaße der Vergrößerung wurden mittels Echokardiografie näher bestimmt. So zeigt Abb. 24 Sonographiebilder des Herzens von einer IRS-2^{OE}-Maus im Vergleich zu einer CO^{OE}-Maus. Die Bewegungsabläufe des Herzens stellen sich im M-Mode eindimensional dar. Bei den IRS-2^{OE}-Mäusen zeigte sich im Vergleich zu den CO^{OE}-Mäusen in der Echokardiografie eine verdickte Myokardschicht, die auch ausgemessen werden konnte. Die Bewegungsabläufe des Herzens stellten sich bei den IRS-2^{OE}-Mäusen unauffällig physiologisch dar. Hinweise auf eine Herzinsuffizienz ergaben sich nicht.

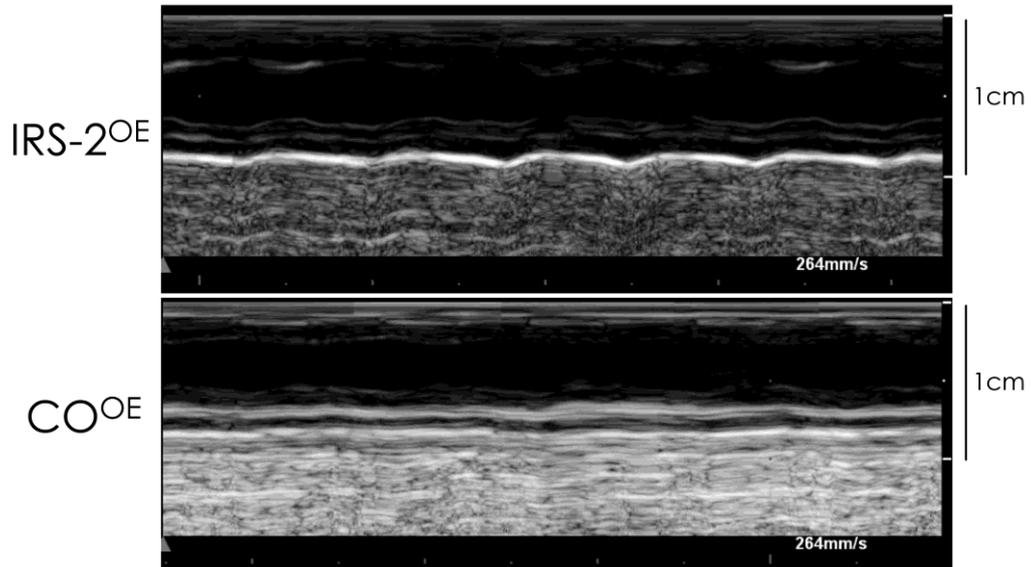


Abb. 24: Sonographiebilder (M-Mode) des Mäuseherzens im Vergleich zwischen einer ♂ IRS-2^{OE}-Maus zur ♂ CO^{OE}-Maus (n = 5 pro Gruppe).

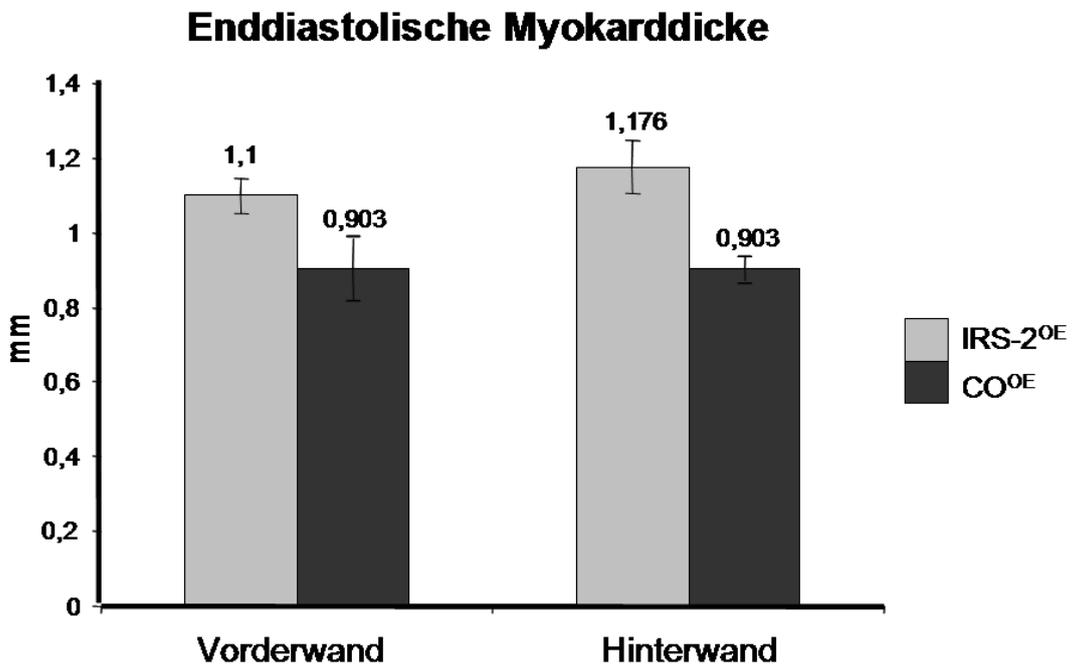


Abb. 25: Enddiastolische Myokarddicke von ♂ IRS-2^{OE}-Mäusen und ♂ CO^{OE}-Mäusen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte +/- Standardfehler der Gruppe (n = 5 pro Gruppe).

Histologische Färbungen des Herzgewebes

Eine Herzhypertrophie ist oft mit einer Einlagerung von Kollagen oder Bindegewebe verknüpft. Unter physiologischen Bedingungen findet man kaum Kollagen im Herzgewebe, nur um die Koronararterien ist eine dünne Schicht Bindegewebe ausgebildet. Um dies beurteilen zu können, wurden paraffinierte Herzschnitte mit Pikrofuchsin gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Das Pikrofuchsin färbt Kollagen oder Bindegewebe stark rot an. Auf beiden Bildern (siehe Abb. 26 und Abb. 27) ist mikroskopisch betrachtet kein Unterschied zu sehen. Die starke Rotfärbung beschränkt sich auf die Umgebung der Koronararterien sowie auf das Epicardium. Dies ist physiologisch für das Herzgewebe.

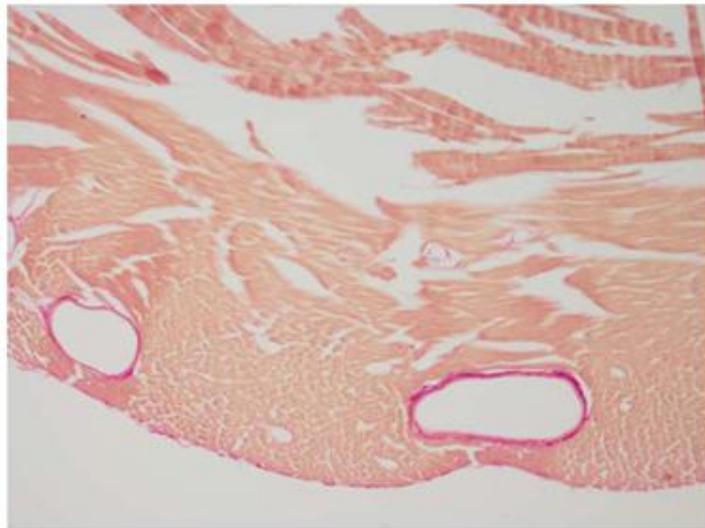


Abb. 26: Pikrofuchsin Färbung des Herzgewebes einer IRS-2^{OE}-Maus
(repräsentativer Ausschnitt) n = 3 ♂

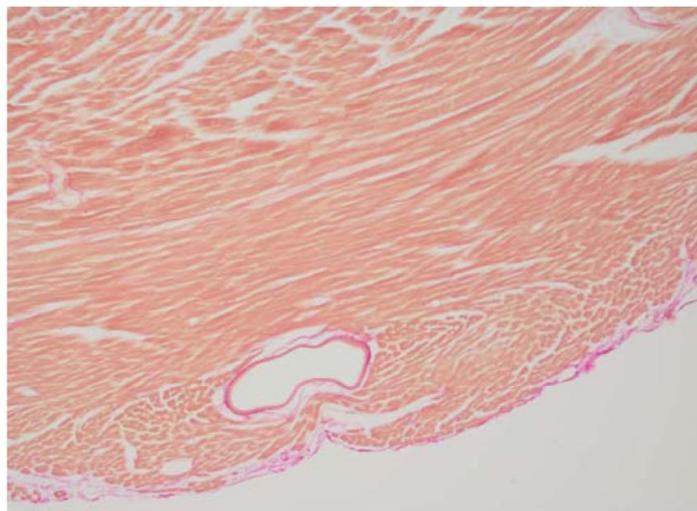


Abb. 27: Pikrofuchsin Färbung des Herzgewebes einer CO^{OE}-Maus
(repräsentativer Ausschnitt) n = 3 ♂

Ein möglicher Grund für die Zunahme des Herzgewichtes von IRS-2^{OE}-Mäusen ist die Vergrößerung der Myokardzelle an sich. Diese sogenannte Hypertrophie zeigt sich durch die Volumenzunahme der einzelnen Myokardzellen. Mit Rhodamine Wheat Germ Agglutinin (hier rot) der Myokardzellen markiert und mittels eines Fluoreszenzmikroskops wurde die Fläche der Anschnitte der Kardiomyozyten als Surrogatparameter ihrer Größe beurteilt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (hier blau) sichtbar gemacht. In Abb. 28 (IRS-2^{OE}-Maus) und in Abb. 29 (CO^{OE}-Maus) kann man keinen signifikanten Unterschied in der Zellgröße mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops erkennen.

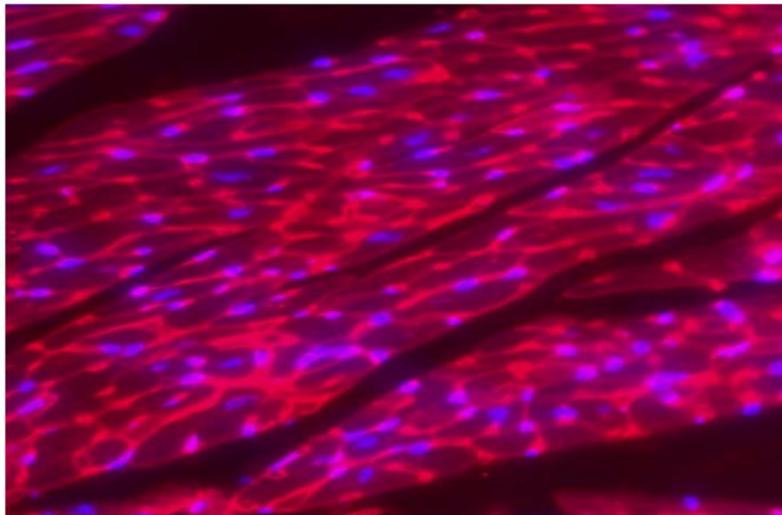


Abb. 28: WGA-Färbung des Herzgewebes einer IRS-2^{OE}-Maus

Rhodamine Wheat Germ Agglutinin & DAPI Färbung (repräsentativer Ausschnitt) des Herzgewebes einer ♂ IRS-2^{OE}-Maus. (n = 3)

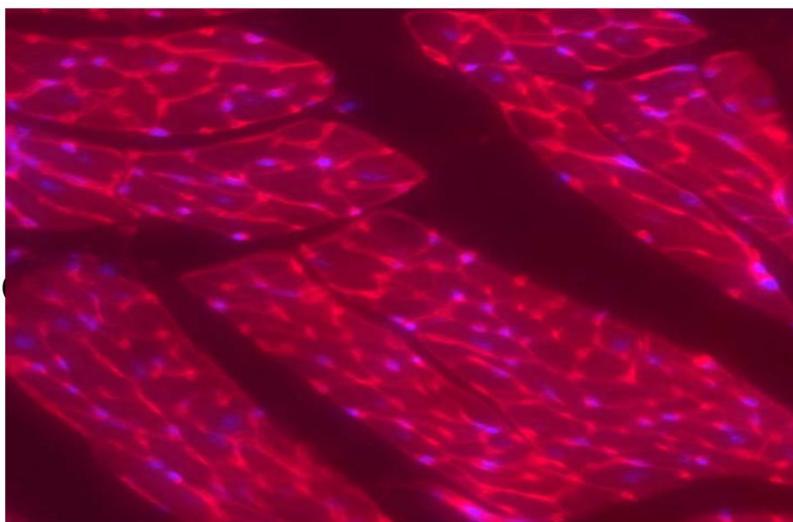


Abb. 29: WGA-Färbung des Herzgewebes einer CO^{OE}-Maus

Rhodamine Wheat Germ Agglutinin & DAPI Färbung (repräsentativer Ausschnitt) des Herzgewebes einer ♂ CO^{OE}-Maus. (n = 3)

Ein weiterer Grund für die Zunahme des Herzgewichtes wäre eine Hyperplasie, d.h. eine Vergrößerung des Myokards durch eine Vermehrung der Myokardzellen. Die Gesamtzahl der Kardiomyozyten ist aber nur sehr schwer zu quantifizieren. Da andere Veränderungen, wie die Einlagerung von Kollagen oder die Hypertrophie, die die Größenzunahme des Herzens in IRS-2^{OE}-Mäusen erklären könnten, nicht gefunden wurden, ist es möglich, dass in diesem Falle eine Hyperplasie vorliegen könnte.

3.2.5. Die Morphologie der Arterien

In den Validierungsschritten ist gezeigt worden, dass vermehrt IRS-2-Protein wie intendiert in den Arterien – repräsentiert durch die Aorta – sowie in isolierten VSMC vorliegt. Die Auswirkungen auf die morphologische Struktur der Gefäße sind nicht bekannt. Deswegen wurden histologische Paraffinpräparate der Aorta und der A. carotis communis (ACC) angefertigt, um dieses beurteilen zu können. Beide wurden mit Resorcinfuchsin und der Gegenfärbung Kernechtrot angefärbt (siehe Abb. 30).

Die elastischen Fasern stellen sich dunkel-violett dar und man kann ca. 5 bis 6 konzentrische Ringe in der Aorta und 3 bis 4 Ringe in der ACC erkennen. Lichtmikroskopisch kann man keine morphologischen Unterschiede zwischen den ♂IRS-2^{OE}-Tieren zu den ♂CO^{OE}-Tieren erkennen.

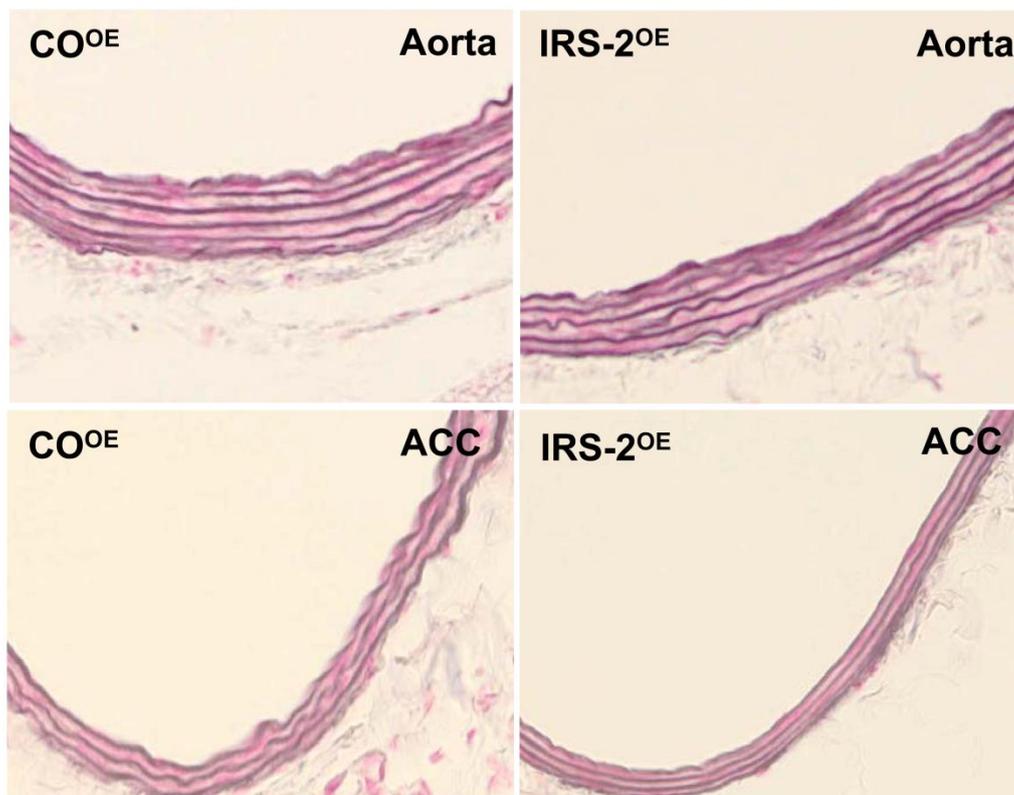


Abb. 30: Elastika-Färbung der Aorta und der A. carotis communis von ♂CO^{OE}-Mäusen und ♂IRS-2^{OE}-Mäusen. (n = 5 pro Gruppe)

Um diesen lichtmikroskopischen Eindruck zu objektivieren, wurde die Wandstärke der Gefäße ausgemessen (siehe Abb. 31). Weder bei der Aorta noch bei der A. carotis communis zeigten sich Größenunterschiede in der Wandstärke zwischen den IRS-2^{OE}-Tieren zu den CO^{OE}-Tieren.

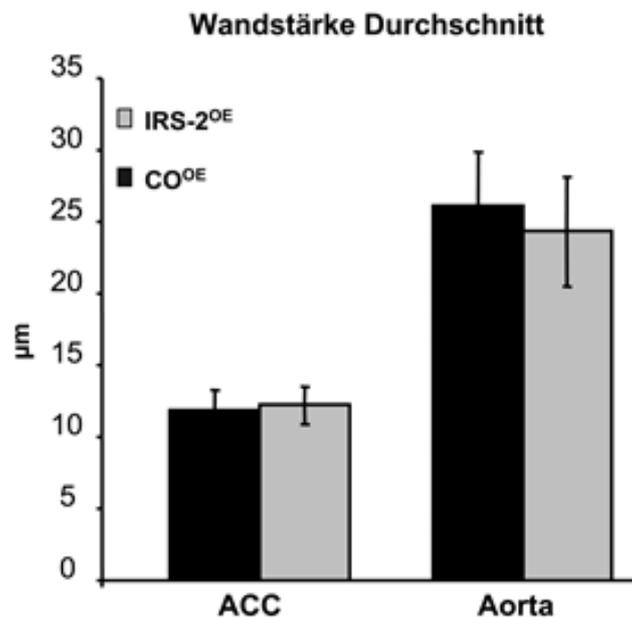


Abb. 31: Wandstärkendurchschnitt der Aorta und der ACC

Messdaten (Mittelwerte n = 4) von der Wandstärke (µm) der Aorta und der A. carotis communis (ACC) von ♂CO^{OE}-Mäusen und ♂IRS-2^{OE}-Mäusen mit deren +/-Standardfehler.

Neben der Aorta und der A. carotis communis wurden weitere, kleinere Arterien untersucht. Die Koronararterien (H.E.-Färbung), die Nierenarterien sowie die Pulmonalarterien (jeweils mit Resorcinfuchsin gefärbt) stellen sich jeweils unauffällig dar (siehe Abb. 32).

Entgegen den Vermutungen, die sich aus den veröffentlichten (Cruzado, M. et al., 1998); (Desouza, C. V. et al., 2006) und den eigenen Daten (basale Erhöhung von pAKT und pERK – siehe 3.1.2.) ergeben, weisen damit die großen und kleinen Arterien der IRS-2^{OE}-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen keine fassbaren morphologischen Unterschiede auf.

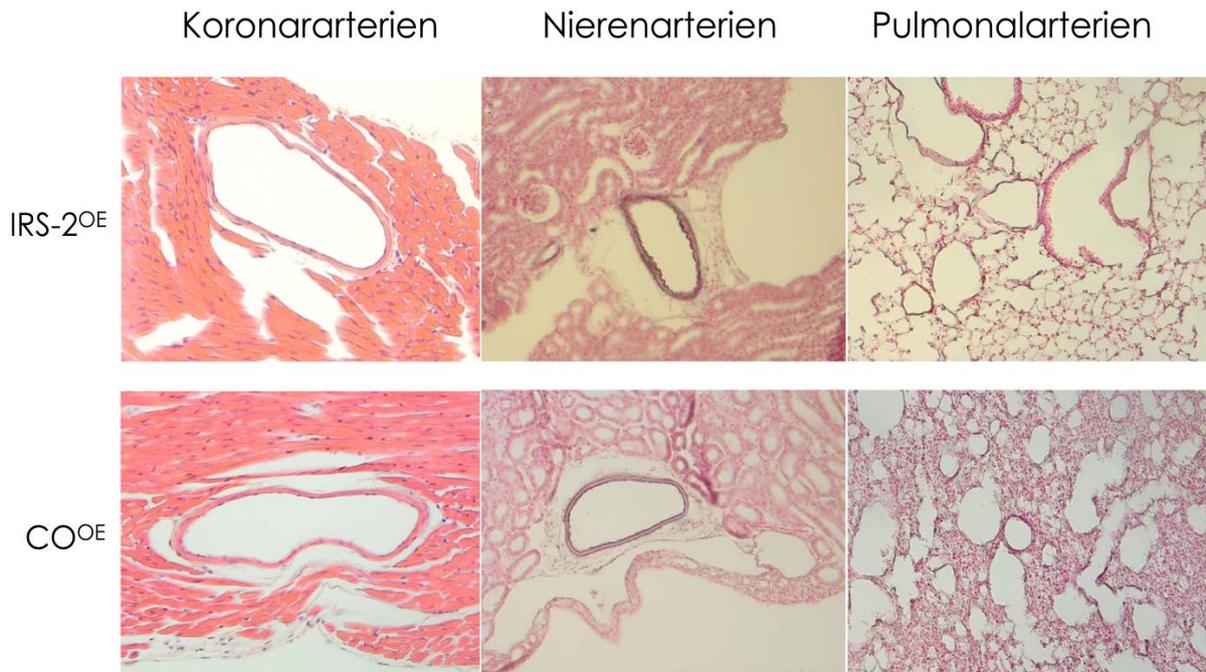


Abb. 32: Histologische Bilder von Arterien

Der Koronararterien (H.E.-Färbung), der Nierenarterien (Elastika-Färbung) sowie der Pulmonalarterien (Elastika-Färbung) von ♂IRS-2^{OE}-Mäusen und ♂CO^{OE}-Mäusen.

3.3. Die Auswirkung einer Ballondilatation auf die ACC von IRS-2^{OE}- und CO^{OE}-Mäusen nach 2 Wochen

Wie oben beschrieben, hatte eine vermehrte IRS-2 Produktion keinen Einfluss auf die Morphologie der Arterien. Allerdings ließen die in der Literatur verfügbaren Informationen sowie die basale Erhöhung von pAKT und pERK (siehe 3.1.2.) vermuten, dass die Überexpression von IRS-2 in VSMC zu einer verstärkten Neointimabildung nach einer Gefäßwandverletzung, wie sie im Rahmen einer Ballondilatation vorkommt, führt. Um dies beurteilen zu können, wurde ein Ballonkatheter in die A. carotis communis von 10 bis 12 Wochen alten männlichen Mäusen eingeführt, dilatiert und wieder entfernt. Nach 14 Tagen wurde die A. carotis communis (ACC) entnommen und histologisch aufgearbeitet. Alle paraffinierten Carotiden wurden mit Resorcinfuchsin angefärbt, um die elastischen Fasern klar darstellen zu können. Es wurde jeweils die operierte Seite (ACC re OP) mit der nicht operierten (ACC li KO) als interne Kontrolle und mit ACC's nach Sham-OP von Mäusen einer Kontrollgruppe sowie die IRS-2^{OE}-Mäuse mit den CO^{OE}-Mäusen verglichen, um Auswirkungen einer vermehrten IRS-2 Produktion zu erkennen. Wider Erwarten zeigte sich trotz der Erstellung von seriellen Carotidschnitten eine nur sehr geringe Neointimabildung. Es werden jeweils repräsentative Abbildungen gezeigt.



ACC li KO IRS-2^{OE}

Abb. 33: Kontroll-ACC einer IRS-2^{OE}-Maus



ACC re OP IRS-2^{OE}

Abb. 34: operierte ACC einer IRS-2^{OE}-Maus

Die beiden Abbildungen zeigen die A. carotis communis (ACC). Auf der linken Seite stellt sich die nicht operierte Kontrollseite dar. Dieses Bild zeigt die typischen 3 elastischen Fasern sowie eine Wandstärke von ca. 12 μm (siehe auch Abb. 30).

Auf der rechten Seite stellt sich die operierte Carotide einer IRS-2^{OE}-Maus dar. Bei gleicher Vergrößerung ist diese stark dilatiert und die elastischen Fasern innerhalb der Gefäßwand haben zugenommen. Die Wandstärke ist leicht verdickt. Es kam allerdings zu keiner Neointimabildung.



ACC li KO WT^{OE}

Abb. 35: Kontroll-ACC einer CO^{OE}-Maus



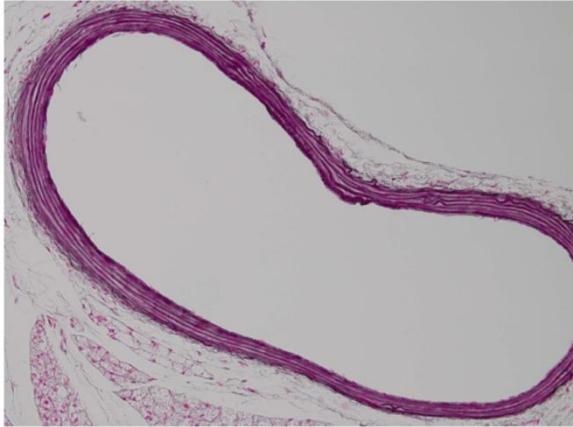
ACC re OP WT^{OE}

Abb. 36: operierte ACC einer CO^{OE}-Maus

Auf der linken Seite sieht man die nicht operierte Kontrollseite einer CO^{OE}-Maus. Die A. carotis communis stellt sich physiologisch dar. Auf der rechten Abbildung sieht man die operierte A. carotis communis einer CO^{OE}-Maus. Auch hier fällt die starke Dilatation auf, die leicht verdickte Wandstärke sowie die Zunahme der elastischen Fasern. Allerdings zeigt sich bei dieser Carotide eine Neointima (siehe Pfeil). Es kam zu einer wenn auch geringen, aber reproduzierbaren Neointimabildung nach Gefäßwandverletzung.

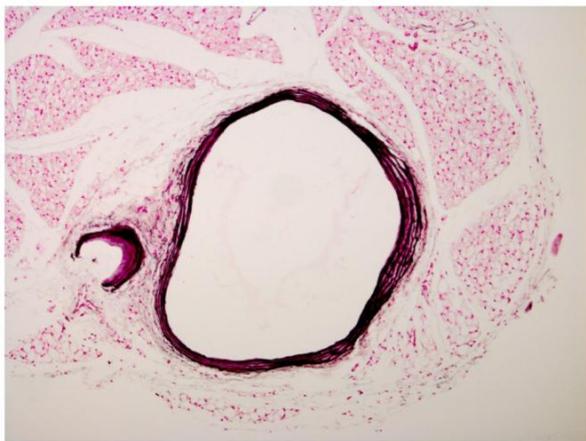
Auch die folgenden Abbildungen (siehe Abb. 37 und Abb. 38) zeigen alle operierten Carotiden von IRS-2^{OE}-Mäusen (1. OP bis 5. OP) und CO^{OE}-Mäusen (6. OP bis 10. OP).

ERGEBNISSE

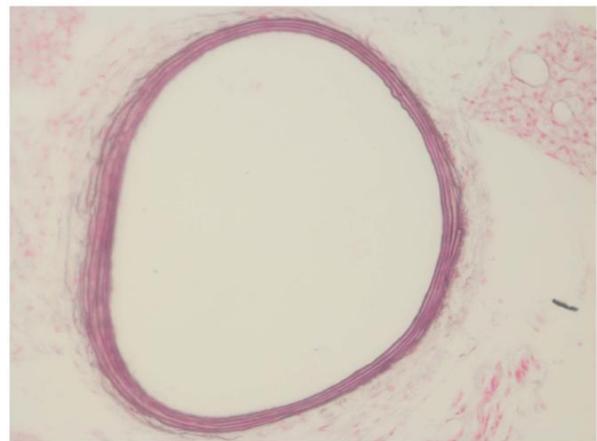


1. OP ACC OP re

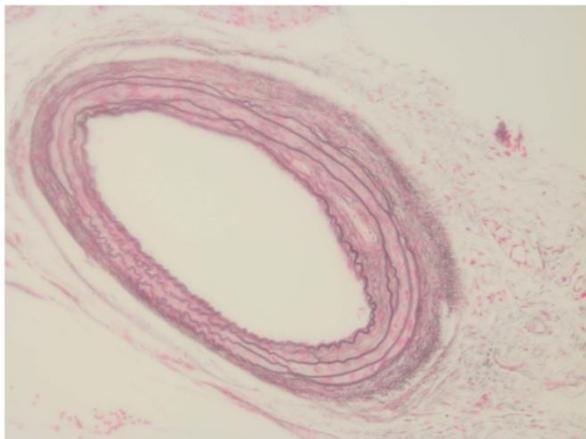
Zuerst werden die IRS-2^{OE}-Mäuse dargestellt. Auffallend ist hier das outward remodeling der vierten OP. Da die gleiche Reaktion auch nach einer Sham-OP beobachtet werden konnte, ist sie am ehesten der Operationstechnik, aber nicht der Dilatation zuzurechnen (siehe Abb. 37). In der ACC 5.OP fand sich nach Dilatation ein Thrombus. Allerdings kann man bei keiner Operation eine Neointimabildung feststellen.



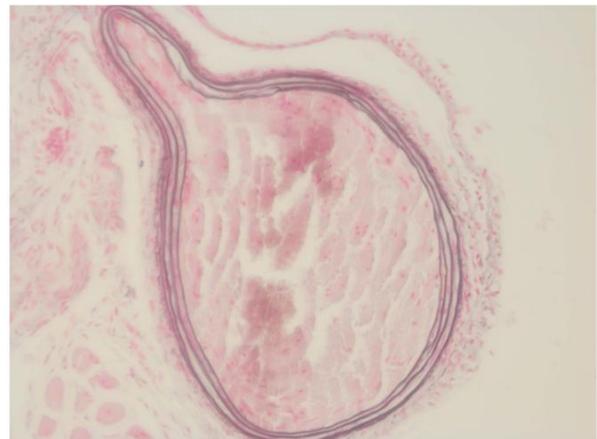
2. OP ACC OP re



3. OP ACC OP re



4. OP ACC OP re



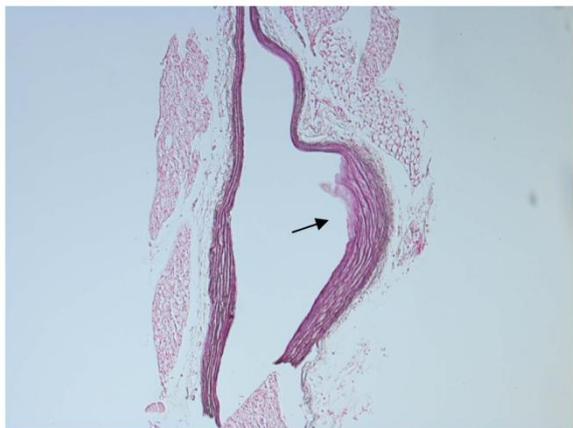
5. OP ACC OP re

Abb. 37: operierte A. carotis communis (ACC) von IRS-2^{OE}-Mäusen (1. OP bis 5. OP)

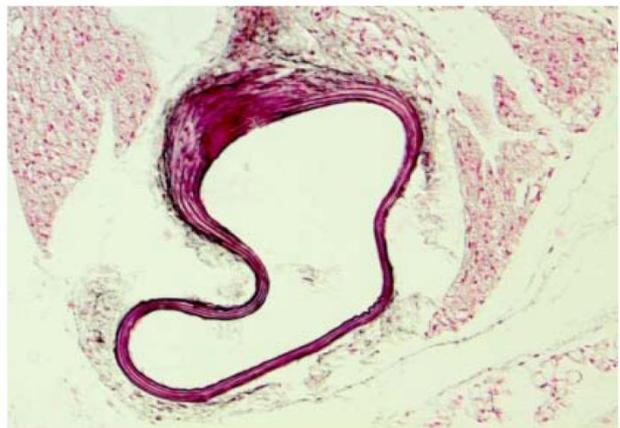


6. OP ACC OP re

In den folgenden Grafiken werden die CO^{OE}-Mäuse dargestellt (6. OP bis 10. OP). Die Pfeile markieren jeweils die Reaktion des Gefäßes auf die Ballondilatation. Es kam zu einer unterschiedlich starken Ausprägung der Neointima. Das Endothel stellte sich immer verändert dar. In der achten Operation konnte keine Neointima festgestellt werden. Das Bild zeigte lediglich einen Gefäßabgang von der A. carotis communis.



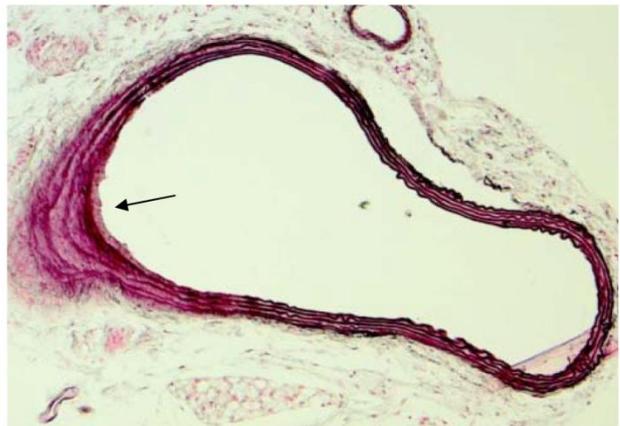
7. OP ACC OP re (10x)



8. OP ACC OP re



9. OP ACC OP re

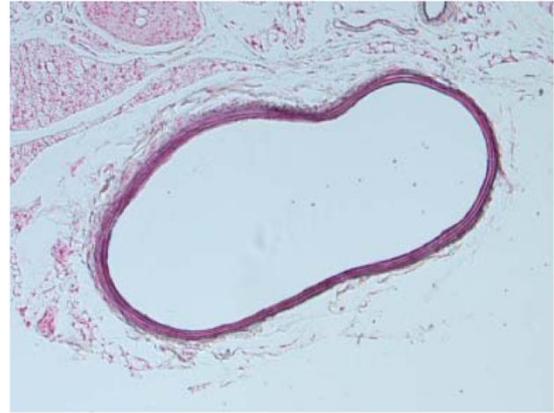


10. OP ACC OP re

Abb. 38: operierte A. carotis communis (ACC) von CO^{OE}-Mäusen (6. OP bis 10. OP)



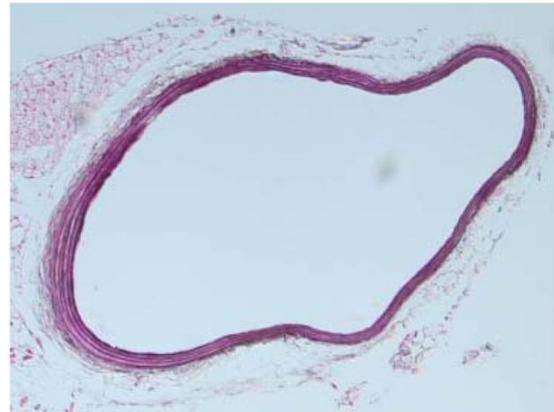
1. S-OP IRS-2^{OE}



3. S-OP IRS-2^{OE}



6. S-OP CO^{OE}



4. S-OP CO^{OE}

Abb. 39: Sham- operierte A. carotis communis (ACC)

von ♂ IRS-2^{OE}-Mäusen (repräsentativ 1. & 3.) sowie von ♂ CO^{OE}- Mäusen (repräsentativ 6. & 4.). (n = 5 pro Gruppe) siehe 2.2.9.1.

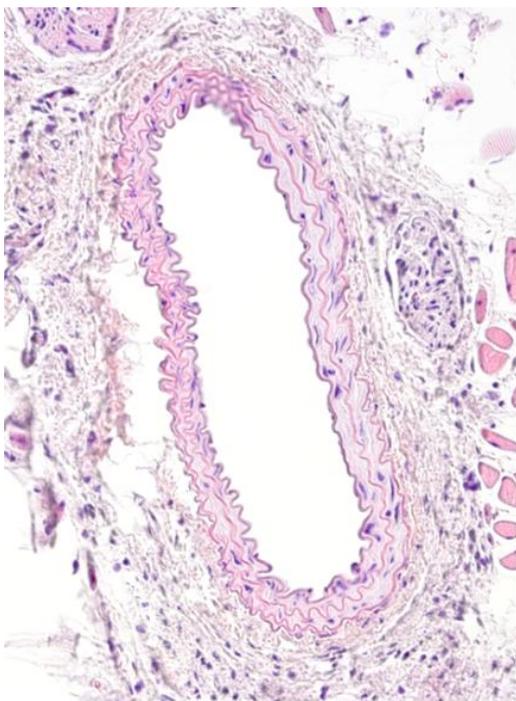
Neointimabildung 14 Tage nach OP

IRS-2 ^{OE}	CO ^{OE}	
-		OP 1
-		OP 2
-		OP 3
-		OP 4
-		OP 5
	+	OP 6
	+	OP 7
	-	OP 8
	+	OP 9
	+	OP 10

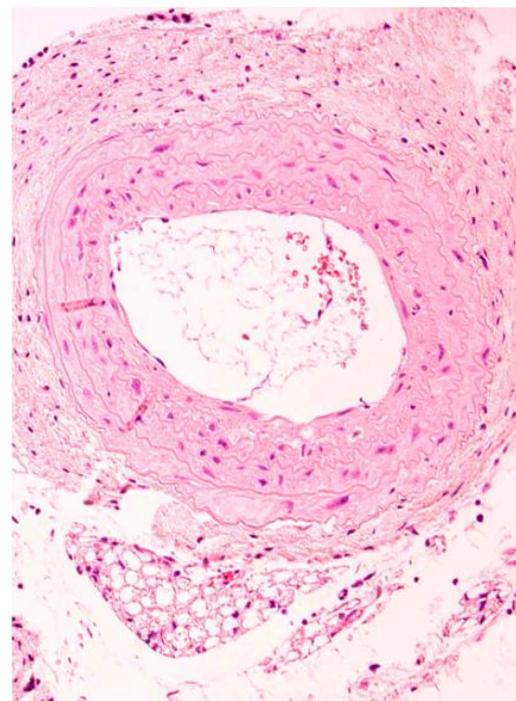
Abb. 40: tabellarische Aufzeichnung der OP-Tiere mit Beurteilung der Neointimabildung

3.4. Die Auswirkung einer Gefäßwandverletzung mittels eines Führungsdrahtes auf die ACC von IRS-2^{OE}- und CO^{OE}-Mäusen nach 4 Wochen

Aufgrund der geringen Neointimabildung der ACC nach 2 Wochen wurde bei zehn männlichen Tieren (jeweils fünf IRS-2^{OE}-Mäuse und fünf CO^{OE}-Mäuse) eine Gefäßwandverletzung mittels eines Führungsdrahtes durchgeführt. Die Carotiden wurden nach 4 Wochen präpariert, H.E. gefärbt, histologisch verglichen (siehe Abb. 41) und mit Hilfe des ImageJ ausgewertet (siehe Abb. 42). Hier wurde das Flächenverhältnis mittels eines Wilcoxon-Mann-Whitney-Testes zwischen Intima und Media im Schnitt berechnet.



ACC re OP IRS-2^{OE} 4 wo



ACC re OP CO^{OE} 4 wo

Abb. 41: 4 Wochen alte operierte A. carotis communis (ACC) einer ♂ IRS-2^{OE}-Maus sowie einer ♂ CO^{OE}-Maus

Auf der linken Seite sieht man eine mittels Führungsdrahtes operierte A. carotis communis einer IRS-2^{OE}-Maus, beispielhaft für insgesamt vier Carotiden (eine von fünf war aufgrund einer Entzündungsreaktion nicht auswertbar). Auch nach vier Wochen lässt sich kaum Neointima darstellen. Auf der rechten Abbildung sieht man eine operierte ACC einer CO^{OE}-Maus. Hier kam es erneut zu einer reproduzierbaren Neointimabildung nach Gefäßwandverletzung.

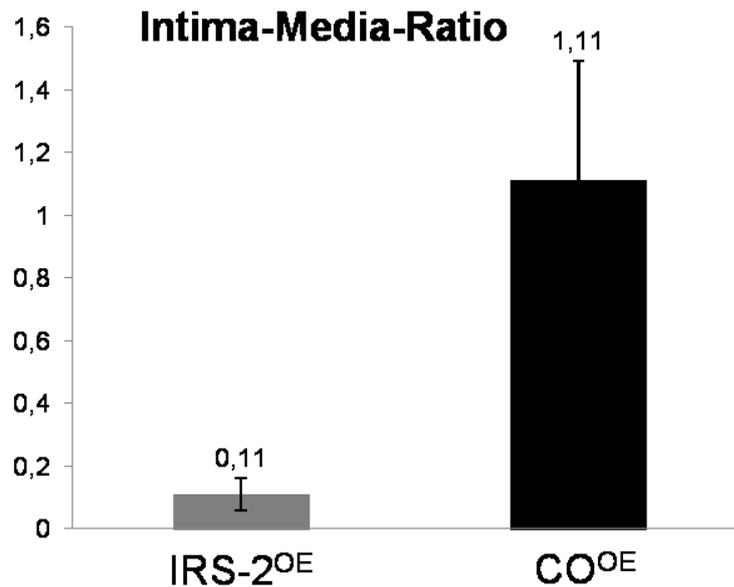


Abb. 42: Intima-Media-Ratio von ACC 4 Wochen nach Operation

Messdaten (Mittelwerte $n = 4$) von dem Flächenverhältnis zwischen Intima und Media der operierten ACC von ♂ IRS-2^{OE}-Mäusen und ♂ CO^{OE}-Mäusen mit deren +/-Standardfehler ($p < 0,05$).

3.5. Charakterisierung von isolierten VSMC

Um die Bedeutung von IRS-2 in den VSMC zu untersuchen, wurden VSMC aus der Aorta der Maus isoliert und in Kultur genommen. Die jeweiligen dazugehörigen Kontrollzellen kommen aus derselben Zuchtlinie. Die 6 folgenden VSMC-Linien wurden etabliert:

1. - IRS-2^{OE}-Zellen und CO^{OE}-Kontrollzellen
2. - VSMC aus IRS-1^{-/-} - und IRS-1^{+/+} -Mäusen (IRS-1-KO- und WTK-1-VSMC)
3. - VSMC aus IRS-2^{-/-} - und IRS-2^{+/+} -Mäusen (IRS-2-KO - und WTK-2-VSMC)

3.5.1. Proliferationsassay

Die Proliferation von VSMC ist für die Neointimabildung ein notwendiger Mechanismus. Die Grafik (siehe Abb. 43) zeigt einen BrdU-basierten Proliferationsassay mit IRS-2^{OE}-Zellen und CO^{OE}-Zellen. Sie wurden für 16 h serumfrei gesetzt und anschließend mit 20% FCS-haltigem Medium stimuliert. Gleichzeitig wurden Inhibitoren der PI3-Kinase bzw. der MAP-Kinase zugegeben. Dabei wachsen die IRS-2^{OE}-Zellen signifikant schneller als die CO^{OE}-Zellen. Es kam durch die Zugabe von 20 µM LY 294002, einem PI3K-Inhibitor, zu einer geringen aber signifikanten Hemmung der Proliferation in den IRS-2^{OE}-Zellen nach 24 h. Die CO^{OE}-Zellen zeigten fast keinen Rückgang der Proliferation durch die Zugabe von LY 294002. Die Zugabe von 50 µM PD 98,059 dagegen, einem MAPK-Inhibitor, verursachte einen signifikanten Rückgang ($p < 0,05$) des Zellwachstums in IRS-2^{OE}-Zellen und weniger ausgeprägt in CO^{OE}-Zellen.

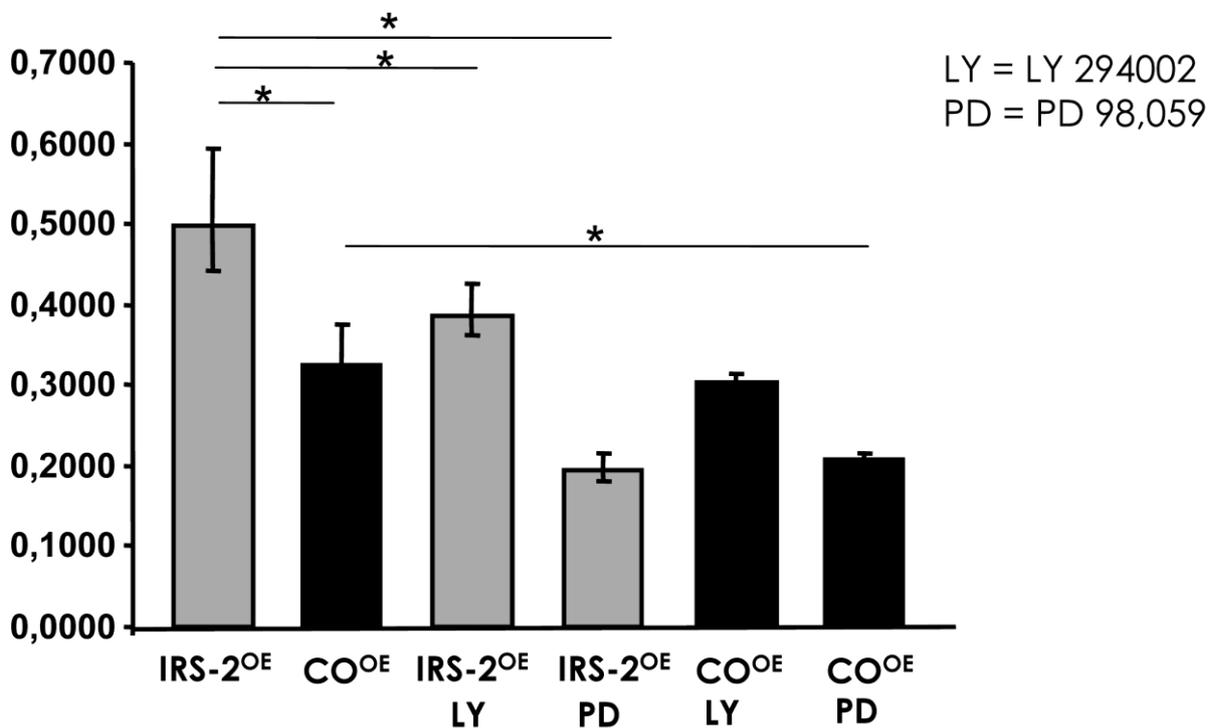


Abb. 43: Proliferationsassay mit IRS-2^{OE}-Zellen und CO^{OE}-Zellen, sowie zweier Inhibitoren (20 µM LY und 50 µM PD). Gezeigt werden Mittelwerte +/- Standardfehler sowie signifikante * Unterschiede $p < 0,05$.

Parallel wurden die Proliferationsraten von IRS-1-KO- und IRS-2-KO-VSMC im Vergleich zu den jeweiligen Kontroll-VSMC untersucht. Beide Zelllinien der KO Zellen verhielten sich sehr ähnlich und zeigten statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zu den WTK-Zellen. Die Proliferationsrate war bei beiden stark herabgesetzt.

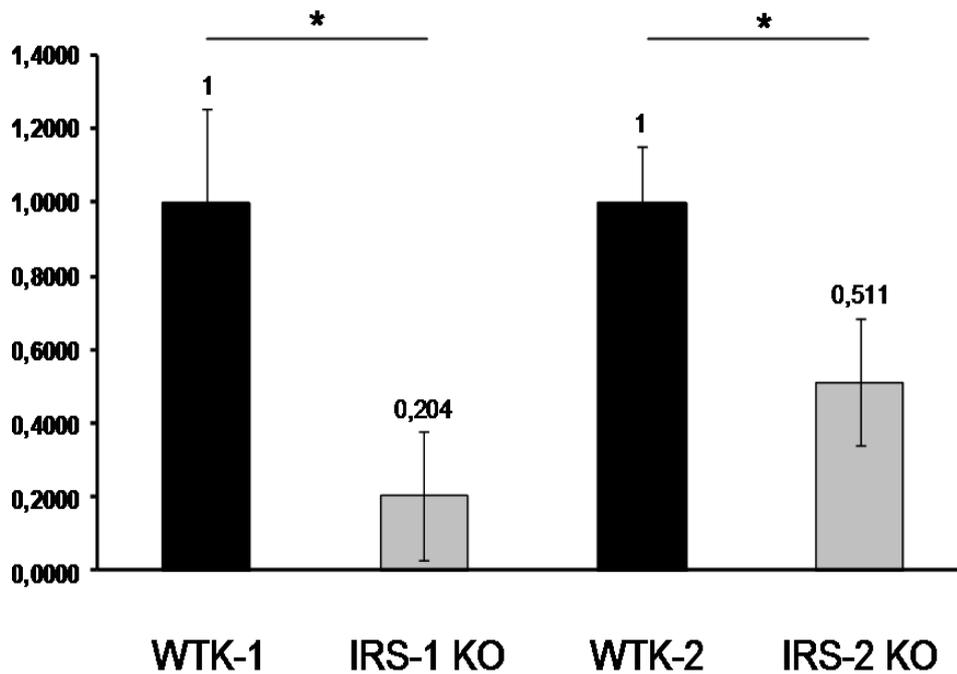


Abb. 44: Proliferationsassay mit KO-VSMC

IRS-1-KO-VSMC und WTK-1-VSMC, sowie IRS-2-KO-VSMC und WTK-2-VSMC
 Dargestellt werden Mittelwerte der relativen Proliferationsraten, normiert auf die jeweiligen Kontrollzellen +/- Standardfehler sowie signifikante * Unterschiede $p < 0,05$.

3.5.2. Western Blot Analysen

Neben dem Proliferationsverhalten wurden auch damit in Verbindung stehende Proteine der Zellen während der Proliferationsphase mittels Western Blot analysiert. Dieser Western Blot (siehe Abb. 45) diente ebenfalls zur Validierung der Zellen. Der erste Western Blot zeigte das IRS-2-Protein in den verschiedenen Zelllinien. So zeigten IRS-1-KO-Zellen keinen Unterschied im IRS-2 Proteingehalt zu den WTK-1-Zellen. Dagegen sah man in den IRS-2-KO-Zellen kein IRS-2-Protein und in den IRS-2^{OE}-Zellen ein deutliches Signal, welches um ein Vielfaches stärker war als in den CO^{OE}-Zellen. In dem darauf folgendem IRS-1 Western Blot sah man keine IRS-1 Bande in den IRS-1-KO-Zellen, eine Bande in den IRS-2-KO-Zellen und eine Doppelbande in den IRS-2^{OE}-Zellen. Dies liegt möglicherweise an einer Antikörper-Kreuzreaktion durch die Überexpression von IRS-2 in diesen Zellen. Fast kein IRS-1-Protein konnte detektiert werden in den jeweiligen WTK- und CO^{OE}-Zellen.

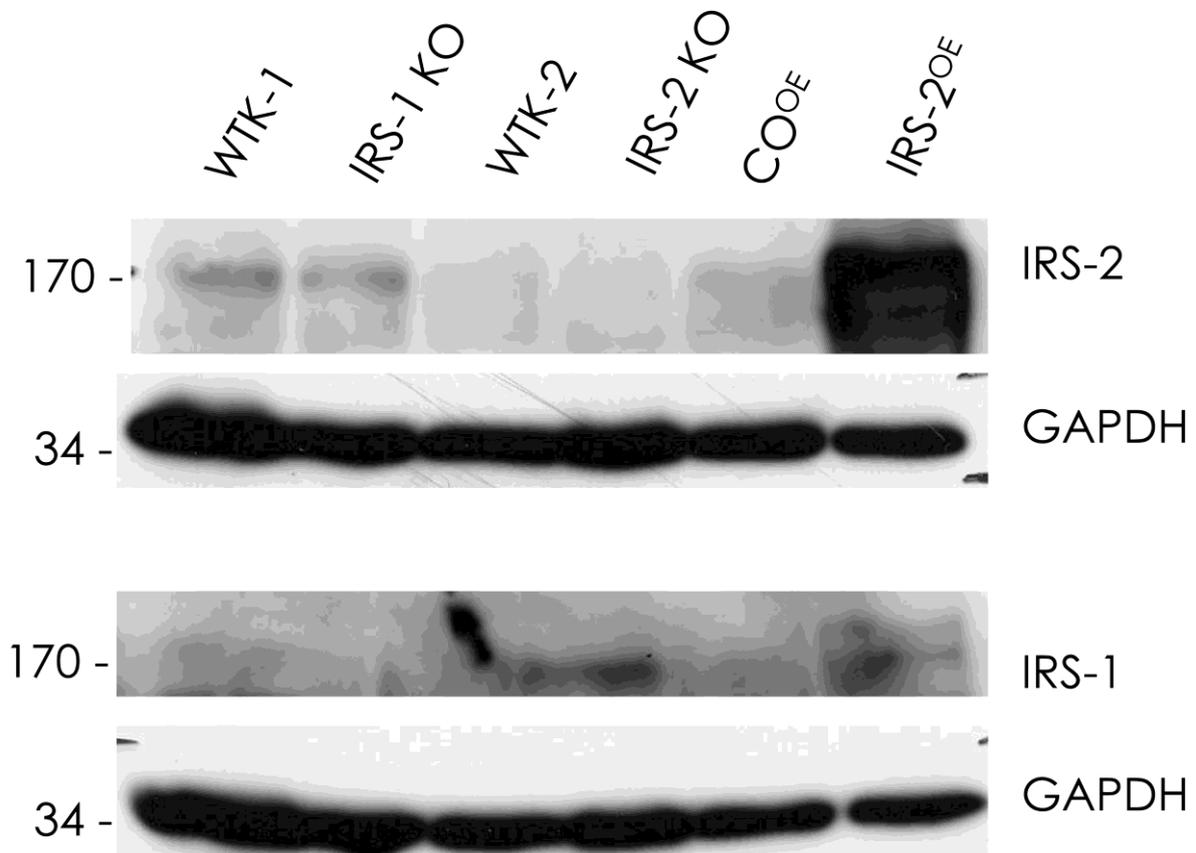


Abb. 45: IRS-1/IRS-2 Western Blot

Western Blot Analyse von Zelllysaten der sechs verschiedenen Zelllinien (siehe 3.6.) von IRS-2-Protein (IRS-2) und IRS-1-Protein (IRS-1). (n = 5)

Die intrazelluläre Signalkaskade verzweigt sich nach den IRS-Proteinen in zwei verschiedene Wege, den MAP-Kinase Weg und den PI3-Kinase Weg. Wie schon bei den Versuchen des *in vivo* Signalings erwähnt, ist AKT unter anderem ein Zielprotein des PI3-Kinase Weges. In der folgenden Abb. 46 zeigte sich pAKT in den IRS-2^{OE}-Zellen unverändert zu den CO^{OE}-Zellen. IRS-1-KO-Zellen zeigten dagegen mehr pAKT im Vergleich zu den WTK-1-Zellen und die IRS-2-KO-Zellen zeigten eine verringerte Phosphorylierung von pAKT zur Kontrolle der WTK-2-Zellen. Die IRS-1-KO-Zellen verhielten sich somit komplementär zu den IRS-2-KO-Zellen. Die Gesamtmenge von AKT stellte sich in allen sechs Proben unverändert dar. Bei dem MAP-Kinase Weg ist ERK unter anderem ein Zielprotein. Dieses verhielt sich in der phosphorylierten Form etwas abgeschwächt ähnlich wie pAKT.

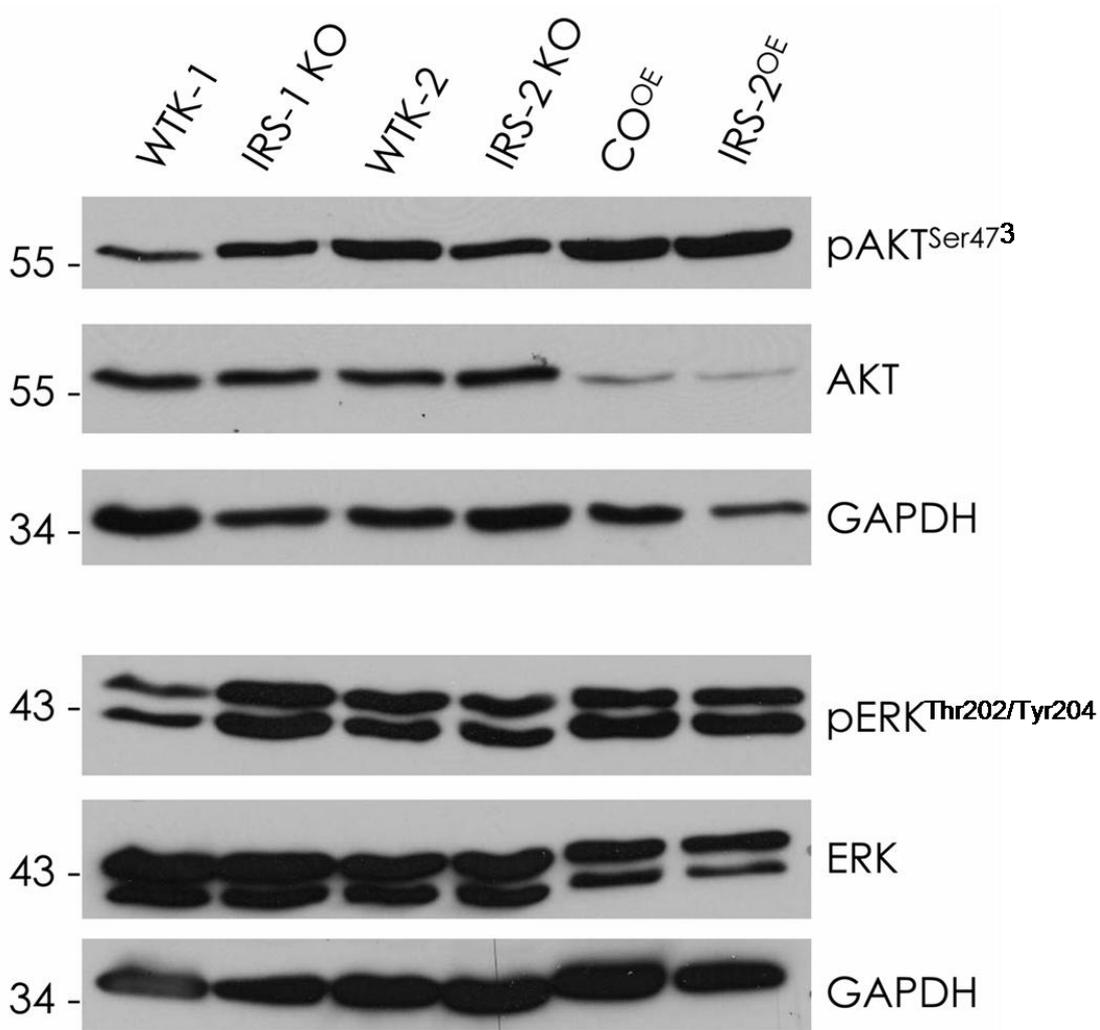


Abb. 46: pAKT^{Ser473}/pERK^{Thr202/Tyr204} Western Blot

Western Blot Analyse von Zelllysaten der sechs verschiedenen Zelllinien (siehe 3.6.) von pAKT^{Ser473} und AKT sowie pERK^{Thr202/Tyr204} und ERK. (n = 3)

ERGEBNISSE

Unter Stimulation mit 20 % FCS zeigten sich allenfalls geringe Unterschiede an pAKT und pERK zwischen IRS-2^{OE}- und CO^{OE}-VSMC. Unter diesen Bedingungen sind die Zellen bereits maximal stimuliert. Deswegen wurde der Teil des Versuches mit serumfrei gesetzter Probe wiederholt (Abb. 47). Hier zeigten sich stärkere pAKT bzw. pERK Signale in IRS-2^{OE}-VSMC.

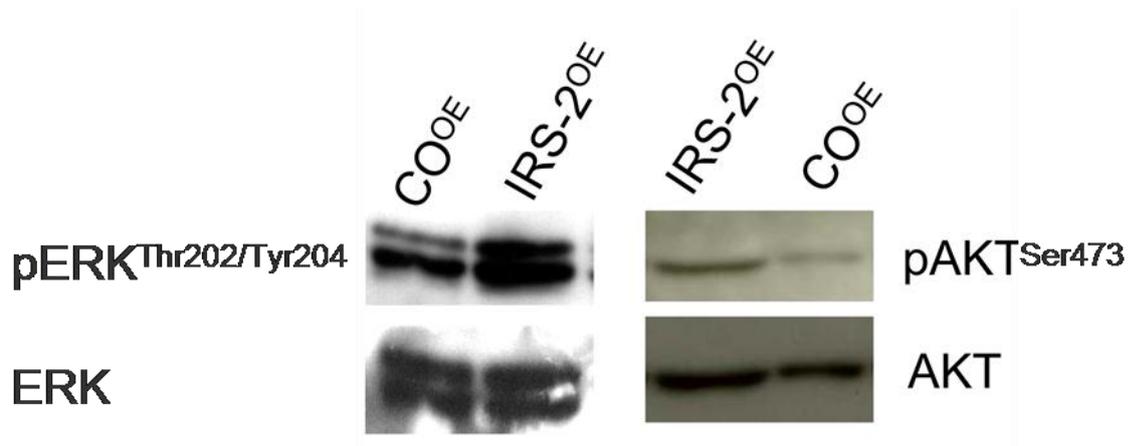


Abb. 47: pAKT^{Ser473}/pERK^{Thr202/Tyr204} Western Blot

Western Blot Analyse von serumfreien Zelllysaten von IRS-2^{OE}- und CO^{OE}-Zellen. (n = 3)

In den folgenden Western Blots wurde nur der PI3-Kinase Weg untersucht. Die Phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) dephosphoryliert $PI_{3,4,5}P$ zu $PI_{4,5}P$. Dieser Schritt inaktiviert den PI3-Kinase Weg. Somit steht PTEN für einen Inhibitor des PI3-Kinase Weges. Das $pGSK3\alpha/\beta^{Ser21/Ser9}$ (*phosphoryliertes Glycogen Synthase Kinase 3*) wird von AKT phosphoryliert und damit inaktiviert. Es reguliert die Proliferation negativ, d.h. wenn es gehemmt wird, erfolgt mehr Proliferation. Die einmalig entwickelten Western Blots dieser Enzyme zeigten keine Unterschiede (siehe Abb. 48).

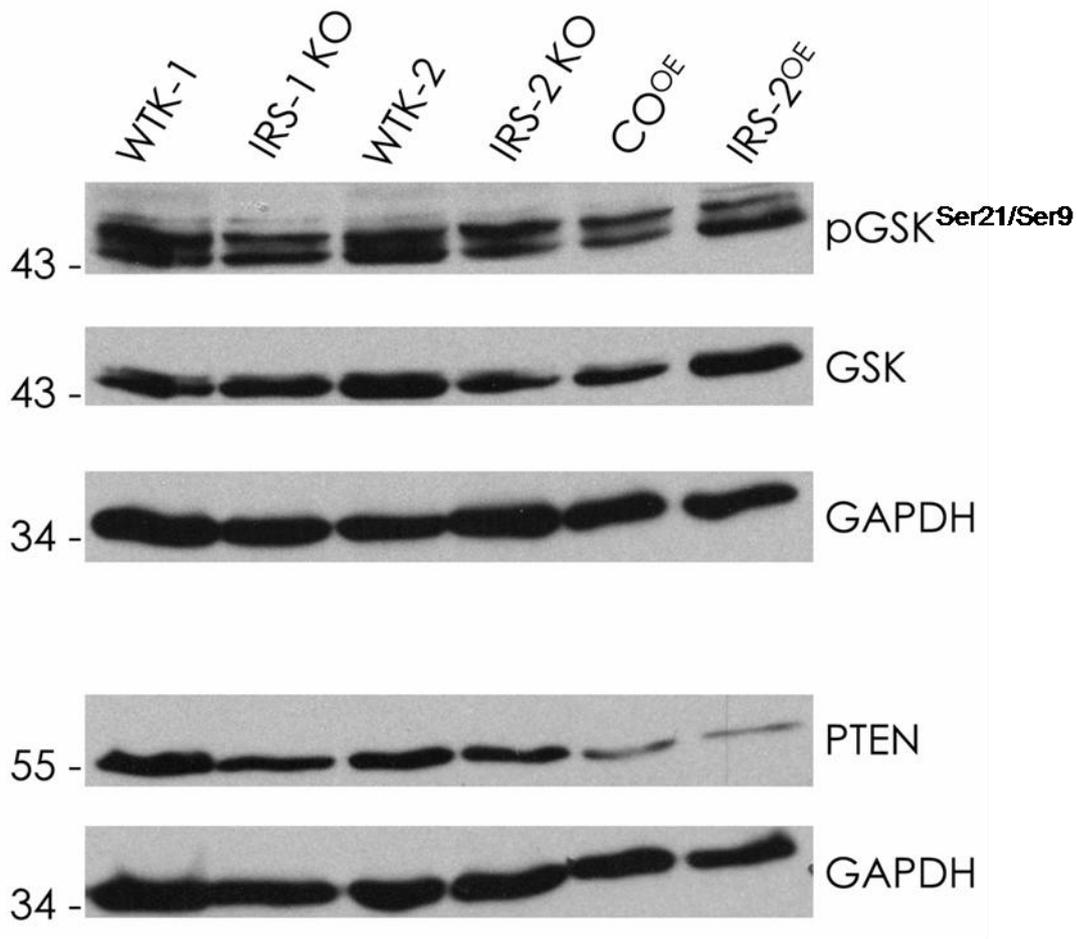


Abb. 48: pGSK3 $\alpha/\beta^{Ser21/Ser9}$ /PTEN Western Blot

Western Blot Analyse von Zelllysaten der sechs verschiedenen Zelllinien (siehe 3.6.) von pGSK3 $\alpha/\beta^{Ser21/Ser9}$ und GSK3 β sowie PTEN.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

Die Restenose ist eine der häufigsten Komplikationen nach einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA). Ziel der Arbeit war es, die Auswirkungen von IRS-2-Protein auf die Neointimabildung nach einer Ballondilatation zu beschreiben, da die bisher verfügbaren Ergebnisse der Grundlagenforschung auf eine besondere Rolle dieses Proteins hindeuten und dem Insulin-/IGF-1-Signalweg eine wichtige pathophysiologische Bedeutung bei Patienten mit einem Diabetes mellitus und dessen Folgeerkrankungen zukommt.

Um die Bedeutung von IRS-2 für die Neointimabildung zu charakterisieren, wurden Mäuse, die IRS-2 in glatten Muskelzellen überexprimieren, erzeugt. Diese unterschieden sich bis auf ein vergrößertes Herz nicht von den Kontrollmäusen. Insbesondere waren die Insulin- und Glukosetoleranz und die Morphologie der Blutgefäße nicht verändert, obwohl sowohl in Aortenlysaten (Abb.: 16) als auch in isolierten serumfreien Zelllysaten von VSMC (Abb.: 47) ein verstärktes pAKT- und pERK- Signal nachgewiesen werden konnte. Isolierte IRS-2^{OE}-VSMC proliferierten schneller als die Kontrollzellen (CO^{OE}-VSMC). Nach Verletzung der ACC bildeten IRS-2^{OE}-Mäuse jedoch weder nach 2 noch nach 4 Wochen eine relevante Neointima. Die *in vivo* Befunde stehen im Gegensatz zu den *in vitro* erhobenen und verlangen nach neuen Ansätzen und Modellen zur Klärung.

4.2. Die Auswahl des Tiermodells: Vorteile und Grenzen

Die Auswahl eines Tierversuchsmodells wird in Abhängigkeit von der Fragestellung und bereits bekannten, veröffentlichten Daten vorgenommen (Malhowski, A. J. et al., 2011); (Hassane, S. et al., 2011); (Holtwick, R. et al., 2002); (Milton, I. et al., 2012); (El-Bizri, N. et al., 2008); (Umans, L. et al., 2007); (Mesaros, A. et al., 2008); (Tovar, S. et al., 2013); (Zemva, J. et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung einer VSMC-spezifische Überexpression von IRS-2 auf die Neointimabildung in der ACC nach Dilatation untersucht. Thematischer Hintergrund sind die erhöhten Raten an Restenosen, die Typ-2-Diabetiker nach Koronarinterventionen im klinischen Alltag entwickeln (Piatti, P. M. et al., 2013). Die Neointimabildung wurde unter den Bedingungen einer Insulinresistenz bzw. einer Hyperinsulinämie bereits in der Literatur beschrieben. In insulinresistenten Tieren war sie stets vermehrt (Desouza, C. V. et al., 2006); allerdings ist dies mit multiplen Veränderungen wie einer Hyperglykämie und einer Hyperlipidämie, aber eben auch mit einer Hyperinsulinämie verknüpft, so dass relevante Mechanismen nicht eindeutig zuzuordnen sind. Umgekehrt führte Metformin, das eine Insulinresistenz mildert, in Ratten zu weniger

Neointima (Lu, J. et al., 2013). Auch die Hyperinsulinämie, deren Auswirkungen auf die Neointimabildung sich in der Literatur als sowohl hemmend als auch fördernd finden (Breen, D. M. et al., 2009); (Foster, E. et al., 2006), beeinflusst zumindest verschiedene Zelltypen; so wurde eine Reduktion der Neointima (Breen, D. M. et al., 2009) mit einer schnelleren Reendothelialisierung des verletzten Arterienbereichs in Verbindung gebracht. Da auch VSMC wie Endothelzellen zu den Insulin stimulierbaren Zelltypen gehören, ist nicht auszuschließen, dass die sich scheinbar widersprechenden Tierversuchsdaten auf eine durch Insulin verstärkte Proliferation zurückführen lassen. Diese wäre in dem einen Tiermodell bevorzugt in Endothelzellen, in anderen eher in VSMC anzunehmen. Da die entsprechende Präferenz der proliferativen Wirkung von Insulin vom genetischen Hintergrund des gewählten Tiermodells abhängt und sich dementsprechend nicht kontrollieren lässt, sind zelltypspezifische Veränderungen wie z.B. ein konditionaler Knockout hinsichtlich eines möglichen Mechanismus sehr viel aufschlussreicher.

Der VSMC-spezifische Knockout von PTEN, einer Lipidphosphatase, die PIP3 inaktiviert, führte zu einem erhöhten pAKT-Signal und zu verdickten Arterienwänden ohne weiteren Stimulus (Nemenoff, R. A. et al., 2008). Die Überexpression von PTEN (Koide, S. et al., 2007) und ein Knockdown von AKT (Stabile, E. et al., 2003) unterdrücken eine Neointimabildung, während eine Überexpression von konstitutiv aktivem AKT zu einer Hyperplasie von glatten Muskelzellen in Bronchien führte (Ma, L. et al., 2011). AKT und PTEN gehören zum PI3K-Signalweg. Dieser ist nur ein Teil des Insulin-/IGF-1/IRS-Signals, das über weitere Signalwege wie den MAPK-Weg übertragen wird (Skolnik, E. Y. et al., 1993). Zudem kann die PI3-Kinase auch von anderen Rezeptortyrosinkinasen (z.B. PDGF oder VEGF) aktiviert werden (Hirsch, E. et al., 2007). Damit bilden die oben genannten Modelle die Insulinwirkung auf die Neointimabildung nur in einem eingeschränkten Sinn ab, wenn sie auch nahelegen, dass das AKT-stimulierende Insulin- bzw. IGF-1-Signal die Neointima verstärkt.

Eine Insulinresistenz bzw. eine herabgesetzte Glukosetoleranz sind bekannte Risikofaktoren für die Bildung von Neointima, wenn auch der zugrundeliegende Mechanismus nicht klar ist. Auch Kubota et al. (Kubota, T. et al., 2003) beschreiben in den IRS-1- und IRS-2-KO-Mäusen zu einem Zeitpunkt von 8 und 20 Wochen eine Insulinresistenz, Dyslipidämie sowie eine Hypertonie, wobei die IRS-2-KO-Mäuse stärker betroffen waren. Für die verstärkte Neointimabildung in diesen Mäusen sind damit mindestens zwei Erklärungsmodelle, nämlich eine direkt die glatten Gefäßmuskelzellen betreffende Auswirkung des jeweiligen Knockout bzw. ein über die Risikofaktoren entstehender indirekter Effekt, denkbar. Zusätzlich sind in den IRS-Knockout-Mäusen Kompensationseffekte durch das jeweils andere IRS-Protein nicht ausgeschlossen. Um diese Einschränkungen der Aussagekraft zu vermeiden wurde eine Maus, die ein IRS-2-Transgen in glatten Muskelzellen vor allem der Blutgefäße (und

promoterbedingt in Herzmuskelzellen) exprimiert, erzeugt. Sowohl das damit intendierte vermehrte Vorkommen von IRS-2-Protein als auch dessen funktionelle Bedeutsamkeit, markiert durch eine basal erhöhte Phosphorylierung von AKT und ERK, konnte in Mausexpressionsarten gezeigt werden. Damit stellt diese Maus ein Modell für eine gesteigerte oder dauerhafte Insulin-/IGF-1-Wirkung dar. Sowohl IRS-1 als auch IRS-2 werden in verschiedenen Geweben vom Insulin- bzw. IGF-1-Rezeptor aktiviert (Copps, K. D. et al., 2012). Beide Proteine sind strukturell ähnlich und haben dieselben Bindungspartner (Hanke, S. et al., 2008). Deshalb können sie den Knockout des jeweils anderen zumindest teilweise kompensieren. Die hier gewählte SM22-Cre-gesteuerte Überexpression vermeidet diese experimentelle Probleme, wobei zu beachten ist, dass dafür unphysiologische Interaktionen mit anderen Proteinen vorkommen können. So wäre denkbar, dass in großer Menge vorliegendes IRS-2 nicht nur mit dem Insulin- und IGF-1-Rezeptor, sondern auch mit anderen (Rezeptor-) Tyrosinkinasen interagiert, wie z.B. dem EGF-Rezeptor oder ABL oder auch andere Interleukinrezeptoren wie die physiologischerweise bindenden IL-4-Rezeptoren (Pernis, A. et al., 1995); (Yin, T. et al., 1994).

Die Verwendung eines Cre-loxP-Systems kann ebenfalls Probleme bereiten, da das Säugetiergenom Pseudo-loxP-sites enthält (Thyagarajan, B. et al., 2000). Deshalb wurde darauf geachtet, dass Kontroll- und Zieltiere aus derselben Zucht stammten und dass die Kontrolltiere die Cre-Rekombinase exprimierten.

4.3. Das Verhalten isolierter IRS-2-überexprimierender VSMC

Bei den *in vitro* - Versuchen führte die Überexpression von IRS-2-Protein in glatten Muskelzellen (VSMC) zu einer verstärkten Proliferation der isolierten VSMC unter Stimulation mit 20 % FCS. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Knockout-Zelllinien (IRS-1-KO/ IRS-2-KO) eine verminderte Proliferation. In den Western Blot Analysen wiesen IRS-2^{OE}-VSMC unter Serumentzug ein stärkeres pAKT- und pERK-Signal auf. Dies konnte allerdings unter Stimulation mit FCS nicht festgestellt werden, was am ehesten an der wohl bereits maximalen Stimulation auch der Kontrollzellen durch FCS liegt. Die IRS-1-KO-Zellen zeigten sowohl ein verstärktes pAKT-Signal als auch ein verstärktes pERK-Signal. Im Gegensatz zu den IRS-2-KO-Zellen die ein abgeschwächtes pAKT- und pERK-Signal zeigten. Die Ergebnisse der Proliferationsversuche liegen innerhalb des Erwartungshorizontes, da Insulin die Proliferation von VSMC *in vitro* anregt (Cruzado, M. et al., 1998); (Pfeifle, B. et al., 1981). Da in IRS-1-KO-VSMC der AKT- und der ERK-Weg verstärkt aktiviert sind, dies jedoch nicht mit vermehrten Proliferationsraten einhergeht, liegt jedoch nahe, dass IRS-Proteine – und damit IRS-2 - seine proliferative Wirkung nicht nur über AKT und ERK vermittelt. Interessanterweise wurde bereits beschrieben, dass IRS-1

und IRS-2 funktionell nicht redundant sind; so konnte eine IRS-2-Überexpression in IRS-1-KO-Zellen zwar die PI3K-Aktivierung normalisieren, jedoch nicht die durch den IRS-1-KO verringerten Proliferationsraten (Brüning, J. C. et al., 1997).

Als weiterer Signaltransduktionsweg kommt möglicherweise die PhospholipaseC γ (PLC γ) in Frage. IRS-2 bindet PLC γ (Hanke, S. et al., 2008). Die Phospholipase C hydrolysiert Phosphoinositolbisphosphat zu Diacylglycerin, das unter anderen die „klassischen“ Vertreter der PKC-Familie aktiviert (Fukami, K. et al., 2010) und Inositoltrisphosphat, das einen Calciumeinstrom und letztendlich die Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Weges bewirkt (Boss, V. et al., 1998); (Rao, A. et al., 1997). Die Phospholipase C und die von ihr angesteuerten Signalwege sind mit Proliferation in VSMC verknüpft (Lymn, J. S. et al., 2000); (House, S. J. et al., 2008). In der Pathogenese der Restenose spielt nicht nur die Proliferation der VSMC eine wichtige Rolle, sondern auch die Migrationsfähigkeit und eine Abschwächung der Apoptoseraten.

Nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe legen jedoch nahe, dass beide Mechanismen für die Erklärung der verminderten Neointimabildung in IRS-2^{OE}-Mäusen wohl keine Bedeutung haben. Ein Screening weiterer Proteine wie GSK-3 β oder PTEN, die in der Regulation des IRS-Signalwegs eine Rolle spielen, ergab keinen eindeutigen Hinweis auf eine mögliche zugrundeliegende Pathophysiologie. Deshalb muss diese Frage weiter offen bleiben.

4.4. *In vivo* Ergebnisse

Die IRS-2^{OE}-Mäuse entwickelten sich unauffällig. Das Körpergewicht unterschied sich nicht von den jeweiligen Kontrollmäusen (CO^{OE}-Mäuse). Das Herz der IRS-2^{OE}-Mäuse stellte sich während der Echokardiographie im Vergleich zu den CO^{OE}-Mäusen vergrößert dar, allerdings war die Funktion soweit ersichtlich nicht eingeschränkt. Die IRS-2^{OE}-Mäuse zeigten keine Glukosetoleranzstörung oder eine Veränderung der Insulinsensitivität im Vergleich zu den CO^{OE}-Mäusen. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell wurde gewählt, um die Auswirkungen einer IRS-2-Überexpression in VSMC auf die Neointimabildung zu eruieren. Potentiell die Neointimabildung beeinflussende Faktoren wie ein veränderter Blutzuckerspiegel sollten nach Möglichkeit vermieden werden; soweit getestet, ist diese Voraussetzung für die weitergehenden Versuche erfüllt.

4.4.1. Die Histologie ausgewählter Organe

Gehirn, Leber, Nieren, Lungen, Skelettmuskel, Pankreas und Milz von IRS-2^{OE}-Mäusen waren in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von den Organen der CO^{OE}-Mäuse nicht zu unterscheiden. Diese Ergebnisse waren zu erwarten, da die Überexpression von IRS-2 sich promoterbedingt auf VSMC sowie auf Kardiomyozyten beschränkte. Auffällig war ein vergrößertes Herz.

4.4.1.1. Kardialer Phänotyp

Der angeschaltete SM22-Promoter und somit die Überexpression von IRS-2 zeigte sich nicht nur in VSMC, sondern auch in kardialen Myozyten (Malhowski, A. J. et al., 2011). So haben IRS-2^{OE}-Mäuse im Gegensatz zu den CO^{OE}-Mäusen ein vergrößertes und schwereres Herz (siehe Abb. 22 und 23). Eine interstitielle Fibrose oder eine Hypertrophie der Kardiomyozyten konnten nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 26 - 29). So führte eine vermehrte IRS-2-Produktion zu einer Hyperplasie der Myozyten. Allerdings kam es bis zu einem Alter von 6 Monaten zu keinen sichtbaren Symptomen. Die sonographische Untersuchung der Herzen (siehe Abb. 24) zeigte abgesehen von verdickten Ventrikelwänden ebenfalls keine Auffälligkeiten. Eine schlechtere Herzfunktion in den IRS-2^{OE}-Mäusen konnte durch die durchgeführten Tests nicht erfasst werden.

Durch den konventionellen Knockout des IR in Kardiomyozyten entwickelte sich ein kleineres und leichteres Herz im Gegensatz zu Wildtypmäusen (Kim, J. et al., 2008). Der doppelte Knockout von IRS-1 und IRS-2 in Kardiomyozyten führte zu einer Reduzierung des ventrikulären Gewichtes. Die Herzen zeigten vermehrt apoptotische Zellen, Fibrose bis hin zum Versagen der physiologischen Herztätigkeit ab einem Alter von 10 Wochen. Auf Proteinebene war AKT vermindert und an beiden Phosphorylierungsstellen Thr308 und Ser473 konnte keine Phosphorylierung festgestellt werden. Desweiteren fand keine Phosphorylierung an FOXO statt und auch p70S6K war vermindert (Guo, S. et al., 2014). Bei der spezifischeren Deletion von IRS-1 in Kardiomyozyten zeigte sich ebenfalls eine Verminderung der Herzgröße (Abel, E. D. et al., 2014). Im Gegensatz dazu führte der IRS-2 Knockout zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten (Abel, E. D. et al., 2014). Hyperplasie und Hypertrophie führen beide zu schwererem Ventrikelmyokard und können prinzipiell durch dieselben molekularen Mechanismen vermittelt werden, stellen jedoch zwei unterschiedliche Entitäten dar: Die Hyperplasie gründet in einer vermehrten Proliferation von Zellen, die Hypertrophie nicht.

Zunächst kommt deshalb ein unterschiedlicher Zeitpunkt der Cre-Expression und damit der Rekombination als Erklärung in Frage: Sollte der α -MHC-Promoter erst nach der Geburt

angeschaltet werden, dann könnten die Kardiomyozyten nicht mehr proliferieren und eine Hypertrophie wäre Folge eines verstärkten Signals. Die α -MHC-Promoter-gesteuerte lacZ-Expression trat praktisch erst nach der Geburt der Mäuse auf (Palermo, J. et al., 1996), ein Befund, der diese Hypothese stützen würde. Trotzdem erscheint diese Erklärung nicht unbedingt überzeugend, da erstens Berichte existieren, die eine α -MHC-Expression bereits im Embryonalstadium der Maus gezeigt haben (Zammit, P. S. et al., 2000); (Maltsev, V. A. et al., 1994) und da zweitens nicht erklärt ist, warum es in IRS-2^{OE}-Herzen post natum nicht zu einer Hypertrophie kommt. Plausibler erscheint die Annahme, dass es sich auch molekular um zwei distinkte Mechanismen handelt: Das IRS-2-Signal im einen, einen noch unbekanntem Kompensationsmechanismus im anderen Fall.

Interessant ist dabei, dass sowohl beim KO als auch bei der Überexpression kein Hinweis auf eine vermehrte Fibrose des Herzmuskels beschrieben wurde. IRS-2 scheint in Bezug darauf keine Rolle zu spielen. Eine Expression einer konstitutiv-aktiven AKT-1-Variante führte zu einer Hypertrophie und einer verbesserten Kontraktilität (Condorelli, G. et al., 2002). Eine konstitutive ERK-Aktivierung, bedingt durch eine MEK1-Überexpression, hatte eine Herzhypertrophie, jedoch keine Zeichen eines maladaptiven Remodelings zur Folge (Bueno, O. F. et al., 2000). In beiden Modellen wurde keine relevante Myokardfibrose beschrieben. Dementsprechend könnten AKT und ERK die oben beschriebenen Effekte vermitteln; die im Gegensatz zum KO für die IRS-2-Überexpression postulierte Hyperplasie ist damit noch nicht erklärt. Welche weiteren Signaltransduktionswege beteiligt sind, lässt sich beim derzeitigen Kenntnisstand nicht sagen.

4.4.2. Der Aufbau von Aorta und Carotiden in IRS-2^{OE}-Mäusen

Obwohl in den glatten Muskelzellen der Arterien die Überexpression von IRS-2 zu einem konstitutiv aktiven AKT- und ERK-Signal führte, war, wie erwähnt, deren Aufbau – im Gegensatz zum Herzen – nicht verändert. Die gezielte Inaktivierung von PTEN in VSMC (Nemenoff, R. A. et al., 2008) führte zu einem erhöhten pAKT-Signal und sogar zu einem spontanen arteriellen Remodeling. Berücksichtigt man, dass im hier untersuchten Modell *in vivo* das pAKT-Signal in der Aorta selbst unter maximaler Insulinstimulation nicht weiter gesteigert werden konnte, und dass das ebenfalls als proliferationsfördernd geltende pERK-Signal auch verstärkt ist (Fahrenholz, M. et al., 2009), überrascht die unveränderte Gefäßarchitektur. Durch den KO des Tumorsuppressorgens PTEN kommt es nicht mehr zur Dephosphorylierung von PI_{3,4,5}P zu PI_{4,5}P und somit wird vermehrt PDK-1 aktiviert, die AKT am Thr308 phosphoryliert. Interessanterweise messen die Autoren Nemenoff et al. die AKT-Aktivierung an der Phosphorylierung von Ser473 – auch diese ist in PTEN-KO-VSMC verstärkt. Es wird berichtet, dass Ser473 sowohl durch die PI3K selbst nach

Insulinstimulation (Tsuchiya, A. et al., 2013) bzw. durch mTORC2 phosphoryliert werden kann (Koide, H. et al., 2011), jedoch nicht durch PDK-1. pSer473 potenziert die durch pThr308 bewirkte Aktivierung von AKT (Frödin, M. et al., 2002). Da im vorliegenden Modell der IRS-2-Überexpression ebenfalls eine verstärkte AKT-Phosphorylierung am Ser473 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen wurde, liegt der Analogieschluss nahe, dass ebenfalls ein spontanes arterielles Remodeling in IRS-2^{OE}-Mäusen vorliegen sollte. Dies konnte nicht gezeigt werden. Da die Aktivierung von ERK – die in IRS-2^{OE}-VSMC und in Aorten von IRS-2^{OE}-Mäusen wie hier beschrieben vorliegt – (Graf, K. et al., 1997); (George, J. et al., 2004) als auch die Aktivierung von PLC γ sind mit verstärkter Neointimabildung oder zumindest mit vermehrter Proliferation von VSMC *in vitro* in Verbindung gebracht worden (House, S. J. et al., 2008); (Lymn, J. S. et al., 2000). Damit ergibt sich aus diesen Befunden ein erster Anhaltspunkt, dass die Auswirkung des IRS-2-Signals nicht durch die bekannten, von IRS-2 abhängigen Signalwege erklärt werden kann.

Die verfügbare Literatur bietet einige Publikationen, die die verstärkte Neointimabildung erst nach Manipulation als wahrscheinlich erscheinen lassen: Einige beschreiben eine vermehrte Neointimabildung in Arterien nach Ballondilatation oder ähnlicher Manipulation des Gefäßes, wenn man den IGF-1- bzw. den Insulin-Rezeptorsignalweg aktiviert (Pu, Q. et al., 2009); (Zhuang, D. et al., 2008); (Puzik, A. et al., 2012). Insulin selbst verstärkt die Proliferation der VSMC *in vitro* (Cruzado, M. et al., 1998); (Pfeifle, B. et al., 1981). Aber auch Erythropoetin, dessen Signalwege ebenfalls die IRS-Proteine aktivieren (Verdier, F. et al., 1997), führt zu einer verbreiterten Neointimabildung nach dilatationsinduziertem Endothelschaden (Reddy, M. K. et al., 2007); (Janmaat, M. L. et al., 2010). Letztendlich münden alle Wege in einer Aktivierung von mTOR (Oudit, G. Y. et al., 2004), welche zu einer Steigerung der Proteinsynthese, Hypertrophie sowie Proliferation führt und somit nehmen IRS-Proteine mitunter eine Schlüsselposition in der Neointimabildung ein. Durch die Hemmung von mTOR (Moses, J. W. et al., 2003) durch Rapamycin werden derzeit die besten klinischen Ergebnisse bei der Vermeidung von Restenosen erzielt (Sousa, J. E. et al., 2001).

4.4.3. Die Auswirkungen einer Arteridilatation in IRS-2^{OE}-Mäusen

Ausgehend von den obigen Überlegungen und dem in der Literatur beschriebenen zeitlichen Verlauf der Neointimabildung (Daniel, J. M. et al., 2010) wurde zunächst eine Beobachtungszeit von 14 Tagen nach Gefäßmanipulation festgelegt. Bei längerer Beobachtung wäre unter Umständen ein vollständiger Verschluss auch in den Kontrolltieren zu erwarten gewesen. Damit wäre eine verstärkte Neointimabildung in den Zieltieren nicht erfasst worden. Anfänglich wurde mit einem Ballonkatheter die ACC dilatiert um eine im

Wesentlichen durch Druck erzeugte Läsion zu erzielen; ein Vorgehen, das dem klinischen Prozedere möglichst nahe ist.

Bei den Versuchen *in vivo* konnte bei allen operierten IRS-2^{OE}-Mäusen keine Neointimabildung nach 14 Tagen trotz Erstellung serieller Schnitte festgestellt werden. Die operierte Arteria carotis communis ließ sich zwar deutlich dilatiert darstellen im Gegensatz zur Kontrollseite. Sie zeigte zudem eine Reaktion in Form von outward remodeling auf die Operationstechnik – vergleichend mit dem outward remodeling einer sham-OP –, allerdings zeigte sie keine Bildung von Neointima. Dagegen zeigten die CO^{OE}-Mäuse neben der Dilatation die Bildung einer schwach ausgeprägten Neointima, wie es laut Literatur zu erwarten war (Matter, C. et al., 2006). Um diesen Befund zu sichern wurde eine zweite Serie Tiere operiert. Die ACC wurde mit einem Führungsdraht, der eine stärkere Verletzung der Intima durch Reibung hervorruft als ein Ballonkatheter (Auskunft Olli Leppänen, Kuopio-Finnland) dilatiert. Die Carotiden wurden 28 Tage nach Verletzung entnommen. Wiederum fand sich keine relevante Neointimabildung in IRS-2^{OE}-Mäusen, während CO^{OE}-Mäuse deutlich Neointima aufwiesen.

Dieses Ergebnis widerspricht der anfänglichen, durch die verfügbare Literatur gestützten Annahme, das IRS-2-Signal führe zu mehr Neointima. Es legt eher eine protektive Funktion von IRS-2-Protein hinsichtlich der Restenosebildung der Maus *in vivo* nahe.

Unter den Bedingungen einer Insulinresistenz wird in der verfügbaren Literatur sowohl in Tierversuchen als auch in Beobachtungen an Menschen durchgehend von einer vermehrten Neointimabildung berichtet (Park, S. H. et al., 2001); (Kornowski, R. et al., 1997). Versuchsanordnungen, in denen entweder Insulin bzw. IGF-1 verabreicht wurde oder die mit genetischen Veränderungen arbeiteten, kommen zu einander auf den ersten Blick widersprechenden Ergebnissen: Sowohl eine Steigerung der Neointimabildung als auch ihre Abschwächung werden berichtet (Niu, X. L. et al., 2007); (Resch, Z. T. et al., 2006); (Zhu, B. et al., 2001); (Cittadini, A. et al., 2009); (Pu, Q et al., 2008); (Zhuang, D. et al., 2008); (Foster, E. et al., 2006); (Jonas, M. et al., 2005); (Desouza, C. V. et al., 2006); (Shelton, J. et al., 2003); (Park, S. H. et al., 2001). Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von Projekten mit sehr ähnlichem Design könnte ein Hinweis darauf sein, das Insulin-/IGF1-Signal nicht ein Risikofaktor, sondern nur ein Risikoindikator ist. Einen Hinweis darauf gibt der Artikel von Kubota und Mitarbeitern. Die Neointimabildung war einerseits in IRS-1-KO-Mäusen, aber noch stärker in IRS-2-KO-Mäusen augmentiert. Alle getesteten Risikofaktoren, nämlich Blutdruck, Nüchternblutglukosespiegel, Nüchterninsulinspiegel und Blutfette waren in IRS-2-KO-Mäusen stärker als in IRS-1-KO-Mäusen, jedoch im Vergleich zu den Wildtypkontrollen in beiden erhöht, wobei – wie in der vorliegenden Arbeit – nur männliche Versuchstiere hinsichtlich der Neointimabildung untersucht wurden. Nicht beschrieben wurden in dieser Arbeit Leptin- und Adiponectinspiegel. Der Leptinspiegel ist typischerweise

in insulinresistenten Individuen erhöht (Lana, A1 et al., 2014); (Trovati, M. et al., 2014), die in Adipösen beschriebene Leptinresistenz ist nur für das ZNS eindeutig gesichert (Benomar, Y. et al., 2005). Umgekehrt gibt es ein einziges Modell des Metabolischen Syndroms, das eine Insulinresistenz mit beinhaltet, in dem eine verminderte Neointimabildung beschrieben wurde: Die db/db-Maus, welche homozygot eine Spontanmutation des Leptinrezeptorgens trägt – und damit keine funktionellen Leptinrezeptoren bilden kann (Stephenson, K. et al., 2003). Der Leptinrezeptor in seinen diversen Unterformen gehört zu den Cytokinrezeptoren. Er aktiviert unter anderem die Tyrosinkinase JAK-2, welche einerseits IRS-2 und andererseits STAT-3 phosphoryliert (Szanto, I. et al., 2000). Der JAK-STAT-Signalweg wurde mit Neointimabildung in Verbindung gebracht; seine Unterbrechung verhinderte diese (Seki, Y. et al., 2000). Die Bedeutung von STAT-3 ist nicht explizit untersucht worden. Unterstellt man, dass eine STAT-3-Aktivierung einen notwendigen Schritt in der Neointimaformation darstellt, dann könnte ein Exzess an IRS-2, wie er durch eine Überexpression mit einem sehr starken Promoter wie in der vorliegenden Arbeit erzeugt wird, STAT-3 aus der Interaktion mit JAK-2 verdrängen. Damit wäre ein Teil des für die Neointimabildung notwendigen Signalkomplexes ausgeschaltet. In insulinresistenten Individuen liegt vermehrt Leptin vor, und die Leptinresistenz ist für periphere Gewebe nicht gezeigt worden. Ferner moduliert das Leptin- das Insulinsignal (Cohen, B1 et al., 1996); (Kellerer, M1 et al., 1997). Deshalb erscheint es als möglich, dass das Leptinsignal, welches in den Veröffentlichungen zur Neointimabildung unter Insulinresistenz, Insulin- oder IGF-1-Einwirkung nicht untersucht wurde, die eigentliche treibende Kraft hinter der unter den Bedingungen einer Insulinresistenz vermehrten Neointimabildung ist.

Die Assoziation von kardiovaskulären Erkrankungen und erniedrigten Adiponectinspiegeln in Patienten mit einem Diabetes mellitus ist kürzlich in einer Metaanalyse etabliert worden (Wu, Z1 et al., 2013). Adiponectin wird von Fettzellen sezerniert und verbessert die Insulinsensivität. Die 2 Adiponectinrezeptoren bilden wohl eine eigene Rezeptorklasse (Kadowaki, T1 et al., 2005), da sie zwar wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 7 Transmembrandomänen besitzen, sich jedoch anders als diese mit dem N-Terminus nach Intrazellulär orientieren. Adiponectinrezeptoren aktivieren unter anderem die AMPK, und Adiponectin kann in VSMC das mTORC-1-Signal unterdrücken (Ding, M. et al., 2011), eine physiologische Abmilderung der Neointimabildung durch Adiponectin bzw. eine vermehrte Neointimabildung bei Fehlen dieser Hemmung sind zumindest denkbar.

Von den zitierten Arbeiten, die sich nicht in erster Linie mit den Auswirkungen einer Insulinresistenz auf das Gefäßsystem befassen, haben nur drei diese experimentell dokumentiert: In der Arbeit von Chiang (Chiang, S. et al., 2013), die sich mit einer lokalen Insulinapplikation um eine dilatierte Arterie befasst, ist diese protektiv, während keine Veränderungen der systemischen Insulin- und Glukosespiegel dokumentiert werden

konnten. In der Arbeit von Foster (Foster, E. et al., 2006) wirkte sich eine systemische Hyperinsulinämie bei gleichbleibenden Glukosespiegeln, die einem erhöhten HOMA-Index und damit einer Insulinresistenz zuzuordnen sind, neointimafördernd aus. Dem scheint die Arbeit von Niu (Niu, X. L. et al., 2007) zu widersprechen. In ihr wurde ein Knockout von leukocyte antigen-related (LAR) protein, einem Inhibitor des Insulin- bzw. IGF-1-Rezeptors, untersucht. Hier wurde eine verbesserte Insulin- und IGF-1-Sensitivität in LAR-KO-Tieren dokumentiert. Diese aber bildeten mehr Neointima aus als die Wildtypiere. Der Leptinsignalweg, im Besonderen STAT-3, wurden nicht untersucht. Es ist nicht auszuschließen, dass LAR auch den Leptinrezeptor inhibiert, womit in den LAR-KO-Tieren auch ein verstärktes Leptinsignal vorliegen würde. Diese Überlegungen harren jedoch einer umfassenden experimentellen Klärung, die den Rahmen dieser Untersuchung sprengen würde.

4.5. Die Diskrepanz zwischen den *in vivo* und den *in vitro* Befunden – mögliche Erklärungen

IRS-2 aktiviert den PI3-Kinase-Weg und fördert damit die Proliferation der isolierten glatten Gefäßmuskelzellen. Der PI3-Kinase-Weg (und der MAPK-Signalweg) reguliert ebenso die Migration und wirkt antiapoptotisch, so dass die Ergebnisse der *in vitro* Versuche an isolierten VSMC die Befunde *in vivo* nicht erklären.

Vantler et al. (Vantler, M. et al., 2005) zeigten, dass PI3Kalpha in VSMC die Proliferation, die Migration sowie das Zellüberleben fördert. Ausschlaggebend für die Neointimabildung ist unter anderem die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Neointima der Arterienwand. Huang et al. (Huang, J. et al., 2002) konnten zeigen, dass eine Überexpression von PTEN die Migration von VSMC inhibiert. PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom 10*) ist eine PI-3-Phosphatase, die die fettlöslichen Produkte der PI-3-Kinase hydrolysiert und somit abbaut. Hier ist der komplette PI-3-Kinase-Weg durch die Überexpression von PTEN gehemmt. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass es bei einer Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges in verschiedenen Zelltypen zu einer Hemmung der Apoptose kommt (Khwaja, A. et al., 1997); (Kennedy, S. G. et al., 1997); (Datta, K. et al., 1996); (Kulik, G. et al., 1997). Nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe legen jedoch nahe, dass beide Mechanismen für die Erklärung der verminderten Neointimabildung in IRS-2^{OE}-Mäusen wohl keine Bedeutung haben.

Die in der Literatur zu findenden Ergebnisse bzgl. Migration sind nicht eindeutig: Einerseits wird eine Verstärkung der Migration durch hohe Insulinkonzentrationen beschrieben, andererseits soll eine Insulinresistenz oder ein Ausfall des Insulinsignals die Migration von VSMC ebenfalls fördern (Lightell, D. J. Jr. et al., 2010); (Cersosimo, E. et al., 2014); (Abhijit,

S. et al., 2013); Yang, M. et al., 2005). IGF-1 seinerseits induziert Migration in VSMC (Meng, D. et al., 2008); (Radhakrishnan, Y. et al., 2008). Die einzige Arbeit, die IRS-2 im Zusammenhang mit der Migration von VSMC überhaupt untersucht hat, beschreibt keinen Zusammenhang von IRS-2 und IGF-1-induzierter Migration (Duan, C. et al., 2000). Eine Untersuchung der Wirkung von IRS-Proteinen auf die Migration von VSMC ist nicht veröffentlicht. Allerdings wurden sowohl IRS-1 als auch IRS-2 mit der Verstärkung der Migration von Karzinomzellen in Verbindung gebracht (White, S. R. et al., 2009); (de Blaquièrre, G. E. et al., 2009); (Ibrahim, Y. H. et al., 2008); (Jackson, J. G. et al., 2001); (Zhang, X. et al., 2005). Unveröffentlichte Daten von Andreas Markl zeigen, dass unter allen von ihm getesteten Bedingungen IRS-2^{OE}-VSMC eine Migrationsrate aufwiesen, die mindestens der der CO^{OE}-VSMC entsprach oder höher lag. Damit erscheint eine verminderte Migration von VSMC in IRS-2^{OE}-Mäusen als Erklärung für die geringere Neointimabildung als wenig wahrscheinlich.

Die IRS-2^{OE}-Maus zeigt keine mit den gewählten Methoden fassbaren metabolischen Veränderungen, allerdings können auch hier unspezifische Effekte durch die Überexpression des Proteins auftreten. Proteine haben in Zellen meist eine besondere Lokalisation, die über die räumliche Nähe zu möglichen Interaktionspartnern die biologische Funktion mitbestimmt (subzelluläre Kompartimentierung). Die starke Überexpression könnte die Verteilung von IRS-2 über die physiologischen subzellulären Räume hinaus ausdehnen und somit artifiziell bedingte Interaktionen mit sonst nicht involvierten Bindungspartnern erzeugen (Kriauciunas, K. M. et al., 2000). Des Weiteren provozieren starke Signale Kompensationsmechanismen, die nicht erfasst werden. Hier wäre in erster Linie an die Expression von Phosphatasen wie PTP1b und SHP-2 zu denken, die das Insulin-/IGF-1-Signal unterdrücken können (Hayashi, K. et al., 2004); (Goldstein, B. J. et al., 1998). Ein Cre-bedingter Phänotyp erklärt die durch IRS-2 Überexpression verminderte Neointimabildung nicht, da nach 28 Tagen die Kontrollmäuse (CO^{OE}-Mäuse), die Cre exprimieren, Neointima entwickelten.

Nicht nur *in vivo* können unspezifische Effekte auftreten. Auch isolierte VSMC können sich *in vitro* verändern, da in der Regel isolierte VSMC aus Mäusen mehrere Passagen benötigen, um eine genügende Zellanzahl für Versuche zu erreichen. *In vitro* stellen sich die Bedingungen für Wachstum und Proliferation anders dar als *in vivo*. Der Glukosespiegel im Nährmedium ist mit 4 g/l hoch gegenüber den *in vivo* als gesund angesehenen 1 g/l (100 mg/dl). FCS ist ein Mix aus nicht definierten, von Kälbern stammenden Faktoren. Lokal gebildete Wachstumsfaktoren – im Falle von Neointima u.a. PDGF – oder Entzündungsmediatoren werden nicht zusätzlich dem Nährmedium beigefügt. Auch fehlen mechanische Reize wie der durch den Blutfluss hervorgerufene Scherstress oder die Dehnung des Pulses. Ebenso fehlt die Interaktion mit anderen Zelltypen (Makrophagen, Fibroblasten) wie es *in vivo* der Fall wäre (Tomasek, J. J. et al., 2002).

Die Interaktion der verschiedenen Zellen in einem Organismus, die *in vitro* durch die Monokultur nicht gegeben ist, nimmt in diesem Fall eine Schlüsselrolle ein. Im Zusammenhang mit der Neointimabildung ist hierbei sehr wenig bekannt. Neben den VSMC existieren im Organismus weitere Zellen, unter anderem Blutzellen, zu denen die Monozyten gehören, die durch die Inflammation bestimmte Chemokine freisetzen, die wiederum mit den VSMC interagieren (Li, X. D. et al., 2012). Es gibt Publikationen, die eine besondere Rolle den Monozyten zusprechen, weil ihre Auswanderung aus der Zirkulation durch die Endothelschicht in die Intima als erster Schritt zur Bildung von Schaumzellen notwendig ist und damit den Boden für einen atherosklerotischen Plaque bereitet (Glass, C. K. et al., 2001); (Hansson, G. K. et al., 2006). Inwieweit dies auch für die Neointimabildung in Frage kommt, ist nicht bekannt. In Tiermodellen ist es dabei gelungen zu zeigen, dass Chemokine wie GRO- (MCP-1) bzw. ihre Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten entscheidend an der Gefäßinfiltration beteiligt sind (Boring, L. et al., 1998); (Boisvert, W. A. et al., 1998); (Lu, B. et al., 1998) und ihre Blockierung atherosklerotische Läsionen vermindern kann.

Des Weiteren kommt es nach der Ballondilatation zu einer Inflammation im geschädigten Gewebe und zur Ausschüttung unter anderem von MCP-1 und/oder CXCL12, die Progenitorzellen im Normalfall rekrutieren können (Subramanian, P. et al., 2010). Nachweislich konnten erhöhte Werte von Chemokinen in den arteriellen Zellen während des Remodelings gemessen werden. Die Hemmung der Entzündungsreaktion kann die Neointimabildung unterdrücken. Dies führt zur Rekrutierung von Leukozyten an die Endotheldenudation (Raines, E. W. et al., 2005). Ebenfalls entscheidend für die Inflammation ist die Akkumulation von Leukozytenarten an den Ort einer Entzündung oder Verletzung. Dafür sind die Prozesse der Adhäsion an das Endothel und der nachfolgende Schritt der Transmigration unabdingbar. Viele unterschiedliche Signalmoleküle sind an diesem mehrstufigen Vorgang der Zelladhäsionskaskade beteiligt. Die Überproduktion von IRS-2-Protein könnte Einfluss auf die Wirkungsweise der Chemokine haben, und es könnte zur Hemmung der Rekrutierung von Progenitorzellen kommen. Eine entzündungshemmende Wirkung von Insulin ist im Rahmen von Myokardinfarkten gezeigt worden (Chaudhuri, A. et al., 2004).

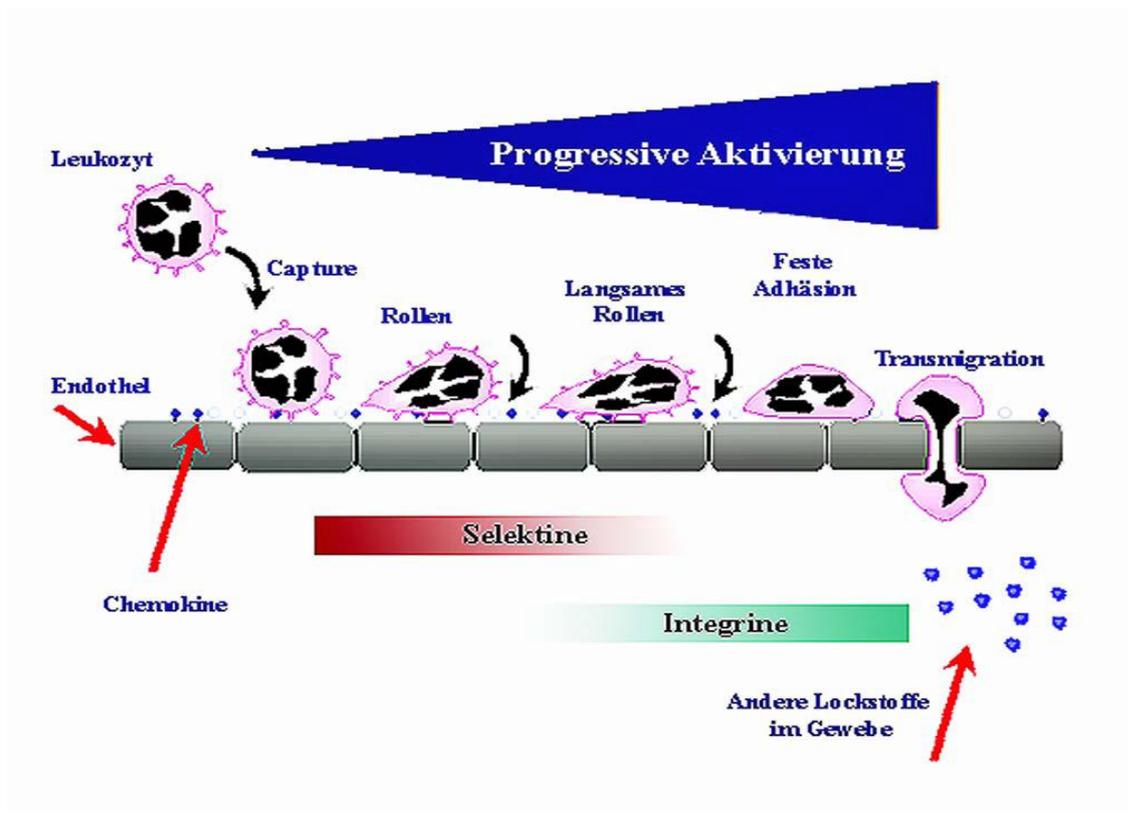


Abb. 49: Die Zelladhäsionskaskade

(modifiziert nach K. Ley in A Web-Based Research Tool for Functional Genomics of the Microcirculation: The Leukocyte Adhesion Cascade Microcirculation 1999)

4.6. Die mögliche klinische Relevanz

In dieser Arbeit war eine Verstärkung des Insulinsignals in VSMC durch die Überexpression von IRS-2 mit einer Unterdrückung der Neointimaformation nach Dilatation der ACC in der Maus verknüpft. Patienten mit einer Insulinresistenz entwickeln mit überdurchschnittlicher Häufigkeit eine Restenose nach Ballondilatation (Piatti, P. M. et al., 2013) und zeigen auch ohne weiteren Auslöser ein Remodeling der Arterien (Rizzoni, D. et al., 2001). Typ-2-Diabetiker haben ein erhöhtes Risiko, eine Restenose nach einer Ballondilatation bzw. einer Stentimplantation zu entwickeln (Kornowski, R. et al., 1997); (Kip, K. E. et al., 1996); (Asakura, Y. et al., 1998). Die dahinterstehenden Mechanismen sind nicht klar; zumindest ein Teil des Phänomens ist wohl durch das in Diabetikern in der Regel stärker ausgeprägte kardiovaskuläre Risikoprofil, zu dem Dyslipidämie und eine arterielle Hypertonie gehören, zu erklären. Ob es darüber hinaus Faktoren gibt, wird derzeit diskutiert; ein Ergebnis ist nicht abzusehen.

Metformin, das eine Insulinresistenz verbessert, ist ein bewährtes Antidiabetikum bei einem nicht insulinpflichtigen Diabetes. Metformin und Thiazolidinedione, die beide eine Insulinresistenz bessern, vermindern klinisch die Restenoseraten nach

Koronarinterventionen. Metformin verringert die Neointimabildung in insulinresistenten Ratten (Lu, J. et al., 2013). Metformin vermindert die bei Typ-2-Diabetikern auftretende Wandverdickung der Arteria carotis communis (ACC) (Matsumoto, K. et al., 2003). Die BARI 2D investigators zeigten die protektive Wirkung von Metformin in Bezug auf kardiovaskuläre Risikofaktoren (Sobel, B. E. et al., 2011). Machado und Mitarbeiter demonstrieren die positiven Effekte von Metformin auf die ACC (Machado, H. A. et al., 2012) im Vergleich zu Glimperid. Beide Therapieformen erzielten eine Absenkung des Blutzuckerspiegels und weitere Verbesserungen des kardiovaskulären Risikoprofils in ähnlichem Ausmaß.

Auch die United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) zeigt eine Senkung des kardiovaskulären Risikos durch Metformin (UKPDS – United Kingdom Prospective Diabetes Study 2008). Ein Risikofaktor, der unter Metformintherapie verringert wurde, war das remnant lipoprotein cholesterol. Alle anderen getesteten Risikofaktoren zeigten keine Verbesserung (Abbasi, F. et al., 2004). Die Arbeit von Matsumoto et al. beschreibt eine direkte Wirkung von Metformin auf die Arterien von OLETF-Ratten (Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats), einem Modell für Typ-2-Diabetes (Matsumoto, T. et al., 2008), *ex vivo*. Unter akuter Stimulation mit Metformin waren die Unterschiede, die Arterien von OLETF-Ratten im Vergleich zu denen von nicht-diabetischen Kontrollratten in Kontraktionsstudien aufwiesen, normalisiert. Die Gruppe schreibt die von ihr gefundenen Metforminwirkungen auf Arterien dem Endothel zu, führte aber alle Experimente mit Proben aus, die auch die Media der Arterien und damit VSMC enthielten.

Die protektive Wirkung von Metformin kann der Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) zugeschrieben werden. Allerdings senken auch chirurgische Eingriffe, die eine verminderte Nahrungsaufnahme und damit Körpergewichtsreduktion zum Ziel haben („bariatric surgery“), das kardiovaskuläre Risiko der so behandelten insulinresistenten Patienten (Ruderman, N. B. et al., 2013). Bariatric surgery verbessert eine Insulinresistenz (Castagneto, M. et al., 2012).

Nicht nur metabolische Veränderungen führen zu einer Verstärkung des Restenose-Risikos. Auch auf Molekularebene führt eine Hemmung des m-TOR-Pathways als Teil des PI3-Kinaseweges zu einer Verminderung der Restenoserate. Durch die Hemmung von m-TOR kann es nicht mehr zu einer Phosphorylierung der p70S6 Kinase kommen, dessen Aktivierung proliferative Wirkung zeigt. Ebenso trägt eine erhöhte Apoptose in medialen Zellen, z.B. nach Gefäßverletzung, zur Bildung einer inflammatorischen und proliferatorischen Gefäßreaktion bei. Eine erhöhte Apoptoserate in glatten Muskelzellen nach Gefäßverletzung wurde bereits nachgewiesen (Sata, M. et al., 2000); (Zernecke, A. et al., 2005). Die Aktivierung des mTORC1-Komplexes ist nicht nur an der Regulation von proliferativen Prozessen beteiligt, sie steuert auch die Apoptose von vaskulären Zellen. Eine Hemmung des mTORC1-Signaltransduktionsweges durch Rapamycin reduziert signifikant die

Apoptoseaktivierung in glatten Muskelzellen (Zohlnhöfer, D. et al., 2004). Außerdem zeigen kürzlich veröffentlichte Daten aus einem Mausmodell, dass die Blockierung des mTORC1-Signalweges durch ein anderes Rapamycin-Analog, Everolimus, nicht nur in einer Verminderung der intimalen Hyperplasie resultiert, sondern auch signifikant die Apoptose von intimalen Zellen verhindert (Nührenberg, T. G. et al., 2007).

Da mTORC-1 vom Insulin-/IGF-1-Signal und abhängig von AKT und ERK aktiviert wird, die beide wie gezeigt in IRS-2-überexprimierenden VSMC vermehrt aktiv sind, kann angenommen werden, dass zumindest dieser Teil des Insulin-/IGF-1-Signals eine neointimaverstärkende Wirkung hat. Das IRS-2-Signal jedoch reguliert nicht nur mTORC1, sondern eine Vielzahl an Signalwegen. Da das IRS-2-Signal insgesamt offensichtlich eine protektive Wirkung gegenüber einer Neointimabildung aufweist, jedoch die Hemmung von mTORC1 diese ebenfalls vermindert, erscheint mTORC1 als lediglich ein Zweig des Insulin-/IGF-1-Signals. Neben dem gut untersuchten und die Neointimabildung fördernden mTORC1-Signal muss der IRS-2-Weg also über weitere, unter Umständen noch nicht bekannte Verzweigungen verfügen, die die Neointimabildung unterdrücken können.

Die zitierten Veröffentlichungen legen, zusammen mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, den Schluss nahe, dass die Insulinresistenz per se das grundlegende Problem darstellt, das betroffene Patienten das Risiko, an Herz-Kreislauferkrankungen zu leiden und zu sterben, erhöht. Damit wäre die Insulinresistenz nicht mehr als ein reines Stoffwechselphänomen anzusehen, sondern als eine Störung, welche in die Regulation grundlegender zellulärer (wie z.B. der Proliferation) oder zelltypspezifischer Funktionen eingreift. *In vitro* wurde an isolierten VSMC gezeigt, dass Insulin sowohl den Phänotyp (gemessen an smooth muscle cell actin Expression) als auch die Migration beeinflusst (Wang, C. C. et al., 2003). Dieses Konzept gibt es bereits in anderem Zusammenhang, nämlich bei der Assoziation von Insulinresistenz und Erkrankungen des Zentralen Nervensystems wie der Alzheimer'schen Erkrankung (Zemva, J. et al., 2011); (Talbot, K. et al., 2012). Insulin fördert die Phosphorylierung des Tau-Proteins (Freude, S. et al., 2005) während IGF-1 den Amyloid- β -Stoffwechsel mitreguliert (Cohen, E. et al., 2009). – Befunde, die die Bedeutung der Insulin-/IGF-1-Signale jenseits der Stoffwechselkontrolle unterstreichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen vor allem in Zusammenschau mit den Befunden, die Kubota et al. (Kubota, T. et al., 2003) erhoben haben, eine protektive Rolle von IRS-2-Protein im Rahmen der Neointimabildung in glatten Gefäßmuskelzellen. Der Mechanismus muss derzeit offen bleiben. Er lässt sich in der Zellkultur unter Standardbedingungen nicht erfassen, sondern besteht wohl in einem Zusammenspiel verschiedener Zelltypen. Da unterschiedliche Veröffentlichungen unter der Verwendung von verschiedenen experimentellen Protokollen teils eine neointimafördernde, teils eine neointimahemmende Wirkung (Sedding, D. G. et al., 2009) des Insulin-/IGF-1-Signaltransduktionsweges beschreiben, ist ein komplexes Geschehen anzunehmen. Die Arbeit soll einen Beitrag zu dessen Aufklärung dadurch leisten, dass die Bedeutung des Insulin-/IGF-1-Signalweges in glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden konnte.

5. Zusammenfassung

Die Restenose ist eine der häufigsten Komplikationen nach einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTA). Vor allem Diabetes mellitus Patienten leiden an einem erhöhten Risiko an einer Restenose zu erkranken. Dabei ist nicht klar, inwieweit ein zumindest intermittierend auftretendes verstärktes Insulin-/IGF-1-Signal pathophysiologisch bedeutsam ist. Da IRS-Proteine sowohl den PI3K-Weg als auch den MAPK-Weg aktivieren und beide Wege in eine Aktivierung von mTOR münden, stellen IRS-Proteine möglicherweise eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Restenosebildung dar. Deswegen wurde eine Maus generiert, die in glatten Gefäßmuskelzellen eine Überexpression von IRS-2-Protein zeigte, indem eine Maus mit einem IRS-2-Transgen und einer vorangehenden loxP-flankierten Stopkassette und eine Maus, die die Cre-Rekombinase unter dem SM22-Promoter exprimiert, gekreuzt wurden. Eine basal verstärkte Insulin-/IGF-1-Signaltransduktion konnte sowohl in Aorten als auch in isolierten glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden.

Phänotypisch entwickelten sich die IRS-2-überexprimierenden Mäuse bis auf eine Vergrößerung des Herzens, die durch die dort promoterbedingt ebenfalls auftretende IRS-2-Überexpression erklärt werden kann, wie die Kontrolltiere. Insbesondere der histologische Aufbau der Arterien und die Glukose- bzw. Insulintoleranztests zeigten keine Auffälligkeiten. Durch eine Ballondilatation wurde ein arterielles Remodeling in der Arteria carotis communis induziert. Die Stärke der Neointimabildung wurde durch serielle histologische Schnitte ausgewertet und konnte in den CO^{OE}-Mäusen deutlich dargestellt werden. Die IRS-2^{OE}-Mäuse zeigten allerdings keine Neointimabildung trotz sichtbarer Dilatation des Gefäßes. *In vitro* proliferierten IRS-2-überexprimierende isolierte glatte Gefäßmuskelzellen schneller als die entsprechenden Kontrollzellen, sowohl IRS-1-Knock-out- als auch IRS-2-Knock-out-Zellen, diese jedoch langsamer. Da laut verfügbarer Literatur Proliferation, Migration und Zellüberleben durch den PI3-Kinase Signalweg gleichsinnig reguliert werden, muss angenommen werden, dass die Zellkultur die Situation *in vivo* nur sehr eingeschränkt darstellen kann.

Die Überexpression von IRS-2-Protein in glatten Gefäßmuskelzellen schützt vor der Bildung einer Neointima. Der Mechanismus ist am ehesten im Zusammenspiel verschiedener Zelltypen zu sehen, wie z.B. der in diesem Rahmen vorkommenden Entzündungsreaktion, und bedarf weiterer Klärung anhand neuer experimenteller Modelle.

6. SUMMARY

Restenosis is a major complication after percutaneous transluminal angioplasty (PTA). Diabetes mellitus patients in particular have an increased risk of developing restenosis. It is not clear how a least intermittently reinforced Insulin-/IGF-1-signaling is pathophysiologically significant. Since IRS proteins activate both the PI3K pathway and the MAPK pathway and both ways result in the activation of mTOR, IRS proteins potentially represent a key role in the pathogenesis of restenosis formation. Therefore a mouse with a vascular smooth muscle cell-specific overexpression of IRS-2 was created by crossing a mouse with an IRS-2 transgene and a preceding loxP flanked stop cassette with a mouse that expresses the Cre recombinase under the SM22 promoter. An increased basal Insulin-/IGF-1-signal was shown in aortic and isolated vascular smooth muscle cells.

Phenotypically the IRS-2-overexpressing mice developed similar to the control animals, except for an enlargement of the heart, which can be explained by the promoter that is reportedly active in smooth muscle cells and cardiomyocytes. In particular, the histological structure of the arteries and the glucose and insulin tolerance tests showed no abnormalities. An arterial remodeling in the common carotid artery was induced by balloon dilatation. The thickness of neointima formation was evaluated by serial histological sections and could be clearly shown in the CO^{OE} mice. The IRS-2^{OE} mice showed, however, no neointima despite visible dilatation of the vessel. IRS-2-overexpressing isolated vascular smooth muscle cells proliferated faster *in vitro* than the corresponding control cells, but both IRS-1-knockout as well as IRS-2-knockout cells proliferated slower. According to the literature, proliferation, migration and cell survival are regulated by the PI3-kinase pathway concordantly, it must be assumed that monocultures of isolated smooth muscle cells may not reflect the *in vivo* situation.

Overexpression of IRS-2 in vascular smooth muscle cells protects against the formation of a neointima. The mechanism lies most likely in the interaction of different cell types, such as the inflammatory reaction occurring in this context, and requires further clarification on the basis of new experimental models.

7. Literaturverzeichnis

25. Bericht über die Leistungszahlen der Herzkatheterlabore, PDF © Springer-Verlag 2010

Boston Scientific, Deutsches Ärzteblatt, Jg. 104, Heft 3, 19. Januar 2007

Deutsches Zentrum für Diabetesforschung, Zahlen

(www.dzd.ev.de/diabetes-die-krankheit/zahlen/index.html)

(<http://vsc.stanford.edu/policies/mice.html>)

Pschyrembel – klinisches Wörterbuch 1998, de Gruyter

Welsch, Lehrbuch Histologie München 2003, Seite 212

F. Abbasi, J. W. Chu, T. McLaughlin, C. Lamendola, E. T. Leary and G. M. Reaven. 2004. Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 53(2):159-64.

E. D. Abel, C. Riehle, A. R. Wende, Y. Zhu, K. J. Oliveira, R. O. Pereira, B. P. Jaishy, J. Bevins, S. Valdez, J. Noh, B. J. Kim, A. B. Moreira, E. T. Weatherford, R. Manivel, T. A. Rawlings, M. Rech and M. F. White. 2014. Insulin receptor substrates are essential for the bioenergetic and hypertrophic response of the heart to exercise training. *Mol Cell Biol* 34(18): 3450-60.

S. Abhijit, R. Bhaskaran, A. Narayanasamy, A. Chakroborty, N. Manickam, M. Dixit, V. Mohan and M. Balasubramanayam. 2013. Hyperinsulinemia-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation is mediated by converging mechanisms of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol Cell Biochem.* 373(1-2): 95-105.

D. Accili and K. C. Arden. 2004. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 117, 421-26.

A. N. Alexopoulou, J. R. Couchman and J. R. Whiteford. 2008. The CMV early enhancer/chicken beta actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol* 10.1186/1471-2121-9-2.

LITERATURVERZEICHNIS

- Y. Asakura, M. Suzuki, H. Nonogi, K. Haze, A. Sato, H. Inada, Y. Okuda, K. Yamashita and Y. Harano. 1998. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *J Cardiovasc Risk* 5: 331-34.
- A. Astrinidis and E. P. Henske. 2005. Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene* 24, 7475-81.
- A. Bayes-Genis, C. A. Conover and R. S. Schwartz. 2000. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 86, 125-30.
- J. W. Baynes and S. R. Thorpe. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48, 1-9.
- R. Beaglehole, R. Bonita, R. Horton, O. Adams and M. McKee. 2004. Public health in the new era: improving health through collective action. *Lancet* 363, 2084-86.
- M. R. Bennett and M. O'Sullivan. 2001. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy. *Pharmacol Ther* 91, 149-66.
- Y. Benomar, A. F. Roy, A. Aubourg, J. Djiane and M. Taouis. 2005. Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signaling in a human neuronal cell line. *Biochem J*. 388(Pt 3): 929-39.
- R. S. Blank and G. K. Owens. 1990. Platelet-derived growth factor regulates actin isoform expression and growth state in cultured rat aortic smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 142, 635-42.
- P. C. Block. 1990. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty--anatomic and pathophysiological mechanisms. Strategies for prevention. *Circ* 81, IV2-4.
- W. A. Boisvert, R. Santiago, L. K. Curtiss and R. A. Terkeltaub. 1998. A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 101, 353-63.
- L. Boring, J. Gosling, M. Cleary and I. F. Charo. 1998. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 394, 894-7.

- V. Boss, K. L. Abbott, X. F. Wang, G. K. Pavlath and T. J. Murphy. 1998. The cyclosporin A-sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells. Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT-mediated transcription by phospholipase C-coupled cell surface receptors. *J Biol Chem.* 273(31):19664-71.
- D. M. Breen, K. K. Chan, J. K. Dhaliwall, M. R. Ward, N. Al Koudsi, L. Lam, M. De Souza, H. Ghanim, P. Dandona, D. J. Stewart, M. P. Bendeck and A. Giacca. 2009. Insulin increases reendothelialization and inhibits cell migration and neointimal growth after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29, 1060-6.
- J. C. Brüning, J. Winnay, B. Cheatham and C. R. Kahn. 1997. Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol.* 17(3): 1513-21.
- O. F. Bueno, L. J. De Windt, K. M. Tymitz, S. A. Witt, T. R. Kimball, R. Klevitsky, T. E. Hewett, S. P. Jones, D. J. Lefer, C. F. Peng, R. N. Kitsis and J. D. Molkentin. 2000. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* 19(23): 6341-50.
- B. M. Burgering. 2008. A brief introduction to FOXOlogy. *Oncogene* 27, 2258-62.
- L. E. Burke, J. M. Dunbar-Jacob and M. N. Hill. 1997. Compliance with cardiovascular disease prevention strategies: a review of the research. *Ann Behav Med* 19, 239-63.
- D. Cai, S. Dhe-Paganon, P.A. Melendez, J. Lee and S. E. Shoelson. 2003. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278(28), 25323-30.
- R. M. Califf, D. F. Fortin, D. J. Frid, W. R. Harlan, E. M. Ohman, J. R. Bengtson, C. L. Nelson, J. E. Tcheng, D. B. Mark and R. S. Stack. 1991. Restenosis after coronary angioplasty: an overview. *J Am Coll Cardiol* 17, 2B-13B.
- M. Castagneto and G. Mingrone. 2012. The effect of gastrointestinal surgery on insulin resistance and insulin secretion. *Curr Atheroscler Rep.* 14(6):624-30.
- E. Cersosimo, X. Xu, S. Upala, C. Triplitt and N. Musi. 2014. Acute insulin resistance stimulates and insulin sensitization attenuates vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Physiol Rep.* 2(8).pii: e12123.

A. Chaudhuri, D. Janicke, M. F. Wilson, D. Tripathy, R. Garg, A. Bandyopadhyay, J. Calieri, D. Hoffmeyer, T. Syed, H. Ghanim, A. Aljada and P. Dandona. 2004. Anti-inflammatory and profibrinolytic effect of insulin in acute ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circ* 109, 849-54.

S. Chiang, D. M. Breen, J. Guo, Y. Mori and A. Giacca. 2013. Local insulin application on the carotid artery inhibits neointima formation. *Can J Physiol Pharmacol*. 91(12): 1086-94.

A. Cittadini, M. G. Monti, M. C. Castiello, E. D'Arco, G. Galasso, D. Sorriento, L. Saldamarco, A. De Paulis, R. Napoli, G. Iaccarino and L. Saccà. 2009. Insulin-like growth factor-1 protects from vascular stenosis and accelerates reendothelialization in a rat model of carotid artery injury. *J Thromb Haemost*. 7(11): 1920-8.

B1. Cohen, D. Novick and M. Rubinstein. 1996. Modulation of insulin activities by leptin. *Science*. 274(5290): 1185-8.

E. Cohen, J. F. Paulsson, P. Blinder, T. Burstyn-Cohen, D. Du, G. Estepa, A. Adame, H. M. Pham, M. Holzenberger, J. W. Kelly, E. Masliah and A. Dillin. 2009. Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell*. 139(6):1157-69.

G. Condorelli, A. Drusco, G. Stassi, A. Bellacosa, R. Roncarati, G. Iaccarino, M. A. Russo, Y. Gu, N. Dalton, C. Chung, M. V. Latronico, C. Napoli, J. Sadoshima, C. M. Croce and J. Jr. Ross. 2002. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 17;99(19): 12333-8.

K. D. Copps and M. F. White MF. 2012. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 55(10):2565-82.

M. Cruzado, N. Risler, C. Castro, A. Ortiz and M. E. Ruttler. 1998. Proliferative effect of insulin on cultured smooth muscle cells from rat mesenteric resistance vessels. *Am J Hypertens*. 11, 54-8.

J. M. Daniel, W. Bielenberg, P. Stieger, S. Weinert, H. Tillmanns and D. G. Sedding. 2010. Time-course analysis on the differentiation of bone marrow-derived progenitor cells into smooth muscle cells during neointima formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30(10): 1890-6.

- K. Datta, A. Bellacosa, T. O. Chan and P. N. Tsichlis. 1996. Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells. *J Biol Chem.* 271, 30835-9.
- G. E. De Blaquièrè, F. E. May and B. R. Westley. 2009. Increased expression of both insulin receptor substrates 1 and 2 confers increased sensitivity to IGF-1 stimulated cell migration. *Endocr Relat Cancer.* 16(2): 635-47.
- A. S. De Vriese, M. S. Stoenoiu, M. Elger, O. Devuyst, R. Vanholder, W. Kriz and N. H. Lameire. 2001. Diabetes-induced microvascular dysfunction in the hydronephrotic kidney: role of nitric oxide. *Kidney Int* 60, 202-10.
- C. V. Desouza, M. Gerety and F. G. Hamel. 2006. Neointimal hyperplasia and vascular endothelial growth factor expression are increased in normoglycemic, insulin resistant, obese fatty rats. *Atherosclerosis* 184, 283-89.
- M. A. Destefano and E. Jacinto. 2013. Regulation of insulin receptor substrate-1 by mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2). *Biochem Soc Trans.* 41(4): 896-901.
- M. Ding, Y. Xie, R. J. Wagner, Y. Jin, A. C. Carrao, L. S. Liu, A. K. Guzman, R. J. Powell, J. Hwa, E. M. Rzucidlo and K. A. Martin. 2011. Adiponectin induces vascular smooth muscle cell differentiation via repression of mammalian target of rapamycin complex 1 and FoxO4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(6): 1403-10.
- C. Duan, J. R. Bauchat and T. Hsieh. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 86, 15-23.
- J. Drake. 2013. Over expression of insulin receptor substrate 2 in Oligodendrocytes. *Dissertation Köln.*
- N. El-Bizri, C. Guignabert, L. Wang, A. Cheng, K. Stankunas, C. P. Chang, Y. Mishina and M. Rabinovitch. 2008. SM22alpha-targeted deletion of bone morphogenetic protein receptor 1A in mice impairs cardiac and vascular development, and influences organogenesis. *Development.* 135, 2981-91.

- M. Fahrenholz, R. Real, A. Kuken, A. Saxena and H. D. Orzechowski. 2009. Single low-dose administration of pharmacological inhibitor of mitogen-activated ERK kinase to the adventitia of the injured rat carotid artery suppresses neointima formation and inhibits nuclear ERK signaling. *Eur J Pharmacol.* 617, 90-6.
- E. Foster, S. Zhang and A. M. Kahn. 2006. Insulin stimulates arterial neointima formation in normal rats after balloon injury. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 8, 348-51.
- S. Freude, L. Plum, J. Schnitker, U. Leeser, M. Udelhoven, W. Krone, J. C. Bruning and M. Schubert. 2005. Peripheral hyperinsulinemia promotes tau phosphorylation in vivo. *Diabetes.* 54(12):3343-8.
- M. Frödin, T. L. Antal, B. A. Dümmler, C. J. Jensen, M. Deak, S. Gammeltoft and R. M. Biondi. 2002. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* 21(20): 5396-407.
- K. Fukami, S. Inanobe, K. Kanemaru and Y. Nakamura. 2010. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res.* 49(4):429-37.
- S. B. Furgeson, P. A. Simpson, I. Park, V. Vanputten, H. Horita, C. D. Kontos, R. A. Nemenoff and M. C. Weiser-Evans. 2010. Inactivation of the tumour suppressor, PTEN, in smooth muscle promotes a pro-inflammatory phenotype and enhances neointima formation. *Cardiovasc Res* 86, 274-82.
- J. George, J. Sack, I. Barshack, P. Keren, I. Goldberg, R. Haklai, G. Elad-Sfadia, Y. Kloog and G. Keren. 2004. Inhibition of intimal thickening in the rat carotid artery injury model by a nontoxic Ras inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(2): 363-8.
- C. K. Glass and J. L. Witztum. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104, 503-16.
- E. J. Glidden, L. G. Gray, S. Vemuru, D. Li, T. E. Harris and M. W. Mayo. 2012. Multiple site acetylation of Rictor stimulates mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2)-dependent phosphorylation of AKT protein. *J Biol Chem.* 287(1): 581-8.

- B. J. Goldstein, F. Ahmad, W. Ding, P. M. Li and W. R. Zhang. 1998. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem.* 182(1-2):91-9.
- D. A. Goncharov, T. V. Kudryashova, H. Ziai, K. Ihida-Stansbury, H. DeLisser, V. P. Krymskaya, R. M. Tuder, S. M. Kawut and E. A. Goncharova. 2014. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) coordinates pulmonary artery smooth muscle cell metabolism, proliferation, and survival in pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 129(8): 864-74.
- K. Graf, X. P. Xi, D. Yang, E. Fleck, W. A. Hsueh and R. E. Law. 1997. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 29(1 Pt 2): 334-9.
- G. R. Grotendorst, H. E. Seppa, H. K. Kleinman and G. R. Martin. 1981. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3669-72.
- L. Gruberg, M. K. Hong, G. S. Mintz, R. Mehran, R. Waksman, G. Dangas, K. M. Kent, A. D. Pichard, L. F. Satler, A. J. Lansky *et al.* 2000. Optimally deployed stents in the treatment of restenotic versus de novo lesions. *Am J Cardiol* 85, 333-37.
- A. R. Gruntzig, A. Senning and W. E. Siegenthaler. 1979. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 301, 61-68.
- S. Guo, Y. Qi, Z. Xu, Q. Zhu, C. Thomas, R. Kumar, H. Feng, D. E. Dostal, M. F. White and K. M. Baker. 2013. Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38a MAPK during insulin resistance. *Diabetes* 62(11): 3887-900.
- S. M. Haffner, E. Ferrannini, H. P. Hazuda and M. P. Stern. 1992. Clustering of cardiovascular risk factors in confirmed prehypertensive individuals. *Hypertension* 20, 38-45.
- S. Hanke and M. Mann. 2008. The phosphotyrosine interactome of the insulin receptor family and its substrates IRS-1 and IRS-2. *Mol Cell Proteomics.* 8(3):519-34.

- G. K. Hansson and P. Libby. 2006. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6, 508-19.
- S. Hassane, N. Claij, M. Jodar, A. Dedman, I. Lauritzen, F. Duprat, J. S. Koenderman, A. van der Wal, M. H. Breuning, E. de Heer, E. Honore, M. C. DeRuiter and D. J. Peters. 2011. Pkd1-inactivation in vascular smooth muscle cells and adaptation to hypertension. *Lab Invest.* 91, 24-32.
- K. Hayashi, K. Shibata, T. Morita, K. Iwasaki, M. Watanabe and K. Sobue. 2004. Insulin receptor substrate-1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 279(39):40807-18.
- E. Hirsch, C. Costa and E. Ciralo. 2007. Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *J Endocrinol.* 194(2):243-56.
- R. Holtwick, M. Gotthardt, B. Skryabin, M. Steinmetz, R. Potthast, B. Zetsche, R. E. Hammer, J. Herz and M. Kuhn. 2002. Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 7142-7.
- S. J. House, M. Potier, J. Bisailon, H. A. Singer and M. Trebak. 2008. The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch.* 456(5):769-85.
- J. Huang and C. D. Kontos. 2002. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem.* 277, 10760-6.
- S. J. Humphrey, G. Yang, P. Yang, D. J. Fazakerley, J. Stöckli, J. Y. Yang and D. E. James. 2013. Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2. *Cell Metab.* 17(6): 1009-20.
- Y. H. Ibrahim, S. A. Byron, X. Cui, A. V. Lee and D. Yee. 2008. Progesterone receptor-B regulation of insulin-like growth factor-stimulated cell migration in breast cancer cells via insulin receptor substrate-2. *Mol Cancer Res.* 6(9): 1491-8.

J. H. Ip, V. Fuster, D. Israel, L. Badimon, J. Badimon and J. H. Chesebro. 1991. The role of platelets, thrombin and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 17, 77B-88B.

J. G. Jackson, X. Zhang, T. Yoneda and D. Yee. 2001. Regulation of breast cancer cell motility by insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in metastatic variants of human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 20(50): 7318-25.

M. L. Janmaat, J. L. Heerkens, A. M. de Bruin, A. Klous, V. de Waard and C. J. de Vries. 2010. Erythropoietin accelerates smooth muscle cell-rich vascular lesion formation in mice through endothelial cell activation involving enhanced PDGF-BB release. *Blood* 115, 1453-60.

A. Jawien, D. F. Bowen-Pope, V. Lindner, S. M. Schwartz and A. W. Clowes. 1992. Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 89, 507-11.

M. Jonas, E. R. Edelman, A. Groothuis, A. B. Baker, P. Seifert and C. Rogers. 2005. Vascular neointimal formation and signaling pathway activation in response to stent injury in insulin-resistant and diabetic animals. *Circ Res* 97, 725-33.

T1. Kadowaki and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 26(3): 439-51.

C. R. Kahn and M. Crettaz. 1985. Insulin receptors and the molecular mechanism of insulin action. *Diabetes Metab Rev* 1, 5-32.

A. Kastrati, A. Schomig, S. Elezi, H. Schühlen, J. Dirschinger, M. Hadamitzky, A. Wehinger, J. Hausleiter, H. Walter and F. J. Neumann. 1997. Predictive factors of restenosis after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 30, 1428-36.

M1. Kellerer, M. Koch, E. Metzinger, J. Mushack, E. Capp and H. U. Häring. 1997. Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathway. *Diabetologia*. 40(11): 1358-62.

S. G. Kennedy, A. J. Wagner, S. D. Conzen, J. Jordan, A. Bellacosa, P. N. Tsichlis and N. Hay. 1997. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 11, 701-13.

M. J. Khorsandi, J. A. Fagin, D. Giannella-Neto, J. S. Forrester and B. Cercek. 1992. Regulation of insulin-like growth factor-I and its receptor in rat aorta after balloon denudation. Evidence for local bioactivity. *J Clin Invest* 90, 1926-31.

A. Khwaja, P. Rodriguez-Viciana, S. Wennstrom, P. H. Warne and J. Downward. 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.* 16, 2783-93.

J. Kim, A. R. Wende, S. Sena, H. A. Theobald, J. Soto, C. Sloan, B. E. Wayment, S. E. Litwin, M. Holzenberger, D. LeRoith and E. D. Abel. 2008. Insulin-like growth factor 1 receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol* 22(11): 2531-43.

S. J. Kim, M. A. DeStefano, W. J. Oh, C. C. Wu, N. M. Vega-Cotto, M. Finlan, D. Liu, B. Su and E. Jacinto. 2012. mTOR complex 2 regulates proper turnover of insulin receptor substrate-1 via the ubiquitin ligase subunit Fbw8. *Mol Cell.* 48(6): 875-87.

K. E. Kip, D. P. Faxon, K. M. Detre, W. Yeh, S. F. Kelsey and J. W. Currier. 1996. Coronary angioplasty in diabetic patients: the National Heart, Lung, and Blood Institute Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty Registry. *Circulation* 94: 1818-25.

H. Koide, T. Asai, K. Furuya, T. Tsuzuku, H. Kato, T. Dewa, M. Nango, N. Maeda and N. Oku. 2011. Inhibition of Akt (ser473) phosphorylation and rapamycin-resistant cell growth by knockdown of mammalian target of rapamycin with small interfering RNA in vascular endothelial growth factor receptor-1-targeting vector. *Biol Pharm Bull.* 34(5): 602-8.

S. Koide, M. Okazaki, M. Tamura, K. Ozumi, H. Takatsu, F. Kamezaki, A. Tanimoto, H. Tasaki, Y. Sasaguri, Y. Nakashima and Y. Otsuji. 2007. PTEN reduces cuff-induced neointima formation and proinflammatory cytokines. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H2824-31.

R. Kornowski, G. S. Mintz, K. M. Kent, A. D. Pichard, L. F. Satler, T. A. Bucher, M. K. Hong, J. J. Popma and M. B. Leon. 1997. Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 95: 1366-69.

K. M. Kriauciunas, M. G. Myers Jr. and C. R. Kahn. 2000. Cellular compartmentalization in insulin action: altered signaling by a lipid-modified IRS-1. *Mol Cell Biol*. 20(18), 6849.

V. P. Krymskaya, J. Snow, G. Cesarone, I. Khavin, D. A. Goncharov, P. N. Lim, S. C. Veasey, K. Ihida-Stansbury, P. L. Jones and E. A. Goncharova. mTOR is required for pulmonary arterial vascular smooth muscle cell proliferation under chronic hypoxia. *FASEB J*. 25(6): 1922-33.

T. Kubota, N. Kubota, M. Moroi, Y. Terauchi, T. Kobayashi, K. Kamata, R. Suzuki, K. Tobe, A. Namiki, S. Aizawa *et al.* 2003. Lack of insulin receptor substrate-2 causes progressive neointima formation in response to vessel injury. *Circ* 107, 3073-80.

G. Kulik, A. Klippel and M. J. Weber. 1997. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol Cell Biol*. 17, 1595-606.

R. E. Kuntz and D. S. Baim. 2000. Prevention of coronary restenosis: the evolving evidence base for radiation therapy. *Circ* 101, 2130-33.

U. K. Laemmli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 227. 5259. 680-5.

M. Lakso, B. Sauer, B. Jr Mosinger, E. J. Lee, R. W. Manning, S. H. Yu, K. L. Mulder and H. Westphal. 1992. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89(14):6232-6.

D. W. Lamming, L. Ye, P. Katajisto, M. D. Goncalves, M. Saitoh, D. M. Stevens, J. G. Davis, A. B. Salmon, A. Richardson, R. S. Ahima, D. A. Guertin, D. M. Sabatini and J. A. Baur. 2012. Rapamycin-induced resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*. 335(6076): 1638-43.

A1. Lana, F2. Rodriguez-Artalejo and E3. Lopez-Garcia. 2014. Consumption of sugar-sweetened beverages is positively related to insulin resistance and higher plasma leptin concentrations in men and nonoverweight women. *J Nutr.* 144(7): 1099-105.

M. C. Lavigne, J. L. Grimsby and M. J. Eppihimer. 2012. Antirestenotic mechanisms of everolimus on human coronary artery smooth muscle cells: inhibition of human coronary artery smooth muscle cell proliferation, but not migration. *J Cardiovasc Pharmacol.* 59(2): 165-74.

K. Ley in a Web-Based Research Tool for Functional Genomics of the Microcirculation: The Leukocyte Adhesion Cascade Microcirculation 1999.

X. D. Li, J. Chen, C. C. Ruan, D. L. Zhu and P. J. Gao. 2012. Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Osteopontin Expression Mediates Vascular Inflammation and Neointima Formation via Flt-1 in Adventitial Fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32, 2250-8.

D. J. Jr. Lightell, S. C. Moss and T. C. Woods. 2011. Loss of canonical insulin signaling accelerates vascular smooth muscle cell proliferation and migration through changes in p27Kip1 regulation. *Endocrinology.* 152(2): 651-8.

F. Liistro, M. Fineschi, S. Grotti, P. Angioli, A. Carrera, K. Ducci, T. Gori, G. Falsini, C. Pierli, and L. Bolognese. 2010. Long-term effectiveness and safety of sirolimus stent implantation for coronary in-stent restenosis results of the TRUE (Tuscany Registry of sirolimus for unselected in-stent restenosis) registry at 4 years. *J Am Coll Cardiol* 55, 613-16.

L. Liu and C. A. Parent. 2011. TOR kinase complexes and cell migration. *J Cell Biol.* 194(6): 815-24.

R. Loewith, E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe and M. N. Hall. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10(3):457-68.

B. Lu, B. J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, R. North, C. Gerard and B. J. Rollins. 1998. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 187, 601-8.

J. Lu, J. Ji, H. Meng, D. Wang, B. Jiang, L. Liu, E. Randell, K. Adeli and Q. H. Meng. 2013. The protective effect and underlying mechanism of metformin on neointima formation in fructose-induced insulin resistant rats. *Cardiovascular Diabetology* 12, 58.

J. S. Lymn and A. D. Hughes. 2000. Phospholipase C Isoforms, Cytoskeletal Organization, and Vascular Smooth Muscle Differentiation. *News Physiol Sci.* 15:41-45.

L. Ma, M. Brown, P. Kogut, K. Serban, X. Li, J. McConville, B. Chen, J. K. Bentley, M. B. Hershenson, N. Dulin, J. Solway and B. Camoretti-Mercado. 2011. Akt activation induces hypertrophy without contractile phenotypic maturation in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300, L701-9.

H. A. Machado, M. Vieira, M. R. Cunha, M. R. S. Correia, R. T. Fukui, R. F. dos Santos, D. M. Rocha, B. L. Wajchenberg, S. G. Lage and M. E. Rossi da Silva. 2012. Metformin, but not glimepiride, improves carotid artery diameter and blood flow in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clinics* 67(7), 711-17.

M. W. Majesky, M. A. Reidy, D. F. Bowen-Pope, C. E. Hart, J. N. Wilcox and S. M. Schwartz. 1990. PDGF ligand and receptor gene expression during repair of arterial injury. *J Cell Biol* 111, 2149-58.

A. J. Malhowski, H. Hira, S. Bashiruddin, R. Warburton, J. Goto, B. Robert, D. J. Kwiatkowski and G. A. Finlay. 2011. Smooth muscle protein-22-mediated deletion of Tsc1 results in cardiac hypertrophy that is mTORC1-mediated and reversed by rapamycin. *20. 7.* 1290-305.

V. A. Maltsev, A. M. Wobus, J. Rohwedel, M. Bader and J. Hescheler. 1994. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res.* 75(2): 233-44.

K. Matsumoto, Y. Sera, Y. Abe, T. Tominaga, Y. Yeki and S. Miyake. 2003. Metformin attenuates progression of carotid arterial wall thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 64 (2004) 225-28.

T. Matsumoto, E. Noguchi, K. Ishida, T. Kobayashi, N. Yamada and K. Kamata. 2008. Metformin normalizes endothelial function by suppressing vasoconstrictor prostanoids in mesenteric arteries from OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295(3), H1165-76.

C. M. Matter, L. Ma, T. von Lukowicz, P. Meier, C. Lohmann, D. Zhang, U. Kilic, E. Hofmann, S. W. Ha, M. Hersberger, D. M. Hermann and T. F. Luscher. 2006. Increased balloon-induced inflammation, proliferation, and neointima formation in apolipoprotein E (ApoE) knockout mice. *Circulation* 114: 2625-32.

J. A. McCubrey, L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, E. W. Wong, F. Chang, B. Lehmann, D. M. Terrian, M. Milella, A. Tafuri *et al.* 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1263-84.

D. Meng, D. D. Lv and J. Fang. 2008. Insulin-like growth factor-1 induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 80(2): 299-308.

A. Mesaros, S. B. Koralov, E. Rother, F. T. Wunderlich, M. B. ernst, G. S. Barsh, K. Rajewsky and J. C. Brüning. 2008. Activation of Stat3 signaling in AgRP neurons promotes locomotor activity. *Cell Metab.* 7(3): 236-48.

I. Milton, D. Ouyang, C. J. Allen, N. E. Yanasak, J. R. Gossage, C. H. Alleyne, Jr. and T. Seki. 2012. Age-dependent lethality in novel transgenic mouse models of central nervous system arteriovenous malformations. *Stroke* 43, 1432-5.

J. R. Molina and A. A. Adjei. 2006. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol* 1, 7-9.

J. W. Moses, M. B. Leon, J. J. Popma, P. J. Fitzgerald, D. R. Holmes, C. O'Shaughnessy, R. P. Caputo, D. J. Kereiakes, D. O. Williams, P. S. Teirstein *et al.* 2003. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 349, 1315-23.

M. G. Jr Myers and M. F. White. The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes.* 42(5):643-50.

R. A. Nemenoff, P. A. Simpson, S. B. Furgeson, N. Kaplan-Albuquerque, J. Crossno, P. J. Garl, J. Cooper and M.C. Weiser-Evans. 2008. Targeted deletion of PTEN in smooth muscle cells results in vascular remodeling and recruitment of progenitor cells through induction of stromal cell-derived factor-1alpha. *Circ Res.* 102, 1036-45.

X. L. Niu, J. Li, Z. S. Hakim, M. Rojas, M. S. Runge and N. R. Madamanchi. 2007. Leukocyte antigen-related deficiency enhances insulin-like growth factor-1 signaling in vascular smooth muscle cells and promotes neointima formation in response to vascular injury. *J Biol Chem.* 282(27): 19808-19.

M. Nobuyoshi, T. Kimura, H. Nosaka, S. Mioka, K. Ueno, H. Yokoi, N. Hamasaki, H. Horiuchi and H. Ohishi. 1988. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol* 12, 616-23.

T. G. Nührenberg, N. Langwieser, J. B. Schwarz, Y. Hou, P. Frank, F. Sorge, S. Matschurat, S. Seidl, A. Kastrati, A. Schömig, M. A. Clauss and D. Zohlnhöfer. 2008. EMAP-II downregulation contributes to the beneficial effects of rapamycin after vascular injury. *Cardiovasc Res* 77(3): 580-9.

G. Y. Oudit, H. Sun, B. G. Kerfant, M. A. Crackower, J. M. Penninger, and P. H. Backx. 2004. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 37, 449-71.

J. Palermo, J. Gulick, M. Colbert, J. Fewell and J. Robbins. 1996. Transgenic remodeling of the contractile apparatus in the mammalian heart. *Circ Res.* 78: 504-509.

V. E. Papaioannou and J. G. Fox. Efficacy of tribromoethanol anesthesia in mice. 1993. 43. 2. 189-92.

S. H. Park, S. P. Marso, Z. Zhou, F. Foroudi, E. J. Topol and A. M. Lincoff. 2001. Neointimal hyperplasia after arterial injury is increased in a rat model of non-insulin-dependent mellitus. *Circulation.* 104(7): 815-9.

A. Pernis, B. Witthuhn, A. D. Keegan, K. Nelms, E. Garfein, J. N. Ihle, W. E. Paul, J. H. Pierce and P. Rothman. 1995. Interleukin 4 signals through two related pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;92(17):7971-5.

B. Pfeifle and H. Ditschuneit. 1981. Effect of insulin on growth of cultured human arterial smooth muscle cells. *Diabetologia.* 20, 155-8.

P. M. Piatti, E. Marone, M. Mantero, E. Setola, E. Galluccio, P. Lucotti, E. Shehaj, V. Villa, F. Perticone, M. Venturini, A. Palini, F. Airoldi, E. Faglia, A. Del Maschio, A. Colombo, R. Chiesa, E. Bosi and L. D. Monti. 2013. Effect of normalization of fasting glucose by intensified insulin therapy and influence of eNOS polymorphisms on the incidence of restenosis after peripheral angioplasty in patients with type 2 diabetes: a randomized, open-label clinical trial. *Acta Diabetol.* 50(3):373-82.

B. M. Proctor, X. Jin, T. S. Lupu, L. J. Muglia, C. F. Semenkovich, and A. J. Muslin. 2008. Requirement for p38 mitogen-activated protein kinase activity in neointima formation after vascular injury. *Circ* 118, 658-66.

Q. Pu, Y. Chang, C. Zhang, Y. Cai and A. Hassid. 2009. Chronic insulin treatment suppresses PTP1B function, induces increased PDGF signaling, and amplifies neointima formation in the balloon-injured rat artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296, H132-39.

A. Puzik, J. Rupp, B. Troger, W. Gopel, E. Herting and C. Hartel. 2012. Insulin-like growth factor-I regulates the neonatal immune response in infection and maturation by suppression of IFN-gamma. *Cytokine.* 60(2):369-76.

Y. Radhakrishnan, L. A. Maile, Y. Ling, L. M. Graves and D. R. Clemmons. 2008. Insulin-like growth factor-1 stimulates Shc-dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation via Grb2-associated p85 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 283(24): 16320-31.

E. W. Raines and N. Ferri. 2005. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J Lipid Res.* 46, 1081-92.

A. Rao, C. Luo and P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol.* 15:707-47.

G. M. Reaven. 1984. Insulin secretion and insulin action in non-insulin-dependent diabetes mellitus: which defect is primary? *Diabetes Care* 7 *Suppl* 1, 17-24.

M. K. Reddy, J. K. Vasir, G. V. Hegde, S. S. Joshi and V. Labhassetwar. 2007. Erythropoietin induces excessive neointima formation: a study in a rat carotid artery model of vascular injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 12, 237-47.

B. J. Rensing, W. R. Hermans, B. H. Strauss and P. W. Serruys. 1991. Regional differences in elastic recoil after percutaneous transluminal coronary angioplasty: a quantitative angiographic study. *J Am Coll Cardiol* 17, 34B-38B.

Z. T. Resch, R. D. Simari and C. A. Conover. 2006. Targeted disruption of the pregnancy-associated plasma protein-A gene is associated with diminished smooth muscle cell response to insulin-like growth factor-1 and resistance to neointimal hyperplasia after vascular injury. *Endocrinology*. 147(12): 5634-40.

D. Rizzoni, E. Porteri, D. Guelfi, M. L. Muiesan, U. Valentini, A. Cimino, A. Girelli, L. Rodella, R. Bianchi, I. Sleiman and E. A. Rosei. 2001. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 103, 1238-44.

O. M. Rosen. 1987. After insulin binds. *Science* 237, 1452-58.

N. B. Ruderman, D. Carling, M. Prentki and J. M. Cacicedo. 2013. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 123(7):2764-72.

D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of AKT/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307: 1098-1101.

M. Sata, A. Saiura, A. Kunisato, A. Tojo, S. Okada, T. Tokuhi, H. Hirai, M. Makuuchi, Y. Hirata and R. Nagai. 2002. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8, 403-09.

D. Sawka-Verhelle, V. Baron, J. Mothe, C. Filloux, M. F. White and E. Van Obberghen. 1997. Tyr⁶²⁴ and Tyr⁶²⁸ in Insulin receptor substrate-2 mediate its association with the insulin receptor. *J Biol Chem*. 272, 16416-20.

S. Sciacchitano and S. I. Taylor. 1997. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. *Endocrin* 138, 4931-40.

D. G. Sedding, M. Trobs, F. Reich, G. Walker, L. Fink, W. Haberbosch, W. Rau, H. Tillmanns, K. T. Preissner, R. M. Bohle and A. C. Langheinrich. 2009. 3-Deazaadenosine prevents smooth muscle cell proliferation and neointima formation by interfering with Ras signaling. *Circ Res*. 104, 1192-200.

Y. Seki, H. Kai, R. Shibata, T. Nagata, H. Yasukawa, A. Yoshimura and T. Imaizumi. 2000. Role of the JAK/STAT pathway in rat carotid artery remodeling after vascular injury. *Circ Res.* 87(1): 12-8.

C. V. Jr. Serrano, J. A. Ramires, M. Venturinelli, S. Arie, E. D'Amico, J. L. Zweier, F. Pileggi and P. L. da Luz. 1997. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 29, 1276-83.

P. W. Serruys, H. E. Luijten, K. J. Beatt, R. Geuskens, P. J. de Feyter, M. van den Brand, J. H. Reiber, H. J. ten Katen, G. A. van Es and P. G. Hugenholtz. 1988. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. A quantitative angiographic study in 342 consecutive patients at 1, 2, 3, and 4 months. *Circ* 77, 361-71.

J. Shelton, D. Wang, H. Gupta, J. M. Wyss, S. Oparil and C. R. White. 2003. The neointimal response to endovascular injury is increased in obese Zucker rats. *Diabetes Obes Metab.* 5(6): 415-23.

Z. D. Shi, X. Y. Ji, D. E. Berardi, H. Qazi, and J. M. Tarbell. 2010. Interstitial flow induces MMP-1 expression and vascular SMC migration in collagen I gels via an ERK1/2-dependent and c-Jun-mediated mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298, H127-35.

D. Simper, P. G. Stalboerger, C. J. Panetta, S. Wang and N. M. Caplice. 2002. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circ* 106, 1199-04.

E. Y. Skolnik, A. Batzer, N. Li, C. H. Lee, E. Lowenstein, M. Mohammadi, B. Margolis and J. Schlessinger. 1993. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science.* 260(5116):1953-5.

B. E. Sobel, R. M. Hardison, S. Genuth, M. M. Brooks, R. D. McBane, D. J. Schneider, R. E. Pratley, K. Huber, R. Wolk, A. Krishnaswami and R. L. Frye. 2011. Profibrinolytic, antithrombotic, and antiinflammatory effects of an insulin-sensitizing strategy in patients in the bypass angioplasty revascularization investigation 2 diabetes (BARI 2 D) trial. *Circulation.* 124, 695-3.

- J. E. Sousa, M. A. Costa, A. Abizaid, A. S. Abizaid, F. Feres, I. M. Pinto, A. C. Seixas, R. Staico, L. A. Mattos, A. G. Sousa, R. Falotico, J. Jaeger, J. J. Popma and P. W. Serruys. 2001. Lack of neointimal proliferation after implantation of sirolimus-coated stents in human coronary arteries: a quantitative coronary angiography and three-dimensional intravascular ultrasound study. *Circulation*. 103, 192-5.
- E. Stabile, Y. F. Zhou, M. Saji, M. Castagna, M. Shou, T. D. Kinnaird, R. Baffour, M. D. Ringel, S. E. Epstein and S. Fuchs. 2003. Akt controls vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by delaying G1/S Exit. *Circ Res*. 93, 1059-65.
- K. Stephenson, J. Tunstead, A. Tsai, R. Gordon, S. Henderson and H. M. Dansky. 2003. Neointimal formation after endovascular arterial injury is markedly attenuated in db/db mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23(11): 2027-33.
- P. Subramanian, E. Karshovska, P. Reinhard, R. T. Megens, Z. Zhou, S. Akhtar, U. Schumann, X. Li, M. van Zandvoort, C. Ludin, C. Weber and A. Schober. 2010. Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *Circ Res*. 107, 96-105.
- I. Szanto and C. R. Kahn. 2000. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Physiology*. 97(5). 2355-60.
- K. Talbot, H. Y. Wang, H. Kazi, L. Y. Han, K. P. Bakshi, A. Stucky, R. L. Fuino, K. R. Kawaguchi, A. J. Samoyedny, R. S. Wilson, Z. Arvanitakis, J. A. Schneider, B. A. Wolf, D. A. Bennett, J. Q. Trojanowski and S. E. Arnold. 2012. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J Clin Invest*. 122(4):1316-38.
- B. Thyagarajan, M. J. Guimarães, A. C. Groth and M. P. Calos. 2000. Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene*. 244(1-2):47-54.
- J. Thyberg, K. Blomgren, J. Roy, P. K. Tran and U Hedin. 1997. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem* 45, 837-46.
- A. Toker and A. C. Newton. 2000. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 275, 8271-74.

J. J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier and R. A. Brown. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3, 349-63.

S. Tovar, L. Paeger, S. Hess, D. A. Morgan, A. C. Hausen, H. S. Brönneke, B. Hampel, P. J. Ackermann, N. Evers, H. Büning, F. T. Wunderlich, K. Rahmouni, P. Kloppenburg and J. C. Brüning. 2013. K(ATP)-channel-dependent regulation of catecholaminergic neurons controls BAT sympathetic nerve activity and energy homeostasis. *Cell Metab.* 18(3): 445-55.

M. Trovati, G. Doronzo, C. Barale, C. Vaccheris, I. Russo and F1. Cavalot. 2014. Leptin and vascular smooth muscle cells. *Curr Pharm Des.* 20(4): 625-34.

A. Tsuchiya, T. Kanno and T. Nishizaki. 2013. PI3 kinase directly phosphorylates Akt1/2 at Ser473/474 in the insulin signal transduction pathway. *J Endocrinol.* 220(1): 49-59.

A. Tzatsos. 2009. Raptor binds the SAIN (Shc and IRS-1 NPXY binding) domain of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and regulates the phosphorylation of IRS-1 at Ser-636/639 by mTOR. *J Biol. Chem.* 284(34): 22525-34.

S. H. Um, F. Frigerio, M. Watanabe, F. Picard, M. Joaquin, M. Sticker, S. Fumagalli, P. R. Allegrini, S. C. Kozma, J. Auwerx and G. Thomas. 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431(7005): 200-5.

L. Umans, L. Cox, M. Tjwa, V. Bito, L. Vermeire, K. Laperre, K. Sipido, L. Moons, D. Huylebroeck and A. Zwijsen. 2007. Inactivation of Smad5 in endothelial cells and smooth muscle cells demonstrates that Smad5 is required for cardiac homeostasis. *Am J Pathol.* 170, 1460-72.

B. Unsöld, A. Kaul, M. Sbroggiò, C. Schubert, V. Regitz-Zagrosek, M. Brancaccio, F. Damilano, E. Hirsch, M. Van Bilsen, C. Munts, K. Sipido, V. Bito, E. Detre, N.M. Wagner, K. Schäfer, T. Seidler, J. Vogt, S. Neef, A. Bleckmann, L. S. Maier, J. L. Balligand, C. Bouzin, R. Ventura-Clapier, A. Garnier, T. Eschenhagen, A. El-Armouche, R. Knöll, G. Tarone und G. Hasenfuß. 2014. Melusin protects from cardiac rupture and improves functional remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 101(1):97-107.

M. Vantler, E. Caglayan, W. H. Zimmermann, A. T. Baumer and S. Rosenkranz. 2005. Systematic evaluation of anti-apoptotic growth factor signaling in vascular smooth muscle cells. Only phosphatidylinositol 3'-kinase is important. *J Biol Chem.* 280, 14168-76.

LITERATURVERZEICHNIS

- F. Verdier, S. Chretien, C. Billat, S. Gisselbrecht, C. Lacombe and P. Mayeux. 1997. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternate pathway for erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Biol Chem* 272, 26173-78.
- S. Versteyhe, C. Blanquart, C. Hampe, S. Mahmood, N. Christeff, P. De Meyts, S.G. Gray and T. Issad. 2010. Insulin receptor substrates-5 and -6 are poor substrates for the insulin receptor. *Mol Med Rep* 3(1), 189-93.
- C. C. Wang, I. Gurevich and B. Draznin. 2003. Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways. *Diabetes*. 52(10):2562-9.
- M. R. Ward, G. Pasterkamp, A. C. Yeung and C. Borst. 2000. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 102, 1186-91.
- F. G. Welt, E. R. Edelman, D. I. Simon and C. Rogers. 2000. Neutrophil, not macrophage, infiltration precedes neointimal thickening in balloon-injured arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2553-58.
- M. F. White. 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E413-22.
- M. F. White. 2003. Insulin signaling in health and disease. *Science* 302, 1710-11.
- S. R. White, L. D. Martin , M. K. Abe, B. A. Marroquin, R. Stern and X. Fu. 2009. Insulin receptor substrate-1/2 mediates IL-4-induced migration of human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 297(1): L164-73.
- E. L. Whiteman, H. Cho and M. J. Birnbaum. 2002. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13, 444-51.
- Z1. Wu, Y. Cheng, L. H. Aung and B. Li. 2013. Association between adiponectin concentrations and cardiovascular disease in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 8(11): e78485.

- M . Yang, E. Foster and A. M. Kahn. 2005. Insulin-stimulated NAD(P)H oxidase activity increases migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens.* 18(10): 1329-34.
- T. Yin, M. L. Tsang and Y. C. Yang. 1994. JAK1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 269(43):26614-7.
- B. P. Zambrowicz, A. Imamoto, S. Fiering, L. A. Herzenberg, W. G. Kerr and P. Soriano. 1997. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:3789-94.
- P. S. Zammit, R. G. Kelly, D. Franco, N. Brown, A. F. Moorman and M. E. Buckingham. 2000. Suppression of atrial myosin gene expression occurs independently in the left and right ventricles of the developing mouse heart. *Dev Dyn.* 217(1): 75-85.
- J. Zemva and M. Schubert. 2011. Central insulin and insulin-like growth factor-1 signaling: implications for diabetes associated dementia. *Curr Diabetes Rev.* 7(5):356-66.
- J. Zemva, M. Udelhoven, L. Moll, S. Freude, O. Stöhr, H. S. Brönneke, R. B. Drake, W. Krone and M. Schubert. 2013. Neuronal overexpression of insulin receptor substrate 2 leads to increased fat mass, insulin resistance, and glucose intolerance during aging. *Age (Dordr)*35(5): 1881-97.
- A. Zernecke, E. A. Liehn, L. Fraemohs, P. von Hundelshausen, R. R. Koenen, M. Corada, E. Dejana and C. Weber. 2006. Importance of junctional adhesion molecule-A für neointimal lesion formation and infiltration in atherosclerosis-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(2): e10-3.
- R. Zhande, J. J. Mitchell, J. Wu and X. J. Sun. 2002. Molecular mechanism of insulin-induced degradation of insulin receptor substrate 1. *Mol Cell Biol* 22(4): 1016-26.
- X. Zhang, M. Lin, K. L. van Golen, K. Yoshioka, K. Itoh and D. Yee. 2005. Multiple signaling pathways are activated during insulin-like growth factor-1 (IGF-1) stimulated breast cancer cell migration. *Breast Cancer Res Treat.* 93(2): 159-68.

B. Zhu, G. Zhao, D. P. Witte, D. Y. Hui and J. A. Fagin. 2001. Targeted overexpression of IGF-I in smooth muscle cells of transgenic mice enhances neointimal formation through increased proliferation and cell migration after intraarterial injury. *Endocrinol* 142, 3598-06.

D. Zhuang, Q. Pu, B. Ceacoreanu, Y. Chang, M. Dixit and A. Hassid. 2008. 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* 295, H163-73.

D. Zohlnhöfer, T. G. Nührenberg, F. J. Neumann, T. Richter, A. E. May, R. Schmidt, K. Denker, M. A. Clauss, A. Schömig and P. A. Baeuerle. 2004. Rapamycin effects transcriptional programs in smooth muscle cells controlling proliferative and inflammatory properties. *Mol Pharmacol*. 65(4): 880-9.

T. Zubilewicz, J. Wronski, A. Bourriez, P. Terlecki, A. M. Guinault, B. Muscatelli-Groux, J. Michalak, D. Melliere, J. P. Becquemin and E. Allaire. 2001. Injury in vascular surgery-the intimal hyperplastic response. *Med Sci Monit* 7, 316-24.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Priv. - Doz. Dr. med. Markus Schubert, Facharzt für Innere Medizin, Endokrinologie & Diabetologie danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes zur Anfertigung meiner Dissertation. Ebenfalls danke ich meinen Kollegen für ihre stets freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold (Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie) für die Vertretung meiner Promotion am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Andreas Markl für die interessante Themenstellung und intensive Betreuung bei der Durchführung des Projektes, sowie seine hilfreichen fachlichen Ratschläge.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. rer. nat. Michael Udelhoven für seine hervorragende Einarbeitung in molekularbiologische Verfahren.

Des Weiteren möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Wolfram Friedrich Neiss (Institut 1 für Anatomie) für sein kompetentes Fachwissen, sein Interesse an dieser Arbeit sowie die Bereitstellung seiner Arbeitsplätze danken.

Mein Dank geht ebenfalls an die Deutsche Diabetes Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

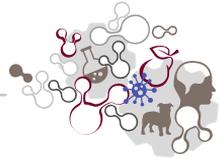
Sehr herzlich möchte ich mich bei meinem Mann für sein Verständnis und meinen Eltern sowie meinem Bruder für deren Unterstützung und ihre Motivation bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

9. Selbstständigkeitserklärung

Nach § 10 (5) der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen:

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Nicole Blank geb. Müller



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6451-8



9 783835 964518