

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Die Rolle von BMPER und BMP4 in der Gefäßregeneration
und Neovaskularisation

von Katia Christina Marenne
aus Brüssel

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Angefertigt an der Klinik für Kardiologie und Angiologie I (Standort Freiburg),
Universitäts-Herzzentrum Freiburg – Bad Krozingen, und der Medizinischen
Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Mentor: Prof. Dr. Martin Moser

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 10.02.2018

Meiner Familie

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abbildungsverzeichnis.....	VII
III.	Tabellenverzeichnis.....	XIII
IV.	Abkürzungsverzeichnis	XIX
1	Einleitung.....	1
1.1	Arteriosklerose und die periphere arterielle Verschlusskrankheit.....	1
1.2	Entstehung und Aufbau von Blutgefäßen	4
1.2.1	Vaskulogenese.....	5
1.2.2	Angiogenese	5
1.2.3	Arteriogenese	5
1.2.4	Gefäßaufbau	7
1.3	Vaskuläre glatte Muskelzellen (vSMCs).....	7
1.3.1	Ursprung.....	8
1.3.2	Eigenschaften und Funktion	8
1.3.3	Phänotyp-Modulation.....	9
1.4	Bone morphogenetic proteins (BMPs).....	15
1.4.1	BMP-Signalweg.....	16
1.4.2	BMP-Modulatoren: Bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER)	17
1.5	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material	21
2.1	Geräte und Gebrauchsgegenstände	21
2.2	Verbrauchsmaterialien	23
2.3	Chemikalien und Reagenzien	24

2.4	Puffer und Lösungen	26
2.4.1	Zellyse.....	26
2.4.2	SDS-PAGE.....	26
2.4.3	Western Blot.....	27
2.4.4	Genotypisierung.....	28
2.5	Kits	29
2.6	Oligonukleotide	29
2.6.1	Primer.....	29
2.6.2	Small interfering RNA.....	30
2.7	Proteine.....	30
2.8	Marker	30
2.9	Enzyme.....	30
2.10	Antikörper	31
2.10.1	Western Blot.....	31
2.10.2	Histologie	31
2.11	Zellen und Zellkulturmedien	32
2.12	Medikamente.....	32
2.13	Operationsmaterialien	33
2.14	Versuchstiere.....	33
2.15	Software.....	33
3	Methoden	34
3.1	Tierexperimentelle Versuche.....	34
3.1.1	Hinterbeinischämie-Modell	34
3.1.2	Cre/loxP-Rekombinationssystem	39
3.1.3	Isolation glatter Muskelzellen aus Mausearten.....	40
3.2	Zellbiologische Methoden.....	43

3.2.1	Kultur von humanen Zellen.....	43
3.2.2	Transfektion von siRNA in HAOSMC.....	45
3.2.3	Stimulation von HAOSMC.....	47
3.3	Molekularbiologische Methoden	48
3.3.1	RNA-Isolation aus Zellen.....	48
3.3.2	RNA-Isolation aus Muskelgewebe.....	49
3.3.3	cDNA-Synthese	49
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	50
3.3.5	Gewinnung von Zelllysaten	59
3.3.6	Gewinnung von Zellüberständen.....	59
3.3.7	Proteinisolierung aus Mausarten.....	60
3.3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford-Assay)	60
3.3.9	Western Blot.....	61
3.3.10	Proteome Profiler™ Antibody Array	65
3.4	Immunfluoreszenzfärbung und Histologie.....	68
3.4.1	Einbetten und Gefrierschneiden der Muskelpräparate	68
3.4.2	Immunfluoreszenzfärbung der Muskelpräparate.....	68
3.4.3	Immunfluoreszenzfärbung der isolierten vaskulären glatten Muskelzellen	70
3.5	Mikroskopie und quantitative Bildanalyse.....	71
3.5.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	71
3.6	Statistik	71
4	Ergebnisse	73
4.1	Teilprojekt 1: Analyse der Expression von BMPER und BMP4 im Hinterbeinischämie-Modell der Maus	75
4.1.1	Laser-Doppler-Messungen über 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von C57BL/6N-Mäusen.....	76

4.1.2	RNA-Expression 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von C57BL/6N-Mäusen	78
4.1.3	RNA-Expression 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von C57BL/6N-Mäusen	82
4.2	Teilprojekt 2: Auswirkung einer BMPER-Defizienz auf die Gefäßregeneration und den Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen	85
4.2.1	Laser-Doppler-Messungen über 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMPER-(teil-)defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen	86
4.2.2	RNA-Expression 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMPER-(teil-)defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen	88
4.2.3	RNA-Expression 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMPER-(teil-)defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen	92
4.2.4	Histologische Analyse 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMPER-(teil-)defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen	95
4.2.5	RNA-Expression von Markern kontraktiver glatter Muskelzellen und von miRNAs in BMPER-defizienten vaskulären glatten Muskelzellen	98
4.2.6	Proteinexpression der Marker kontraktiver glatter Muskelzellen in BMPER-defizienten vaskulären glatten Muskelzellen	102
4.3	Teilprojekt 3: Effekt der Stimulation mittels BMPER und BMP4 auf die Gefäßregeneration und den Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen	105
4.3.1	Laser-Doppler-Messungen über 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von mit BMPER behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen	106
4.3.2	RNA-Expression 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von mit BMPER behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen	108
4.3.3	RNA-Expression der Marker kontraktiver glatter Muskelzellen in vaskulären glatten Muskelzellen nach Stimulation mit BMPER und BMP4	112

4.3.4	Proteinexpression der Marker kontraktile glatter Muskelzellen in vaskulären glatten Muskelzellen nach Stimulation mit BMPER und BMP4	114
4.3.5	Proteome-Array von vaskulären glatten Muskelzellen nach Stimulation mit BMPER	116
4.4	Teilprojekt 4: Auswirkung der BMP4-Defizienz in glatten Muskelzellen auf die Gefäßregeneration.....	117
4.4.1	Nachweis der BMP4-Defizienz in vaskulären glatten Muskelzellen nach Tamoxifenbehandlung.....	118
4.4.2	Laser-Doppler-Messungen über 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMP4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen.....	121
4.4.3	RNA-Expression 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMP4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen.....	126
4.4.4	Histologische Analyse 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMP4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen ..	133
5	Diskussion	137
5.1	BMPER und BMP4 werden im Hinterbeinischämie-Modell reguliert.....	137
5.2	BMPER und BMP4 beeinflussen die Gefäßregeneration und Neovaskularisation im Hinterbeinischämie-Modell und die Eigenschaften vaskulärer glatter Muskelzellen.....	138
5.2.1	BMPER-Defizienz beeinträchtigt die Gefäßregeneration und Neovaskularisation.....	138
5.2.2	Protektive Eigenschaften von BMPER im Hinterbeinischämie-Modell	140
5.2.3	BMPER-Defizienz begünstigt den synthetisierenden Phänotyp von vaskulären glatten Muskelzellen und den Verlust ihrer kontraktile Eigenschaften	141
5.2.4	Einfluss von BMP4 auf den Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen	143
5.2.5	BMP4-Defizienz beeinträchtigt die Gefäßregeneration und führt zum Verlust der kontraktile Eigenschaften vaskulärer glatter Muskelzellen	143
5.3	Mitglieder des BMP-Signalweges beeinflussen sich gegenseitig	144

5.4	Ausblick.....	146
6	Zusammenfassung	149
7	Summary	151
8	Literaturverzeichnis	152
9	Danksagung.....	163

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Atherosklerose, modifiziert nach SILBERNAGL et al. (2013) ⁴	2
Abbildung 2: Phänotyp-Modulation, modifiziert nach DAVIS-DUSENBERY et al. (2011) ⁴⁸	11
Abbildung 3: BMP-Signalweg, modifiziert nach BALEMANS et al. (2002) ¹⁰²	17
Abbildung 4: Darstellung von BMPER und Crossveinless-2, modifiziert nach MOSER et al. (2003) ¹⁰⁸	18
Abbildung 5: Ligatur der <i>A. femoralis</i>	37
Abbildung 6: Immundetektion mittels Chemilumineszenz.....	64
Abbildung 7: Proteome Profiler™ Antibody Array.....	65
Abbildung 8: 4-Well-Multischale	66
Abbildung 9: Immunfluoreszenz.....	69
Abbildung 10: Verlauf der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i> von C57BL/6N-Wildtypmäusen.....	78
Abbildung 11: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	79
Abbildung 12: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	80
Abbildung 13: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	81
Abbildung 14: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	81

Abbildung 15: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	82
Abbildung 16: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	83
Abbildung 17: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	84
Abbildung 18: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	84
Abbildung 19: Vergleich des Verlaufs der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i> von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrollmäusen	88
Abbildung 20: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	89
Abbildung 21: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	90
Abbildung 22: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	91
Abbildung 23: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten	

Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	91
Abbildung 24: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	93
Abbildung 25: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	93
Abbildung 26: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	94
Abbildung 27: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	95
Abbildung 28: Fläche der Media im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	96
Abbildung 29: Kapillaranzahl im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	98
Abbildung 30: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von BMPER und Markern kontraktiver glatter Muskelzellen in HAOSMCs nach si(BMPER)-RNA Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5 (nach 24 h, 48 h und 72 h)	99
Abbildung 31: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von miRNAs in HAOSMCs nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5 (nach 48 h und 72 h)	101
Abbildung 32: Expression von BMPER und Markern kontraktiver glatter Muskelzellen in HAOSMCs 72 h nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5	104

Abbildung 33: Vergleich des Verlaufs der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i> von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen und mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen.....	108
Abbildung 34: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	109
Abbildung 35: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	110
Abbildung 36: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	110
Abbildung 37: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	111
Abbildung 38: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern kontraktiler glatter Muskelzellen in HAOSMCs 24 h nach Stimulation mit BMPER und BMP4, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle.....	113
Abbildung 39: Expression von SMA als repräsentativer Marker kontraktiler glatter Muskelzellen in HAOSMCs 48 h nach Stimulation mit BMPER und BMP4, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle.....	115
Abbildung 40: Expressionsanalyse verschiedener Proteine in HAOSMCs 48 h nach Stimulation mit BMPER, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle.....	117
Abbildung 41: Isolierte vSMCs aus Mausaorten.....	118

Abbildung 42: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von BMP4 in den aus Mausearten isolierten glatten Muskelzellen von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen.....	119
Abbildung 43: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern kontraktiler glatter Muskelzellen in den aus Mausearten isolierten glatten Muskelzellen von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen	120
Abbildung 44: Expression von BMP4 in den aus Mausearten isolierten glatten Muskelzellen von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen	121
Abbildung 45: Vergleich des Verlaufs der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i> von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} -Knockout-Mäusen und unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen.....	123
Abbildung 46: Vergleich des Verlaufs der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i> von mit Tamoxifen behandelten Ctr ^{iΔSMC} -Mäusen und unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen.....	126
Abbildung 47: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF-β-Superfamilie im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	128
Abbildung 48: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	129
Abbildung 49: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF-β-Superfamilie im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	130
Abbildung 50: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten	

Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} - Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp- Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	131
Abbildung 51: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von BMP4 und MYH11 als repräsentativer Marker glatter Muskelzellen im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten Ctr ^{iΔSMC} -Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	132
Abbildung 52: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von BMP4 und MYH11 als repräsentativer Marker glatter Muskelzellen im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten Ctr ^{iΔSMC} -Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	132
Abbildung 53: Fläche der Media im <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} - Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp- Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	134
Abbildung 54: Kapillaranzahl im <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{iΔSMC} -Knockout- Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp- Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	136

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Enzymlösung.....	41
Tabelle 2: Zusammensetzung des Kulturmediums.....	41
Tabelle 3: Zellzahl und Volumina für die Versuche mit HAOSMC	45
Tabelle 4: Versuchsansätze für die Transfektion	46
Tabelle 5: Ansatz 1 für die siRNA-Transfektion	46
Tabelle 6: Ansatz 2 für die siRNA-Transfektion (siRNA: c = 20 µmol/l)	46
Tabelle 7: Ansatz 2 für die siRNA Transfektion (siRNA: c = 50 µmol/l).....	46
Tabelle 8: Versuchsansätze für die Stimulation	47
Tabelle 9: RNA-Isolation aus Zellen.....	48
Tabelle 10: RNA-Isolation aus Muskelgewebeproben.....	49
Tabelle 11: DNA-Extraktion aus Schwanzspitzenbiopsien	52
Tabelle 12: Versuchsansätze für die Genotypisierungs-PCR von BMPER	53
Tabelle 13: Versuchsansatz für die Genotypisierungs-PCR von MYH11-Cre	53
Tabelle 14: Versuchsansatz für die Genotypisierungs-PCR von BMP4flox	53
Tabelle 15: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von BMPER.....	54
Tabelle 16: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von MYH11-Cre	54
Tabelle 17: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von BMP4flox	54
Tabelle 18: Formel zur Berechnung der Expression des Zielgens	55
Tabelle 19: Versuchsansatz der quantitativen Real-Time-PCR.....	56
Tabelle 20: Protokoll der quantitativen Real-Time-PCR.....	56
Tabelle 21: Versuchsansatz für die TaqMan™-Stem-loop-RT	58
Tabelle 22: Protokoll für die TaqMan™-Stem-loop-RT-PCR.....	58
Tabelle 23: Versuchsansatz für die TaqMan™-Real-Time-PCR	58
Tabelle 24: TaqMan™-Real-Time-PCR-Protokoll.....	59
Tabelle 25: Zusammensetzung der Gele für die Gelelektrophorese.....	62
Tabelle 26: Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese.....	62
Tabelle 27: Vorbereitung der Reagenzien für den Proteome-Array	66
Tabelle 28: Probenvorbereitung für den Proteome-Array.....	67

Tabelle 29: Proteome-Array-Protokoll	67
Tabelle 30: Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung der Gefrierschnitte	70
Tabelle 31: Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung der isolierten vSMCs.....	71
Tabelle 32: Versuchsgruppe für Teilprojekt 1 (Zeitraum: 14 Tage)	74
Tabelle 33: Versuchsgruppe für Teilprojekt 1 (Zeitraum: 7 Tage)	74
Tabelle 34: Versuchsgruppen für Teilprojekt 2 (Zeitraum: 14 Tage).....	74
Tabelle 35: Versuchsgruppen für Teilprojekt 2 (Zeitraum: 7 Tage)	75
Tabelle 36: Versuchsgruppen für Teilprojekt 3	75
Tabelle 37: Versuchsgruppen für Teilprojekt 4	75
Tabelle 38: Versuchsgruppen für Teilprojekt 4 (begleitender Kontrollversuch).....	75
Tabelle 39: Versuchsgruppen für Teilprojekt 4 (Nachweis der BMP4- Defizienz)	75
Tabelle 40: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion von C57BL/6N- Wildtypmäusen	78
Tabelle 41: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	80
Tabelle 42: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	80
Tabelle 43: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	81
Tabelle 44: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	82

Tabelle 45: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	83
Tabelle 46: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	83
Tabelle 47: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	84
Tabelle 48: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	85
Tabelle 49: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion des BMPER ^{+/-} -Knockout-Mausstammes im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrollgruppe	88
Tabelle 50: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	90
Tabelle 51: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	90
Tabelle 52: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	91
Tabelle 53: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem <i>M. gastrocnemius</i> des operierten	

Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	92
Tabelle 54: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	93
Tabelle 55: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem <i>M. quadriceps femoris</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	94
Tabelle 56: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>)	94
Tabelle 57: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem <i>M. gastrocnemius</i> des operierten Beines von BMPER ^{+/-} -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der <i>A. femoralis</i>).....	95
Tabelle 58: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für BMPER und Marker kontraktile glatter Muskelzellen aus HAOSMCs nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5 (nach 24 h, 48 h und 72 h)	100
Tabelle 59: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für miRNAs aus HAOSMCs nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5 (nach 48 h und 72 h)	102
Tabelle 60: Übersicht der mittels Western Blot erhobenen Daten für BMPER und Marker kontraktile glatter Muskelzellen aus HAOSMCs 72 h nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5	105
Tabelle 61: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion der mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtyp-Gruppe im Vergleich mit der mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollgruppe.....	108

Tabelle 62: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)..... 109

Tabelle 63: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)..... 110

Tabelle 64: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)..... 111

Tabelle 65: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)..... 111

Tabelle 66: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker kontraktile glatter Muskelzellen in HAOSMCs 24 h nach Stimulation mit BMPER und BMP4, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle..... 114

Tabelle 67: Übersicht der mittels Western Blot erhobenen Daten für SMA in HAOSMCs 48 h nach Stimulation mit BMPER und BMP4, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle 115

Tabelle 68: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker kontraktile glatter Muskelzellen in den aus Mausearten isolierten glatten Muskelzellen von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iASMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen 120

Tabelle 69: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion des mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iASMC}-Knockout-Mausstammes im Vergleich mit der unbehandelten Wildtyp-Kontrollgruppe 123

Tabelle 70: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion des mit Tamoxifen behandelten Ctr^{iΔSMC}-Mausstammes im Vergleich mit der unbehandelten Wildtyp-Kontrollgruppe 126

Tabelle 71: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF-β-Superfamilie aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iΔSMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*) 128

Tabelle 72: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iΔSMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*) 129

Tabelle 73: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF-β-Superfamilie aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iΔSMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*) 130

Tabelle 74: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iΔSMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*) 131

Tabelle 75: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für BMP4 und MYH11 aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten Ctr^{iΔSMC}-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*) 132

Tabelle 76: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für BMP4 und MYH11 aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten Ctr^{iΔSMC}-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*) 133

IV. Abkürzungsverzeichnis

Im Abkürzungsverzeichnis werden in dieser Arbeit verwendete Abkürzungen, die nicht im Duden vorkommen, in alphabetischer Reihenfolge gelistet. Nicht aufgeführt sind SI-Einheiten und ihre Präfixe, gebräuchliche gesetzlich von SI-Einheiten abgeleitete Einheiten sowie chemische Elemente und chemische Formeln.

Abkürzung	Definition
A.	arteria (Arterie)
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest	aqua destillata (destilliertes Wasser)
AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BMP	bone morphogenetic protein (knochenmorphogenetisches Protein)
BMPER	BMP endothelial cell precursor-derived regulator
BMPR	BMP-Rezeptor
BSA	bovin serum albumin (Rinderalbumin)
CD31	cluster of differentiation 31 (Thrombozyten-Endothelzellen Adhäsionsmolekül, auch PECAM-1)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CNN	Calponin
Cre	cyclization recombination
Ct	cycle threshold
CV-2	Crossveinless-2
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	desoxyribonuclease (Desoxyribonuklease)
dNTPs	Desoxyribonukleotidphosphate
EBM	Endothelzell-Basalmedium

ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FBS	fetal bovine serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fwd	forward (vorwärts)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HAOSMC	human aortic smooth muscle cells (humane aortale glatte Muskelzellen)
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
hRP II	humane RNA-Polymerase II
IgG	Immunglobulin G
KG	Körpergewicht
LDPI	Laser Doppler perfusion imaging
loxP	locus of crossing over in P1
M.	musculus (Muskel)
miRNA	mikroRNA
mRNA	messenger RNA
MYH11	smooth muscle Myosin heavy chain (auch: SM-MHC)
n	Anzahl
N.	nervus (Nerv)
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
Oligo(dT)s	Desoxythymidin-Oligonukleotide
PAH	pulmonale arterielle Hypertonie
PASMC	pulmonary arterial smooth muscle cell (pulmonale arterielle glatte Muskelzelle)
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	platelet-derived growth factor (Plättchen-Wachstumsfaktor)
prä-OP	präoperativ
post-OP	postoperativ

qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
rev	reverse (rückwärts)
rhBMP4	rekombinantes humanes BMP4
rhBMPER	rekombinantes humanes BMPER
RIPA	radioimmunprecipitation assay
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROI	region of interest (Region von Interesse)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR (Echtzeit-PCR)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
siRNA	small interfering RNA (kleine eingreifende RNA)
SMA	smooth muscle actin (auch: α -SMA)
Smad	small body size (S) - mothers against decapentaplegic (MAD)
SMC	smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)
SRF	serum response factor
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAGLN	Transgelin (auch: SM22- α)
Taq	thermus aquaticus
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Temp	Temperatur
TGF- β	transforming growth factor- β (transformierender Wachstumsfaktor)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tsg	twisted gastrulation
V.	vena (Vene)

vSMC	vascular smooth muscle cell (vaskuläre SMC)
w/o	without
WT	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

1 Einleitung

Die letzten Jahre haben einen großen Fortschritt in der Erforschung von Erkrankungen des Gefäßsystems gezeigt mit zahlreichen Erkenntnissen in Bezug auf die zugrunde liegende Pathogenese und die Therapiemöglichkeiten. Nichtsdestotrotz bilden kardiovaskuläre Erkrankungen noch immer die weltweit häufigste Todesursache¹. Viele dieser Vaskulopathien werden mit Arteriosklerose assoziiert, bei der es zu Veränderungen an der Gefäßwand kommt. Arterien bilden die Schlüsselgefäße bei diesen Erkrankungen; infolgedessen ist die Untersuchung des Arterienwachstums und der Gefäßreparatur sowie der beteiligten Faktoren und Einflüsse von essentieller Bedeutung.

1.1 Arteriosklerose und die periphere arterielle Verschlusskrankheit

Arteriosklerose

Viele vaskuläre Erkrankungen werden unter der allgemeinen Bezeichnung der Arteriosklerose zusammengefasst. Die Arteriosklerose beschreibt die Verhärtung und den damit einhergehenden Verlust der Elastizität und Dehnbarkeit der betroffenen Gefäße. Dabei handelt es sich hauptsächlich um mittlere bis große Arterien. Sind kleine Arterien, sog. Arteriolen, betroffen, wird dies entsprechend als Arteriolosklerose bezeichnet. Die Atherosklerose beschreibt den zugrunde liegenden Prozess der oben genannten Erkrankungen und wird in Abbildung 1 dargestellt. Infolge der Beschädigung und Dysfunktion des Endothels entsteht eine Entzündungsreaktion mit Einwanderung von verschiedenen Zellen in die *Tunica intima* und eine daraus resultierende Bildung von Plaques, Verengung und Versteifung des Gefäßes. Gelegentlich rupturieren Plaques, an denen sich Thromben bilden und zu einer vollständigen Gefäßverschluss führen können^{2,3}.

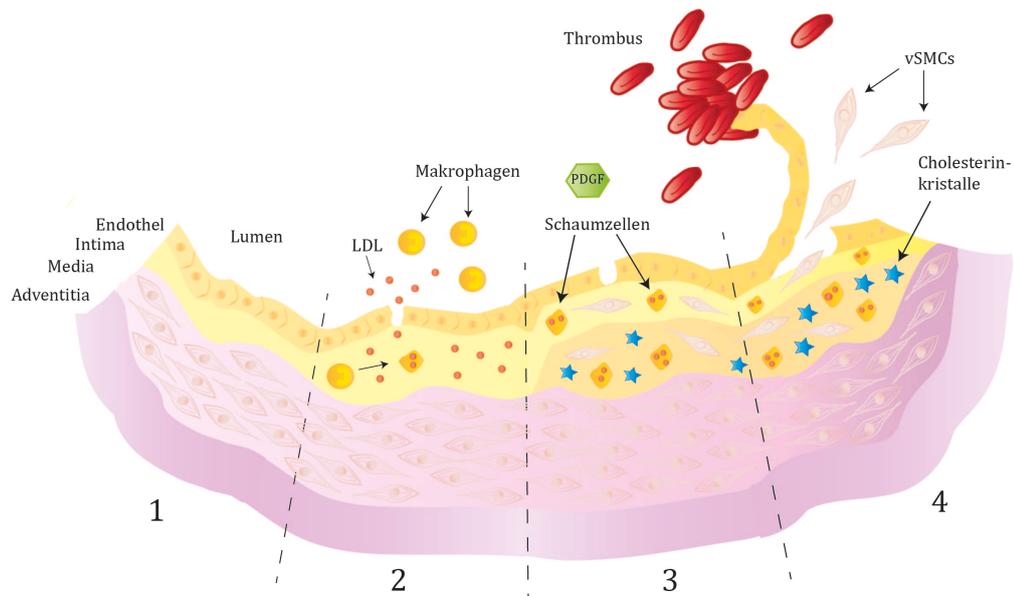


Abbildung 1: Atherosklerose, modifiziert nach SILBERNAGL et al. (2013)⁴

- (1) Darstellung der Gefäßwandschichten einer gesunden Arterie.
- (2) Aufgrund einer endothelialen Dysfunktion wandern Lipoproteine niedriger Dichte (low-density lipoprotein, LDL) in die Intima und werden dort von Monozyten, die sich zu Makrophagen differenzieren, unter Bildung von Zytokinen abgebaut. Die Makrophagen werden anschließend zu cholesterinhaltigen Schaumzellen, die sog. „fatty streaks“ (engl., Fettstreifen) bilden.
- (3) Plättchen-Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor, PDGF) wird freigesetzt und bewirkt die Migration und Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMCs) aus der Media in die Intima, wo diese eine aus Elastin, Kollagen und Proteoglykanen bestehende fibröse Kappe bilden, die zusammen mit den *fatty streaks* als Plaque bezeichnet wird. Die zusätzliche Einlagerung von Cholesterinkristallen in der Gefäßwand, die aufgrund der Plaques von Lipoproteinen hoher Dichte (high-density lipoprotein, HDL) nicht mehr abgebaut werden können, führen zur Versteifung der Arterie.
- (4) Plaque rupturiert; es kommt zur Thrombenbildung.

Bei der Arteriosklerose handelt es sich um einen chronischen Prozess mit schwerwiegenden Folgeerkrankungen. Zu den häufigsten Erkrankungen zählen die koronare Herzkrankheit (KHK), der Myokardinfarkt, der Apoplex, Aneurysmen und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK)^{2,3}.

Periphere arterielle Verschlusskrankheit

Die PAVK, auch „Schaufensterkrankheit“ oder „Raucherbein“ genannt, bezeichnet die Einschränkung der Durchblutung der die Extremitäten versorgenden Arterien durch Stenosen oder Okklusionen und tritt am häufigsten in den unteren Extremitäten auf. Die PAVK wird hauptsächlich

durch Arteriosklerose hervorgerufen. Die Prävalenz, an der PAVK zu erkranken, ist für Männer höher als für Frauen und steigt für beide Geschlechter mit dem Alter kontinuierlich an. Als Risikofaktoren gelten zudem Übergewicht, Diabetes mellitus, Rauchen, arterielle Hypertonie, Fettstoffwechselstörung mit Hyperlipoproteinämie und genetisch bedingte Veranlagungen. Bei der PAVK handelt es sich meistens um einen chronischen Prozess, der in 4 Stadien unterteilt werden kann. Die beginnende Gefäßverengung im ersten Stadium bleibt meist unbeobachtet. Patienten klagen lediglich über Schmerzen bei hoher Belastung. Im zweiten Stadium, das als *Claudicatio intermittens* (zeitweiliges Hinken) bezeichnet wird, müssen Patienten aufgrund von Schmerzen beim Gehen häufig Pausen machen. Dieses Stadium kann je nach der bis zum Auftreten der Schmerzen zurückgelegten Gehstrecke unterteilt werden (IIA: > 200m Gehstrecke, IIB: < 200m Gehstrecke). Bei Betroffenen, die sich im dritten Stadium befinden, treten Schmerzen bereits in Ruhephasen auf. Diese äußern sich häufig nachts durch krampfartige Schmerzen, insbesondere in der Wade, aufgrund der verminderten Sauerstoffversorgung des Gewebes. Im vierten und letzten Stadium entstehen zusätzlich Nekrosen und schlecht heilende offene Wunden. Das Risiko dieser Krankheit besteht zum einen in den schlecht heilenden Wunden und der Bildung von Thromben, die die Gefäße verstopfen, und zum anderen sind bei diesen Patienten häufig weitere arterielle Gefäße wie die Aorta, Karotiden und Koronararterien betroffen, was zu einer KHK, einem Myokardinfarkt, einem Apoplex oder einem Aortenaneurysma führen kann. Die bisherige Therapie in den Anfangsstadien beinhaltet das Abstellen der Risikofaktoren und regelmäßiges Gehtraining sowie die Einnahme durchblutungsfördernder Substanzen und von Gerinnungshemmern. In späteren Stadien sind häufig operative Eingriffe notwendig. Dazu zählen bspw. das Anlegen eines Gefäßbypasses, das Ausschälen von atherosklerotischem Material (Thrombendarteriektomie), die Aufdehnung der Engstelle (perkutane transluminale Angioplastie) oder zuletzt die Amputation der betroffenen Gliedmaße³.

Veterinärmedizinischer Bezug

In der Veterinärmedizin wird die primäre Arteriosklerose mit klinischer Manifestation, wie sie vorwiegend beim Menschen vorkommt, nur selten beschrieben. Speziell bei landwirtschaftlichen Tieren wird Arteriosklerose kaum erwähnt, was jedoch darauf zurückgeführt werden kann, dass viele dieser Tiere als Nutztiere gehalten werden und somit kein hohes Alter erreichen⁵. Bei Hunden zeigt sich eine meistens milde sekundäre Arteriosklerose, die überwiegend klinisch asymptomatisch bleibt. Begünstigend wirken erfahrungsgemäß Adipositas und Hyperlipidämie sowie eine Hypothyreose und bestimmte rassebedingte Prädispositionen⁶. Ausnahmen mit klinischer Manifestation bilden hierbei in der Literatur beschriebene Fälle. Dazu zählt u. a. der veröffentlichte Fall einer idiopathischen Arteriosklerose bei einem Afghanischen Windhund, die sich in Form der *Claudicatio intermittens* klinisch manifestierte⁷. Des Weiteren wurde aufgrund einer Hypercholesterinämie Arteriosklerose ebenfalls beim Kaninchen beobachtet^{8,9}. Dieses stellt somit ein für die Forschung der Arteriosklerose eingesetztes Tiermodell dar¹⁰. Die wohl häufigste betroffene Tierart mit klinischer Symptomatik sind Papageien, insbesondere Amazonen¹¹. Arteriosklerose ist somit auch in der Veterinärmedizin vertreten, auch wenn sie dort eine untergeordnete Rolle spielt.

1.2 Entstehung und Aufbau von Blutgefäßen

Das Blutgefäßsystem übernimmt neben seiner Funktion als Transportsystem von Blut und der Sauerstoffversorgung lebenswichtiger Organe weitere wichtige Aufgaben. Somit dient es u. a. auch als Transportsystem für Nährstoffe, Stoffwechselprodukte, Hormone, Zytokine und Immunzellen. Es spielt eine Rolle beim Gastransport und -austausch sowie bei der Thermo- und pH-Regulation, der Immunabwehr und der Kommunikation³.

Für die Entstehung von Blutgefäßen werden drei Mechanismen unterschieden: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.

1.2.1 Vaskulogenese

Als Vaskulogenese wird die Bildung des primären Gefäßgeflechtes bezeichnet, das aus mesodermalen Angioblasten, die sich zu reifen Endothelzellen differenziert haben, entsteht¹². Dieser Prozess der *De-novo*-Gefäßentstehung spielt hauptsächlich in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle¹³⁻¹⁵.

1.2.2 Angiogenese

Die Angiogenese ist definiert als die Aussprossung und Verzweigung bereits bestehender Gefäßsysteme mit Entwicklung von kleinen Kapillaren¹². Hierbei handelt es sich um einen physiologischen Prozess, der u. a. eine wichtige Funktion in der Entwicklung der embryonalen Lunge¹⁶, in dem weiblichen Reproduktionszyklus^{13,17} und in der Wundheilung^{13,14} spielt. Unter pathologischen Bedingungen wird die Angiogenese häufig im Zusammenhang mit Inflammation und dem Tumorwachstum^{13,14} beschrieben. Sie wird hauptsächlich durch Hypoxie und Ischämie induziert. Durch den angiogenen Stimulus kommt es nach Auflockerung der Zell-Zell-Kontakte und dem Abbau der Extrazellulärmatrix zur Migration und Proliferation der Endothelzellen und somit zur Bildung einer Kapillare¹⁵. Von der klassischen Angiogenese durch Aussprossung (sprouting angiogenesis) wird die nichtsprossende intussuszeptive Angiogenese (intussusceptive, splitting oder non-sprouting angiogenesis) unterschieden^{12,16}. Diese zeichnet sich durch das längliche Falten des Gefäßes mit Bildung von transluminalen Brücken, ausgehend von der Kapillarwand in das Kapillarlumen, mit daraus resultierender Teilung des Gefäßes aus. Diese Form wird v. a. in der Entwicklung der embryonalen Lunge beschrieben¹⁶, aber auch in Nieren¹⁸, Knochen¹⁹, Muskeln²⁰ und vielen weiteren Strukturen²¹.

1.2.3 Arteriogenese

Die Arteriogenese beschreibt den Prozess des äußeren Umbaus bereits existierender Kollateralarterien und unterscheidet sich wesentlich von den beiden anderen Mechanismen der Blutgefäßentstehung^{12,22}. Während die Angiogenese hauptsächlich durch Hypoxie und Ischämie ausgelöst wird und

auf der Migration und Proliferation von Endothelzellen beruht, spielen in der Arteriogenese vaskuläre glatte Muskelzellen durch Anpassung ihres Phänotyps eine entscheidende Rolle (siehe 1.3.3). Bei Verschluss großer Gefäße sind Kollateralarterien in der Lage, die Blutversorgung des Gewebes aufrecht zu erhalten (für den Patienten häufig asymptomatisch) und somit die Ischämie des distalen Gewebes zu verhindern²³. Ungleich der Angiogenese ist dieser Prozess unabhängig von der Sauerstoffversorgung des Gewebes²⁴. Er beruht hauptsächlich auf erhöhten Schub- und Scherkräften, veränderten Blutflussbedingungen (shear stress) und somit erhöhtem Wanddruck der Kollateralarterien, welches insgesamt zur Aktivierung von Entzündungszellen wie z. B. Monozyten führt²⁵⁻²⁸. Dieses Phänomen kann insbesondere am Beispiel der PAVK beobachtet werden: distal im Fuß herrscht eine verminderte Sauerstoffversorgung, aber proximal im gesunden Gewebe und bei normaler Sauerstoffversorgung bilden sich Kollateralarterien²³. Die Arteriogenese beruht auf einem komplexen Zusammenspiel aus verschiedenen Wachstumsfaktoren, Zellen, Zytokinen, proteolytischen Enzymen und äußeren Einwirkungen^{29,30}; dabei handelt es sich nicht um eine *De-novo*-Gefäßentstehung³¹.

Die Arteriogenese bildet bei Okklusion oder Stenose der Femoralarterie die führende Kraft im Prozess der Revaskularisation im ischämischen Bein²⁹. Während bei der Angiogenese die Kapillardichte deutlich langsamer zunimmt und relativ kleine, dünnwandige Kapillaren distal der Okklusion im Fuß gebildet werden, entsteht bei der Arteriogenese auf Höhe der Okklusion innerhalb weniger Tage ein robustes Netzwerk aus Kollateralarterien, die durch eine vermehrte Gewebepfusion und Dilatation präexistierender Gefäße der Ischämie entgegenwirken³⁰. Mit zunehmendem Alter bleibt zwar häufig die Fähigkeit zur Angiogenese zum Beheben von kleineren Wunden bestehen, jedoch ist die Fähigkeit zur Arteriogenese, die essentiell ist bei Okklusionen und Stenosen größerer Gefäße, nur noch vermindert vorhanden³². Da es sich bei vielen PAVK-Betroffenen hauptsächlich um ältere Patienten handelt, steht somit die Stimulation zur Arteriogenese im Fokus der Forschung dieses Krankheitsbildes.

1.2.4 Gefäßaufbau

Die Gefäßwand aller großen Blutgefäße setzt sich aus drei Schichten zusammen. Ausgehend vom Lumen bildet die *Tunica intima*, bestehend aus Endothel und Bindegewebe, die innerste Schicht. Dieser schließt sich die *Tunica media* an. Diese kräftige Schicht, hauptsächlich bestehend aus elastischen Fasern, Kollagen und glatten Muskelzellen, ist insbesondere in arteriellen Gefäßen stark ausgeprägt und bei venösen Gefäßen schwächer ausgeprägt mit wenig glatten Muskelzellen und hauptsächlich Bindegewebe. Des Weiteren wird an dieser Stelle zwischen den herznahen Arterien des elastischen Typs (Media mit vielen elastischen Fasern) und den herzfernen Arterien des muskulären Typs (Media mit überwiegend glatten Muskelzellen für die Blutgefäßregulation) unterschieden. Die äußerste Schicht wird von der *Tunica adventitia* (oder auch *Tunica externa* genannt) gebildet und enthält Kollagenfasern und elastische Fasern. Die Kapillaren, die der Mikrozirkulation dienen, sind die kleinsten Gefäße und setzen sich ausschließlich aus einer flachen Endothelzellschicht und der Basalmembran zusammen³³.

1.3 Vaskuläre glatte Muskelzellen (vSMCs)

Glatte Muskelzellen (Myozyten) bilden als *Tunica muscularis* der meisten Hohlorgane (Ausnahmen sind hierbei das Herz und die Speiseröhre, die aus quergestreifter Muskulatur bestehen) bzw. als *Tunica media* der Blutgefäße den muskulären Teil dieser Strukturen, der sich der inneren Auskleidung, d. h. der *Tunica mucosa* und *Tunica submucosa* der Hohlorgane bzw. *Tunica intima* der Blutgefäße, anschließt. Die Aufgabe der glatten Muskulatur besteht hauptsächlich in ihrer Kontraktion und Relaxation. Dieser Prozess der Kontraktion ist im Vergleich zur Skelettmuskulatur zwar langsamer, jedoch stärker (Verkürzung bis zu einem Drittel der Grundlänge)³⁴ und kann ohne Anzeichen von Ermüdung über einen langen Zeitraum aufrechterhalten werden. Die glatte Muskulatur unterliegt anders als die Skelettmuskulatur nicht der willkürlichen Steuerung.

Die Muskelzellen der Blutgefäße werden als vaskuläre glatte Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMCs) bezeichnet.

1.3.1 Ursprung

Der Ursprung von vSMCs wurde in den letzten Jahren mehrfach in der Literatur beschrieben, ist aber noch immer nicht vollständig geklärt^{35,36}. Zusätzlich zu dem bisherigen Wissen, dass der Großteil der vSMCs aus dem Mesoderm stammt³⁷, ergaben bisherige Untersuchungen mindestens 7 verschiedene Ursprünge für vSMCs im Wirbeltierembryo^{35,36}. Die Erforschung von aus der Neuralleiste ausgewanderten Zellen ergab, dass diese zwar den Ursprung für vSMCs des Aortenbogens und der *Aorta ascendens* bilden, nicht jedoch für vSMCs der *Aorta descendens*, der Pulmonalarterien und der Koronararterien. Für letztere konnte das Proepikard als Ursprungsgewebe identifiziert werden, wohingegen die vSMCs der Aortenwurzel und des *Truncus pulmonalis* aus dem sekundären Herzfeld stammen. Weitere Ursprünge bilden ebenfalls Somiten für die vSMCs der *Pars thoracica* der *Aorta descendens*, das viszerale Mesoderm für die *Pars abdominalis* der *Aorta descendens* sowie das Mesothel und Stamm- und Vorläuferzellen.

Die Diversität der Ursprünge von vSMCs oder das „Mosaik“, wie von MAJESKY et al. (2007) beschrieben³⁵, könnte von großer Bedeutung für die Funktion und Erkrankungen der Blutgefäße sein. Eine Hypothese ist, dass die unterschiedlichen Reaktionen auf systemische Reize von vSMCs unterschiedlicher Lokalisation auf ihren embryonalen Ursprung zurückzuführen sind³⁸.

1.3.2 Eigenschaften und Funktion

Glatte Muskelzellen stellen sich als längliche, spindelförmige Zellen mit einem zentral gelegenen länglich bis ovalen Zellkern dar. Sie sind vollständig von retikulären Fasern und der Basallamina umgeben. Länge und Durchmesser glatter Muskelzellen variieren je nach Ort und ihrem Kontraktionszustand. Somit besitzen die vSMCs in Blutgefäßen eine Länge von 15–20 µm und einen Durchmesser von 5–8 µm, wohingegen in einem

graviden Uterus glatte Muskelzellen eine Länge von über 500 µm erreichen können³⁹. Die Proteine Aktin und Myosin bilden den wichtigsten Bestandteil des kontraktiven Apparates aller Muskelzellen. In glatten Muskelzellen sind im Vergleich zur quergestreiften Muskulatur verhältnismäßig mehr Aktinfilamente vorhanden, die durch sog. „dense bodies“ (Verdichtungszone) verankert werden, die untereinander mit intermediären Filamenten verbunden sind und ein elastisches Zytoskelett bilden⁴⁰. Die parallele Ausrichtung der Filamente, der die quergestreifte Muskulatur ihren Namen verdankt, fehlt in glatten Muskelzellen⁴⁰.

Die Funktion von vSMCs besteht hauptsächlich darin, durch Kontraktion und Relaxation den Lumendurchmesser der Gefäße zu regulieren und somit den Blutdruck aufrechtzuerhalten. Des Weiteren besitzen sie die Fähigkeit, wichtige Komponenten der extrazellulären Matrix zu synthetisieren. Dazu zählen u. a. Kollagen, Elastin und Proteoglykane^{41,42}.

Eine weitere Eigenschaft der vSMCs, die sie von anderen Muskelzellen unterscheidet, ist die Fähigkeit, ihren Phänotyp zu modulieren. Während es sich bei Skelettmuskelzellen und Kardiomyozyten um vollständig differenzierte Zellen handelt, können vSMCs unter bestimmten Umständen zwischen dem kontraktiven und synthetisierenden Phänotyp wechseln⁴³.

1.3.3 Phänotyp-Modulation

Mit dem Begriff der „Phänotyp-Modulation“ (phenotypic modulation) beschrieben CHAMLEY-CAMPBELL et al. (1979) erstmals die Fähigkeit der vSMCs, ihren Phänotyp spontan und reversibel zu ändern⁴¹. Weitere Bezeichnungen, die ebenfalls in diesem Zusammenhang in der Literatur häufig verwendet werden, sind „Phänotyp-Switch“⁴² (phenotypic switch) und „Dedifferenzierung“ vaskulärer SMCs. Letztere Bezeichnung eignet sich nur bedingt, da es sich um einen reversiblen Prozess handelt und vSMCs nicht zu ihrem ursprünglichen Zustand der multipotenten Zelle zurückkehren⁴¹.

Kontraktiver und synthetisierender Phänotyp

Differenzierte reife vSMCs liegen meistens im kontraktiven Zustand vor, wie in 1.3.2 beschrieben, mit vielen kontraktiven Filamenten. Sie synthetisieren

nur sehr wenig Komponenten für die extrazelluläre Matrix und proliferieren extrem selten⁴⁴. Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der Kontraktion des Gefäßes (kontraktiler Phänotyp). Unter bestimmten Bedingungen wie der Gefäßentwicklung in der Embryonalphase oder bei Gefäßverletzungen können vSMCs ihren Phänotyp variieren und einen transienten reversiblen synthetisierenden Phänotyp annehmen^{41,45} (Abbildung 2). Dabei kommt es in den vSMCs zu einer erhöhten Proliferations- und Migrationsrate und dem strukturellen „Remodelling“⁴². Die vSMCs verlieren ihre zelltypische längliche, spindelförmige Struktur und – einhergehend mit der Abnahme der Expression kontraktiler Proteine – die Fähigkeit zur spontanen Kontraktion und nehmen ein epitheloid- bis rhomboidförmiges Aussehen an mit einem vergrößerten Zellkern und der Zunahme wichtiger Organellen für die Proteinbiosynthese (Endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen)⁴¹. Die Bezeichnung synthetisierender Phänotyp beruht auf der vermehrten Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix (Elastin, Proteoglykane, Kollagen) der modulierten vSMCs^{42,44}. Der kontraktile und der synthetisierende Phänotyp bilden hier nur die zwei Extreme des weiten Spektrums von Phänotypen⁴⁶. An dieser Stelle ist es wichtig, die phänotypische Plastizität der vSMCs von der mechanischen Plastizität abzugrenzen, bei der die vSMCs ihren kontraktilen Phänotyp behalten und es zu einer zeitabhängigen subzellulären Reorganisation des kontraktilen Apparates als Antwort auf Änderungen der Muskellänge kommt⁴⁷.

Die Heterogenität von vSMCs – mit dem kontraktilen Phänotyp für die hämodynamische Stabilität des Gefäßes auf der einen Seite und dem synthetisierenden Phänotyp für Gefäßentwicklung und -umbau auf der anderen Seite – spielt somit eine äußerst wichtige Rolle für den Erhalt der Gefäße⁴⁶.

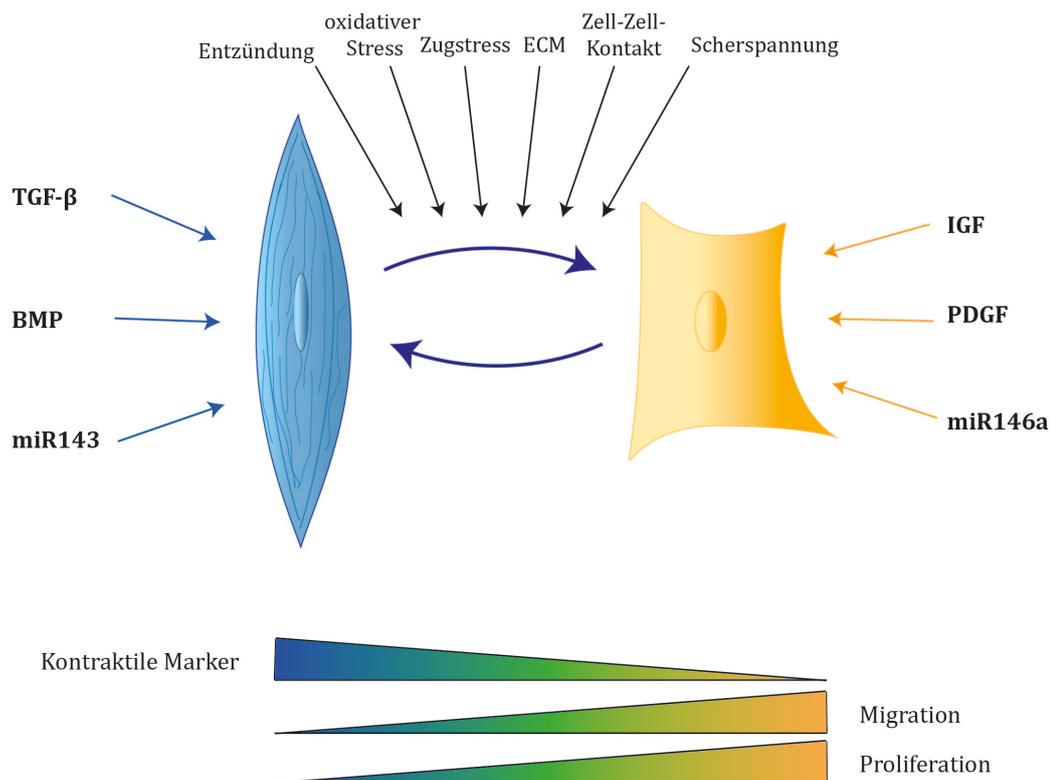


Abbildung 2: Phänotyp-Modulation, modifiziert nach DAVIS-DUSENBERY et al. (2011)⁴⁸

Schematische Darstellung des kontraktilen und des synthetisierenden Phänotyps vaskulärer glatter Muskelzellen und der möglichen Einflüsse, die die Phänotyp-Modulation verursachen, sowie der Faktoren, die den jeweiligen Phänotypen begünstigen.

BMPs = bone morphogenetic proteins, ECM = extracellular matrix, IGF = insulin-like growth factor, miR = mikroRNA, PDGF = platelet-derived growth factor, TGF-β = transforming growth factor-β

Einflüsse und Nachteile der Phänotyp-Modulation

Die Modulation des kontraktilen Zustandes zu einem transienten proliferativen Zustand mit erhöhter Migration ist die physiologische Antwort auf Gefäßverletzungen⁴². Unter pathologischen Bedingungen, wie der Arteriosklerose (siehe 1.1), ist dieser physiologische Prozess jedoch beeinträchtigt, und es entsteht aufgrund der Prädisposition dieser Zellen eine irreversible und langfristige Phänotyp-Modulation. Diese äußert sich durch die abweichende Proliferation und Migration von vSMCs, die erhöhte Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten in Plaques³⁷ und infolgedessen die Begünstigung der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. Häufig in Frage gestellt wird die Annahme, dass die seit langem in der Literatur

beschriebene Phänotyp-Modulation von vSMCs, die aus der Media in die Intima wandern und somit zum Voranschreiten der Arteriosklerose beitragen, die einzige Erklärung für das Vorkommen von vSMCs in atherosklerotischem Gewebe ist. Demnach können sich in der Media⁴⁹ und Adventitia⁵⁰ sitzende Subpopulationen von Stamm- und Vorläuferzellen genauso wie freie im Blut zirkulierende Vorläuferzellen⁵¹ zu vSMCs differenzieren und in die Intima migrieren. Ebenso können sich Epithelzellen durch die epitheliale-mesenchymale Transition (EndMT) zu Mesenchymzellen dedifferenzieren oder sogar den Phänotyp von vSMCs annehmen³⁶.

Ergänzend zur genetischen Programmierung und lokalen Umgebung haben viele Faktoren Einfluss auf den Phänotyp-Switch (Abbildung 2). Der kontraktile Phänotyp wird zusätzlich zum physiologischen Stress, auch mechanische Plastizität genannt, durch verschiedene Wachstumsfaktoren und mikroRNAs (miRNA) gefördert. Hierzu gehören u. a. der „Transforming Growth Factor- β “ (TGF- β), „Bone morphogenetic proteins“ (BMPs) und miRNA 143 (miR143), auf die nachfolgend und in 1.4 näher eingegangen wird. Andere Wachstumsfaktoren wie der „Platelet-derived Growth Factor“ (PDGF) und „Insulin-like Growth Factor“ sowie die miRNA 146a (miR146a) (siehe nachfolgend: mikroRNAs) begünstigen in vSMCs den synthetisierenden Phänotyp. Weitere Faktoren, die die Proliferation und Migration der vSMCs fördern, sind in Abbildung 2 dargestellt. Dazu zählen mechanische Reize wie Zug- und Scherspannungen, Zell-Zell-Kontakte, die Dysfunktion des Endothels, Gefäßverletzungen sowie oxidativer Stress, inflammatorische Stimuli, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, Zytokine und viele weitere Faktoren^{42,48,52}.

Die Kenntnis des Einflusses verschiedener Faktoren auf den Phänotyp von vSMCs und von deren Funktionsweise erlaubt, diese möglicherweise zugunsten des kontraktilen Phänotyps zu beeinflussen oder zu blockieren, und könnte somit von großer klinischer Relevanz sein.

Marker für den kontraktilen und den synthetisierenden Phänotyp

Die Zu- und Abnahme der Expression bestimmter Markerproteine ist charakteristisch für den jeweiligen Phänotyp. Dabei müssen mindestens zwei Marker reguliert sein, um den Phänotyp bestimmen zu können⁵². Da nur wenige Marker für den synthetisierenden Phänotyp existieren⁵², wird neben der vermehrten Expression von Kollagen I und Matrix-Metalloproteasen⁵³ die verminderte Expression der Mehrheit der für glatte Muskelzellen spezifischen kontraktilen Proteine als charakteristisch für diesen Phänotyp angesehen^{42,44}. Bei den kontraktilen Proteinen handelt es sich in erster Linie um „Alpha smooth muscle actin“ (SMA, auch: α -SMA), „Smooth muscle Myosin heavy chain“ (MYH11, auch: SM-MHC), Smoothelin (SMTN), Caldesmon, Calponin (CNN) und „Smooth muscle protein 22 alpha/transgelin“ (TAGLN, auch: SM22- α)⁴². SMA bildet den größten Teil der in vSMCs enthaltenen Proteine und stellt folglich den wichtigsten Marker dar⁴². Somit können vSMCs von Fibroblasten und Endothelzellen sicher differenziert werden⁴¹. Dennoch ist zu beachten, dass unter bestimmten Umständen auch andere Zellen wie Myofibroblasten^{54,55}, Endothelzellen⁵⁶ und Tumorzellen SMA exprimieren können.

Die meisten für glatte Muskelzellen spezifischen Marker werden über ihre CC(A/T)₆GC-Nukleotidsequenz (die sog. „CArG-Box“) reguliert, die sich in der Promoterregion befindet. Der „Serum response Factor“ (SRF), ein Transkriptionsfaktor, der auch eine wichtige Rolle in der Differenzierung glatter Muskelzellen spielt, bindet im Zellkern als Homodimer an diese Domänen einer Vielzahl von vSMC-spezifischen Genen. Viele dieser Marker besitzen mindestens eine CArG-Box⁵⁷. Die Fähigkeit von SRF, spezifische Transkriptionsprogramme zu aktivieren, hängt weitgehend von Koaktivatoren wie Myokardin oder myokardinverwandten Faktoren ab, die direkt mit SRF interagieren und seine Affinität zur CArG-Box verstärken^{58,59}.

Des Weiteren können – wie nachfolgend beschrieben – auch miRNAs als Marker sowohl für den synthetisierenden als auch für den kontraktilen Phänotyp dienen.

mikroRNAs (miRNAs)

MiRNAs sind kleine (17–24 Basenpaare), einzelsträngige, nichtcodierende RNAs, die – nachdem sie als primäre miRNA (pri-miRNA) transkribiert wurden – durch einen Proteinkomplex (Mikroprozessor), der die RNase Drosha enthält, zu einer Vorläufer-miRNA (precursor-miRNA, pre-miRNA) aufgespalten werden. Anschließend erfolgt eine erneute Spaltung durch das Enzym Dicer, und die reife miRNA wird dann in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) geladen und im aktivierten Zustand zu Einzelsträngen aufgespalten. Diese Einzelstränge können unvollständige Basenpaarungen mit spezifischen Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) von Ziel-mRNAs eingehen und somit die Genexpression dieser Zielgene auf posttranskriptionaler Ebene – hauptsächlich durch translationale Repression – regulieren^{48,60}. MiRNAs sind von großer Bedeutung bei der Differenzierung von vSMC in der Embryonalentwicklung und für ihren Erhalt im adulten Organismus. Die miR143 und die miR145 fördern wie viele weitere miRNAs den kontraktile Phänotyp von vSMCs und ihre Differenzierung während der Embryonalentwicklung^{61,62}. Die Überexpression dieser miRNAs führt zur vermehrten Expression kontraktiler Gene in vSMCs und zur verminderten Expression von extrazellulären Matrixkomponenten. Die Defizienz von miR143 und miR145 bewirkt in Mäusen infolge einer verminderten vSMC-Anzahl und einer damit einhergehenden Dünnwandigkeit der Gefäße die Abnahme des systolischen und diastolischen Blutdrucks^{63,64}. Demgegenüber existieren auch miRNAs mit einer inhibitorischen Wirkung auf den Erhalt der kontraktile Eigenschaften von vSMCs⁴⁸. Hierzu zählt z. B. die miR146a. Dementsprechend hat die Überexpression dieser miRNA die vermehrte vSMC-Proliferation zur Folge⁶⁵. Ihre Defizienz hingegen bewirkt durch Abnahme des PDGF-vermittelten vSMC-Wachstums eine verminderte Proliferation und Neointimabildung⁶⁶. Da miRNAs in dieser Arbeit hauptsächlich als Marker fungieren, ist jeweils die Zunahme oder Abnahme ihrer Expression typisch für den jeweiligen Phänotyp.

1.4 Bone morphogenetic proteins (BMPs)

Die knochenmorphogenetischen Proteine (bone morphogenetic proteins, BMPs) bilden einen wichtigen Teil der TGF- β -Superfamilie. Ihren Namen verdanken sie dem Orthopäden M. R. URIST, der sie im Jahre 1965 zum ersten Mal aufgrund ihrer Fähigkeit zur Anregung der Knochenneubildung als solche beschrieb⁶⁷. Heute sind über 20 verschiedene Mitglieder der BMP-Familie bekannt; dabei handelt es sich nicht ausschließlich um osteoinduktive Substanzen⁶⁸. Sie sind von großer Bedeutung für die Achsenbildung und Organogenese während der Embryonalentwicklung⁶⁹ und essentiell für viele Prozesse im erwachsenen Organismus u. a. in der Vaskulogenese und in kardiovaskulären Erkrankungen⁷⁰⁻⁷⁵ sowie in der Tumorprogression^{76,77}. BMPs sind extrazelluläre Signalproteine, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und Rezeptorbindungsaffinität in Subgruppen unterteilt werden können. Somit bilden z. B. BMP2 und BMP4 mit 86 % Übereinstimmung ihrer Sequenzen eine Subgruppe⁷⁸. Wie bereits in 1.3.3 erwähnt, können BMP-Mitglieder den Phänotyp von vSMCs beeinflussen (Abbildung 2). Der Wachstumsfaktor TGF- β ist essentiell für die Differenzierung von vSMCs in der Embryonalentwicklung und besitzt die Fähigkeit, den kontraktilen Phänotyp in vSMCs zu induzieren und zu erhalten^{44,79-81}. Gleiches konnte auch für eine Reihe BMPs nachgewiesen werden. Anders als in Endothelzellen, auf die BMP2 und BMP4 einen proinflammatorischen Effekt haben^{82,83}, induziert BMP4 in vSMCs den kontraktilen Phänotyp^{80,84,85}. Des Weiteren regulieren BMPs die Apoptose von vSMCs^{86,87}, inhibieren ihre Proliferation und Migration und fördern die Expression von Markern kontraktiler vSMCs⁸⁸. Dieses wurde sowohl für aortale als auch für pulmonale vSMCs für verschiedene BMPs (BMP2, -4 und -7) beschrieben^{80,89-92}. Die BMP4-Defizienz hingegen führt bei Mäusen aufgrund der fehlerhaften Mesodermbildung oder durch die Dysfunktion der Differenzierung hämatopoetischer und endothelialer Vorläuferzellen und somit der Gefäßbildung zum embryonalen Tod⁹³. Entsprechend verlieren vSMCs *in vivo* sowie *in vitro* nach induzierter BMP4-Defizienz mittels BMP-Antagonisten ihre strukturellen Eigenschaften⁹⁴.

1.4.1 BMP-Signalweg

Die BMP-Signaltransduktion erfolgt über Serin/Threonin-Kinase abhängige BMP-Rezeptoren vom Typ I und II (BMPRI und BMPRII) an der Zelloberfläche und wird in Abbildung 3 dargestellt². Nach Aktivierung und Phosphorylierung von BMPRI durch BMPRII bilden diese ein Heterodimer und vermitteln die intrazelluläre Signalübertragung durch Phosphorylierung von Smad-Proteinen². Smad ist ein Schachtelwort, das aus dem homologen Protein der Taufliege *Drosophila melanogaster* MAD (mothers against decapentaplegic) und dem Gen für das Protein SMA (small body size) des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*⁹⁵ entstanden ist. Smad-Proteine bilden eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die in drei Subgruppen unterteilt werden können⁹⁵. Die rezeptorregulierten R-Smads (Smad 1/5/8) bilden, nachdem sie durch den BMP-Rezeptorkomplex aktiviert wurden, einen heterodimeren Komplex mit dem sog. co-Smad (common-mediator) Smad 4 und wandern als Komplex in den Zellkern, um die Transkription verschiedener Gene zu regulieren². Die inhibitorischen I-Smads (Smad 6/7) besitzen die Eigenschaft, das BMP-Signal über die klassische Smad-Signalkaskade zu unterdrücken⁹⁵.

Daneben werden aber auch weitere alternative Signalkaskaden aktiviert, wie der MAP-Kinase-Signalweg (MAP, engl. mitogen-activated protein), der auch über Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Transkription von Zielgenen im Zellkern aktiviert⁹⁵.

Ein Beispiel für die Dysregulation des BMP-Signalweges stellt die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) dar. Dabei handelt es sich um eine progressive Erkrankung mit zunehmendem pulmonalem Gefäßwiderstand durch endotheliale Dysfunktion und vermehrter Migration und Proliferation von vSMCs, der daraus resultierenden Überbelastung des rechten Herzens und folglich dem Rechtsherzversagen⁹⁶. Dieser Prozess beruht hauptsächlich auf der Mutation im BMPRII^{97,98}. Dies bestätigt somit die Notwendigkeit eines intakten und strikt regulierten BMP-Signalweges für die Funktion und den Erhalt von vSMCs⁹⁹⁻¹⁰¹.

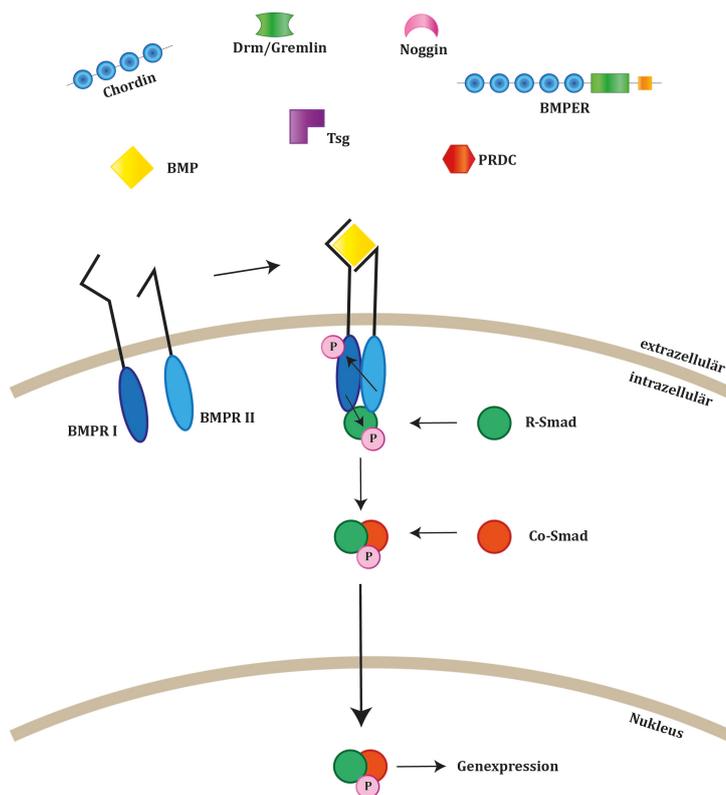


Abbildung 3: BMP-Signalweg, modifiziert nach BALEMANS et al. (2002)¹⁰²

Schematische Darstellung des SMAD-abhängigen BMP-Signalweges.

„Bone morphogenetic protein“ (BMP) Signaltransduktion an der Zelloberfläche über BMP-Rezeptoren (BMPR I und II); Aktivierung und Phosphorylierung von BMPR I durch BMPR II; intrazelluläre Signalübertragung durch Phosphorylierung der Rezeptor-Smad-Proteine (R-Smad); Bindung an „common mediator-Smad“ (co-Smad); Genexpressionsregulation im Zellkern.

Extrazelluläre BMP-Modulatoren: BMPER = bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator, Chordin, Drm/Gremlin, Noggin, PRDC = Protein related to DAN and Cerberus, Tsg = twisted gastrulation

1.4.2 BMP-Modulatoren: Bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER)

Verschiedene extrazelluläre Modulatoren, die essentiell in der Embryonalentwicklung sind, können die Signalübertragung und Verfügbarkeit von BMPs durch Regulation der Interaktion der BMPs mit ihrem Rezeptor agonistisch oder antagonistisch beeinflussen¹⁰². Dazu zählen – neben vielen weiteren Proteinen – Chordin¹⁰³, Drm/Gremlin¹⁰⁴, Noggin¹⁰⁵, „Protein related to DAN and Cerberus“ (PRDC)¹⁰⁶, „Twisted gastrulation“ (Tsg)¹⁰⁷ und „Bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator“ (BMPER)¹⁰⁸.

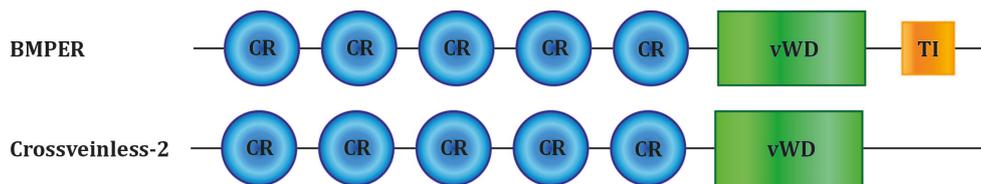


Abbildung 4: Darstellung von BMPER und Crossveinless-2, modifiziert nach MOSER et al. (2003)¹⁰⁸

Vergleichende schematische Darstellung von „Bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator“ (BMPER) und „Crossveinless-2“ (CV-2).

CR = Cystein-reiche Domäne; vWD = von-Willebrand-Faktor-D-Domäne; TI = Trypsin-Inhibitor-Domäne

BMPER ist ein sezerniertes Glykoprotein mit 5 Cystein-reichen Domänen gefolgt von einer von-Willebrand-Faktor-D-Domäne und einer Trypsin-Inhibitor-Domäne. Es wurde bei einem Screen für differentiell exprimierte Proteine in embryonalen endothelialen Vorläuferzellen als Homolog von „Crossveinless-2“ (CV2) der *Drosophila melanogaster* im Wirbeltier entdeckt¹⁰⁸ (Abbildung 4). Dieses extrazelluläre Matrixprotein, das ebenfalls Teil der TGF- β -Superfamilie ist, wird u. a. in den Endothelzellen von Haut, Lunge, Herz und Tumorzellen exprimiert und ist *in vitro* und *in vivo* nachweisbar¹⁰⁸⁻¹¹². BMPER hat eine konzentrationsabhängige Wirkung auf BMPs und kann durch eine direkte Bindung an BMPs (BMP2, -4, -6, -7, -9) und BMPRI mit diesen interagieren und ihre Funktion modulieren^{108,113-115}. Homozygote BMPER-defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben bei der Geburt, da die Knorpelspannen der Trachea fehlen und die Lunge nicht vollständig entwickelt ist^{113,116}. Darüber hinaus konnte in der Entwicklung des Zebrafischembryos festgestellt werden, dass nach Morpholino-vermittelter BMPER-Reduktion das Aussprossen der intersomitischen Gefäße und des kaudalen Gefäßplexus vermindert ist, welches aufzeigt, dass BMPER essentiell für die Angiogenese in der embryonalen Entwicklung ist¹¹⁷.

Über die Funktion von BMPER in Endothelzellen, die in vielen Versuchen untersucht wurde, liegen bereits mehrere Erkenntnisse vor. Demnach verfügt BMPER über eine konzentrationsabhängige proangiogene und antiinflammatorische Wirkung auf die Funktion von Endothelzellen^{111,112,117,118}. Eine Rolle von BMPER wurde außerdem im Kontext der Tumorprogression beschrieben¹¹⁰. Über die Funktion von

BMPER in vSMCs ist hingegen bisher nur wenig bekannt. Vorangegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, ergaben in vSMCs für BMPER eine ähnliche Funktion wie die von BMP4. Dabei handelte es sich um pulmonale arterielle glatte Muskelzellen (pulmonary arterial smooth muscle cells, PSMCs). Demnach bewirkte die Stimulation von PSMCs mit BMPER eine konzentrationsabhängige Zunahme der Expression von Markern des kontraktiven Phänotyps von vSMCs (SMA und MYH11) und eine verminderte Migration der PSMCs. Folglich konnte bei BMPER-Defizienz der synthetisierende Phänotyp der PSMCs mit vermehrter Expression von Matrix-Metalloproteasen, verminderter Kollagenexpression und zunehmender Migration beobachtet werden.

Erste Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe über die Bedeutung von BMPER in vSMC-abhängigen kardiovaskulären Erkrankungen ergaben im Karotisligatur-Modell eine unterschiedliche Expression von BMPER in der Adventitia und in vSMCs. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen von BMPER und der Entstehung eines Aortenaneurysmas beobachtet werden.

Die bisherigen Kenntnisse erlauben somit die Annahme, dass BMPER nicht nur eine wichtige Funktion in der Entwicklung des Blutgefäßsystems hat, sondern auch eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen spielt und essentiell für die Induktion und den Erhalt des kontraktiven Phänotyps in vSMCs ist.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von BMPER und BMP4 auf den Phänotyp von vSMCs in assoziierten Gefäßerkrankungen zu analysieren und damit festzustellen, welche Rolle sie in der Gefäßregeneration und Neovaskularisation spielen.

Nach bisherigen Kenntnissen sind BMP4 und BMPER nicht nur essentiell in der embryonalen Entwicklung des Blutgefäßsystems, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Entstehung und beim Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen, indem sie den Phänotyp von vSMCs beeinflussen. Dieses Wissen sollte nun *in vitro* in humanen aortalen glatten Muskelzellen (human aortic smooth muscle cells, HAOSMCs) sowie *in vivo* in der Maus im Hinterbeinischämie-Modell untersucht werden. Entsprechend wurden folgende Hypothesen aufgestellt und in den jeweiligen Teilprojekten geprüft:

1. BMPER und BMP4 werden im Hinterbeinischämie-Modell, dem Krankheitsmodell für die PAVK, reguliert.
2. Die BMPER-Defizienz hat eine Auswirkung (a) *in vivo* auf die Gefäßregeneration und auf weitere Mitglieder des BMP-Signalweges und (b) *in vitro* auf den Phänotyp von HAOSMCs.
3. Die Stimulation mittels BMPER hat (a) *in vivo* einen protektiven Effekt im Hinterbeinischämie-Modell mit positiven Auswirkungen auf die Gefäßregeneration und (b) *in vitro* zusammen mit der Stimulation mittels BMP4 einen protektiven Effekt auf den kontraktile Phänotyp von HAOSMCs.
4. Die BMP4-Defizienz wirkt sich *in vivo* auf die Gefäßregeneration und auf weitere Mitglieder des BMP-Signalweges aus.

Die Erkenntnisse über die Bedeutung, Funktion und Beeinflussbarkeit von BMPER und BMP4 im Gefäßsystem könnten neue Optionen für die Entwicklung von Therapieansätzen in kardiovaskulären Erkrankungen eröffnen.

2 Material

2.1 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Geräte und Gebrauchsgegenstände	Hersteller
Bechergläser 100–600 ml	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Brutschrank Hera Cell	Sorvall Heraeus, Hanau, DE
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad GmbH, München, DE
Dampfsterilisator Varioklav Typ 500	H+P Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim, DE
Einfrierbox Mr. Frosty Cryo	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Eismaschine ZBE 30-10	Ziegra, Isernhagen, DE
Epifluoreszenzmikroskop Zeiss Axioplan-2	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Erlenmeyerkolben 100–250 ml	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Färbekasten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Flaschen 100–2000 ml	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Fluoreszenzlampe HB050	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Gefrierschrank -20 °C Öko super	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank -80 °C	Forma Scientific, Marietta, US-GA
Geldokumentationssystem	Peqlab GmbH, Erlangen, DE
Gelkammern	Bio-Rad GmbH, München, DE
Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Heizblock Thermo-Block TDB-120	A.Hartenstein, Würzburg, DE
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heizblock Thermomixer F1.5	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Heizdecke Sanitas SHK 16	Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, DE
Homogenisatorstempel 1,5 ml	neoLab GmbH, Heidelberg, DE
Infrarot-Wärmelampe Sanitas SIL 16	Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, DE
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Kamera AxioCam HR	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Kryoboxen Rotilabo	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Kryostat CM1510S	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Kühlschrank +4 °C Premium	Liebherr, Bulle, CH
Magnetrührer RCT basic	IKA, Staufen, DE
Messzylinder	Schott AG/Duran GmbH, Mainz, DE
Messzylinder 500–1000 ml	Vitlab GmbH, Großostheim, DE
Mikroskop Dialux	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Mikroskop Zeiss Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena, DE

Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad GmbH, München, DE
Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad GmbH, München, DE
Neubauer Zählkammer 0,0025 m ²	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Objektträgerkästen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
PeriScan PIM II Laser Doppler Perfusion Imager	Perimed AB, Stockholm, SE
Pipettboy Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Pipetten 0,1–1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
PowerPAC 3000	Bio-Rad GmbH, München, DE
Präparatemappen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Rotilabo-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Rührfische	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
S1000 Thermal Cycler	Bio-Rad GmbH, München, DE
Sicherheitsarbeitsplatz WIBObjekt Economy	Weiss GWE GmbH, Hude, DE
Spektrophotometer Nanodrop 2000	Peqlab GmbH, Erlangen, DE
Spektrophotometer SpectraMax Plus	Molecular Devices, Sunnyvale, US-CA,
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Carl Zeiss AG, Jena, DE
Stickstofftank Cryo Med	Forma Scientific, Marietta, USA
Ultra-Clear Water Purification System	Siemens, Barsbüttel, DE
Vortexer Genius 3 Vortex	Ika, Staufen, DE
Vortexer Lab Dancer	Ika, Staufen, DE
Vortexer MS2 Minishaker	Ika, Staufen, DE
Waage BP 211 D	Sartorius AG, Göttingen, DE
Waage BP 4100 S	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wärmeschrank	Memmert GmbH, Schwabach, DE
Wasserbad Julabo TWB22	Julabo GmbH, Seelbach, DE
Western Blot Imager ChemiDoc MP System	Bio-Rad GmbH, München, DE
Zellkulturbank Clean Air	Clean Air GmbH, Hilden, DE
Zentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Heraeus Multifuge X3R	Sorvall Heraeus, Hanau, DE

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
„Microseal B“, versiegelnde PCR-Klebefolie	Bio-Rad, München, DE
12-Well Platte	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
4-Well-Zellkulturobjektträger, gekammert	BD Falcon™, Heidelberg, DE
48-Well Platte	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
5 ml-Polystyrol-Röhrchen	BD Falcon™, Heidelberg, DE
96-Well Semi-Skirted PCR Plate	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Chromatographie-Papier Whatman	Schleicher & Schuell/Whatman, Kent, GB
Deckgläschen (25 x 75 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Doppelseitiges Klebeband	Tesa, Hamburg, DE
Einbettungsbehälter „Tissue Tek Cryomold“	Sakura Finetek, Staufen, DE
Filterpipettenspitzen „Art Tips“ 1000 µL	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Filterpipettenspitzen „Filter Tips“ 0,1–2 µL	Corning Inc., Kaiserslautern, DE
Handschuhe „Gentle Skin“	Meditrade, Kiefersfelden, DE
Hard-Shell® 96-Well PCR Plate	Bio-Rad, München, DE
Kanülen 20G	B. Braun, Melsungen, DE
Kanülen 24G	B. Braun, Melsungen, DE
Kanülen 26G	B. Braun, Melsungen, DE
Kanülen 30G	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Kryoröhrchen 2 ml	Corning Inc., Kaiserslautern, DE
Küvetten aus Polystyrol	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Nitril-Handschuhe Nitra-Tex	Ansell Healthcare, Brüssel, BE
Nitrozellulose-„Blotting“-Membran Amersham	GE Healthcare Europe, München, DE
Objektträger Super Frost plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, DE
Parafilm M	Bemis, Neenah, US-WI
Pasteur-Plastikpipetten 3ml	Ratiolab, Dreieich, DE
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisches Oldendorf, DE
PCR SingleCap SoftTubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisches Oldendorf, DE
Pipettenspitzen 10 µl TipOne	Starlab, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 100–1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, DE
Reaktionsröhrchen 15–50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

Reaktionsröhrchen mit Zentrifugen-Filtereinheit, Amicon Ultra-4 10K	Merck, Millipore, Darmstadt, DE
Sonnenblumenöl	Edeka, Hamburg, DE
Spritzen 1–20 ml	B. Braun, Melsungen, DE
Spritzenvorsatzfilter Acrodisc	Pall GmbH, Dreieich, DE
Stabpipetten 5–25 ml	Corning Inc., Kaiserslautern, DE
Tissue-Tek O.C.T.	Sakura Finetek, Staufen, DE
Zellkulturflaschen 175 cm ²	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Zellkulturschalen 100 x 20 mm	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Zellkulturschalen 60 x 15 mm	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Zellschaber	Corning Inc., Kaiserslautern, DE

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Acrylamid	Applichem GmbH, Darmstadt, DE
Agarosepulver	Lonza, Verviers, BE
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bovin Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE
Bradford-Dye	Bio-Rad GmbH, München, DE
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Chloroform	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
DAPI	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
dNTP Mix	Thermo Scientific, Dreieich, DE
ECL-Lösungen	GE Healthcare Europe, München, DE
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Essigsäure	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, DE
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, DE
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega, Madison, US-WI
Gentamycin, Amphotericin B	Pelo Biotech, Planegg/Martinsried, DE
Glycerin	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Igepal	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München, DE

Isopropanol/2-Propanol	VWR International, Darmstadt, DE
Kaisers Glycerin-Gelatine	Merck, Darmstadt, DE
Lipofectamine RNAiMAX Transfektionsreagent	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Magermilchpulver	Bio-Rad GmbH, München, DE
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Methanol	VWR International, Darmstadt, DE
Mowiol 4-88	Merck Darmstadt, DE
N-Propyl-Gallat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Normales Ziegen Serum	Dako Cytomation, Hamburg, DE
OptiMEM	Gibco life Technologies, Darmstadt, DE
PBS-Tabletten	Gibco life Technologies, Darmstadt, DE
Penicillin/Streptomycin	Pelo Biotech, Planegg/Martinsried, DE
PeqGOLD Taq-DNA-Polymerasen und dNTPs	Peqlab/VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Proteinase Inhibitor Cocktail	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Qiazol-Lysereagens	Qiagen GmbH, Hilden, DE
RNase away	Molecular BioProducts, San Diego, US-CA
Sojabohne-Trypsin-Inhibitor Typ II	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
TaqMan™ universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad GmbH, München, DE
TriPure Isolation Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Tris Ultra	Appllichem GmbH, Darmstadt, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Xylene Cyanol FF	Sigma-Aldrich GmbH, Schnelldorf, DE
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Zelllyse

<u>RIPA-Puffer</u>	50 ml	2,5 ml	Tris-HCl (1 mol/l) (pH 8,0)
		100 µl	EDTA (0,5 M) (pH 8,0)
		1,5 ml	NaCl (5 mol/l)
		5 ml	Igepal 10 %
		1,25 ml	Natriumdeoxycholat 20 %
		0,25 ml	SDS 20 %
		39,4 ml	H ₂ O

2.4.2 SDS-PAGE

<u>Trenngelpuffer</u>	200 ml	36,3 g	Trisbase (1,5 mol/l)
		200 ml	H ₂ O
			NaOH/HCl zur pH-Einstellung (pH 8,8)

<u>Sammelgelpuffer</u>	200 ml	12,1 g	Tris-HCl (0,5 mol/l)
		200 ml	H ₂ O
			NaOH/HCl zur pH-Einstellung (pH 6,8)

Ladepuffer

6 x Stock	7,4 ml	0,5 ml	H ₂ O
		1,5 ml	Tris-HCl (0,5 mol/l) (pH 6,8)
		2,4 ml	Glycerin
		2,4 ml	SDS 10 %
		0,6 ml	Bromphenolblau 0,5 %

Gebrauchslösung	100 µl	92,5 µl	Ladepuffer 6 x Stock
		7,5 µl	β-Mercaptoethanol

Laufpuffer

10 x Stock	1 l	30,25 g	Trisbase
		144,25 g	Glycin
		10 g	SDS
		1 l	H ₂ O
Gebrauchslösung	1 l	100 ml	Laufpuffer 10 x Stock
		900 ml	H ₂ O

2.4.3 Western BlotTransferpuffer

10 x Stock	1 l	30,25 g	Trisbase
		144,25 g	Glycin
		1 l	H ₂ O
Gebrauchslösung	1 l	100 ml	Transferpuffer 10 x Stock
		200 ml	Methanol
		700 ml	H ₂ O

TBS Puffer

10 x Stock pH 7,4	1 l	24,22 g	Trisbase
		87,66 g	NaCl
		1 l	H ₂ O
Gebrauchslösung	1 l	100 ml	TBS-Puffer 10 x Stock
(TBST-Puffer)		899,5 ml	H ₂ O
		500 µl	Tween 20
<u>Absättigungslösung</u>	50 ml	1,5 g	Milchpulver
(3%)		50 ml	TBST-Puffer

<u>PonceauS</u>	100 ml	0,1 g	PonceauS-Pulver
		95 ml	H ₂ O
		5 ml	Essigsäure

2.4.4 Genotypisierung

<u>DNA-Lysepuffer:</u>	100 ml	10 ml	Tris-HCl (1 mol/l) (pH 8,0)
		1 ml	EDTA (0,5 mol/l) (pH 8,0)
		2 ml	SDS 10 %
		4 ml	NaCl (5 mol/l)
		90 ml	H ₂ O

TAE-Puffer

50 x Stock	1 l	242 g	Trisbase
		57,1 ml	Essigsäure
		100 ml	EDTA (0,5 mol/l) (pH 8,0)
		auf 1 l mit H ₂ O auffüllen	

Gebrauchslösung	2 l	40 ml	TAE-Puffer 50 x Stock
		1960 ml	H ₂ O

Ladepuffer

Stocklösung	10 ml	25 µl	Bromphenolblau
		25 µl	Xylene Cyanol FF
		3 ml	Glycerin
		6,95 ml	H ₂ O

Gebrauchslösung:	1 ml	500 µl	Glycerin
		500 µl	H ₂ O
		40 µl	Stocklösung

2.5 Kits

Kits	Hersteller
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München, DE
miRNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Proteome Profiler™ Antibody Arrays	R&D Systems, Wiesbaden, DE
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
TaqMan™ MicroRNA-Assay hsa-miR-143	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
TaqMan™ MicroRNA-Assay hsa-miR-146a	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
TaqMan™ MicroRNA-Assay RNU 19	Applied Biosystems, Darmstadt, DE

2.6 Oligonukleotide

2.6.1 Primer

Alle Primer stammen von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, DE)

Bezeichnung		Sequenz (5'-3')	Annealing-Temperatur (°C)
12026	fwd	TGACCCCATCTCTTCACTCC (20)	60
12028	rev	AGTCCCTCACATCCTCAGGTT (21)	
BMP4 loxP2	fwd	AGACTCTTTAGTGAGCATTTTCAAC (25)	55
	rev	AGCCCAATTTCCACAACCTC (20)	
hBMPER	fwd	CTTGTGTTCTACGCCAGTGCC (21)	62-64
	rev	GGACAGGAGAGAATGGGACAGAC (23)	
hCNN	fwd	AGCTAAGAGAAGGGCGGAAC (20)	55-59
	rev	CATCTGCAGGCTGACATTGA (20)	
hRPII	fwd	GCACCACGTCCAATGACAT (19)	60-62
	rev	GTGCGGCTGCTTCCATAA (18)	
hSMA	fwd	GCGTGGCTATTCTTCGTTA (20)	55-59
	rev	ATGAAGGATGGCTGGAACAG (20)	
hTAGLN	fwd	AACAGCCTGTACCCTGATGG (20)	55-61
	rev	CGGTAGTGCCATCATTCTT (20)	
mBMP4	fwd	CACGAAGAACATCTGGAGAAC (21)	58
	rev	CCCTTGAGGTAACGATCGGCT (21)	
mBMPER	fwd	CACGAAGAACATCTGGAGAAC (21)	60-62
	rev	CCCTTGAGGTAACGATCGGCT (21)	
mCNN	fwd	GCACATTTTAACCGAGGTCCT (21)	62,3-64
	rev	CTGATGGTCGTATTTCTGGGC (21)	
mCV2down	fwd/rev	AGTCTCCTCTATGTTTCTTGC (22)	55
mCV2up	fwd	TCTCTTTGGTGATGCTATTGTT (22)	
pGN1	rev	ACCCTCTGTGTCCTCTGTAA (22)	

mMYH11	fwd rev	AAGCTGCGGCTAGAGGTCA (19) CCCTCCCTTTGATGGCTGAG (20)	58,3–63,4
mSMA	fwd rev	CCCAGACATCAGGGAGTAATGG (22) TCTATCGGATACTTCAGCGTCA (22)	56,8–63,4
mTAGLN	fwd rev	ACCAAAAACGATGGAAACTACCG (23) GTGAAGTCCCTCTTATGCTCCT (22)	56,8–63,4
mTsg	fwd rev	TCTAGCCTCCCTGACGTTCC (20) CACATACCGACACAGTCGC (19)	58
oIMR7338 oIMR7339	fwd rev	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT (24) GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC (25)	60

2.6.2 Small interfering RNA

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Hersteller
siRNA negativ Alexa 488 nm	unbekannt	Qiagen GmbH, Hilden, DE
siRNA hBMPER 2	GCUGCCUCUUUCGAAGUGATT	Ambion, Darmstadt, DE
siRNA hBMPER 5	CAGAGGAAAGUGUUUGACCUCCUU	Invitrogen, Karlsruhe, DE

2.7 Proteine

Proteine und Stimulantien	Hersteller
Rekombinantes humanes BMP4	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Rekombinantes humanes CV-2 (BMPER)	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Rekombinantes Maus-CV-2 (BMPER)	R&D Systems, Wiesbaden, DE

2.8 Marker

Marker	Hersteller
Proteinmarker Precision Plus Protein Dual Color	Bio-Rad GmbH, München, DE
SSL-Marker	Eurogentec, Lüttich, BE

2.9 Enzyme

Enzyme	Hersteller
DNase	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Elastase aus Schweinepankreas	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Kollagenase Typ II	Gibco life technologies, Darmstadt, DE
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Trypsin/EDTA	Lonza, Verviers, BE

2.10 Antikörper

2.10.1 Western Blot

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Actin α -Smooth muscle monoclonal mouse	1 : 5000	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Anti-BMP4 polyclonal rabbit	1 : 1000	Thermo Scientific, Dreieich, DE
Anti-GAPDH polyclonal rabbit	1 : 5000	EnoGene Biotech, New York, US
Anti-human CV-2 monoclonal rat	1 : 2000	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Anti-Myosin, smooth muscle heavy chain 1 and 2 monoclonal rabbit	1 : 10000	Abcam, Cambridge, GB
Anti- α tubulin monoclonal mouse	1 : 5000	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse IgG/HRP conjugated	1 : 5000	R&D Systems, Wiesbaden, DE
Anti-rabbit IgG/HRP conjugated	1 : 10000	Thermo Scientific, Dreieich, DE
Anti-rat IgG/HRP conjugated	1 : 5000	Dako Cytomation, Hamburg, DE

2.10.2 Histologie

Die Verdünnung der Negativkontrollen ist abhängig von der Konzentration des jeweiligen Primärantikörpers.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Actin α -Smooth muscle monoclonal mouse FITC conjugated	1 : 300	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE
Anti-CD31 rabbit anti-mouse polyclonal	1 : 200	Abcam, Cambridge, GB
Negative control mouse IgG2A-FITC	-	Dako Cytomation, Hamburg, DE
Negative control rabbit IgG	-	Dako Cytomation, Hamburg, DE

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (H + L)	1 : 500	Invitrogen, Karlsruhe, DE

2.11 Zellen und Zellkulturmedien

Zellen	Bezugsquelle
Humane aortale glatte Muskelzellen (HAOSMCs)	Pelo Biotech, Planegg/Martinsried, DE

Zellkulturmedien	Hersteller
DMEM/F12 Medium	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, DE
Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM)	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, DE
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS +/-)	Lonza, Verviers, BE
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (PBS w/o)	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, DE
Einfriermedium	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, DE
Endothelzellbasalmedium (EBM)	Lonza, Verviers, BE
Fötale Kälberserum (FBS)	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, DE
Opti-MEM	Gibco® Life Technologies, Darmstadt, DE
Glatte-Muskelzellen-Basalmedium 2 (SMC-BM)	Pelo Biotech, Planegg/Martinsried, DE
Trypsin/EDTA	Lonza, Verviers, BE

Arbeitsmedien	Hersteller
Kulturmedium HAOSMCs	10 % FBS in SMC-BM
Stimulationsmedium	0,4 % FBS in EBM
Stoppmedium	10 % FBS in DMEM
Transfektionsmedium	1 % FBS in EBM

2.12 Medikamente

Medikamente	Hersteller
Aqua ad injectabilia	B. Braun, Melsungen, DE
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen, DE
Temgesic Ampullen 0,3 mg/ml (Buprenorphin)	Indivior EU Limited, Berkshire, GB
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
Ketavet Injektionslösung 100 mg/ml (Ketamin)	Zoetis, Berlin, DE
Rompun 2 % Injektionslösung (Xylazin)	Bayer, Leverkusen, DE
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, DE

2.13 Operationsmaterialien

Operationsmaterialien	Hersteller
Aortenschere	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Feinschere	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Nadelhalter	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Pinzetten, gerade und gebogen	Fine Science Tools, Heidelberg, DE
Seidenfaden 0,7 mm Look Suture	Surgical Specialities Cooperation, Vancouver, US-CA
Skalpell Nr. 10	Feather Safety Razor Co., JP
Tücher Foliodrape	Hartmann, Heidenheim, DE
Wattestäbchen, unsteril	Applied SA, Châtel-St-Denis, CH
Wundnaht 3-0 Mersilene, geflochten	Ethicon, Norderstedt, DE

2.14 Versuchstiere

Mäuse	Bezugsquelle
C57BL/6N	Charles River Laboratories GmbH, Sulzfeld, DE
C57BL/6N_BMPER ^{+/-}	Eigene Zucht AG Moser, Freiburg, DE
C57BL/6N_BMPER ^{+/+}	Eigene Zucht AG Moser, Freiburg, DE
MYH11-Cre	Eigene Zucht AG Moser, Freiburg, DE
MYH11-CreBMP4flox	Eigene Zucht AG Moser, Freiburg, DE

2.15 Software

Software	Hersteller
AxioVision40 Release 4.8.2.0	Carl Zeiss GmbH, Jena, DE
Bio-Rad CFX Manager Version 3.1	Bio-Rad GmbH, München, DE
GraphPad Prism 5.01	GraphPad Software, La Jolla, US-CA
Image Lab Version 4.0	Bio-Rad GmbH, München, DE
LDPIwin Version 2.6.1	Perimed AB, Stockholm, SE

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Versuche

Das Tierversuchsvorhaben „Der Einfluss von BMPs und BMP Modulatoren auf die Neovaskularisierung im Maus Hinterbein-Ischämie Modell“ wurde am 22.10.2013 gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes durch das Regierungspräsidium Freiburg genehmigt (Aktenzeichen: 35-9185.81/G-13/90). Die Genehmigung der Anzeige „Isolation von vaskulären glatten Muskelzellen aus der Aorta“ erfolgte am 15.02.2015 intern über den Tierschutzbeauftragten der Versuchstierhaltung CEMT (Center for Experimental Models and Transgenic Service) in Freiburg (Registriernummer: X-15/1J).

Die Haltung der Tiere und die Durchführung der Versuche erfolgten in der Versuchstierhaltung CEMT in Freiburg. Bei von externen Lieferanten bezogenen Tieren wurden die Versuche frühestens eine Woche nach Transport durchgeführt, um die Eingewöhnung der Tiere zu gewährleisten. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in einzelbelüfteten IVC-Käfigen (SealSafe Plus, Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg, DE) mit staubarmer Einstreu (J. Rettenmaier & Söhne GmbH, Rosenberg, DE) gehalten mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus, freiem Zugang zu Futter (Alleinfuttermittel Kliba Nafag, Kaiseraugust, CH) und Wasser. Die Haltung erfolgte in Gruppengrößen von 2–5 Tieren, mit Ausnahme von Tieren, die einzeln gehalten werden mussten.

Die Einteilung der Mäuse in die Versuchs- und Kontrollgruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip (randomisiert). Bei der Versuchsdurchführung sowie der anschließenden Auswertung der Daten wurde auf eine Verblindung der versuchsdurchführenden Person geachtet.

3.1.1 Hinterbeinischämie-Modell

Die Hinterbeinischämie-Ligatur in der Maus dient als Modell für die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK). Ziel ist es, die Neovaskularisation in Form von Arteriogenese und Angiogenese nach einseitiger Ligatur der *A. femoralis* auf Höhe der Abzweigung der *A. profunda*

femoris zu analysieren. Dieses lang etablierte Modell ist das repräsentativste Modell für die PAVK im Menschen. Es ermöglicht – im Vergleich zu anderen Arteriogenesemodellen – die gleichzeitige Analyse vieler Prozesse wie der Arteriogenese, Angiogenese, ischämischen Perfusion und Gewebereaktion. Die Durchführung des Hinterbeinischämie-Modells umfasst viele Variationen, beginnend mit einer einfachen Ligatur sowie doppelten Ligaturen der *A. femoralis* bis hin zu vollständigen Exzisionen von Arterie, Vene und Nerv. In dieser Arbeit wurde das Modell mit einer doppelten Ligatur der *A. femoralis* proximal und distal der Abzweigung der *A. profunda femoris* gewählt. Mit einem therapeutischen Fenster, in welchem Verbesserungen effizient beobachtet und kontrolliert werden können, ermöglicht diese Durchführung des Modells den besten Zugang zu neuen therapeutischen Ansätzen¹¹⁹.

Ein vollständig entwickeltes Gefäßsystem ist Voraussetzung für diesen Versuch. Um dies zu gewährleisten, wurde die Operation in ca. 10 Wochen alten Mäusen durchgeführt, wobei es sich ausschließlich um männliche Mäuse handelte, um die zyklusabhängige Östrogenauswirkung auf das Blutgefäßsystem auszuschließen²⁷. Des Weiteren wurden für diese Arbeit C57BL/6N-Mäuse gewählt, die – im Vergleich zu anderen Stämmen wie z. B. BALB/c-Mäuse – durch eine bessere Reaktion auf Ischämie und Bildung von Kollateralgefäßen den für dieses Modell geeignetsten Stamm darstellen^{120,121}. Da es sich bei PAVK-Betroffenen hauptsächlich um ältere Patienten mit Komorbiditäten (z. B. Diabetes mellitus) handelt, müsste der Versuch idealerweise an entsprechend älteren Mäusen durchgeführt werden¹²¹.

Anästhesie

Als Anästhesie wurde die Injektionsnarkose aus 2 mg/kg KG Xylazin und 100 mg/kg KG Ketamin verdünnt in 0,9%iger isotonischer Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) gewählt, die den Mäusen intraperitoneal appliziert wurde. Diese Kombination ermöglichte die ausreichende Analgesie und Sedierung für den durchgeführten Eingriff. Die Narkosetiefe wurde mit Hilfe des fehlenden Lid- und Zwischenzehenreflexes sichergestellt.

Operationsdurchführung

Um zu vermeiden, dass die Körpertemperatur absinkt, wurden die Mäuse während der Operation in Rückenlage auf der Heizmatte positioniert. Die Operation erfolgte mithilfe des Binokulars.

Zuerst wurde die Operationsstelle mit dem Skalpell rasiert und anschließend mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Der ca. 1 cm lange Hautschnitt erfolgte entlang dem Verlauf der *A. femoralis*. Das Gewebe wurde stumpf freipräpariert bis zum Erkennen der *A. femoralis*, der *V. femoralis* und des *N. femoralis* (Abbildung 5A). Da die drei Strukturen gebündelt vorliegen, wurden sie proximal der Abzweigung der *A. profunda femoris* vorsichtig separiert, wobei besonders darauf geachtet wurde, weder die Gefäße noch den Nerven zu verletzen. Anschließend konnte die erste Ligatur der *A. femoralis* proximal der Abzweigung der *A. profunda femoris* gesetzt werden. Dies erfolgte mit einem dreifachen Instrumentenknoten. Dieser Vorgang wurde distal der Abzweigung der *A. profunda femoris* mit der zweiten Ligatur wiederholt (Abbildung 5B). Nach dem Setzen der beiden Ligaturen wurde die Wunde mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Dauer der Operation betrug zwischen 10 und 20 min.

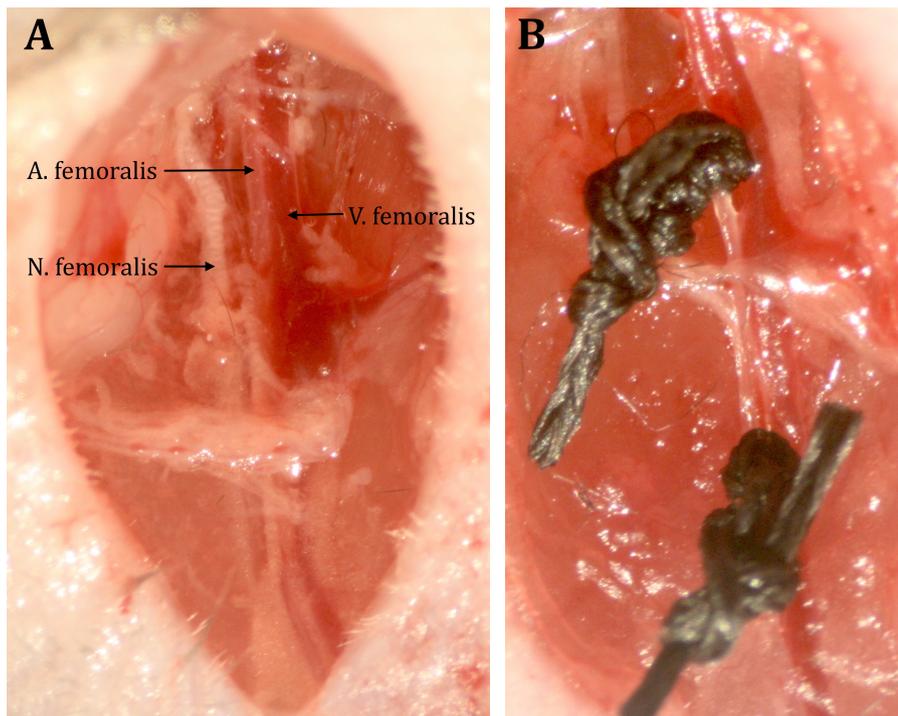


Abbildung 5: Ligatur der *A. femoralis*

Darstellung von *A.*, *N.*, *V. femoralis* des rechten Beines vor (A) und nach (B) Ligatur der *A. femoralis* proximal und distal der Abzweigung der *A. profunda femoris*.

Schmerzmittelinjektion

Den Mäusen wurde postoperativ sowie alle 8 Stunden in den ersten 24 Stunden nach der Operation 0,1 mg/kg KG Buprenorphin (1 : 30 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt) subkutan gespritzt. Des Weiteren wurden die operierten Tiere regelmäßig kontrolliert und gewogen, und es wurden zur Minimierung der maximalen Belastung bereits im Vorfeld klar definierte Abbruchkriterien festgelegt und alles wurde dokumentiert.

Applikation von rekombinantem BMPER-Protein

Bei einer Subgruppe der Versuchsgruppen wurde den Mäusen in 100 μ l 0,9%iger NaCl-Lösung gelöstes rekombinantes BMPER-Protein in der Dosierung 50 ng/g KG postoperativ sowie parallel zu den Laser-Dopplermessungen subkutan in die abdominale Leistengegend injiziert. Die Wahl der Dosierung beruht auf erhobenen Daten aus vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe. Durch die weder reizende noch schmerzhaft subkutane Applikation des rekombinanten BMPER-Proteins konnte dieses eine Depotwirkung entfalten und musste somit nur insgesamt

viermal injiziert werden. Der Kontrollgruppe zu dieser Versuchsgruppe wurde dementsprechend zu gleichen Zeitpunkten die gleiche Menge 0,9%ige NaCl-Lösung subkutan appliziert.

Laser Doppler Perfusion Imaging (LDPI)

Das Prinzip der Laser-Doppler-Messung beruht auf der Änderung des Dopplersignals, wenn das Laserlicht auf sich bewegende Blutzellen trifft (Doppler-Effekt), und kann somit für die Messung der Blutperfusion genutzt werden. Dabei handelt es sich um eine nicht invasive indirekte Messmethode, die in Echt-Zeit mikrozirkulierende Änderungen misst und reproduzierbar ist¹²¹.

Die Messung der Blutperfusion der Hinterbeine mittels Laser-Doppler erfolgte prä- und postoperativ für die direkte Effizienzkontrolle der Operation sowie an Tag 3, 7, 10 und 14. Dazu wurden die Mäuse in eine Kurznarkose mit Ketamin und Xylazin gelegt. Anschließend wurde die Maus in Bauchlage unter den Laser-Doppler-Kopf gelegt und die Füße wurden vorsichtig mit doppelseitigem Klebeband an der Unterlage fixiert. Für die Messung wurden Kopf und Arm des Laser-Dopplers abgedunkelt. Jede Maus wurde dreimal hintereinander gemessen, indem der ausgewählte Bereich durch den Laserstrahl abgefahren wurde. Zwischen jeder Messung wurde die Maus kurz hochgehoben und erneut auf die Unterlage platziert, um die konstante Durchblutung der Beine zu gewährleisten. Nach Wiedererwachen aus der Narkose wurde die Maus wieder zurück zu den anderen Mäusen in den Käfig gesetzt.

Die Messung der plantaren Blutperfusion hat den Vorteil, dass das Laser-Doppler-Signal nicht durch Haare oder Pigmentierung gestört wird. Da es sich hierbei um eine kleine Fläche handelt, wird außerdem die Zeit der Messung reduziert und es werden mögliche Bewegungsartefakte verhindert²⁷. Zu beachten ist ferner, dass diese Methode nicht nur mit den verschiedenen Gewebeeigenschaften variiert, sondern auch durch den vasomotorischen Ton beeinflusst wird¹²¹.

Auswertung der Laser-Doppler-Perfusionsmessungen

Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der gleichen Software, die für die Messungen genutzt wurde: LDPIwin.2.6. Es wurden für die Bilder sog. „regions of interest“ (ROI) festgelegt und anschließend der Quotient aus dem nicht operierten und dem operierten Bein erstellt. Der ermittelte Wert wurde für den Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen verwendet.

Gewinnung der Hinterbeinmuskulatur

Nach der letzten Messung wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurde die Maus auf einer Unterlage fixiert und der Thorax eröffnet. Nachdem die *V. cava* durchtrennt und der linke Herzventrikel mit einer Kanüle punktiert wurde, erfolgte die Perfusion des Gefäßsystems mit 0,9%iger NaCl-Lösung. Schließlich wurden auf jeder Seite die Beinmuskeln herauspräpariert, beginnend mit dem *M. quadricpes femoris*, gefolgt vom *M. gastrocnemius* und zuletzt den Adduktoren. Die Muskeln wurden halbiert und ein Teil für die Gefrierschnitthistologie nach dem Einbetten bei -20 °C gelagert. Der andere Teil wurde mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur molekularbiologischen Analyse bei -80 °C gelagert. Die Entnahme des *M. quadriceps femoris* diente, da sich dieser Muskel auf Höhe der Ligatur befindet, der Untersuchung der Arteriogenese aufgrund von Flussveränderungen. Im Gegensatz dazu wurde im *M. gastrocnemius*, der sich distal der Ligatur befindet, die Angiogenese nach Ischämie und Hypoxie des Gewebes analysiert.

3.1.2 Cre/loxP-Rekombinationssystem

Das Cre/loxP-System dient dem gezielten Entfernen bestimmter Gensequenzen und der damit einhergehenden Geninaktivierung.

Cre (cyclization recombination) ist eine Rekombinase mit der Fähigkeit, die DNA zu spalten, Sequenzen gezielt zu entfernen und anschließend neu zu verbinden. Das Zielgen, das durch die Cre-Rekombinase entfernt werden soll, wird zur Erkennung durch sog. „loxP“-Stellen (locus of crossing over in P1) flankiert, was als „floxed“ bezeichnet wird. Hierzu wird die Cre-Rekombinase-exprimierende Linie mit der das gefloxed Gen tragenden

Mauslinie verpaart, sodass als Folge dessen das Zielgen herausgeschnitten wird¹²².

Das Fehlen bestimmter Gene im gesamten Organismus sowie ihr zu frühes Abschalten führen häufig dazu, dass die Tiere nicht lebensfähig sind. Um dieses Problem zu umgehen, wurde das Modell der konditionalen Knockout-Maus etabliert. Für das spezifische Abschalten des Gens wird die Expression der Cre-Rekombinase durch den ihr vorgeschalteten spezifischen Promotor auf einen bestimmten Zell- oder Gewebetyp eingegrenzt. Dadurch bleibt das gefloxtete Zielgen in allen anderen Zellen bzw. Geweben erhalten. Des Weiteren wird das zu frühe Abschalten des Zielgens in der Embryonalentwicklung umgangen, indem die Aktivierung der Cre-Rekombinase zeitlich kontrolliert wird. Dies erfolgt über die Fusion der Cre-Rekombinase mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) eines Östrogenrezeptors, der aufgrund einer Mutation der Gensequenz nicht mehr an körpereigene Hormone bindet, sondern nur noch durch synthetische Hormone, wie z. B. Tamoxifen, aktivierbar ist. Dadurch kann die Cre-Rekombinase zu einem beliebigen Zeitpunkt durch Tamoxifen aktiviert, das Zielgen herausgeschnitten und somit ein zell- oder gewebespezifisches Abschalten dieses Gens ermöglicht werden¹²².

Tamoxifen-Applikation

Einem Teil der Versuchsgruppen wurde vor Beginn der Versuche über einen Zeitraum von 5 Tagen täglich 100 µl in Sonnenblumenöl gelöstes Tamoxifen intraperitoneal appliziert. Der Versuchsbeginn startete 10 Tage nach der letzten Injektion.

3.1.3 Isolation glatter Muskelzellen aus Mausearten

Die Isolation glatter Muskelzellen aus Mausearten diente dem Nachweis, dass mit Tamoxifen induzierte MYH11-Cre/BMP4flox-Mäuse kein BMP4 mehr in ihren glatten Muskelzellen exprimieren. Das Protokoll für die Isolation wurde nach Internetrecherchen und in Anlehnung an vorhandene Protokolle im Labor etabliert¹²³.

Die Entnahme der Aorten erfolgte bei ca. 4–6 Wochen alten Mäusen 10 Tage nach der letzten Tamoxifen-Applikation sowie bei gleichaltrigen nicht behandelten Mäusen als Kontrollgruppe.

Am Tag der Isolation wurden die Enzymlösung (Tabelle 1) sowie das Kulturmedium (Tabelle 2) frisch zubereitet und, je nach anschließender Weiterverarbeitung der isolierten Zellen, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert oder kühl gelagert. Die in der Enzymlösung enthaltene Kollagenase ist in der Lage, durch Spaltung von Peptidbindungen Kollagen abzubauen, während die Elastase in der Lage ist, Elastin zu verdauen. Für den Schutz der Zellen vor dem Enzymverdau wurde der Enzymlösung noch der Sojabohne-Trypsin-Inhibitor hinzugefügt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Enzymlösung

Reagenz	Menge
Kollagenase Typ II	50 mg
Sojabohne-Trypsin-Inhibitor	50 mg
Elastase	7,2 mg
Penicillin/Streptomycin	500 µl
PBS +/-	50 ml
Gesamtvolumen	50 ml

Tabelle 2: Zusammensetzung des Kulturmediums

Reagenz	Menge
Gentamycin/Amphotericin B	200 µl
Penicillin/Streptomycin	500 µl
FBS	10 ml
DMEM/F-12	40 ml
Gesamtvolumen	50 ml

Nach Asphyxie der Mäuse mittels CO₂ wurde, wie in 3.1.1 beschrieben, das Gefäßsystem mit 0,9%iger NaCl-Lösung perfundiert, und es wurden alle Organe außer dem Herz aus der Brust- und Bauchhöhle entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, die Aorta nicht zu verletzen. Das Freipräparieren der Aorta erfolgte unter dem Binokular. Hierzu wurden Fasern und Fettgewebe entfernt und anschließend die Aorta nach dem Schnitt unterhalb des Aortenbogens sowie dem Schnitt auf Höhe der Abzweigung der *A. iliaca*

externa und *interna* entnommen und in einer 6-cm-Kulturschale mit 5 ml kaltem OptiMEM kühl gelagert. Im Anschluss wurden die Aorten zügig mit frischem OptiMEM gewaschen und entweder einzelne Aorten (für die anschließende RNA- und Proteingewinnung) oder zwei bis drei Aorten (für die Subkultivierung der isolierten Zellen) von Mäusen der gleichen Gruppe in eine 6-cm-Kulturschale mit 4 ml vorgewärmter Enzymlösung gesetzt und für 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die angedauten Aorten in eine 6-cm-Kulturschale mit 4 ml vorgewärmtem oder – für die Proteingewinnung – kaltem Kulturmedium gesetzt, um die Enzymreaktion zu stoppen. Die Weiterverarbeitung der Aorten erfolgte unter dem Binokular (auf Eis für die Proteingewinnung). Um eine reine Kultur vaskulärer glatter Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMCs) zu erhalten, müssen Adventitia und Intima entfernt werden⁴¹. In einem ersten Schritt wurde die bereits angedaute Adventitia abgezogen und im Anschluss das Gefäß längs mit der Aortenschere eröffnet, um übriges Blut zu entfernen. Die Endothelzellschicht wurde mit einer flachen Pinzette vorsichtig entfernt, und die – nun hauptsächlich nur noch aus der glatten Muskelzellschicht bestehenden – Aorten wurden in eine saubere 6-cm-Kulturschale mit 4 ml Kulturmedium gesetzt. Nach diesem Schritt konnte Protein aus den Aorten gewonnen werden (siehe 3.3.7 Proteinisolierung aus Mausaorten).

Für die Weiterkultivierung wurden die Aorten erneut in einer 6-cm-Kulturschale mit 4 ml vorgewärmter Enzymlösung eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und das Lösen der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Die weitere Lösung der Zellen erfolgte durch mehrmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren, indem die Zellen in der Enzymlösung resuspendiert wurden und im Anschluss die Platte mit 4 ml warmem Kulturmedium gewaschen wurde. Die 8-ml-Zellsuspension wurde in ein 50-ml-Reaktionsröhrchen gegeben und 5 min bei 300 x g und Raumtemperatur (RT) oder für die Gewinnung von RNA bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sich im Pellet befindenden Zellen wurden erneut mit 5 ml warmem Kulturmedium bzw. kalter phosphatgepufferter Salzlösung mit Kalzium und Magnesium (phosphate

buffered saline, PBS +/-) (für RNA) gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde für die Gewinnung von RNA aus den isolierten Zellen 700 µl Qiazol-Lysereagenz auf das Zellpellet gegeben und den in Tabelle 9 (siehe 3.3.1 RNA-Isolation aus Zellen) aufgeführten Schritten gefolgt.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, in eine 48-Well-Platte ausgesät und für zwei Wochen subkultiviert, bis ausreichend Zellen vorhanden waren und die Zellen erneut ausgesät wurden. Hierzu wurden 5×10^4 Zellen in je 1 ml Kulturmedium auf einen sog. gekammerten 4-Well-Zellkulturobjektträger verteilt. Ein Tag später wurden die Zellen zweimal mit PBS +/- gewaschen und je Kammer 1 ml EBM mit 0,4 % FBS auf die Zellen gegeben. Nach 48 h wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz gefärbt (siehe 3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung der isolierten).

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultur von humanen Zellen

Für die folgenden Versuche wurden humane aortale glatte Muskelzellen (human aortic smooth muscle cells, HAOSMCs) kultiviert. HAOSMC wurden höchstens bis zur neunten Passage kultiviert, da die Zellen beginnen seneszent zu werden, was sich durch das verzögerte Wachstum, die Ausdehnung der Zellen und den Verlust ihres charakteristischen spindelförmigen Aussehens manifestiert.

Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen mit der Zellkonzentration von $1,0 \times 10^6$ Zellen/ml aus flüssigem Stickstoff, der ihrer dauerhaften Konservierung diene, entnommen und bei Raumtemperatur angetaut. Anschließend wurden die Zellen steril unter der Zellkulturbank in ein 50-ml-Reaktionsröhrchen mit 9 ml 4 °C kaltem Stoppmedium überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das dabei entstandene Zellpellet wurde in 10 ml 37 °C warmem Kulturmedium suspendiert und in eine T-75-Flasche (75 cm²)

überführt. Diese wurde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis die Zellen weiter kultiviert oder für die Versuche ausgesät werden konnten.

Passagieren und Subkultivieren von Zellen

Sobald die Zellen eine Konfluenz von mindestens 80 % erreicht hatten, wurden sie passagiert und in ein neues Kulturgefäß gegeben. Um die adhärennten Zellen zu lösen, wurde in einem ersten Schritt das Kulturmedium aus der T-75-Zellkulturflasche entfernt, und es wurden die Zellen mit 10 ml PBS ohne Kalzium und Magnesium (PBS w/o) gewaschen. Damit die adhärennten Zellen sich von der Oberfläche lösen, wurden sie mit 2 ml Trypsin/EDTA benetzt und im Brutschrank 2 min bei 37 °C inkubiert. Wiederholtes leichtes Klopfen an die Seite der Zellkulturflasche erleichterte das Ablösen der Zellen. Um die enzymatische Reaktion zu beenden, wurden nach lichtmikroskopischer Kontrolle 8 ml Stoppmedium dazugegeben und die 10 ml Zellsuspension in ein 50-ml-Reaktionsröhrchen überführt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden bei diesem Schritt 20 µl der Zellsuspension entnommen. Das 50-ml-Reaktionsröhrchen wurde 5 min bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet in der für die gewünschte Zellkonzentration erforderlichen Menge Kulturmedium suspendiert und in ein neues Kulturgefäß ausgesät (Tabelle 3).

Zellzahlbestimmung

Für die Durchführung von Versuchen mit definierter Zellzahl sowie für die weitere Kultivierung wurde die Gesamtzellzahl in der Zellsuspension bestimmt. Hierzu wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und im gleichen Verhältnis mit 20 µl Trypanblau gemischt. Trypanblau dient der Unterscheidung vitaler Zellen, die den Farbstoff nicht aufnehmen, von abgestorbenen Zellen, die sich blau darstellen. Nach dem Auftragen auf die Neubauer-Zählkammer konnten bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop die vitalen Zellen in den 4 Quadranten gezählt werden und anschließend mit folgender Formel die Gesamtzellzahl je Milliliter bestimmt werden:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Summe der Zellzahl der 4 Quadranten}}{4} \times 2 \times 10^4$$

Durch Zugabe von Kulturmedium konnte die erforderliche Zellkonzentration für die benötigten Kulturgefäße erreicht werden.

Tabelle 3: Zellzahl und Volumina für die Versuche mit HAOSMC

Kulturgefäß	Zellzahl	Gesamtvolumen
12-Well-Platte	5×10^4	2 ml
6-cm-Kulturschale	3×10^5	2-3 ml
10-cm-Kulturschale	1×10^6	8 ml
75-cm ² -Zellkulturflasche	$0,8-1 \times 10^6$	10-12 ml
175-cm ² -Zellkulturflasche	$1,5-2 \times 10^6$	20-25 ml

Einfrieren von Zellen

Für die dauerhafte Konservierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach der Behandlung mit Trypsin/EDTA und dem Zentrifugieren wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium suspendiert und in der Konzentration 1×10^6 Zellen/ml in Kryoröhrchen abgefüllt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen für ein schonendes Einfrieren 24 Stunden in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigem Stickstoff kryokonserviert wurden.

3.2.2 Transfektion von siRNA in HAOSMC

Bei der Transfektion mittels siRNA (small interfering RNA) handelt es sich um eine transiente Transfektion auf posttranskriptionaler Ebene, um die Expression einzelner Gene zu hemmen und somit die Herunterregulierung des Zielgens zu erreichen.

Nach dem Einschleusen der siRNA in das Zytosol konnte diese mithilfe des dabei entstandenen Proteinkomplexes „RNA-Induced Silencing Complex“ (RISC) an die komplementären Messenger-RNA-Abschnitte (mRNA) binden und die Translation der Ziel-mRNA und somit die Produktion eines bestimmten Proteins verhindern².

Zwei Stunden vor Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel: Nach zweimaligem Waschen mit PBS +/+ wurden die Zellen auf Hungermedium

(EBM mit 1 % FBS) gesetzt, um sie für die Transfektion empfänglicher zu machen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Versuchsansätze für die Transfektion

	Für RNA-Isolation	Für Proteinisolation
Kulturgefäß	12-Well-Platte	6-cm-Kulturschale
Zellzahl	5×10^4	3×10^5
Hungermedium	500 μ l	5 ml

Die Reaktionsansätze wurden, wie in folgenden Tabellen (Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7) dargestellt, in Polystyrol-Röhrchen pipettiert.

Tabelle 5: Ansatz 1 für die siRNA-Transfektion

Ansatz 1	Für 1 x RNA-Isolation	Für 1 x Proteinisolation
Opti-MEM	48 μ l	490 μ l
Lipofectamine RNAiMAX	2 μ l	10 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l	500 μ l

Tabelle 6: Ansatz 2 für die siRNA-Transfektion (siRNA: c = 20 μ mol/l)

Ansatz 2	Für 1 x RNA-Isolation	Für 1 x Proteinisolation
Opti-MEM	47 μ l	470 μ l
siRNA (c = 20 μ mol/l)	3 μ l	30 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l	500 μ l

Tabelle 7: Ansatz 2 für die siRNA Transfektion (siRNA: c = 50 μ mol/l)

Ansatz 2	Für 1 x RNA-Isolation	Für 1 x Proteinisolation
Opti-MEM	48,8 μ l	488 μ l
siRNA (c = 50 μ mol/l)	1,2 μ l	12 μ l
Gesamtvolumen	50 μ l	500 μ l

Ansatz 1 wurde jeweils zu Ansatz 2 gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Ansätze gleichmäßig auf die Zellen getropft wurden.

24 Stunden nach Transfektion erfolgte erneut ein Mediumwechsel: Nach zweimaligem Waschen mit PBS ++ wurden die Zellen auf 1 ml (RNA) bzw. 2 ml (Protein) Medium für glatte Muskelzellen mit 5 % FBS gesetzt. Für die Gewinnung von Protein wurde das Medium 17 Stunden vor der Proteinisolation erneut gewechselt und es wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS ++ auf Opti-MEM gesetzt. Opti-MEM ist ein

serumfreies Medium und ermöglicht somit, für extrazelluläre Proteine die verminderte Expression in den Zellüberständen nachzuweisen.

Als Transfektionskontrolle diente die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 nm gekoppelte *scrambled* siRNA. Somit konnte die erfolgreiche Transfektion im Fluoreszenzmikroskop durch grün fluoreszierendes Licht optisch sichtbar gemacht werden.

3.2.3 Stimulation von HAOSMC

Nach dem Aussäen der HAOSMC in die entsprechenden Kulturgefäße (Tabelle 3: für den Western Blot in 6-cm- und für den Proteome Profiler™ Antibody Array in 10-cm-Kulturschalen) wurden die Zellen am folgenden Tag nach Abnahme des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS +/- auf Hungermedium gesetzt (EBM mit 0,4 % FBS). 24 Stunden später erfolgte die Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von rekombinantem BMPER-Protein (20/40/80 ng/ml) und rekombinantem BMP4-Protein (40 ng/ml) bzw. für den Proteome Profiler™ Antibody Array nur mit rekombinantem BMPER-Protein (40 ng/ml). Das Hungermedium wurde hierzu auf den Zellen belassen und die rekombinanten Proteine wurden in 500 µl (RNA) bzw. 1–4 ml (Protein) in Hungermedium verdünnt und zugegeben (Tabelle 8). Als Negativkontrolle dienten Zellen, denen in gleicher Menge nur Hungermedium zugegeben wurde.

Tabelle 8: Versuchsansätze für die Stimulation

	Für RNA-Isolation	Für Proteinisolation	
Kulturgefäß	12-Well-Platte	6-cm-Kulturschale	10-cm-Kulturschale
Zellzahl	5 x 10 ⁴	3 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶
Hungermedium	500 µl	2 ml	4 ml
Hungermedium mit bzw. ohne Stimulanzen	500 µl	1 ml	4 ml
Gesamtvolumen nach Stimulation	1 ml	3 ml	8 ml

Für die Stimulation über 48 Stunden wurde 24 Stunden nach Stimulation das Hungermedium von den Zellen genommen und es wurden die Zellen in gleicher Konzentration wie zuvor erneut stimuliert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Isolation aus Zellen

Für die RNA-Isolation aus Zellen wurde das Medium abgenommen, und es wurden die Zellen zweimal mit PBS +/- gewaschen. Die anschließende Isolation erfolgte unter dem Abzug nach Herstellerangaben (Tabelle 9). Außer Schritt 6 erfolgten alle Schritte bei Raumtemperatur.

Tabelle 9: RNA-Isolation aus Zellen

	Durchführung	Dauer
1.	Zugabe von 700 µl Qiazol-Lysereagenz zu den Zellen	
2.	Zellablösung mittels Zellschaber und Überführung in ein Reaktionsgefäß	
3.	Inkubation	5 min
4.	Vortexen nach Zugabe von 140 µl Chloroform	15 sec
5.	Inkubation	2–3 min
6.	Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C	15 min
8.	<u>Phasentrennung</u> : wässrige obere Phase mit RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführen (mittlere und untere Phase: DNA und Protein)	
9.	Auf- und Abpipettieren nach Zugabe von 525 µl 100 % EtOH	
10.	Überführung von 700 µl in eine Säule (sog. <i>mini spin column</i>)	
11.	Zentrifugation bei 8.000 x g und Durchfluss verwerfen	15 sec
12.	Wiederholung von Schritt 10–11 mit dem Rest der Probe	
13.	Zugabe von 700 µl RWT-Puffer auf die Säule	
14.	Zentrifugation bei 8.000 x g und Durchfluss verwerfen	15 sec
15.	Zugabe von 500 µl RPE-Puffer auf die Säule	
16.	Zentrifugation bei 8.000 x g und Durchfluss verwerfen	15 sec
17.	Wiederholung von Schritt 15–16	2 min
18.	Säule in ein neues Auffanggefäß setzen	
19.	Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und Durchfluss verwerfen	1 min
20.	Säule in das endgültige Reaktionsgefäß für die RNA setzen	
21.	Zugabe von 40 µl RNase-freiem Wasser auf die Säule	
22.	Zentrifugation bei 8.000 x g und Säule verwerfen	1 min
23.	RNA befindet sich im Eluat	
24.	Lagerung der RNA bei -80°C	

3.3.2 RNA-Isolation aus Muskelgewebe

Die RNA-Isolation aus den bei -80 °C gelagerten Muskelgewebeproben erfolgte unter dem Abzug. Die Vorgehensweise wird in folgender Tabelle 10 wiedergegeben.

Tabelle 10: RNA-Isolation aus Muskelgewebeproben

	Durchführung	Dauer	Temp
1.	Auftauen der Muskelgewebeproben		Auf Eis
2.	Zerkleinern mit dem Skalpell und Überführung in ein Reaktionsgefäß		Auf Eis
3.	100 μl TriPure zugeben und mörsern		Auf Eis
4.	Inkubation nach Zugabe von 400 μl TriPure	5 min	RT
5.	Vortexen nach Zugabe von 100 μl Chloroform	15 sec	RT
6.	Inkubation	10 min	RT
7.	Zentrifugation bei 12.000 x g	15 min	4 °C
8.	<u>Phasentrennung</u> : wässrige obere Phase mit RNA in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 μl Glykogen überführen (mittlere und untere Phase: DNA und Protein)		RT
9.	<u>RNA-Präzipitation</u> : Inkubation nach Zugabe von 250 μl Isopropanol und mehrfachem Invertieren	10 min	RT
10.	Zentrifugation bei 12.000 x g	10 min	4°C
11.	Überstand verwerfen und Pellet mit 500 μl 75 % EtOH waschen		RT
12.	Zentrifugation bei 7.500 x g	5 min	4 °C
13.	Überstand verwerfen und Pellet kopfüber trocknen lassen	10 min	RT
14.	Pellet in 40 μl Nuklease-freiem Wasser resuspendieren		RT
15.	Pellet im Heizblock vollständig lösen	15 min	60 °C
16.	<u>DNase Verdau</u> : Nach Zugabe von 1 μl DNase für eine höhere Reinheit der RNA im Heizblock	30 min	37 °C
17.	Inaktivierung der DNase im Heizblock	15 min	70 °C
18.	Lagerung der RNA		-80 °C

Sollte die gewonnene RNA gleich in cDNA umgeschrieben werden, wurde die Reinheit und Konzentration der Proben mit dem NanoDrop spektrophotometrisch gemessen.

3.3.3 cDNA-Synthese

Zum Umschreiben der einzelsträngigen RNA in doppelsträngige cDNA wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit verwendet. Zunächst wurden alle zuvor gemessenen RNA-Proben mittels Nuklease-freiem Wasser auf die gleiche

Konzentration mit einem Gesamtvolumen von 15 µl verdünnt. Zu jeder Probe wurden anschließend 5 µl Mastermix, bestehend aus 1 µl reverser Transkriptase und 4 µl iScript™ Reaction Mix (enthält verschiedene Reaktionspuffer, dNTPs, Oligo(dT)s und Random Primer) pipettiert. Die Proben wurden nun im Heizblock in einem ersten Schritt 5 min bei 25 °C inkubiert, danach 30 min bei 42 °C, um die RNA in cDNA umzuschreiben, und zuletzt 5 min bei 85 °C. Bevor die Lagerung bei -20 °C erfolgte, wurden die Proben mittels Nuklease-freiem Wasser auf eine Endkonzentration von 10 ng/µl verdünnt.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein Verfahren, mit dem DNA-Abschnitte vervielfältigt werden können. Der Name „Kettenreaktion“ beruht darauf, dass die Taq-Polymerase, eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, den komplementären Strang zu dem gewünschten DNA-Abschnitt synthetisiert und diesen Schritt mehrmals wiederholt, indem die Kopien immer wieder als Matrize für die nächste fungieren und es somit zu der exponentiellen Vervielfältigung der DNA kommt².

Für die PCR sind folgende Reagenzien notwendig: Die zu replizierende DNA (Template), zwei spezifische Primer (forward und reverse), dNTPs, eine hitzestabile Taq-Polymerase, Mg²⁺-Ionen für die Funktion der Taq-Polymerase und eine Pufferlösung, die für den optimalen pH-Wert und die optimale Salzkonzentration für die Taq-Polymerase sorgt. Primer sind Oligonukleotide, die sich an komplementäre DNA-Abschnitte anlagern und den Startpunkt der DNA-Synthese für die Taq-Polymerase festlegen.

Der Ablauf eines PCR-Zyklus gliedert sich wie folgt:

Zu Beginn erfolgt die Denaturierung. Durch Erhitzung denaturiert der DNA-Doppelstrang. Es kommt zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen und die beiden Stränge werden voneinander getrennt. In einem zweiten Schritt folgt die Primerhybridisierung (Annealing). Dabei lagern sich die Primer spezifisch an die nun freien DNA-Einzelstränge an. Da jeder Primer nur bei bestimmten Temperaturen (meist zwischen 55 und 64 °C)

zuverlässig bindet, muss vorher die Temperatur herabgesetzt werden. Beim letzten Schritt, der Elongation (Amplifikation), synthetisiert die Taq-Polymerase von dem durch die Primer gekennzeichneten Startpunkt aus die komplementären Stränge der DNA. Diese Schritte werden so oft wiederholt, bis ausreichend DNA amplifiziert wurde bzw. bis eine der Reagenzien ausgeschöpft ist.

Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung dient dem Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen im dem Genom der Maus und ist häufig die Voraussetzung für darauffolgende Versuche. Hierdurch lässt sich feststellen, ob es sich bei den Versuchsmäusen z. B. um Wildtypmäuse, homozygote oder heterozygote defiziente Mäuse handelt oder um konditionale Knockout-Mäuse, bei denen als Transgen die Cre-Rekombinase exprimiert wird sowie ein spezifischer DNA-Abschnitt gefloxt ist.

Gewebeentnahme und DNA-Extraktion

Die Schwanzspitzenbiopsie für die Genotypisierung der Mäuse erfolgte optimalerweise beim Absetzen im Alter zwischen 3–4 Wochen. Die Proben wurden für die Trennung des genetischen Materials von anderen Bestandteilen jeweils in 400 µl DNA-Lysepuffer mit 6 µl des Enzyms Proteinase K bei 55 °C und 1000 rpm über Nacht inkubiert. Die Fortsetzung der DNA-Extraktion erfolgte am nächsten Tag mit dem in Tabelle 11 dargestellten Protokoll.

Tabelle 11: DNA-Extraktion aus Schwanzspitzenbiopsien

	Durchführung	Dauer	Temp
1.	Zentrifugation bei 15.682 x g	10 min	4 °C
2.	300 µl Überstand abnehmen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführen		
3.	300 µl Isopropanol zu den Überständen geben		
4.	Zentrifugation bei 15.682 x g	20 min	4 °C
5.	Überstand verwerfen		
6.	100 µl EtOH auf das Pellet geben		
7.	Zentrifugation bei 15.682 x g	10 min	4 °C
8.	Überstand verwerfen		
9.	Pellet offen trocknen	10 min	50 °C
10.	Pellet in 60 µl <i>Aqua dest</i> resuspendieren		
11.	DNA bei 300 rpm im Heizblock inkubieren	2 h	50 °C
12.	Lagerung der DNA		4 °C

Genotypisierung mittels PCR

Die Versuchsansätze für die durchgeführten PCRs sind in Tabelle 12, Tabelle 13 und Tabelle 14 dargestellt. Zusätzlich wurde für jede PCR eine Wasserkontrolle – statt DNA – mitgeführt, die als Negativkontrolle nach dem Auftragen auf das Agarosegel keine Banden zeigen sollte. Da beim Nachweis des BMPER-Gens zwischen Wildtyp und BMPER-heterozygoten defizienten Mäusen unterschieden werden soll, wurden je Probe zwei Ansätze pipettiert. Ansatz I dient dem Nachweis des BMPER-Gens und sollte bei allen Mäusen im Agarosegel als gleiche Bande sichtbar werden. Die Bande auf dem Agarosegel für Ansatz II hingegen sollte – als Nachweis für die eingebrachte transgene DNA und damit das Abschalten des BMPER-Gens – nur bei BMPER-heterozygoten defizienten Mäusen vorhanden sein.

Tabelle 12: Versuchsansätze für die Genotypisierungs-PCR von BMPER

Reagenz	Ansatz I Volumen (µl)	Ansatz II Volumen (µl)
DNA	4	4
Wasser	16,3	16,3
10 x Puffer	2,5	2,5
Primer <i>fwd</i> : pCV2up (Ansatz I) bzw. pCV2down (Ansatz II)	0,5	0,5
Primer <i>rev</i> : pCV2down (Ansatz I) bzw. pGN1 (Ansatz II)	0,5	0,5
dNTPs	1	1
Taq-Polymerase	0,2	0,2
Gesamtvolumen	25	25

Tabelle 13: Versuchsansatz für die Genotypisierungs-PCR von MYH11-Cre

Reagenz	Volumen (µl)
DNA	1
Wasser	16,375
10 x Puffer	2,5
Magnesiumchlorid	2,5
Primer <i>fwd</i> oIMR7338	0,5
Primer <i>rev</i> OIMR7339	0,5
Primer 12026	0,5
Primer 12028	0,5
dNTPs	0,5
Taq-Polymerase	0,125
Gesamtvolumen	25

Tabelle 14: Versuchsansatz für die Genotypisierungs-PCR von BMP4floxed

Reagenz	Volumen (µl)
DNA	5
Wasser	15,3
10 x Puffer	2,5
Primer <i>fwd</i> BMP4 lox 2	0,5
Primer <i>rev</i> BMP4 lox 2	0,5
dNTPs	1
Taq-Polymerase	0,2
Gesamtvolumen	25

Anschließend wurden die Ansätze in den Thermocycler platziert und das entsprechende Protokoll (Tabelle 15, Tabelle 16, Tabelle 17) durchlaufen.

Tabelle 15: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von BMPER

Schritt	Temp (°C)	Dauer (min)	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	5:00	1 x
Denaturierung	94	0:30	
2. Primerhybridisierung	55	0:30	40 x
Elongation	72	0:30	
3. Terminale Elongation	72	7:00	1 x
4. Abkühlung	4	∞	1 x

Tabelle 16: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von MYH11-Cre

Schritt	Temp (°C)	Dauer (min)	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	2:00	1 x
Denaturierung	94	0:30	
2. Primerhybridisierung	60	0:30	40 x
Elongation	72	0:30	
3. Terminale Elongation	72	3:00	1 x
4. Abkühlung	4	∞	1 x

Tabelle 17: PCR-Protokoll für die Genotypisierung von BMP4flox

Schritt	Temp (°C)	Dauer (min)	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	5:00	1 x
Denaturierung	94	0:20	
2. Primerhybridisierung	55	0:30	38 x
Elongation	72	1:00	
3. Terminale Elongation	72	4:00	1 x
4. Abkühlung	4	∞	1 x

Agarose-Gelelektrophorese und Bandendetektion

Währenddessen wurde ein 2%-Agarosegel hergestellt. Dafür wurden 2 g Agarosepulver und 100 ml TAE-Puffer erhitzt und nach Zugabe von 12 µl des Farbstoffes Ethidiumbromid, der für das Sichtbarwerden der DNA-Banden nach UV-Anregung verantwortlich ist, in eine dafür vorgesehene Kammer mit einem Taschenkamm gegossen. Nach der PCR-Reaktion wurden zu den 25 µl Reaktionsprodukten je 7 µl Ladepuffer gegeben und davon 15 µl auf das Gel aufgetragen. Im Anschluss wurde eine elektrische Spannung von 120 V für ca.

30 min angelegt. Dabei wurden verschieden lange Nukleinsäure-Stücke voneinander getrennt. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem Geldokumentationssystem von Peqlab. Anschließend konnte die Größe der Fragmente mit Hilfe des SSL-Markers zugeordnet werden.

Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time-PCR (qPCR) beruht auf dem Verfahren der konventionellen PCR, ermöglicht jedoch die direkte quantitative Expressionsanalyse des Zielgens.

Ein zusätzliches Reagenz, das hier eingesetzt wird, ist ein inaktiver Fluoreszenzfarbstoff, SYBR Green. Dieser wird bei der DNA-Produktion aktiviert, indem er sich in die entstandenen DNA-Doppelstränge interkaliert und Fluoreszenzlicht emittiert. Somit steigt das Fluoreszenzsignal proportional zu den entstandenen DNA-Produkten, bis der Fluoreszenzwert erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dieser Wert wird auch als Ct-Wert (Cycle Threshold) bezeichnet und wird in der exponentiellen Phase der PCR gemessen. Mit folgender Formel in Tabelle 18 lässt sich die Expression des Zielgens in der jeweiligen Probe quantifizieren.

Tabelle 18: Formel zur Berechnung der Expression des Zielgens

$\Delta\Delta\text{Ct}$ -Formel
$\Delta\text{Ct (Probe)} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (Referenzgen)}$
$\Delta\text{Ct (Kontrolle)} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (Referenzgen)}$
$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Probe)} - \Delta\text{Ct (Kontrolle)}$
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = \text{Expression des Zielgens in der Probe}$

Die zusätzliche qualitative Aussage erfolgt durch die Schmelzkurvenanalyse, die die Spezifität der PCR-Reaktion anzeigt. Durch die kontinuierliche Erhöhung der Temperatur werden die DNA-Produkte bei der für sie spezifischen Schmelztemperatur erneut aufgetrennt. Dabei sinkt das Fluoreszenzsignal aufgrund des dadurch freiwerdenden Fluoreszenzfarbstoffes ab. Die Stärke des Fluoreszenzabfalles stellt sich in der Schmelzkurve als „Peak“ da. Besitzt eine Kurve mehrere *Peaks*, spricht dies für eine Verunreinigung der Probe oder für die Bildung von Primer-Dimeren².

Nachdem die RNA-Proben in cDNA umgeschrieben wurden, erfolgte die qPCR, um die Expression verschiedener Gene zu untersuchen. Als Referenzgen diente hRP II (humane RNA-Polymerase II). Da es sich bei SYBR Green um einen fluoreszierenden Farbstoff handelt, wurde lichtgeschützt gearbeitet. Zuerst wurde ein Mastermix bestehend aus Wasser, spezifischen Primern (forward und reverse) und SYBR Green Mix erstellt (Tabelle 19). Der Mix enthält neben dem SYBR Green die Taq-Polymerase, dNTPs und Magnesiumchlorid. Von den zu untersuchenden Proben bzw. vom Wasser für die Negativkontrolle wurden jeweils 2 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert und zu jeder Probe 10 µl vom Mastermix zugegeben. Um ein präziseres Ergebnis zu erhalten, wurden Duplikate von den Proben pipettiert.

Tabelle 19: Versuchsansatz der quantitativen Real-Time-PCR

Reagenz	Volumen (µl)
Wasser	3,25
Forward-Primer	0,25
Reverse-Primer	0,25
cDNA	2
SYBR Green	6,25
Gesamtvolumen	12

Anschließend wurde die Platte mit selbstklebender Klarsichtfolie versiegelt und für 1 min bei 872 x g zentrifugiert. Dann wurde die Platte in den Thermocycler gesetzt und das Protokoll (Tabelle 20) gestartet.

Tabelle 20: Protokoll der quantitativen Real-Time-PCR

Schritt	Temp (°C)	Dauer (min)	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	94	1:00	1 x
Denaturierung	94	0:05	
2. Primerhybridisierung	55–64	0:30	50 x
Elongation	72	0:30	
3. Terminale Elongation	72	5:00	1 x
4. Schmelzkurvenbeginn	55	1:00	1 x
5. Schmelzkurve (jeweils + 0,5 °C)	55–95	0:10	80 x
6. Abkühlung	4	∞	1 x

Die Auswertung der PCR erfolgte mit der Bio-Rad CFX Manager Software.

TaqMan™-Real-Time-MicroRNA-Assay

TaqMan™-MicroRNA-Assays sind hochspezifische Verfahren, die der Detektion und genauen Quantifizierung reifer miRNAs dienen. Dabei handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, da nur sehr geringe Mengen RNA benötigt werden. Die Quantifizierung reifer miRNAs erfolgt dabei in zwei Schritten. In einem ersten Schritt findet die reverse Transkription der cDNA aus RNA mithilfe von spezifischen *stem-looped* RT-Primern und weiteren Reagenzien aus dem TaqMan™-MicroRNA-Reverse-Transcription-Kit statt. Anschließend folgt die RT-PCR mit der Amplifizierung und Quantifizierung der PCR-Produkte. Der Assay unterscheidet dabei spezifisch zwischen reifer miRNA und ihrem Vorläufer, der prä-mRNA. Das Prinzip der RT-TaqMan™-PCR beruht auf einer Sonde, die an ihrem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) und am 3'-Ende mit einem sog. „Quencher“ (Akzeptor) versehen ist. Der *Quencher* absorbiert das emittierte Licht des Reporterfarbstoffes, solange sich beide in räumlicher Nähe befinden. In jedem Zyklus lagert sich diese Sonde komplementär an das bei der Stem-loop-RT entstandene PCR-Produkt an. Bei der Synthese des neuen DNA-Stranges durch die Taq-DNA-Polymerase spaltet diese während der Amplifikation mit ihrer 5'-3'-Nukleaseaktivität das 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff von der Sonde ab. Dadurch entsteht eine räumliche Trennung von Reporter und *Quencher* und es kommt zum Anstieg des Fluoreszenzsignals proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produktes¹²⁴.

TaqMan™-Stem-loop-RT

Zu Beginn wurden die RNA-Proben auf 2 ng/μl verdünnt und anschließend der Versuchsansatz wie in Tabelle 21 dargestellt in eine 96-Well-Platte pipettiert.

Tabelle 21: Versuchsansatz für die TaqMan™-Stem-loop-RT

Reagenz	Volumen (µl)
Wasser	1,39
reverser Transkriptionspuffer	0,5
dNTPs	0,05
Multi scribe reverse Transkriptase	0,33
RNase-Inhibitor	0,06
spezifischer RT-Primer	1
RNA	1,666
Gesamtvolumen	5

Die Platte wurde versiegelt und für 1 min bei 863 x g zentrifugiert. Danach wurde sie in den Thermocycler gesetzt und das Protokoll (Tabelle 22) gestartet.

Tabelle 22: Protokoll für die TaqMan™-Stem-loop-RT-PCR

	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1.	16	30:00
2.	42	30:00
3.	85	5:00
4.	4	∞

TaqMan™-Real-Time-PCR

Nach Abschluss der Stem-loop-RT-Reaktion wurden die RT-Produkte in eine neue 96-Well-Platte als Duplikate pipettiert und die spezifischen Primer sowie der Universal-Master-Mix zugegeben (Tabelle 23).

Tabelle 23: Versuchsansatz für die TaqMan™-Real-Time-PCR

Reagenz	Volumen (µl)
Wasser	7,67
TaqMan™-Universal PCR Master-Mix	10
Spezifischer TaqMan™-miRNA-Assay-Mix	1
cDNA (RT-Produkt)	1,33
Gesamtvolumen	20

Nach Versiegelung und Zentrifugation der Platte wurde das in Tabelle 24 aufgeführte TaqMan™-Real-Time-PCR-Protokoll gestartet.

Tabelle 24: TaqMan™-Real-Time-PCR-Protokoll

Schritt	Temp (°C)	Dauer (min)	Zyklen
1. Enzymaktivierung	95	10:00	1 x
2. Denaturierung	95	0:15	40 x
Annealing und Elongation	60	1:00	
3. Abkühlung	4	∞	1 x

Die anschließende Auswertung erfolgte mit der Bio-Rad-CFX-Manager-Software.

3.3.5 Gewinnung von Zelllysaten

Zur Proteingewinnung aus den Zellen wurde das Medium von den Kulturschalen entfernt und entweder verworfen oder für die Gewinnung der Zellüberstände (3.3.6 Gewinnung von Zellüberständen) verwendet. Die Zellen wurden mit PBS ++ gewaschen und anschließend – um sie zu lösen – mit 60 µl eines Gemisches aus RIPA-Puffer mit SDS und Proteinase-Inhibitor (im Verhältnis 1 : 50) bedeckt und für 20 min bei 4 °C auf dem Schwenktisch inkubiert. Hierbei dient der RIPA-Puffer als Lysepuffer, SDS denaturiert Proteine durch Unterbrechung ihrer nichtkovalenten Bindungen und der Proteinase-Inhibitor schützt Proteine vor dem Abbau durch zelleigene Proteinase. Darauf folgend wurden die Zellen mechanisch mit dem Zellschaber von den Zellkulturplatten gelöst und die Proteine durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren aufgeschlossen. Das aufgeschäumte Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand, in dem sich die Proteine befanden, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde verworfen.

3.3.6 Gewinnung von Zellüberständen

Nach Abnahme des Mediums von den mit siRNA transfizierten Zellen wurde dieses in ein Reaktionsgefäß pipettiert und sofort bei -20 °C eingefroren. Das Einengen der Proben erfolgte erst für die Analyse der Proteinexpression. Hierzu wurden die Proben erneut aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit Filtereinheit gegeben, das bei 4000 x g 15 min bei Raumtemperatur

zentrifugiert wurde. Anschließend wurden 50 µl Proteinkonzentrat in ein Reaktionsgefäß überführt. Da alle Proben ein einheitliches Volumen aufwiesen, wurden sie ohne vorherige Bestimmung der Proteinkonzentration vollständig auf das Gel für die Elektrophorese aufgetragen.

3.3.7 Proteinisolierung aus Mausearten

Die Proteingewinnung aus Mausearten erfolgte nach Ablösen der Adventitia und Endothelzellschicht der Gefäße. Die Aorten wurden mit dem Skalpell zerkleinert und nach Zugabe von 50 µl RIPA-Puffer mit SDS und Proteinase-Inhibitor (im Verhältnis 1 : 50) mit dem Mörser in einem Reaktionsgefäß mechanisch weiter zerkleinert. Anschließend wurden die Proben ähnlich wie bei der Gewinnung der Zelllysate für 20 min bei 4 °C auf dem Schwenktisch inkubiert und danach 10 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die weitere Aufreinigung wurde der Zentrifugationsschritt bei den gewonnenen Überständen zwei- bis dreimal wiederholt. Danach wurden die Überstände bei -20 °C gelagert.

3.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford-Assay)

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bradford-Assay. Um die Proben messen zu können, wurde zunächst eine BSA-Standardreihe erstellt. Hierzu wurden jeweils 1 ml verdünntes Bradford-Dye (200 µl Bradford-Dye und 800 µl Wasser) in die Plastikküvetten gegeben. Anschließend wurden für die 4 Standards kein, 1, 2 oder 5 µl BSA der Konzentration 2 µg/µl hinzu pipettiert bzw. für die Messung der Proteinproben jeweils 3 µl der entsprechenden Probe. Die Messküvetten wurden mit Parafilm abgedeckt, kurz invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Messung im Spektrophotometer bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ erfolgte.

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau, der im Bradford-Dye enthalten ist, hat in ungebundener, roter Form ein Absorptionsspektrum bei $\lambda = 470 \text{ nm}$. Durch die Komplexbildung mit Proteinen entsteht die gebundene, blaue Form und das Absorptionsspektrum verschiebt sich zu

einem Maximum bei $\lambda = 595 \text{ nm}$. Die gemessene Extinktion ist somit das Maß für die Proteinkonzentration in der jeweiligen Probe.

3.3.9 Western Blot

Ziel des Western Blot ist es, die Expression verschiedener Proteine zu analysieren. Dies geschieht, indem Proteine, die zuvor mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden, um anschließend durch Immundetektion sichtbar gemacht werden zu können.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Dem eigentlichen Western Blot ist die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) vorgeschaltet. Hierbei werden Proteine entsprechend ihrer Größe bzw. Molekülmasse in einem elektrischen Feld aufgetrennt, indem die negativ geladenen Moleküle durch das Gel zur Anode wandern. Kleine Proteine migrieren dabei schneller durch das Maschensystem des Gels als große, die zurückgehalten werden. Dieses Verfahren wird als „diskontinuierlich“ bezeichnet, da die Proteine Gele mit unterschiedlichen Porengrößen und pH-Werten durchlaufen. Zuerst werden die Proteine im Sammelgel konzentriert und anschließend erfolgt im Trenngel ihre eigentliche Auftrennung.

Als erstes wurde das Trenngel gegossen. Dafür wurden zwei Glasplatten in eine dafür vorgesehene Vorrichtung eingeklemmt und das Trenngel in den Spalt pipettiert. Für eine glatte Oberfläche wurde es mit 70 %igem Ethanol (EtOH) abgedeckt. Die Polymerisation dauerte ca. 30 min. Darauf folgend wurde das EtOH entfernt und die Oberfläche dreimal mit *Aqua dest* gewaschen. Im Anschluss wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Taschen eingesetzt. Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) fungieren dabei als Initiator und Katalysator der Polymerisation. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Gele für die Gelelektrophorese

Reagenz	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
Wasser	3,5 ml	2,85 ml
Acrylamid	4 ml	0,85 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
SDS (10 %)	100 µl	50 µl
TEMED	14 µl	10 µl
APS (10 %)	100 µl	100 µl

Nachdem das zweite Gel nach 15 min fertig polymerisiert war, wurde der Kamm entnommen; die 10 Taschen wurden dreimal mit *Aqua dest* gewaschen und die fertigen Gele in eine dafür vorgesehene, mit Laufpuffer gefüllte Apparatur gesetzt.

Im Anschluss wurden die Proteinproben für die Taschen vorbereitet. Hierzu wurden die Proben, wie in Tabelle 26 aufgeführt, zusammenpipettiert.

Tabelle 26: Probenvorbereitung für die Gelelektrophorese

Reagenz	Menge
Proteinprobe	x µl (je nach Proteinkonzentration)
RIPA-Puffer + SDS	50 µl - x
Loading-Dye	9,25 µl
β-Mercaptoethanol	0,75 µl

Die Proben wurden bei 95 °C erhitzt und zügig in die Tasche pipettiert. Durch das Erhitzen und die Zugabe von SDS und β-Mercaptoethanol wurden die Proteine denaturiert und es kam zum Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen, die u. a. für die typischen Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine verantwortlich sind. Damit den bei der Immundetektion sichtbar werdenden Banden eine Größe zugeordnet werden kann, wurden in die erste Tasche 7,5 µl des Proteinmarkers gegeben. War das Gel fertig beladen, wurde die Apparatur angeschlossen und je nach Größe der zu untersuchenden Proteine für 1,5–2 Stunden bei 150 V laufen gelassen.

Proteintransfer

Nach der Gelelektrophorese folgte der eigentliche Western Blot; die Übertragung der aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine

Nitrozellulosemembran (Blotting). Dafür wurde ein Wet-(Tank-)Blot-System der Firma Bio-Rad verwendet. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel herausgelöst und das Sammelgel mit den Taschen entfernt. Das Gel wurde anschließend auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und zwischen Filterpapieren und Schwämmchen, die zuvor für 5 min in 4 °C kaltem Transferpuffer eingelegt waren, in strenger Reihenfolge zu dem sog. „Blot-Sandwich“ zusammengebaut. Um den Einschluss von Luftbläschen zu vermeiden, die bei der späteren Immundetektion stören, wurde mehrmals mit einem Plastikstab über das *Blot-Sandwich* gerollt. Dieses wurde dann in das mit kaltem Transferpuffer gefüllte Tank-System gestellt und angeschlossen. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 100 V.

Ponceau S

Die Membran mit den Überständen wurde vor dem Blocken mit Milch für 10 min auf dem Schwenktisch in Ponceau S bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden inkubiert. Dies dient zum einen zur Überprüfung, ob die Proteine auf die Membran übertragen wurden, und ist gleichzeitig die Ladekontrolle. Sobald die Banden erkennbar waren, wurde von der Membran ein Auflichtbild im Image-Reader aufgenommen. Bevor die Membran nun mit Milch geblockt werden konnte, musste sie drei- bis viermal jeweils 10 min auf dem Schwenktisch mit *Tris-buffered saline with Tween 20* (TBST) gewaschen werden, um den roten Farbstoff wieder zu entfernen.

Blockieren

Im Anschluss daran wurde die Membran in eine passende Schale auf den Schwenktisch für 30 min bei Raumtemperatur in 3 % Magermilch, bestehend aus Magermilchpulver und TBST, eingelegt. Dadurch konnten überschüssige Proteinbindungsstellen auf der Membran abgesättigt und somit das unspezifische Binden durch Primärantikörper an sie verhindert werden. Nach 30 min wurde die Milch entfernt, der in Magermilch verdünnte spezifische Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schwenktisch inkubiert.

Immundetektion

Alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf dem Schwenktisch bei Raumtemperatur.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper abgenommen und die Membran nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit TBST für 1–2 Stunden in den ebenfalls in Magermilch verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Dabei handelt es sich um einen spezifisch gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper, der an das Reporterenzym Meerrettichperoxidase (HRP, engl. horseradish peroxidase) gekoppelt ist. Als nächstes folgten erneut drei Waschschrte für jeweils 5 min mit TBST und zuletzt wurde 1 ml ECL-Lösung auf die Membran gegeben. Durch das HRP wurde das in der ECL-Lösung vorhandene Luminol oxidiert und eine Chemilumineszenzreaktion ausgelöst (Abbildung 6). Für die Immundetektion wurden von der Membran im Image-Reader je nach Intensität der Banden zwischen 60 sec und 40 min mehrere Bilder aufgenommen. Die Auswertung der Banden erfolgte ebenfalls mit der Image-Lab 4.0-Software von Bio-Rad.

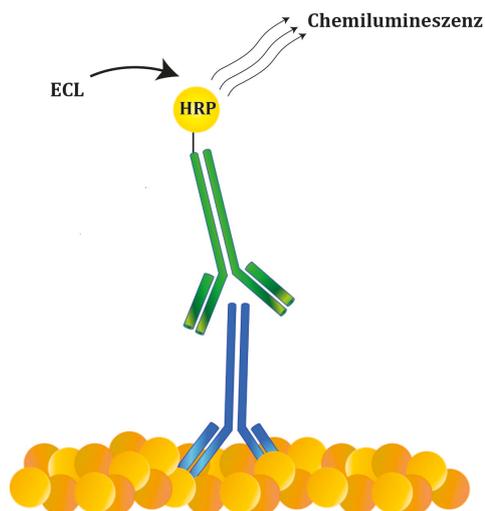


Abbildung 6: Immundetektion mittels Chemilumineszenz

Schematische Darstellung der Immundetektion mittels Chemilumineszenz.

Der Primärantikörper bindet an das Zielprotein auf der Membran; HRP-gekoppelter Sekundärantikörper (HRP = horseradish peroxidase) bindet an Primärantikörper; Detektionsreagenz (ECL, enhanced chemiluminescence) interagiert mit HRP und erzeugt Chemilumineszenz.

3.3.10 Proteome Profiler™ Antibody Array

Der „Proteome Profiler™ Antibody Array“ (Proteome-Array) ist im Vergleich zum konventionellen Western Blot eine schnelle, sensitive, zeit- und kostensparende Methode, um die Expression von vielen Proteinen (hier 119) in verschiedenen Proben gleichzeitig zu messen und zu vergleichen.

Das Prinzip beruht auf Antikörper-Antigen-Interaktionen und wird in Abbildung 7 dargestellt. Die sog. „capture antibodies“ (Fangantikörper) und Kontrollantikörper befinden sich als Duplikate auf einer Nitrozellulosemembran. Da die Testflächen der einzelnen Antikörper sehr nah beieinanderliegen, wird dieser Prozess zum Fixieren der Antikörper auf die Membran auch *Spotting* (Tüpfeln) genannt. Das vorher biotinylierte Zelllysate wird auf der Membran inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten Detektionsantikörper. Nach Zugabe von Streptavidin-HRP, das mit Biotin interagiert, und dem Chemilumineszenzdetektionsreagenz wird ein Signal in Form von Licht entsprechend der an den *Spots* gebundenen Menge Protein produziert.

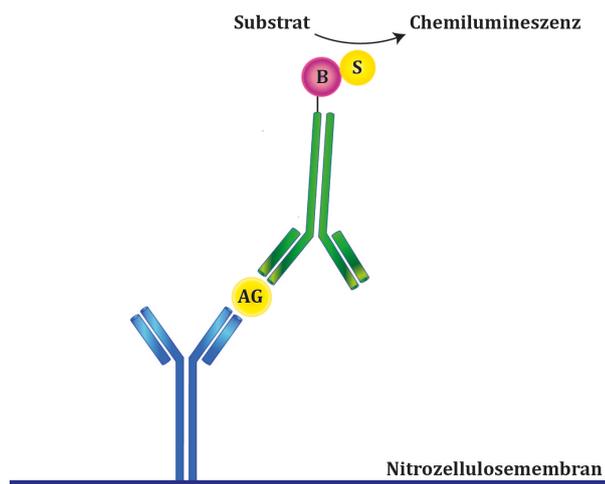


Abbildung 7: Proteome Profiler™ Antibody Array

Schematische Darstellung des Proteome-Arrays.

Biotin-gekoppelter Detektionsantikörper (B = Biotin) bindet an das Antigen (AG), das vom Fangantikörper auf der Nitrozellulosemembran gebunden wurde; Streptavidin-HRP (S) interagiert mit Biotin; nach Zugabe von dem Detektionsreagenz wird Licht emittiert, proportional zu der an den *Spots* gebundenen Menge Protein.

Bei dem verwendeten Proteome-Array von R&D Systems handelt es sich um den „Non-Hematopoietic Panel“ (Nicht-hämatopoetische Panel) bestehend aus zwei „Non-Hematopoietic Arrays“ (N-Array) und zwei „Common Analytes Arrays“ (C-Array) (Abbildung 8).

N	N	C	C
Kontrolle	Stimulation	Kontrolle	Stimulation

Abbildung 8: 4-Well-Multischale

Schematische Darstellung der verwendeten 4-Well-Multischale.
N = N-Array; C = C-Array

Die in Tabelle 27 aufgeführten Reagenzien und Puffer wurden am Tag der Versuchsdurchführung bzw. kurz vorher frisch angesetzt.

Tabelle 27: Vorbereitung der Reagenzien für den Proteome-Array

Reagenz	Durchführung
Lysepuffer-17-Mix	Proteinase-Inhibitor 1 : 200 in Lysepuffer 17 lösen
Array-Puffer 8/1	1 ml Array-Puffer 8 + 9 ml Array-Puffer 1
Waschpuffer	40 ml Waschpufferkonzentrat + 960 ml <i>Aqua dest</i>
Detektionsantikörpermischung N bzw. C	Biotinylierter Antikörper N bzw. C in 100 µl <i>Aqua dest</i> lösen
Streptavidin-HRP	Streptavidin-HRP 1:2000 in Array-Puffer 8/1 lösen
Chemi-Reagent-Mix	Chemi Reagent 1 und 2 im Verhältnis 1 : 1 mischen

Die Zellen wurden nach Entnahme des Mediums zweimal mit PBS +/- gewaschen und anschließend jeweils mit 300 µl mit dem Lysepuffer-17-Mix benetzt. Nach dem mechanischen Lösen mit dem Zellschaber wurde jeweils das Zelllysat von zwei Kulturschalen, die der gleichen Bedingung unterlagen (Kontrolle oder Stimulation), in ein Reaktionsgefäß überführt. Die zwei Reaktionsgefäße mit jeweils einem Gesamtvolumen von 600 µl wurden im Anschluss für 30 min bei 4 °C und 800 rpm im Schüttler inkubiert. Danach wurden die Proben für 5 min bei 4 °C und 14.000 x g zentrifugiert, der

Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay gemessen (siehe 3.3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford-Assay)). Während die 4 Membranen in je 2 ml Array-Puffer 8/1 in der 4-Well-Multischale auf dem Schwenktisch bei Raumtemperatur inkubiert wurden, erfolgte die Vorbereitung der Proben (Tabelle 28).

Tabelle 28: Probenvorbereitung für den Proteome-Array

Reagenz	Menge
Array-Puffer 8	300 µl
Proteinprobe	x µl (je nach Proteinkonzentration)
Array-Puffer 1	2,7 ml - x
Gesamtvolumen	3 ml

Nach einer Stunde wurde der Array-Puffer 8/1 von der 4-Well-Multischale abgenommen und je 1,5 ml von jeder Probe auf eine der Membranen (N- und C-Array) gegeben. Danach wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C auf dem Schwenktisch inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Proteome-Array, wie in Tabelle 29 beschrieben, fortgesetzt. Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf dem Schwenktisch bei Raumtemperatur.

Tabelle 29: Proteome-Array-Protokoll

	Durchführung	Dauer
1.	Membranen aus 4-Well-Multischale entfernen und mit je 20 ml Waschlösung waschen	3 x 10 min
2.	4-Well-Multischale mit <i>Aqua dest</i> waschen und trocknen	
3.	Zugabe pro Well von 1,5 ml Array-Puffer 8/1 und 30 µl der entsprechenden Detektionsantikörpermischung	
4.	Membranen in der 4-Well-Multischale inkubieren	2 h
5.	Wiederholung Schritt 1 und 2	3 x 10 min
6.	Zugabe von 2 ml verdünntes Streptavidin-HRP pro Well	
7.	Membranen in der 4-Well-Multischale inkubieren	30 min
8.	Wiederholung von Schritt 1 und 2	3 x 10 min
9.	Membranen in die 4-Well-Multischale legen	
10.	Zugabe in jeden Well von 1 ml Chemi-Reagent-Mix pro Membran und inkubieren	1 min

Anschließend erfolgte die Immundetektion für 30 min mit dem Image-Reader von Bio-Rad. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Manuals des Herstellers und der Image-Lab-4.0 Software.

3.4 Immunfluoreszenzfärbung und Histologie

3.4.1 Einbetten und Gefrierschneiden der Muskelpräparate

Die für die Gefrierschnitthistologie gewonnenen Muskelproben aus dem Hinterbeinischämie-Modell wurden mit Hilfe von Tissue-Tek O.C.T. Compound in kleine dafür vorgesehene Einbettungsbehälter eingebettet und, damit sich die Proben bis zum vollständigen Festwerden des Einbettmediums nicht verschoben, auf den Metallblock positioniert. Bis zu ihrer Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Das Schneiden der Muskelproben erfolgte am Kryostaten. Dafür wurden die Proben aus den Einbettungsbehältern gelöst und mit Tissue-Tek O.C.T. Compound auf dem Stempel fixiert. Sobald das Präparat fixiert war, wurde es in den Kryostaten eingespannt, und es wurden ca. 5 µm dicke Querschnitte erzeugt, die auf Objektträger aufgebracht wurden. Zwischen jedem Schnitt wurden 5–10 µm verworfen. Auf jeden Objektträger wurden drei Schnitte aufgebracht, und zwar nicht in serieller Reihenfolge, sondern immer abwechselnd auf die 15 Objektträger verteilt. Somit konnte gewährleistet werden, dass die für die spätere Immunfluoreszenzfärbung benötigten Schnitte, die sich auf einem Objektträger befanden, aus unterschiedlichen Abschnitten des Präparates stammten. Nachdem auf allen Objektträgern der erste Schnitt aufgezogen war, wurden 50 µm verworfen und der zweite Schnitt auf die Objektträger gesetzt. Das gleiche erfolgte zwischen dem zweiten und dem dritten Schnitt. Die fertigen Objektträger wurden für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und danach bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Immunfluoreszenzfärbung der Muskelpräparate

Die Immunfluoreszenz dient dem *In-situ*-Nachweis der Proteinexpression auf den Schnitten, die mit dem Kryostaten angefertigt wurden. Das Prinzip beruht auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion und dem dabei entstehenden Immunkomplex. Dabei werden zwei Methoden dieser Nachweisreaktion

unterschieden: die direkte Immunfluoreszenz (Abbildung 9A) und die indirekte Immunfluoreszenz (Abbildung 9B). Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der Primärantikörper, der spezifisch an das Antigen bindet, an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Dieser kann unter dem Fluoreszenzmikroskop durch Licht mit einer speziellen Wellenlänge angeregt werden und als Antwort Licht einer anderen Wellenlänge emittieren. Die indirekte Immunfluoreszenz unterscheidet sich, indem nicht der Primärantikörper fluoreszenzmarkiert ist, sondern ein gegen diesen gerichteter Sekundärantikörper (Prinzip wie beim Western Blot).

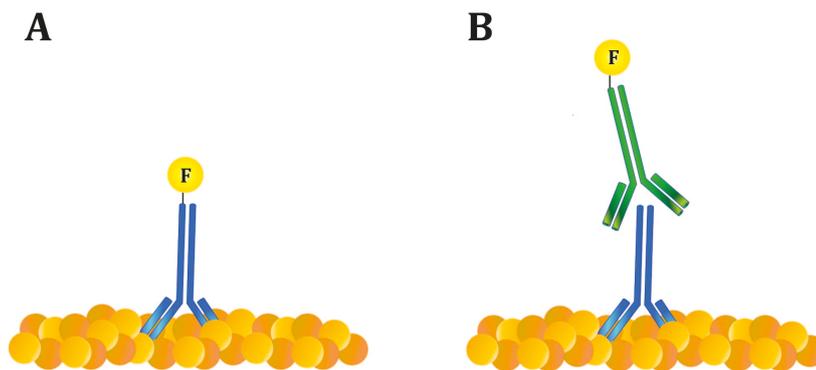


Abbildung 9: Immunfluoreszenz

Schematische Darstellung der

- A) direkten Immunfluoreszenz: Der an den Fluoreszenzfarbstoff (F) gekoppelte Primärantikörper bindet an das Antigen.
- B) indirekten Immunfluoreszenz: Der Primärantikörper bindet an das Antigen und der an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper.

Für die im Hinterbeinischämie-Modell gewonnenen, auf Objektträgern angelegten Gefrierschnitte der Muskelproben wurde die Doppelfärbung mit dem Endothelzellmarker CD31 und dem Marker für glatte Muskelzellen SMA gewählt. Zusätzlich dazu wurden die Zellkerne mittels DAPI angefärbt. Die Vorgehensweise für die Färbung wird in Tabelle 30 dargestellt. Alle Waschschritte und die Fixierung erfolgten auf dem Schwenktisch.

Tabelle 30: Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung der Gefrierschnitte

	Durchführung	Dauer	Temp
1.	Auftauen, Trocknen und Beschriften	30 min	RT
2.	Fixieren mit -20°C kaltem Aceton	20 min	4 °C
3.	Waschen mit PBS w/o	3 x 5 min	RT
4.	Blocken mit 10 %igem normalem Ziegen Serum	60 min	RT
5.	Waschen mit PBS w/o	1 x 3 min	RT
6.	Primärantikörper	über Nacht	4 °C
7.	Waschen mit PBS w/o	3 x 5 min	RT
8.	Sekundärantikörper und DAPI	60 min	RT
9.	Waschen mit PBS w/o	5 x 5 min	RT
10.	Eindecken mit Mowiol		RT
11.	Trocknen	über Nacht	RT
12.	Lagerung im Dunkeln		4 °C

Als Negativkontrolle wurden anstelle des Primärantikörpers ein Isotyp-Kontrollantikörper verwendet, um unspezifische Antikörperinteraktionen auszuschließen. Da verschiedene Proteine nachgewiesen werden sollten, erfolgte das Blocken für alle Schnitte mit in PBS verdünntem 10 %igem normalem Ziegen Serum, wodurch sich unspezifische Bindungen durch den Sekundärantikörper verhindern lassen. Um die fertig gefärbten Präparate möglichst lange zu konservieren, wurden sie mit dem Einbettmedium Mowiol und Bleichschutz eingedeckt und mit dem Deckgläschen geschützt.

3.4.3 Immunfluoreszenzfärbung der isolierten vaskulären glatten Muskelzellen

Das Medium der aus Mauseorten isolierten und in einem gekammerten 4-Well-Zellkulturobjektträger kultivierten vSMCs wurde entfernt, und die Zellen wurden einmal mit 1 ml PBS +/- gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen nach dem in Tabelle 31 aufgeführten Protokoll fixiert und gefärbt. Alle Schritte erfolgten auf dem Schwenktisch.

Tabelle 31: Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung der isolierten vSMCs

	Durchführung	Dauer	Temp
1.	Fixieren mit -20°C kaltem Aceton-Methanol-Gemisch (1:1)	10 min	-20 °C
2.	Waschen mit PBS +/-	3 x 3 min	RT
3.	Blocken mit 10 %igem Kaninchenserum	30 min	RT
4.	Zugabe von in 5 %igem Kaninchenserum verdünntem Primärantikörper SMA-FITC bzw. der Isotypkontrolle und DAPI	2 h	RT
5.	Waschen mit PBS +/-	3 x 3 min	RT
6.	Lösen der Kammer von dem Objektträger		RT
7.	Eindecken mit Mowiol und Bleichschutz		RT
8.	Trocknen	über Nacht	RT
9.	Lagerung im Dunkeln		4 °C

3.5 Mikroskopie und quantitative Bildanalyse

3.5.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Analyse der immunfluoreszenzgefärbten Präparate wurde mit dem Axioplan-2-Epifluoreszenzmikroskop und der Quecksilberlampe durchgeführt.

Für die Auswertung der Muskelpräparate wurde von jedem Schnitt jeweils ein Übersichtsbild in 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Anschließend wurde in 200-facher Vergrößerung ein repräsentatives Bild aufgenommen und ein Quadrat (490 x 490 Pixel) eingefügt, um innerhalb dieser Region alle Kapillaren (CD31-positiv gefärbte Zellen) zu zählen. Für die Auswertung der Fläche der Media (SMA-positiv gefärbte Zellen) wurden mehrere für das Präparat repräsentative Bilder in 400-facher Vergrößerung je Schnitt aufgenommen. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit der AxioVision-Software.

3.6 Statistik

Bei dieser Arbeit handelt es sich in erster Linie um eine Orientierungsstudie mit dem Ziel, für die Medizin relevante Zusammenhänge zu erkennen und zu erforschen.

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen erfolgte mit der Software GraphPad Prism 5.01. Für die ausgewerteten PCR, Western Blot und histologischen Daten wurde die graphische Darstellung als Säulendiagramm – unter Angabe des jeweiligen arithmetischen Mittelwertes und Standardfehlers (\pm SEM als Fehlerbalken dargestellt) – gewählt bzw. bei $n \leq 3$ als Punktdiagramm mit Darstellung des Mittelwertes als Querbalken. Die graphische Darstellung der Laser-Doppler-Messungen im Zeitverlauf erfolgte als Kurvendiagramm aus den jeweiligen Mittelwerten und Standardfehlern der einzelnen Gruppen unter Angabe der Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC). Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle mit einem Signifikanzniveau von 5 % ($p \leq 0,05$) wurden als statistisch signifikant angenommen und mit Sternen markiert (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$). Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und die Varianzhomogenität mit dem F-Test, überprüft. Anschließend wurde für die Untersuchung der statistischen Signifikanz der Unterschiede der jeweiligen Gruppe zu ihrer Kontrollgruppe bei normalverteilten abhängigen Daten der gepaarte T-Test bzw. bei unabhängigen Daten der ungepaarte T-Test gewählt. War eine Normalverteilung der Daten nicht gegeben, wurde stattdessen für abhängige Daten der Wilcoxon-Test herangezogen und entsprechend für unabhängige Daten der Mann-Whitney-U-Test. Bei einer Varianzheterogenität der Daten erfolgte die Korrektur nach Welch. Die Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm diente dem Vergleich mehrerer Gruppen gegen eine Kontrollgruppe. Als statistisch signifikant gilt hierbei nicht mehr $p \leq 0,05$, sondern bei einer Gruppenanzahl von zwei gegen die zu vergleichende Kontrollgruppe das angegliche Signifikanzniveau mit einem kleineren P-Wert bei 0,025 und einem größeren P-Wert bei 0,05. Zuletzt wurde für die Analyse des festgestellten Unterschiedes zum Mittelwert der Kontrollgruppe die Berechnung der Effektgröße Cohen d angewendet. Dabei sind Werte von $\geq 0,2$ als schwach, $\geq 0,5$ als mittel-stark und $\geq 0,8$ als stark zu interpretieren.

4 Ergebnisse

Als *In-vivo*-Methode wurde das Hinterbeinischämie-Modell in der Maus gewählt, begleitet von Laser-Doppler-gestützten Messungen des Reperfuisionsverlaufes zur funktionellen Analyse sowie anschließenden histologischen Färbungen und RNA-Analysen mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR).

Die Messungen mittels Laser-Doppler wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Ligatur der *A. femoralis* durchgeführt. Die prä- und postoperativen Aufnahmen dienten hierbei als Startbedingungen bzw. als operative Erfolgskontrollen.

Die Analyse der Fläche der Media im operierten Bein nach Ligatur der *A. femoralis* erfolgte auf der Grundlage der durch die Lage und Flussveränderungen zu erwartenden Arteriogenese im *M. quadriceps femoris*. Ergänzend wurde im *M. gastrocnemius*, der sich distal der Ligatur befindet, die Angiogenese mittels Bestimmung der Kapillaranzahl untersucht.

Für die RNA-Analyse nach Ligatur der *A. femoralis* wurde die Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie (TGF- β = Transforming-Growth-Factor- β) und von repräsentativen Markern glatter Muskelzellen im *M. quadriceps femoris* und im *M. gastrocnemius* untersucht. Dabei wurde im Teilprojekt 1 (siehe 4.1) das operierte Bein mit dem nicht operierten Bein verglichen. Für die weiteren Versuche wurden jeweils für die RNA-Analysen und histologischen Färbungen die operierten Beine der zu vergleichenden Gruppen miteinander verglichen.

Um gleiche Startbedingungen für beide Gruppen sicherzustellen, wurden auch die RNA- und histologischen Analysen der jeweils nicht operierten Beine der zu vergleichenden Gruppen durchgeführt; aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit fehlenden Relevanz und des Umfangs werden sie aber nicht gezeigt.

Die Charakterisierung der *In-vitro*-Versuche in humanen aortalen glatten Muskelzellen (human aortic smooth muscle cells, HAOSMCs) erfolgte mittels

Analyse der RNA (qPCR und TaqMan™-PCR) und der Proteinexpression (Western Blot, Proteome-Array).

Für eine bessere Übersicht und Vergleichbarkeit wurden für umfangreiche Versuche (mehr als zwei zu vergleichende Proben oder mehrere Graphen) die berechneten Werte und erhobenen Daten (Mittelwert \pm SEM, relativer Unterschied zur Kontrolle, Effektgröße Cohen d und P-Wert) jeweils nach den entsprechenden Graphen zusammenfassend in einer Tabelle dargestellt.

Das Hinterbeinischämie-Modell wurde bei den in Tabelle 32–Tabelle 38 für die verschiedenen Teilprojekte aufgeführten Versuchsgruppen in 10 Wochen alten männlichen Mäusen durchgeführt. Die bei den Laser-Doppler-Messungen angegebenen Tierzahlen entsprechen jeweils der Gesamtzahl operierter Tiere je Gruppe (abzüglich bei der Operation verendeter Tiere und Tiere, die auf Grund zu hoher Belastung aus dem Versuch genommen wurden). Diese Gesamtzahl kann von der Anzahl der mit den unterschiedlichen Analysen untersuchten Proben abweichen. Dies beruht darauf, dass nicht von jeder Probe ausreichend Material gewonnen werden konnte, um alle Analysen zuverlässig durchzuführen und alle Marker zu untersuchen. Bei den in Tabelle 39 aufgeführten Versuchsgruppen handelt es sich um 5 Wochen alte männliche Mäuse, bei denen eine Aortenisolation durchgeführt wurde. Bei allen Mäusen handelte es sich um Mäuse mit einem C57BL/6-genetischen Hintergrund.

Tabelle 32: Versuchsgruppe für Teilprojekt 1 (Zeitraum: 14 Tage)

Stamm		Mittleres KG (g)
WT	C57BL/6N	24,8

Tabelle 33: Versuchsgruppe für Teilprojekt 1 (Zeitraum: 7 Tage)

Stamm		Mittleres KG (g)
WT	C57BL/6N	26,7

Tabelle 34: Versuchsgruppen für Teilprojekt 2 (Zeitraum: 14 Tage)

Stamm		Mittleres KG (g)
WT	C57BL/6N	24,8
KO	C57BL/6N_BMPER ^{+/-} (BMPER ^{+/-})	24,2

Tabelle 35: Versuchsgruppen für Teilprojekt 2 (Zeitraum: 7 Tage)

Stamm		Mittleres KG (g)
WT	C57BL/6N	26,7
KO	C57BL/6N_BMPER ^{+/-} (BMPER ^{+/-})	24,3

Tabelle 36: Versuchsgruppen für Teilprojekt 3

Stamm	Behandlung	Mittleres KG (g)	
WT	C57BL/6N	NaCl-Lösung	24,7
WT	C57BL/6N	rek. BMPER-Protein	25,5

Tabelle 37: Versuchsgruppen für Teilprojekt 4

Stamm	Behandlung	Mittleres KG (g)	
WT	MYH11-CreBMP4flox	-	25,0
KO	MYH11-CreBMP4flox (BMP4 ^{iASMC})	Tamoxifen	25,7

Tabelle 38: Versuchsgruppen für Teilprojekt 4 (begleitender Kontrollversuch)

Stamm	Behandlung	Mittleres KG (g)	
WT	MYH11-Cre	-	24,5
WT	MYH11-Cre (Ctr ^{iASMC})	Tamoxifen	25,0

Tabelle 39: Versuchsgruppen für Teilprojekt 4 (Nachweis der BMP4-Defizienz)

Stamm	Behandlung	
WT	MYH11-CreBMP4flox	-
KO	MYH11-CreBMP4flox (BMP4 ^{iASMC})	Tamoxifen

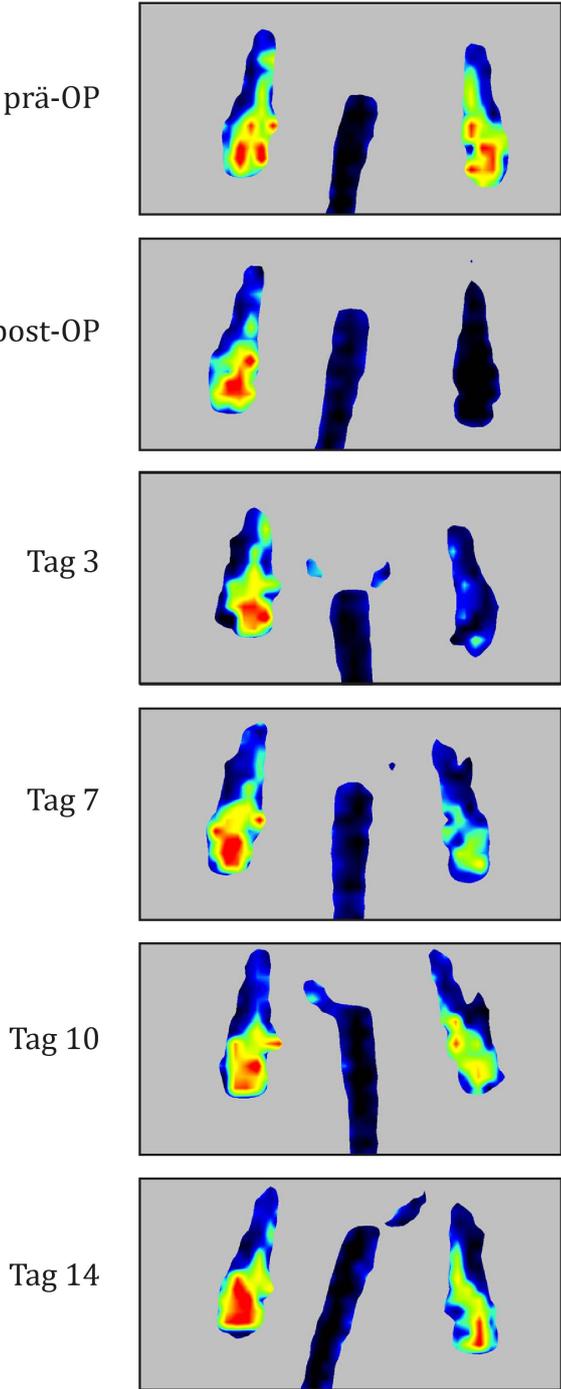
4.1 Teilprojekt 1: Analyse der Expression von BMPER und BMP4 im Hinterbeinischämie-Modell der Maus

Im ersten Teilprojekt sollte festgestellt werden, ob „Bone morphogenetic protein 4“ (BMP4) und „Bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator“ (BMPER) 14 bzw. 7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* in C57BL/6N-Mäusen (Tabelle 32 und Tabelle 33) reguliert werden. Begleitend dazu wurden zur funktionellen Analyse der Reperfusion Laser-Doppler-Messungen durchgeführt. Die Wahl der Zeiträume beruht auf bisherigen Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen^{27,125}.

4.1.1 Laser-Doppler-Messungen über 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von C57BL/6N-Mäusen

Ab Tag 3 nach der Ligatur konnte mittels Laser-Doppler eine stetig zunehmende Reperfusion im Fuß von C57BL/6N-Mäusen beobachtet werden (Abbildung 10; Tabelle 40). Die Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC) betrug 3,276.

A



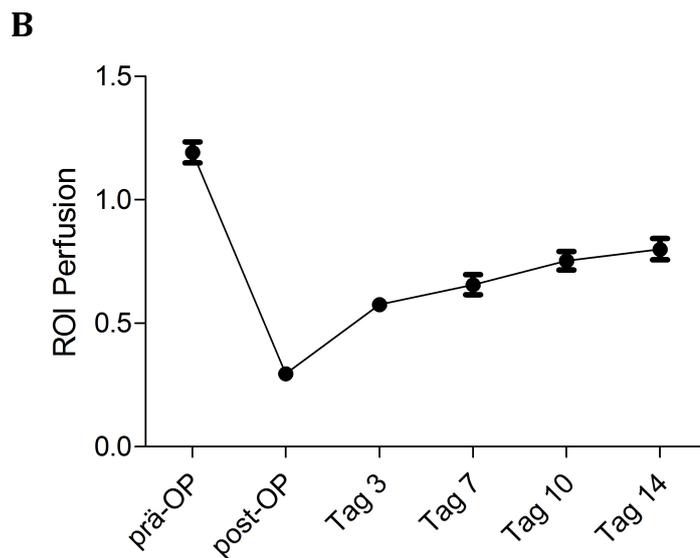


Abbildung 10: Verlauf der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* von C57BL/6N-Wildtypmäusen

- A) Repräsentative Bilder der LDPI-Messungen einer Maus; links: nicht operiertes Bein; rechts: operiertes Bein
- B) Darstellung der Mittelwerte der Reperfusion von C57BL/6N-Wildtypmäusen (n = 31) im Zeitverlauf (prä-OP–Tag 14); ROI (Region of interest) = Quotient aus operiertem und nicht operiertem Bein; Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung

Tabelle 40: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion von C57BL/6N-Wildtypmäusen

Mittelwerte (Quotient aus ligiertem und nicht ligiertem Bein) und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Fuß-Perfusion von C57BL/6N-Wildtypmäusen (n = 31) im Zeitverlauf (prä-OP–Tag 14)

	Mittelwert	SEM
prä-OP	1,192	0,043
post-OP	0,296	0,010
Tag 3	0,575	0,026
Tag 7	0,656	0,040
Tag 10	0,753	0,038
Tag 14	0,800	0,043

4.1.2 RNA-Expression 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von C57BL/6N-Mäusen

14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* von C57BL/6N-Mäusen war die Expression der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, BMPER, BMP4 und Twisted gastrulation (Tsg), im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines mit starken Effekten (BMPER: 0,992; BMP4: 0,936; Tsg: 0,814) signifikant (BMPER: p = 0,0005; BMP4: p = 0,0008; Tsg: p = 0,0071) erhöht im Vergleich

mit der Expression in dem nicht operierten Kontrollbein (Abbildung 11; Tabelle 41). Ebenso war eine vermehrte Expression der Marker glatter Muskelzellen „alpha smooth muscle actin“ (SMA), „smooth muscle Myosin heavy chain“ (MYH11) und Calponin (CNN) im selben Muskel zu erkennen, mit einem signifikanten Unterschied (SMA: $p = 0007$; CNN: $p = 0,0028$) und starken Effekt (SMA: 1,071; CNN: 1,132) für SMA und CNN (Abbildung 12; Tabelle 42). Ein ähnliches Bild konnte auch im *M. gastrocnemius* des operierten Beines beobachtet werden (Abbildung 13; Tabelle 43), allerdings mit signifikanten Unterschieden nur bei den Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie (BMPER: $p = 0,0065$; BMP4: $p = 0,0153$; Tsg: $p = 0,0021$) und mit mittleren bis vereinzelt starken Effekten (Tsg: 0,949). Bei den Markern glatter Muskelzellen (Abbildung 14; Tabelle 44) zeigte dabei die Expression von CNN als einzige Ausnahme mit einem vernachlässigbaren schwachen Effekt (0,189) keinen Unterschied zwischen den zu vergleichenden Beinen. Diese Ergebnisse zeigen nach Hinterbeinischämie sowohl die vermehrte Expression der BMP-Mitglieder als auch der Marker glatter Muskelzellen.

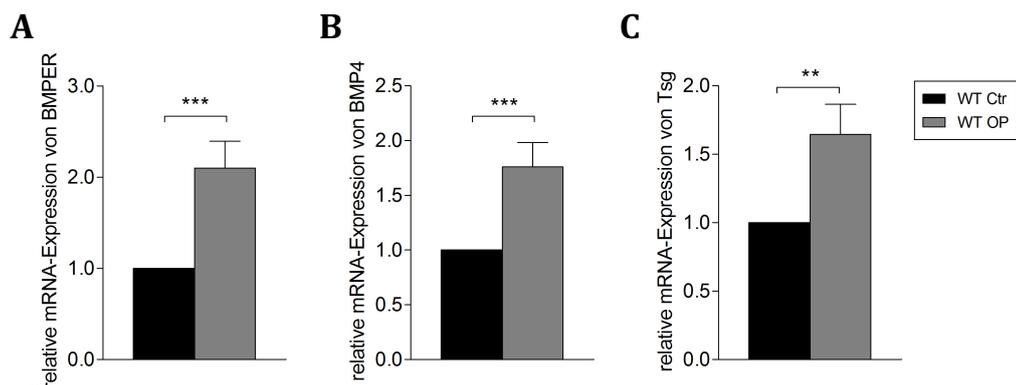


Abbildung 11: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

A) Expression von BMPER (n = 28)

B) Expression von BMP4 (n = 26)

C) Expression von Tsg (n = 26)

statistisch signifikante Ergebnisse: *** = $p \leq 0,001$; ** = $p \leq 0,01$;

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 41: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker	Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum Kontrollbein	Effektgröße	Signifikanz
BMPER	2,099 \pm 0,2959	52,36 %	0,992	p = 0,0005
BMP4	1,759 \pm 0,2249	43,15 %	0,936	p = 0,0008
Tsg	1,646 \pm 0,2201	39,25 %	0,814	p = 0,0071

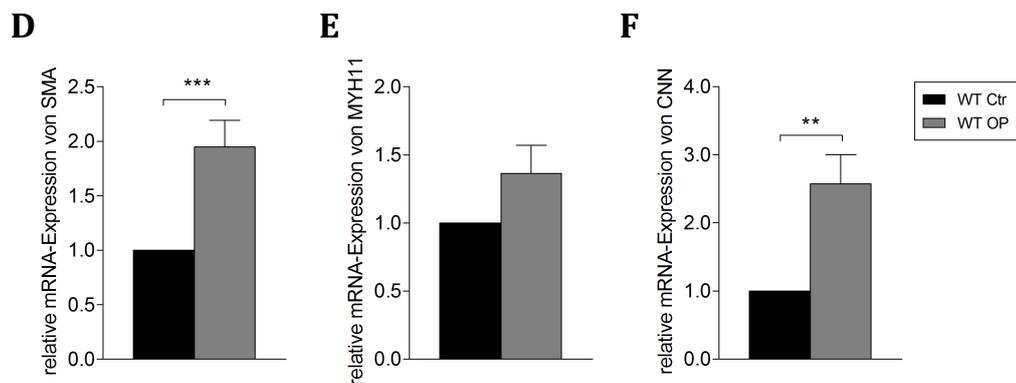


Abbildung 12: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

D) Expression von SMA (n = 26)

E) Expression von MYH11 (n = 19)

F) Expression von CNN (n = 21)

statistisch signifikante Ergebnisse: *** = p \leq 0,001; ** = p \leq 0,01;

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 42: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker	Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum Kontrollbein	Effektgröße	Signifikanz
SMA	1,949 \pm 0,2457	48,69 %	1,071	p = 0,0007
MYH11	1,365 \pm 0,2054	26,74 %	0,577	p = 0,0733
CNN	2,574 \pm 0,4291	61,15 %	1,132	p = 0,0028

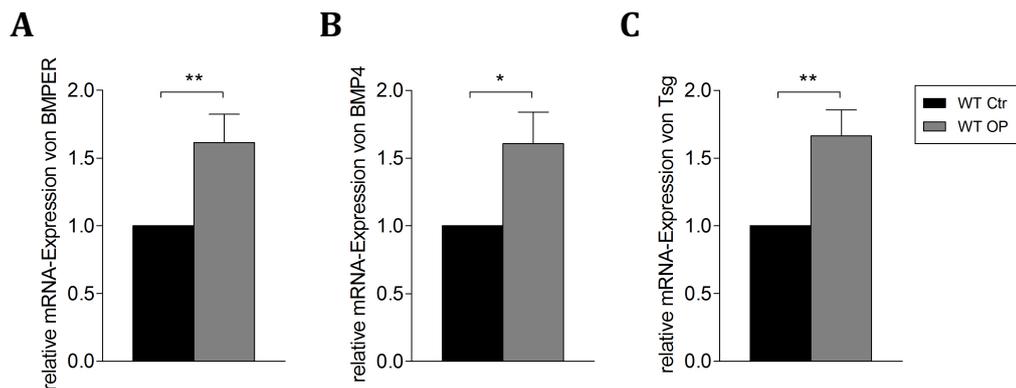


Abbildung 13: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- A) Expression von BMPER (n = 28)
 B) Expression von BMP4 (n = 26)
 C) Expression von Tsg (n = 26)

statistisch signifikante Ergebnisse: ** = $p \leq 0,01$; * = $p \leq 0,05$;
 Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 43: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker	Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum Kontrollbein	Effektgröße	Signifikanz
BMPER	1,616 \pm 0,2088	38,12 %	0,788	p = 0,0065
BMP4	1,607 \pm 0,2333	37,77 %	0,721	p = 0,0153
Tsg	1,663 \pm 0,1938	39,87 %	0,949	p = 0,0021

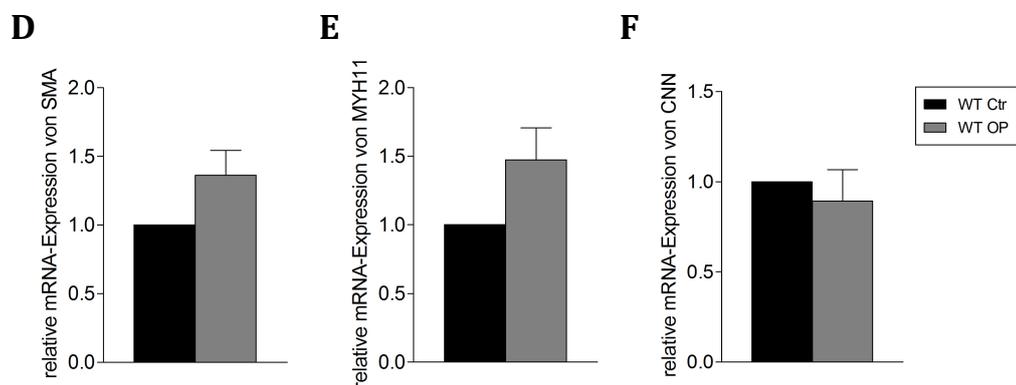


Abbildung 14: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- D) Expression von SMA (n = 26)
 E) Expression von MYH11 (n = 19)
 F) Expression von CNN (n = 21)

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 44: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker	Mittelwert±SEM	relativer Unterschied zum Kontrollbein	Effektgröße	Signifikanz
SMA	1,362±0,1819	26,58 %	0,552	p = 0,0575
MYH11	1,475±0,2333	32,20 %	0,661	p = 0,1119
CNN	0,893±0,1755	-10,73 %	0,189	p = 0,5478

4.1.3 RNA-Expression 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von C57BL/6N-Mäusen

Wie bei den RNA-Analysen 14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* (siehe 4.1.2) zeigte sich nach 7 Tagen, dass eine einheitliche vermehrte Expression mit größtenteils starken Effekten der zu untersuchenden Marker in den Muskeln des operierten Beines verglichen mit dem Kontrollbein gegeben war (Abbildung 15–Abbildung 18; Tabelle 45–Tabelle 48). Die fehlende Signifikanz der Daten nach 7 Tagen, wie sie nach 14 Tagen gegeben war, könnte hierbei auf die vergleichsweise geringe Anzahl der untersuchten Tiere zurückzuführen sein (n = 19–28 für 14 Tage und n = 5 für 7 Tage).

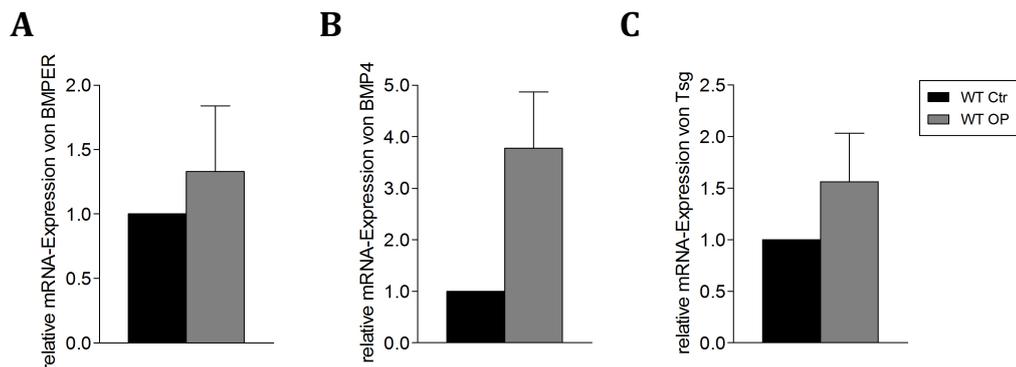


Abbildung 15: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF-β-Superfamilie im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- A) Expression von BMPER
- B) Expression von BMP4
- C) Expression von Tsg

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 5

Tabelle 45: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker	Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum Kontrollbein	Effektgröße	Signifikanz
BMPER	1,329 \pm 0,5114	24,76 %	0,407	p = 0,5550
BMP4	3,775 \pm 1,0910	73,51 %	1,61	p = 0,0637
Tsg	1,562 \pm 0,4691	35,98 %	0,758	p = 0,2973

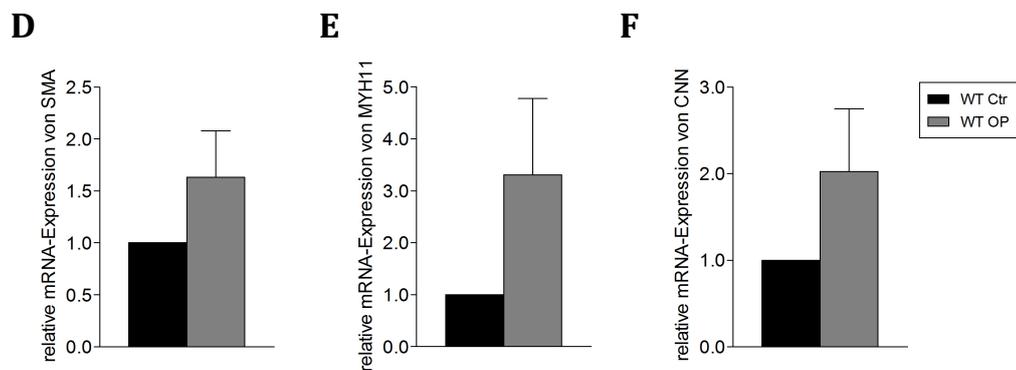


Abbildung 16: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- D) Expression von SMA
- E) Expression von MYH11
- F) Expression von CNN

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 5

Tabelle 46: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker	Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum Kontrollbein	Effektgröße	Signifikanz
SMA	1,633 \pm 0,4468	38,76 %	0,896	p = 0,2297
MYH11	3,310 \pm 1,4650	69,79 %	0,997	p = 0,1900
CNN	2,026 \pm 0,7233	50,64 %	0,897	p = 0,2288

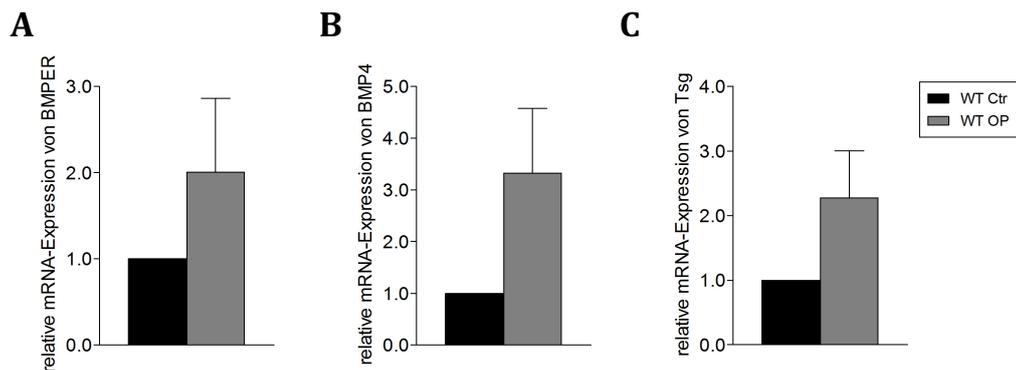


Abbildung 17: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- A) Expression von BMPER
- B) Expression von BMP4
- C) Expression von Tsg

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 5

Tabelle 47: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker	Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum Kontrollbein	Effektgröße	Signifikanz
BMPER	2,004 \pm 0,8603	50,10 %	0,738	p = 0,3080
BMP4	3,320 \pm 1,2550	69,88 %	1,17	p = 0,1381
Tsg	2,276 \pm 0,7284	56,06 %	1,108	p = 0,1546

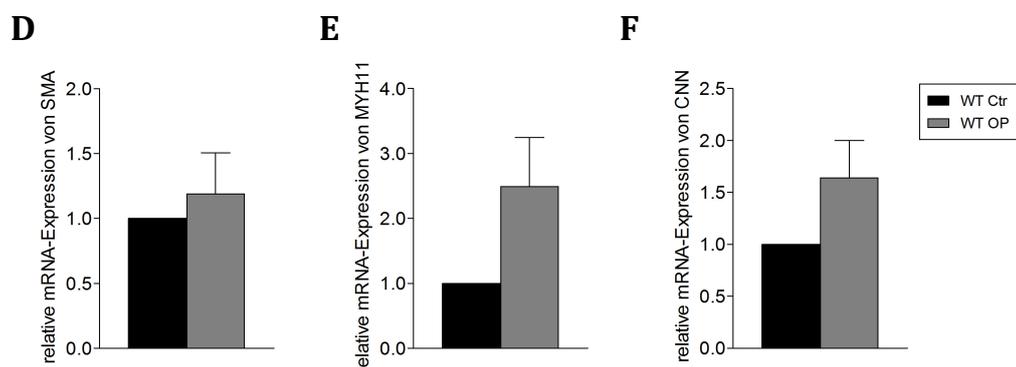


Abbildung 18: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- D) Expression von SMA
- E) Expression von MYH11
- F) Expression von CNN

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 5

Tabelle 48: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von C57BL/6N-Wildtypmäusen, verglichen mit dem nicht operierten Kontrollbein (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

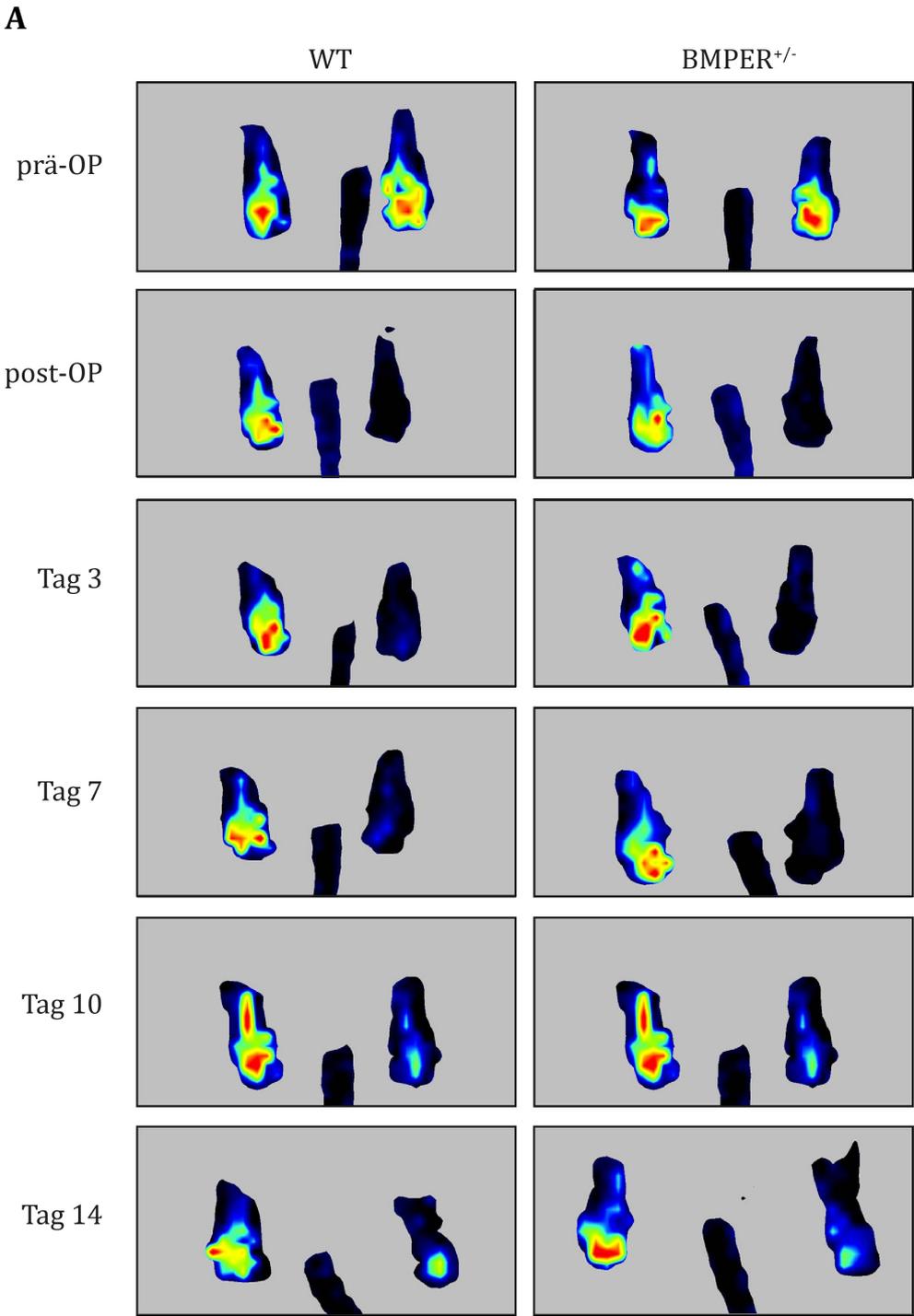
Marker	Mittelwert±SEM	relativer Unterschied zum Kontrollbein	Effektgröße	Signifikanz
SMA	1,189±0,3165	15,90 %	0,378	p = 0,5820
MYH11	2,489±0,7600	59,82 %	1,239	p = 0,1217
CNN	1,640±0,3587	39,02 %	1,128	p = 0,1491

4.2 Teilprojekt 2: Auswirkung einer BMPER-Defizienz auf die Gefäßregeneration und den Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen

Ausgehend von den Beobachtungen in Teilprojekt 1 (siehe 4.1) und dem Wissen, dass BMPER eine wichtige Rolle in der Gefäßentwicklung spielt und Einfluss auf den Phänotyp von vaskulären glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMCs) hat, ergab sich die Frage, welche Auswirkung die BMPER-Defizienz *in vivo* auf die Gefäßregeneration und *in vitro* auf den Phänotyp von HAOSMCs hat. Dieses wurde wie bereits in Teilprojekt 1 (siehe 4.1) mittels Laser-Doppler-Messungen und RNA-Analysen in C57BL/6-Mäusen sowie in BMPER-(teil-)defizienten Mäusen (BMPER^{+/-}) (da homozygote BMPER-defiziente Mäuse nicht lebensfähig sind) (siehe 1.4.2) über einen Zeitraum von 14 bzw. 7 Tagen untersucht (Tabelle 34 und Tabelle 35). Dabei wurde ebenfalls untersucht, welche Bedeutung die BMPER-Defizienz auf die Expression weiterer BMP-Mitglieder hat. Ergänzend wurden zur Analyse des Gefäßumbaus histologische Färbungen mittels SMA und CD31 angefertigt. Der Einfluss der BMPER-Defizienz auf den Phänotyp von HAOSMCs wurde mittels Messung der RNA-Expression von Markern kontraktiler vSMCs sowie von mikroRNAs (miRNAs) und der Proteinexpression untersucht. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die unterschiedlichen Zeitpunkte der RNA-Expression nach si(BMPER)-RNA-Transfektion in einem gemeinsamen Graphen dargestellt (siehe 4.2.5).

4.2.1 Laser-Doppler-Messungen über 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMPER-(teil-)defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Bei der Analyse der Laser-Doppler-Messungen der beiden Gruppen konnten über einen Zeitraum von 14 Tagen keine signifikanten Unterschiede in der Reperfusion festgestellt werden (Abbildung 19; Tabelle 49). Dabei betrug die AUC der Wildtyp-Kontrollmäuse 2,614 und die der BMPER^{+/-}-Mäuse lag mit einem relativen Unterschied von 6,24 % bei 2,788. Auffällig ist hierbei, dass die Reperfusion der Wildtyp-Kontrollmäuse im Vergleich mit den Wildtypmäusen aus den vorherigen Versuchen in Teilprojekt 1 (siehe 4.1.1) deutlich verlangsamt ist. Dabei ist zu beachten, dass es sich in dieser Versuchsgruppe bei den Wildtyp-Kontrollmäusen um Wurfgeschwister der BMPER^{+/-}-Mäuse handelt und nicht wie in den vorherigen Versuchen um reine C57BL/6N-Mäuse.



B

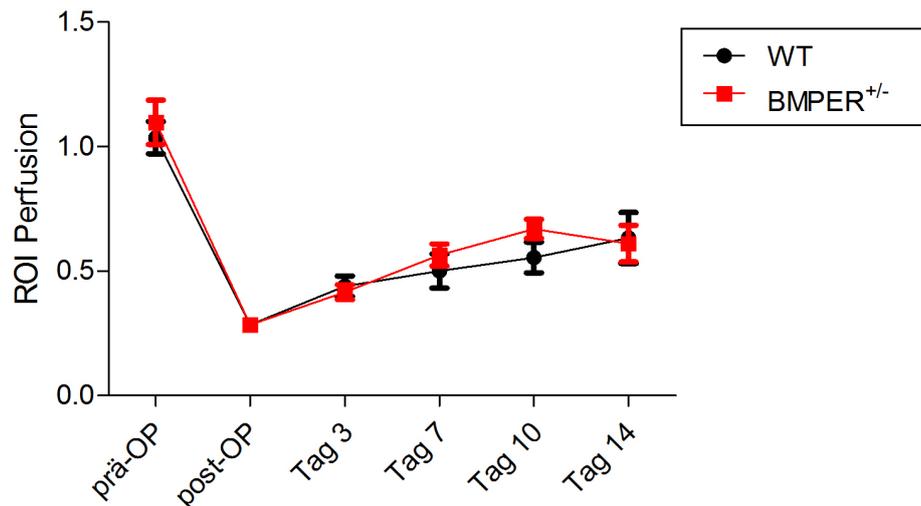


Abbildung 19: Vergleich des Verlaufs der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrollmäusen

- A) Repräsentative Bilder der LDPI-Messungen von zwei Mäusen; links: nicht operiertes Bein; rechts: operiertes Bein
- B) Darstellung der Mittelwerte der Reperfusion von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen (BMPER^{+/-}; n = 8) und Wildtyp-Kontrollmäusen (WT; n = 7) im Zeitverlauf (prä-OP–Tag 14); ROI (Region of interest) = Quotient aus operiertem und nicht operiertem Bein; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 49: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion des BMPER^{+/-}-Knockout-Mausstammes im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrollgruppe

Mittelwerte (Quotient aus ligiertem und nicht ligiertem Bein) und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Fuß-Perfusion des Knockout-Mausstammes (BMPER^{+/-}; n = 8) im Vergleich mit der Wildtyp-Kontrollgruppe (WT; n = 7) im Zeitverlauf (prä-OP–Tag 14)

	WT Mittelwert	SEM	BMPER ^{+/-} Mittelwert	SEM
prä-OP	1,036	0,064	1,098	0,089
post-OP	0,285	0,014	0,284	0,009
Tag 3	0,439	0,041	0,415	0,030
Tag 7	0,501	0,069	0,565	0,044
Tag 10	0,555	0,062	0,669	0,038
Tag 14	0,633	0,102	0,611	0,074

4.2.2 RNA-Expression 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMPER-(teil-)defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Im Vergleich mit den Wildtyp-Kontrollmäusen zeigte sich 14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* im operierten Bein der BMPER^{+/-}-Mäuse eine verminderte Expression von BMP4 im *M. quadriceps femoris* mit einem Mittelwert von $0,371 \pm 0,1128$ und einem relativen Unterschied von 62,95 %

und im *M. gastrocnemius* mit einem Mittelwert von $0,801 \pm 0,3720$ und einem relativen Unterschied von 19,88 % (Abbildung 20A und Abbildung 22A; Tabelle 50 und Tabelle 52). Im *M. quadriceps femoris* war außerdem eine verminderte Expression von Tsg ($0,783 \pm 0,1872$) mit einem relativen Unterschied zu den Wildtyp-Kontrollmäusen von 21,67 % zu beobachten (Abbildung 20B; Tabelle 50). Dabei handelte es sich nur um sehr schwache bis mittlere Effekte ohne signifikanten Unterschied. Im Gegensatz dazu war die Expression der Marker glatter Muskelzellen (SMA und CNN) im operierten Bein der BMPER^{+/-}-Mäuse im Vergleich mit dem der Wildtyp-Kontrollmäuse stärker (Abbildung 21 und Abbildung 23; Tabelle 51 und Tabelle 53) und für SMA im *M. gastrocnemius* sogar mit einem starken Effekt (1,207) signifikant ($p = 0,0418$) unterschiedlich.

Diese Ergebnisse zeigen bei BMPER^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen im operierten Bein eine verminderte Expression der weiteren BMP-Mitglieder (insbesondere von BMP4), jedoch keine Veränderungen oder vermehrte Expression der Marker kontraktiler glatter Muskelzellen. Wie bereits bei den Laser-Doppler-Messungen (siehe 4.2.1) ist hierbei ebenfalls zu beachten, dass es sich bei den Wildtyp-Kontrollmäusen um Wurfgeschwister der BMPER^{+/-}-Mäuse handelt.

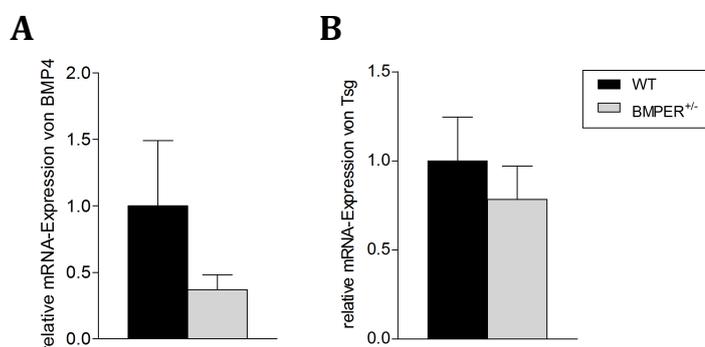


Abbildung 20: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- A) Expression von BMP4
- B) Expression von Tsg

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; $n = 7$ (WT); $n = 8$ (BMPER^{+/-})

Tabelle 50: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von BMPER $^{+/-}$ -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
BMP4	WT	1,000 \pm 0,4927			
	BMPER $^{+/-}$	0,371 \pm 0,1128	- 62,95 %	0,687	p = 0,2595
Tsg	WT	1,000 \pm 0,2440			
	BMPER $^{+/-}$	0,783 \pm 0,1872	- 21,67 %	0,37	p = 0,4875

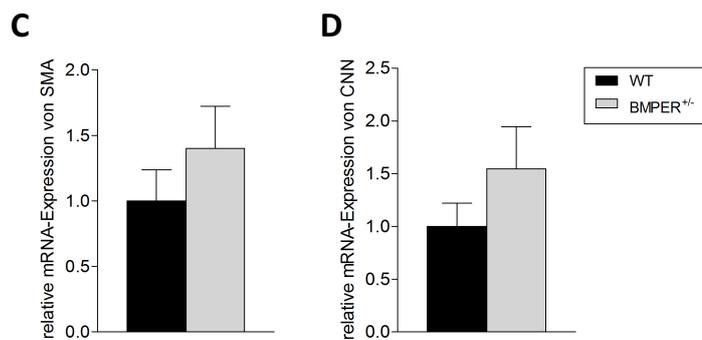


Abbildung 21: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von BMPER $^{+/-}$ -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

C) Expression von SMA

D) Expression von CNN

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 7 (WT); n = 8 (BMPER $^{+/-}$)

Tabelle 51: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von BMPER $^{+/-}$ -Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
SMA	WT	1,000 \pm 0,2388			
	BMPER $^{+/-}$	1,399 \pm 0,3246	28,52 %	0,499	p = 0,3525
CNN	WT	1,000 \pm 0,2183			
	BMPER $^{+/-}$	1,546 \pm 0,3998	35,32 %	0,595	p = 0,2713

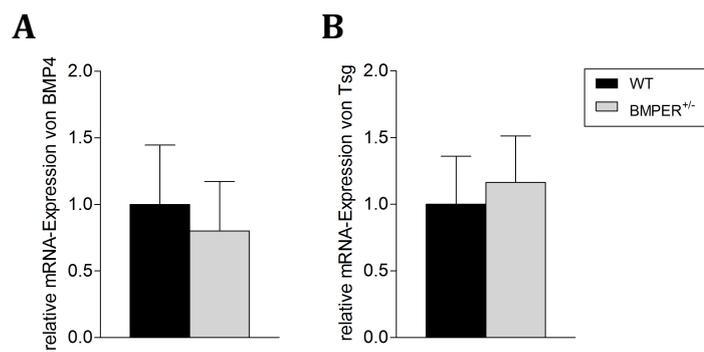


Abbildung 22: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- A) Expression von BMP4
B) Expression von Tsg

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 7 (WT); n = 8 (BMPER^{+/-})

Tabelle 52: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
BMP4	WT	1,000 \pm 0,4441		0,179	p = 0,6943
	BMPER ^{+/-}	0,801 \pm 0,3720	- 19,88 %		
Tsg	WT	1,000 \pm 0,3602		0,168	p = 0,8168
	BMPER ^{+/-}	1,163 \pm 0,3498	14,02 %		

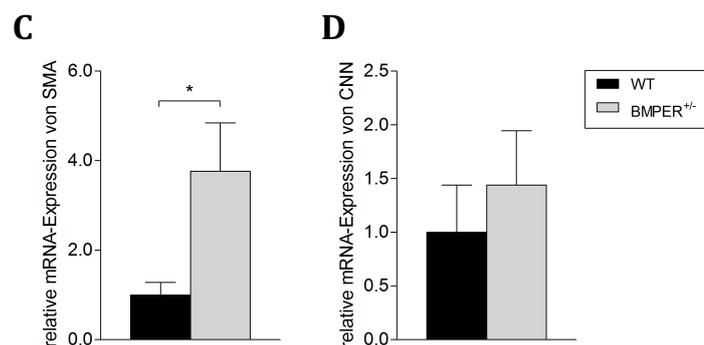


Abbildung 23: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- C) Expression von SMA
D) Expression von CNN

statistisch signifikante Ergebnisse: * = p \leq 0,05; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 7 (WT); n = 8 (BMPER^{+/-})

Tabelle 53: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert±SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
SMA	WT	1,000±0,2760			
	BMPER ^{+/-}	3,766±1,0780	73,45 %	1,207	p = 0,0418
CNN	WT	1,000±0,4388			
	BMPER ^{+/-}	1,438±0,5068	30,46 %	0,333	p = 0,5307

4.2.3 RNA-Expression 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMPER-(teil-)defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Die RNA-Analysen 7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* zeigten gegenüber den RNA-Analysen nach 14 Tagen (siehe 4.2.2) Tendenzen einer deutlich verminderten Expression sowohl der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie (BMP4 und Tsg) als auch der Marker glatter Muskelzellen (SMA, MYH11 und CNN) im *M. quadriceps femoris* (Abbildung 24 und Abbildung 25; Tabelle 54 und Tabelle 55) und *M. gastrocnemius* (Abbildung 26 und Abbildung 27; Tabelle 56 und Tabelle 57) des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp-Kontrollmäusen. Besonders starke Effekte waren in der Regulation der Expression von BMP4 zu beobachten, mit einem Mittelwert bei den BMPER^{+/-}-Mäusen von $0,144 \pm 0,0627$ und einem relativen Unterschied zu den Wildtyp-Kontrollmäusen von 85,6 % im *M. quadriceps femoris* bzw. einem Mittelwert von $0,079 \pm 0,0128$ und einem relativen Unterschied von 92,07 % im *M. gastrocnemius* (Abbildung 24A und Abbildung 26A; Tabelle 54 und Tabelle 56).

Die Beobachtungen 7 Tage nach Hinterbeinischämie entsprechen den in 4.2.2 aufgeführten Tendenzen einer verminderten Expression der BMP-Mitglieder bei der BMPER-(Teil-)Defizienz nach 14 Tagen und zeigen zusätzlich eine verminderte Expression der Marker glatter Muskelzellen, wie sie nach 14 Tagen nicht gegeben war. Die teilweise schwachen Effekte und fehlenden Signifikanzen könnten auf die geringen Tieranzahlen (WT: n = 5 und BMPER^{+/-}: n = 6) und hohen Standardabweichungen zurückzuführen sein.

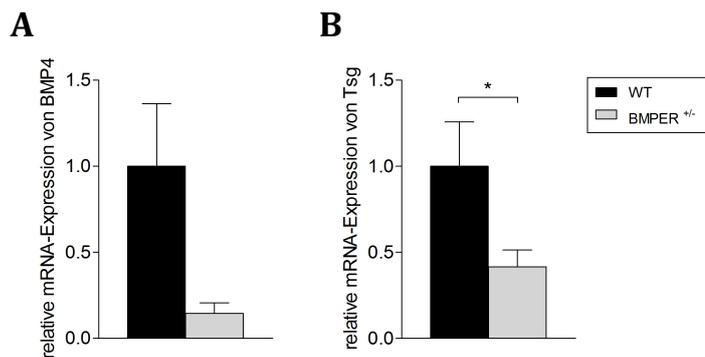


Abbildung 24: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- A) Expression von BMP4
- B) Expression von Tsg

statistisch signifikante Ergebnisse: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 5 (WT); n = 6 (BMPER^{+/-})

Tabelle 54: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
BMP4	WT	1,000 \pm 0,3637			
	BMPER ^{+/-}	0,144 \pm 0,0627	- 85,6 %	1,545	p = 0,0812
Tsg	WT	1,000 \pm 0,2575			
	BMPER ^{+/-}	0,415 \pm 0,0977	- 58,48 %	1,382	p = 0,0484

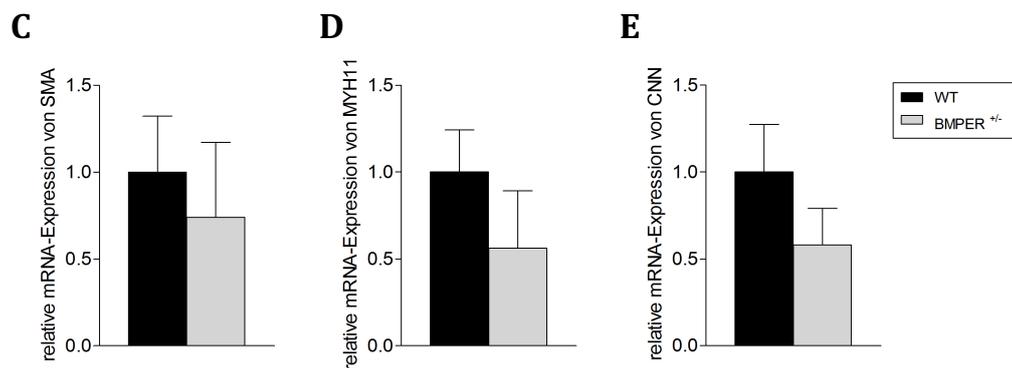


Abbildung 25: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- C) Expression von SMA
- D) Expression von MYH11
- E) Expression von CNN

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 5 (WT); n = 6 (BMPER^{+/-})

Tabelle 55: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert±SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
SMA	WT	1,000±0,3224			
	BMPER ^{+/-}	0,740±0,4311	- 25,99 %	0,282	p = 0,6527
MYH11	WT	1,000±0,2421			
	BMPER ^{+/-}	0,562±0,3303	- 43,83 %	0,624	p = 0,0823
CNN	WT	1,000±0,2737			
	BMPER ^{+/-}	0,580±0,2099	- 42,02 %	0,751	p = 0,2464

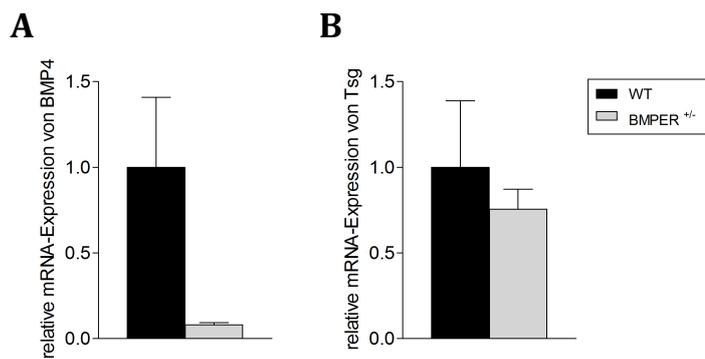


Abbildung 26: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- A) Expression von BMP4
B) Expression von Tsg

Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; n = 5 (WT); n = 6 (BMPER^{+/-})

Tabelle 56: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert±SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
BMP4	WT	1,000±0,4088			
	BMPER ^{+/-}	0,079±0,0128	- 92,07 %	1,51	p = 0,0876
Tsg	WT	1,000±0,3884			
	BMPER ^{+/-}	0,756±0,1160	- 24,36 %	0,395	p = 0,5802

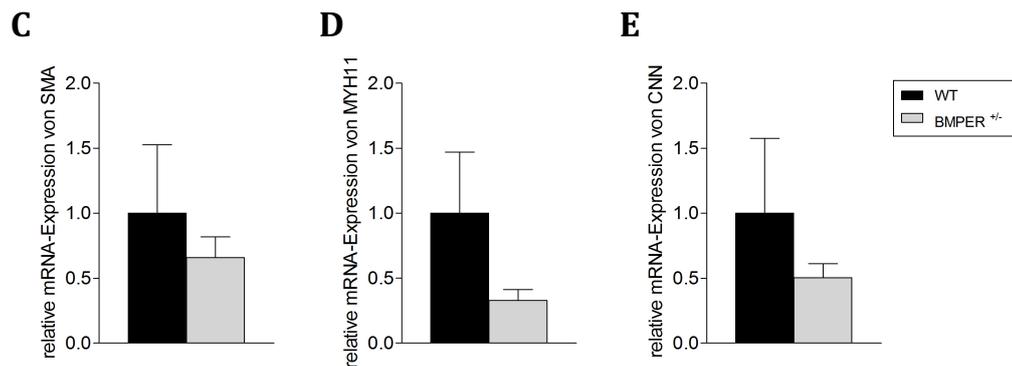


Abbildung 27: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- C) Expression von SMA
 D) Expression von MYH11
 E) Expression von CNN

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 5 (WT); n = 6 (BMPER^{+/-})

Tabelle 57: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
SMA	WT	1,000 \pm 0,5268		0,409	p = 0,5675
	BMPER ^{+/-}	0,658 \pm 0,1590	- 34,24 %		
MYH11	WT	1,000 \pm 0,4713		0,935	p = 0,1775
	BMPER ^{+/-}	0,327 \pm 0,0852	- 67,27 %		
CNN	WT	1,000 \pm 0,5759		0,563	p = 0,4451
	BMPER ^{+/-}	0,504 \pm 0,1086	49,59 %		

4.2.4 Histologische Analyse 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMPER-(teil-)defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Anhand der SMA-positiv gefärbten Zellen konnten die Fläche der Media im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines 7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* bestimmt werden (Abbildung 28A). Die durchschnittliche Fläche der Media von BMPER^{+/-}-Mäusen mit $130,6 \pm 5,602 \mu\text{m}^2$ war mit einem relativen Unterschied von 16,71 % und einem nur sehr schwachen Effekt von 0,322 signifikant kleiner (p = 0,0149) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen mit einer durchschnittlichen Fläche der Media von $156,8 \pm 9,108 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 28B).

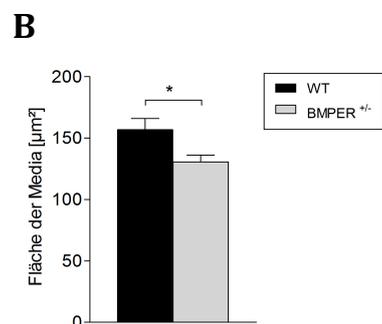
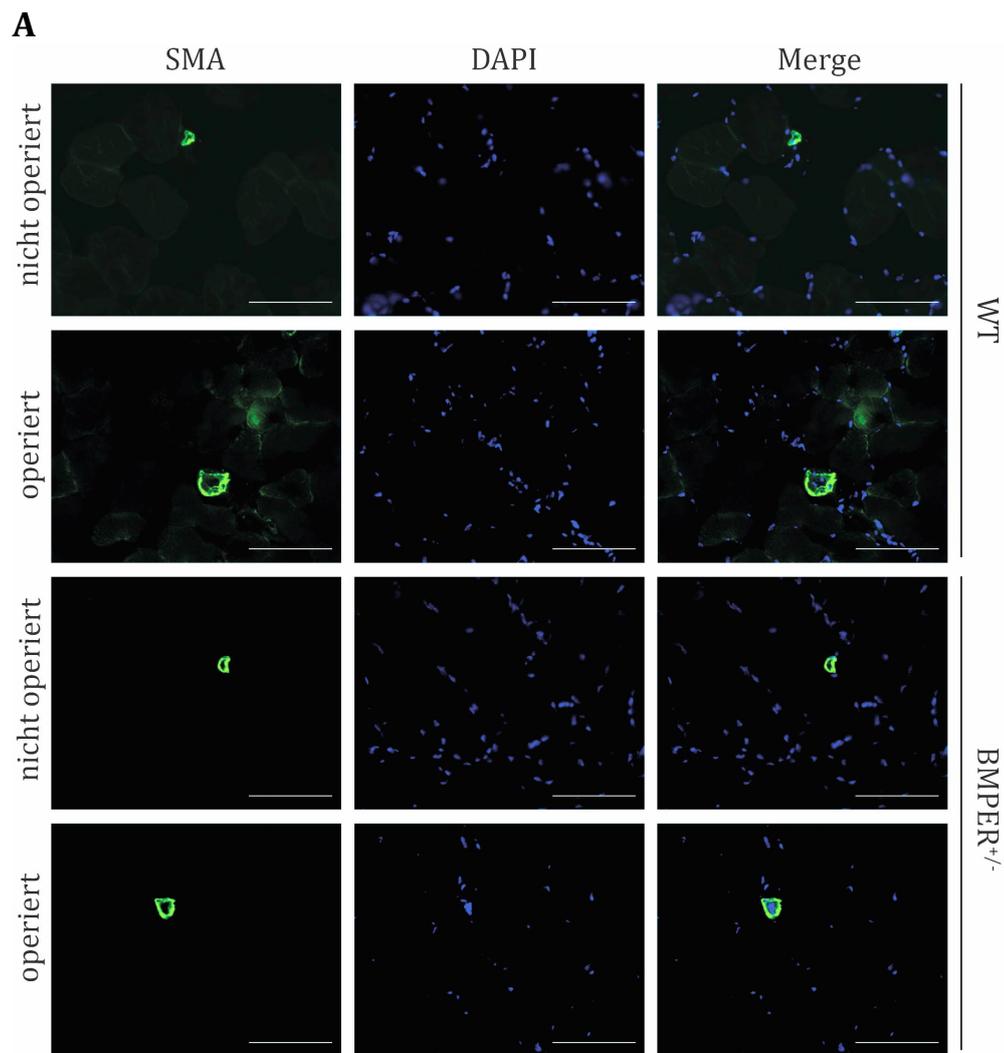
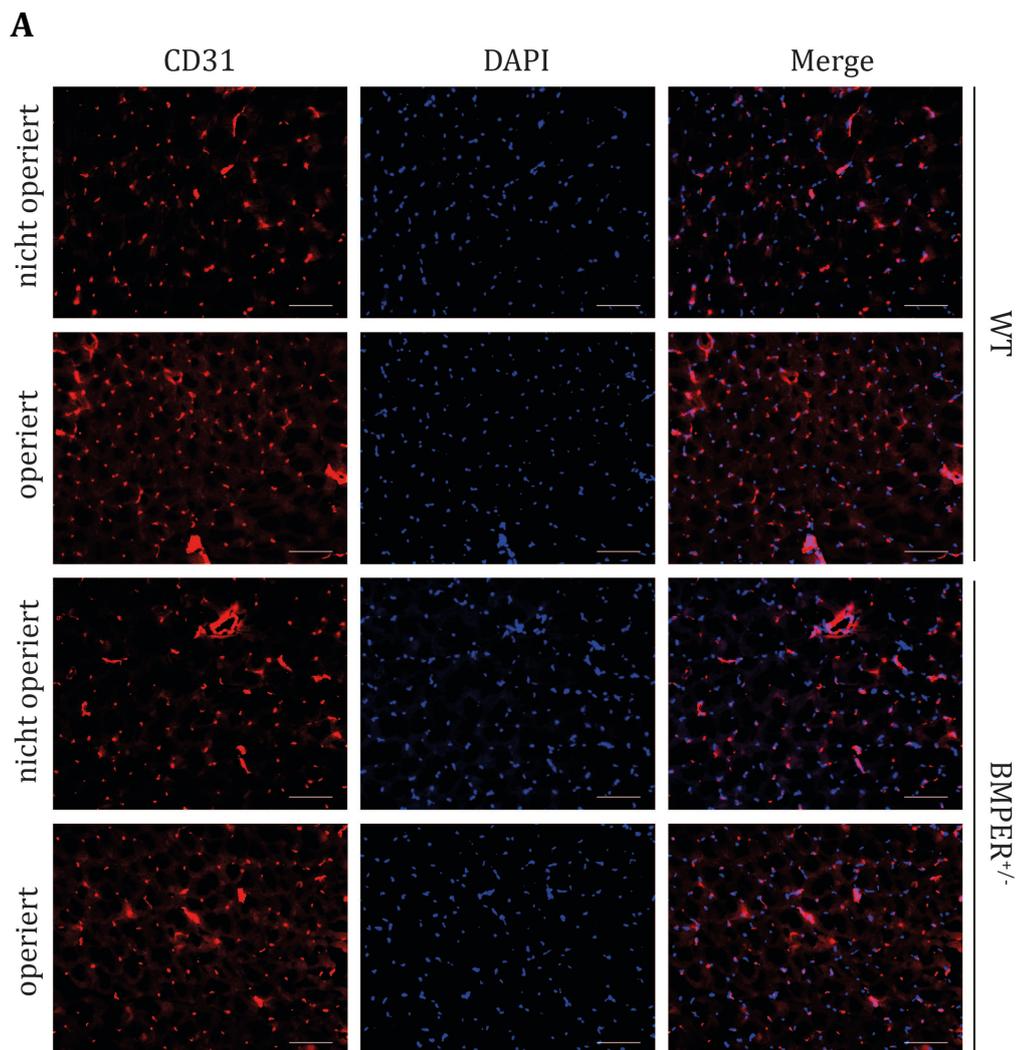


Abbildung 28: Fläche der Media im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- A) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung in 400-facher Vergrößerung; Färbung von glatten Muskelzellen mittels SMA (grün); Zellkernfärbung mittels DAPI (blau); Maßstab: 100 µm
- B) Vergleich der Mittelwerte der SMA-positiven Fläche der Media des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen mit Wildtyp-Kontrollmäusen
- statistisch signifikante Ergebnisse: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 4 (WT); n = 6 (BMPER^{+/-})

Die Quantifizierung der Kapillare im *M. gastrocnemius* erfolgte mittels der CD31-positiv gefärbten Zellen (Abbildung 29A). Die durchschnittliche Kapillaranzahl von BMPER^{+/-}-Mäusen ($25,27 \pm 1,334$) war mit einem relativen Unterschied von 19,45 % und einem mittleren Effekt von 0,775 signifikant niedriger ($p = 0,0104$) als die durchschnittliche Kapillaranzahl von $31,37 \pm 1,957$ der Wildtyp-Kontrollmäuse (Abbildung 29B).



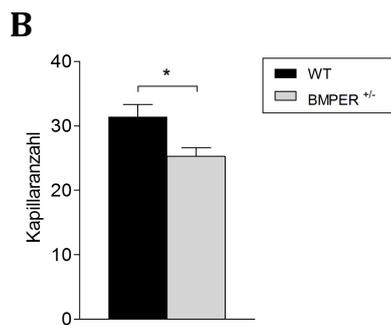


Abbildung 29: Kapillaranzahl im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen, verglichen mit Wildtyp-Kontrollmäusen (7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

- A) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung in 200-facher Vergrößerung; Endothelzellfärbung mittels CD31 (rot); Zellkernfärbung mittels DAPI (blau); Maßstab: 100 μ m
- B) Vergleich der Mittelwerte der Kapillaranzahl des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Knockout-Mäusen mit Wildtyp-Kontrollmäusen;

statistisch signifikante Ergebnisse: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 5 (WT); n = 6 (BMPER^{+/-})

4.2.5 RNA-Expression von Markern kontraktiver glatter Muskelzellen und von miRNAs in BMPER-defizienten vaskulären glatten Muskelzellen

Nach der erfolgreichen siRNA-vermittelten reduzierten BMPER-Expression in HAOSMCs (Abbildung 30A; Tabelle 58) konnte die Tendenz einer verminderten Expression der untersuchten Marker kontraktiver glatter Muskelzellen (SMA und TAGLN) nach 24 h, 48 h und 72 h gezeigt werden (Abbildung 30B und C; Tabelle 58). Die stärksten Effekte (sihB2: 0,987; sihB5: 1,097) zwischen beiden si(BMPER)-RNAs und der Kontrolle waren mit Mittelwerten von $0,439 \pm 0,1673$ (sihB2) und $0,424 \pm 0,1203$ (sihB5) und relativen Unterschieden von 56,1 % bzw. 57,62 % für SMA 72 h nach Transfektion zu beobachten (sihB2: $p = 0,0897$; sihB5: $p = 0,0627$). Interessanterweise war SMA nach Herunterregulierung von BMPER im Durchschnitt stärker reguliert als TAGLN.

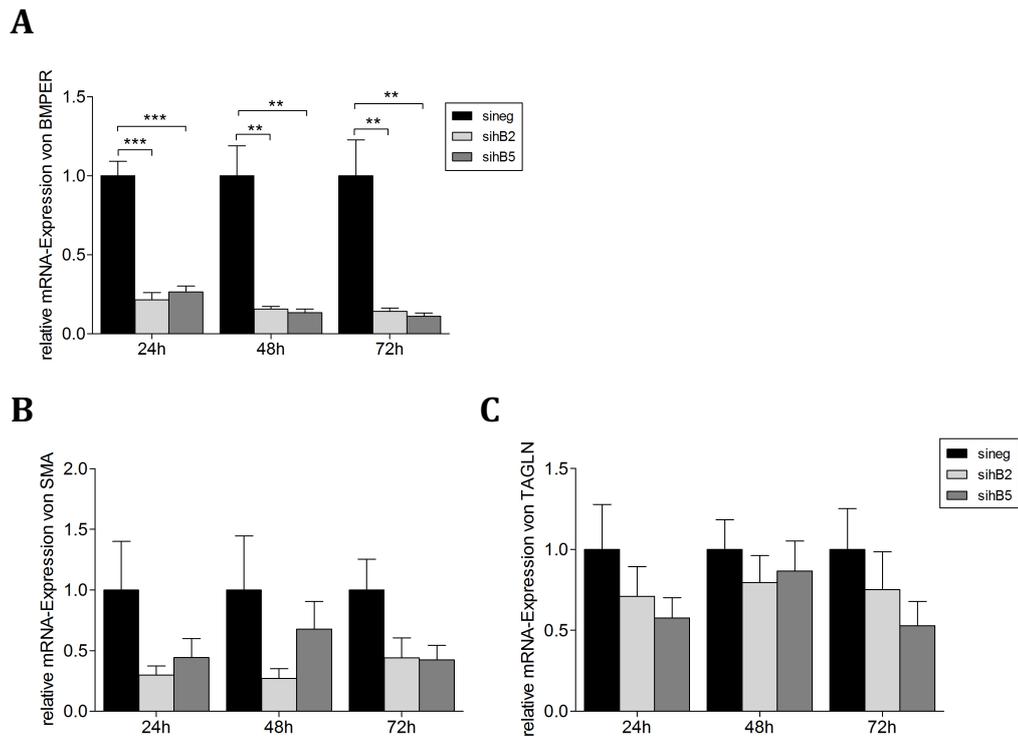


Abbildung 30: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von BMPER und Markern kontraktiver glatter Muskelzellen in HAOSMCs nach si(BMPER)-RNA Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5 (nach 24 h, 48 h und 72 h)

A) Expression von BMPER (n = 6 sineg; n = 9 sihB2; n = 9 sihB5)

B) Expression von SMA (n = 6 sineg; n = 7 sihB2; n = 7 sihB5)

C) Expression von TAGLN (n = 6 sineg; n = 7 sihB2; n = 7 sihB5)

statistisch signifikante Ergebnisse nach Bonferroni-Holm-Adjustierung: *** = $p \leq 0,001$;

** = $p \leq 0,01$; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 58: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für BMPER und Marker kontraktiler glatter Muskelzellen aus HAOSMCs nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5 (nach 24 h, 48 h und 72 h)

Marker	Zeit		Mittelwert ±SEM	relativer Unterschied zu sineg	Effekt- größe	Signifikanz
BMPER	24h	sineg	1,000±0,0918			
		sihB2	0,214±0,0467	- 78,6 %	4,407	p < 0,0001
		sihB5	0,262±0,0383	- 73,8 %	4,281	p < 0,0001
	48h	sineg	1,000±0,1904			
		sihB2	0,154±0,0177	- 84,57 %	2,085	p = 0,0022
		sihB5	0,132±0,0247	- 86,79 %	2,131	p = 0,0019
	72h	sineg	1,000±0,2270			
		sihB2	0,142±0,0205	- 85,82 %	1,775	p = 0,0055
		sihB5	0,109±0,0211	- 89,08 %	1,842	p = 0,0045
SMA	24h	sineg	1,000±0,4000			
		sihB2	0,299±0,0743	- 70,1 %	0,996	p = 0,1451
		sihB5	0,442±0,1580	- 55,8 %	0,750	p = 0,2231
	48h	sineg	1,000±0,4447			
		sihB2	0,270±0,0800	- 72,99 %	0,864	p = 0,1573
		sihB5	0,677±0,2272	- 32,27 %	0,346	p = 0,5303
	72h	sineg	1,000±0,2537			
		sihB2	0,439±0,1673	- 56,1 %	0,987	p = 0,0897
		sihB5	0,424±0,1203	- 57,62 %	1,097	p = 0,0627
TAGLN	24h	sineg	1,000±0,2786			
		sihB2	0,709±0,1843	- 29,07 %	0,502	p = 0,4046
		sihB5	0,577±0,1256	- 42,34 %	0,800	p = 0,1961
	48h	sineg	1,000±0,1838			
		sihB2	0,796±0,1657	- 20,36 %	0,440	p = 0,4267
		sihB5	0,866±0,1856	- 13,38 %	0,274	p = 0,6179
	72h	sineg	1,000±0,2520			
		sihB2	0,752±0,2339	- 24,82 %	0,386	p = 0,4841
		sihB5	0,529±0,1500	- 42,87 %	0,859	p = 0,1340

Für die Analyse der Expression von miRNAs in HAOSMCs nach si(BMPER)-RNA-Transfektion fungierten die miRNAs als Marker für den kontraktilen (mir143) bzw. den synthetisierenden (miR146a) Phänotyp.

Die verminderte Expression der miR143 48 h (sihB2: $0,616 \pm 0,0960$; sihB5: $0,650 \pm 0,0756$) und 72 h (sihB2: $0,654 \pm 0,1140$; sihB5: $0,590 \pm 0,1240$) nach si(Bmper)-RNA-Transfektion mit starken Effekten war sowohl für die Transfektion mittels sihB2 als auch mittels sihB5 zu beobachten (Abbildung 31A; Tabelle 59). Besonders starke Effekte waren nach 48 h zu beobachten (sihB2: 1,111; sihB5: 1,076), die jedoch nach Adjustierung des

Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm nicht mehr signifikant waren (sihB2: $p = 0,0433$; sihB5: $p = 0,0492$).

Die RNA-Analyse 48 h nach si(BMPER)-RNA-Transfektion ergab nur nach Transfektion mittels sihB2 Tendenzen einer vermehrten Expression der miR146a ($1,439 \pm 0,3327$) mit einem relativen Unterschied zur Kontrolle von 30,51 % und einem mittleren Effekt von 0,582. Nach 72 h war auch nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mittels sihB5 eine vermehrte Expression der miR146a zu beobachten ($1,348 \pm 0,3241$) mit einem relativen Unterschied von 25,82 % zur Kontrolle und einem mittleren Effekt von 0,512. Mit einem Mittelwert von $3,851 \pm 1,120$ und einem relativen Unterschied zur Kontrolle von 74,03 % war der stärkste Effekt (1,346) für die vermehrte Expression von miR146a 72 h nach Transfektion mittels sihB2 zu beobachten. Mit einer Signifikanz von $p = 0,0454$ war das Ergebnis nach Bonferroni-Holm-Adjustierung nicht mehr als statistisch signifikant einzustufen (Abbildung 31B; Tabelle 59).

Somit konnte nach si(BMPER)-RNA-Transfektion in HAOSMCs sowohl die Tendenz zu einer verminderten Expression der für den kontraktilen Phänotyp als Marker dienenden miRNA143 beobachtet werden als auch nach 72 h eine vermehrte Expression der für den synthetisierenden Phänotyp als Marker dienenden miRNA146a.

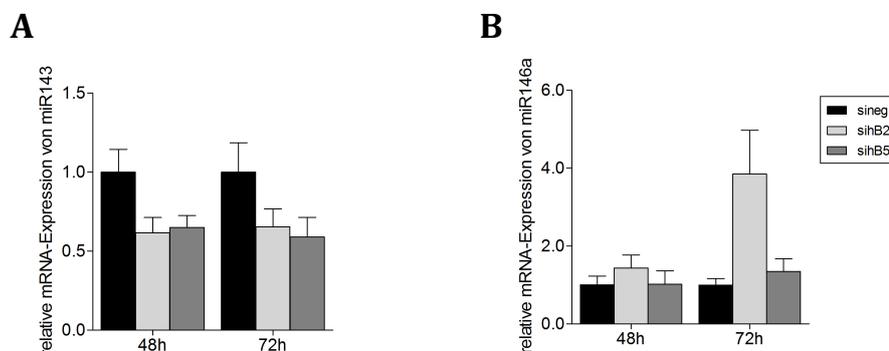


Abbildung 31: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von miRNAs in HAOSMCs nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit siNEG, sihB2 und sihB5 (nach 48 h und 72 h)

A) Expression von miR143 (n = 8)

B) Expression von miR146a (n = 7)

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 59: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für miRNAs aus HAOSMCs nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5 (nach 48 h und 72 h)

Marker	Zeit		Mittelwert ±SEM	relativer Unterschied zu sineg	Effekt- größe	Signifikanz
miR 143	48h	sineg	1,000±0,1439			
		sihB2	0,616±0,0960	- 38,44 %	1,111	p = 0,0433
		sihB5	0,650±0,0756	- 35,00 %	1,076	p = 0,0492
	72h	sineg	1,000±0,1854			
		sihB2	0,654±0,1140	- 34,65 %	0,796	p = 0,1337
		sihB5	0,590±0,1240	- 41,01 %	0,92	p = 0,0870
miR 146a	48h	sineg	1,000±0,2283			
		sihB2	1,439±0,3327	30,51 %	0,582	p = 0,2979
		sihB5	1,021±0,3405	2,06 %	0,027	p = 0,9609
	72h	sineg	1,000±0,1645			
		sihB2	3,851±1,1200	74,03 %	1,346	p = 0,0454
		sihB5	1,348±0,3241	25,82 %	0,512	p = 0,3567

4.2.6 Proteinexpression der Marker kontraktile glatter Muskelzellen in BMPER-defizienten vaskulären glatten Muskelzellen

Da die verminderte BMPER-Expression mittels Western Blot in den Zelllysaten nur schwer nachweisbar war, wurden stattdessen die Zellüberstände untersucht. Der Nachweis der Marker kontraktile glatter Muskelzellen SMA und MYH11 erfolgte im Zelllysate.

Nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mittels sihB2 ($0,575 \pm 0,1518$) und sihB5 ($0,397 \pm 0,1006$) war die BMPER-Expression in den Zellüberständen nach 72 h vermindert (Abbildung 32A; Tabelle 60). Mit einem relativen Unterschied zur Kontrolle von 42,46 % (sihB2) bzw. 60,3 % (sihB5) und starken Effekten von 2,284 bzw. 4,895 waren die Ergebnisse nach Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm statistisch nicht mehr signifikant (sihB2: $p = 0,1076$; sihB5: $p = 0,0267$).

Die Expression der Marker kontraktile glatter Muskelzellen war insbesondere nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mittels sihB2 nach 72 h stark vermindert (Abbildung 32B und C; Tabelle 60). Die durchschnittliche Expression für SMA ($0,561 \pm 0,0761$) und MYH11 ($0,510 \pm 0,0251$) war hierbei mit einem relativen Unterschied von 43,94 % (SMA) bzw. 49 % (MYH11) und einem sehr starken Effekt von 4,715 (SMA) bzw. 15,927 (MYH11) nach Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni-Holm mit $p = 0,0026$ nur noch für MYH11 statistisch signifikant, jedoch nicht mehr

für SMA mit $p = 0,0287$. Die Herunterregulierung von BMPER mittels sihB5 zeigte für die Expression der Marker kontraktile glatter Muskelzellen ähnliche Tendenzen mit starken, aber im Vergleich zu sihB2 schwächeren Effekten und stärkeren Standardabweichungen. Des Weiteren ist für diese Ergebnisse zu beachten, dass es sich hierbei mit $n = 3$ um sehr geringe Fallzahlen handelt.

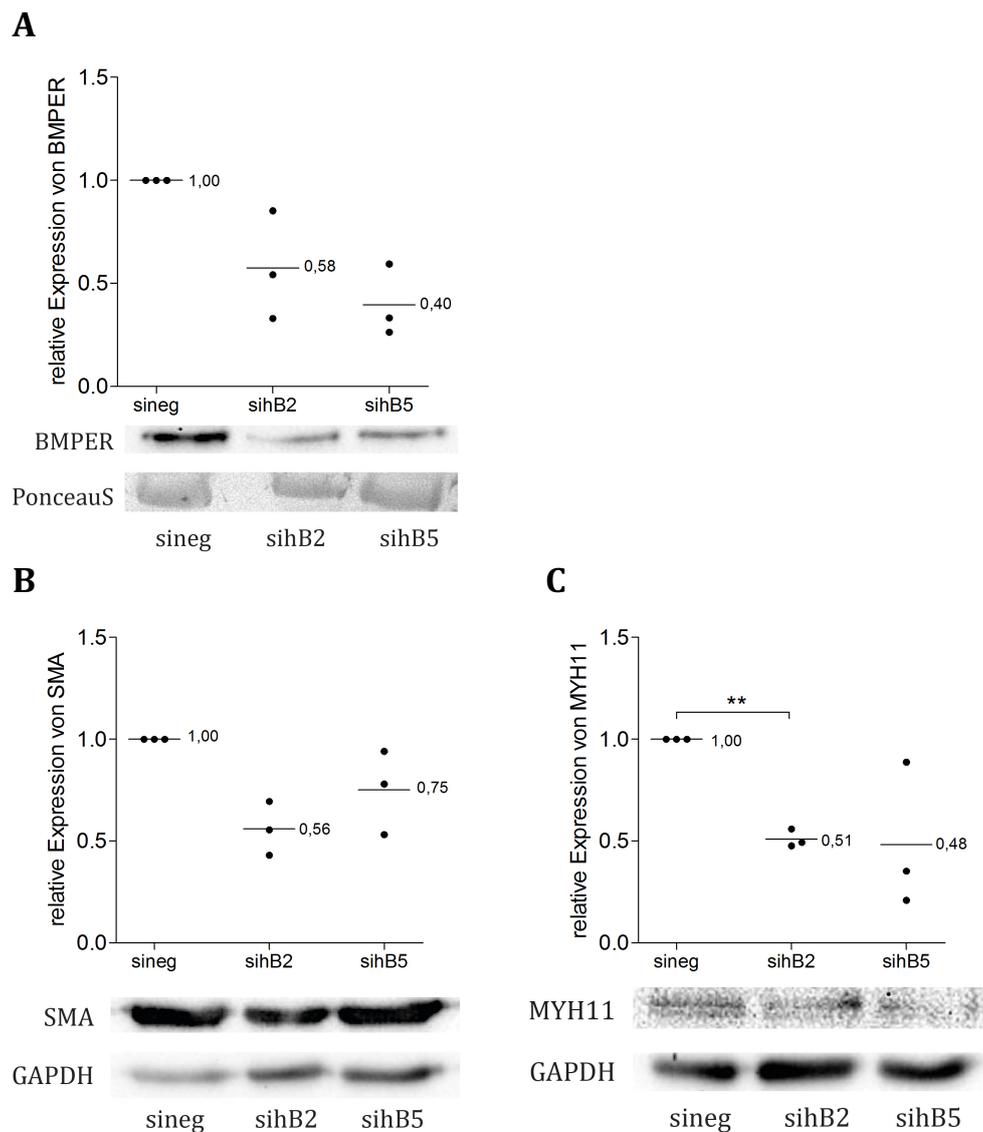


Abbildung 32: Expression von BMPER und Markern kontraktiver glatter Muskelzellen in HAOSMCs 72 h nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5

Darstellung eines repräsentativen Western Blots und der Mittelwerte der relativen Expression von

- A) BMPER
- B) SMA
- C) MYH11

Ladekontrolle: Ponceau S (A) oder GAPDH (B, C); statistisch signifikante Ergebnisse nach Bonferroni-Holm-Adjustierung: ** = $p \leq 0,01$; Querbalken \triangleq Mittelwert; n = 3

Tabelle 60: Übersicht der mittels Western Blot erhobenen Daten für BMPER und Marker kontraktile glatter Muskelzellen aus HAOSMCs 72 h nach si(BMPER)-RNA-Transfektion mit sineg, sihB2 und sihB5

Marker		Mittelwert ±SEM	relativer Unterschied zu sineg	Effekt- größe	Signifikanz
BMPER	sihB2	0,575±0,1518	- 42,46 %	2,284	p = 0,1076
	sihB5	0,397±0,1006	- 60,3 %	4,895	p = 0,0267
SMA	sihB2	0,561±0,0761	- 43,94 %	4,715	p = 0,0287
	sihB5	0,751±0,1189	- 24,87 %	1,707	p = 0,1716
MYH11	sihB2	0,510±0,0251	- 49 %	15,927	p = 0,0026
	sihB5	0,484±0,2061	- 51,64 %	2,046	p = 0,1292

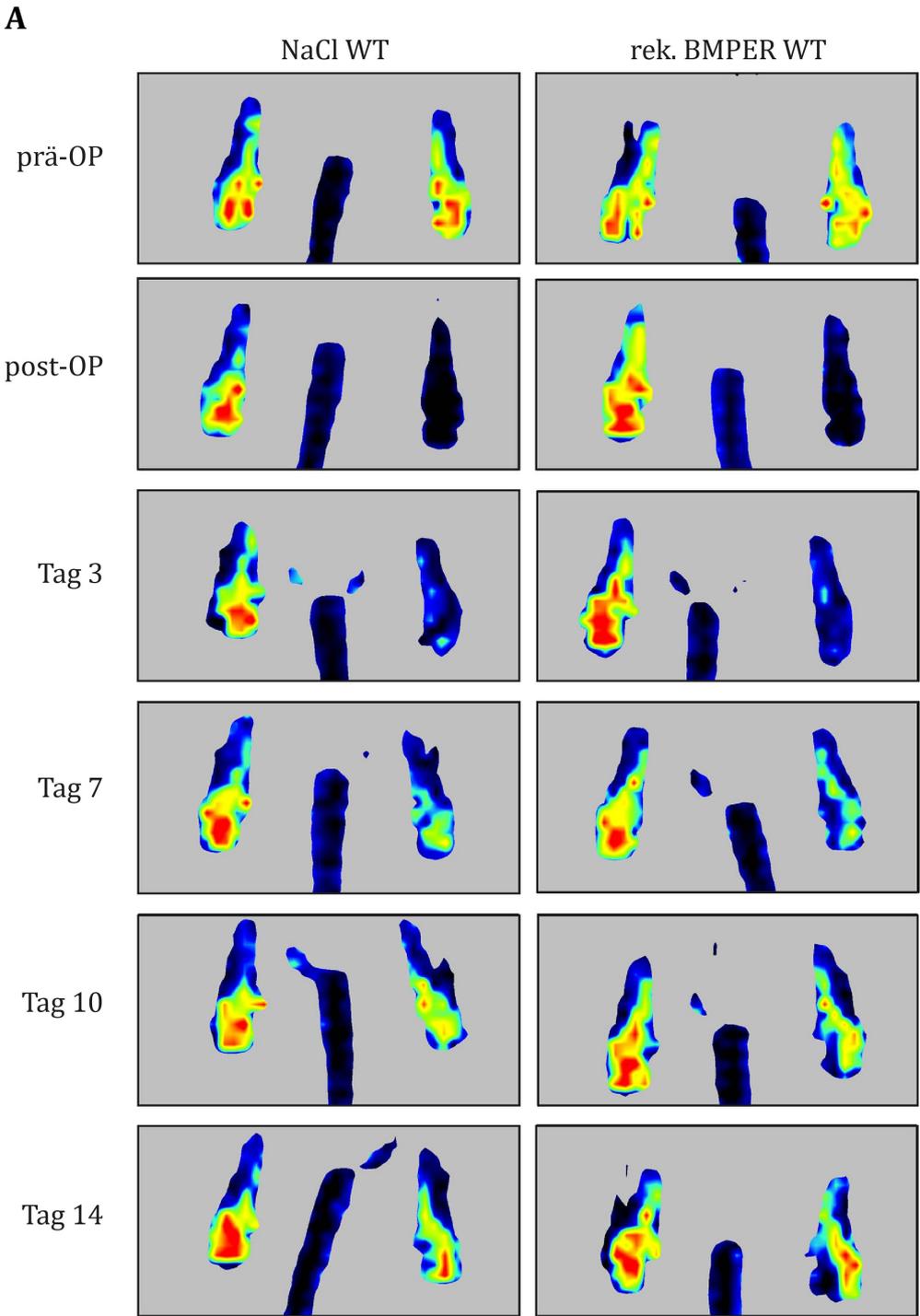
Die Gesamtheit dieser Ergebnisse zeigen, dass die BMPER-Defizienz *in vitro* und *in vivo* eine verminderte Expression der Marker des kontraktile Phänotyps und eine vermehrte Expression der Marker des synthetisierenden Phänotyps glatter Muskelzellen zur Folge hat.

4.3 Teilprojekt 3: Effekt der Stimulation mittels BMPER und BMP4 auf die Gefäßregeneration und den Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen

Komplementär zu Teilprojekt 2 (siehe 4.2) folgte der Umkehrversuch, um den protektiven Effekt von BMPER in der PAVK und somit in der Gefäßregeneration zu untersuchen. Dazu wurde das Hinterbeinischämie-Modell mit begleitenden Laser-Doppler-Messungen und anschließenden RNA-Analysen in C57BL/6-Mäusen untersucht, die über einen Zeitraum von 14 Tagen mit rekombinantem BMPER-Protein behandelt wurden (Tabelle 36). Entsprechend wurden *in vitro* HAOSMCs mit unterschiedlicher Konzentration des rekombinanten BMPER-Proteins und im Vergleich dazu mit rekombinantem BMP4-Protein stimuliert und die RNA- und Proteinexpression der Marker für kontraktile glatte Muskelzellen gemessen. Die Durchführung des Proteome-Arrays diente der Untersuchung weiterer Proteine der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Interaktion, die nach Stimulation mit rekombinantem BMPER-Protein vermehrt oder vermindert in HAOSMCs exprimiert werden. Da es sich bei BMPs und BMPER um extrazelluläre Matrixproteine handelt, lassen sich diese therapeutisch nutzen, indem sie von außen zugeführt werden.

4.3.1 Laser-Doppler-Messungen über 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von mit BMPER behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Die Laser-Doppler-Messungen von C57/BL6N-Wildtypmäusen, die begleitend zu den Messungen über einen Zeitraum von 14 Tagen mit rekombinantem BMPER-Protein behandelt wurden, zeigten mit einer AUC von 3,329 und einem relativen Unterschied von 1,14 % im Vergleich mit Wildtyp-Kontrollmäusen (AUC = 3,291), die entsprechend mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelt wurden, keinen Unterschied in ihrer Reperfusion (Abbildung 33; Tabelle 61).



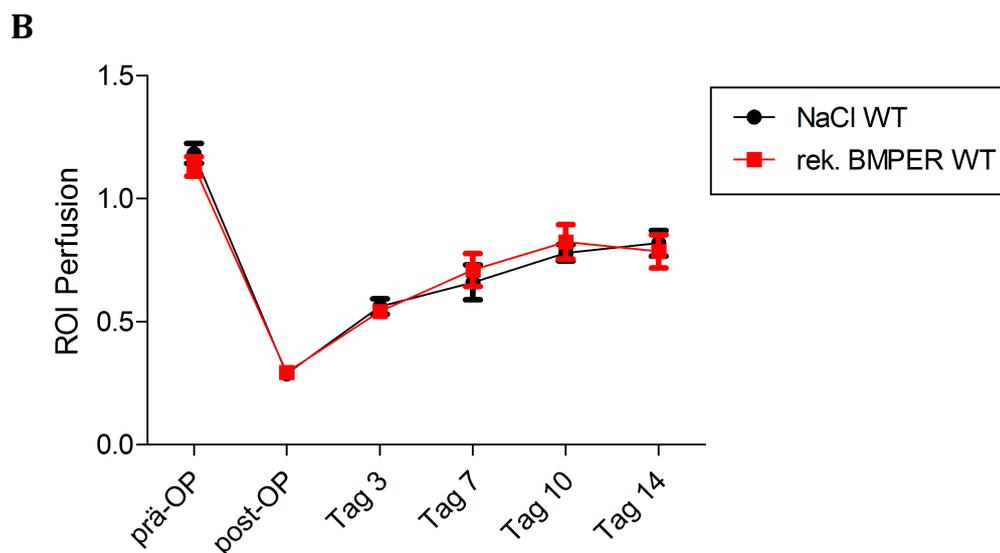


Abbildung 33: Vergleich des Verlaufs der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen und mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen

- A) Repräsentative Bilder der LDPI-Messungen von zwei Mäusen; links: nicht operiertes Bein; rechts: operiertes Bein
- B) Darstellung der Mittelwerte der Reperfusion von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen (rek. BMPER WT; n = 10) und von mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (NaCl WT; n = 10) im Zeitverlauf (prä-OP–Tag 14); ROI (Region of interest) = Quotient aus operiertem und nicht operiertem Bein; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 61: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion der mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtyp-Gruppe im Vergleich mit der mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollgruppe

Mittelwerte (Quotient aus ligiertem und nicht ligiertem Bein) und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Fuß-Perfusion der mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypgruppe (rek. BMPER WT; n = 10) im Vergleich mit der mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollgruppe (NaCl WT; n = 10) im Zeitverlauf (prä-OP–Tag 14)

	NaCl WT Mittelwert	SEM	rek. BMPER WT Mittelwert	SEM
prä-OP	1,184	0,041	1,132	0,040
post-OP	0,289	0,008	0,294	0,009
Tag 3	0,562	0,031	0,542	0,025
Tag 7	0,660	0,070	0,710	0,067
Tag 10	0,780	0,033	0,824	0,070
Tag 14	0,819	0,052	0,785	0,068

4.3.2 RNA-Expression 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von mit BMPER behandelten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Wie schon bei den Laser-Doppler-Messungen zeigten sich auch in den RNA-Analysen 14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* zwischen den mit

rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen und den mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen kaum Unterschiede, weder im *M. quadriceps femoris* (Abbildung 34 und Abbildung 35; Tabelle 62 und Tabelle 63) noch im *M. gastrocnemius* (Abbildung 36 und Abbildung 37; Tabelle 64 und Tabelle 65) des operierten Beines. Dabei waren alle Effekte vernachlässigbar oder schwach.

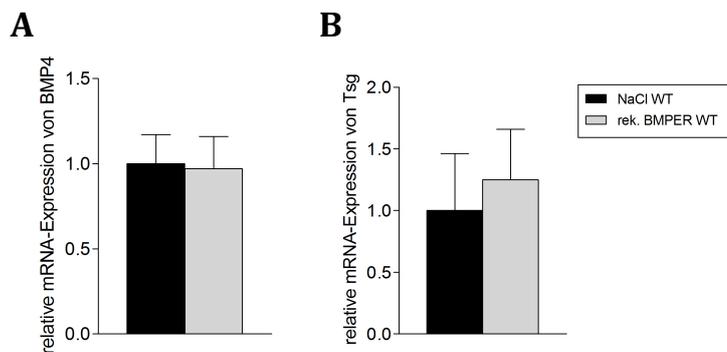


Abbildung 34: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

A) Expression von BMP4; n = 6 (rek. BMPER WT); n = 6 (NaCl WT)

B) Expression von Tsg; n = 7 (rek. BMPER WT); n = 7 (NaCl WT)

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 62: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum NaCl WT	Effekt- größe	Signifikanz
BMP4	NaCl	1,000 \pm 0,1702		0,066	p = 0,9119
	rek.BMPER	0,971 \pm 0,1882	- 2,88 %		
Tsg	NaCl	1,000 \pm 0,4628		0,215	p = 0,6943
	rek.BMPER	1,249 \pm 0,4104	19,94 %		

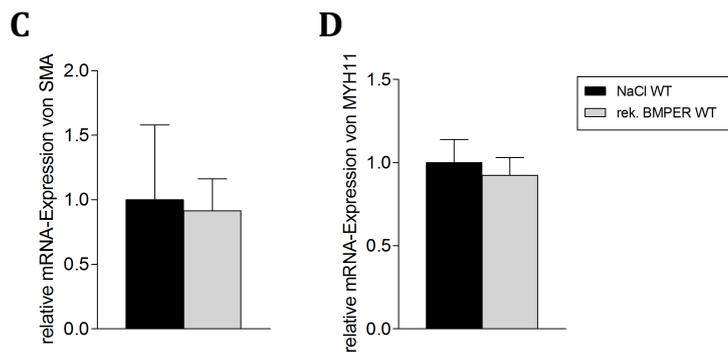


Abbildung 35: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(C) Expression von SMA; n = 7 (rek. BMPER WT); n = 7 (NaCl WT)

(D) Expression von MYH11; n = 5 (rek. BMPER WT); n = 5 (NaCl WT)

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 63: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum NaCl WT	Effekt- größe	Signifikanz
SMA	NaCl	1,000 \pm 0,5789		0,072	p = 0,3176
	rek.BMPER	0,915 \pm 0,2464	- 8,5 %		
MYH11	NaCl	1,000 \pm 0,1382		0,281	p = 0,6690
	rek.BMPER	0,923 \pm 0,1068	- 7,75 %		

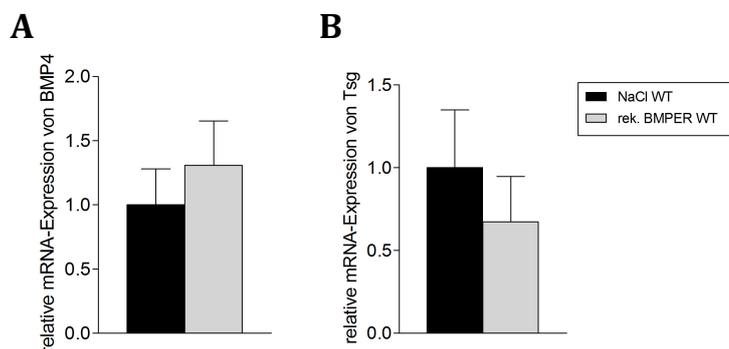


Abbildung 36: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

A) Expression von BMP4; n = 6 (rek. BMPER WT); n = 6 (NaCl WT)

B) Expression von Tsg; n = 7 (rek. BMPER WT); n = 7 (NaCl WT)

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 64: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum NaCl WT	Effekt- größe	Signifikanz
BMP4	NaCl	1,000 \pm 0,2802		0,401	p = 0,6991
	rek.BMPER	1,309 \pm 0,3452	23,61 %		
Tsg	NaCl	1,000 \pm 0,3495		0,394	p = 0,2086
	rek.BMPER	0,673 \pm 0,2739	- 32,73 %		

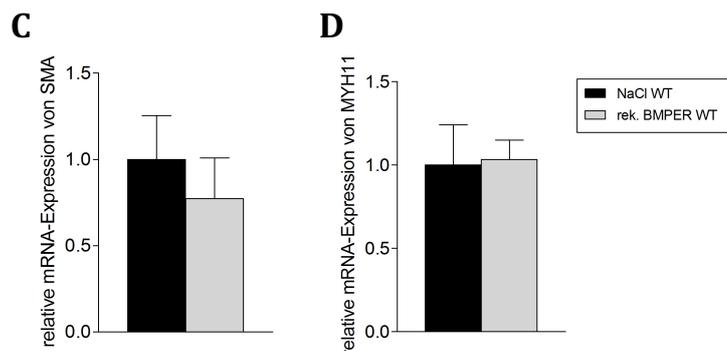


Abbildung 37: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(C) Expression von SMA; n = 7 (rek. BMPER WT); n = 7 (NaCl WT)

(D) Expression von MYH11; n = 5 (rek. BMPER WT); n = 5 (NaCl WT)

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 65: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Wildtypmäusen, im Vergleich zu mit 0,9%iger NaCl-Lösung behandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum NaCl WT	Effekt- größe	Signifikanz
SMA	NaCl	1,000 \pm 0,2546		0,35	p = 0,7104
	rek.BMPER	0,772 \pm 0,2365	- 22,78 %		
MYH11	NaCl	1,000 \pm 0,2408		0,078	p = 0,6905
	rek.BMPER	1,033 \pm 0,1152	3,19 %		

Sowohl in den Laser-Doppler-Messungen als auch in der RNA-Analyse waren kaum Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Gruppen festzustellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass für die applizierte Menge rekombinanten BMPER-Proteins einzig die Konzentration von 50 ng/g KG gewählt wurde.

4.3.3 RNA-Expression der Marker kontraktile glatter Muskelzellen in vaskulären glatten Muskelzellen nach Stimulation mit BMPER und BMP4

Die RNA-Analysen der Marker kontraktile glatter Muskelzellen (SMA, TAGLN, CNN) 24 h nach Stimulation von HAOSMCs mit rekombinantem BMPER-Protein und BMP4 ergaben insbesondere für SMA eine vermehrte Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abbildung 38A; Tabelle 66). Dabei waren für alle Bedingungen starke Effekte zu beobachten, mit dem stärksten Effekt von 2,374 und einem relativen Unterschied von 36,95 % für die Stimulation mit 40 ng/ml rhBMPER ($1,586 \pm 0,1550$). Starke Effekte zeigten sich auch in der Regulation der Expression von TAGLN (Abbildung 38B; Tabelle 66) nach Stimulation mit 40 ng/ml rhBMPER (1,776) und 80 ng/ml rhBMPER (2,035) mit Mittelwerten von $1,150 \pm 0,0263$ bzw. $1,164 \pm 0,0164$ und jeweils relativen Unterschieden zur Kontrolle von 13,04 % bzw. 14,09 %. Die CNN-Expression war nach Stimulation mit 80 ng/ml rhBMPER ($1,223 \pm 0,1908$) und 40 ng/ml rhBMP4 ($1,177 \pm 0,1667$) ebenfalls vermehrt, zeigte aber aufgrund höherer Standardabweichungen mit relativen Unterschieden von 18,23 % bzw. 15,04 % nur mittlere Effekte von 0,724 bzw. 0,618 (Abbildung 38C; Tabelle 66). Des Weiteren ist für diese Ergebnisse zu beachten, dass es sich hierbei mit $n = 3$ um sehr geringe Fallzahlen handelt.

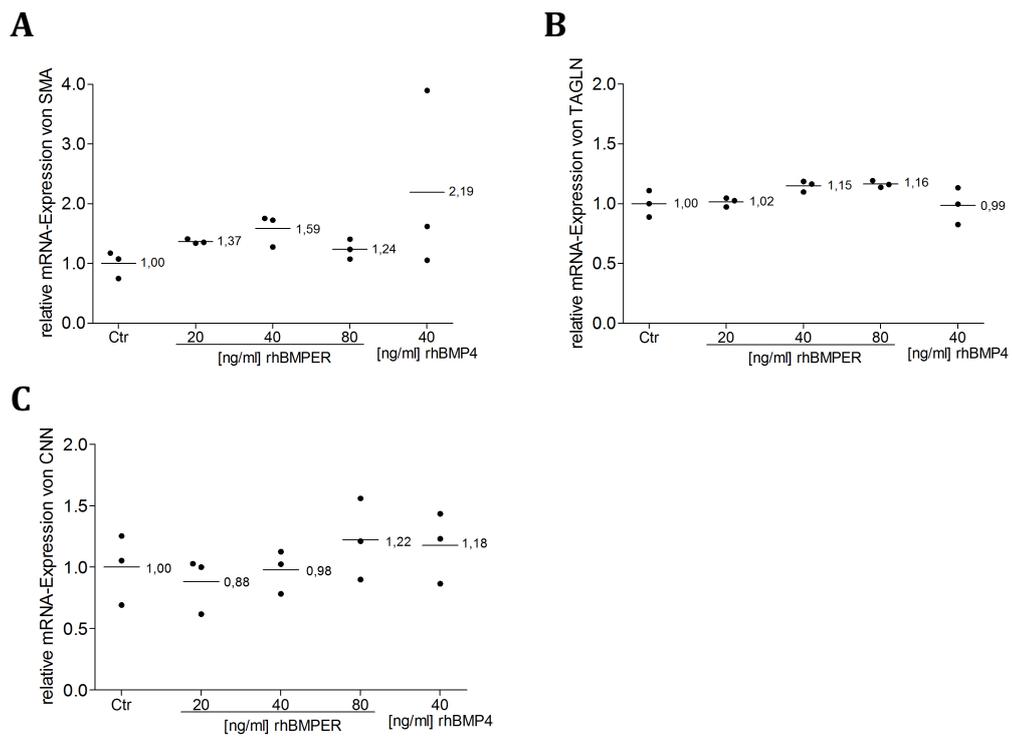


Abbildung 38: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern kontraktiver glatter Muskelzellen in HAOSMCs 24 h nach Stimulation mit BMPER und BMP4, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle

- (A) Expression von SMA
- (B) Expression von TAGLN
- (C) Expression von CNN

Querbalken $\hat{=}$ Mittelwert; n = 3

Tabelle 66: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker kontraktile glatter Muskelzellen in HAOSMCs 24 h nach Stimulation mit BMPER und BMP4, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle

Marker		Mittelwert ±SEM	relativer Unterschied zur Kontrolle	Effekt- größe	Signifikanz
SMA	Kontrolle	1,000±0,1289			
	20 ng/ml rhBMPER	1,368±0,0219	26,9 %	2,299	p = 0,1
	40 ng/ml rhBMPER	1,586±0,1550	36,95 %	2,374	p = 0,1
	80 ng/ml rhBMPER	1,239±0,0962	19,29 %	1,214	p = 0,4
	40 ng/ml rhBMP4	2,191±0,8682	54,36 %	1,108	p = 0,4
TAGLN	Kontrolle	1,000±0,0638			
	20 ng/ml rhBMPER	1,015±0,0218	1,48 %	0,182	p = 1,0
	40 ng/ml rhBMPER	1,150±0,0263	13,04 %	1,776	p = 0,2
	80 ng/ml rhBMPER	1,164±0,0164	14,09 %	2,035	p = 0,1
	40 ng/ml rhBMP4	0,986±0,0887	- 1,42 %	0,106	p = 1,0
CNN	Kontrolle	1,000±0,1640			
	20 ng/ml rhBMPER	0,882±0,1324	- 11,76 %	0,456	p = 0,4
	40 ng/ml rhBMPER	0,978±0,1019	- 2,24 %	0,095	p = 1,0
	80 ng/ml rhBMPER	1,223±0,1908	18,23 %	0,724	p = 0,7
	40 ng/ml rhBMP4	1,177±0,1667	15,04 %	0,618	p = 0,7

4.3.4 Proteinexpression der Marker kontraktile glatter Muskelzellen in vaskulären glatten Muskelzellen nach Stimulation mit BMPER und BMP4

Die Analyse der SMA-Expression mittels Western Blot 48 h nach Stimulation von HAOSMCs mit rekombinantem BMPER-Protein und BMP4-Protein ergab kaum Unterschiede zwischen den stimulierten Zellen und der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 39; Tabelle 67). Die Stimulationen mit 20 ng/ml rhBMPER und 40 ng/ml rhBMP4 zeigten dabei mit Mittelwerten von

1,081 ± 0,0511 bzw. 1,117 ± 0,1141 und Effektgrößen von 1,063 bzw. 0,592 die größten relativen Unterschiede (7,49 % bzw. 10,47 %) zur Kontrolle.

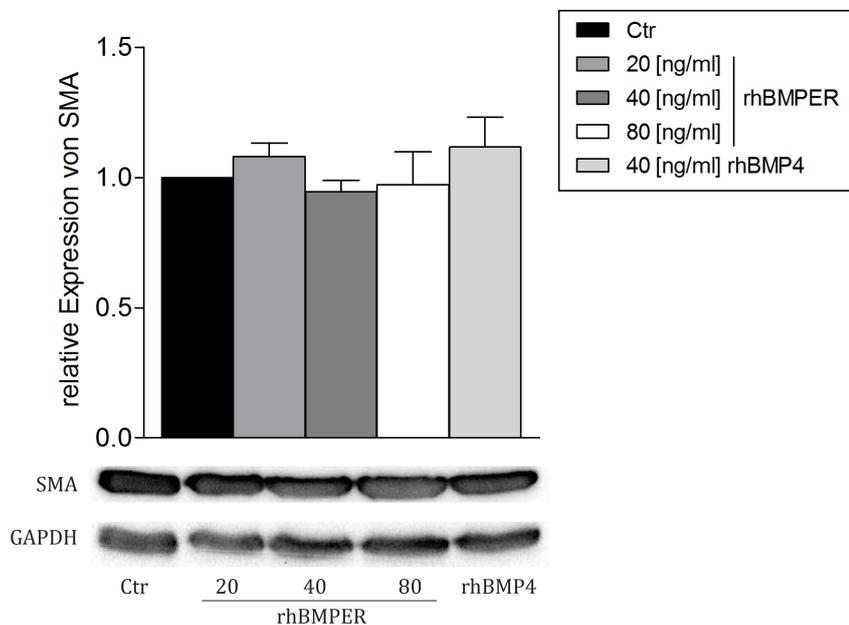


Abbildung 39: Expression von SMA als repräsentativer Marker kontraktiver glatter Muskelzellen in HAOSMCs 48 h nach Stimulation mit BMPER und BMP4, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle

Darstellung eines repräsentativen Western Blots und der Mittelwerte der relativen Expression von SMA; Ladekontrolle: GAPDH

Fehlerbalken \pm Standardabweichung; n = 6 (Ctr, 80 ng/ml rhBMPER, 40 ng/ml rhBMP4); n = 5 (20 und 40 ng/ml rhBMPER)

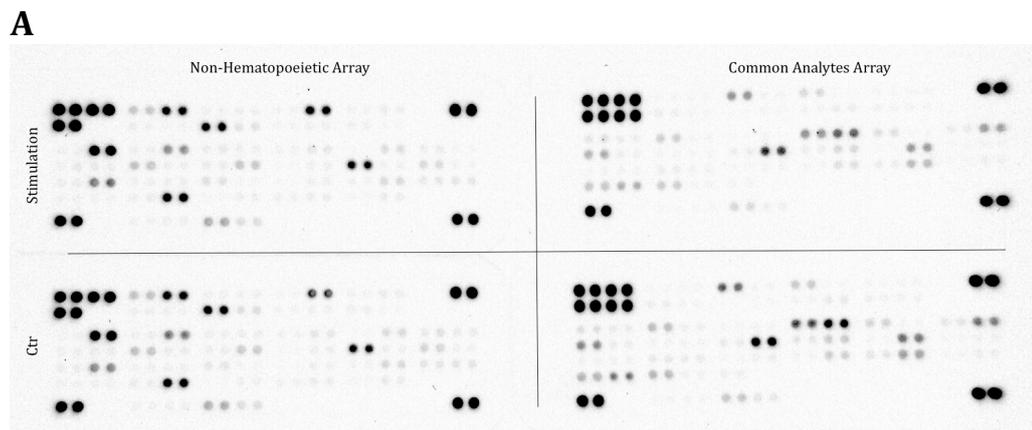
Tabelle 67: Übersicht der mittels Western Blot erhobenen Daten für SMA in HAOSMCs 48 h nach Stimulation mit BMPER und BMP4, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle

Marker	Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zur Kontrolle	Effektgröße	Signifikanz
20 ng/ml rhBMPER	1,081 \pm 0,0511	7,49 %	1,063	p = 0,1876
40 ng/ml rhBMPER	0,945 \pm 0,0446	- 5,5 %	0,828	p = 0,2846
80 ng/ml rhBMPER	0,973 \pm 0,1252	- 2,83 %	0,127	p = 0,8350
40 ng/ml rhBMP4	1,117 \pm 0,1141	10,47 %	0,592	p = 0,3535

Die Ergebnisse der RNA- und Proteinanalysen ergaben nach Stimulation von HAOSMCs mit rekombinantem BMPER-Protein und BMP4 keine vermehrte Expression von Markern kontraktiver glatter Muskelzellen.

4.3.5 Proteome-Array von vaskulären glatten Muskelzellen nach Stimulation mit BMPER

Bei der Auswertung des Proteome-Arrays (Abbildung 40A), der 48 h nach Stimulation von HAOSMCs mit 40 ng/ml rhBMPER durchgeführt wurde, konnte die Regulation verschiedener Proteine beobachtet werden, wie in Abbildung 40B dargestellt. Dabei war zum einen eine vermehrte Expression von Cadherin-13 (T-cadherin; CDHH) und zum anderen eine verminderte Expression von Thrombospondin-1 (TSP) zu erkennen. Cadherin-13 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das von vSMCs stark exprimiert wird¹²⁶. Es besteht zudem ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Expression von Cadherin-13 in vSMCs und deren erhöhter Proliferation und Migration sowie der verminderten Expression des Markers SMA für den kontraktile Phänotyp¹²⁶. Thrombospondin-1 ist ein anti-angiogenes Protein und wird durch die Induktion des Wachstumsfaktors „Platelet-derived Growth Factor“ (PDGF)^{127,128} von vSMCs sezerniert¹²⁹. Bisher ist bekannt, dass Thrombospondin-1 die Proliferation^{130,131} und Migration^{132,133} von vSMCs fördert.



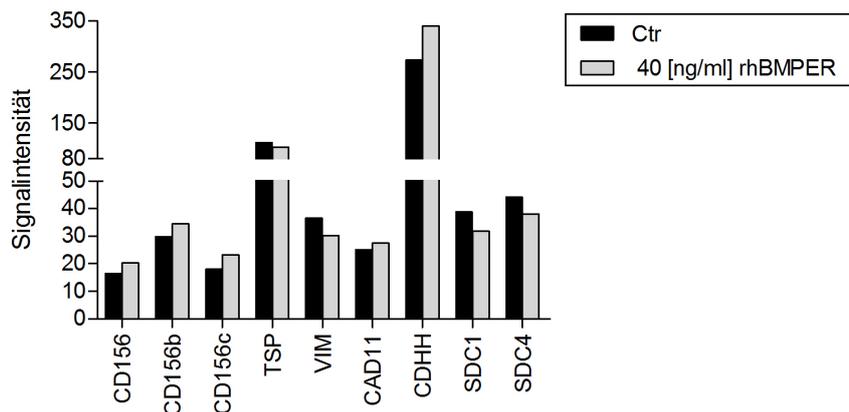
B

Abbildung 40: Expressionsanalyse verschiedener Proteine in HAOSMCs 48 h nach Stimulation mit BMPER, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle

Darstellung des Proteome-Arrays (A) und der Auswertung (B); n = 1

CD156/156b/156c/CDHH/CAD11= Cadherine; TSP = Thrombospondin-1; VIM = Vimentin; SDC = Syndecan

4.4 Teilprojekt 4: Auswirkung der BMP4-Defizienz in glatten Muskelzellen auf die Gefäßregeneration

Die Ergebnisse aus Teilprojekt 1 (siehe 4.1) zeigen, dass die Expression von BMP4 in der PAVK im Hinterbeinischämie-Modell reguliert wird. Des Weiteren konnte in Teilprojekt 2 (siehe 4.2) bei der BMPER-Defizienz eine verminderte BMP4-Expression beobachtet werden. Diese Ergebnisse und die Kenntnis, dass die BMP4-Defizienz *in vitro* eine Auswirkung auf den Phänotyp von vSMCs hat (siehe 1.4), führten zu der Frage, welche Auswirkung die BMP4-Defizienz auf die Gefäßregeneration im Hinterbeinischämie-Modell hat. Da die BMP4-Defizienz in der frühen embryonalen Entwicklung aufgrund von Dysfunktionen und fehlerhafter Mesodermbildung zum embryonalen Tod führt (siehe 1.4), wurde vor Durchführung des Hinterbeinischämie-Modells bei den adulten BMP4-geflochten Mäusen (Tabelle 37) mittels Tamoxifen eine BMP4-Defizienz in glatten Muskelzellen induziert (BMP4^{iΔSMC}) (siehe 3.1.2). Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse auf eine BMP4-Defizienz in den vaskulären glatten Muskelzellen und nicht auf eine unspezifische Wirkung des Tamoxifens zurückzuführen sind, wurde begleitend das Hinterbeinischämie-Modell mit Tamoxifen-behandelten nicht geflochtenen Mäusen durchgeführt (Ctr^{iΔSMC}) (Tabelle 38). Zunächst erfolgte jedoch der Nachweis eines vollständigen

Fehlens der BMP4-Expression in den glatten Muskelzellen von BMP4^{i^ΔSMC}-Mäusen nach Gabe von Tamoxifen (Tabelle 39).

4.4.1 Nachweis der BMP4-Defizienz in vaskulären glatten Muskelzellen nach Tamoxifenbehandlung

Der Nachweis für die fehlende Expression von BMP4 in glatten Muskelzellen von BMP4^{i^ΔSMC}-Mäusen nach Tamoxifeninjektion erfolgte mittels qPCR und Western Blot in den aus Mausearten isolierten glatten Muskelzellen. Da es sich bei der Isolation glatter Muskelzellen aus Mausearten um eine neu etablierte Methode handelt (siehe 3.1.3), wurde in einem ersten Versuch histologisch geprüft, ob mit dieser Methode tatsächlich vorwiegend glatte Muskelzellen isoliert werden.

Histologische Analyse

Die nach Isolation aus Mausearten über zwei Wochen subkultivierten und mit SMA und DAPI gefärbten glatten Muskelzellen sind in Abbildung 41 dargestellt. In der gleichen Abbildung wird auch die Färbung mit der Isotypkontrolle, die als Negativkontrolle für die SMA-Färbung dient, dargestellt. Nach Betrachten der Abbildungen (Abbildung 41) ist eine für vSMCs typische⁴¹ langgestreckte Anordnung gerader Fibrillen zu erkennen.

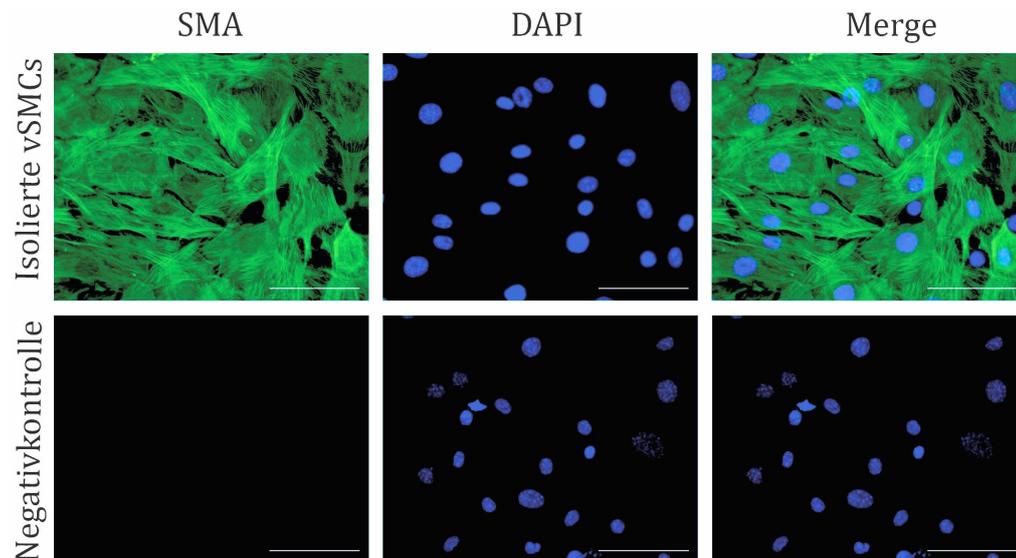


Abbildung 41: Isolierte vSMCs aus Mausearten

Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung in 400-facher Vergrößerung; Färbung von glatten Muskelzellen mittels SMA (grün); Zellkernfärbung mittels DAPI (blau); Maßstab: 100 µm

RNA-Expression

Glatte Muskelzellen, die aus den Aorten von mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{iASMC}$ -Mäusen isoliert wurden, zeigten mit einem relativen Unterschied von 52,8 % und einem starken Effekt von 1,198 eine deutliche Tendenz einer verminderten Expression von BMP4 ($0,470 \pm 0,0861$) im Vergleich mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen ($1,000 \pm 0,2762$) ($p = 0,1420$). (Abbildung 42).

Zusätzlich wurde auch noch die Expression der Marker kontraktiler glatter Muskelzellen SMA, TAGLN, MYH11 und CNN untersucht (Abbildung 43; Tabelle 68). Dabei war eine verminderte Expression aller Marker in den aus Mauseorten isolierten glatten Muskelzellen von mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{iASMC}$ -Mäusen im Vergleich mit den Wildtyp-Kontrollmäusen zu beobachten, und mit Ausnahme von TAGLN bei allen mit starken, statistisch signifikanten Effekten.

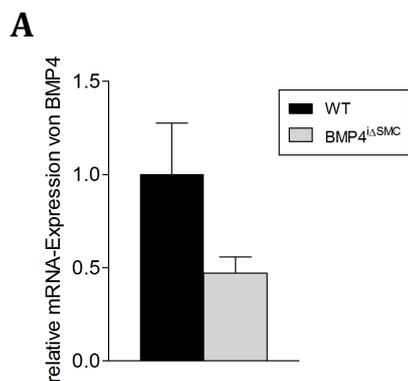


Abbildung 42: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von BMP4 in den aus Mauseorten isolierten glatten Muskelzellen von mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{iASMC}$ -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen

(A) Expression von BMP4

Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; n = 5 (WT); n = 6 ($BMP4^{iASMC}$)

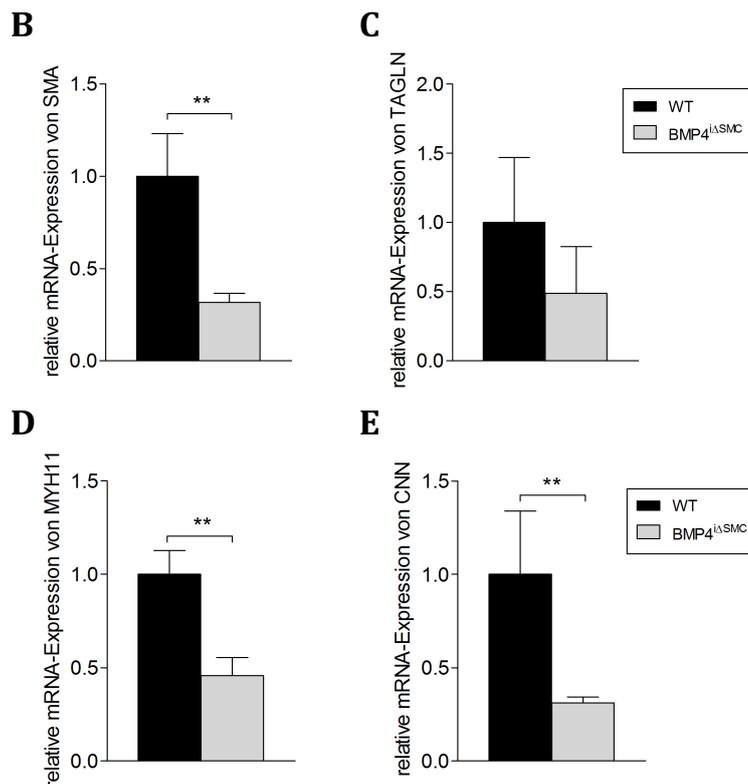


Abbildung 43: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern kontraktiver glatter Muskelzellen in den aus Mausearten isolierten glatten Muskelzellen von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iASMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen

- (B) Expression von SMA
 (C) Expression von TAGLN
 (D) Expression von MYH11
 (E) Expression von CNN

statistisch signifikante Ergebnisse: ** = $p \leq 0,01$; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 5 (WT); n = 6 (BMP4^{iASMC})

Tabelle 68: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker kontraktiver glatter Muskelzellen in den aus Mausearten isolierten glatten Muskelzellen von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iASMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
SMA	WT	1,000 \pm 0,2312			
	BMP4 ^{iASMC}	0,317 \pm 0,0496	- 68,32 %	1,917	p = 0,0043
TAGLN	WT	1,000 \pm 0,4706			
	BMP4 ^{iASMC}	0,486 \pm 0,3389	- 51,42 %	0,55	p = 0,0519
MYH11	WT	1,000 \pm 0,1281			
	BMP4 ^{iASMC}	0,456 \pm 0,0992	- 54,36 %	2,066	p = 0,0087
CNN	WT	1,000 \pm 0,3388			
	BMP4 ^{iASMC}	0,312 \pm 0,0312	- 68,82 %	1,354	p = 0,0043

Proteinexpression

Ergänzend zu den Ergebnissen der RNA-Analyse zeigte sich auch im Western Blot bei mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{i\Delta SMC}$ -Mäusen ($0,495 \pm 0,1716$) eine verminderte Expression ($p = 0,1905$) von BMP4 mit einem relativen Unterschied von 50,54 % und einem starken Effekt von 0,905 im Vergleich mit Wildtyp-Kontrollmäusen ($1,000 \pm 0,3089$) (Abbildung 44).

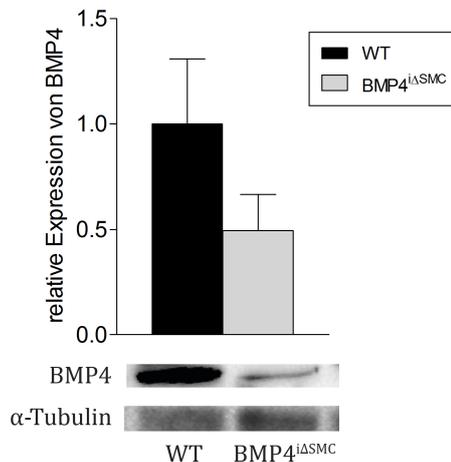


Abbildung 44: Expression von BMP4 in den aus Mauseorten isolierten glatten Muskelzellen von mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{i\Delta SMC}$ -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen

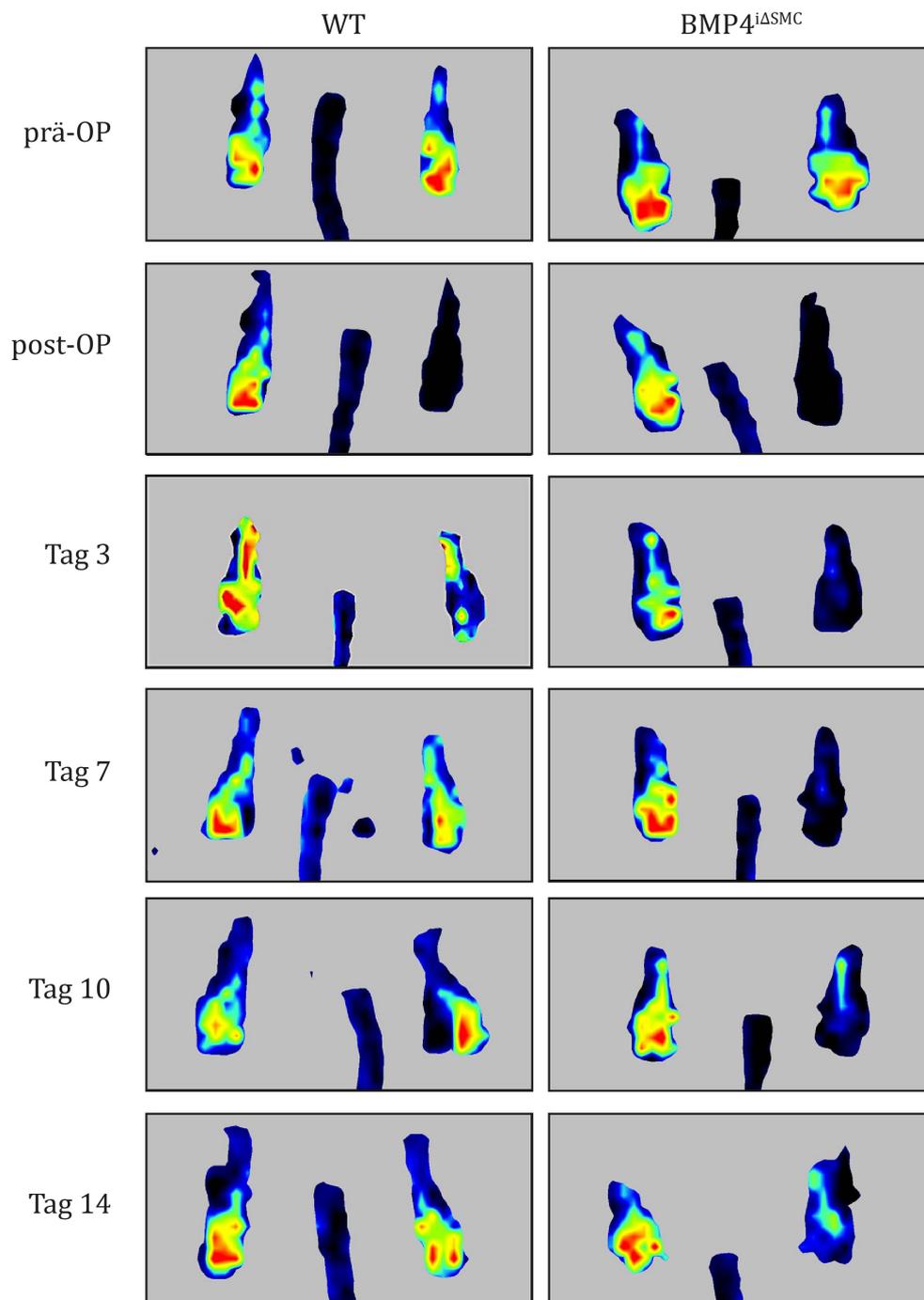
Darstellung eines repräsentativen Western Blots und der Mittelwerte der relativen Expression von BMP4; Ladekontrolle: α -Tubulin
Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung; $n = 5$ (WT); $n = 5$ ($BMP4^{i\Delta SMC}$)

Die Ergebnisse der RNA- und Proteinanalysen zeigen deutliche Tendenzen einer verminderten BMP4-Expression in den vSMCs von mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{i\Delta SMC}$ -Mäusen, jedoch kein vollständiges Fehlen, was auf eine nicht vollständig reine vSMC-Aufreinigung zurückzuführen sein könnte.

4.4.2 Laser-Doppler-Messungen über 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von $BMP4$ -defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Die über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Ligatur der *A. femoralis* durchgeführten Laser-Doppler-Messungen ergaben zwischen $BMP4^{i\Delta SMC}$ -Mäusen mit einer AUC von 2,937 und Wildtyp-Kontrollmäusen mit einer AUC von 3,596 einen deutlichen relativen Unterschied von 18,33 % (Abbildung 45; Tabelle 69). Auffällig ist die bereits präoperative Diskrepanz der durchschnittlichen Fußperfusion zwischen den beiden Gruppen ($BMP4^{i\Delta SMC}$: $0,975 \pm 0,064$; WT: $1,275 \pm 0,078$). Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die

Mäuse präoperativ über einen Zeitraum von 5 Tagen mit Tamoxifen und einer Inkubationszeit von 10 Tagen handelt wurden und dies schon einen Effekt auf die BMP4-Defizienz in vSMCs darstellt.

A

B

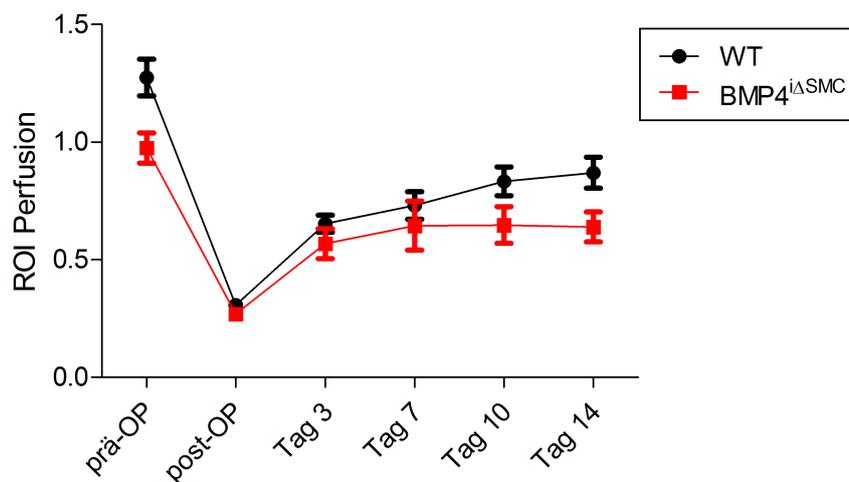


Abbildung 45: Vergleich des Verlaufs der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iΔSMC}-Knockout-Mäusen und unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen

- (A) Repräsentative Bilder der LDPI-Messungen von zwei Mäusen; links: nicht operiertes Bein; rechts: operiertes Bein
- (B) Darstellung der Mittelwerte der Reperfusion von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iΔSMC}-Knockout Mäusen (BMP4^{iΔSMC}; n = 8) und unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (WT; n = 14) im Zeitverlauf (prä-OP-Tag 14); ROI (Region of interest) = Quotient aus operiertem und nicht operiertem Bein; Fehlerbalken $\hat{=}$ Standardabweichung

Tabelle 69: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion des mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iΔSMC}-Knockout-Mausstammes im Vergleich mit der unbehandelten Wildtyp-Kontrollgruppe

Mittelwerte (Quotient aus ligiertem und nicht ligiertem Bein) und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Fuß-Perfusion des mit Tamoxifen behandelten konditionellen Knockout-Mausstammes (BMP4^{iΔSMC}; n = 8) im Vergleich mit der unbehandelten Wildtyp-Kontrollgruppe (WT; n = 14) im Zeitverlauf (prä-OP-Tag 14)

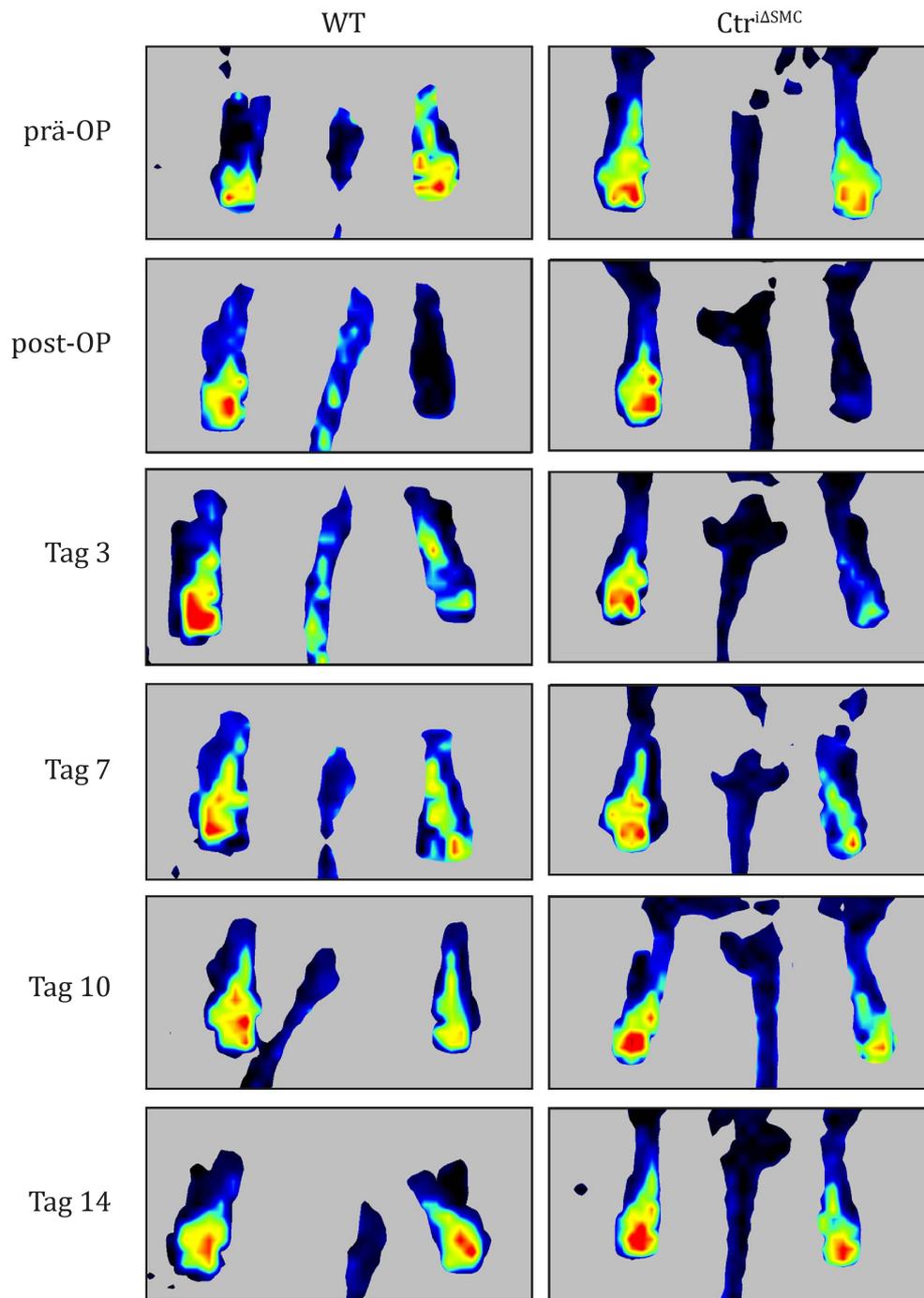
	WT Mittelwert	SEM	BMP4 ^{iΔSMC} Mittelwert	SEM
prä-OP	1,275	0,078	0,975	0,064
post-OP	0,307	0,019	0,270	0,018
Tag 3	0,653	0,037	0,568	0,063
Tag 7	0,731	0,059	0,645	0,104
Tag 10	0,833	0,061	0,647	0,078
Tag 14	0,870	0,066	0,639	0,064

Ausschluss einer Wirkung der Tamoxifenbehandlung bei nicht geflochten Mäusen: Laser-Doppler-Messungen über 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von mit Tamoxifen behandelten nicht geflochten Mäusen

In den Laser-Doppler-Messungen konnten über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Ligatur der *A. femoralis* bei mit Tamoxifen behandelten nicht geflochten

$\text{Ctr}^{\Delta\text{SMC}}$ -Mäusen (AUC = 3,467) und unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (AUC = 3,515) keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden (relativer Unterschied: 1,37 %). Somit sind die in Abbildung 45 betrachteten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen einzig auf das Fehlen von BMP4 in den glatten Muskelzellen und nicht auf die bloße Behandlung mit Tamoxifen zurückzuführen (Abbildung 46; Tabelle 70).

A



B

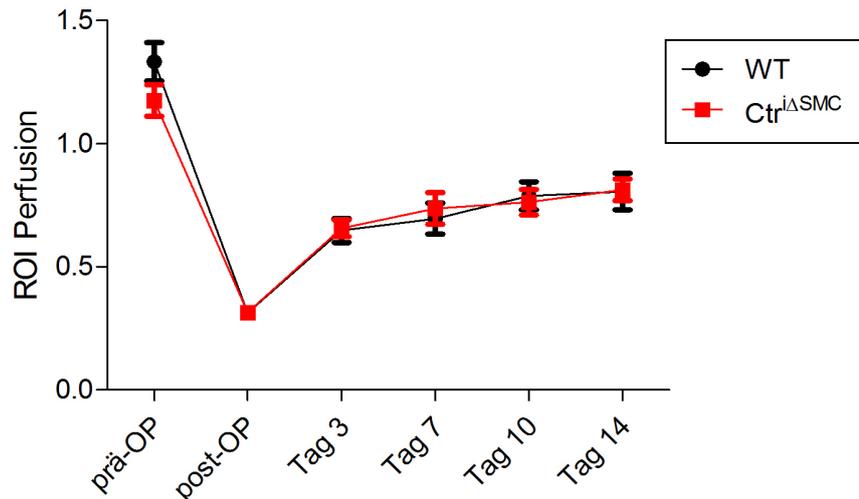


Abbildung 46: Vergleich des Verlaufs der Reperfusion über 14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* von mit Tamoxifen behandelten Ctr^{iΔSMC}-Mäusen und unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen

- (A) Repräsentative Bilder der LDPI-Messungen von zwei Mäusen; links: nicht operiertes Bein; rechts: operiertes Bein
- (B) Darstellung der Mittelwerte der Reperfusion von mit Tamoxifen behandelten Ctr^{iΔSMC}-Mäusen (Ctr^{iΔSMC}; n = 8) und unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (WT; n = 9) im Zeitverlauf (prä-OP–Tag 14); ROI (Region of interest) = Quotient aus operiertem und nicht operiertem Bein; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung

Tabelle 70: Übersicht der Mittelwerte der Fuß-Perfusion des mit Tamoxifen behandelten Ctr^{iΔSMC}-Mausstammes im Vergleich mit der unbehandelten Wildtyp-Kontrollgruppe

Mittelwerte (Quotient aus ligiertem und nicht ligiertem Bein) und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Fuß-Perfusion der mit Tamoxifen behandelten Gruppe (Ctr^{iΔSMC}; n = 8) im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe (WT; n = 9) im Zeitverlauf (prä-OP–Tag 14)

	WT Mittelwert	SEM	Ctr ^{iΔSMC} Mittelwert	SEM
prä-OP	1,334	0,078	1,176	0,064
post-OP	0,313	0,022	0,316	0,017
Tag 3	0,648	0,048	0,657	0,034
Tag 7	0,696	0,063	0,737	0,064
Tag 10	0,788	0,057	0,763	0,052
Tag 14	0,806	0,074	0,813	0,044

4.4.3 RNA-Expression 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMP4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Im operierten Bein der BMP4^{iΔSMC}-Mäuse zeigte sich 14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis* im Vergleich mit dem operierten Bein der Wildtyp-

Kontrollmäuse eine verminderte Expression der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie (BMPER und Tsg) sowie eine starke Tendenz zu einer verminderten Expression der Marker von glatten Muskelzellen (SMA, MYH11 und CNN) insbesondere im *M. gastrocnemius*.

Die durchschnittliche Expression von BMPER im *M. quadriceps femoris* ($0,369 \pm 0,1278$) bzw. im *M. gastrocnemius* ($0,368 \pm 0,0614$) der BMP4^{iASMC}-Mäuse war mit einem relativen Unterschied von 63,12 % bzw. 63,17 % und einem starken Effekt von 0,875 bzw. 1,237 signifikant niedriger ($p = 0,0366$ bzw. $p = 0,0047$) als die bei den Wildtyp-Kontrollmäusen ($1,000 \pm 0,2435$ bzw. $1,000 \pm 0,1753$) (Abbildung 47A und Abbildung 49A; Tabelle 71 und Tabelle 73). Ein ähnliches Bild war auch für Tsg zu beobachten (Abbildung 47B und Abbildung 49B; Tabelle 71 und Tabelle 73). Entsprechend den vorherigen Beobachtungen bei den BMPER^{+/-}-Mäusen aus Teilprojekt 2 (siehe 4.2), die im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen eine verminderte BMP4-Expression im operierten Bein zeigten, führt hier die BMP4-Defizienz zu einer verminderten Expression der Mitglieder der TGF- β -Superfamilie (BMPER und Tsg).

Vergleichsweise schwache bis mittlere Effekte, aber mit eindeutigen Tendenzen einer verminderten Expression im operierten Bein von BMP4^{iASMC}-Mäusen, zeigten sich für die Regulation der Expression der Marker von glatten Muskelzellen (Abbildung 48 und Abbildung 50; Tabelle 72 und Tabelle 74). Starke Effekte (0,821 bzw. 0,944) und signifikante Unterschiede ($p = 0,0218$ bzw. $p = 0,0246$) zu den Wildtyp-Kontrollmäusen waren einzig für die Expression von MYH11 im *M. quadriceps femoris* (Abbildung 48D; Tabelle 72) und für die Expression von SMA im *M. gastrocnemius* (Abbildung 50C; Tabelle 74) zu beobachten. Ausnahmen von der verminderten Expression im operierten Bein von BMP4^{iASMC}-Mäusen bildeten hierbei SMA, das im *M. quadriceps femoris* mit einem vernachlässigbaren Effekt von 0,136 und einem relativen Unterschied von 13,57 % kaum reguliert wurde, und CNN im *M. quadriceps femoris*, das in BMP4^{iASMC}-Mäusen mit einem Mittelwert von $1,372 \pm 0,6879$ und einem relativen Unterschied von 27,11 %

sogar mehr exprimiert war als in den Wildtyp-Kontrollmäusen (Abbildung 48C und E; Tabelle 72).

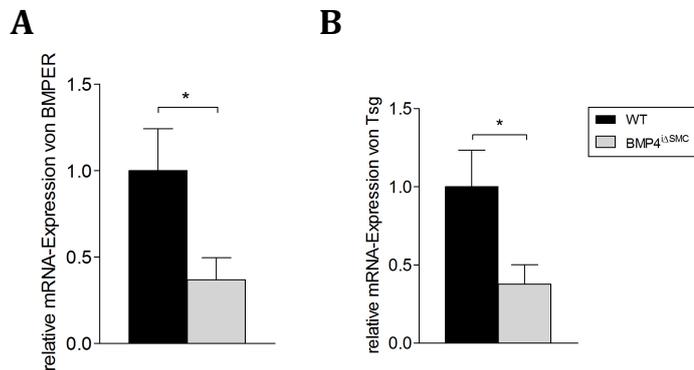


Abbildung 47: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{Δ SMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(A) Expression von BMPER

(B) Expression von Tsg

statistisch signifikante Ergebnisse: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 12 (WT); n = 6 (BMP4 ^{Δ SMC})

Tabelle 71: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{Δ SMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
BMPER	WT	1,000 \pm 0,2435			
	BMP4 ^{ΔSMC}	0,369 \pm 0,1278	- 63,12 %	0,875	p = 0,0366
Tsg	WT	1,000 \pm 0,2347			
	BMP4 ^{ΔSMC}	0,378 \pm 0,1245	- 62,22 %	0,895	p = 0,0334

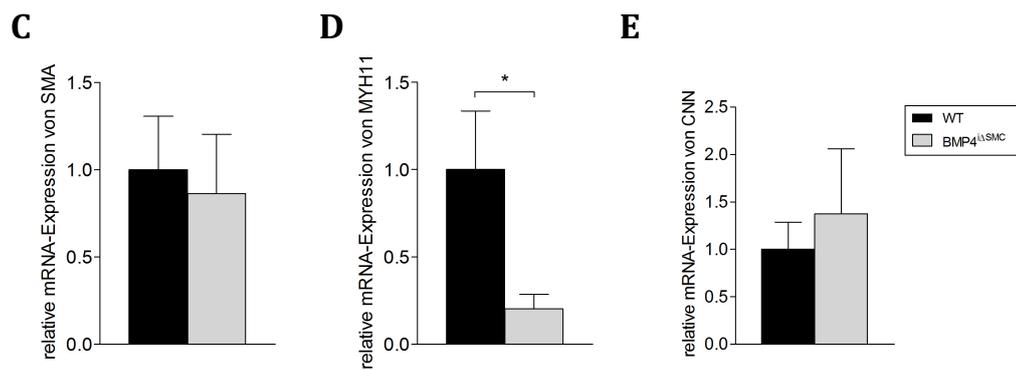


Abbildung 48: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{\Delta SMC}$ -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(C) Expression von SMA

(D) Expression von MYH11

(E) Expression von CNN

statistisch signifikante Ergebnisse: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; $n = 12$ (WT); $n = 6$ ($BMP4^{\Delta SMC}$)

Tabelle 72: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{\Delta SMC}$ -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
SMA	WT	1,000 \pm 0,3063			
	$BMP4^{\Delta SMC}$	0,8643 \pm 0,3383	- 13,57 %	0,136	$p = 0,7431$
MYH11	WT	1,000 \pm 0,3364			
	$BMP4^{\Delta SMC}$	0,2011 \pm 0,0845	- 79,89 %	0,821	$p = 0,0218$
CNN	WT	1,000 \pm 0,2846			
	$BMP4^{\Delta SMC}$	1,372 \pm 0,6879	27,11 %	0,298	$p = 0,926$

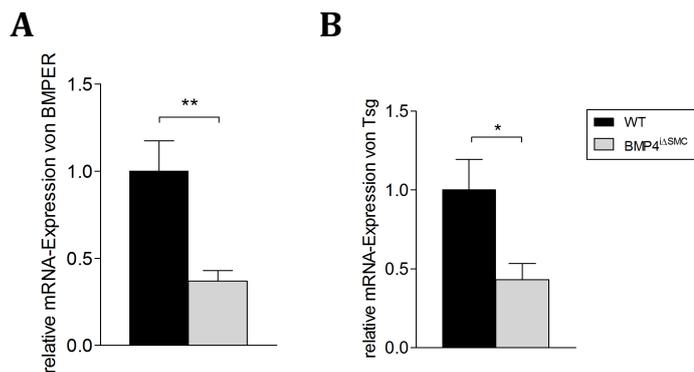


Abbildung 49: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{Δ SMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(A) Expression von BMPER

(B) Expression von Tsg

statistisch signifikante Ergebnisse: ** = $p \leq 0,01$; * = $p \leq 0,05$;

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 12 (WT); n = 6 (BMP4 ^{Δ SMC})

Tabelle 73: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4 ^{Δ SMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
BMPER	WT	1,000 \pm 0,1753			
	BMP4 ^{ΔSMC}	0,368 \pm 0,0614	- 63,17 %	1,237	p = 0,0047
Tsg	WT	1,000 \pm 0,1936			
	BMP4 ^{ΔSMC}	0,4313 \pm 0,1011	- 56,87 %	0,992	p = 0,0199

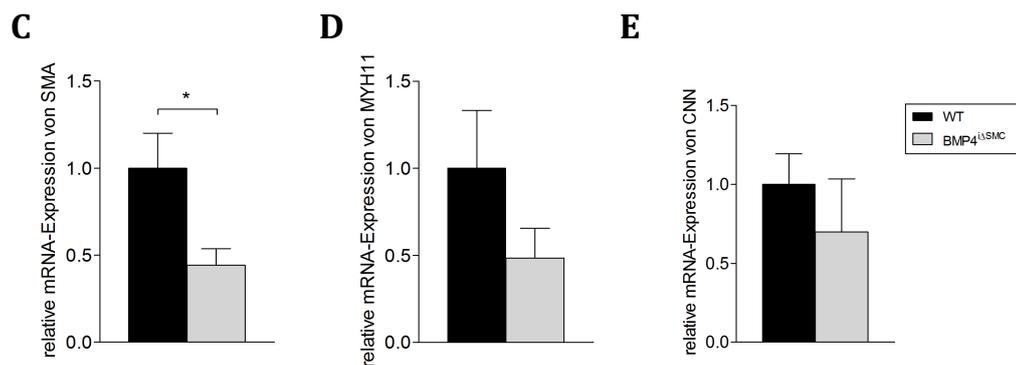


Abbildung 50: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{i\Delta SMC}$ -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(C) Expression von SMA

(D) Expression von MYH11

(E) Expression von CNN

statistisch signifikante Ergebnisse: * = $p \leq 0,05$; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; $n = 12$ (WT); $n = 6$ ($BMP4^{i\Delta SMC}$)

Tabelle 74: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für Marker glatter Muskelzellen aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten $BMP4^{i\Delta SMC}$ -Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
SMA	WT	1,000 \pm 0,2006			
	$BMP4^{i\Delta SMC}$	0,4427 \pm 0,0933	- 55,73 %	0,944	$p = 0,0246$
MYH11	WT	1,000 \pm 0,3325			
	$BMP4^{i\Delta SMC}$	0,4841 \pm 0,1704	- 51,59 %	0,525	$p = 0,2059$
CNN	WT	1,000 \pm 0,1932			
	$BMP4^{i\Delta SMC}$	0,6992 \pm 0,3369	- 30,08 %	0,417	$p = 0,4167$

Ausschluss einer Wirkung der Tamoxifenbehandlung bei nicht geflochten Mäusen: RNA-Expression 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von mit Tamoxifen behandelten nicht geflochten Mäusen

Die RNA-Analysen für die Expression von BMP4 und von MYH11 als repräsentativer Marker glatter Muskelzellen, ergaben wie schon zuvor in den Laser-Doppler-Messungen (siehe 4.4.2; Abbildung 46) keine wesentlichen Unterschiede zwischen den nicht geflochten mit Tamoxifen behandelten $Ctr^{i\Delta SMC}$ -Mäusen und den unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (Abbildung 51 und Abbildung 52; Tabelle 75 und Tabelle 76).

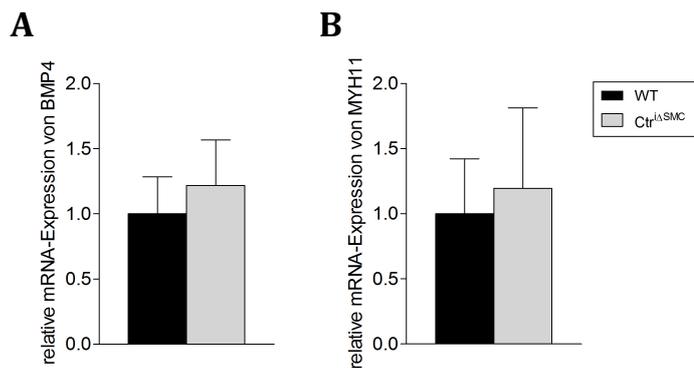


Abbildung 51: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von BMP4 und MYH11 als repräsentativer Marker glatter Muskelzellen im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten *Ctrl^{iΔSMC}*-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(A) Expression von BMP4

(B) Expression von MYH11

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 7 (WT); n = 6 (*Ctrl^{iΔSMC}*)

Tabelle 75: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für BMP4 und MYH11 aus dem *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten *Ctrl^{iΔSMC}*-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert \pm SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
BMP4	WT	1,000 \pm 0,2830			
	<i>Ctrl^{iΔSMC}</i>	1,218 \pm 0,3487	17,90 %	0,273	p = 0,952
MYH11	WT	1,000 \pm 0,4213			
	<i>Ctrl^{iΔSMC}</i>	1,194 \pm 0,6171	16,25 %	0,148	p = 0,8357

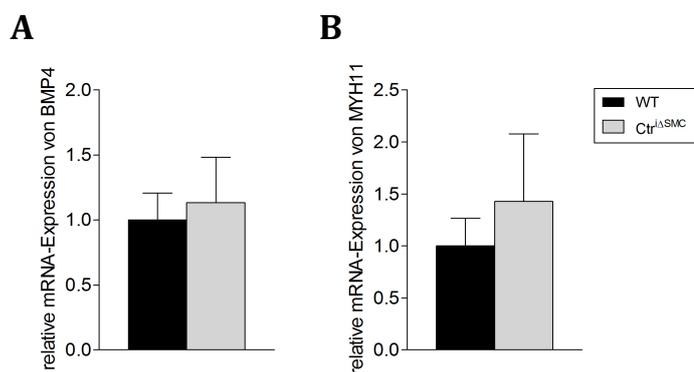


Abbildung 52: Mittelwert der relativen mRNA-Expression von BMP4 und MYH11 als repräsentativer Marker glatter Muskelzellen im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten *Ctrl^{iΔSMC}*-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(A) Expression von BMP4

(B) Expression von MYH11

Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 7 (WT); n = 6 (*Ctrl^{iΔSMC}*)

Tabelle 76: Übersicht der mittels qPCR erhobenen Daten für BMP4 und MYH11 aus dem *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten Ctr^{iASMC}-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

Marker		Mittelwert±SEM	relativer Unterschied zum WT	Effektgröße	Signifikanz
BMP4	WT	1,000±0,2064			
	Ctr ^{iASMC}	1,135±0,3486	11,89 %	0,192	p = 0,7371
MYH11	WT	1,000±0,2645			
	Ctr ^{iASMC}	1,428±0,6516	29,97 %	0,359	p = 0,5322

4.4.4 Histologische Analyse 14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie von BMP4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen

Mit einer durchschnittlichen Fläche der Media (SMA-positive Zellen) von $110,6 \pm 5,654 \mu\text{m}^2$ im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines der BMP4^{iASMC}-Mäuse war diese mit einem relativen Unterschied von nur 9,12 %, und einem vernachlässigbaren Effekt von 0,147 nur tendenziell kleiner ($p = 0,0612$) im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen mit einer durchschnittlichen Fläche der Media von $121,7 \pm 5,000 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 53).

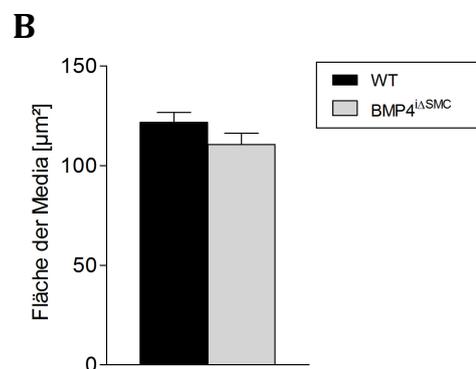
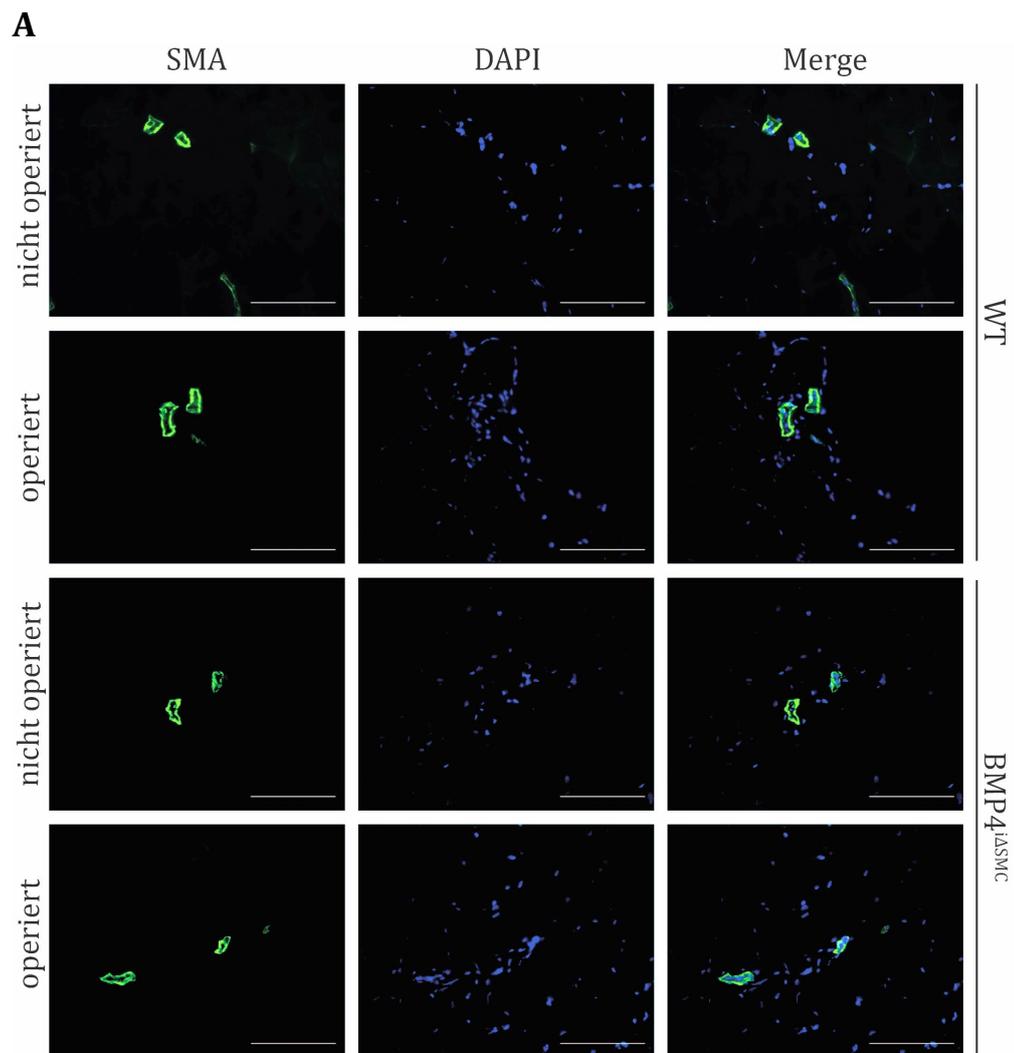


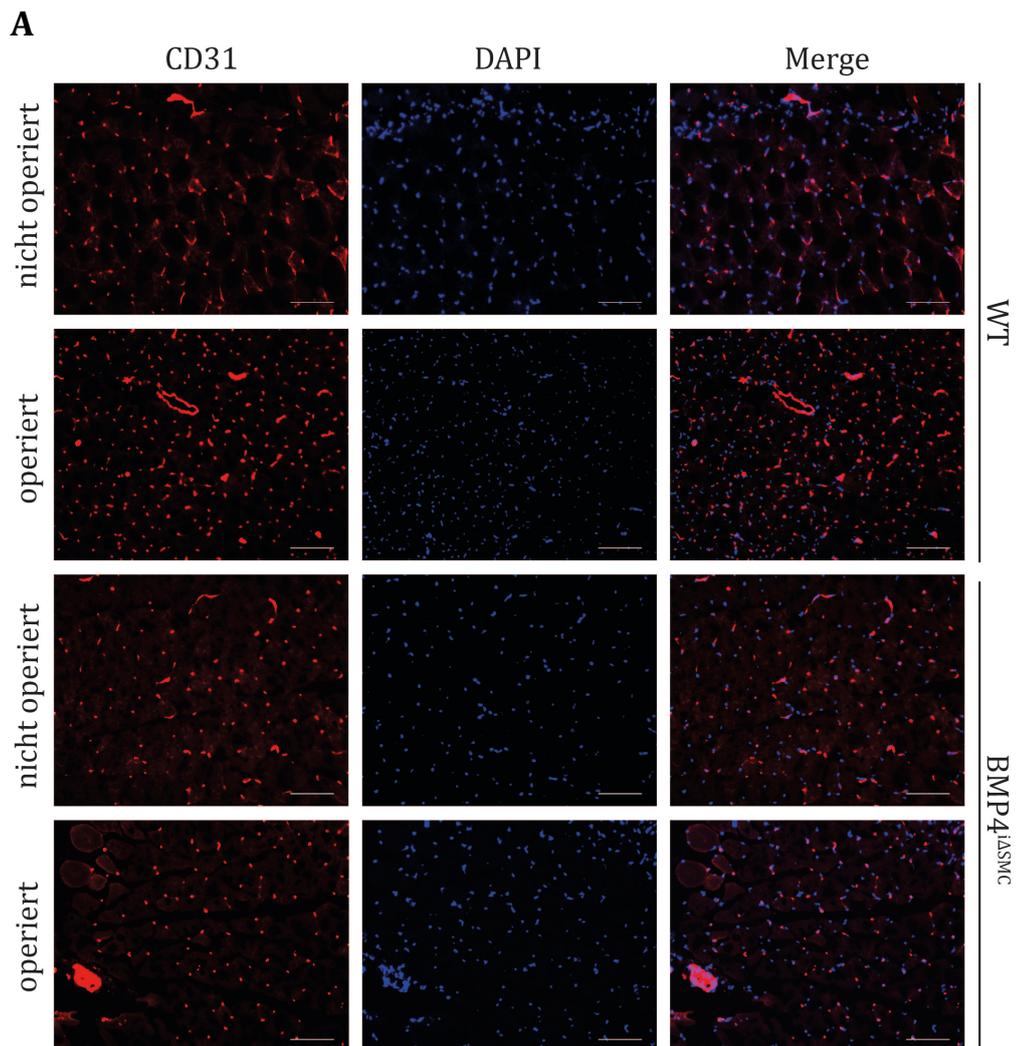
Abbildung 53: Fläche der Media im *M. quadriceps femoris* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iASMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(A) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung in 400-facher Vergrößerung; Färbung von glatten Muskelzellen mittels SMA (grün); Endothelzellfärbung mittels CD31 (rot); Zellkernfärbung mittels DAPI (blau); Maßstab: 100 µm

(B) Vergleich der Mittelwerte der Fläche der Media des operierten Beines von BMP4^{iASMC}-Knockout-Mäusen mit Wildtyp-Kontrollmäusen;

Fehlerbalken \pm Standardabweichung; n = 6 (WT); n = 6 (BMP4^{iASMC})

Die durchschnittliche Kapillaranzahl (CD31-positive Zellen) im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMP4^{iΔSMC}-Mäusen ($41,18 \pm 1,348$) war mit einem relativen Unterschied von 17,21 % und einem mittleren Effekt von 0,61 deutlich signifikant niedriger ($p = 0,0072$) als die ermittelte Kapillaranzahl von $49,74 \pm 2,767$ der Wildtyp-Kontrollmäuse (Abbildung 54).



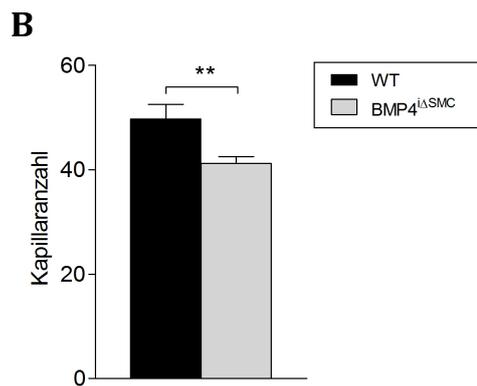


Abbildung 54: Kapillaranzahl im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von mit Tamoxifen behandelten BMP4^{iΔSMC}-Knockout-Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Kontrollmäusen (14 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*)

(A) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung in 200-facher Vergrößerung; Endothelzellfärbung mittels CD31 (rot); Zellkernfärbung mittels DAPI (blau); Maßstab: 100 μ m

(B) Vergleich der Mittelwerte der Kapillaranzahl des operierten Beines von BMP4^{iΔSMC}-Knockout-Mäusen mit Wildtyp-Kontrollmäusen;

statistisch signifikante Ergebnisse: ** = $p \leq 0,01$; Fehlerbalken \triangleq Standardabweichung; n = 7 (WT); n = 7 (BMP4^{iΔSMC})

5 Diskussion

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal im Hinterbeinischämie-Modell die Bedeutung von „Bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator“ (BMPER) und „Bone morphogenetic protein 4“ (BMP4) für die Gefäßregeneration und Neovaskularisation sowie die Folgen ihres Fehlens für die Eigenschaften vaskulärer glatter Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMCs) und den BMP-Signalweg.

Angesichts der in dieser Arbeit gewonnenen Daten kann davon ausgegangen werden, dass BMPER und BMP4 im Rahmen der Gefäßregeneration und -neubildung nach Hinterbeinischämie zur Arterio- und Angiogenese beitragen und darüber hinaus für den Erhalt der kontraktilen Eigenschaften von vSMCs wichtig sind. Folglich äußerte sich die Defizienz dieser beiden Proteine, insbesondere von BMP4, *in vivo* durch die langsamere Reperfusion nach Hinterbeinischämie und somit eine reduzierte Arteriogenese. Entsprechend verloren beim Fehlen von BMPER und BMP4 vSMCs *in vitro* ihre kontraktilen Eigenschaften und nahmen den synthetisierenden Phänotyp an.

5.1 BMPER und BMP4 werden im Hinterbeinischämie-Modell reguliert

Nach bisheriger Kenntnis sind Mitglieder des BMP-Signalweges von großer Relevanz in vSMC-assoziierten kardiovaskulären Erkrankungen. Dieses zeigte sich z. B. in der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH), bei der es aufgrund einer Mutation im BMPRII und der daraus resultierenden deregulierten BMP-Signaltransduktion zur vermehrten Proliferation und Migration von vSMCs kommt¹³⁴. Des Weiteren wurde bei Patienten mit Herzversagen vermehrt BMP4 im Plasmaspiegel gemessen¹³⁵ und eine verminderte BMPER-Expression war in kalzifizierten Aortenklappen zu beobachten⁷¹. Mit diesem Wissen über BMP4 und BMPER erfolgten weitere Untersuchungen der Mitglieder der TGF- β -Familie in Krankheitsmodellen. Im Zuge dessen konnten sowohl CORRIERE et al. (2008) eine vermehrte BMP4-Expression nach Ligatur der Karotis zeigen als auch PACHORI et al. (2010)

und OGURA et al. (2012) im Ischämie/Reperfusion-Myokardinfarktmodell¹³⁶⁻¹³⁸. Eine vermehrte BMPER-Expression stellten JONES et al. (2008) nach Induktion eines thorakalen Aortenaneurysmas fest⁷³. Erste Hinweise der Bedeutung von BMPER in vSMC-abhängigen kardiovaskulären Erkrankungen ergaben sich ebenfalls in der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Dabei konnte im Karotisligatur-Modell eine unterschiedliche Expression von BMPER in der Adventitia und in vSMCs beobachtet werden. Die Hypothese war, dass die Expression von BMPER und BMP4 im Hinterbeinischämie-Modell reguliert ist und der BMP-Signalweg somit eine Funktion in der Arterio- und Angiogenese im Rahmen der Reperfusion hat.

Tatsächlich konnte nach Hinterbeinischämie bei C57BL/6N-Mäusen neben der vermehrten Expression von Markern glatter Muskelzellen eine vermehrte Expression von BMPER, BMP4 und Twisted gastrulation (Tsg), einem weiteren BMP-Modulator, nachgewiesen werden (siehe 4.1).

Diese Ergebnisse im Hinterbeinischämie-Modell unterstützen die Beobachtungen aus den zuvor genannten Krankheitsmodellen, wonach BMPER und BMP4 im Gefäßumbau reguliert werden und im Zusammenhang mit der Arteriogenese und Angiogenese vermehrt exprimiert sind. Dieser Nachweis ist ein starkes Indiz dafür, dass ihnen eine wichtige Rolle als Modulatoren und Angriffspunkte in der Gefäßregeneration zukommt.

5.2 BMPER und BMP4 beeinflussen die Gefäßregeneration und Neovaskularisation im Hinterbeinischämie-Modell und die Eigenschaften vaskulärer glatter Muskelzellen

5.2.1 BMPER-Defizienz beeinträchtigt die Gefäßregeneration und Neovaskularisation

Mit dem Wissen, dass BMPER im Hinterbeinischämie-Modell reguliert wird und im Zusammenhang mit Arteriogenese und Angiogenese vermehrt exprimiert ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Fähigkeit BMPER-defizienter Mäuse, die Hinterbeinischämie zu kompensieren, vermindert ist. Da BMPER eine essentielle Rolle in der Embryonalentwicklung spielt und somit homozygote BMPER-defiziente Mäuse (BMPER^{-/-}) nicht lebensfähig

sind^{113,116,139}, wurde das Hinterbeinischämie-Modell bei BMPER-(teil-)defizienten Mäusen (BMPER^{+/-}) und ihren Wurfgeschwistern, C57BL/6N-Wildtypmäusen, durchgeführt.

Die Reperfusion über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Hinterbeinischämie wies dabei in den Laser-Doppler-Messungen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf (siehe 4.2.1). Bereits WILLIS et al. (2013) untersuchten in diesem Reperfuisionsmodell über einen Zeitraum von 21 Tagen, die Auswirkung der BMPER-Defizienz. Da nach 21 Tagen in den Laser-Doppler-Messungen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festzustellen waren, schlussfolgerten sie, dass BMPER nur eine geringe Rolle im Gefäßumbau als Reaktion auf die Ischämie spielt. Entgegen den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen konnten WILLIS et al. (2013) jedoch an Tag 14 einen Unterschied mit einer geringeren Perfusion bei BMPER^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern beobachten¹⁴⁰. Die unterschiedlichen Beobachtungen an Tag 14 könnten auf die Wahl der Methode und auf die verschiedenen transgenen Mausstämme zurückzuführen sein. Die von WILLIS et al. (2013) angewandte Methode beinhaltet die vollständige Exzision der *A. femoralis*, wohingegen bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode die *A. femoralis* einzig proximal und distal der Abzweigung der *A. profunda femoris* ligiert wurde (siehe 3.1.1). Des Weiteren ist zu beachten, dass es sich bei der Perfusionsmessung mittels Laser-Doppler lediglich um eine versuchsbegleitende Methode handelt. Diese ist sehr sensibel gegenüber Bewegungsartefakten und dem vasomotorischen Ton und variiert mit der Narkosetiefe und den Gewebeeigenschaften. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich an den gewonnenen Proben die RNA-Expression von Markern glatter Muskelzellen und histologisch die Fläche der Media und Kapillardichte analysiert (siehe 4.2). Tatsächlich zeigte die histologische Analyse 7 Tage nach Hinterbeinischämie mit einer kleineren Fläche der Media im *M. quadriceps femoris* und einer geringeren Kapillardichte im *M. gastrocnemius* des operierten Beines von BMPER^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen einen Zusammenhang der BMPER-Defizienz und der

langsameren Arteriogenese und Angiogenese (siehe 4.2.4). Während in der RNA-Analyse sich nach ebenfalls 7 Tagen die BMPER-Defizienz durch die verminderte Expression der Marker glatter Muskelzellen bemerkbar machte (siehe 4.2.3), war nach 14 Tagen ein umgekehrter Effekt zu beobachten (siehe 4.2.2). Eine Erklärung für die differentiellen Ergebnisse nach 7 und 14 Tagen wäre eine kompensatorische Gegenregulation der Defizienz.

Grundlegend ist zu beachten, dass es sich bei den für diese Versuche verwendeten BMPER^{+/-}-Mäusen um teildefiziente Mäuse handelt, was sich auf die Ergebnisse auswirken könnte. Des Weiteren könnte der genetische Hintergrund der C57BL/6N-Wildtypmäuse von bedeutender Relevanz sein. So hatten die C57BL/6N-Wildtypmäuse, bei denen es sich um Wurfgeschwister von den BMPER^{+/-}-Mäusen handelte, eine schwächere Reperfusion in den Laser-Doppler-Messungen (siehe 4.2.1) als reine C57BL/6N-Wildtypmäuse aus vorangegangenen Versuchen (siehe 4.1.1).

Zusammenfassend unterstützen die gewonnenen Ergebnisse die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die BMPER-Defizienz die Gefäßregeneration und Neovaskularisation nach Hinterbeinischämie beeinträchtigt.

5.2.2 Protektive Eigenschaften von BMPER im Hinterbeinischämie-Modell

Nach der gewonnenen Erkenntnis, dass die BMPER-Defizienz die Fähigkeit zur Gefäßregeneration und Neovaskularisation nach Hinterbeinischämie beeinträchtigt, wurde die Umkehrhypothese geprüft, dass die Gabe von rekombinantem BMPER-Protein nach Hinterbeinischämie eine positive Auswirkung auf die Gefäßregeneration hat. Eine Möglichkeit, den therapeutischen Effekt von BMPER im Hinterbeinischämie-Modell zu erzielen, wäre die postoperative Behandlung von BMPER-defizienten Mäusen mit rekombinantem BMPER-Protein. Als Alternative im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Untersuchung der protektiven Eigenschaften von BMPER als Therapiemöglichkeit C57BL/6N-Wildtypmäusen postoperativ über einen Zeitraum von 14 Tagen 50 ng/g KG rekombinantes BMPER-Protein verabreicht.

Wider Erwarten konnte eine pro-angiogene Wirkung von BMPER, wie HEINKE et al. (2008) sie *in vitro* in Endothelzellen und *in vivo* mittels eines

Matrigel plug assays zeigten¹¹⁸, für die mit rekombinantem BMPER-Protein behandelten Mäuse im Hinterbeinischämie-Modell nicht nachgewiesen werden (siehe 4.3).

Da für BMPER in der verwendeten Konzentration nach subkutaner Injektion im Hinterbeinischämie-Modell keine protektiven Eigenschaften gezeigt werden konnten, sollte dieser Versuch folglich mit anderen Konzentrationen der applizierten Menge rekombinanten BMPER-Proteins und anderer Applikationsart wiederholt werden.

5.2.3 BMPER-Defizienz begünstigt den synthetisierenden Phänotyp von vaskulären glatten Muskelzellen und den Verlust ihrer kontraktilen Eigenschaften

Die Phänotyp-Modulation der vSMCs vom physiologischen, kontraktilen Phänotyp zum proliferativen synthetisierenden Phänotyp ist nicht nur essentiell für die Gefäßreparatur, sondern spielt auch eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und dem Voranschreiten von Gefäßerkrankungen. Aufgrund bisheriger Versuche der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, konnte BMPER in vSMCs eine wichtige Funktion nicht nur in der Induktion, sondern auch im Erhalt des kontraktilen Phänotyps von vSMCs zugeschrieben werden. Dabei bewirkte die mit siRNA induzierte BMPER-Defizienz in pulmonalen arteriellen glatten Muskelzellen (pulmonary arterial smooth muscle cells, PSMCs) den Verlust ihrer kontraktilen Marker (SMA und MYH11) und förderte den synthetisierenden Phänotyp von PSMCs mit zunehmender Migration, vermehrter Matrix-Metalloproteasen-Expression und verminderter Kollagenexpression. Da es sich bei den verwendeten Zellen ausschließlich um PSMCs handelt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die BMPER-Defizienz in humanen aortalen glatten Muskelzellen (human aortic smooth muscle cells, HAOSMCs) ebenfalls zum Verlust des kontraktilen Phänotyps führt.

In der Tat führte die BMPER-Defizienz in HAOSMCs ebenfalls zum Verlust ihres kontraktilen Phänotyps, demonstriert durch die verminderte Expression der kontraktilen Marker. Zusätzlich zeigte die vermehrte Expression von miR146a, die an dieser Stelle ebenfalls als Marker fungiert¹⁴¹,

den *switch* der Zellen zum synthetisierenden Phänotyp (siehe 4.2.5 und 4.2.6).

Dieser Nachweis bestätigt, dass das Fehlen von BMPER in PSMCs und in HAOSMCs zum Verlust ihrer kontraktile Eigenschaften führt und den synthetisierenden Phänotyp begünstigt.

Inwieweit Mitglieder des BMP-Signalweges den kontraktile Phänotypen in vSMCs fördern, wurde insbesondere für BMPs und TGF- β erforscht^{79,81}. MORRELL et al. (2001) demonstrierten in PSMCs, dass die Stimulation mit TGF- β und BMPs (BMP2, -4 und -7) zu einer verminderten Proliferation der Zellen führt⁹⁰. Entsprechend konnten bereits NAKAOKA et al. (1997) für BMP2 eine verminderte Proliferation der vSMCs in der Ratte beobachten⁹¹ sowie später WONG et al. (2003) in HAOSMCs⁹² und DORAI et al. (2000) für BMP7 in HAOSMCs⁸⁹. Über den Einfluss von BMPER auf den Phänotyp von vSMCs ist bisher noch wenig bekannt. Erste Ergebnisse aus vorangegangenen Versuchen dieser Arbeitsgruppe mit PSMCs zeigten die Zunahme der Expression kontraktile Marker sowie eine verminderte Migration der Zellen nach Stimulation mit rekombinantem BMPER-Protein. Mit diesem Wissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Gabe von rekombinantem BMPER-Protein den kontraktile Phänotyp von HAOSMCs fördert.

Entgegen den Erwartungen konnte die Hypothese in HAOSMCs im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht unterstützt werden (siehe 4.3.3 und 4.3.4). Da es sich um den gleichen Versuchsaufbau allerdings mit vSMCs aus unterschiedlichen Gefäßen handelt, ist davon auszugehen, dass der embryologische Ursprung der Zellen eine entscheidende Rolle in der Ansprechbarkeit der Zellen spielt. Demnach konnten für PSMCs und HAOSMCs unterschiedliche Ursprünge identifiziert werden³⁵. Welchen tatsächlichen Einfluss der Ursprung von Zellen auf ihre Reaktion auf verschiedene Faktoren *in vivo* und *in vitro* hat, ist bisher noch unklar, wird jedoch häufig diskutiert³⁸.

5.2.4 Einfluss von BMP4 auf den Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen

BMP4 fördert – wie viele weitere Mitglieder des BMP-Signalweges (siehe 5.2.3) – den kontraktile Phänotyp von vSMCs. Bereits KING et al. (2003) zeigten in aortalen glatten Muskelzellen der Ratte, dass BMP4 die Expression von Markern kontraktiler glatter Muskelzellen und somit den Erhalt des kontraktile Phänotyps dieser Zellen fördert⁸⁸. Diese Aussage wurde ebenfalls von LAGNA et al. (2007) in humanen PSMCs, HAOSMCs und umbilikalen arteriellen glatten Muskelzellen (umbilical artery smooth muscle cells, UASMCs) bestätigt⁸⁰. Entsprechend zeigten vorausgegangene Versuche der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, eine vermehrte Expression von SMA nach Stimulation mit rekombinantem BMP4-Protein in PSMCs. Einzig HAYASHI et al. (2006) beobachteten nach Stimulation mit BMP4 eine verminderte Expression kontraktile Marker in aortalen glatten Muskelzellen der Ratte¹⁴². Damit einhergehend wurde – ergänzend zur Stimulation von HAOSMCs mit rekombinantem BMPER-Protein – der positive Einfluss von BMP4 auf den Erhalt des kontraktile Phänotyps von HAOSMCs untersucht.

Tatsächlich waren nach Stimulation von HAOSMCs mit 40 ng/ml rekombinantem BMP4-Protein Tendenzen einer vermehrten Expression kontraktile Marker zu beobachten (siehe 4.3.3 und 4.3.4).

Zusammenfassend lässt sich also schließen, dass BMP4 wie TGF- β den kontraktile Phänotyp von vSMCs fördert.

5.2.5 BMP4-Defizienz beeinträchtigt die Gefäßregeneration und führt zum Verlust der kontraktile Eigenschaften vaskulärer glatter Muskelzellen

Die Auswirkung der BMP4-Defizienz in vSMCs *in vivo* wurde bisher noch nicht beschrieben. WANG et al. (2009) konnten jedoch bereits zeigen, dass das Fehlen von BMP4 *in vivo* und *in vitro* den Verlust der regelmäßigen Anordnung von vSMCs, die den Ureter umschließen, bewirkt⁹⁴. Nachdem in 4.1 ein Zusammenhang zwischen der vermehrten BMP4-Expression und der Arteriogenese und Angiogenese nach Hinterbeinischämie festgestellt werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die BMP4-Defizienz die Gefäßregeneration beeinträchtigt. Da die Abwesenheit von BMP4 in der

Embryonalentwicklung aufgrund der fehlerhaften Gefäßbildung zum embryonalen Tod führt⁹³, wurde vor Durchführung des Hinterbeinischämie-Modells bei adulten BMP4-geflochten Mäusen (MYH11-CreBMP4flox) mittels Tamoxifen eine zellspezifische BMP4-Defizienz in vSMCs induziert (siehe 3.1.2).

Tatsächlich wiesen die über 14 Tage vorgenommenen Reperfusionmessungen mittels Laser-Doppler deutliche Unterschiede zwischen den in glatten Muskelzellen BMP4-defizienten Mäusen (BMP4^{iΔSMC}) und den Wildtyp-Kontrollmäusen auf (siehe 4.4.2). Tendenzen einer verlangsamten Reperfusion mit verzögerter Arteriogenese und Angiogenese nach Hinterbeinischämie bei den BMP4^{iΔSMC}-Mäusen bestätigten sich ebenfalls in den histologischen Analysen (siehe 4.4.4). Wie bereits in 5.2.1 beschrieben, könnten die vergleichsweise weniger eindeutigen Ergebnisse der RNA-Analysen auf eine kompensatorische Gegenregulation der BMP4-Defizienz in vSMCs zurückzuführen sein (siehe 4.4.3). Des Weiteren konnte die Hypothese des Verlustes der kontraktile Eigenschaften von BMP4-defizienten vSMCs mit der präoperativen Diskrepanz der zu vergleichenden Gruppen in den Laser-Doppler-Messungen (siehe 4.4.2) sowie mit der deutlich verminderten Expression der Marker kontraktile glatter Muskelzellen in BMP4-defizienten vSMCs (siehe 4.4.1) bestätigt werden.

Dieser Nachweis bestätigt, dass BMP4 wichtig für die Gefäßregeneration nach Hinterbeinischämie und für den Erhalt des kontraktile Phänotyps in vSMCs ist.

5.3 Mitglieder des BMP-Signalweges beeinflussen sich gegenseitig

BMP-Modulatoren haben die Funktion, die Verfügbarkeit und Rezeptorbindung von BMPs positiv oder negativ zu beeinflussen¹⁰². BMPER kann durch eine direkte Bindung mit BMPs interagieren und ihre Funktion modulieren¹⁰⁸. Für BMPER wurde ein dualer Einfluss auf die BMPs beschrieben, wonach BMPER sowohl als Antagonist als auch als Agonist auf die BMP-Aktivität wirkt^{114,143}. Demnach zeigte die Stimulation mit BMPER eine antagonistische Wirkung auf die BMP-Aktivität^{108,144} und umgekehrt

wurde bei einer Defizienz von BMPER dieser als BMP-Agonist charakterisiert^{116-118,145,146}. Außerdem konnte für BMPER eine konzentrationsabhängige Wirkung auf BMP4 festgestellt werden^{113,114,147}. Bereits Untersuchungen von SERPE et al. (2008) ergaben, dass die Wirkung von BMPER auf BMPs konzentrationsabhängig agonistisch oder antagonistisch ist¹¹⁴. KELLEY et al. (2009) zeigten anschließend, dass BMPER dabei so lange als BMP4-Aktivator fungiert, bis die BMPER-Konzentration die von BMP4 überschreitet und BMPER eine inhibitorische Wirkung auf das BMP4-Signal annimmt¹¹³. Basierend auf diesem Wissen, sollte das Zusammenspiel der Mitglieder des BMP-Signalweges im Hinterbeinischämie-Modell untersucht werden.

In der Tat war die Expression von BMP4 nach 14 Tagen – und noch deutlicher nach 7 Tagen – im operierten Bein von BMPER^{+/-}-Mäusen im Vergleich zu dem operierten Bein von Wildtyp-Kontrollmäusen sichtbar vermindert (siehe 4.2.2 und 4.2.3). Umgekehrt war in BMP4^{ΔSMC}-Mäusen die Expression von BMPER im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen reduziert (siehe 4.4.3). Diese Ergebnisse unterstützen die bisherigen Beobachtungen, dass BMPER und BMP4 sich gegenseitig beeinflussen. In Übereinstimmung mit den hier erhobenen Daten konnten HEINKE et al. in Endothelzellen zeigen, dass die BMPER-Defizienz die pro-angiogene BMP4-Aktivität beeinträchtigt und umgekehrt die BMP4-Defizienz die von BMPER¹¹⁸. Demgegenüber waren nach der Gabe von rekombinantem BMPER-Protein zwischen behandelten und nicht behandelten Mäusen keine Unterschiede in der Expression von BMP4 im Hinterbeinischämie-Modell zu beobachten (siehe 4.3.2).

Zusammenfassend entsprechen diese Ergebnisse den zuvor genannten Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, dass BMPER eine duale Wirkung auf die Aktivität und Expression von BMPs hat, je nachdem ob eine BMPER-Defizienz vorliegt oder eine Stimulation mittels rekombinantem BMPER-Protein.

Ein weiterer BMP-Modulator ist Tsg. Genau wie BMPER wurde Tsg je nach untersuchter Tierart und Gewebe ebenfalls sowohl als BMP-Agonist^{107,148-151} als auch als BMP-Antagonist^{149,152-154} charakterisiert. BMP4^{iASMC}-Mäuse zeigten im Hinterbeinischämie-Modell eine vergleichsweise deutlich verminderte Expression von Tsg, was auf eine positive Wechselwirkung zwischen diesen beiden Mitgliedern des BMP-Signalweges hindeutet (siehe 4.4.3). Des Weiteren ist bekannt, dass die BMP-Modulatoren BMPER und Tsg miteinander interagieren und gegenseitig ihre Aktivität und Wirkung beeinflussen^{139,152,155-157}. Im Hinterbeinischämie-Modell zeigten BMPER^{+/-}-Mäuse eine vergleichsweise verminderte Tsg-Expression (siehe 4.2.2 und 4.2.3). Die Interaktion von Tsg und BMPER konnten auch IKEYA et al. (2010) in der frühen embryonalen Entwicklung beobachten, wonach die Funktion von Tsg ebenfalls die Anwesenheit von BMPER erfordert¹⁵⁶.

Dieses enge Zusammenspiel der Mitglieder des BMP-Signalweges spiegelte sich ebenfalls in ihrer pro-angiogenen Aktivität und Fähigkeit zur Induktion der Arteriogenese nach Hinterbeinischämie wider. Wenn bei einer Defizienz eines der Mitglieder des BMP-Signalweges eine starke Regulation der RNA-Expression der weiteren Mitglieder vorlag, waren allgemein stärkere Effekte sowohl in den Laser-Doppler-Messungen als auch in der histologischen Analyse und der Expression der Marker von glatten Muskelzellen in den RNA-Analysen zu beobachten

5.4 Ausblick

Um das Voranschreiten der PAVK und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen zu reduzieren, könnten die protektiven Eigenschaften von BMPER und BMP4 von großem Nutzen sein, da es sich dabei um extrazelluläre Proteine handelt, die in Form rekombinanter Proteine von außen zugeführt werden können.

Da C57BL6/N-Mäuse, die mit rekombinantem BMPER-Protein behandelt wurden, 14 Tage nach Hinterbeinischämie in den Laser-Doppler-Messungen und RNA-Analysen keine Unterschiede zu unbehandelten Mäusen aufwiesen,

wäre es zusätzlich zu der ausstehenden Auswertung der histologischen Daten dieser Mäuse sinnvoll, diesen Versuch mit unterschiedlichen Konzentrationen der applizierten Menge rekombinanten BMPER-Proteins zu wiederholen. Des Weiteren könnte im Hinblick auf die therapeutische Wirkung ein sog. *Rescue*-Versuch bei BMPER^{+/-}-Mäusen eindeutigere Ergebnisse der protektiven Eigenschaften von BMPER zeigen. Zur weiteren Untersuchung der Auswirkung der BMPER-Defizienz auf die Arteriogenese und Angiogenese würde die Durchführung des Hinterbeinischämie-Modells bei BMPER^{-/-}-Mäusen oder bei in glatten Muskelzellen BMPER-defizienten Mäusen vermutlich stärkere Effekte zeigen als bei den BMPER^{+/-}-Mäusen.

Aufgrund der Ergebnisse des Hinterbeinischämie-Modells bei BMP4^{iΔSMC}-Mäusen, die klare Tendenzen der Notwendigkeit von BMP4 für die Gefäßregeneration und Neovaskularisation zeigten, wäre der Umkehrversuch mittels Applikation von rekombinantem BMP4-Protein ein wichtiger nächster Schritt, um die protektiven Eigenschaften von BMP4 in diesem Modell zu untersuchen.

Um die Auswirkung der Beeinträchtigung des kompletten BMP-Signalweges und nicht nur einzelner Mitglieder zu untersuchen, besteht weiter die Möglichkeit den synthetischen BMP-Antagonisten Dorsomorphin Homolog 1 (DMH1) C57BL/6N-Mäusen zu applizieren. Dieses hemmt den BMP-Signalweg hauptsächlich durch die Blockierung des BMPRI.

Für die Vervollständigung der in HAOSMCs gewonnenen *In-vitro*-Daten, müsste zum einen mittels siRNA die Auswirkung des Fehlens von BMP4 auf den Phänotyp von HAOSMCs untersucht werden. Zum anderen müsste die Stimulation mit rekombinantem BMPER-Protein und BMP4 mit anderen Konzentrationen und mit Änderung der Dauer der Stimulation wiederholt werden, um die protektiven Eigenschaften von BMPER und BMP4 auf den Phänotyp von HAOSMCs zu ermitteln.

Zusätzlich bilden Thrombospondin-1 und Cadherin-13, die beide nach Stimulation von HAOSMCs mit rekombinantem BMPER-Protein im Proteome-Array reguliert wurden, Anhaltspunkte einer möglichen Regulation neuer Signalwege.

Einen weiteren wichtigen Punkt stellt die Verbesserung der Isolation glatter Muskelzellen aus murinen Aorten dar. Zwar konnte eine deutlich reduzierte Expression von BMP4 in isolierten vSMCs aus Aorten von BMP4^{iΔSMC}-Mäusen festgestellt werden, dennoch ist unter Annahme, dass die Tamoxifeninduktion optimal funktioniert, davon auszugehen, dass es sich bei den isolierten Zellen nicht ausschließlich um SMCs handelte.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen arterieller Gefäßerkrankungen wie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) verlieren vaskuläre glatte Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMCs) ihren kontraktilen Phänotyp und nehmen einen synthetisierenden Phänotyp an, der durch eine erhöhte Migrations- und Proliferationsrate der Zellen gekennzeichnet ist. Die „Bone morphogenetic proteins“ (BMPs) sind wichtige extrazelluläre Proteine, von denen einige die Expression kontraktiler Marker induzieren. Ein Mitglied der BMP-Familie ist „Bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator“ (BMPER), ein extrazelluläres Matrixprotein, das u. a. mit BMP4 durch eine direkte Bindung interagiert und eine konzentrationsabhängige Wirkung ausübt. Aufgrund vorläufiger Daten, die zeigten, dass BMPER in vSMCs *in vitro* und *in vivo* nachweisbar ist, war das Ziel dieser Arbeit, die Funktion und Genexpressionsregulation von BMPER und BMP4 zum ersten Mal im Hinterbeinischämie-Modell in der Maus sowie die Folgen ihres Fehlens auf die Arteriogenese und Angiogenese zu analysieren.

Dabei hatte die Defizienz von BMPER und BMP4 *in vivo* eine reduzierte Arterio- und Angiogenese zur Folge und zeigte insbesondere bei der BMP4-Defizienz eine langsamere Reperfusion nach Hinterbeinischämie. Zudem äußerte sich das Fehlen von BMPER oder BMP4 in der Beeinträchtigung des BMP-Signalweges. Entsprechend verloren beim Fehlen von BMPER humane aortale glatte Muskelzellen *in vitro* ihre kontraktilen Eigenschaften und nahmen einen synthetisierenden Phänotyp an.

Zusammenfassend kann anhand dieser Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass BMPER und BMP4 im Hinterbeinischämie-Modell für die Gefäßregeneration und Neovaskularisation und für den Erhalt der kontraktilen Eigenschaften der Gefäße wichtig sind. Diese Erkenntnisse zusammen mit dem bisherigen Wissen geben BMP4 und BMPER eine

bedeutende Rolle für die Vorbeugung und Entwicklung neuer
Therapiemöglichkeiten für die PAVK und weiterer kardiovaskulärer
Erkrankungen.

7 Summary

In arterial vascular diseases such as peripheral arterial disease (PAD), vascular smooth muscle cells (vSMCs) switch from a contractile to a synthetic phenotype which is marked by an increased migration and proliferation of these cells. Bone morphogenetic proteins (BMPs) are extracellular proteins, some of which induce the expression of contractile markers. One member of the BMP-family is bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER), an extracellular matrix protein which *inter alia* interacts directly with BMP4 in a concentration-dependent manner. Based on preliminary data showing that BMPER is expressed *in vitro* and *in vivo* in vSMCs, the aim of this work was to investigate BMPER and BMP4 function and regulation for the first time in the hindlimb ischemia model in mice and to analyse the consequences of their deficiency for arteriogenesis and angiogenesis.

BMPER and BMP4 deficiency *in vivo* resulted in reduced arteriogenesis and angiogenesis and showed, especially in the case of BMP4-deficiency, a slower reperfusion after hindlimb ischemia. Furthermore, a lack of BMPER or BMP4 manifests itself by an impaired BMP signaling pathway. Accordingly, in the absence of BMPER, human aortic smooth muscle cells lost their contractile characteristics *in vitro* and switched from their contractile phenotype to a synthetic phenotype.

Taken together, these results indicate that BMPER and BMP4 are important in vascular regeneration and neovascularization in the hindlimb ischemia model and preserve the contractile characteristics of blood vessels. These findings together with the current knowledge suggest that BMP4 and BMPER might be interesting candidates for the development of new therapeutic strategies for PAD and other cardiovascular diseases.

8 Literaturverzeichnis

- 1 World Health Organization. *Cardiovascular Diseases (CVDs)*, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>> (Accessed 16 May 2017).
- 2 Rassow, J., Deutzmann, R., Netzker, R. & Hauser, K. *Biochemie*. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. edn, (Thieme, 2012).
- 3 Arastéh, K., Baenkler, H. W., Bieber, C., Brandt, R. & Chatterjee, T. *Innere Medizin*. 3., überarb. Aufl. edn, (Thieme, 2013).
- 4 Silbernagl, S. & Lang, F. *Taschenatlas Pathophysiologie*. 4., aktualisierte und erw. Aufl. edn, (Thieme, 2013).
- 5 Meurer, D. G. & Wolf, S. *Allgemeine Pathologie : Kompendium für die Veterinärmedizin*. 2., neu bearb. und erw. Aufl. edn, (Schattauer, 2006).
- 6 Suter, P. F., Arnold-Gloor, S. & Niemand, H. G. *Praktikum der Hundeklinik*. 10., komplett überarb. und erw. Aufl. edn, (Parey, 2006).
- 7 Zandvliet, M. M., Stokhof, A. A., Boroffka, S. & van den Ingh, T. S. Intermittent claudication in an Afghan hound due to aortic arteriosclerosis. *J Vet Intern Med* **19**, 259-261 (2005).
- 8 Skatulla, L. *Über die Induktion und Progression der Atherosklerose durch Cholesterin in verschiedenen Gefäßregionen weißer Neuseeland Kaninchen : ihre Beeinflussung durch Proteinzusätze und Veränderungen des Futterregimes*. (Heidelberg, Univ., Diss., 1999).
- 9 Nikolova, A. *Aussagefähigkeit der Magnetresonanztomographie mit superparamagnetischen Eisenoxid (SPIO) von atherosklerotischen Wandläsionen beim Kaninchen*. (Berlin, Freie Univ., Diss., 2003).
- 10 Stehbens, W. *Atherosclerosis and degenerative disease of blood vessels*. In: *Vascular Pathology*. 175-268 edn, (Chapman & Hall, 1995).
- 11 De Wit, M. & Schiemaker, N. J. Clinical approach to avian cardiac disease. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **14**, 6-13, doi:10.1053/j.saep.2005.12.004 (2005).
- 12 Augustin, H. G. Tubes, branches, and pillars: the many ways of forming a new vasculature. *Circ Res* **89**, 645-647 (2001).
- 13 Laubach, E. *Medizin im 21. Jahrhundert: Molekulare Medizin, Mikrotherapie und High-Tech-Operationen*. (Springer, 2002).
- 14 Pschyrembel, W. & Pschyrembel-Redaktion. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 266. , aktualisierte Aufl. edn, (De Gruyter, 2014).
- 15 Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298-307, doi:10.1038/nature10144 (2011).
- 16 Djonov, V., Schmid, M., Tschanz, S. A. & Burri, P. H. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res* **86**, 286-292 (2000).
- 17 Rogers, P. A., Lederman, F. & Taylor, N. Endometrial microvascular growth in normal and dysfunctional states. *Hum Reprod Update* **4**, 503-508 (1998).

- 18 De Spiegelaere, W. *et al.* Expression and localization of angiogenic growth factors in developing porcine mesonephric glomeruli. *J Histochem Cytochem* **58**, 1045-1056, doi:10.1369/jhc.2010.956557 (2010).
- 19 De Spiegelaere, W., Cornillie, P., Casteleyn, C., Burvenich, C. & Van den Broeck, W. Detection of hypoxia inducible factors and angiogenic growth factors during foetal endochondral and intramembranous ossification. *Anat Histol Embryol* **39**, 376-384, doi:10.1111/j.1439-0264.2010.01005.x (2010).
- 20 Egginton, S., Zhou, A. L., Brown, M. D. & Hudlicka, O. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc Res* **49**, 634-646 (2001).
- 21 De Spiegelaere, W. *et al.* Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *J Vasc Res* **49**, 390-404, doi:10.1159/000338278 (2012).
- 22 Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K. & Paavonen, K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* **65**, 550-563, doi:10.1016/j.cardiores.2004.12.002 (2005).
- 23 Grundmann, S., Piek, J. J., Pasterkamp, G. & Hoefer, I. E. Arteriogenesis: basic mechanisms and therapeutic stimulation. *Eur J Clin Invest* **37**, 755-766, doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01861.x (2007).
- 24 Deindl, E. *et al.* Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res* **89**, 779-786 (2001).
- 25 Pipp, F. *et al.* Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1664-1668, doi:10.1161/01.ATV.0000138028.14390.e4 (2004).
- 26 Heil, M., Eitenmuller, I., Schmitz-Rixen, T. & Schaper, W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med* **10**, 45-55 (2006).
- 27 Limbourg, A. *et al.* Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* **4**, 1737-1746, doi:10.1038/nprot.2009.185 (2009).
- 28 Schaper, W. Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol* **104**, 5-21, doi:10.1007/s00395-008-0760-x (2009).
- 29 Buschmann, I. & Schaper, W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci* **14**, 121-125 (1999).
- 30 Schaper, W. & Scholz, D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1143-1151, doi:10.1161/01.ATV.0000069625.11230.96 (2003).
- 31 Scholz, D. *et al.* Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 775-787 (2002).
- 32 Westvik, T. S. *et al.* Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis. *J Vasc Surg* **49**, 464-473, doi:10.1016/j.jvs.2008.08.077 (2009).

- 33 König, H. E. & Liebich, H. G. *Anatomie der Haussäugetiere - Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. 3., überarb. und erw. Aufl. edn, (Schattauer, 2004).
- 34 Lüllmann-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 4., vollst. überarb. Aufl. edn, (Thieme, 2012).
- 35 Majesky, M. W. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1248-1258, doi:10.1161/ATVBAHA.107.141069 (2007).
- 36 Wang, G., Jacquet, L., Karamariti, E. & Xu, Q. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Physiol* **593**, 3013-3030, doi:10.1113/JP270033 (2015).
- 37 Yoshida, T. & Owens, G. K. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ Res* **96**, 280-291, doi:10.1161/01.RES.0000155951.62152.2e (2005).
- 38 Bennett, M. R., Sinha, S. & Owens, G. K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 692-702, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306361 (2016).
- 39 Leonhardt, H. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. 8., überarb. und erw. Aufl. edn, Vol. Band 3 (Thieme, 1990).
- 40 Hick, C. & Hick, A. *Intensivkurs Physiologie*. 6., überarb. Aufl., Sonderausg. edn, (Elsevier, Urban & Fischer, 2012).
- 41 Chamley-Campbell, J., Campbell, G. R. & Ross, R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* **59**, 1-61 (1979).
- 42 Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**, 767-801, doi:10.1152/physrev.00041.2003 (2004).
- 43 Perry, R. L. & Rudnick, M. A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* **5**, D750-767 (2000).
- 44 Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* **75**, 487-517 (1995).
- 45 Poole, J. C., Cromwell, S. B. & Benditt, E. P. Behavior of smooth muscle cells and formation of extracellular structures in the reaction of arterial walls to injury. *Am J Pathol* **62**, 391-414 (1971).
- 46 Shanahan, C. M. & Weissberg, P. L. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 333-338 (1998).
- 47 Halayko, A. J. & Solway, J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. *J Appl Physiol (1985)* **90**, 358-368 (2001).
- 48 Davis-Dusenbery, B. N., Wu, C. & Hata, A. Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 2370-2377, doi:10.1161/ATVBAHA.111.226670 (2011).
- 49 Sainz, J. *et al.* Isolation of "side population" progenitor cells from healthy arteries of adult mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 281-286, doi:10.1161/01.ATV.0000197793.83391.91 (2006).

- 50 Hu, Y. *et al.* Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* **113**, 1258-1265, doi:10.1172/JCI19628 (2004).
- 51 Hirschi, K. K. & Majesky, M. W. Smooth muscle stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **276**, 22-33, doi:10.1002/ar.a.10128 (2004).
- 52 Rensen, S. S., Doevendans, P. A. & van Eys, G. J. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* **15**, 100-108 (2007).
- 53 Sasaguri, Y. *et al.* Development-related changes in matrix metalloproteinase expression in human aortic smooth muscle cells. *Lab Invest* **71**, 261-269 (1994).
- 54 Sartore, S. *et al.* Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* **89**, 1111-1121 (2001).
- 55 Skalli, O. *et al.* Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. *Lab Invest* **60**, 275-285 (1989).
- 56 Arciniegas, E., Sutton, A. B., Allen, T. D. & Schor, A. M. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* **103 (Pt 2)**, 521-529 (1992).
- 57 Miano, J. M., Long, X. & Fujiwara, K. Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C70-81, doi:10.1152/ajpcell.00386.2006 (2007).
- 58 Wang, D. *et al.* Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* **105**, 851-862 (2001).
- 59 Yoshida, T. *et al.* Myocardin is a key regulator of CArG-dependent transcription of multiple smooth muscle marker genes. *Circ Res* **92**, 856-864, doi:10.1161/01.RES.0000068405.49081.09 (2003).
- 60 Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
- 61 Cheng, Y. *et al.* MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* **105**, 158-166, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.197517 (2009).
- 62 Cordes, K. R. *et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* **460**, 705-710, doi:10.1038/nature08195 (2009).
- 63 Elia, L. *et al.* The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ* **16**, 1590-1598, doi:10.1038/cdd.2009.153 (2009).
- 64 Norata, G. D. *et al.* MicroRNA 143-145 deficiency impairs vascular function. *Int J Immunopathol Pharmacol* **25**, 467-474, doi:10.1177/039463201202500216 (2012).
- 65 Cao, J., Zhang, K., Zheng, J. & Dong, R. MicroRNA-146a and -21 cooperate to regulate vascular smooth muscle cell proliferation via modulation of

- the Notch signaling pathway. *Mol Med Rep* **11**, 2889-2895, doi:10.3892/mmr.2014.3107 (2015).
- 66 Dong, S. *et al.* MiRNA-146a regulates the maturation and differentiation of vascular smooth muscle cells by targeting NF-kappaB expression. *Mol Med Rep* **8**, 407-412, doi:10.3892/mmr.2013.1538 (2013).
- 67 Urist, M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**, 893-899 (1965).
- 68 Hiepen, C., Yadin, D., Rikeit, P., Dorpholz, G. & Knaus, P. Actions from head to toe: An update on Bone/Body Morphogenetic Proteins in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **27**, 1-11, doi:10.1016/j.cytogfr.2015.12.006 (2016).
- 69 Wagner, D. O. *et al.* BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal* **3**, mr1, doi:10.1126/scisignal.3107mr1 (2010).
- 70 Upton, P. D., Davies, R. J., Tajsic, T. & Morrell, N. W. Transforming growth factor-beta(1) represses bone morphogenetic protein-mediated Smad signaling in pulmonary artery smooth muscle cells via Smad3. *Am J Respir Cell Mol Biol* **49**, 1135-1145, doi:10.1165/rcmb.2012-0470OC (2013).
- 71 Ankeny, R. F. *et al.* Preferential activation of SMAD1/5/8 on the fibrosa endothelium in calcified human aortic valves--association with low BMP antagonists and SMAD6. *PLoS One* **6**, e20969, doi:10.1371/journal.pone.0020969 (2011).
- 72 Cai, J., Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G. & ten Dijke, P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett* **586**, 1993-2002, doi:10.1016/j.febslet.2012.04.030 (2012).
- 73 Jones, J. A. *et al.* Altered transforming growth factor-beta signaling in a murine model of thoracic aortic aneurysm. *J Vasc Res* **45**, 457-468, doi:10.1159/000127437 (2008).
- 74 Garcia de Vinuesa, A., Abdelilah-Seyfried, S., Knaus, P., Zwijsen, A. & Bailly, S. BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine Growth Factor Rev* **27**, 65-79, doi:10.1016/j.cytogfr.2015.12.005 (2016).
- 75 Bostrom, K. *et al.* Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **91**, 1800-1809, doi:10.1172/JCI116391 (1993).
- 76 Fukuda, N., Saitoh, M., Kobayashi, N. & Miyazono, K. Execution of BMP-4-induced apoptosis by p53-dependent ER dysfunction in myeloma and B-cell hybridoma cells. *Oncogene* **25**, 3509-3517, doi:10.1038/sj.onc.1209393 (2006).
- 77 Davis, H., Raja, E., Miyazono, K., Tsubakihara, Y. & Moustakas, A. Mechanisms of action of bone morphogenetic proteins in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **27**, 81-92, doi:10.1016/j.cytogfr.2015.11.009 (2016).
- 78 Celeste, A. J. *et al.* Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9843-9847 (1990).

- 79 Chan, M. C. *et al.* Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGFbeta family of signalling pathways by control of miR-24 expression. *EMBO J* **29**, 559-573, doi:10.1038/emboj.2009.370 (2010).
- 80 Lagna, G. *et al.* Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors. *J Biol Chem* **282**, 37244-37255, doi:10.1074/jbc.M708137200 (2007).
- 81 ten Dijke, P. & Arthur, H. M. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 857-869, doi:10.1038/nrm2262 (2007).
- 82 Csiszar, A. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *Am J Pathol* **168**, 629-638, doi:10.2353/ajpath.2006.050284 (2006).
- 83 Csiszar, A., Labinsky, N., Jo, H., Ballabh, P. & Ungvari, Z. Differential proinflammatory and prooxidant effects of bone morphogenetic protein-4 in coronary and pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H569-577, doi:10.1152/ajpheart.00180.2008 (2008).
- 84 Kang, H. *et al.* Bone morphogenetic protein 4 promotes vascular smooth muscle contractility by activating microRNA-21 (miR-21), which down-regulates expression of family of dedicator of cytokinesis (DOCK) proteins. *J Biol Chem* **287**, 3976-3986, doi:10.1074/jbc.M111.303156 (2012).
- 85 Kim, S., Hata, A. & Kang, H. Down-regulation of miR-96 by bone morphogenetic protein signaling is critical for vascular smooth muscle cell phenotype modulation. *J Cell Biochem* **115**, 889-895, doi:10.1002/jcb.24730 (2014).
- 86 Lagna, G., Nguyen, P. H., Ni, W. & Hata, A. BMP-dependent activation of caspase-9 and caspase-8 mediates apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L1059-1067, doi:10.1152/ajplung.00180.2006 (2006).
- 87 Zhang, S. *et al.* Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**, L740-754, doi:10.1152/ajplung.00284.2002 (2003).
- 88 King, K. E., Iyemere, V. P., Weissberg, P. L. & Shanahan, C. M. Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor beta 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem* **278**, 11661-11669, doi:10.1074/jbc.M211337200 (2003).
- 89 Dorai, H., Vukicevic, S. & Sampath, T. K. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1) inhibits smooth muscle cell proliferation and stimulates the expression of markers that are characteristic of SMC phenotype in vitro. *J Cell Physiol* **184**, 37-45, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200007)184:1<37::AID-JCP4>3.0.CO;2-M (2000).
- 90 Morrell, N. W. *et al.* Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation* **104**, 790-795 (2001).

- 91 Nakaoka, T. *et al.* Inhibition of rat vascular smooth muscle proliferation in vitro and in vivo by bone morphogenetic protein-2. *J Clin Invest* **100**, 2824-2832, doi:10.1172/JCI119830 (1997).
- 92 Wong, G. A., Tang, V., El-Sabeawy, F. & Weiss, R. H. BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E972-979, doi:10.1152/ajpendo.00385.2002 (2003).
- 93 Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A. & Hogan, B. L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* **9**, 2105-2116 (1995).
- 94 Wang, G. J., Brenner-Anantharam, A., Vaughan, E. D. & Herzlinger, D. Antagonism of BMP4 signaling disrupts smooth muscle investment of the ureter and ureteropelvic junction. *J Urol* **181**, 401-407, doi:10.1016/j.juro.2008.08.117 (2009).
- 95 Sedlacek, H. *Immunologie - die Immunabwehr des Menschen: Schutz, Gefahren, Erkrankungen*. 2. Aufl. edn, (De Gruyter, 2014).
- 96 Farber, H. W. & Loscalzo, J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* **351**, 1655-1665, doi:10.1056/NEJMra035488 (2004).
- 97 Deng, Z. *et al.* Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* **67**, 737-744, doi:10.1086/303059 (2000).
- 98 International, P. P. H. C. *et al.* Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet* **26**, 81-84, doi:10.1038/79226 (2000).
- 99 Moser, M. & Patterson, C. Bone morphogenetic proteins and vascular differentiation: BMPing up vasculogenesis. *Thromb Haemost* **94**, 713-718, doi:10.1160/TH05-05-0312 (2005).
- 100 Schmierer, B. & Hill, C. S. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 970-982, doi:10.1038/nrm2297 (2007).
- 101 Morrell, N. W. *et al.* Targeting BMP signalling in cardiovascular disease and anaemia. *Nat Rev Cardiol* **13**, 106-120, doi:10.1038/nrcardio.2015.156 (2016).
- 102 Balemans, W. & Van Hul, W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* **250**, 231-250 (2002).
- 103 Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B. & De Robertis, E. M. Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* **86**, 589-598 (1996).
- 104 Stabile, H. *et al.* Bone morphogenic protein antagonist Drm/gremlin is a novel proangiogenic factor. *Blood* **109**, 1834-1840, doi:10.1182/blood-2006-06-032276 (2007).
- 105 Smith, W. C. & Harland, R. M. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos. *Cell* **70**, 829-840 (1992).
- 106 Sudo, S., Avsian-Kretchmer, O., Wang, L. S. & Hsueh, A. J. Protein related to DAN and cerberus is a bone morphogenetic protein antagonist that

- participates in ovarian paracrine regulation. *J Biol Chem* **279**, 23134-23141, doi:10.1074/jbc.M402376200 (2004).
- 107 Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D. & De Robertis, E. M. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* **405**, 757-763, doi:10.1038/35015500 (2000).
- 108 Moser, M. *et al.* BMPER, a novel endothelial cell precursor-derived protein, antagonizes bone morphogenetic protein signaling and endothelial cell differentiation. *Mol Cell Biol* **23**, 5664-5679 (2003).
- 109 Esser, J. S. *et al.* Bone morphogenetic protein 4 regulates microRNAs miR-494 and miR-126-5p in control of endothelial cell function in angiogenesis. *Thromb Haemost* **117**, 734-749, doi:10.1160/TH16-08-0643 (2017).
- 110 Heinke, J. *et al.* Bone morphogenetic protein modulator BMPER is highly expressed in malignant tumors and controls invasive cell behavior. *Oncogene* **31**, 2919-2930, doi:10.1038/onc.2011.473 (2012).
- 111 Helbing, T. *et al.* BMPER is upregulated by statins and modulates endothelial inflammation by intercellular adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 554-560, doi:10.1161/ATVBAHA.109.201087 (2010).
- 112 Helbing, T. *et al.* BMP activity controlled by BMPER regulates the proinflammatory phenotype of endothelium. *Blood* **118**, 5040-5049, doi:10.1182/blood-2011-03-339762 (2011).
- 113 Kelley, R. *et al.* A concentration-dependent endocytic trap and sink mechanism converts Bmper from an activator to an inhibitor of Bmp signaling. *J Cell Biol* **184**, 597-609, doi:10.1083/jcb.200808064 (2009).
- 114 Serpe, M. *et al.* The BMP-binding protein Crossveinless 2 is a short-range, concentration-dependent, biphasic modulator of BMP signaling in *Drosophila*. *Dev Cell* **14**, 940-953, doi:10.1016/j.devcel.2008.03.023 (2008).
- 115 Yao, Y. *et al.* Crossveinless 2 regulates bone morphogenetic protein 9 in human and mouse vascular endothelium. *Blood* **119**, 5037-5047, doi:10.1182/blood-2011-10-385906 (2012).
- 116 Ikeya, M. *et al.* Essential pro-Bmp roles of crossveinless 2 in mouse organogenesis. *Development* **133**, 4463-4473, doi:10.1242/dev.02647 (2006).
- 117 Moser, M., Yu, Q., Bode, C., Xiong, J. W. & Patterson, C. BMPER is a conserved regulator of hematopoietic and vascular development in zebrafish. *J Mol Cell Cardiol* **43**, 243-253, doi:10.1016/j.yjmcc.2007.05.008 (2007).
- 118 Heinke, J. *et al.* BMPER is an endothelial cell regulator and controls bone morphogenetic protein-4-dependent angiogenesis. *Circ Res* **103**, 804-812, doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.178434 (2008).
- 119 Hellingman, A. A. *et al.* Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **40**, 796-803, doi:10.1016/j.ejvs.2010.07.009 (2010).

- 120 Helisch, A. *et al.* Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 520-526, doi:10.1161/01.ATV.0000202677.55012.a0 (2006).
- 121 Lotfi, S. *et al.* Towards a more relevant hind limb model of muscle ischaemia. *Atherosclerosis* **227**, 1-8, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.060 (2013).
- 122 Friedel, R. H., Wurst, W., Wefers, B. & Kuhn, R. Generating conditional knockout mice. *Methods Mol Biol* **693**, 205-231, doi:10.1007/978-1-60761-974-1_12 (2011).
- 123 Ray, J. L., Leach, R., Herbert, J. M. & Benson, M. Isolation of vascular smooth muscle cells from a single murine aorta. *Methods Cell Sci* **23**, 185-188 (2001).
- 124 Thermo Fisher Scientific Applied Biosystems. *TaqMan® Small RNA Assays*, <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042167.pdf> (Accessed 12 june 2017).
- 125 Grundmann, S. *et al.* MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation* **123**, 999-1009, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.000323 (2011).
- 126 Ivanov, D. *et al.* Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. *Histochem Cell Biol* **115**, 231-242 (2001).
- 127 Majack, R. A., Cook, S. C. & Bornstein, P. Platelet-derived growth factor and heparin-like glycosaminoglycans regulate thrombospondin synthesis and deposition in the matrix by smooth muscle cells. *J Cell Biol* **101**, 1059-1070 (1985).
- 128 Majack, R. A., Mildbrandt, J. & Dixit, V. M. Induction of thrombospondin messenger RNA levels occurs as an immediate primary response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* **262**, 8821-8825 (1987).
- 129 Raugi, G. J., Mumby, S. M., Abbott-Brown, D. & Bornstein, P. Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture. *J Cell Biol* **95**, 351-354 (1982).
- 130 Majack, R. A., Cook, S. C. & Bornstein, P. Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: autocrine role for thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9050-9054 (1986).
- 131 Majack, R. A., Goodman, L. V. & Dixit, V. M. Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Biol* **106**, 415-422 (1988).
- 132 Patel, M. K., Lymn, J. S., Clunn, G. F. & Hughes, A. D. Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 2107-2114 (1997).
- 133 Yabkowitz, R., Mansfield, P. J., Ryan, U. S. & Suchard, S. J. Thrombospondin mediates migration and potentiates platelet-derived growth factor-dependent migration of calf pulmonary artery smooth muscle cells. *J Cell Physiol* **157**, 24-32, doi:10.1002/jcp.1041570104 (1993).

- 134 Eickelberg, O. & Morty, R. E. Transforming growth factor beta/bone morphogenic protein signaling in pulmonary arterial hypertension: remodeling revisited. *Trends Cardiovasc Med* **17**, 263-269, doi:10.1016/j.tcm.2007.09.003 (2007).
- 135 Sun, B. *et al.* Bone morphogenetic protein-4 mediates cardiac hypertrophy, apoptosis, and fibrosis in experimentally pathological cardiac hypertrophy. *Hypertension* **61**, 352-360, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00562 (2013).
- 136 Corriere, M. A. *et al.* Endothelial Bmp4 is induced during arterial remodeling: effects on smooth muscle cell migration and proliferation. *J Surg Res* **145**, 142-149, doi:10.1016/j.jss.2007.03.077 (2008).
- 137 Pachori, A. S. *et al.* Bone morphogenetic protein 4 mediates myocardial ischemic injury through JNK-dependent signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 1255-1265, doi:10.1016/j.yjmcc.2010.01.010 (2010).
- 138 Ogura, Y. *et al.* Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models. *Circulation* **126**, 1728-1738, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115089 (2012).
- 139 Zakin, L., Metzinger, C. A., Chang, E. Y., Coffinier, C. & De Robertis, E. M. Development of the vertebral morphogenetic field in the mouse: interactions between Crossveinless-2 and Twisted Gastrulation. *Dev Biol* **323**, 6-18, doi:10.1016/j.ydbio.2008.08.019 (2008).
- 140 Willis, M. S. *et al.* BMPER regulates cardiomyocyte size and vessel density in vivo. *Cardiovasc Pathol* **22**, 228-240, doi:10.1016/j.carpath.2012.10.005 (2013).
- 141 Sun, S. G. *et al.* miR-146a and Kruppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation. *EMBO Rep* **12**, 56-62, doi:10.1038/embor.2010.172 (2011).
- 142 Hayashi, K., Nakamura, S., Nishida, W. & Sobue, K. Bone morphogenetic protein-induced MSX1 and MSX2 inhibit myocardin-dependent smooth muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* **26**, 9456-9470, doi:10.1128/MCB.00759-06 (2006).
- 143 Kamimura, M., Matsumoto, K., Koshiba-Takeuchi, K. & Ogura, T. Vertebrate crossveinless 2 is secreted and acts as an extracellular modulator of the BMP signaling cascade. *Dev Dyn* **230**, 434-445, doi:10.1002/dvdy.20069 (2004).
- 144 Binnerts, M. E. *et al.* Human Crossveinless-2 is a novel inhibitor of bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 272-280, doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.048 (2004).
- 145 Conley, C. A. *et al.* Crossveinless 2 contains cysteine-rich domains and is required for high levels of BMP-like activity during the formation of the cross veins in *Drosophila*. *Development* **127**, 3947-3959 (2000).
- 146 Rentzsch, F., Zhang, J., Kramer, C., Sebald, W. & Hammerschmidt, M. Crossveinless 2 is an essential positive feedback regulator of Bmp signaling during zebrafish gastrulation. *Development* **133**, 801-811, doi:10.1242/dev.02250 (2006).

-
- 147 Dyer, L., Wu, Y., Moser, M. & Patterson, C. BMPER-induced BMP signaling promotes coronary artery remodeling. *Dev Biol* **386**, 385-394, doi:10.1016/j.ydbio.2013.12.019 (2014).
- 148 Little, S. C. & Mullins, M. C. Twisted gastrulation promotes BMP signaling in zebrafish dorsal-ventral axial patterning. *Development* **131**, 5825-5835, doi:10.1242/dev.01464 (2004).
- 149 Nosaka, T. *et al.* Mammalian twisted gastrulation is essential for skeleto-lymphogenesis. *Mol Cell Biol* **23**, 2969-2980 (2003).
- 150 Xie, J. & Fisher, S. Twisted gastrulation enhances BMP signaling through chordin dependent and independent mechanisms. *Development* **132**, 383-391, doi:10.1242/dev.01577 (2005).
- 151 Zakin, L. & De Robertis, E. M. Inactivation of mouse Twisted gastrulation reveals its role in promoting Bmp4 activity during forebrain development. *Development* **131**, 413-424, doi:10.1242/dev.00946 (2004).
- 152 Chang, C. *et al.* Twisted gastrulation can function as a BMP antagonist. *Nature* **410**, 483-487, doi:10.1038/35068583 (2001).
- 153 Ross, J. J. *et al.* Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature* **410**, 479-483, doi:10.1038/35068578 (2001).
- 154 Scott, I. C. *et al.* Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling. *Nature* **410**, 475-478, doi:10.1038/35068572 (2001).
- 155 Heinke, J. *et al.* Antagonism and synergy between extracellular BMP modulators Tsg and BMPER balance blood vessel formation. *J Cell Sci* **126**, 3082-3094, doi:10.1242/jcs.122333 (2013).
- 156 Ikeya, M. *et al.* Cv2, functioning as a pro-BMP factor via twisted gastrulation, is required for early development of nephron precursors. *Dev Biol* **337**, 405-414, doi:10.1016/j.ydbio.2009.11.013 (2010).
- 157 Ikeya, M. *et al.* Twisted gastrulation mutation suppresses skeletal defect phenotypes in Crossveinless 2 mutant mice. *Mech Dev* **125**, 832-842, doi:10.1016/j.mod.2008.06.011 (2008).

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka bedanken, für ihr Interesse an meinem Thema und für die Übernahme der Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Meinem Mentor Herrn Prof. Dr. Martin Moser danke ich für die Vergabe des Promotionsthemas sowie für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Die regelmäßigen Laborbesprechungen und Vorträge halfen mir, durch unzählige Diskussionen und den Austausch fundierter fachlicher Kenntnisse Zusammenhänge zu erkennen und mein Thema stets zielgerichtet zu verfolgen.

Ein besonders großer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Jennifer Eßer, die mir mit ihrem exzellenten Fachwissen und konstruktiver Kritik stets unterstützend zur Seite stand. Durch die vielen Anregungen, die sie mir für meine Arbeit gegeben hat, konnte sie mich immer wieder motivieren und mir bei meinen zahlreichen Fragen weiterhelfen. Ihre ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchsicht meiner Dissertation haben einen wesentlichen Anteil zu dieser Arbeit beigetragen.

Ein herzliches Dankeschön gilt zudem allen Mitarbeitern und Doktoranden meiner großartigen Arbeitsgruppe sowie der Arbeitsgruppen Grundmann, Helbing und Zhou. Besonders hervorheben möchte ich dabei Herrn Adrian Bauer, der durch seine gute Laune und positive Einstellung mich immer wieder zum Lachen gebracht und aufgemuntert hat, aber auch mit seinem fachlichen Wissen stets eine große Unterstützung war. Daneben gilt außerdem Frau Bianca Engert mein großer Dank sowohl für die hervorragende Einarbeitung in die unterschiedlichen Methoden, die

kompetente Unterstützung und unermüdliche Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche als auch für die Freude bei der Zusammenarbeit im Labor.

Auch den Tierpflegern der Versuchstierhaltung CEMT (Center for Experimental Models and Transgenic Service) in Freiburg gilt ein Dank für die großartige Betreuung und Versorgung der Mäuse.

Für seine Beratung und Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Sven Reese ganz besonders bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Else Kröner-Fresenius-Stiftung für die finanzielle Unterstützung des Projektes dieser Arbeit bedanken.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die stets an mich geglaubt haben und mir mein Studium und die Dissertation erst ermöglicht haben. Auch meinen Schwestern Enora, Sandra und Lena danke ich für ihren emotionalen Beistand, ihre aufmunternden Worte und dafür, dass sie immer für mich da sind.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei dem Menschen bedanken, der mir jeden Tag zur Seite steht, mir Rückhalt gibt in allen Lebenslagen und mir immer wieder Mut zugesprochen hat. Danke Philipp, dass du an mich glaubst und ich mich immer auf dich verlassen kann.