



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

# Die Rolle von TGF $\beta$ 1 in Thrombozyten im Rahmen der arteriellen Thrombose und Neointimabildung nach experimenteller Gefäßwandverletzung

---

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Biologie

Vorgelegt dem:

Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Von:

**M. Sc. Eva Schütz**

geb. am 29.10.1987 in St. Wendel

Mainz, August 2019

Aus der Forschungsgruppe  
„Translationale Vaskuläre Biologie“  
der Kardiologie I des Zentrums für Kardiologie  
Direktor: Professor Dr. xxx  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. xxx

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. xxx

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. xxx

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2020

*Publiziert in der wissenschaftlichen Zeitschrift „Thrombosis and Haemostasis“:*

Schütz E, Bochenek ML, Riehl DR, Bosmann M, Münzel T, Konstantinides S, Schäfer K. **Absence of Transforming Growth Factor beta 1 in murine platelets reduces neointima formation without affecting arterial thrombosis.** *Thromb Haemost.* 2017 Aug 31;117(9):1782-1797. doi: 10.1160/TH17-02-011



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>9</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>10</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>17</b>
1.1 <b>Aufbau und Funktion der Blutgefäße/Gefäßwand</b> .....	18
1.2 <b>Atherosklerose</b> .....	20
1.2.1 Definition der Atherosklerose.....	20
1.2.2 Epidemiologie und Ätiologie der Atherosklerose.....	20
1.2.3 Pathogenese der Atherosklerose.....	21
1.2.4 Klinische Manifestation der Atherosklerose.....	24
1.3 <b>Restenose und Neointimabildung</b> .....	25
1.4 <b>Thrombozyten (Blutplättchen)</b> .....	27
1.4.1 Definition, Aufbau und Funktion.....	27
1.5 <b>Der Wachstumsfaktor TGFβ</b> .....	30
1.5.1 Struktur und Biochemie.....	30
1.5.2 Aktivierung.....	31
1.5.3 Signaltransduktion und TGFβ-Rezeptoren.....	32
1.5.4 Wirkung und Funktion.....	34
1.6 <b>Die Bedeutung des TGFβ1 für die vaskuläre Wundheilung</b> .....	35
<b>2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>38</b>
<b>3 MATERIAL</b> .....	<b>40</b>
3.1 <b>Laborgeräte</b> .....	40
3.2 <b>Software</b> .....	42
3.3 <b>Zubehör und Hilfsmittel</b> .....	43

<b>3.4</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	45
<b>3.5</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b> .....	48
<b>3.6</b>	<b>ELISA und Kits</b> .....	51
3.6.1	ELISA .....	51
3.6.2	Kits .....	51
<b>3.7</b>	<b>Antikörper für die Immunhistochemie</b> .....	52
3.7.1	Primärantikörper .....	52
3.7.2	Sekundärantikörper .....	53
<b>3.8</b>	<b>Enzyme und Standards</b> .....	53
3.8.1	Enzyme .....	53
3.8.2	Standards .....	53
<b>3.9</b>	<b>PCR-Reagenzien für die Genotypisierung transgener Mäuse</b> .....	54
<b>3.10</b>	<b>Oligonukleotidsequenzen für die Genotypisierung transgener Mäuse</b> ..	54
<b>3.11</b>	<b>Versuchstiere und Haltungszubehör</b> .....	55
3.11.1	Versuchstiere.....	55
3.11.2	Haltungsfutter und Haltungszubehör.....	55
<b>3.12</b>	<b>Analgetika, Anästhetika und Sauerstoff</b> .....	56
<b>3.13</b>	<b>Lösungen und Puffer</b> .....	56
3.13.1	Gewebefärbungen .....	57
3.13.2	Immunhistochemie.....	59
3.13.3	Isolation muriner Blutplättchen.....	60
<b>4</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Tierexperimentelle Untersuchungen</b> .....	61
4.1.1	Tierversuchsantrag und Genehmigung der Studie.....	61
4.1.2	Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	61
4.1.3	Generierung eines Plättchen-spezifischen TGFβ1-Knockouts mittels Cre/loxP-Rekombination.....	62

4.1.4	Genotypisierung .....	67
4.1.4.1	DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien.....	67
4.1.4.2	PCR als Genotypisierungs-Nachweis .....	67
4.1.4.3	Agarosegelelektrophorese .....	69
4.1.5	Versuchsablauf.....	70
4.1.6	Das Eisen-(III)-chlorid-Modell zur Induktion einer experimentellen Gefäßwandläsion in der Maus .....	71
4.1.6.1	Anästhesie.....	71
4.1.6.2	Präparation der <i>A. carotis sinister</i> .....	72
4.1.6.3	Entnahme der <i>A. carotis sinister</i> .....	75
4.1.7	Hämodynamische Untersuchungen .....	76
4.1.7.1	Messung der Blutflussgeschwindigkeit in der <i>A. carotis sinister</i> .....	76
4.1.7.2	Aufbau und Messprinzip des Dopplerschallkopfs.....	76
4.1.7.3	Okklusionsverhalten und hämodynamische Parameter .....	77
4.1.8	Messung der Blutungszeit mittels <i>Tail tip bleeding</i> .....	78
4.1.9	Blutzellanalyse.....	78
4.1.10	Isolation muriner Blutplättchen („ <i>washed platelets</i> “).....	79
4.1.11	Thrombozytenaggregationsmessung .....	81
<b>4.2</b>	<b>Histologische Untersuchungen</b> .....	<b>82</b>
4.2.1	Erstellen von Paraffinschnitten .....	82
4.2.2	Verhoeff's Elastica-Färbung zur Darstellung der elastischen Fasern .....	84
4.2.3	Masson-Trichrom-Färbung zur Visualisierung von Kollagenfasern und thrombotischem Material .....	86
4.2.4	Picro-Siriusrot-Färbung zur Darstellung von Kollagenfasern.....	87
<b>4.3</b>	<b>Immunhistochemische Färbungen</b> .....	<b>88</b>
4.3.1	Allgemeines Prinzip der Immunhistochemie .....	88
4.3.2	Allgemeines Färbeprotokoll zur Immunhistochemie .....	89

4.3.3	Spezifische Färbebedingungen zur Immunhistochemie .....	91
4.3.4	Auswertung immunhistochemischer Färbungen .....	93
<b>4.4</b>	<b>Morphometrische Quantifizierung</b> .....	<b>93</b>
4.4.1	Ausmessen eines Arterienquerschnitts mit sichtbarer neointimaler Läsion ... .....	94
4.4.2	Quantifizierung .....	95
<b>4.5</b>	<b>ELISA</b> .....	<b>95</b>
<b>4.6</b>	<b>Statistik</b> .....	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>98</b>
<b>5.1</b>	<b>Nachweis der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion</b> .....	<b>98</b>
<b>5.2</b>	<b>Untersuchung von Hämatopoese und Hämostase</b> .....	<b>100</b>
5.2.1	Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf hämatologische Parameter .....	100
5.2.2	Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die Blutgerinnung .....	101
5.2.3	Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die Thrombozytenaggregation .....	103
<b>5.3</b>	<b>Hämodynamische Untersuchungen im Rahmen der akuten arteriellen Thrombose</b> .....	<b>105</b>
5.3.1	Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die Blutflussgeschwindigkeit in der <i>A. carotis</i> und die Okklusionszeit .....	105
5.3.2	Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die Thrombusstabilität .....	108
<b>5.4</b>	<b>Morphometrische Untersuchung der chemisch induzierten Gefäßwandverletzung in der <i>A. carotis</i></b> .....	<b>109</b>
5.4.1	Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die Neointimabildung .....	109
5.4.2	Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die kontralaterale, unverletzte <i>A. carotis</i> .....	112



5.4.3	Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die Thrombusauflösung .....	114
<b>5.5</b>	<b>Untersuchung der aktiven TGFβ1-Plasmaspiegel nach Gefäßwandverletzung in der <i>A. carotis</i> .....</b>	<b>115</b>
<b>5.6</b>	<b>Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die zelluläre Zusammensetzung der vaskulären Läsion .....</b>	<b>117</b>
5.6.1	Die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion resultierte in einer neointimalen und medialen Hochregulation der TGFβ Typ I- und Typ II-Rezeptoren ...	117
5.6.2	Die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion resultierte in kleineren, zellreicheren und stabileren vaskulären Läsionen.....	125
5.6.3	Die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion resultierte in einer medialen glatten Muskelzell-Dedifferenzierung und Inflammation .....	131
5.6.4	Die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion resultierte in einer verstärkten medialen Proteasenexpression.....	132
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>137</b>
<b>6.1</b>	<b>Einfluss der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die hämatologischen Parameter, die Blutgerinnung, die Thrombozytenaggregation und die arterielle Thrombose .....</b>	<b>138</b>
<b>6.2</b>	<b>Einfluss der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die vaskuläre Wundheilung, insbesondere die Neointimabildung .....</b>	<b>139</b>
<b>6.3</b>	<b>Fazit und Limitation der Arbeit .....</b>	<b>146</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>148</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>150</b>
	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>158</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>159</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>162</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1-1:</b> Histologischer Aufbau der arteriellen Gefäßwand .....	19
<b>Abb. 1-2:</b> Stadien der atherosklerotischen Läsionsbildung .....	24
<b>Abb. 1-3:</b> Aufbau eines Thrombozyten im Querschnitt .....	30
<b>Abb. 1-4:</b> TGFβ-Signaltansduktion .....	34
<b>Abb. 4-1:</b> Das transgene Pf4-Cre-Konstrukt .....	63
<b>Abb. 4-2:</b> Die Cre/loxP vermittelte Generierung eines konstitutiven Plättchen-spezifischen TGFβ1-Knockouts .....	65
<b>Abb. 4-3:</b> Kreuzungsschemata zur Generierung von Plättchen-spezifischen TGFβ1-KO-Mäusen und deren Kontrollgruppe.....	66
<b>Abb. 4-4:</b> Übersicht des Versuchsaufbaus zur Durchführung des Eisen-(III)-chlorid-Modells mit den einzelnen Komponenten der Narkoseanlage.....	72
<b>Abb. 4-5:</b> Präparation der <i>A. carotis sinister</i> unter Anwendung des Eisen-(III)-chlorid Modells zur Induktion einer experimentellen Gefäßwandläsion und arteriellen Thrombose in der Maus .....	74
<b>Abb. 4-6:</b> Aufbau der Dopplersonde ( <i>Transonic® Flowprobe</i> ).....	77
<b>Abb. 4-7:</b> Messprinzip der Dopplersonde .....	77
<b>Abb. 4-8:</b> Isolation muriner Thrombozyten unter Anwendung der sogenannten “ <i>washed platelets</i> ”-Technik .....	81
<b>Abb. 4-9:</b> Schematische Darstellung zur Herstellung von Paraffinschnitten.....	84
<b>Abb. 4-10:</b> Darstellung eines Verhoeff’s Elastica gefärbten Arterienquerschnitts mit neointimaler Läsion (Neointima) .....	94
<b>Abb. 5-1:</b> Repräsentativer genotypischer Nachweis der erfolgreichen Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion.....	99
<b>Abb. 5-2:</b> Repräsentativer immunologischer Nachweis der erfolgreichen Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion mittels ELISA.....	100
<b>Abb. 5-3:</b> Blutungszeiten und Hämoglobin-Gehalt der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse.....	102
<b>Abb. 5-4:</b> Aggregationsverhalten der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse.....	104

**Abb. 5-5:** Blutflussgeschwindigkeit in der *A. carotis* der Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse ..... 106

**Abb. 5-6:** Hämodynamische Befunde nach FeCl<sub>3</sub>-induzierter Gefäßwandläsion und Thrombose der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse ..... 107

**Abb. 5-7:** Stabilität der sich gebildeten Thromben in Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen (nach FeCl<sub>3</sub>-induzierter Gefäßwandläsion) ..... 109

**Abb. 5-8:** Morphometrische Analyse der Neointimabildung 21 Tage nach chemisch induzierter Gefäßwandläsion in den Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen ..... 111

**Abb. 5-9:** Morphometrische Analyse der kontralateralen, unverletzten Karotisarterien (*A. carotis dexter*) der Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse ..... 113

**Abb. 5-10:** Morphometrische Analyse der arteriellen Thromben sechs Tage nach chemisch induzierter Gefäßwandläsion in den Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen ..... 115

**Abb. 5-11:** Aktive TGF $\beta$ 1-Plasmaspiegel der Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse nach Gefäßwandverletzung in der *A. carotis* ..... 116

**Abb. 5-12:** Expression des TGF $\beta$  Typ I-Rezeptors (TGF $\beta$ RI/ALK5) in vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäuse ..... 119

**Abb. 5-13:** Expression des TGF $\beta$  Typ II-Rezeptors (TGF $\beta$ RII) in vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäuse ..... 120

**Abb. 5-14:** Immunhistochemische Visualisierung BMP7-positiver Zellen in vaskulären Läsionen von Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen ..... 122

**Abb. 5-15:** Immunhistochemische Detektion SDF1 $\alpha$ -positiver Zellen in vaskulären Läsionen von Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen. .... 124

**Abb. 5-16:** Analyse der Zellularität bzw. Zelldichte der vaskulären Läsionen von Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen ..... 126

**Abb. 5-17:** Untersuchung der Zellproliferation in vaskulären Läsionen von Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen ..... 127

**Abb. 5-18:** Immunhistochemische Detektion  $\alpha$ -SMA-positiver Zellen in der Neointima und Media von Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen ..... 129

**Abb. 5-19:** Visualisierung von interstitiellem Kollagen in vaskulären Läsionen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse ..... 130

**Abb. 5-20:** Analyse der Reendothelialisierung der Neointima in Plt.TGF $\beta$ -WT- und -KO-Mäusen. .... 131

**Abb. 5-21:** Zelluläre Zusammensetzung der Media 21 Tage nach induzierter Gefäßwandverletzung in Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäusen ..... 133

**Abb. 5-22:** Mediale Expression von Proteasen in Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäusen ..... 134

**Abb. 5-23:** Neointimale Expression von dedifferenzierten glatten Muskelzellen, inflammatorischen Zellen und Proteasen in Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäusen ..... 135

## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 4-1:</b> Reaktionsansatz für die Lyse von Ohrstanz-bzw. Schwanzspitzenbiopsien .....	67
<b>Tabelle 4-2:</b> Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR.....	68
<b>Tabelle 4-3:</b> Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR für das Pf4-Cre- und TGF $\beta$ 1-Gen.....	68
<b>Tabelle 4-4:</b> Protokoll zur Paraffineinbettung.....	83
<b>Tabelle 4-5:</b> Protokoll zur Verhoeff's Elastica-Färbung.....	85
<b>Tabelle 4-6:</b> Protokoll zur Masson-Trichrom-Färbung.....	86
<b>Tabelle 4-7:</b> Protokoll zur Picro-Siriusrot-Färbung.....	88
<b>Tabelle 4-8:</b> Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Primärantikörper in der Immunhistochemie.....	92
<b>Tabelle 4-9:</b> Auflistung der morphometrisch erhobenen Messwerte nach Durchführung der Verhoeff's Elastica-Färbung.....	95
<b>Tabelle 5-1:</b> Hämatologische Parameter der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- (Plt.TGF $\beta$ -WT) und TGF $\beta$ 1-KO- (Plt.TGF $\beta$ -KO) Mäuse .....	101

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> ) als Einheitenpräfix
A	Österreich (engl. <i>Austria</i> )
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex (engl. <i>avidin-biotin complex</i> )
AB-Diluent	engl. <i>Antibody-Diluent</i>
Abs.	Absatz
<i>A. carotis</i>	<i>Arteria carotis (communis)</i>
ACD	engl. <i>Acid citrate dextrose</i>
ACTs	Aktivine (engl. <i>activins</i> )
ADP/ATP	Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AG	Aktiengesellschaft
ALK	engl. <i>activin receptor-like kinase</i>
AMH	Anti-Müller-Hormon
Art.-Nr.	Artikel-Nummer
ASS	Acetylsalicylsäure
BAC	engl. <i>bacterial artificial chromosomes</i>
BMP	morphogenetische Knochenproteine (engl. <i>bone morphogenetic proteins</i> )
bp	Basenpaar (engl. <i>base pair</i> )
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa

CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CD31	engl. <i>cluster of differentiation 31</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
CH	Schweiz
c-Mpl	engl. <i>myeloproliferative leukemia protein</i>
Cre	engl. <i>cyclization recombination</i>
CTH	Centrum für Thrombose und Hämostase
d	Dezi (10 <sup>-1</sup> ) als Einheitenpräfix und Tag
DAB	3.3.-Diaminobenzidin
DAPT	duale Plättchen-hemmende Therapie (engl. <i>dual antiplatelet therapy</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-demineralisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
ECM	Extrazellulärmatrix (engl. <i>extracellular matrix</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (engl. <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> )
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i> )
ELISA	engl. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assays</i>
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere
f	Femto (10 <sup>-15</sup> ) als Einheitenpräfix
F0/F1/F2	Filialgeneration null/eins/zwei
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
fl/fl	flox/flox
flox	engl. <i>flankend by loxP</i>

FSP1	Fibroblasten spezifisches Protein 1 (engl. <i>fibroblast-specific protein 1</i> )
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GB	Großbritannien (engl. <i>Great Britain</i> )
GDF	Wachstums- und Differenzierungsfaktor (engl. <i>growth and differentiation factor</i> )
GDNFS	engl. <i>glial-derived neurotrophic factor</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde/Society of Laboratory Animal Science
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (engl. <i>high density lipoprotein</i> )
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
I	Italien
I.U.	Internationale Einheit (engl. <i>International Unit</i> )
IgG	Immunglobulin G
Inc.	Gesellschaft mit beschränkter Haftung (engl. <i>Incorporated</i> )
INHs	Inhibine (engl. <i>Inhibins</i> )
IQR	Interquartilsabstand (engl. <i>interquartile range</i> )
J	Japan
JGU	Johannes Gutenberg-Universität
K.K.	Aktiengesellschaft (jap. <i>Kabushiki kaisha</i> )
kb	Kilobase



kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
kJ	Kilojoule
KO	Knockout
l, L	Liter
LAMP	lysosomales Membranprotein (engl. <i>lysosomal-associated membrane protein</i> )
LAP	Latenz-assoziierten Peptid
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (engl. <i>low density lipoprotein</i> )
LDPE	Weich-Polyethylen (engl. <i>Low Density Polyethylen</i> )
Lefty	engl. <i>left-right determination factor</i>
LLC	engl. <i>Limited Liability Company</i>
loxP	engl. <i>locus of crossover (x) in P1 bacteriophage</i>
LTA	Lichttransmissionsaggrometrie
LTBP-1	engl. <i>latent TGF<math>\beta</math> binding protein-1</i>
Ltd	engl. <i>limited</i>
m	Meter
m	Milli ( $10^{-3}$ ) als Einheitenpräfix
M	Mol
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mAB	monoklonaler Antikörper (engl. <i>monoclonal antibody</i> )
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (engl. <i>mean corpuscular haemoglobin</i> )
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen (engl. <i>mean corpuscular volume</i> )

ME	Metabolische Energie (engl. <i>metabolizable energy</i> )
MEK	Methylethylketon (2-Butanon)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
MMP	Metalloproteinasen (engl. <i>matrix metalloproteinase</i> )
MPV	mittleres Thrombozytenvolumen (engl. <i>mean platelet volume</i> )
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MTC	Masson-Trichrom
n	Nano (10 <sup>-9</sup> ) als Einheitenpräfix und Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NIH	Nationale Gesundheitsinstitute (engl. <i>National Institutes of Health</i> )
Nodal	engl. <i>nodal growth differentiation factor</i>
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OP	Operation
oxLDL	oxidiertes LDL
p	Piko (10 <sup>-12</sup> ) als Einheitenpräfix und p-Wert/Signifikanzwert
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCNA	engl. <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PD	Privatdozent
PDGF	engl. <i>platelet-derived growth factor</i>

PDGFR $\beta$	engl. <i>platelet-derived growth factor receptor beta</i>
PECAM-1	engl. <i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
Pf4	Plättchenfaktor 4 (engl. <i>platelet factor 4</i> )
plc.	Kapitalgesellschaft (engl. <i>public limited company</i> )
PP	Polypropylen
PPP	Plättchen-armes Plasma (engl. <i>platelet poor plasma</i> )
PRP	Plättchen-reiches Plasma (engl. <i>platelet rich plasma</i> )
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie (engl. <i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> )
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PyRAT	engl. <i>Python-based Relational Animal Tracking</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. <i>real-time polymerase chain reaction</i>
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt (engl. <i>severe combined immunodeficiency</i> )
SDF1 $\alpha$	engl. <i>stromal cell-derived factor 1<math>\alpha</math></i>
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. <i>standard error of mean</i> )
SFLLRNP	engl. <i>seryl-phenylalanyl-leucyl-leucyl-arginyl-asparaginy-proline</i>
SLC	kleiner latenter Komplex (engl. <i>small latent complex</i> )
SMC	glatte Muskelzellen (engl. <i>smooth muscle cells</i> )
SM-MHC	engl. <i>Smooth Muscle-Myosin Heavy Chain</i>
SM $\alpha$ -actin	engl. <i>Smooth Muscle <math>\alpha</math>-actin</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TARC	engl. <i>Translational Animal Research Center</i>

TGF $\alpha$ / $\beta$	engl. <i>transforming growth factor <math>\alpha/\beta</math></i>
TGF $\beta$ RI/II	TGF $\beta$ Typ I/II Rezeptor
TIA	transitorisch-ischämische Attacke
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP-1	Thrombospondin-1
U	units
UK	Vereinigtes Königreich (engl. <i>United Kingdom</i> )
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl. <i>United States of America</i> )
UV	Ultraviolett
VCAM-1	engl. <i>vascular-cell adhesion molecule-1</i>
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte (engl. <i>very low density lipoprotein</i> )
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i> )
WT	Wildtyp
$\alpha$ -SMA	engl. <i>alpha-smooth muscle actin</i>

# 1 EINLEITUNG

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellt die koronare Herzkrankheit (KHK) die häufigste Todesursache weltweit dar. Im Jahr 2016 starben etwa 17,9 Millionen Menschen an den Folgen einer KHK, was 31% aller Todesfälle weltweit entspricht [1]. Pathophysiologisch liegt der KHK eine atherosklerotische Veränderung der Koronararterien zugrunde. Als minimalinvasive Kathethertherapie kommt diesbezüglich die sogenannte perkutane transluminale Koronarangioplastie, kurz PTCA (engl. *percutaneous transluminal coronary angioplasty*) zum Einsatz, eine revaskularisierende Maßnahme, die den Blutfluss in den atherosklerotisch verengten Koronarien wiederherstellen soll. Die PTCA gehört neben der medikamentösen Therapie und dem invasiven Verfahren der Bypass-Operation zum Standardtherapieverfahren der KHK [2]. Sie beruht auf einer Ballondilatation, einem Verfahren nach Andreas Grüntzig aus dem Jahr 1978, bei welchem mit Hilfe eines Katheters ein dehnbarer Ballon an die betroffene stenosierte Koronararterie vorgeschoben und entfaltet wird, um so die atherosklerotische Plaque in die Gefäßwand zu drücken und eine Vergrößerung des Gefäßdurchmessers zu erreichen [3]. Um das dilatierte Gefäß jedoch langfristig offen zu halten, wird die PTCA heutzutage meistens mit einer Stentimplantation kombiniert.

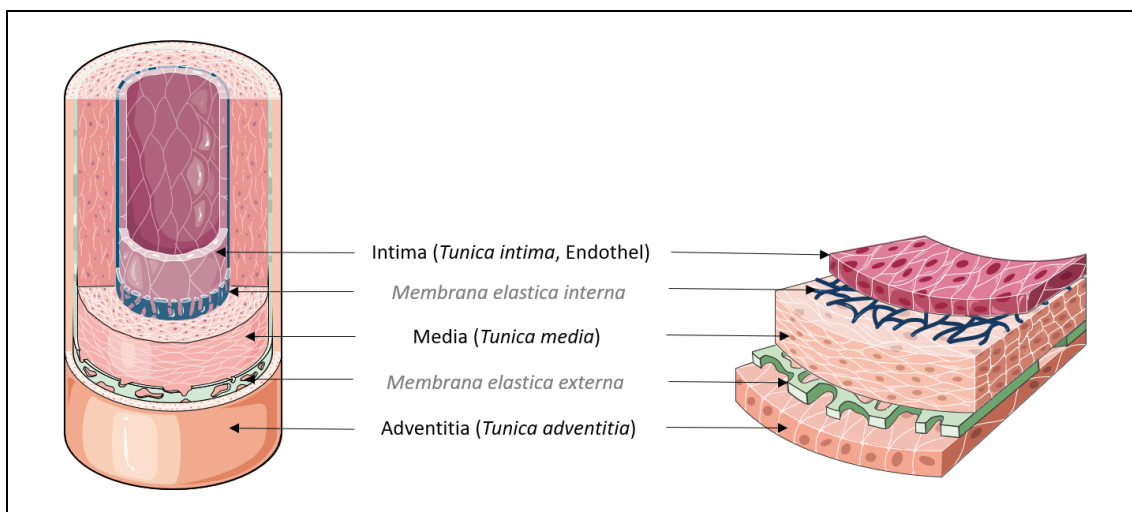
Neben dem gewünschten Effekt der Gefäßdilatation führt die Koronarangioplastie jedoch auch oft zu unerwünschten Nebenwirkungen. In diesem Zusammenhang ist die sogenannte Restenose zu nennen, die nach Ballondilatation mit und ohne Stentimplantation im behandelten Gefäßbereich auftritt und sich als erneute Einengung des bereits dilatierten Lumens um  $\geq 50\%$  manifestiert. Hierbei sind Stenoseraten von 32-42% nach alleiniger Ballonangioplastie, 16-32% nach Stentimplantation von nichtmedikamentenfreisetzender Stents und  $<10\%$  nach Implantation von medikamentenfreisetzender Stents zu verzeichnen. [4-6]. Bei der Koronarangioplastie sorgt die Aufdehnung des Ballonkatheters für eine Verletzung oder Abtragung der endothelialen Zellschicht. In Antwort auf diese vaskuläre Verletzung kommt es zur Freilegung prokoagulatorischer Faktoren in der Gefäßwand, die eine verstärkte Thrombozytenaggregation induzieren und die Bildung eines Thrombus begünstigen. Die darauffolgende Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen aus aktivierten Thrombozyten führt zur Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und letztendlich zur Entstehung einer intimalen Hyperplasie als Zeichen des vaskulären Remodelings. [7]. Um einer möglichen postoperativen Thrombose entgegenzuwirken und so das

Risiko einer Restenose zu minimieren, wird die sogenannte duale Plättchen-hemmende Therapie (DAPT, engl. *dual antiplatelet therapy*) in Form von Thrombozytenaggregationshemmern (Acetylsalicylsäure (ASS) und Adenosindiphosphat (ADP)-P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor-Blocker) als etablierte Strategie eingesetzt [8]. Jedoch spielt die Plättchenaktivierung im Rahmen der vaskulären Verletzung nicht nur bei der akuten Thrombusbildung eine entscheidende Rolle. Durch die Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren und inflammatorischer Zytokine aus der Thrombozyten-Granula trägt sie auch zum Prozess der chronischen vaskulären Wundheilung bei [4, 9]. Hierbei ist neben PDGF (engl. *platelet-derived growth factor*) und EGF (engl. *epidermal growth factor*) vor allem der Wachstumsfaktor TGFβ<sub>1</sub> (engl. *transforming growth factor β 1*) zu nennen [10]. Als Thema der vorliegenden Arbeit ist TGFβ<sub>1</sub> Gegenstand der nachfolgenden Literatordiskussion. Hierbei soll ausgehend von der Einordnung in die TGFβ-Superfamilie unter anderem seine Struktur, Wirkung, Aktivierung und pathophysiologische Bedeutung erörtert werden. Zu Beginn wird jedoch die Gefäßfunktion beschrieben und das Krankheitsbild der Atherosklerose vorgestellt. In diesem Zusammenhang wird auch über den chronischen Prozess der arteriellen Neointimabildung und Restenose informiert, der im Rahmen der Behandlung atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen entstehen kann. Unter anderem wird auch auf Thrombozyten und deren Funktion im Rahmen der akuten Thrombus- und chronischen Neointimabildung eingegangen.

## 1.1 Aufbau und Funktion der Blutgefäße/Gefäßwand

Grundsätzlich setzen sich Arterien, Venen und Arteriolen aus mehreren Wandschichten unterschiedlicher Zell- und Gewebsarten zusammen, wobei diese entsprechend der Aufgabe des jeweiligen Blutgefäßes unterschiedlich aufgebaut sind. Die arterielle Gefäßwand gliedert sich in drei morphologisch verschiedene Schichten (siehe Abb. 1-1): die Intima (*Tunica intima*), die Media (*Tunica media*) und die Adventitia (*Tunica adventitia*). Die Intima bildet die innerste Schicht bestehend aus einem Monolayer aus Endothelzellen, der in unmittelbarem Kontakt mit dem Gefäßlumen und somit auch in direkter Interaktion mit dem Blut steht. Diese Endothelzellschicht (Endothel) sitzt einer lockeren Bindegewebsschicht aus Proteoglykanen und Kollagen (Basalmembran) auf und wird durch die *Membrana elastica interna* von der angrenzenden Media abgeschirmt. Die Endothelzellen fungieren dabei als selektiv permeable Barriere zwischen Blut und Gewebe und

steuern so deren Stoffaustausch. Des Weiteren sind sie an der Bildung von Effektormolekülen beteiligt und regulieren den Gefäßtonus, das vaskuläre Remodeling und inflammatorische Prozesse. Zudem trägt das Endothel zur Regulation der Hämostase bei. Abhängig von der durch den Blutfluss bedingten Schubspannung kann sich die Morphologie der Endothelzellen ändern. Demnach zeigen jene Endothelzellen, die einem laminaren Blutstrom ausgesetzt sind, ellipsoide Formen und richten sich in Strömungsrichtung aus. Endothelzellen, die dagegen in Bereichen arterieller Verzweigung mit turbulenter Strömung vorzufinden sind, sind polygonalförmig ohne bestimmte Ausrichtung. Letztere weisen eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle wie LDL- (engl. *low density lipoprotein*) Cholesterin auf und sind für die atherosklerotische Läsionsbildung bevorzugt empfänglich. Angrenzend an das Endothel schließt sich nach außen die mittlere Schicht der arteriellen Gefäßwand an, die Media. Diese besteht im Wesentlichen aus glatten Muskelzellen, die durch Vasodilatation und Vasokonstriktion für die Regulation des Gefäßtonus verantwortlich sind. In Form einer dichten Schicht ordnen sich diese entweder zirkulär oder spiralförmig an und werden von extrazellulären Elastinfasern durchzogen. Durch die *Membrana elastica externa* wird die Media von der Adventitia, der äußersten arteriellen Wandschicht, abgegrenzt. Die Adventitia wird vorwiegend aus Kollagen und anderen extrazellulären Matrixproteinen gebildet und enthält zudem Fibroblasten und Immunzellen. Durch eine eigene Mikrovaskulatur bestehend aus Arteriolen und Venolen (*Vaso vasorum*) stellt sie die Versorgung der Gefäßwand mit Nährstoffen sicher und sorgt außerdem für Halt und Verankerung der Arterienwand [11-14].



**Abb. 1-1: Histologischer Aufbau der arteriellen Gefäßwand.** Dargestellt sind die einzelnen Wandschichten einer Arterie. (Die Abbildung wurde unter Verwendung der *Powerpoint image bank* von Servier Medical Art erstellt.)

## **1.2 Atherosklerose**

### **1.2.1 Definition der Atherosklerose**

Die Atherosklerose ist eine chronisch verlaufende, langsam progrediente entzündliche Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien [13, 15]. Sie ist durch eine Verdickung und Verhärtung der Gefäßwand gekennzeichnet und geht in Folge dessen mit einer Einengung des Gefäßlumens, einem Elastizitätsverlust und demnach auch mit einer Änderung des Blutflusses einher [15]. Charakterisiert wird der progressive Prozess der atherosklerotischen Gefäßveränderung durch eine Akkumulation von Lipiden und fibrotischem Material innerhalb der Arterienwand [13, 15, 16]. Als Ausgangspunkt der Atherosklerose wird die sogenannte endotheliale Dysfunktion angesehen, eine Funktionsstörung des Endothels, welche unter anderem mit einer eingeschränkten Steuerung des Gefäßtonus und einer erhöhten Gefäßpermeabilität reagiert [12]. In diesem Zusammenhang lässt sich auf kardiovaskuläre Risikofaktoren verweisen, die die endotheliale Dysfunktion und die Entstehung atherosklerotischer Gefäßveränderungen begünstigen.

In Folge der endothelialen Dysfunktion treten die oben beschriebenen Veränderungen der Arterienintima auf, die deren chronisch entzündliche Erkrankung und die Entstehung von sogenannten Plaques begünstigen [17]. Über die Stadieneinteilung der Atherosklerose wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit unter Punkt 1.2.3 (Abb. 1-2) informiert. Die beschriebene Plaquebildung zeigt sich vorwiegend an Gefäßverzweigungen, da hier besondere Strömungsverhältnisse herrschen [12]. Kommt es im weiteren Verlauf der Erkrankung zu einer Plaqueruptur, resultiert diese in einer Thrombozytenaktivierung und gegebenenfalls in der Bildung eines Thrombus, welcher zur Entstehung eines lebensbedrohlichen arteriellen Gefäßverschlusses in Form eines akuten Myokardinfarkts oder Schlaganfalls führen kann [17].

### **1.2.2 Epidemiologie und Ätiologie der Atherosklerose**

Wie bereits zuvor erwähnt, sind hinsichtlich der Epidemiologie atherosklerotischer Gefäßveränderungen unterschiedliche kardiovaskuläre Risikofaktoren zu nennen. Diese wurden erstmalig im Rahmen der Framingham-Herz-Studie identifiziert, einer Kohortenstudie der Bevölkerung von Framingham, die im Jahre 1948 begann und mittlerweile die dritte Generation der Probanden untersucht. Auf Grundlage dieser Studie konnten einige Ursachen für die Entstehung und Progression einer KHK und



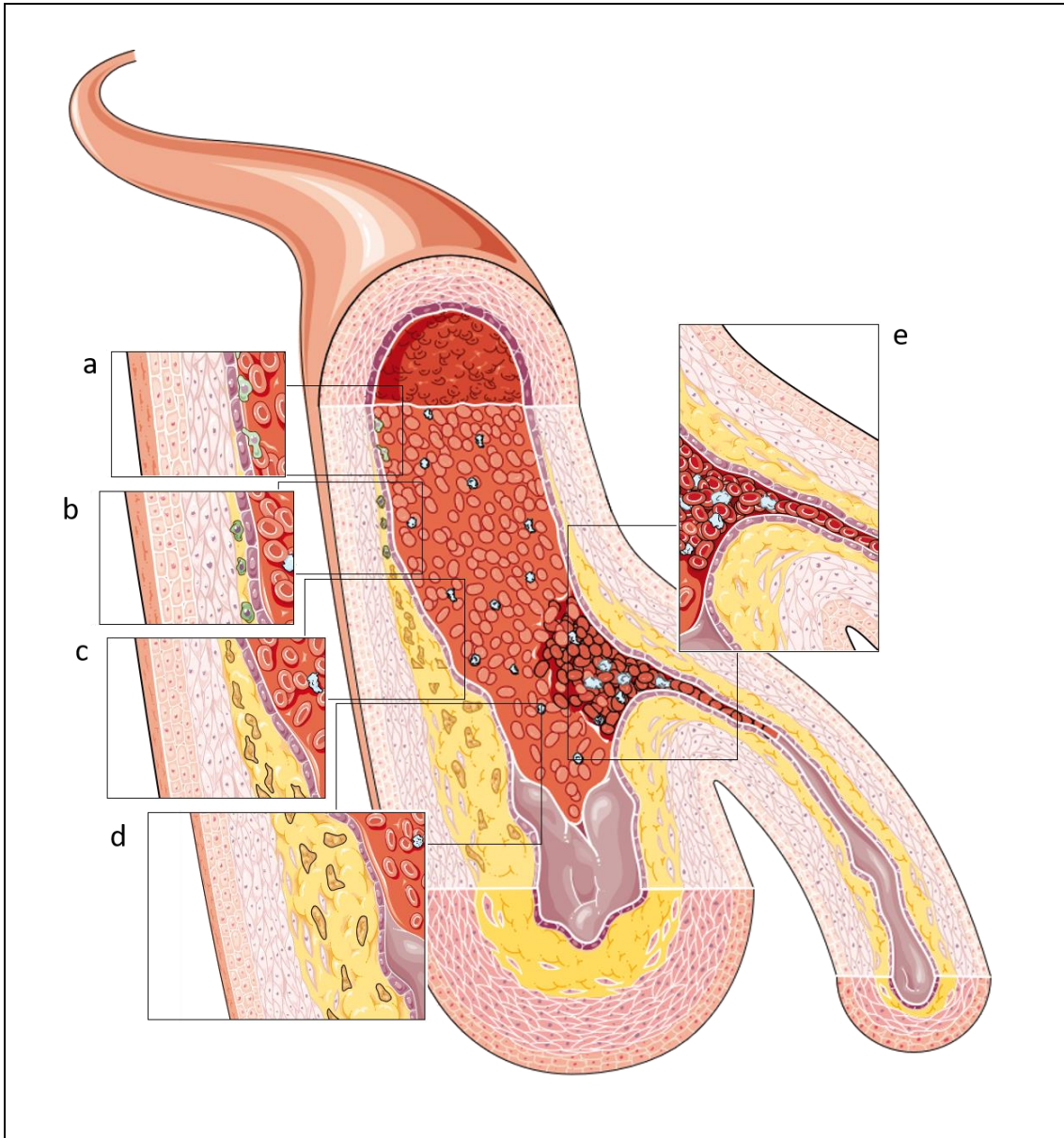
anderer kardiovaskulärer Erkrankungen ausfindig gemacht werden. Hierbei wird zwischen beeinflussbaren und nicht beeinflussbaren Faktoren unterschieden [18, 19]. Zudem differenzieren weitere epidemiologische Studien zwischen Risikofaktoren mit einer ausgeprägten genetischen Komponente und Faktoren, die größtenteils auf Umweltfaktoren zurückzuführen sind [13]. Faktoren, die das kardiovaskuläre Risiko erhöhen und beeinflussbar sind, sind vorwiegend auf Aspekte der Lebensweise zurückzuführen, wie das Ernährungsverhalten, Bewegungsmangel, Nikotinabusus oder Stress. Ebenfalls als beeinflussbar einzustufen sind Faktoren, die sich auf bestimmte Erkrankungen wie die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Störungen des Fettstoffwechsels, sprich erhöhte LDL-/VLDL- (engl. *very low density lipoprotein*) und erniedrigte HDL- (engl. *high density lipoprotein*) Werte beziehen. Zu den kardiovaskulären Risikofaktoren, die nicht beeinflussbar sind, zählen neben dem hohen Lebensalter und dem männlichen Geschlecht auch die genetische Disposition, sprich das vermehrt familiäre Auftreten von atherosklerotisch bedingten Gefäßerkrankungen. All diese Faktoren gehören zu den unabhängigen Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose und können sowohl allein als auch in Kombination das Risiko einer atherosklerotischen Gefäßerkrankung erhöhen [18-20]. Hierbei gilt, je größer die Anzahl oder der Schweregrad der Risikofaktoren, desto höher das Risiko einer vorzeitigen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität [21].

### **1.2.3 Pathogenese der Atherosklerose**

Obwohl die Pathogenese der Atherosklerose trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig geklärt ist, lassen sich spezifische Stadien der Entwicklung atherosklerotischer Plaques charakterisieren. Diese stützen sich auf unterschiedliche Hypothesen. Hier ist insbesondere die „Response-to-injury“-Hypothese von Russell Ross aus dem Jahre 1977 zu nennen. Diese besagt, dass eine atherosklerotische Läsion in Antwort auf eine Verletzung des Endothels entsteht, die in der Denudation der Endothelzellen resultiert. Als potentielle Quellen der Endothelzellschädigung charakterisiert Ross neben der chronischen Hyperlipidämie, verschiedene chemische Faktoren (wie Metaboliten, Infektionen und immunologische Schädigungen) aber auch mechanische Faktoren wie Strömungsstörungen oder erhöhter Scherstress [9]. In einer späteren Version löst sich Ross von seiner ursprünglichen Theorie der Endotheldenudation als initiales Ereignis der Atherogenese. Gegenwertig wird die endotheliale Dysfunktion als kausale Erklärung der Atherosklerose angesehen. Als Ursache für die endotheliale Dysfunktion werden kardiovaskuläre Risikofaktoren wie

erhöhtes und verändertes LDL, Nikotinkonsum, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, genetische Dispositionen, erhöhte Plasma-Homocystein-Konzentrationen oder eine Kombination dieser und anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren vermutet. In Antwort auf die endotheliale Dysfunktion lässt sich als erste läsionsbedingte Veränderung eine Modifikation der normalen homöostatischen Endotheleigenschaften verzeichnen, die in einer Permeabilitätssteigerung des Endothels und einer erhöhten Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten resultiert [15, 22]. In Folge der endothelialen Permeabilitätsstörung kommt es zur vermehrten Akkumulation von Lipoproteinen, vor allem von LDL-Cholesterin, in den subendothelialen Raum. Ein Teil des eingelagerten LDLs wird dabei durch Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) zu oxLDL (oxidiertes LDL-Cholesterin) oxidiert, was die Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen wie L-Selektin, Integrinen, PECAM-1 (engl. *platelet-endothelial-cell adhesion molecule-1*), E-Selektin, P-Selektin und VCAM-1 (engl. *vascular-cell adhesion molecule-1*) verstärkt. Darüberhinaus kommt es zur vermehrten Rekrutierung von Monozyten, die aus dem Blut über das Endothel in die Gefäßwand migrieren und dort unter Einwirkung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren zu Makrophagen differenzieren. Jene Makrophagen, die Scavenger-Rezeptoren auf ihrer Plasmamembran exprimieren, nehmen über diese kontinuierlich oxidativ-modifiziertes LDL-Cholesterin auf. Durch fortwährende Überladung der Makrophagen mit oxidierten Lipoproteinen wandeln sich diese in sogenannte Schaumzellen um, die charakteristisch für die atherosklerotische Läsionsbildung sind und zusammen mit T-Lymphozyten die sogenannten *fatty streaks* bilden. Diese subintimalen Fettablagerungen schreiten im Laufe der Jahre durch Nekrose von Schaumzellen und weiterer Lipidakkumulation zu einem nekrotischen Lipidkern als Teil der atherosklerotischen Plaque fort. Hier ist auch auf die glatten Muskelzellen zu verweisen, die unter dem Einfluss von Makrophagen und T-Lymphozyten sekretierter Wachstumsfaktoren wie PDGF, FGF2 (engl. *basic fibroblast growth factor2*) und TGF $\beta$  aus der Media in die Intima migrieren und dort proliferieren. Durch Produktion extrazellulärer Matrixproteine sind sie zudem für die Bildung einer fibrösen Plaquekappe verantwortlich, die den nekrotischen Lipidkern bedeckt und so die atherosklerotische Plaque vom Gefäßlumen abgrenzt. Der persistierende Prozess der Akkumulation mononukleärer Zellen, Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und der Bildung von fibrösem Gewebe führt infolgedessen zur Umstrukturierung der Plaque und zur Entstehung einer fortgeschrittenen komplexen atherosklerotischen Läsion. Dem kann die Arterie früher oder später nicht mehr durch

Dilatation entgegenwirken, was folglich in der Okklusion des Lumens und damit einhergehender Veränderungen des Blutflusses resultiert [13, 15-17]. Hierbei gilt eine Ruptur bzw. Erosion der fibrösen Kappe als klinisch relevante Komplikation der atherosklerotischen Läsionsbildung, da sie zur Thrombosierung und oftmals zum vollständigen Verschluss des betroffenen Gefäßes führt. Ursächlich für die Plaqueruptur ist eine vulnerable, instabile Plaque mit ausgedünnter fibröser Kappe und großem Lipidkern. Die Ausdünnung der Plaquekappe ist unter anderem auf die von aktivierten Makrophagen sekretierten Metalloproteinasen wie Kollagenasen und Elastasen zurückzuführen, die einen vermehrten Abbau der Extrazellulärmatrix bedingen. Ferner verstärken proinflammatorische Zytokine durch entzündliche Prozesse die apoptotische und prothrombotische Aktivität in der Plaque. Durch erhöhte mechanische Aktivität kann die ausgedünnte Kappe reißen, wodurch thrombogenes Material freigelegt wird. Der dabei freigesetzte Gewebefaktor (Faktor III, Gewebetromboplastin) leitet die Aktivierung der Koagulationskaskade ein, was in der Bildung eines Thrombus resultiert. Dieser führt entweder am Ort der Ruptur oder nach dessen Ablösung als Embolus an einer stromabwärts gelegenen Stelle der rupturierten Plaque zum Verschluss der Arterie. Je nach Lokalisation des Gefäßverschlusses kann der Thrombus einen Myokardinfarkt oder einen Schlaganfall als akut kardiovaskuläres Ereignis zur Folge haben (siehe 1.2.4 Klinische Manifestation der Atherosklerose) [15-17, 23]. Die einzelnen Entwicklungsstufen der atherosklerotischen Plaquebildung sind in nachfolgender Abbildung (Abb. 1-2) vereinfacht dargestellt.



**Abb. 1-2: Stadien der atherosklerotischen Läsionsbildung.** (a) Endothelzellschädigung mit Einwanderung von Immunzellen (Makrophagen, T-Lymphozyten) in den subintimalen Raum, (b) Differenzierung der Makrophagen zu Schaumzellen, (c) zunehmende Akkumulation von Lipoproteinen mit Bildung subintimaler Fettablagerungen (*fatty streaks*), (d) Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in die Intima mit komplexer Plaquebildung, (e) thrombotischer Gefäßverschluss: vollständig ausgeprägte atherosklerotische Läsion mit Thrombozytenablagerung. (Die Abbildung wurde unter Verwendung der *Powerpoint image bank* von Servier Medical Art erstellt.)

#### 1.2.4 Klinische Manifestation der Atherosklerose

Klinisch kann sich die Atherosklerose in unterschiedlichen Regionen des arteriellen Gefäßsystems manifestieren und folglich diverse Krankheitsbilder verursachen. An erster Stelle ist hier die KHK zu nennen, die auf atherosklerotische Veränderungen der Koronararterien zurückzuführen ist. Mit einer Prävalenz von 7% (bei Frauen) bzw. 10%

(bei Männern) zählt sie zu der häufigsten Manifestation der Atherosklerose in Deutschland. Kommt es im Falle einer Koronarthrombose zum vollständigen Verschluss eines oder mehrerer Koronargefäße kann dies zur Entstehung eines lebensbedrohlichen Myokardinfarkts führen. Des Weiteren lässt sich auf die Atherosklerose der Halsschlagader und der extrakraniellen, hirnversorgenden Arterien verweisen, die bei kompletter Lumenokklusion in der Entstehung einer transitorisch-ischämischen Attacke (TIA) oder einem ischämischen Schlaganfall resultiert. Sind die oberen oder häufiger die unteren Extremitätenarterien von der atherosklerotischen Plaquebildung betroffen, kann dies bei starker Gefäßstenosierung in die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) münden [24]. Zur Revaskularisierung der atherosklerotisch stenosierten Arterien wird standardmäßig die minimalinvasive Kathethertherapie der Ballondilatation mit oder ohne Stentimplantation angewandt. Im Falle der KHK ist das die bereits anfangs vorgestellte perkutane transluminale Koronarangioplastie [2].

### **1.3 Restenose und Neointimabildung**

Wie bereits zu Beginn erwähnt, resultiert eine erfolgreich durchgeführte PTCA bei bis zu 42% der Patienten innerhalb der ersten sechs bis 12 Monate nach therapeutischer Dilatation des stenosierenden Gefäßes in einer arteriellen Restenose, einer signifikanten Einschränkung der Gefäßdurchblutung nach perkutaner Revaskularisierung. Hierbei führt die arterielle Aufdehnung mittels Ballonkatheter zur Abtragung der endothelialen Zellschicht und folglich zur endothelialen Dysfunktion, die mit einer allmählichen Wiedereinengung des Lumens um mehr als 50% des bereits dilatierten Gefäßes reagiert und so die Langzeitresultate der Angioplastie begrenzt. Dies kann sowohl bei einer isolierten Ballon-Koronarangioplastie als auch in Kombination mit einem mechanischen Metallgerüst, sprich einer Stentimplantation auftreten. Dabei kommt es zur Bildung einer rezidivierenden intimalen Verdickung, der sogenannten Neointima. Diese führt zur Entstehung einer obstruktiven Läsion, die schlussendlich ischämische Symptome verursacht, welche einer erneuten Revaskularisierung bedürfen [4-6, 25-27]. Mit der Einführung von medikamentenfreisetzenden Stents, sogenannten Drug Eluting Stents, konnten zwar signifikant verbesserte Restenose-Raten als auch eine verbesserte Revaskularisierung des Zielgefäßes erreicht werden, jedoch zeigten langfristige Follow-Up-Studien unter Verwendung von medikamentenfreisetzenden Stents eine zunehmende Anzahl später

Stent-Thrombosen bei nicht vollständig reendothelialisierten Arealen. Aufgrund dessen besteht die Notwendigkeit einer Langzeittherapie mit Thrombozytenaggregationshemmern, die jedoch mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergehen. Folglich bedarf es der Entwicklung neuer Drug Eluting Stents, die die Bildung der Neointima hemmen und gleichzeitig für eine verbesserte Reendothelialisierung sorgen [26].

Hinsichtlich der Pathogenese der Neointima lässt sich auf die von Ross postulierte "Response-to-Injury"-Hypothese verweisen, die am ehesten den Mechanismus der Bildung einer intimalen Hyperplasie beschreibt. Hierbei kommt es in Antwort auf die mechanisch bedingte Gefäßwandverletzung am Ort der Ballon- bzw. Stententfaltung zur Infiltration von Entzündungszellen und zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren, die von lokal aktivierten Endothelzellen, zirkulierenden Entzündungszellen (Makrophagen, T-Zellen) und aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet werden. Dies stimuliert die Migration und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen von der Media in die Intima, was zur Bildung einer intimalen Hyperplasie führt. Zudem resultiert die lokale Produktion von Wachstumsfaktoren wie TGF $\beta$  und PDGF in der Differenzierung subendothelialer glatter Muskelzellen in einen synthetischen Phänotyp. Dieser Differenzierungsprozess hat zur Folge, dass die glatten Muskelzellen verstärkt extrazelluläre Matrixproteine synthetisieren und dadurch sowohl das Volumen der vaskulären Läsion weiter vorantreiben als auch ihre eigene Migration und Proliferation. Mit der Zeit entsteht so eine intimale Verdickung, die mit einer Einengung des Gefäßlumens und infolgedessen mit einer Beeinträchtigung des Blutflusses einhergeht. Ferner sind weitere Zelltypen an der Neointimabildung beteiligt. Hier sind unter anderem zirkulierende vaskuläre Vorläuferzellen zu nennen, die durch Zytokinfreisetzung in einen endothelialen- oder glatten Muskelzell-Phänotyp differenzieren. Andere postulieren einen möglichen Einfluss von Fibroblasten aus der Adventitia, die entlang der *Membrana elastica externa* über die Media und die *Membrana elastica interna* in die Intima wandern. Dort differenzieren sie zu glatten Muskelzell-ähnlichen Zellen und regen durch Sekretion extrazellulärer Matrix-Proteine die Neointimabildung an [26].

Um die Mechanismen der Neointimabildung zu analysieren, bedarf es geeigneter experimenteller Tiermodelle. Dabei wird zwischen intravaskulären und perivaskulären Methoden unterschieden, die unter Zuhilfenahme verschiedener Techniken eine Verletzung der Gefäßwand induzieren [28]. Die intravaskulären Methoden beruhen auf einer Verletzung des Endothels, die perivaskulären Methoden dagegen auf einer

Schädigung der Adventitia. Zu den intravaskulären Techniken zählen unter anderem endotheliale Verletzungen, die mit Hilfe eines Führungsdrahtes bzw. eines Federdrahtes erzeugt werden. Ebenfalls zur Verwendung kommen Ballonkatheter-induzierte Verletzungen und internale Stent-Applikationen, die im Rahmen einer PTCA durchgeführt werden. Arterielle Ligaturmodelle stellen eine weitere intravaskuläre Technik zur Generierung einer neointimalen Läsion dar. Bei den perivaskulären Methoden ist auf die sogenannten perivaskulären Cuffs (Manschetten) zu verweisen. Diese werden außen um das Gefäß platziert und führen sowohl in Antwort auf die vaskuläre Verletzung als auch durch die Beeinträchtigung des transmuralen Flusses zur neointimalen Verdickung. Neben den mechanischen Verletzungsmodellen durch Manschetten und Metallclips kann die Adventitia auch chemisch durch Auftragen oxidativ wirksamer Substanzen wie z.B. Eisen(III)-chlorid [29] oder elektrisch z.B. durch Bolusgabe von elektrischem Strom geschädigt werden [30]. In experimentellen Studien wird häufig die *Arteria carotis communis* (in der weiteren Beschreibung als *A. carotis* abgekürzt) oder die *Arteria femoralis* mechanisch z.B. mit Hilfe der intravaskulären Ballonkathetertechnik oder chemisch unter Verwendung der perivaskulären Eisen(III)-chlorid-Applikation verletzt [31, 32]. Auch in der vorliegenden Arbeit entschied man sich für die Gefäßwandverletzung der *A. carotis* mit Hilfe von Eisen(III)-chlorid, da man mit diesem Modell bereits in vorherigen Studien gute Resultate bei der Induktion der Neointimabildung erzielte [33, 34].

## 1.4 Thrombozyten (Blutplättchen)

### 1.4.1 Definition, Aufbau und Funktion

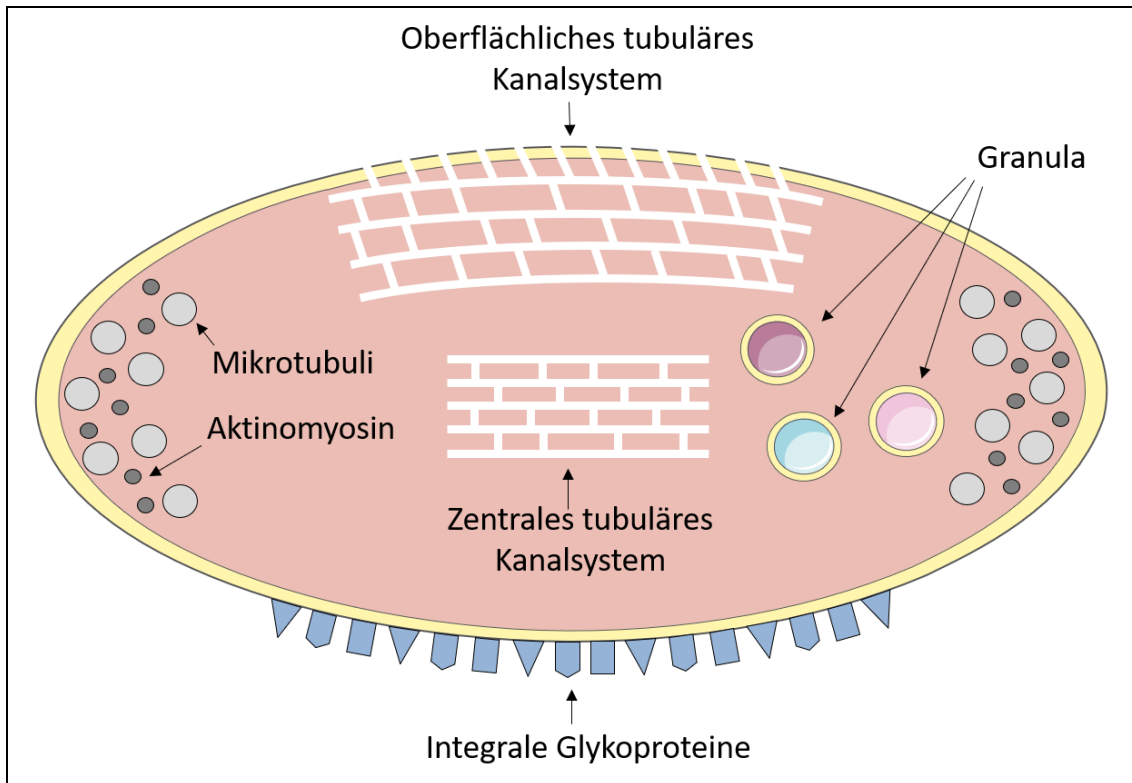
Thrombozyten (Blutplättchen/Plättchen) sind kernlose zytoplasmatische Zellfragmente, die sich in ihrem inaktiven Zustand als bikonvexe „linsenförmige“ Scheiben charakterisieren lassen [12, 35]. Beim gesunden Menschen besitzen sie einen Längsdurchmesser von 1,5 - 4  $\mu\text{m}$ , eine Dicke von 0,5 - 3  $\mu\text{m}$  und ein Volumen von 8,5 - 11,5 fl. Sie zirkulieren mit einer durchschnittlichen Zahl von 140.000 – 400.000 pro  $\mu\text{l}$  Blut und besitzen eine Lebensdauer von acht bis 12 Tagen [12, 36]. Etwa ein Drittel der Thrombozyten wird von der Milz als Hauptspeicherorgan eingelagert, der Rest zirkuliert frei im Blut [35, 37]. Unter dem Einfluss von Thrombopoietin und anderen Zytokinen kommt es zur Stimulation und Regulation der im Knochenmark stattfindenden Megakaryopoese, der Proliferation und Differenzierung thrombozytärer Vorläuferzellen (Megakaryozyten) [12, 38]. Megakaryozyten, auch als

Knochenmarksriesenzellen bezeichnet, sind polypleide Zellen, deren Größe und DNA-Gehalt direkt mit der zirkulierenden Thrombozytenmasse korrelieren. Hierbei fungiert Thrombopoietin als Ligand für die auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimierten c-Mpl- (engl. *myeloproliferative leukemia protein*) Rezeptoren. Das Zytoplasma der Megakaryozyten ist mit Plättchen-spezifischen Granula versehen und besitzt ein charakteristisches inneres Membransystem. Durch megakaryozytäre Membranabschnürung dünner röhrenartiger Zellfortsätze (Prothrombozyten) werden die Thrombozyten freigesetzt und ins Blut ausgeschwemmt [35, 37, 39]. Entsprechend der strukturellen Zusammensetzung lassen sich in Thrombozyten folgende Organellen differenzieren: die Plasmamembran, das Zytoplasma, ein verzweigtes „offenes Kanalsystem“ und unterschiedliche Granula [40]. Die Plasmamembran setzt sich aus unterschiedlichen integralen Glykoproteinen zusammen, die als spezifische Membranrezeptoren fungieren und die thrombozytäre Adhäsion an Subendothelgewebe und deren nachfolgende Aggregation vermitteln [12, 37]. Unterhalb der Plasmamembran befindet sich das Zytoplasma, das sogenannte *Hyalomer*. Dieses weist zirkulär verlaufende Mikrotubuli sowie Actin und Myosin für die thrombozytäre Kontraktion auf [35, 37]. Tiefe Einstülpungen in der Oberflächenmembran der Plättchen bilden das sogenannte „offene Kanalsystem“, ein netzartiges, tubuläres System aus verzweigten Membrankanälen. Hierbei wird zwischen dem zentralen, in sich geschlossenen System im Zellinneren und dem oberflächlichen System mit direktem Kontakt zur Zelloberfläche unterschieden (siehe Abb. 1-3). Letzteres ist für die Ausscheidung von Thrombozytensekreten zuständig [35, 41]. Im Zentrum der Thrombozyten ist das sogenannte *Granulomer* lokalisiert. Dieses setzt sich aus drei unterschiedlichen Typen sekretorischer Granula zusammen:  $\alpha$ -Granula, dichte Granula und Lysosomen [35, 42].  $\alpha$ -Granula sind die größten (200 - 500 nm) und am häufigsten in Thrombozyten vorkommenden sekretorischen Granula (~80 pro Zelle). Sie enthalten unter anderem Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF, TGF $\alpha/\beta$ ), Gerinnungsfaktoren (z.B. Fibrinogen, Faktor V, Plättchenfaktor 4, PAI (Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren)), Adhäsionsmoleküle (z.B. von-Willebrand-Faktor (vWF), P-Selektin, Fibronectin), Zytokine wie SDF1 $\alpha$  (engl. *stromal cell-derived factor 1 $\alpha$* ), zellaktivierende Stoffe und angiogene Faktoren [37, 41-43]. In den dichten Granula (engl. *dense bodies*) sind zum einen hohe Konzentrationen an ADP und ATP (Adenosintriphosphat) vorzufinden und zum anderen Kalzium, Magnesium und Serotonin. Die dritte Art der Granula, die Lysosomen, beinhalten neben den



lysosomalen Membranproteinen LAMP (engl. *lysosomal-associated membrane protein*) -1, -2, und -3 auch Endoproteasen und saure Hydrolasen [42].

Primäre Aufgabe der Thrombozyten ist die Hämostase in Antwort auf eine vaskuläre Verletzung (Blutstillung). Der Prozess der Hämostase lässt sich in mehrere Phasen unterteilen. Hierbei kommt es unmittelbar nach Gefäßverletzung zur Anheftung der Thrombozyten an subendotheliale Matrixproteine, auch Plättchenadhäsion genannt. Diese erfolgt unter Beteiligung des Glykoprotein Ib-IX-V-Rezeptor-Komplexes (vWF-Rezeptor-Komplex), der an den vWF bindet [44, 45]. Aus der Adhäsion resultiert im zweiten Schritt die Plättchenaktivierung, die durch Plättchen-aktivierende Faktoren (ADP, Thromboxan, Epinephrin, Serotonin, Kollagen und Thrombin) induziert wird und mit unterschiedlichen Veränderungen der Thrombozyten einhergeht [40, 41, 44]. Hier ist vorrangig die thrombozytäre Formänderung zu nennen, in der die Blutplättchen aufgrund des kontrahierenden Actinomyosins von ihrer normalen Scheibenform zu einer kompakten Kugel mit langen dendritischen Zellfortsätzen, sogenannten Pseudopodien, wechseln um so eine bessere Haftung zu erlangen [37, 41]. Zudem umfasst die Plättchenaktivierung die Degranulation der Thrombozyten, sprich die Freisetzung der in den Speichergranula enthalten Inhaltsstoffen, entlang des tubulären Kanalsystems nach außen. Dieser Vorgang triggert wiederum den letzten Schritt der primären Hämostase, die Plättchenaggregation. Hier haften bereits aktivierte, adhärenente Thrombozyten aneinander und bilden so unter Einwirkung von Fibrin den primären hämostatischen Pfropfen, der das verletzte Gefäß provisorisch verschließt [40, 45, 46]. Neben der physiologischen hämostatischen Funktion nehmen Thrombozyten auch bei der Pathogenese atherothrombotischer Ereignisse eine entscheidende Rolle ein [44]. Hierbei führt eine rupturierte atherosklerotische Plaque zur Freilegung der subendothelialen extrazellulären Matrix, was starke Signale zur Aktivierung des hämostatischen Systems einschließlich der Plättchenadhäsion und -aktivierung erzeugt. Dies resultiert in der Entwicklung einer prothrombotischen Oberfläche, die durch Überschreiten der Reizschwelle zu einer übermäßigen Plättchenaktivierung führt und folglich in der Bildung eines Thrombus mündet, der wiederum den Verschluss des Gefäßes herbeiführen kann [44, 47].



**Abb. 1-3: Aufbau eines Thrombozyten im Querschnitt.** Entsprechend der strukturellen Zusammensetzung lassen sich in Thrombozyten folgende Organellen differenzieren: die Plasmamembran, das Zytoplasma, das tubuläre Kanalsystem und die Granula. An der Zelloberfläche ist, die aus integralen Glykoproteinen bestehende Plasmamembran lokalisiert. Unterhalb dieser befindet sich das Zytoplasma, das sogenannte *Hyalomer* mit zirkulär verlaufenden Mikrotubuli und Aktinomyosin für die thrombozytäre Kontraktion. Das tubuläre Kanalsystem setzt sich aus netzartig verzweigten Membrankanälen zusammen. Das zentrale tubuläre Kanalsystem befindet sich im Zellinneren und ist in sich geschlossen, während das oberflächliche tubuläre Kanalsystem direkten Kontakt zur Zelloberfläche hat. Das *Granulomer* mit seinen drei unterschiedlichen Typen sekretorischer Granula ( $\alpha$ -Granula, dichte Granula und Lysosomen) ist im Zentrum der Thrombozyten angeordnet (modifiziert nach [41]).

## 1.5 Der Wachstumsfaktor TGF $\beta$

### 1.5.1 Struktur und Biochemie

Der Wachstumsfaktor *Transforming Growth Faktor- $\beta$*  (TGF $\beta$ ) ist ein multifunktionales Zytokin, das der sogenannten TGF $\beta$ -Superfamilie angehört [48, 49]. Obwohl er von vielen Zellen (unter anderem Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen) exprimiert wird, gelten die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten als Hauptsekretions- und -speicherorgan von TGF $\beta$ . Thrombozyten enthalten bis zu 100-fach mehr TGF $\beta$  als andere Zellen und setzen diesen unmittelbar nach ihrer Aktivierung mittels Degranulation frei [50, 51]. Im Menschen als auch bei allen anderen Säugetierspezies existieren drei Isoformen des TGF $\beta$ : TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ 3.

Diese werden jeweils von einem eigenen Gen auf unterschiedlichen Chromosomen (TGF $\beta$ 1: Chromosom 19, TGF $\beta$ 2: Chromosom 1, TGF $\beta$ 3: Chromosom 14) kodiert und sind durch ihre pleiotropen und redundanten Effekte gekennzeichnet, durch welche sie Einfluss auf zelluläre Funktionen nehmen [48, 49, 52]. Abhängig vom Zelltyp und dessen extrazellulärer Umgebung können diese Effekte sowohl positiv als auch negativ sein [53]. Eine genauere Beschreibung der biologischen Effekte bzw. Wirkungen und Funktionen des TGF $\beta$  erfolgt in Abschnitt 1.5.4.

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich ausschließlich auf TGF $\beta$ 1. TGF $\beta$ 1 gilt als Prototyp der TGF $\beta$ -Familie und ist die am häufigsten vorkommende Isoform. Hierbei handelt es sich um ein Homodimer, welches aus zwei identischen Polypeptidketten besteht, die über Disulfidgruppen miteinander verbunden sind und einen Komplex mit einem Gesamtmolekulargewicht von 25 kDa bilden. Synthetisiert wird dieser Komplex als Teil eines latenten, 390 Aminosäuren langen Vorläufermoleküls, dem sogenannten Prä-Pro-TGF $\beta$ . [52, 53]. Zu der anfangs benannten TGF $\beta$ -Superfamilie gehören neben dem TGF $\beta$  weitere regulatorische Polypeptide, Zytokine und multifunktionelle Liganden, einschließlich morphogenetischer Knochenproteine (engl. *bone morphogenetic proteins* (BMPs)), Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (engl. *growth and differentiation factors* (GDFs)), Aktivine (engl. *activins* (ACTs)), Inhibine (engl. *inhibins* (INHs)), GDNFs (engl. *glial-derived neurotrophic factors*) sowie das Anti-Müller-Hormon (AMH) und Faktoren wie Lefty (engl. *left-right determination factor*) und Nodal (engl. *nodal growth differentiation factor*) [51, 52].

### 1.5.2 Aktivierung

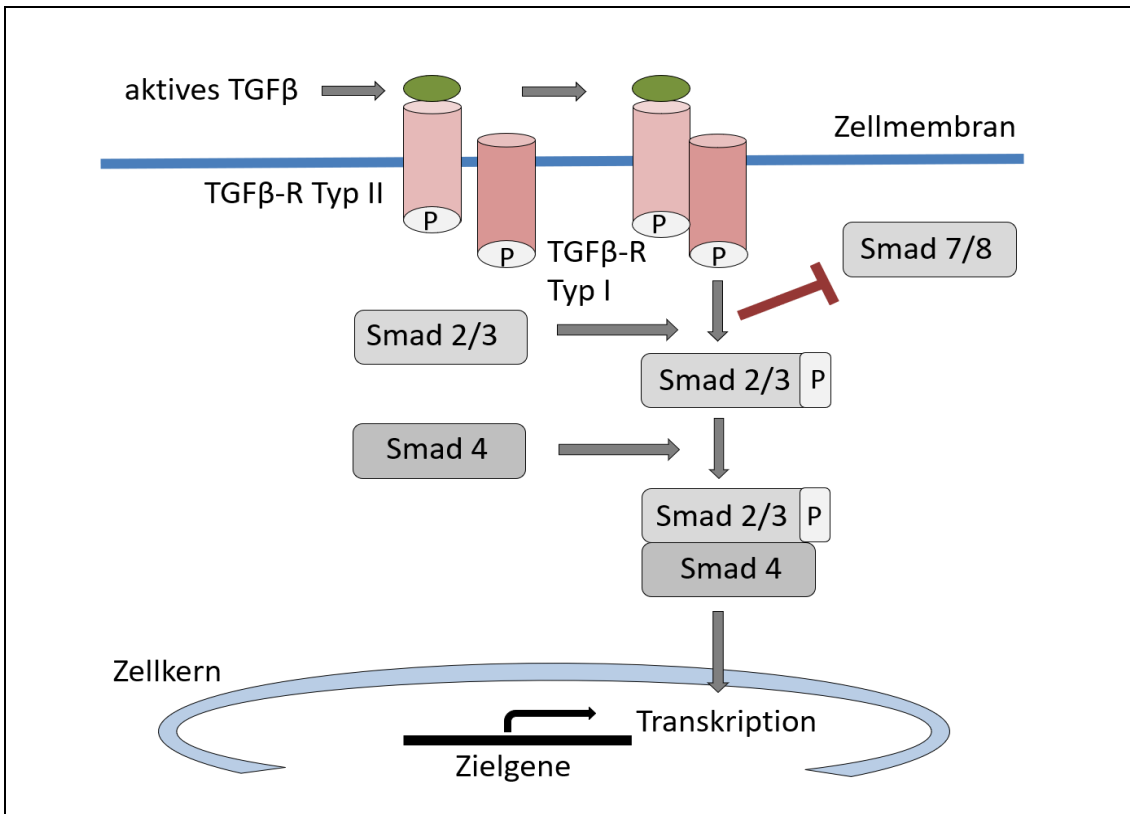
Bei der Synthese des TGF $\beta$  wird zunächst bei allen drei Isoformen eine latente Komplexform, sprich ein Vorläufermolekül erzeugt, welches vor seiner Bindung an spezifische TGF $\beta$ -Rezeptoren (siehe 1.5.3) aktiviert werden muss, um reife, aktive TGF $\beta$ -Dimere freisetzen zu können [49, 51]. Das Vorläufermolekül (Propeptid) lässt sich als Monomer bestehend aus 390-412 Aminosäuren (Pro-TGF $\beta$ s) mit einem Gesamtmolekulargewicht von ca. 55 kDa charakterisieren. Dieses setzt sich aus einem hydrophoben Signalpeptid, einer N-terminalen Prodomäne, dem sogenannten Latenz-assoziierten Peptid (LAP), und einer C-terminalen biologisch aktiven Domäne zusammen [51, 52, 54]. Das LAP ist dabei für die richtige Faltung und Dimerisierung der C-terminalen Domäne des reifen Peptids, sprich des TGF $\beta$ s, erforderlich. Nach der Dimerisierung findet die Proteolyse statt. Hierbei wird das TGF $\beta$ -Dimer mit Hilfe der Calcium-abhängigen Serinendoprotease Furin (Furin-Konvertase) im Golgi-Apparat

von seinem Propeptid abgespalten, wobei dieses mit dem TGF $\beta$ -Dimer durch nichtkovalente Bindung verbunden bleibt. Dies führt zur Bildung des sogenannten „kleinen latenten Komplexes“ (engl. *small latent complex* (SLC)), welcher im zweiten Schritt eine Bindung mit dem Glykoprotein LTBP-1 (engl. *latent TGF $\beta$  binding protein-1*) eingeht und so den „langen latenten Komplex“ (engl. *long latent complex* (LLC)) freisetzt. Dieser wird in der extrazellulären Matrix (ECM, engl. *extracellular matrix*) gespeichert und erzeugt so eine Art TGF $\beta$ -Reservoir, welches gemäß physiologischem bzw. pathophysiologischem Bedarf die lokalen aktiven TGF $\beta$ -Konzentrationen reguliert [51, 52]. Durch Bindung des TGF $\beta$ -Dimers über Disulfidbrücken an das LTBP-1 wird verhindert, dass dieses in seiner latenten Komplexform an spezifische TGF $\beta$ -Rezeptoren bindet [55]. Ausschließlich die reife, aktive Form von TGF $\beta$  ist in der Lage mit seinen Rezeptoren zu interagieren und die intrazelluläre Signaltransduktion zu induzieren [51, 52]. Die Aktivierung des latenten TGF $\beta$ -Komplexes kann durch unterschiedliche Faktoren und physikalische Prozesse erfolgen. Hier ist neben der Latenz-assoziierten Peptidproteolyse die Integrin-vermittelnde Aktivierung zu nennen, welche unabhängig vom proteolytischen Verdau erfolgt. Zudem sind Proteasen einschließlich Plasmin, Thrombin, Elastase und Metalloproteinasen, darunter MMP2 (engl. *matrix metalloproteinase 2*) und MMP9 (engl. *matrix metalloproteinase 9*), sowie weitere Moleküle einschließlich des ECM-Glykoproteins Thrombospondin-1 (TSP-1) und der reaktiven Sauerstoffspezies ROS (engl. *reactive oxygen species*) an der Aktivierung des latenten TGF $\beta$ -Komplexes beteiligt. [48, 51, 52, 56].

### 1.5.3 Signaltransduktion und TGF $\beta$ -Rezeptoren

Nach Freisetzung der reifen, bioaktiven Form von TGF $\beta$  bindet diese an spezifische Zelloberflächenrezeptoren, um so eine Signalkaskade in Gang zu setzen, die die biologischen Effekte des TGF $\beta$  auslöst. Hierbei wird zwischen drei Arten von Rezeptoren unterschieden, dem TGF $\beta$ -Rezeptor Typ I, Typ II und Typ III. Sowohl Typ I- als auch Typ II-Rezeptoren zählen zu den sogenannten transmembranen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren [57]. Exprimiert werden diese in einer Vielzahl von Zelltypen, darunter Endothelzellen [58] und glatte Muskelzellen in der Gefäßwand [57, 59]. Hauptbestandteile der Rezeptoren sind eine extrazelluläre Ligandendomäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Kinasedomäne. TGF $\beta$  Rezeptoren vom Typ I, auch ALKs (engl. *activin receptor-like kinase*) genannt, weisen zudem zwischen Transmembran- und Kinasedomäne eine sogenannte GS-Domäne auf, die reich an sich wiederholenden Serin- und Threonin-Resten ist [51, 52]. Während Typ II-

Rezeptoren in der Lage sind ihre Liganden selbstständig zu binden, können Typ I-Rezeptoren ihre Liganden effizient nur in Verbindung mit Typ II-Rezeptoren binden [54]. Die Bindung des TGF $\beta$  resultiert dabei in der Bildung eines heterotetrameren Rezeptorkomplexes. Hierzu bindet die aktive TGF $\beta$ -Form zunächst an das TGF $\beta$  Typ II-Rezeptordimer, was wiederum zur Rekrutierung des spezifischen TGF $\beta$  Typ I-Rezeptordimers führt. Die darauffolgende Phosphorylierung der GS-Domäne des Typ I-Rezeptors durch den Typ II-Rezeptor hat eine Konformationsänderung des Typ I-Rezeptors und dessen Aktivierung zur Folge [49, 51, 54, 60]. Der aktivierte TGF $\beta$  Typ I-Rezeptor phosphoryliert *downstream* gelegene Effektormoleküle, sogenannte Smads (abgeleitet von den Genen *MAD* (engl. *mothers against decapentaplegic*) der *Drosophila* und *Sma* (engl. *small body size*) des *Caenorhabditis elegans*). Smads sind intrazelluläre Proteine, die mittels Translokation extrazelluläre Signale in den Zellkern weiterleiten und dort zusammen mit anderen Proteinen die Transkription von Zielgenen regulieren [54, 60, 61]. Sie lassen sich in drei Subgruppen unterteilen: die Rezeptor-regulierenden Smads (R-Smads (Smad 1, Smad 2, Smad 3, Smad 5, Smad 8)), die sogenannten common-partner Smads (Co-Smads (Smad 4)), die als Partner für die R-Smads dienen, und die inhibitorischen Smads (I-Smads (Smad 6, Smad 7)). Die R-Smads differenzieren sich wiederum in BMP-Smads und TGF $\beta$ /Aktivin-Smads. Während Smad 1, Smad 5 und Smad 8 BMP-Signale vermitteln, sind Smad 2 und Smad 3 für die TGF $\beta$ -Signalübertragung zuständig. Der aktivierte TGF $\beta$  Typ I-Rezeptor phosphoryliert Smad 2 und Smad 3. Das resultiert wiederum in der Rekrutierung der Co-Smads, sprich dem Smad 4, der unter Komplexbindung mit Smad 2 und Smad 3 in den Kern transloziert und dort die Transkription spezifischer Zielgene reguliert. Smad 7 und Smad 8 fungieren als Antagonisten der TGF $\beta$ -Signaltransduktion. Sie inhibieren die Phosphorylierung von Smad 2 und Smad 3 und verhindern so die TGF $\beta$ -Signalweiterleitung [62, 63]. Im Gegensatz zu den TGF $\beta$  Typ I- und Typ II-Rezeptoren sind Typ III-Rezeptoren nicht direkt an der Signaltransduktion beteiligt, da sie keine Kinaseaktivität vorweisen. Sie fungieren vielmehr als eine Art Korezeptor und regulieren den Zugang des aktiven TGF $\beta$  zu Typ I- und Typ II-Rezeptoren [51, 54, 55, 57]. Hier sind vor allem Betaglycan, ein membranverankertes Proteoglykan, und Endoglin, ein membranassoziertes Glykoprotein mit partieller Sequenzähnlichkeit zu Betaglycan, zu nennen. Endoglin wird in hohen Konzentrationen in Endothelzellen und in geringeren Konzentrationen in Monozyten und anderen Zelltypen exprimiert [63, 64].



**Abb. 1-4: TGFβ-Signaltansduktion.** Schematische Darstellung der TGFβ-vermittelten Signalkaskade, die durch Komplexbildung des TGFβ Typ I- und Typ II-Rezeptors zur Phosphorylierung und Aktivierung von Effektormolekülen, sogenannten Smads, führt, die mittels Translokation extrazelluläre Signale in den Zellkern weiterleiten und dort die Transkription bestimmter Zielgene regulieren. P: Phosphorylierung, TGFβ-R Typ I/II: TGFβ-Rezeptor Typ I/II (modifiziert nach [65]).

#### 1.5.4 Wirkung und Funktion

Als multifunktionales Zytokin ist der TGFβ an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Funktionen und biologischen Prozessen, sowohl in stimulierender als auch in inhibierender Form, beteiligt. Hierzu zählen unter anderem die Proliferation und Differenzierung von Zellen, die Morphogenese, Hämatopoese, Angiogenese und Apoptose [51, 53-55]. Auch bei der Regulierung von Entzündungsreaktionen spielt TGFβ eine entscheidende Rolle und zeigt immunsuppressive und anti-inflammatorische Aktivitäten [54]. Zudem ist der Wachstumsfaktor entscheidend in Reparatur- und Regenerationsvorgänge von Geweben involviert und gilt in Verbindung mit EGF als wirksamer Promotor der Wundheilung [50]. Gemäß dessen ist auf die regulierende Rolle des TGFβ bei der ECM-Synthese zu verweisen. Hierbei ist neben der verstärkten ECM-Proteinexpression auch die inhibierende Wirkung auf die Expression von Proteasen, die entscheidend für den Abbau der ECM verantwortlich sind, als auch der stimulierende Einfluss auf die Expression von Proteaseinhibitoren zu

nennen. Ebenfalls von Bedeutung sind die TGF $\beta$ -bedingte Steuerung der Integrinexpression sowie die Expression von Molekülen, die als Rezeptoren für unterschiedliche extrazelluläre Matrixkomponenten fungieren. In der Gesamtheit resultieren diese Effekte in einer verstärkten ECM-Akkumulation und einer gesteigerten Interaktion zwischen Zellen und ECM, was ausschlaggebend für den Prozess der Wundheilung ist [51]. Als Prototyp der TGF $\beta$ -Familie nimmt der TGF $\beta$ 1 eine zentrale Rolle in der Regulierung der beschriebenen biologischen Vorgänge ein. Zudem wird er aber auch mit weiteren physiologischen Abläufen und Entwicklungsprozessen in Verbindung gebracht [57]. Demnach agiert er als effektiver Signalgeber der Chemotaxis und ist maßgeblich an der Migration von Monozyten, Lymphozyten, Neutrophilen und Fibroblasten beteiligt [51]. Hinsichtlich seiner Rolle in der extrazellulären Matrixproduktion konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$ 1 eine verstärkte mRNA-Expression extrazellulärer Matrixkomponenten wie Kollagen, Fibronectin, Fibronectinrezeptoren und Aktin aufweist [66]. Darüber hinaus wird eine relevante Beeinflussung der Atherogenese durch TGF $\beta$ 1 postuliert [56]. Dieser Einfluss und weitere vaskuläre Effekte des TGF $\beta$ 1 werden unter 1.6 näher erörtert.

### **1.6 Die Bedeutung des TGF $\beta$ 1 für die vaskuläre Wundheilung**

Wie bereits unter 1.5.1 erwähnt, gilt der Wachstumsfaktor TGF $\beta$  als Hauptbestandteil der  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten, aus denen er nach Aktivierung mittels Degranulation freigesetzt wird [50, 51]. Frühere Studien haben gezeigt, dass Thrombozytenaggregate, die in Antwort auf eine vaskuläre Verletzung entstehen, signifikante Mengen an TGF $\beta$ 1 enthalten. Diese werden im Rahmen der Thrombusauflösung allmählich aktiviert und freigesetzt und können so lokal Einfluss auf die Prozesse der Wundheilung nehmen [67]. Aufgrund seiner Bindung an TGF $\beta$ -Rezeptoren, die von vielen Zellen einschließlich Endothelzellen [58] und glatten Muskelzellen [57, 59] exprimiert werden, kann TGF $\beta$ 1 die Proliferation glatter Muskelzellen, die Myofibroblasten-Transdifferenzierung, die Produktion von Kollagen und ECM und die Fibrose stimulieren [68-70]. Dadurch wird der TGF $\beta$ 1 als bedeutender Effektor der Wundheilung, sprich Regulator von Reperatur- und Regenerationsprozessen charakterisiert [56], und steuert somit auch die Neointimabildung. Dies konnte anhand mehrerer Untersuchungen bestätigt werden. Hierbei haben frühere Studien gezeigt, dass eine adenovirale TGF $\beta$ 1-Überexpression in Schweinearterien die Synthese extrazellulärer Matrixproteine und folglich die Bildung

einer intimalen Hyperplasie in Antwort auf eine experimentelle arterielle Verletzung fördern [71]. Ähnliches konnte 1995 von Kanzaki *et al.* in einer Studie an Kaninchen bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass eine Verabreichung von rekombinatem TGFβ1 ebenfalls mit einer verstärkten Akkumulation von Extrazellulärmatrix und einer zunehmenden Intimahyperplasie nach Verletzung der *A. carotis* mittels Ballonkatheter einhergeht [57]. Passend dazu konnte die Neointimabildung durch Neutralisation der TGFβ1-Aktivität unterdrückt werden. Auch im Rattenmodell führte die anti-TGFβ1-Antikörper-Behandlung zur Reduktion extrazellulärer Matrixproteine und zur Unterdrückung der intimalen Läsion nach Angioplastie in der *A. carotis* [72]. Des Weiteren ist bekannt, dass die adventitielle Applikation von TGFβ1-Antisense-Oligonukleotiden im Kaninchenmodell sowohl den Anstieg der TGFβ1-mRNA-Expression inhibiert als auch die Neointimabildung nach Verletzung der Karotisarterien mittels Ballonkatheter minimiert [73]. Ebenso konnte Yamamoto *et al.* anhand einer Ballonverletzung der Karotisarterie in der Ratte zeigen, dass die Transfektion mit Ribozymen, die sich spezifisch gegen das TGFβ-Gen richten, mit einer signifikanten Minderung der TGFβ-mRNA-Expression einhergehen und einen inhibierenden Effekt auf die Kollagen- und Neointimasynthese nach Gefäßverletzung zeigen [74]. Neben den Thrombozyten existieren noch weitere Zelltypen, die TGFβ1 exprimieren. Hierbei sind vorrangig die glatten Muskelzellen zu nennen. Hinsichtlich dessen konnte Majesky *et al.* in einer *in vivo*-Studie zeigen, dass neointimale glatte Muskelzellen in verletzten Karotisarterien der Ratte nach Ballonangioplastie die Produktion des TGFβ1 stimulieren und diesen vermehrt exprimieren [75]. Nikol *et al.* konnte diesen Befund der gesteigerten TGFβ1-Expression in glatten Muskelzellen von isolierten humanen Atheromen bestätigen [76]. Neben TGFβ1 exprimieren Thrombozyten auch TGFβ-Rezeptoren [77]. Hierzu wurde in jüngeren Studien gezeigt, dass eine Ablation des TGFβ1-Rezeptors in glatten Muskelzellen schädliche Wirkungen haben kann. Hier ist exemplarisch auf eine *in vivo*-Studie von Jie Hong Hu *et al.* zu verweisen, in der in glatten Muskelzell-spezifischen TGFβ Typ II-Rezeptor Knockout-Mäusen eine Minderung des aortal medialen TGFβ Typ II-Rezeptor-Proteins generiert wurde. Dies ging mit einer schweren Aortopathie einschließlich Blutung, Ulzeration, Dissektion und Dilatation einher [78]. Ähnliches wurde auch von Pu Yang *et al.* berichtet. Hierbei wurde anhand von genetischen Experimenten in der Maus die funktionelle Beziehung zwischen TGFβ-Rezeptoren und der aortalen Homöostase untersucht. Die Befunde zeigten, dass eine Deletion des TGFβ Typ I-Rezeptors in den glatten Muskelzellen die Bildung von Aortenaneurysmen stimuliert, die teilweise von TGFβ Typ II-Rezeptoren



abhängig sind [79]. Diese Ergebnisse konnten auch in der *in vivo*-Studie von Wei Li *et al.* bestätigt werden. Auch hier wurde beschrieben, dass eine konditionale Inaktivierung des TGF $\beta$  Typ II-Rezeptor-kodierenden Gens in den glatten Muskelzellen eine schwere Aortopathie mit Verdickung, Dilatation und Dissektion der Brustaorta und aneurysmatischer Degeneration induziert [80]. All diese Untersuchungen konzentrierten sich jedoch auf das systemische TGF $\beta$ 1 bzw. die glatten Muskelzellen als zelluläre TGF $\beta$ 1-Quelle und deren Einfluss auf die vaskuläre Wundheilung. Welche Bedeutung TGF $\beta$ 1, exprimiert und freigesetzt von aktivierten Thrombozyten, bei der akuten und chronischen Antwort auf eine vaskuläre Verletzung hat, wurde noch nicht direkt untersucht.

## 2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Koronarangioplastie geht trotz Entwicklung sogenannter Drug-Eluting Stents mit einem vermehrten Auftreten von Restenosen im Bereich des behandelten Gefäßareals einher, was die klinische Langzeitwirksamkeit der Angioplastie begrenzt und folglich den Einsatz etablierter Methoden zur Hemmung der Plättchenaktivierung notwendig macht. Allerdings spielt die Thrombozytenaktivierung am Ort der Gefäßverletzung nicht nur bei der akuten Thrombusbildung eine entscheidende Rolle, sondern dient auch als Stimulus für die Sekretion potenter vaskulärer Wachstumsfaktoren aus der Thrombozyten-Granula und ist somit entscheidend am chronischen Prozess der postoperativen vaskulären Wundheilung beteiligt. Der multifunktionale Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 ist Hauptbestandteil der  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten, aus der er nach Gefäßwandverletzung und anschließender Thrombozytenaktivierung freigesetzt wird. In vorherigen Studien wurde bereits gezeigt, dass TGF $\beta$ 1 sowohl in Thrombozytenaggregaten als auch in Intimahyperplasien vermehrt exprimiert wird und dass eine genetische TGF $\beta$ 1-Überexpression mit einer Verstärkung der Intimahyperplasie reagiert. Des Weiteren konnte mit Hilfe von TGF $\beta$ 1-Antikörpern in mehreren Tiermodellen eine unterdrückte intimale Hyperplasie nach Angioplastie der *A. carotis* nachgewiesen werden. Dies konnte mit Hilfe von TGF $\beta$ 1-Antisense-Oligonukleotiden bestätigt werden. All dies bezieht sich jedoch nur auf das systemische TGF $\beta$ 1. Darum wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, was passiert, wenn TGF $\beta$ 1 spezifisch in den Thrombozyten als deren Hauptproduktionsquelle fehlt. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung von TGF $\beta$ 1, exprimiert und freigesetzt von aktivierten Thrombozyten, für die arterielle Thrombusbildung, -auflösung und die Neointimabildung in Antwort auf eine experimentelle Gefäßwandverletzung zu untersuchen. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurden folgende *in vivo*- und *ex vivo*-Analysen durchgeführt:

- Als experimentelle Versuchsgruppe standen Mäuse mit Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-Deletion und deren Kontrollen zur Verfügung (Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-KO und -WT-Mäuse). Mittels Eisen-(III)-chlorid-Modell wurde die Rolle des Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1 auf die Neointimabildung, Lumenstenose, Media-Fläche und Gefäßgesamtfläche 21 Tage nach experimenteller Gefäßwandverletzung in der *A. carotis* morphometrisch untersucht.
- Um zu überprüfen, ob die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion auch die akute arterielle Thrombose beeinflusst, wurde bei den Versuchstieren sowohl vor als

auch nach Gefäßwandverletzung mittels Dopplersonde die Blutflussgeschwindigkeit in der *A. carotis* gemessen und anschließend die Okklusionszeit und die Thrombusstabilität bestimmt.

- Die möglichen Effekte, die die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion auf die Hämostase hat, wurden anhand mehrerer Tests an nicht operierten Versuchstieren untersucht. Hierzu wurde bei einem Teil der Versuchstiere mittels *Tail tip bleeding-Assay* die Blutungszeit bestimmt, um so Informationen über die hämostatische Aktivität der Thrombozyten zu erhalten. An einem weiteren Teil der Tiere wurde mit Hilfe der Aggregationsmessung die Funktionalität isolierter Thrombozyten untersucht. Bei einer dritten Gruppe unverletzter Tiere wurde eine Blutzellanalyse durchgeführt, um mögliche Unterschiede in den hämatologischen Parametern der Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT und -KO-Mäuse zu detektieren.
- Zur Klärung möglicher Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die Thrombusauflösung wurde an einem Teil der Versuchstiere sechs Tage nach Gefäßwandverletzung die thrombotische Okklusion morphometrisch untersucht.
- Mittels ELISAs wurden die aktiven TGFβ1-Plasmaspiegel der unverletzten als auch verletzten Versuchstiere sechs und 21 Tage nach Gefäßwandverletzung bestimmt, um zu überprüfen ob die Freisetzung des TGFβ1 mit der vaskulären Thrombose bzw. Wundheilung korreliert.
- Um die morphometrischen Befunde der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion drei Wochen nach experimenteller Gefäßwandverletzung zu verifizieren, wurde die Zelldichte der vaskulären Läsionen als auch deren zelluläre Zusammensetzung (proliferierende Zellen, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, intersitiales Kollagen, TGFβ-Rezeptoren, TGFβ-Liganden, mesenchymale Zellen, Makrophagen, chemotaktische Zytokine und Proteasen) und die Reendothelialisierung mit Hilfe histochemischer bzw. immunhistochemischer Färbungen näher untersucht.

## 3 MATERIAL

### 3.1 Laborgeräte

Artikel	Firma
Aggregometer <i>APACT 4S PLUS</i>	Diagnostic Systems, Holzheim
Analysewaage MC1 <i>Analytic AC 210 S</i>	Satorius, Göttingen
Dampf-Sterilisator <i>WEBECO Serie EA</i>	WEBECO GmbH, Selmsdorf
Dopplerschallkopf <i>Transonic® Flowprobe</i>	Transonic Systems Inc., New York, USA
Einbett-Ausgießformen	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Einbettautomat <i>LEICA TP1020</i> , zur automatischen Gewebeeinfiltration	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Elektronischer Timer	TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Wertheim
<i>Eppendorf flexid Mastercycler® nexus gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Eppendorf ThermoMixer® C</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Forschungsblutflussmessgerät <i>T106 Small animal blood flow meter</i>	Transonic Systems Inc., New York USA
Hämatologieanalysator <i>Sysmex KX-21N</i>	Sysmex Corporation, Chuoko, Kobe, J
Kaltlichtquelle <i>KL 1500 compact</i>	Schott AG, Mainz
Liebherr Kühl- und Gefrierkombi (4°C, -20°C)	Liebherr-International AG, Bulle, CH
Magnetrührer - <i>IKA C-MAG MS7</i> - <i>IKA-COMBIMAG REO</i>	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Magnetrührer <i>VS-C4</i>	VWR International, Pennsylvania, USA
Mikroskop <i>Olympus® BH2</i> , zur mikroskopischen Kontrolle der Histologie	Olympus® Corporation, Tokio, J
Mikrotom <i>LEICA RM2245</i>	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Mikrowellengerät <i>SHARP R-200INW</i>	SKARP K.K., Osaka, J
Mikrozentrifuge <i>Eppendorf Centrifuge 5424 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Minizentrifuge <i>Sprout</i>	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA

MATERIAL

Narkoseanlage mit - Maus-Beatmungsgerät <i>MiniVent</i> Type - Gasversorgungsanlage und Gasevakuierungssystem <i>IMS Fluosorbers</i> - Sauerstoff-Flowmeter [0,2-2,0 L/min] - Präzisionsverdampfer für Isofluran - Anästhesiekammer <i>Fluovac</i> - Druckminderer	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Objektivrevolver <i>U-D6RE</i> mit Polarisationsaufsatz <i>BX-POL</i> (Analysator und Polarisator), für die Mikroskopie der Picro-Siriusrot-Färbung	Olympus® Corporation, Tokio, J
Paraffinausgießstation <i>LEICA EG1150 H</i> , beheizt	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
pH-Meter <i>pHenomena</i> ® pH 1000L mit pH-Elektrode <i>pHenomena</i> ® 110	VWR International, Pennsylvania, USA
Plattformschüttler, <i>Titramax 1000</i> , kreisförmig, vibrierend	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Plattenphotometer Infinite® M200 PRO NanoQuant	TECAN Group Ltd., Männedorf, CH
Präzisionswaage <i>EBI 1200-1</i>	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Präzisionswaage <i>MC1 Laboratory LC 2200 P</i>	Satorius, Göttingen
Reinstwassersystem <i>PURELAB Ultra</i>	ELGA LabWater by Veolia Water Technologies, Celle
Scotsman® Flockeneisbereiter <i>AF100</i>	Scotsman® Ice Systems, Vernon Hills, Illinois, USA
Spannungsquelle <i>PowerPac</i> ™ <i>Basic</i> , für Elektrophoresekammern	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
Stereo-Zoom-Mikroskop <i>VisiScope SB350H</i>	VWR International, Pennsylvania, USA
Streckbadkombination Typ 16801, für Paraffinschnitte	MEDAX GmbH & Co. KG., Neumünster
Systemmikroskop <i>OLYMPUS BX51</i>	Olympus® Corporation, Tokio, J
Taschenrechner <i>Canon LS-8TCG</i>	Canon Inc., Tokio, J
Tischzentrifuge <i>Mini Centrifuge NG002B</i> mit Rotor für PCR-8er-Strips	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
Tischzentrifuge <i>Mini Spin</i> ®	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenschrank <i>DRY-Line</i> ®, mit natürlicher Luftumwälzung	VWR International, Pennsylvania, USA

Ultratiefkühlschrank <i>Innova® U725-G</i>	New Brunswick by Eppendorf AG, Hamburg
UV-Geldokumentationskammer	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Vortexer <i>VORTEX-GENIE® 2</i>	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Wärmeplatte <i>Hot Plate 062</i> mit Temperaturregler <i>Hot Plate Controller</i>	LaboTec GmbH & Co. KG, Dillenburg
Wärme- und Trockenschrank <i>HERATHERM</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Zentrifuge mit Ausschwingrotor <i>Eppendorf Centrifuge 5810 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.2 Software

Artikel	Verwendung	Firma
APACT 4S PLUS, Version 1.21c	Analyse Plättchenaggregation	Diagnostic Systems, Holzheim
EndNote X7	Literaturverwaltungsprogramm	EndNote™ by Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
GraphPad Prism 5.01	Statistikprogramm	GraphPad Software, Inc., Kalifornien, USA
Image-Pro® PLUS 7.0	Graphikprogramm	Media Cybernetics, Inc., Maryland, USA
Intas GDS, Version 3.34	UV-Geldokumentation	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Magellan™ 7.1 SP1	Photometrische Analyse	TECAN Group Ltd., Männedorf, CH
WINDAQ® Data Acquisition, Version 2.61	Analyse Blutfluss	DATAQ Instruments, Akron, Ohio, USA
WINDAQ® Waveform Browser	Analyse Blutfluss	DATAQ Instruments, Akron, Ohio, USA

### 3.3 Zubehör und Hilfsmittel

Artikel	Firma
Bechergläser <i>DURAN</i> <sup>®</sup> (600 ml, 250 ml, 100 ml)	Schott AG, Mainz
Chemikalienlöffel, beidseitig	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Doppelspatel	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dosierhilfe <i>Eppendorf Varispenser</i> <sup>®</sup>	Eppendorf AG, Hamburg
Eiswannen <i>Magic Touch 2<sup>TM</sup> Icewares</i>	Bel-Art Products, Wayne, NJ, USA
<i>Eppendorf Multipette</i> <sup>®</sup> M4	Eppendorf AG, Hamburg
<i>Eppendorf Tip-Tubes</i> , zur Reagenzentnahme mit Mehrkanalsystemen	Eppendorf AG, Hamburg
Extra feine Schere <i>Bonn</i> (8,5 cm, Spitzen: gerade, spitz, Art.-Nr. 14084-08)	Fine Science Tools <sup>®</sup> , Heidelberg
Färbegestelle mit Drahtbügel (85 x 60 x 45 mm)	VWR International, Pennsylvania, USA
Färbeglasküvetten mit Deckel (105 x 85 x 70 mm)	VWR International, Pennsylvania, USA
Färbekästen mit Deckel nach <i>Hellendahl</i> , für acht Objektträger	VWR International, Pennsylvania, USA
Federschere <i>Vannas-Tübingen</i> (8,5 cm, Spitzen: gerade, Art.-Nr. 15003-08)	Fine Science Tools <sup>®</sup> , Heidelberg
Gefrierbehälter <i>Nalgene</i> <sup>TM</sup>	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Gasflaschen mit Schraubdeckel (20 ml), zur Gewebsaufbewahrung	VWR International, Pennsylvania, USA
Haltehebel (aus Büroklammer und Pinnadel)	selbst hergestellt
Horizontales Elektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, USA
- Pufferkammern <i>Sub-Cell</i> <sup>®</sup> <i>GT Cell</i>	
- Deckel mit Spannungskabel	
- Gießstation mit Klemmvorrichtung und Spanner	
- Gelträger/Gelschlitten aus Glas (15 x 15 cm, 30 x 15 cm)	
- Käbme mit 15 und 20 Taschen	
- Wasserwaage	
Inkubationsschalen für die Immunhistologie	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Kanister mit Ablasshahn <i>Nalgene</i> <sup>®</sup>	VWR International, Pennsylvania, USA
Klemme/Nadel-Halter <i>Olsen-Hegar</i> (12 cm, Spitzenbreite: 1,5 mm, Klemmlänge: 8,5 mm, Art.-Nr. 12002-12)	Fine Science Tools <sup>®</sup> , Heidelberg
Kühlbox <i>PCR-Cooler</i> , für 96-Well-Mikrotiterplatten	Eppendorf AG, Hamburg
Kryo-Aufbewahrungsboxen <i>Rotilabo</i> <sup>®</sup> , aus PP	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kryoboxen <i>Rotilabo</i> <sup>®</sup> , aus Karton mit Rastereinsatz	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Laborflasche, Braunglas, vierkant	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Laborflaschen <i>DURAN</i> <sup>®</sup> mit PP-Schraubkappe (2000 ml, 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml, 40 ml)	Schott AG, Mainz
Laborschale mit Rillen <i>Rotilabo</i> <sup>®</sup>	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnetrührstäbchen und Magnetrührstab-Entferner	VWR International, Pennsylvania, USA
Maus-Fixiereinheit (Maus-Restrainer)	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober- Beerbach
Messzylinder aus PP (100 ml)	Vitlab GmbH, Grossostheim
Messzylinder aus PP (2000 ml, 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100 ml)	Kartell Labware, Noviglio, I
Mikrotom-Klingen <i>Leica DB80 LS</i>	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Multikanalpipette <i>Eppendorf Research</i> <sup>®</sup> <i>plus</i> (30-300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Objektträger-Boxen für 100 Standard-Objektträger	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA
Objektträger-Mappen für 20 Standard-Objektträger (76 x 26 mm)	VWR International, Pennsylvania, USA
Pinzette (10 cm, gerade, Spitzen: gezahnt, Art.-Nr. 11150-10)	Fine Science Tools <sup>®</sup> , Heidelberg
Pinzette (10 cm, gebogen, Spitzen: gezahnt, Art.-Nr. 11151-10)	Fine Science Tools <sup>®</sup> , Heidelberg
Pinzetten (fein) <i>Dumont # 5/45</i> (Art.-Nr. 11251-35)	Fine Science Tools <sup>®</sup> , Heidelberg
Pipette <i>Eppendorf Reference</i> <sup>®</sup> 2 (0,1-2,5 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten <i>Eppendorf Research</i> <sup>®</sup> <i>plus</i> (100-1000 µl, 10-100 µl, 1-10 µl)	Eppendorf AG, Hamburg



## MATERIAL

Pipettierhilfe für Pipetten von 0,1-100 ml <i>Eppendorf Easypet® 3</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Rack für FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, A
Rack für 50 ml-Falcon ( <i>1-Well Tube Rack [HS23053A]</i> )	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA
Racks für Reaktionsgefäße	VWR International, Pennsylvania, USA
Racks für 15 ml- und 50 ml-Falcons	VWR International, Pennsylvania, USA
Spritzflasche <i>Nalgene®</i>	VWR International, Pennsylvania, USA
Sprühflasche <i>BÜRKLE LaboPlas®</i>	VWR International, Pennsylvania, USA
Trichter	VWR International, Pennsylvania, USA
Tropfflasche <i>Nalgene®</i> aus LDPE (30 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA

### 3.4 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
Abwurf-Sammelbehälter <i>Dahlhausen Sharpsafe®</i> , 4 L	P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln
Adhäsion-Objektträger <i>Superfrost Ultra plus®</i> , weiß, (J3800AMNZ)	Thermo Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co.KG, Braunschweig
Aluminiumfolie <i>Universal</i> , weich, glatt (0,015 x 300 mm)	VWR International, Pennsylvania, USA
Blutentnahmeröhrchen <i>S-Monovette® 9 ml K3E</i> , Inhalt: 1,6 mg EDTA/ml Blut (02.1066.001)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Chirurgisches Nahtmaterial <i>Ethilon® 6-0</i> , Polyamid, (697H)	Ethicon, division of Johnson & Johnson Medical Limited, Edinburgh, Schottland
Deckgläser <i>MENZEL-GLÄSER</i> (24 x 60 mm)	Thermo Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co.KG, Braunschweig
Einbettkassetten <i>Bio-Net®</i>	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermunde

Einmal-Skalpell, steril verpackt	Swann-Morton, Sheffield, GB
Einmalspritzen <i>Injekt</i> <sup>®</sup> (2 ml, 5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmalspritzen <i>Omnifix</i> <sup>®</sup> -F (1 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Einmal-Wägeschalen <i>Diamond Weighing Boats</i> (5 ml, antistatisch)	Heathrow Scientific, Vernon Hills, Illinois, USA
Einmal-Wägeschalen <i>VWR</i> <sup>®</sup> <i>Diamond Weighing Boats</i> (25 ml, antistatisch)	VWR International, Pennsylvania, USA
Entsorgungsbeutel aus PP, dampfsterilisierbar (200 x 300 mm)	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FACS-Röhrchen <i>Falcon</i> <sup>®</sup> , 5 ml Rundbodenröhrchen (12 mm x 75 mm)	Corning Inc., Corning, USA
Falcons <i>CELLSTAR</i> <sup>®</sup> <i>Tubes</i> mit Schraubverschluss (aus PP, 15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AU
Filterpapier <i>Whatman</i> <sup>®</sup> No.1	Whatman <sup>®</sup> by GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Filterspitzen <i>TipOne</i> <sup>®</sup> - 1000 µl Filter Tip (S1126-7810) - 100 µl Bevelled, Filter Tip (S1120-1840) - 10/20 µl XL Graduated, Filter Tip (S1120-3810)	Starlab International GmbH, Hamburg
Filtrierpapier, MN 615 ¼, Durchmesser 150 mm	Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren
Fixierklebeband <i>TimeMed</i> <sup>®</sup> <i>Labeling Systems</i>	VWR International, Pennsylvania, USA
Fixierpflaster Leukosilk <sup>®</sup> S (2,5 x 9,2 cm)	BSN medical GmbH, Hamburg
Fixierpflaster Leukofix <sup>®</sup> , transparent (2,5 x 9,2 cm)	BSN medical GmbH, Hamburg
ImmEdge <sup>™</sup> Pen	Vector Laboratories Inc., Kalifornien, USA
Insulinspritzen <i>Omnican</i> <sup>®</sup> U-100 Insulin, 1 ml/100 I.U., 30G x ½" (0,3 x 12 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen <i>Microlance</i> <sup>™</sup> 3 (20G x ½" – Nr.1; 0,9 x 40 mm)	BD (Becton, Dickinson and Company), USA
Kanülen <i>Microlance</i> <sup>™</sup> 3 (26G x ½" ; 0,45 x 13 mm)	BD (Becton, Dickinson and Company), USA
Klebepunkte für 1,5 ml Röhrchen <i>VWR Cryo-Pro</i> <sup>®</sup> <i>Labels</i> , farbig	VWR International, Pennsylvania, USA

## MATERIAL

Kompressen <i>MaiMed</i> <sup>®</sup>	MaiMed GmbH, Neuenkirchen
Korkplatten (zugeschnitten ca. 8 x 10 cm)	Baumarkt
Kosmetiktücher, 2-lagig	WEPA Professional GmbH, Arnsberg
Mikro-Planküvetten, inkl. Mixer 1 x 4 mm für APACT 4S PLUS	DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim
Mehrzwecktuch <i>Multizell</i> <sup>®</sup> , 3-lagig, natur (27 x 32 cm)	ZVG Zellstoff-Vertriebs-GmbH & Co. KG, Troisdorf
Mundschutz <i>The Lite One Procedure Mask</i> <sup>®</sup>	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz-Rheinhafen
Pasteurpipetten (150 mm)	VWR International, Pennsylvania, USA
PCR-Gefäße 8er-Strips (aus PP, mit anhängendem Einzeldeckel, 0,2 ml) für RT-PCR	Life Science Products, BRAND GmbH & Co.KG, Wertheim
Perfusionsbesteck/Sicherheits-Venenpunktionsbesteck <i>Venofix</i> <sup>®</sup> <i>Safety</i> (25G x 1/4" ; 0,5 x 19 mm)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pipettenspitzen für <i>Eppendorf Multipette</i> <sup>®</sup> <i>Combitips advanced</i> <sup>®</sup> (5,0 ml, 2,5 ml, 1,0 ml, 0,5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen <i>TipOne</i> <sup>®</sup> - 1000 µl Blue, Graduated Tip (S1111-6001) - 300 µl Graduated Tip, refill (F117400H) - 200 µl Yellow Tip (S1111-0006) - 10/20 µl XL Graduated Tip (S110-3000)	Starlab International GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße <i>Safe-Lock Tubes</i> <sup>®</sup> (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten <i>CELLSTAR</i> <sup>®</sup> , steril (10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, AU
Transferpipetten 5,8 ml, 15,5 cm, unsteril	VWR International, Pennsylvania, USA
Transferpipetten 5,8 ml, 14,7 cm, unsteril	VWR International, Pennsylvania, USA
Untersuchungshandschuhe <i>Sempercare</i> <sup>®</sup> <i>premium</i> , Latex, Größe S 6-7, puderfrei	Semperit Technische Produkte GmbH, Wien, AU
Untersuchungshandschuhe <i>Supreno</i> <sup>®</sup> , Nitril, Größe S 6-7, puderfrei	Mikroflex <sup>®</sup> Corporation, Nevada, USA
Untersuchungshandschuhe <i>Vasco</i> <sup>®</sup> <i>Nitril blue</i> , Größe S 6-7, puderfrei	B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Verschlussfolie <i>Parafilm</i> <sup>®</sup> <i>M</i> (10 cm x 38 m)	Bemis Company Inc., Neenah, USA
VWR <i>Einfache Tissue-Wischer</i> , einlagig weiße Wischer (11,4 x 21,0 cm)	VWR International, Pennsylvania, USA
Wattestäbchen (15 cm)	Medical Care & Serve Industry <sup>®</sup> , Willich
96-Well Mikrotiterplatte <i>NUNK</i> <sup>™</sup> <i>MirkroWell</i> <sup>™</sup> , mit Deckel, Type F96, transparent	NUNK, Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Wischtücher <i>KIMTECH PREP</i> <sup>®</sup> <i>Process Wipers</i> (49 x 38 cm)	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz-Rheinhafen
Zellstoff <i>Zick Zack Handtuchpapier</i> , 2lagig	Basisbedarf Universitätsmedizin Mainz

### 3.5 Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Firma
Acid Fuchsin, für Gewebefärbung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose Broad Range, <i>Rot</i> <sup>®</sup> <i>agarose</i> , <i>BioScience-Grade</i>	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA), endotoxin geprüft, ≥98.0%, <i>CELLPURE</i> <sup>®</sup>	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Anilinblau (C.I. 42780), reinst, wasserlöslich	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Augen- und Nasensalbe <i>Bepanthen</i> <sup>®</sup> mit 5% Dexpanthenol	Bayer AG, Leverkusen
Calciumchlorid Dihydrat, ≥99,0%, reinst, für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Citratsäure Monohydrat, ≥99,0%, reinst	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-(+)-Glucose (Dextrose), ≥99,5%, reinst, für die Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Dako Antibody Diluent</i> (mit Hintergrundreduzierungskomponente)	Dako North America, Inc., Kalifornien, USA
Dekontaminationslösung <i>RNase AWAY</i> <sup>®</sup>	Molecular BioProducts by Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
<i>Direct Red 8</i> (Sirius Rot), Farbstoffgehalt 25%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

## MATERIAL

EDTA Dinatriumsalz, Dihydrat zur Analyse	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eindeckmedium <i>Eukitt® quick-hardening mounting medium</i> , für die Mikroskopie	Fluka® Analytical by Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eindeckmedium <i>SHANDON IMMU-MOUNT™</i> , für die Mikroskopie	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Eisen-III-chlorid ( <i>Iron (III) chloride hexahydrate</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure 100%, <i>ROTIPURAN® 100%</i> , reinst	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 70% vergällt, ≥70%, mit ca. 1% MEK	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 96%, vergällt, ≥96%, mit ca. 1% MEK	PanReac by AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 100% vergällt, ≥99,8%, mit ca. 1% MEK	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Formaldehydlösung 37%, <i>ROTIPURAN® 37%</i> , reinst	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Gewebekleber <i>Histoacryl®</i> , aus Enbucrilat	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Hämatoxylin (C.I: 75290), für die Mikroskopie	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylinlösung <i>Gill Nr.3</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES <i>Pufferan®</i> , ≥99,5%, reinst	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Immersionsöl Type F <i>Immoil-F30CC</i> , für die Mikroskopie	Olympus® Corporation, Tokio, J
Iod, ≥99,8%, reinst, resublimiert	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropylalkohol (2-Propanol)	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart
Isotone Natriumchloridlösung 0,9% (Spüllösung)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Isotone Natriumchloridlösung 0,9% (steril, 10ml-Glasflasche) für Injektionen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kaliumchlorid, ≥99,5%, reinst, zur Analyse	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumjodid, ≥99,5%, reinst	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Magnesiumchlorid, ≥98,5%, reinst, wasserfrei	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol, ≥99,5%, reinst	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Midori Green Advance</i> , zum Anfärben von DNA oder RNA in Agarosegelen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Molybdatophosphorsäure Hydrat, reinst	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nagellack	Drogerie
Natriumchlorid, ≥99,5%, reinst	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumphosphat, monobasisch, ≥99,0%, reinst, für die Zellkultur	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumthiosulfat Pentahydrat, ≥99,5%, reinst	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumzitat, dreibasisch, ≥99,0%, reinst	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natronlauge 2mol/L (2 N) Maßlösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
Normales Ziegenserum, 100 mg/ml, (ab156046)	Abcam®, plc., Cambridge, UK
Paraffin <i>Surgipath® Paraplast®</i>	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar
Peqlab <i>DirectPCR® Lyse-Reagent Ear</i>	Peqlab, VWR International, Pennsylvania, USA
Peqlab <i>DirectPCR® Lyse-Reagent Tail</i>	Peqlab, VWR International, Pennsylvania, USA
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 (1x)</i>	Gibco® by life Technologies™, Kalifornien, USA
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 (10x)</i>	Gibco® by life Technologies™, Kalifornien, USA
Phosphotungstensäure Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pikrinsäure wässrig, gesättigt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Ponceau BS</i> (Biebrich Scarlet), Farbstoffgehalt ~60%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Roticlear® für die Histologie	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe

<i>Rotiphorese</i> <sup>®</sup> 50x TAE Puffer	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure 1M Maßlösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
Salzsäure 37%, rauchend, <i>ROTIPURAN</i> <sup>®</sup> 37%, reinst	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Schnelldesinfektionspräparat <i>Terralin</i> <sup>®</sup> liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
TRIS, ≥99,9%, <i>Blotting-Grade</i>	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton <sup>®</sup> X100, reinst	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Van Gieson-Lösung, für die Mikroskopie	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid 30%, stabilisiert	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Xylol (Isomere), ≥98,0%, reinst, für die Histologie	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zinkformalin ( <i>Zinc Formalin Fixative</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

## 3.6 ELISA und Kits

### 3.6.1 ELISA

Artikel	Firma
<i>Quantikine</i> <sup>®</sup> ELISA Mouse/Rat/Porcine/Canine TGFβ1 Immunoassay (765250.4)	R&D Systems Inc., Minnesota, USA

### 3.6.2 Kits

Artikel	Firma
AEC Peroxidase (HRP) Substrat-Kit (SK-4200)	Vector Laboratories Inc., Kalifornien, USA
DAB Peroxidase (HRP) Substrat-Kit (SK-4100)	Vector Laboratories Inc., Kalifornien, USA
<i>Vectastain</i> <sup>®</sup> <i>Elite</i> <sup>®</sup> ABC HRP Kit (Peroxidase, Standard) (PK-6100)	Vector Laboratories Inc., Kalifornien, USA

## 3.7 Antikörper für die Immunhistochemie

### 3.7.1 Primärantikörper

Bei den nachfolgend aufgeführten Primärantikörpern handelt es sich um unkonjugierte murine Antikörper, die bei der Immunhistochemie zum Einsatz kamen.

Spezifität	Wirt	Isotyp	Art.-Nr./Clone	Firma
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Maus	monoklonal	A2547/ clone 1A4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<b>CD31 (PECAM-1)</b>	Ratte	monoklonal	DIA-310	DIANOVA Vertrieb GmbH, Hamburg
<b>BMP7</b>	Kaninchen	polyklonal	ab56023	Abcam plc. Cambridge, UK
<b>FSP1 (S100A4)</b>	Kaninchen	monoklonal	NBP1-89402	Novus Biologicals LLC, Colorado, USA
<b>F4/80</b>	Ratte	monoklonal	MCA497GA	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
<b>MMP2</b>	Kaninchen	polyklonal	ab110186	Abcam plc. Cambridge, UK
<b>MMP9 (C-20)</b>	Ziege	polyklonal	sc-6840	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA
<b>PCNA</b>	Maus	monoklonal	sc-56	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	Kaninchen	monoklonal	ab32570	Abcam plc. Cambridge, UK
<b>SDF1<math>\alpha</math></b>	Kaninchen	polyklonal	sc-28876	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA
<b>TGF<math>\beta</math>RI</b>	Kaninchen	polyklonal	250879	Abbotec LLC, San Diego, USA
<b>TGF<math>\beta</math>RII</b>	Kaninchen	polyklonal	PA5-35076	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
<b>Thrombin</b>	Kaninchen	polyklonal	ab83981	Abcam plc. Cambridge, UK



### 3.7.2 Sekundärantikörper

Alle für die Immunhistochemie zur Verfügung stehenden und im Folgenden aufgeführten Sekundärantikörper waren Peroxidase-gekoppelt.

Spezifität	Wirt/Isotyp	Konjugat	Art.-Nr.	Firma
<b>Anti-Kaninchen</b>	Goat/IgG (H+L)	Biotin	B2770	Molecular Probes® by Life Technologies™, Oregon, USA
<b>Anti-Maus</b>	Goat/IgG (H+L)	Biotin	B2763	Molecular Probes® by Life Technologies™, Oregon, USA
<b>Anti-Ratte</b>	Goat/IgG (H+L)	Biotin	A10517	Molecular Probes® by Life Technologies™, Oregon, USA
<b>Anti-Ziege</b>	Rabbit/IgG (H+L)	Biotin	A10518	Molecular Probes® by Life Technologies™, Oregon, USA

## 3.8 Enzyme und Standards

### 3.8.1 Enzyme

Artikel	Firma
Apyrase from potatoes, ATase $\geq$ 200 units/mg Protein (A6535)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>peqGOLD</i> Proteinase-K, 20 mg/ml (04-1076)	Peqlab, VWR International, Pennsylvania, USA
Thrombin aus Rinderplasma, 600-2000 NIH units/mg Protein (T6634)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 3.8.2 Standards

Artikel	Firma
DNA-Ladder 100 bp (N3231L)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main

### 3.9 PCR-Reagenzien für die Genotypisierung transgener Mäuse

Artikel	Firma
Green <i>GoTaq<sup>®</sup> Flexi</i> Buffer 5x, (M891A)	Promega Corporation, Fitchburg, USA
MgCl <sub>2</sub> , 25mM (A351H)	Promega Corporation, Fitchburg, USA
PCR Nucleotide Mix (C1145)	Promega Corporation, Fitchburg, USA
<i>GoTaq<sup>®</sup> G2 Flexi</i> DNA Polymerase (M7808)	Promega Corporation, Fitchburg, USA
Wasser, <i>BioScience-Grade</i> , nuklease-frei und autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser (T143.1)	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### 3.10 Oligonukleotidsequenzen für die Genotypisierung transgener Mäuse

Alle für die Genotypisierung verwendeten Primer wurden von Eurofins Genomics bezogen und mittels Genotypisierungs-PCR (siehe 4.1.4.2) und anschließender Agarosegelelektrophorese (siehe 4.1.4.3) analysiert.

murin	Größe (bp)	forward (5' → 3')	reverse (5' → 3')
<b>Pf4-Cre</b>	Transgen: 450	CCCATACAGCACAC CTTTTG	TGCACAGTCAGCAG GTT
<b>TGFβ1</b>	Mutant: 277 WT: 216 Heterozygot: 216+277	AAGACCTGGGTTGG AAGTG	CTTCTCCGTTTCTCT GTCACCCTAT

## 3.11 Versuchstiere und Haltungszubehör

### 3.11.1 Versuchstiere

Mausstamm	Beschreibung	Quelle
Pf4-Cre	C57BL/6-Tg(Pf4-Cre) Q3Rsko/J-Stamm; Cre-Rekombinase-Expression unter der Kontrolle des murinen Megakaryozyten-spezifischen Plättchenfaktor 4 (Pf4)-Promotors [81]	Zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. M. Bosmann, Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) der Universitätsmedizin Mainz
TGFβ1 flox	Tgfb1tm2.1Doe/J-Stamm durch Insertion eine LoxP-flankierten (floxed) Expressionskassette auf Exon 6 des TGFβ1 Allels [82]	Zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. M. Bosmann, CTH der Universitätsmedizin Mainz

### 3.11.2 Haltungsfutter und Haltungszubehör

Beschreibung	Quelle
Alleinfuttermittel für die Haltung von Mäusen Ssniff® R/M-H Extrudat (Ssniff® V1536): <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kohlenhydrate 58 kcal%</li> <li>- Rohfaser, XF 5,0%</li> <li>- Rohfett, XL 3,4% (9 kJ% Fett)</li> <li>- Rohprotein, XP 19,3% (33 kJ% Protein)</li> <li>- ME 13,0 MJ/kg</li> </ul>	Ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest
Einstreu und Nistmaterial	Standardmaterial Versuchstiereinrichtung
Käfig Typ 2 (265 x 205 x 140 mm; Laufbodenfläche 360 cm <sup>2</sup> ) mit <ul style="list-style-type: none"> <li>- innenliegendem Gitterdeckel Typ 2/5023621</li> <li>- konventioneller Filterhaube Typ FIH 2-MB</li> <li>- Trennblech Typ TB 2-BS</li> </ul>	ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel
Maus-Tunnel (100 x Ø 50 mm)	ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel
Tränkflasche mit Silikondichtungsring und Tränkkappe	ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel

### 3.12 Analgetika, Anästhetika und Sauerstoff

Artikel	Firma
Inhalatives Anästhetikum <i>Isoflurane Forene® 100%</i> (V/V)	Abbott GmbH, Wiesbaden
Ketamin-hameln, 50 mg/ml (Injektionslösung)	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln
Novalgin <i>Novaminsulfon-ratiopharm®</i> , 500 mg/ml (Tropfen zum Einnehmen)	Ratiopharm GmbH, Ulm
Sauerstoff <i>medicAL</i> für medizinische Zwecke (Gas, druckverdichtet)	AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf
Xylazin <i>Rompun®</i> 2% (Injektionslösung)	Bayer AG, Leverkusen

### 3.13 Lösungen und Puffer

Bei der Herstellung der nachfolgend aufgelisteten Lösungen und Puffer wurde ausschließlich deionisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet, welches zuvor mittels des Reinstwassersystems *PURELAB Ultra* aufbereitet wurde.

Neben den in 3.13.1 und 3.13.2 aufgeführten Lösungen und Puffer wurde des Weiteren Ethanol 50% selbst hergestellt und zur Entparaffinierung der Gewebeschnitte verwendet. Hierzu wurde 500 ml 100%iger Ethanol mit 500 ml ddH<sub>2</sub>O versetzt.

### 3.13.1 Gewebefärbungen

#### Masson-Trichrom (MTC)-Färbung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
<b>Anilinblau-Lösung 2,5%</b>	2,5 g	Anilinblau
	auf 100 ml	ddH <sub>2</sub> O einstellen
	2 ml	Essigsäure 100%
<b>Biebrich-Scarlet-Acid-Fuchsin</b>	90 ml	Biebrich-Scarlet/Ponceau BS (1% wässrige Lösung: 1 g auf 100 ml ddH <sub>2</sub> O einstellen)
	10 ml	Acid-Fuchsin (1% wässrige Lösung: 1 g auf 100 ml ddH <sub>2</sub> O einstellen)
	1 ml	Essigsäure 100%
<b>Bouin's Fixative</b>	750 ml	Pikrinsäure, gesättigt
	250 ml	Formaldehyd 37%
	50 ml	Essigsäure 100%
<b>Essigsäure, 1%</b>	1 ml	Essigsäure 100%
	99 ml	ddH <sub>2</sub> O
<b>Phosphomolybdic- Phosphotungstic-Lösung 1,25%</b>	5 g	Molybdatophosphorsäure
	5 g	Phosphotungstensäure
	auf 200 ml	ddH <sub>2</sub> O einstellen
<b>Weigert's Eisenhämatoxylin- Lösung</b>	<b><u>Lösung A:</u></b>	
	1 g	Hämatoxylin
	in 100 ml	Ethanol 95% (95 ml Ethanol 100% + 5 ml ddH <sub>2</sub> O)
	<b><u>Lösung B:</u></b>	
	4 ml	Eisen-(III)-chlorid 29% (29 g auf 100 ml ddH <sub>2</sub> O einstellen)
	in 95 ml	ddH <sub>2</sub> O
	1 ml	Salzsäure 37%
	<b><u>A : B</u></b>	<b>1 : 1</b>

## Siriusrot-Färbung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
<b>Picro-Siriusrot-Lösung 1%</b>	1 g auf 100 ml	Siriusrot ( <i>Direct Red 8</i> ) gesättigte Pikrinsäure einstellen
<b>Essigsäure 30%</b>	120 ml 280 ml	Essigsäure 100% ddH <sub>2</sub> O

## Verhoeff's Elastica-Färbung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
<b>Alkoholisches Hämatoxylin, 10%</b>	10 g auf 100 ml	Hämatoxylin Ethanol 100% einstellen
<b>Eisen-(III)-chlorid, 10%</b>	10 g auf 100 ml	Eisen-(III)-chlorid ddH <sub>2</sub> O einstellen
<b>Eisen-(III)-chlorid Differenzierungs-Lösung, 2%</b>	20 ml 80 ml	Eisen-(III)-chlorid 10% ddH <sub>2</sub> O
<b>Natriumthiosulfat-Lösung, 5%</b>	5 g auf 100 ml	Natriumthiosulfat ddH <sub>2</sub> O einstellen
<b>Verhoeff's Elastica-Färbelösung</b>	50 ml 50 ml 50 ml 50 ml	Alkoholisches Hämatoxylin 10% Ethanol 100% Eisen-(III)-chlorid 10% Verhoff's Iod-Lösung
<b>Verhoeff's Iod-Lösung</b>	2 g 4 g auf 100 ml	Iod Kaliumjodid ddH <sub>2</sub> O einstellen

## 3.13.2 Immunhistochemie

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
<b>Citrat-Puffer 0,1M, 10x (pH 6,0)</b> (Stammlösung)	21,1 g auf 1000 ml	Citronsäure Monohydrat ddH <sub>2</sub> O einstellen pH-Wert auf 6,0 einstellen
<b>Citrat-Puffer 0,01M, 1x (pH 6,0)</b> (Gebrauchslösung)	100 ml 900 ml	Citrat-Puffer 0,1M (pH 6,0) ddH <sub>2</sub> O
<b>Normales Ziegen Serum 10%</b>	500 µl 4500 µl	Normales Ziegen Serum PBS 1x, selbst hergestellt
<b>Normales Ziegen Serum 5%</b>	250 µl 4750 µl	Normales Ziegen Serum PBS 1x selbst hergestellt
<b>PBS 1x, selbst hergestellt</b>	100 ml 900 ml	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) pH 7,4 (10x) ddH <sub>2</sub> O
<b>Triton® X100 0,05%</b>	50 µl 100 ml	Triton® X100 PBS 1x, selbst hergestellt
<b>100 mM Tris/10mM EDTA Stock-Lösung 10x (pH 9,0)</b>	12,1 g 3,72 g auf 800 µl	TRIS EDTA-Dinatriumsalz ddH <sub>2</sub> O einstellen
<b>10 mM Tris/1mM EDTA Gebrauchslösung (pH 9,0)</b>	100 ml 900 ml	Tris/EDTA-Stock-Lösung 10x ddH <sub>2</sub> O
<b>Wasserstoffperoxid 3%</b>	50 ml 450 ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% Methanol

### 3.13.3 Isolation muriner Blutplättchen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	
<b>Acid citrate dextrose (ACD)</b> (Antikoagulans)	2,5 g	Natriumzitat
	2 g	D-(+)-Glukose
	1,4 g	Citratsäure Monohydrat
	auf 100 ml	ddH <sub>2</sub> O einstellen
<b>2 mM CaCl<sub>2</sub></b>	2 µl	100 mM CaCl <sub>2</sub> (0,15 g auf 10 ml ddH <sub>2</sub> O einstellen)
	auf 100 ml	ddH <sub>2</sub> O einstellen
<b>1,2 N NaOH in 0.5M HEPES</b>	3 ml	2M NaOH (final 1.2M)
	2 ml	0.5M HEPES (1,19 g auf 10 ml ddH <sub>2</sub> O einstellen)
<b>Tyrode's Puffer Stock-Lösung</b> (10x, Calcium-frei)	8 g	NaCl
	0,2 g	KCL
	0,13 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , monobasisch
	1,19 g	HEPES
	0,5 g	D-(+)-Glukose
	auf 100 ml	ddH <sub>2</sub> O einstellen
<b>Tyrode's Gebrauchslösung</b>	5 ml	10x Tyrode's Puffer Stock-Lösung
	43 ml	ddH <sub>2</sub> O
	500 µl	1M HEPES
	250 µl	BSA 20%
	500 µl	D-(+)-Glukose 10%
	50 µl	1M MgCl <sub>2</sub>
		pH-Wert auf 6,5 bzw. 7,4 einstellen



## 4 METHODEN

### 4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

#### 4.1.1 Tierversuchantrag und Genehmigung der Studie

Bei der tierexperimentellen Studie handelt es sich um das Versuchsvorhaben mit dem Aktenzeichen G-14-1-044, welches gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt wurde. Die Tierhaltung und die Versuchsdurchführung entsprachen dabei den nationalen Bestimmungen.

#### 4.1.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die vorliegenden tierexperimentellen Untersuchungen wurden sowohl männliche als auch weibliche Wurfgeschwister verwendet. Bei ihrer Verwendung ist zwischen *in vivo*- und *ex vivo*-Analysen zu differenzieren: so wurden für das Eisen-(III)-chlorid-Modell zur Induktion einer experimentellen Gefäßwandläsion (siehe 4.1.6) ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet. Diese waren zu Versuchsbeginn 10-14 Wochen alt und im Mittel 31,0 g ( $31,0 \pm 0,4$  g; Mittelwert  $\pm$  SEM) schwer. Für die Messung der Blutungszeit (*Tail tip bleeding-Assay*; siehe 4.1.8) wurden weibliche Tiere im Alter von 9-15 Wochen eingesetzt. Die *ex vivo*-Analysen wurden ebenfalls mit weiblichen Tieren durchgeführt. Diese waren bei der Blutzellanalyse (siehe 4.1.9) 8-15 Wochen und der Plättchenisolation (siehe 4.1.10) 10-18 Wochen alt.

Die Unterbringung und Pflege der Versuchstiere erfolgte gemäß konventionellen Hygiene-Standards durch das *Translational Animal Research Center* (TARC) der Johannes Gutenberg-Universität (JGU) Mainz und die dortig angestellten TierpflegerInnen. Alle Versuchstiere wurden in Typ 2-Käfigen mit üblichen Filterhauben und einer Laufbodenfläche von 360 cm<sup>2</sup> gehalten. Diese waren gemäß der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) in klimatisierten Räumen bei einer Temperatur von 20-24°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% (50-70%) untergebracht. Mit Hilfe einer automatisierten Beleuchtungsanlage konnte ein stetiger Tag-Nachtrhythmus von je 12 h simuliert werden, während dessen die Dunkelperiode von 18:00 bis 6:00 Uhr andauerte. Sowohl Wasser als auch Nahrung wurden den Tieren *ad libitum* angeboten. Wasser wurde über eine Tränkflasche zugeführt. Als Futter wurde ein Alleinfuttermittel für Mäuse in extrudierter Form (Ssniff® R/M-H

Extrudat; siehe 3.11.2) verwendet. Zur eindeutigen Identifizierung der Versuchstiere wurden diese mit Hilfe einer Ohrstanze markiert und anhand einer fortlaufenden Registrierungsnummer im PyRAT- (engl. *Python-based Relational Animal Tracking*) System dokumentiert. Des Weiteren wurde bei allen Tieren im Alter von 3-4 Wochen eine Schwanzspitzenbiopsie zur Genotypisierung entnommen. Sofern Versuchstiere im späteren Versuchsverlauf mittels *Tail tip bleeding-Assay* zur Bestimmung der Blutungszeit analysiert werden sollten, wurden von diesen Tieren das Gewebe der Ohrstanzenmarkierung zur Genotypisierung verwendet.

#### **4.1.3 Generierung eines Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Knockouts mittels Cre/loxP-Rekombination**

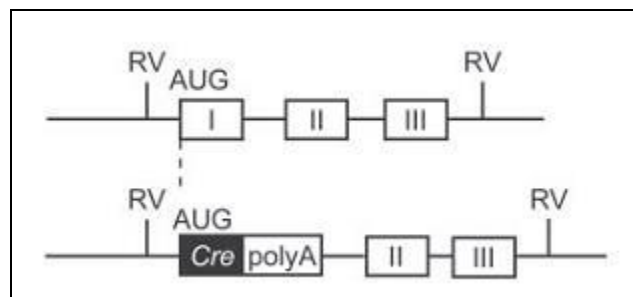
Mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems wurden Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1 Knockout-Mäuse generiert. Die Herstellung dieser Mäuse erfolgte in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. med. xxx am CTH der Universitätsmedizin Mainz, der uns die Zuchtpaare dieser Mauslinie freundlicherweise zur Verfügung stellte. Das allgemeine Prinzip der Cre/loxP-Rekombinationstechnik und die verwendeten Mauslinien werden im Folgenden beschrieben.

##### Das Cre/loxP-System

Bei dem Cre/loxP-System handelt es sich um eine Rekombinationstechnik, die es erlaubt gezielt DNA-Sequenzen auszuschalten und so einen zellspezifischen Gen-Knockout zu generieren. Hierbei kommt das aus dem Bakteriophagen P1 stammende Enzym der Cre (engl. *cyclization recombination*) -Rekombinase zum Einsatz. Dieses katalysiert die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA, während loxP (engl. *locus of X-over P1*) als Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase fungiert. Die gezielte Flankierung eines DNA-Abschnitts mittels zwei gleichgerichteten 34 bp langen loxP-Sequenzen wird auch als floxen (engl. *flankend by loxP*) bezeichnet. Die Cre-Rekombinase kann so die beiden LoxP-Stellen lokalisieren und das spezifische, gefloxtes Gensegment aus dem Genom deletieren. Dieses liegt als ringförmiges DNA-Fragment vor und wird intrazellulär abgebaut [83]. Des Weiteren ist bei der Cre/loxP-Rekombination ein Promotor von essentieller Bedeutung. Dieser wird vor der Cre-Nuklease eingebracht und sorgt für die Zellspezifität des Knockouts.

Cre/loxP vermittelte TGFβ1-Deletion

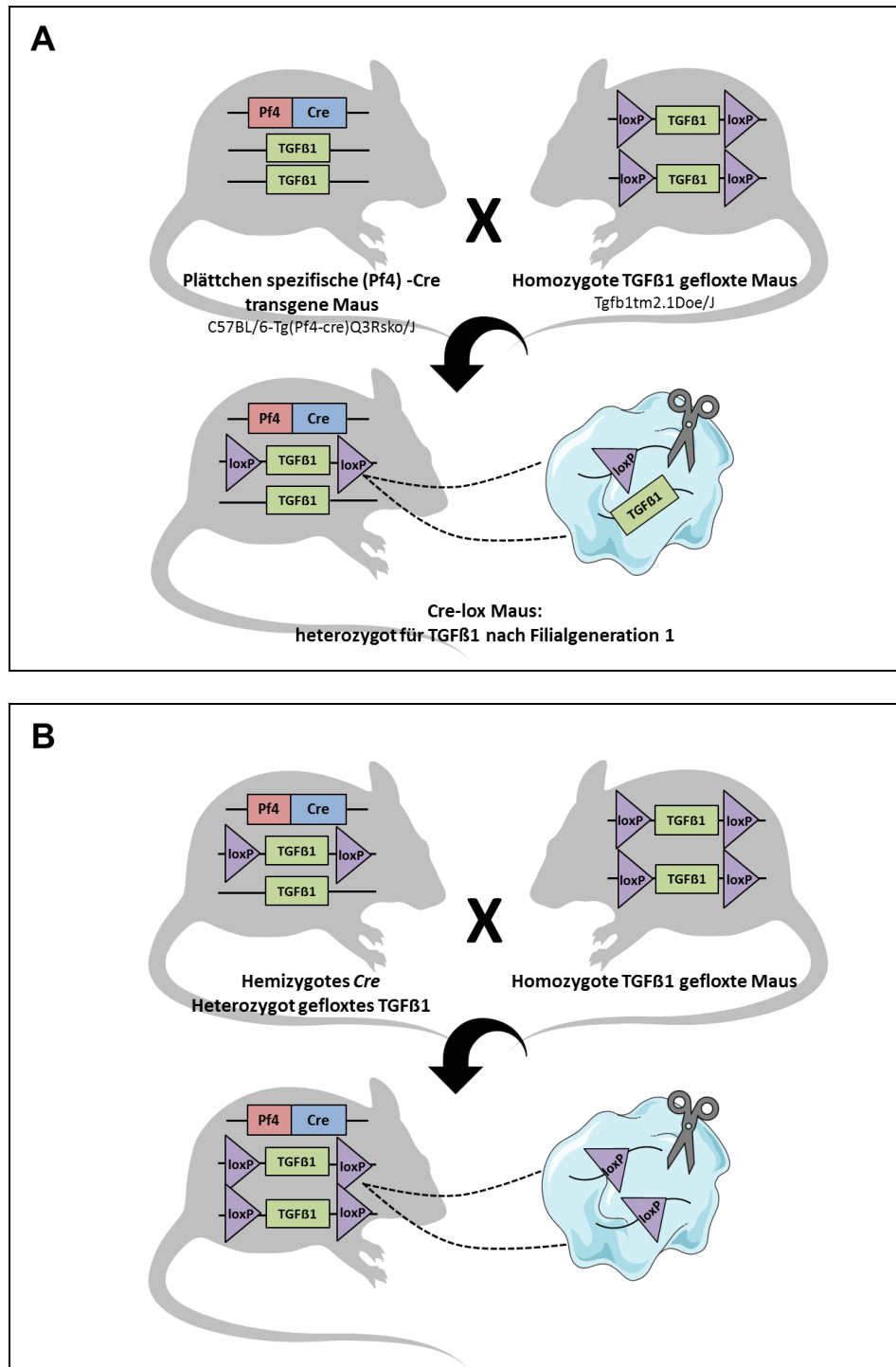
Zur Generierung einer zellspezifischen Knockout-Mauslinie werden zwei transgene Mausstämme benötigt. Zum einen ein Mausstamm mit Cre-Rekombinase und zum anderen ein Mausstamm, der das gefloخته DNA-Segment enthält. Im Falle der hier verwendeten Pf4 (engl. *platelet factor 4*) -Cre-Mauslinie (C57BL/6-Tg(Pf4-Cre) Q3Rsko/J) [81] steht die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des murinen Pf4-Promotors. Dadurch wird das Cre-Enzym spezifisch in den Megakaryozyten exprimiert, wodurch der spätere Plättchen-spezifische Knockout zu Stande kommt. Da es sich hier um einen nicht induzierbaren (konstitutiven) Knockout handelt, ist eine vorherige Aktivierung des Pf4-Promotors nicht notwendig. Die Generierung des Pf4-Cre-Mausstammes erfolgte mittels homologer Rekombination in Bakterien. Hierzu wurde cDNA (engl. *complementary DNA*) der Cre-Rekombinase in einen 100kb BAC (engl. *bacterial artificial chromosomes*) -Klon eingebracht, welcher die genomische DNA des murinen Plättchenfaktors 4 enthielt. Dabei wurde Exon 1 des Pf4-Gens durch die Cre-Rekombinase cDNA ersetzt [81] (siehe Abb. 4-1).



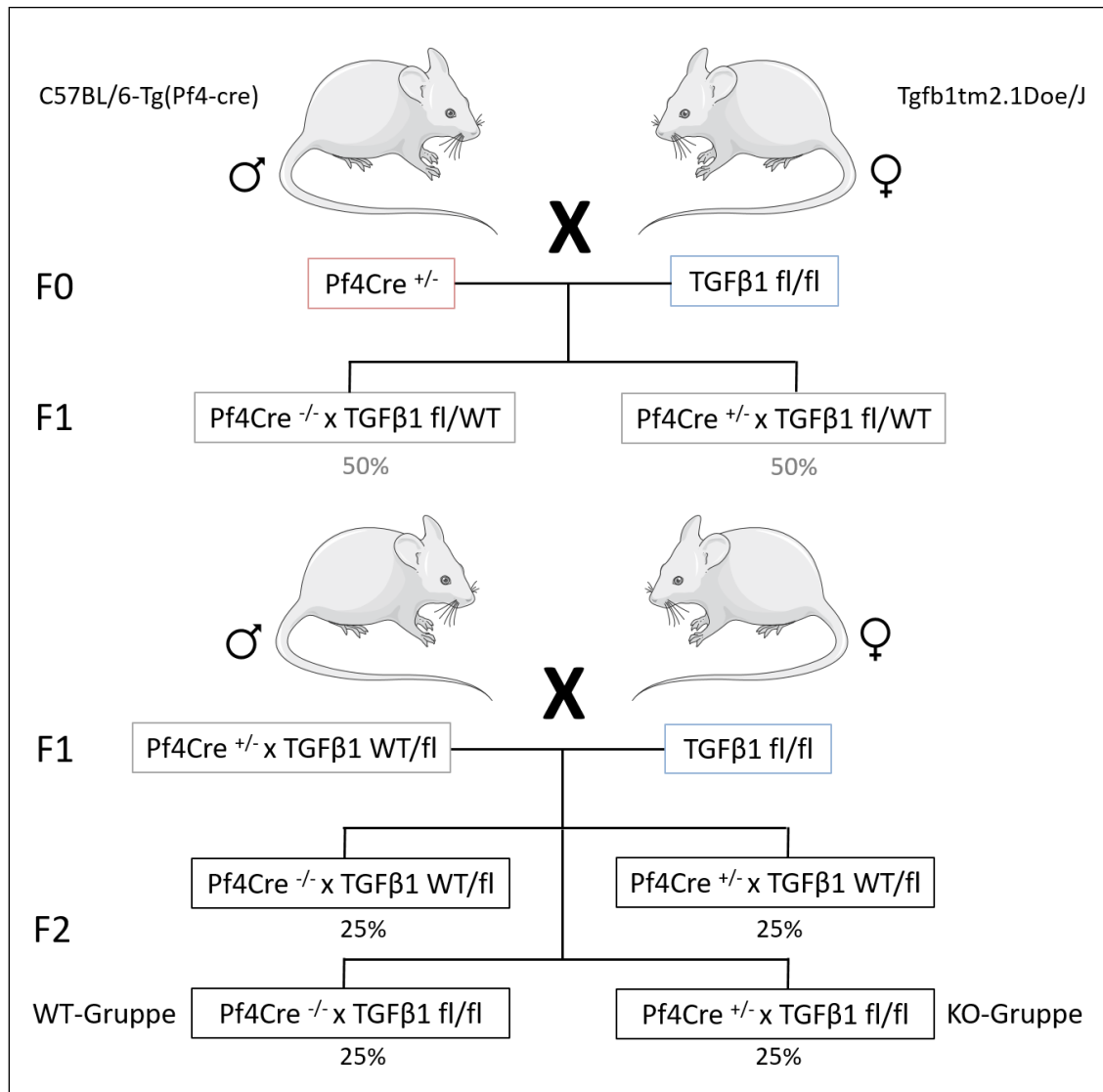
**Abb. 4-1: Das transgene Pf4-Cre-Konstrukt.** cDNA der Cre-Rekombinase wurde mittels homologer Rekombination in einen BAC (engl. *bacterial artificial chromosomes*) -Klon eingebracht, der das Pf4 (engl. *platelet factor 4*) -Gen enthielt. Dabei wurde Exon 1 des Pf4-Gens durch die Cre-Rekombinase cDNA ersetzt. Die umrahmten Ziffern kennzeichnen die einzelnen Exons des Pf4-Gens, AUG das Startcodon. RV steht für die EcoRV-Restriktionsendonuklease und polyA für das Polyadenylierungssignal. Abbildung nach [81].

Die zweite benötigte Mauslinie trägt den gefloخته DNA-Abschnitt. Im Falle der hier vorliegenden Arbeit waren dies Mäuse der TGFβ1 fl/fl-Mauslinie (Tgfb1tm2.1Doe/J) [82]. Bei diesen wurde Exon 6 des TGFβ1-Gens durch homologe Rekombination mit zwei LoxP-Stellen flankiert und so für die Cre-Rekombinase markiert. Zum Erhalt von Nachkommen mit Plättchen-spezifischem TGFβ1-Knockout wurde die transgene Pf4-Cre-Maus mit einer homozygoten TGFβ1 gefloخته Maus gekreuzt. Durch die LoxP-Stellen erkennt die Pf4-Cre-Rekombinase das Markergen, sprich TGFβ1, und kann dieses dort spezifisch ausschneiden (siehe Abb. 4-2, A). Folglich erhielt man in der ersten Filialgeneration (F1) Nachkommen, die zu 50% heterozygot für das TGFβ1-

loxP-Allel und hemizygot/heterozygot für das Cre-Transgen waren. Diese wurden wiederum mit den homozygoten TGF $\beta$ 1 geflochten Mäusen verpaart. Hieraus gingen in der F2-Generation Nachkommen hervor, die zu 25% homozygot für das TGF $\beta$ 1-loxP-Allel und hemizygot/heterozygot für das Cre-Transgen waren und als Versuchsgruppe bzw. Knockout (KO) -Gruppe fungierten (siehe Abb. 4-2, B). Weitere 25% der generierten F2-Mäuse waren ebenfalls homozygot für das geflochte TGF $\beta$ 1-Allel, allerdings negativ für das Cre-Transgen. Diese wurden in der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung als Kontroll- bzw. Wildtyp- (WT) Gruppe verwendet. Die Aufrechterhaltung der Linie erfolgte mittels Inzucht-Kreuzung der F2-Nachkommen. Abb. 4-3 zeigt das zur Generierung der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1 Knockout-Mäuse verwendete Kreuzungsschema.



**Abb. 4-2: Die Cre/loxP vermittelte Generierung eines konstitutiven Plättchen-spezifischen TGFβ1-Knockouts.** (A) Verpaarung der transgenen Pf4 (engl. *platelet factor 4*) -Cre-Mauslinie mit einer homozygoten TGFβ1 (engl. *transforming growth factor β1*) gefloختen Maus. Hierbei erkennt die Pf4-Cre-Rekombinase spezifisch in Megakaryozyten die loxP-Stellen des Markergens (TGFβ1) und kann dieses dort deletieren. (B) Die aus dieser Kreuzung hervorgehenden Nachkommen, welche heterozygot für das TGFβ1-loxP-Allel und hemizygot für das Cre-Transgen waren, wurden wiederum mit den homozygoten TGFβ1 gefloختen Mäusen verpaart. Hierbei wurden Nachkommen generiert, die homozygot für das TGFβ1-loxP-Allel und hemizygot für das Cre-Transgen waren. Abbildung modifiziert nach [84].



**Abb. 4-3: Kreuzungsschemata zur Generierung von Plättchen-spezifischen TGFβ1-KO-Mäusen und deren Kontrollgruppe.** Angegeben sind die einzelnen zu verpaarenden Mauslinien mit ihren jeweiligen Genotypen und die hieraus hervorgehenden Nachkommen mit prozentualer Häufigkeit. F0 kennzeichnet die Parentalgeneration, F1 und F2 die erste und zweite Filialgeneration.

#### 4.1.4 Genotypisierung

##### 4.1.4.1 DNA-Extraktion aus Mausschwanzbiopsien

Zur Genotypisierung der unter 4.1.3 beschriebenen Versuchstiere wurde aus den zuvor entnommenen Ohrstanzbiopsien bzw. Schwanzspitzenbiopsien die genomische DNA extrahiert. Dies erfolgte durch Lyse der Biopsien. Hierzu wurden je nach Ausgangsmaterial eine definierten Menge *DirectPCR*<sup>®</sup> *Lyse-Reagent Tail* bzw. *DirectPCR*<sup>®</sup> *Lyse-Reagent Ear* (siehe Tabelle 4-1) und 0,2-0,4 mg/ml *peqGOLD* Proteinase K [20 mg/ml] zugegeben und über Nacht bei 55°C und 550 rpm im Thermomixer bis zur vollständigen Lyse inkubiert. Hierbei war auf ein komplettes Eintauchen der Biopsien in das Lyse-Reagenz zu achten. Abschließend wurde der Reaktionsansatz zur Inaktivierung der Proteinase K für 60 min bei 85°C im Thermomixer inkubiert. Danach wurden die entstandenen Lysate abzentrifugiert und die Lysatüberstände in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Für die im Anschluss durchzuführende Genotypisierungs-PCR (siehe 4.1.4.2) wurden 5 µl Lysat pro 20 µl PCR-Ansatz verwendet.

**Tabelle 4-1: Reaktionsansatz für die Lyse von Ohrstanz-bzw. Schwanzspitzenbiopsien**

Größe der Biopsie	Menge <i>DirectPCR</i> <sup>®</sup> <i>Lyse-Reagent Tail/Ear</i>
0,2 – 0,3 cm Schwanzspitze	150 µl
0,4 – 0,5 cm Schwanzspitze	200 µl
0,2 cm Ohrstanze	100-200 µl

##### 4.1.4.2 PCR als Genotypisierungs-Nachweis

Zur Feststellung des Genotyps der aus der Zucht hervorgegangenen Mäuse (siehe 4.1.3) wurde eine Genotypisierungs-*Polymerase Chain Reaction* (PCR) durchgeführt. Hierzu wurde die extrahierte genomische DNA (siehe 4.1.4.1) in einem 20 µl Reaktionsansatz mit 5x Green *GoTaq*<sup>®</sup> *Flexi* Buffer, MgCl<sub>2</sub>, Desoxyribonukleosid-triphosphate (PCR Nukleotide-Mix), *GoTaq*<sup>®</sup> *G2 Flexi* DNA Polymerase, *forward* und *reverse* Primer (siehe 3.10) entsprechend Tabelle 4-2 versetzt. Pro Reaktion wurde eine genomische DNA-Menge von 5 µl und die jeweiligen *forward* und *reverse* Primer in einer Konzentration von jeweils 1 µM eingesetzt. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe des *Eppendorf flexlid Mastercycler*<sup>®</sup> *nexus gradient* und des in Tabelle 4-3 gezeigten PCR-Reaktionsprofils amplifiziert. Hierbei wurde sowohl für

den PF4-Cre-Genotyp als auch das TGF $\beta$ 1-Gen das gleiche PCR-Reaktionsprofil verwendet.

**Tabelle 4-2: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR**

PCR-Reaktionsansatz		
Reagenz	Volumen pro Ansatz ( $\mu$ l)	Endkonzentration
Nuklease-freies DEPC-Wasser	4,80 $\mu$ l	-
Green <i>GoTaq</i> <sup>®</sup> <i>Flexi</i> Buffer 5x	4,00 $\mu$ l	1x
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	1,60 $\mu$ l	2,00 mM
PCR Nukleotid-Mix, 10 mM	0,40 $\mu$ l	0,20 mM
<i>forward</i> Primer, 10 $\mu$ M	2,00 $\mu$ l	1,00 $\mu$ M
<i>reverse</i> Primer, 10 $\mu$ M	2,00 $\mu$ l	1,00 $\mu$ M
<i>GoTaq</i> <sup>®</sup> <i>G2 Flexi</i> DNA Polymerase, 5 U/ $\mu$ l	0,20 $\mu$ l	0,05 U/ $\mu$ l
DNA	5,00 $\mu$ l	-

**Tabelle 4-3: Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR für das Pf4-Cre- und TGF $\beta$ 1-Gen**

PCR-Reaktionsprofil			
Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94°C	5 min	1x
Denaturierung	94°C	30 min	40x
Annealing	60°C	30 min	40x
Elongation	72°C	30 min	40x
Extension	72°C	10 min	1x
Kühlung	4°C	$\infty$	1x



Im Anschluss an die Genotypisierungs-PCR erfolgte die Analyse der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 4.1.4.3). Hinsichtlich des Pf4-Cre-Genotyps wurde bei den generierten Nachkommen zwischen der heterozygoten Variante Pf4-Cre<sup>+/-</sup> als Cre-positiv mit 450 bp und der homozygoten Variante Pf4-Cre<sup>-/-</sup> als Cre-negativ bzw. WT differenziert. Bei dem TGFβ1-Genotyp konnte zwischen dem WT (TGFβ1<sup>WT/WT</sup>) mit 216 bp, der homozygoten Variante, sprich dem Mutanten (TGFβ1<sup>fl/fl</sup>) mit 277 bp und der heterozygoten Variante (TGFβ1<sup>fl/WT</sup>) mit 216 und 277 bp unterschieden werden.

### 4.1.4.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle der generierten PCR-Produkte wurden diese mittels Agarosegelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Das allgemeine Prinzip der Elektrophorese beruht auf der Wanderung negativ geladener DNA unter Anlegung eines elektrischen Feldes. Im Falle der Agarosegelelektrophorese wird mittels Agarose ein netzartiges Molekularsieb ausgebildet, wodurch kleinere DNA-Fragmente mit weniger Widerstand durch das Gel wandern und dieses somit schneller passieren als große Fragmente.

In der vorliegenden Arbeit kamen ausschließlich Agarosegele mit einem Agaroseanteil von 1,5% zum Einsatz. Als Laufpuffer und Lösungsmittel der Agarose (*Broad Range*) wurde 1x Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer verwendet. Für ein 1,5%iges Agarosegel wurden demnach 1,5 g Agarose mit 100 ml 1x TAE-Puffer versetzt. Die entstandene Suspension wurde anschließend in einer Laborflasche mit locker aufliegendem Deckel in der Mikrowelle zum Sieden gebracht. Hierbei war darauf zu achten, dass der Kochvorgang des Öfferns unterbrochen und die Flasche geschwenkt wurde, um noch vorhandene ungelöste Agaroseteilchen in Lösung zu bringen. Nachdem die Agarose im TAE-Puffer vollständig gelöst war, wurde sie mittels Magnetrührer zum Abkühlen gebracht (ca. 50-60°C). Danach wurde die leicht abgekühlte Agaroselösung mit 5 µl/100 ml des DNA-interkalierenden Farbstoffs Midori Green versetzt, gut geschwenkt und schließlich luftblasenfrei in einen Gelträger gegossen, welcher zuvor auf der Gelgießstation nivelliert und mit einem Kamm versehen worden war. Midori Green lagert sich zwischen die Basen der DNA und ermöglicht somit unter UV-Licht die Visualisierung der aufgetrennten DNA-Fragmente. Sobald das Agarosegel ausgehärtet war, wurde es samt Gelträger aus der Gießstation entfernt, in die Pufferkammer des horizontalen Elektrophorese-Systems (*Sub-Cell® GT Cell*) gelegt und der eingesetzte Kamm vorsichtig und möglichst parallel entfernt. Hier

war darauf zu achten, dass sich die Geltaschen am schwarzen Kathodenende befanden, da die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung während der Elektrophorese zum positiven roten Anodenende wandern. Danach wurde die Elektrophoresekammer bis zur Markierung mit 1x TAE-Puffer befüllt, sodass das Gel vollständig bedeckt war. Da die zu analysierenden DNA-Proben bereits bei der Genotypisierungs-PCR mittels Puffer (Green *GoTaq*<sup>®</sup> *Flexi*-Buffer 5x) angefärbt wurden, konnten diese nun direkt in die Taschen des Gels aufgetragen und mit einer Spannung von 100 Volt unter Einsatz eines Netzgeräts (*PowerPac*<sup>™</sup> *Basic*) für etwa 60 min aufgetrennt werden. Beim Verschließen der Elektrophoresekammer war die korrekte Orientierung der Spannungskabel zu den korrespondierenden Elektroden an der Spannungsquelle einzuhalten. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente mittels Fluoreszenz unter einem Transilluminator, der Intas-UV-Geldokumentationskammer, sichtbar gemacht und mit der Intas GDS-Software (Version 3.34) dokumentiert. Die Größe der zu analysierenden Fragmente wurde letztendlich durch Vergleich eines separat im Gel mitlaufenden Standards (100 bp Plus-DNA-Ladder) bestimmt.

#### **4.1.5 Versuchsablauf**

In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung wurde sowohl die Rolle des Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1 für die Hämostase als auch die akute arterielle Thrombose und die vaskuläre postoperative Wundheilung untersucht. Hinsichtlich der Analysen, die die Hämostase betreffen, wurde an einem Teil der weiblichen Versuchstiere mit Hilfe des *Tail tip bleeding-Assays* (siehe 4.1.8) ein Thrombozyten-Funktionstest durchgeführt, um Informationen über die Blutungszeit zu erhalten. Zudem wurde bei einem weiteren Teil der weiblichen Tiere das Aggregationsverhalten und somit die Funktionalität isolierter Thrombozyten untersucht (siehe 4.1.10 und 4.1.11). Eine Blutzellanalyse soll darüber hinaus Aufschluss über hämatologische Parameter der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT und -KO-Mäuse geben (siehe 4.1.9). Diese erfolgte mittels antikoaguliertem Vollblut einer weiteren Gruppe von weiblichen Versuchstieren. Um den Effekt des Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1 auf die vaskuläre Wundheilung zu untersuchen, wurde bei den männlichen Versuchstieren das Eisen-(III)-chlorid-Modell zur Induktion einer experimentellen Gefäßwandläsion an der *A. carotis sinister* durchgeführt (siehe 4.1.6). Hierdurch wurde die postoperative Entstehung einer intimalen Hyperplasie (Neointimabildung) induziert. Darüber hinaus wurde bei diesen Versuchstieren sowohl vor als auch nach Gefäßverletzung mit Hilfe

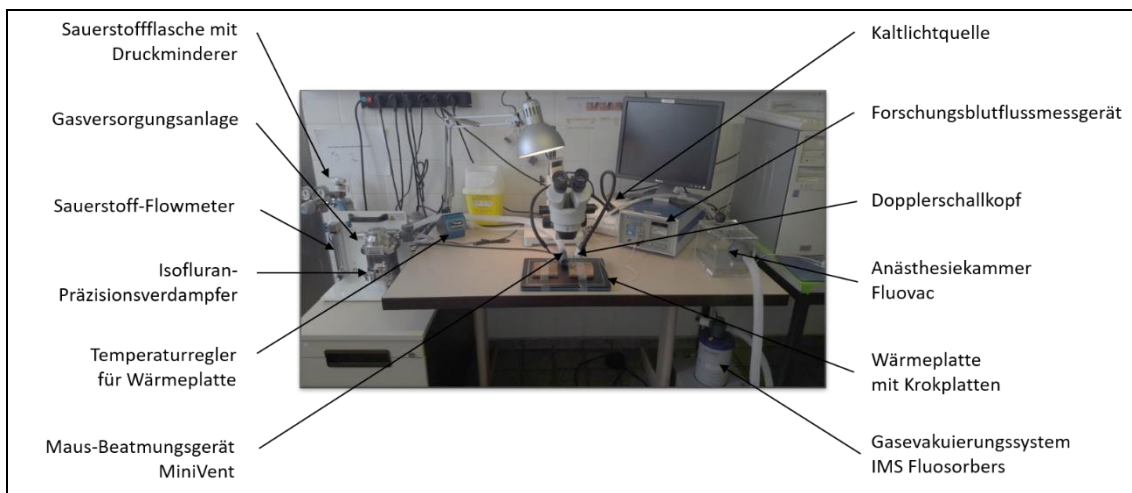
eines Blutflussmessgerätes und einer Dopplersonde der Blutfluss in der *A. carotis* über die Zeit hinweg bestimmt. Dies sollte klären, inwiefern die akute arterielle Thrombose durch die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion beeinflusst wurde. Drei Wochen nach Gefäßverletzung wurde den Versuchstieren sowohl die verletzte (*sinister*) als auch kontralaterale unverletzte (*dexter*) Karotisarterie entnommen. Zuvor erfolgte mittels kardialer Punktion eine Blutentnahme, die final zum Tod der betäubten Tiere führte. Anschließend wurden die mit Zinkformalin (4%) perfundierten und fixierten Arterien in Paraffin eingebettet. Zur histologischen Analyse der postoperativen, intimalen Veränderungen wurden 5  $\mu$ m-dicke Serienschnitte angefertigt, mit Verhoeff's Elastica-Lösung gefärbt und morphometrisch quantifiziert. Um die vaskuläre inflammatorische Aktivität nach Gefäßverletzung näher untersuchen zu können, wurden unterschiedliche immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Im Folgenden werden sämtliche Untersuchungsmethoden detailliert beschrieben.

### **4.1.6 Das Eisen-(III)-chlorid-Modell zur Induktion einer experimentellen Gefäßwandläsion in der Maus**

#### **4.1.6.1 Anästhesie**

Zur Induktion einer experimentellen Gefäßwandläsion und arteriellen Thrombose wurde das in der Arbeitsgruppe etablierte Eisen-(III)-chlorid-Modell angewandt [31]. Die Anästhesie der zu untersuchenden Mäuse erfolgte unter Zuhilfenahme einer Narkoseanlage der Firma Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten (siehe Abb. 4-4). Deren Hauptkomponenten waren neben der Gasversorgungsanlage, ein Gasevakuierungssystem (*IMS Fluosorbers*) und ein Präzisionsverdampfer für das Inhalationsnarkotikum. Ebenfalls in das System integriert waren eine Beatmungsmaske des Typs *MiniVent* und eine Anästhesiekammer (*Fluovac*). Als Inhalationsgas kam Isofluran und als Trägergas Sauerstoff (O<sub>2</sub>) zum Einsatz. Die Sauerstoffzufuhr wurde mit Hilfe eines Sauerstoff-Flowmeters geregelt. Vor Beginn der Anästhesie wurde die zu untersuchende Maus gewogen. Anschließend wurde sie in die Anästhesiekammer gesetzt und zur Narkoseeinleitung mit einem Gemisch aus 0,5% O<sub>2</sub> und 2,5-3,0% Isofluran betäubt. Sofern das narkotisierte Tier nicht mehr auf externe Reflexe wie ein leichtes Kneifen zwischen die Zehen des Hinterlaufs (Rückziehreflex) reagierte, konnte von einer ausreichend tiefen Sedierung ausgegangen werden. Nun wurde das betäubte Tier auf eine 37°C temperierte Wärmeplatte transferiert und in Rückenlage zwischen zwei auf der Wärmeplatte

angebrachten Korkplatten positioniert. Mund und Nase der Maus wurden dabei in die dafür vorgesehene Beatmungsmaske platziert, worüber die Narkose mit 0,5% O<sub>2</sub> und 1,5% Isofluran aufrechterhalten wurde. Um die Hornhaut (Auge) vor dem Austrocknen zu schützen, wurden die Augen der Maus zuvor mit Augensalbe (Augen- und Nasensalbe *Bepanthen*<sup>®</sup> mit 5% Dexpanthenol) bedeckt. Auf eine suffiziente Atmung (Atemfrequenz von ca. 60/min) des narkotisierten Tieres war zu achten. Möglichst, nicht normofrequenten Atemmustern wurde mit einer Reduzierung der Isofluran-Konzentration entgegengesteuert.



**Abb. 4-4: Übersicht des Versuchsaufbaus zur Durchführung des Eisen-(III)-chlorid-Modells mit den einzelnen Komponenten der Narkoseanlage.**

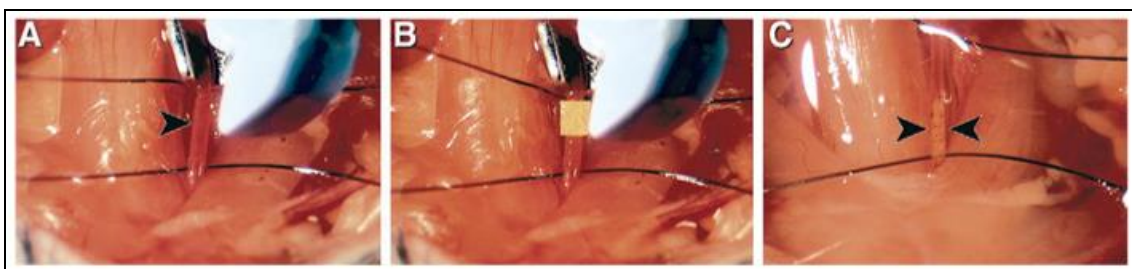
#### 4.1.6.2 Präparation der *A. carotis sinister*

Zunächst wurde die sedierte Maus wie in 4.1.6.1 beschrieben rücklings auf einer vortemperierten Wärmeplatte (37°C) in Position gebracht. Hierbei war darauf zu achten, dass die *Incisura jugularis* mit den oberen Enden der auf der Wärmeplatte befestigten Korkplatten auf einer Höhe lag. Die vorderen als auch die hinteren Extremitäten wurden leicht gespreizt und mit Klebepflaster (Leukofix) auf der Wärmeplatte fixiert. Der Kopf wurde überstreckt und in dieser Position am Unterkiefer ebenfalls mit Klebeband fixiert. Nun wurde das OP-Gebiet großzügig mit 70%igem Ethanol desinfiziert und das Fell um die *Incisura jugularis* zur Seite gestrichen.

Die Haut über der *Incisura jugularis* wurde mit einer groben Pinzette umfasst und mit der Präparierschere wurde ein etwa 1,0-1,5 cm langer Hautschnitt in kranialer Richtung gesetzt. Nun konnte mit zwei groben Pinzetten das OP-Feld erweitert und die beiden Lappen der *Glandula thyroidea* zur Seite geschoben werden. Hierzu musste die schmale Brücke zwischen den beiden Drüsenlappen, der sogenannte *Isthmus*,

aufgelöst werden. Dadurch konnte das OP-Gebiet mit Hilfe zweier auf den Korkplatten fixierbaren Halteklammern soweit offengehalten werden, dass sowohl eine optimale Ausleuchtung als auch Präparation der *A. carotis sinister* möglich war. Die eigentliche Präparation der Karotisarterie erfolgte unter Zuhilfenahme eines Stereo-Zoom-Mikroskops (*VisiScope SB350H*). Hierzu wurden zunächst die einzelnen Halsfaszien mit zwei feinen Pinzetten durchtrennt, um in den Bereich des *Trigonum caroticum* (Karotisdreieck) zu gelangen. Dort wurde die *Vagina Carotica*, eine Faszienhülle, welche die Karotisarterie, die *Vena jugularis* und den *Nervus Vagus* umgibt, gelöst. Dazu wurde der dorsal zur Karotisarterie liegende Vagusnerv mit einer der feinen Pinzetten gegriffen, während mit der Spitze der zweiten Pinzette leicht gegen die Faszie gedrückt und diese dabei vorsichtig aufgespreizt wurde. Hierbei wurde kranial bis zur Karotisbifurkation und kaudal bis zum Dreieck zwischen *Musculus sternocleidomastoideus sinister* und *Trachea* vorgedrungen. Sobald die *A. carotis sinister* freipräpariert war, konnte sie mit Hilfe der beiden Pinzetten von zwei chirurgischen Polyamidfäden (*Ethilon® 6-0*) unterfädelt werden. Dadurch konnte die Arterie an den beiden Fadenenden mit der Pinzette leicht angehoben und vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden. Um die Karotisarterie der Länge nach darzustellen, wurde einer der beiden Fäden auf Höhe der Bifurkation und der andere am kaudalen Ende des Gefäßes positioniert. Nun konnte die Arterie mit Hilfe eines Dopplerschallkopfs (*Trasonic® Flowprobe*), der mit einem Blutflussmessgerät (*Small animal blood flow meter T106*) verbunden war, aufgegebelt und so aus ihrer physiologischen Lage herausgehoben werden (siehe Abb. 4-5, Bild A). Hierbei war darauf zu achten, dass die Arterie nicht überdehnt wurde. Des Weiteren musste kaudal des Dopplerschallkopfs genügend Platz bleiben, um dort später ein in Eisen-(III)-chlorid getränktes Filterpapier zu platzieren. Zunächst wurde die Geschwindigkeit des basalen Blutflusses (ml/min) in der Karotisarterie bestimmt. Dazu wurde die auf dem Dopplerschallkopf liegende Arterie in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gebettet. Hierbei spielte die akkurate Ausrichtung, sprich der richtige Winkel der Dopplersonde, eine entscheidende Rolle. Sobald die Arterie auf dem Dopplerschallkopf optimal positioniert war und eine konstante Blutflussgeschwindigkeit zwischen 1,00 und 2,00 ml/min registriert werden konnte, wurde die Messung des Blutflusses über die Zeit gestartet. Währenddessen wurde ein etwa 1,0 x 1,5 mm großes Filterpapier in 10%ige Eisen-(III)-chlorid-Lösung getränkt, welche am jeweiligen OP-Tag frisch angesetzt wurde. Anschließend wurde mit Hilfe einer Transferpipette das PBS aus dem OP-Gebiet entfernt und die *A. carotis sinister* mit einem Wattestäbchen trockengetupft. Nun

konnte das Filterpapier längs auf der Adventitia der Arterie kaudal der Dopplersonde platziert werden (siehe Abb. 4-5, Bild B). Hierbei war darauf zu achten, dass umliegendes Gewebe nicht mit dem in Eisen-(III)-chlorid getränktem Filterpapier in Berührung kam und verletzt wurde. Sobald das Filterpapier parallel zur Karotisarterie lag, konnte die Stoppuhr mit einem Countdown von 3 min gestartet werden. Nach Ablauf der Zeit wurde das Filterpapier zügig von der Adventitia entfernt und nochmals lateral von der Auflagefläche an der Arterie abgestrichen. Unmittelbar danach wurde das OP-Gebiet mit PBS umspült. Als Zeichen der einsetzenden Plättchenaggregation und arteriellen Thrombosierung konnte auf der gesamten Länge der Läsion eine leichte Gelbfärbung der Arterie beobachtet werden. Dies war in der Regel etwa 5-10 min nach Entfernung des Filterpapiers der Fall (siehe Abb. 4-5, Bild C). Zudem war distal des Thrombus eine arterielle Minderperfusion zu erkennen. Nach Abschluss der Blutflussmessung wurden der Dopplerschallkopf und die Markierungsfäden wieder vorsichtig entfernt. Auch die beiden Haltehebel konnten behutsam entnommen und die Schilddrüsenlappen über das *Trigonum caroticum* gelegt werden. Anschließend wurde die Wunde mit einer Hautnaht aus drei bis vier Einzelknopfnähten (6-0 Ethilonfaden) verschlossen und mit 70%igem Ethanol gereinigt. Nun konnte die narkotisierte Maus von der Beatmungseinheit getrennt und zum Aufwachen in einen sauberen, vorgewärmten Käfig transferiert werden. Für den Wärmeerhalt des Tieres wurde der Käfig auf einer Wärmeplatte platziert und die Maus ventral und dorsal mit Zellstofftüchern bedeckt. Zur postoperativen Analgesie erhielten die Versuchstiere Metamizol im Trinkwasser. Abschließend wurden der Operationstisch und die verwendeten Instrumente mit 70%igem Ethanol gesäubert.



**Abb. 4-5: Präparation der *A. carotis sinister* unter Anwendung des Eisen-(III)-chlorid Modells zur Induktion einer experimentellen Gefäßwandläsion und arteriellen Thrombose in der Maus.** Positionierung der Dopplersonde und basale, postoperative Blutflussmessung (A); Applizierung des in Eisen(III)-chlorid getränktem Filterpapiers (B); Ausbildung der Gefäßwandläsion/Thrombosierung (C). Nach [31].

#### 4.1.6.3 Entnahme der *A. carotis sinister*

Postoperativ wurde den Mäusen sowohl die verletzte *A. carotis sinister* als auch die unverletzte *A. carotis dexter* entnommen. Dies erfolgte sechs bzw. 21 Tage nach Induktion der Gefäßwandläsion und wird in der vorliegenden Arbeit als Gewebeentnahme bezeichnet. Hierzu wurde die Maus entsprechend des ersten operativen Eingriffes narkotisiert (siehe 4.1.6.1), fixiert und das Gebiet um den Operationsbereich freipräpariert (siehe 4.1.6.2). Infolge möglicher Verwachsungen durch die Erst-OP wurde hier besonders auf Blutgefäße innerhalb des Narbengewebes geachtet. Zur Vorbeugung möglicher Verletzungen als auch zur Erhaltung der Stabilität der *A. carotis* wurde diese nicht komplett vom umliegenden Bindegewebe freipräpariert. Nun erfolgte die kardiale Blutentnahme, welche final zum Tod der betäubten Tiere führte. Dabei wurde das Herz der Maus mittels einer 20G-Kanüle und einer mit dem Antikoagulans EDTA (Ethyldiamintetraacetat) benetzten Einmalspritze (1 ml) unterhalb des *Xiphoides* durch die Haut punktiert und unter leichtem Zug bis zu 1 ml Blut entnommen. Dieses wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, im Verhältnis 1:9 mit EDTA versetzt, für 10 min bei 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand (Plasma) für weitere Analysen bei -80°C weggefroren. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde die Haut über dem Thorax entfernt und der Thorax eröffnet. Hierzu wurde zunächst das Abdomen entlang des *Arcus costalis* mittels einer robusten Schere eröffnet und anschließend parasternal von der unteren zur oberen Thoraxapertur geschnitten. Nun konnte das freigelegte Herz aus dem Perikard gelöst und der *Oesophagus* (zur besseren Sicht), die *Aorta* und die *Vena cava inferior* durchtrennt werden. Durch Letzteres konnte der venöse Rückstrom zum Herzen unterbrochen und so eine Volumenüberlastung und Geweberuptur verhindert werden. Zur Perfusion wurde der linke Ventrikel der Maus mit Hilfe eines Perfusionsbestecks (*Venofix® Safety*) punktiert und 1-2 ml 4%ige Zinkformalin-Lösung langsam in den Körperkreislauf injiziert. Die korrekte Perfusion der *A. carotis* konnte zeitgleich unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Nun wurde ein Tropfen der Zinkformalin-Lösung direkt in das OP-Gebiet geträufelt, um die Arterie in ihrer Ausdehnung zu fixieren und mindestens 1 min gewartet. Anschließend wurden zunächst die verletzte linke Karotisarterie und danach die unverletzte rechte Karotisarterie unter mikroskopischer Sicht entnommen. Hierzu wurde mit Hilfe einer feinen Pinzette die Arterie auf Höhe der Bifurkation gegriffen und oberhalb dieser durchtrennt. Unter leichtem Zug in kranialer Richtung konnte die Arterie mit ihrer Läsion im unteren Winkel des *Trigonum caroticum* optimal dargestellt und letztendlich 1 mm proximal der (gut sichtbaren)

Verletzungsstelle ebenfalls durchtrennt werden. Parallel dazu wurde anschließend auf gleiche Weise die rechte unverletzte Arterie entfernt. Nun konnten die entnommenen Arterien in separaten Glasgefäßen für mindestens 4 h, vorzugsweise jedoch über Nacht, in 4%iger Zinkformalin-Lösung fixiert werden. Danach wurden sie in 70%igen Ethanol transferiert, um später in Paraffin eingebettet zu werden (siehe 4.2.1).

#### **4.1.7 Häodynamische Untersuchungen**

##### **4.1.7.1 Messung der Blutflussgeschwindigkeit in der *A. carotis sinister***

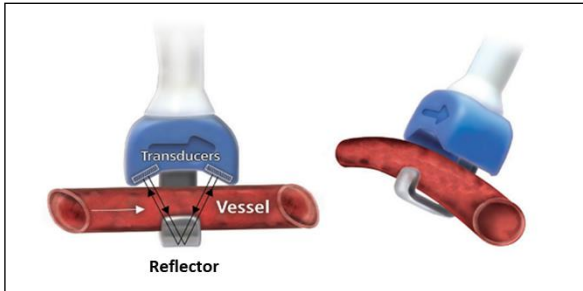
Wie bereits zuvor erwähnt, wurde mit Hilfe des Dopplerschallkopfs und des Blutflussmessgerätes über einen Zeitraum von 35 min kontinuierlich die Geschwindigkeit des Blutflusses in der *A. carotis sinister* aufgezeichnet. Mittels des dazugehörigen Programmes WINDAQ® Data Acquisition (Version 2.61) konnte sowohl graphisch in Form einer Kurve als auch zeitlich die Thrombosierung nach Induktion der Gefäßwandläsion detektiert werden. Die Messung erfolgte zunächst präoperativ, unmittelbar vor der eigentlichen Gefäßwandläsion zur Bestimmung des sogenannten basalen Blutflusses über einen Zeitraum von 4 min. Anschließend wurde die Aufzeichnung während der Applikation des in Eisen-(III)-chlorid getränkten Filterpapiers und postoperativ für weitere 25 min fortgeführt. Mit Hilfe der WINDAQ® Waveform Browser Software wurden die aufgezeichneten Flusskurven analysiert.

##### **4.1.7.2 Aufbau und Messprinzip des Dopplerschallkopfs**

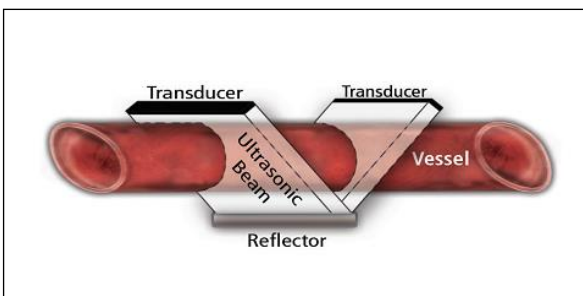
Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Dopplerschallkopf, respektive *Flowprobe*, setzt sich aus einem Sondenkörper, zwei Ultraschalltransducern und einem fixen, akustischen Reflektor zusammen. Zur Detektion der arteriellen Fließgeschwindigkeit wurde die zu vermessende Karotisarterie auf den V-förmigen Haken der *Flowprobe* aufgegabelt, auf deren Boden sich der Reflektor befand. Auf der gegenüberliegenden Seite links und rechts des Reflektors waren die beiden Messfühler (Transducer) angebracht (siehe Abb. 4-6). Bei dem eigentlichen Messvorgang der arteriellen Blutflussgeschwindigkeit wurden Ultraschallwellen auf die Karotisarterie übertragen. Diese gelangen zunächst von dem ersten Transducer durch das Gefäß. Hier streuen die im Gefäß zirkulierenden Erythrozyten das Ultraschallsignal aufgrund ihrer Eigenbewegung wieder zurück. Dieses wird dann von dem Reflektor eingefangen und in gebündelter Form an den zweiten Transducer weitergeleitet, der es wiederum in ein elektrisch nutzbares Signal umwandelt (siehe Abb. 4-7). Das allgemeine Messprinzip der Blutflussgeschwindigkeit beruht auf der sogenannten Ultraschall-



Durchflussmessung, welche sich den Dopplereffekt zu Nutze macht. Hierbei breiten sich innerhalb des strömenden Mediums (Blut) Schallwellen durch dessen Eigengeschwindigkeit aus. Folglich tritt aufgrund der Relativbewegung von Signalgeber und Signalempfänger eine Frequenzverschiebung auf, die als verwertbares Signal zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit genutzt werden kann.



**Abb. 4-6: Aufbau der Dopplersonde (Transonic® Flowprobe).** Schematische Darstellung des Dopplerschallkopfs mit Sondenkopf, Reflektor und zwei Messfühlern (Transducer). Nach [85].



**Abb. 4-7: Messprinzip der Dopplersonde.** Dargestellt ist der Verlauf der Ultraschallwellen beim Eintritt in das Gefäß. Nach [85].

#### 4.1.7.3 Okklusionsverhalten und hämodynamische Parameter

Durch die Induktion der Gefäßwandläsion in der *A. carotis* wurde eine arterielle Thrombose induziert, die eine Okklusion, sprich eine Einengung oder kompletten Verschluss des Gefäßlumens zur Folge hatte. Resultierend daraus kam es zu einer Verringerung des Blutflusses in der *A. carotis*. Zur Quantifizierung der arteriellen Thrombusbildung wurde zunächst die Okklusionszeit nach Entfernen des Filterpapiers bestimmt. Hierbei unterschied man zwischen der „Zeit bis zur ersten thrombotischen Okklusion“ (min) und der „Zeit bis zur letzten thrombotischen Okklusion“ (min). Hinsichtlich des Blutflusses galt laut Herstellerangabe des technischen Messfehlers eine Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit auf  $\leq 0,2$  ml/min als komplette thrombotische Okklusion. Lag die Blutflussgeschwindigkeit innerhalb der Messperiode bei diesem bzw. unter diesem Wert, handelte es sich um eine „stabile Stenose“ der Karotisarterie. Rekanalisierte hingegen das Gefäß, kam es zur Reperfusion und somit auch zur erneuten Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit nach vorangehender Okklusion. Dieses Verhalten wurde als „instabile Stenose“ definiert. Des Weiteren wurde protokolliert, ob das Gefäß am Ende der jeweiligen Messperiode offen

(Blutflussgeschwindigkeit  $>0,2$  ml/min) oder verschlossen (Blutflussgeschwindigkeit  $<0,2$  ml/min) war. Versuchstiere, die auf die Induktion der Gefäßwandläsion ohne adäquate Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit reagierten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

#### **4.1.8 Messung der Blutungszeit mittels *Tail tip bleeding***

Bei dem sogenannten *Tail tip bleeding*-Assay handelt es sich um ein *in vivo*-Verfahren zur Bestimmung der Blutungszeit an der murinen Schwanzvene und somit um einen Test zur Abschätzung der Hämostase, welche unter anderem von der Funktion und der Aktivität der Blutplättchen abhängig ist. In der vorliegenden Arbeit sollte dies Aufschluss darüber geben, inwiefern sich die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion auf die Hämostase auswirkt. Dieser Assay wurde nach einem von Liu Y *et al.* publizierten Protokoll durchgeführt [86]. Dabei wurde die zu untersuchende Maus mit Hilfe einer Fixiereinheit, einem sogenannten Maus-Restrainer, auf einer 37°C-temperierten Wärmeplatte immobilisiert. Der Schwanz des Tieres blieb dabei frei zugänglich. Erst im Anschluss wurde die Maus mittels Narkoseanlage und einem Gemisch aus 0,5% O<sub>2</sub> und 1,0% Isofluran leicht anästhesiert. Nun wurden 2 mm der distalen herabhängenden Schwanzspitze mit Hilfe eines Skalpells abgetrennt. Unmittelbar danach wurde der amputierte Schwanz in ein 50 ml-Falcon mit 37°C warmer 0,9%iger NaCl-Lösung eingetaucht und die Zeit bis zum kompletten Sistieren der Blutung gestoppt. Hierbei war darauf zu achten, dass der Schwanz stets ruhig nach unten hing. Insgesamt wurden zwei Messwerte ermittelt, und zwar die „Zeit bis zum ersten Blutungsstopp“ (sec) und die „Zeit bis zum letzten Blutungsstopp“ (sec) innerhalb einer Messperiode von 10 min. Das Versiegen der Blutung musste dabei mindestens für 30 sec andauern um als erfolgreiche Blutungszeit registriert zu werden. Um die verlorene Blutmenge zu bestimmen, wurde zudem mit Hilfe eines Plattenphotometers (Infinite® M200 PRO NanoQuant) die optische Dichte, sprich Absorption der blutigen Kochsalzlösung, bei 560 nm gemessen. Als Referenz wurde eine bekannte Blutmenge und als Leerwert eine 0,9%ige Kochsalz-Lösung verwendet.

#### **4.1.9 Blutzellanalyse**

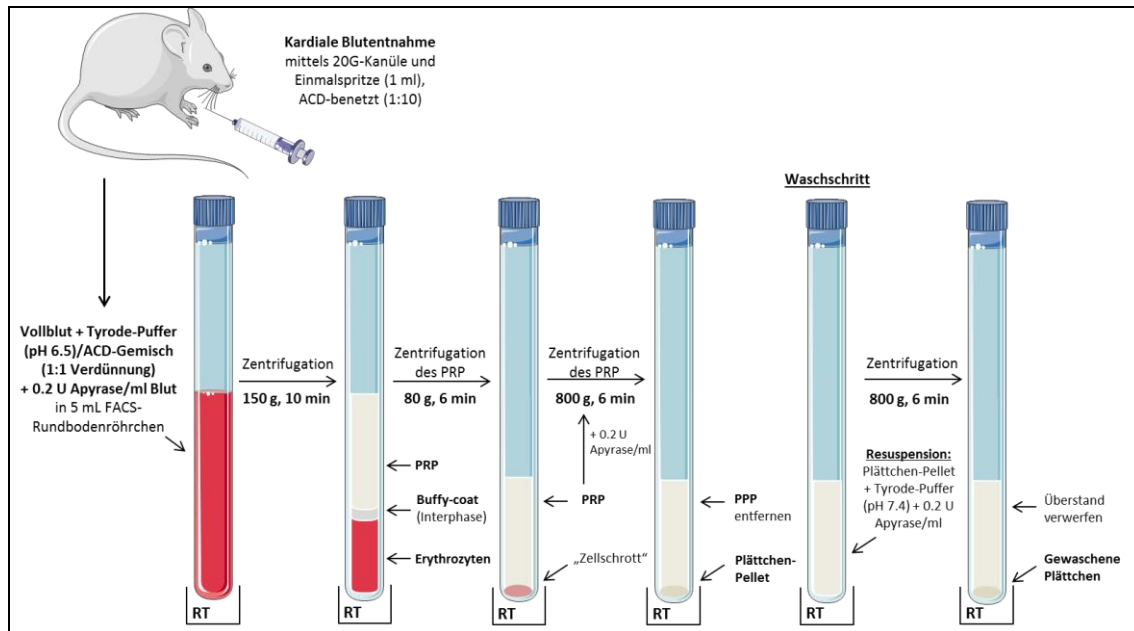
Um mögliche Unterschiede in der Hämatopoese der beiden Genotypen auszuschließen, wurden die Gesamtzellzahlen im Vollblut anhand einer automatisierten laborchemischen Blutzellanalyse untersucht. Hierzu wurden die

Versuchstiere zunächst durch eine intraperitoneale Injektion mit 5% Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und 2% Xylazin (6 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und anschließend auf dem Rücken liegend auf einer festen Unterlage fixiert. Danach wurde mit Hilfe einer 20G-Kanüle und einer mit ACD (engl. *Acid citrate dextrose*) benetzten Einmalspritze (1 ml) das Herz punktiert und bis zu 1 ml Blut entnommen. Das gewonnene Vollblut wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß im Verhältnis 1:9 mit dem Antikoagulans versetzt. Nun konnten mit Hilfe eines automatisierten Hämatologieanalysators (KX21N; Sysmex) die zellulären Blutbestandteile ermittelt werden. Nach Blutentnahme wurden die anästhesierten Mäuse durch Luxation der Halswirbelsäule getötet.

### **4.1.10 Isolation muriner Blutplättchen („*washed platelets*“)**

Zur Isolation muriner Blutplättchen wurde in der vorliegenden Arbeit die Technik der sogenannten „*washed platelets*“ verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren nach Cazenave *et al.* [87], abgeleitet von der Technik nach Mustard *et al.* [88]. Dieses erlaubt aufgrund von Zentrifugations- und Waschschritten unter Verwendung von Tyrode-Puffer, einem isoosmotischen Phosphatpuffer, die Isolation und Aufreinigung von Thrombozyten [87]. Die Gewinnung der Blutplättchen erfolgte aus ACD-antikoaguliertem Vollblut. Anästhesie, Fixierung und kardiale Blutentnahme der Versuchstiere wurden analog der Vorgehensweise bei der Blutzellanalyse (siehe 4.1.9) durchgeführt. Wichtig war, dass die Blutentnahme möglichst langsam und ohne Zug durchgeführt wurde, um eine mögliche Voraktivierung der Blutplättchen durch zu starken Scherstress zu vermeiden. Das entnommene Vollblut wurde in 5 ml-Rundbodenröhrchen aus Polystyrol, sogenannte FACS-Röhrchen (*Falcon*<sup>®</sup>), überführt. Hierbei war darauf zu achten, dass keine Röhrchen aus Glas verwendet wurden, da durch deren negativ geladene Oberfläche die Gefahr der Thrombozytenaktivierung besteht. Anschließend wurde pro ml Blut 0,2 U Apyrase (Adenosindiphosphatase; Stock: 0,1 U/ml), ein membranständiges Plasmaprotein, hinzugefügt. Dies sollte verhindern, dass die Plättchen refraktär gegenüber ADP, dem wesentlichen Energieträger der Thrombozytenaggregation, werden. Zudem sollte es dafür sorgen, dass die Blutplättchen ihre discoidale Form beibehalten und somit nicht frühzeitig aggregieren [87]. Unmittelbar danach wurde das Vollblut im Verhältnis 1:1 mit dem Tyrode/ACD-Gemisch versetzt. Hierzu ließ man 833 µl vorgewärmten (37°C) Tyrode-Puffer (pH 6,5) und 167 µl ACD pro ml Blut langsam einträufeln. Nun wurde das Röhrchen mit Parafilm abgedeckt und vorsichtig über Kopf gemischt. Hierbei war zur

Vermeidung einer frühzeitigen Thrombozytenaktivierung stets eine vorsichtige Arbeitsweise einzuhalten. Durch Zentrifugation der Thrombozytensuspension bei 150 g für 10 min bei Raumtemperatur (RT) (ohne Bremse) wurde Plättchen-reiches Plasma (PRP, engl. *platelet rich plasma*) gewonnen. Dieses wurde mittels Transferpipette (mit breiter Spitze) abgenommen und in ein neues FACS-Röhrchen transferiert. Dabei musste darauf geachtet werden, die Interphase, den sogenannten „*buffy coat*“, nicht aufzumischen. Durch Zentrifugieren des PRP bei 80 g für 6 min bei RT konnten eventuell vorhandene Leukozyten aus der Interphase sedimentiert werden. Der Überstand (PRP) wurde in ein neues FACS-Röhrchen überführt und pro ml PRP 0,2 U Apyrase hinzugefügt, vorsichtig gemischt und bei 800 g für 6 min bei RT pelletiert. Hierbei entstand ein Plättchen-reiches Pellet und darüber das sogenannte Plättchen-arme Plasma (PPP, engl. *platelet poor plasma*). Letzteres wurde sorgfältig abpipettiert und wiederum bei 3.200 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Dadurch konnten sämtliche zellulären Bestandteile aus dem PPP entfernt werden. Das Plättchen-reiche Pellet wurde vorsichtig in 1 ml vorgewärmten Tyrode-Puffer (pH 7,4) und 0,2 U/ml Apyrase resuspendiert und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte eine letzte Zentrifugation bei 800 g für 6 min bei RT. Dies diente zum Waschen der Plättchen. Der Überstand konnte nun verworfen und das entstandene Thrombozytenpellet (je nach Größe) in 100-200 µl vorgewärmten Tyrode-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und anschließend für 15-20 min bei 37°C inkubiert werden. Nun wurde mit Hilfe des automatisierten Hämatologieanalysators (KX21N; Sysmex) die Zahl der isolierten Thrombozyten bestimmt und deren Konzentration mittels vorgewärmten Tyrode-Puffers (pH 7,4) auf  $2 \times 10^8$  Plättchen/ml eingestellt. Um im Folgenden mit funktionsfähigen Plättchen arbeiten zu können, wurde unmittelbar vor der Aggregationsmessung 2 mM  $\text{CaCl}_2$  zu der Thrombozytensuspension hinzugefügt.



**Abb. 4-8: Isolation muriner Thrombozyten unter Anwendung der sogenannten "washed platelets"-Technik:** Dargestellt sind die einzelnen Zentrifugations- und Waschschrte. ACD (engl. *Acid citrate dextrose*), PRP (engl. *platelet rich plasma*, Plättchen-reiches Plasma), PPP (engl. *platelet poor plasma*, Plättchen-armes Plasma). Modifiziert nach [87]

#### 4.1.11 Thrombozytenaggregationsmessung

Bei der Thrombozytenaggregationsmessung handelt es sich um ein Verfahren zur Überprüfung der Thrombozytenfunktion *ex vivo*. In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung wurde diesbezüglich die Methode der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born angewandt. Diese beruht auf der Messung der Lichtdurchlässigkeit einer Thrombozytensuspension.

Hierzu wurden zunächst murine Thrombozyten mit Hilfe der „washed platelets“-Technik isoliert (siehe 4.1.10). Anschließend wurden 200 µl der hergestellten Thrombozytensuspension ( $2 \times 10^8$  Plättchen/ml) in eine lichtdurchlässige Küvette mit Magnetkern transferiert und in die Küvettenvorrichtung des Aggregometers platziert. Als Aggregometer kam das Model APACK 4 S Plus zum Einsatz, welches uns freundlichst von der Arbeitsgruppe um Herrn PD Dr. med. xxx (CTH, Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt wurde. Vor Beginn der Messung wurden die Proben für 2-5 min bei 37°C im Aggregometer äquilibriert. Im Anschluss wurde zunächst für jede Probe ein Leerwert ermittelt um so die Trübung/Lichtdurchlässigkeit der Thrombozytensuspension vor Zugabe des Agonisten zu bestimmen. Nun konnte Thrombin (100 U/ml) als Agonist zugegeben werden. Dies führte zur Thrombozytenaggregation und somit zur Aufklärung der Suspension, was in

einer Zunahme der Transmission/Lichtdurchlässigkeit resultierte. Insgesamt wurde über einen Zeitraum von 10 min bei konstanten 37°C gemessen. Die Temperatur spielte hierbei eine essentielle Rolle, da Kälte eine frühzeitige Thrombozytenaktivierung auslösen kann. Mit Hilfe der APACT 4S PLUS-Software (Version 1.21c) konnte die Transmissionsänderung detektiert und in Abhängigkeit von der Zeit als Kurve dargestellt werden. Hierbei wurde die Transmissionsänderung in Prozent analog zu unstimulierten Thrombozyten wiedergegeben. Zur Quantifizierung wurden die emittierten Messwerte der entsprechenden Versuchsgruppe (WT oder KO) zugeordnet und in dem Statistikprogramm GraphPad Prism 5.01 gegen die Zeit (sec) aufgetragen und statistisch ausgewertet.

## 4.2 Histologische Untersuchungen

### 4.2.1 Erstellen von Paraffinschnitten

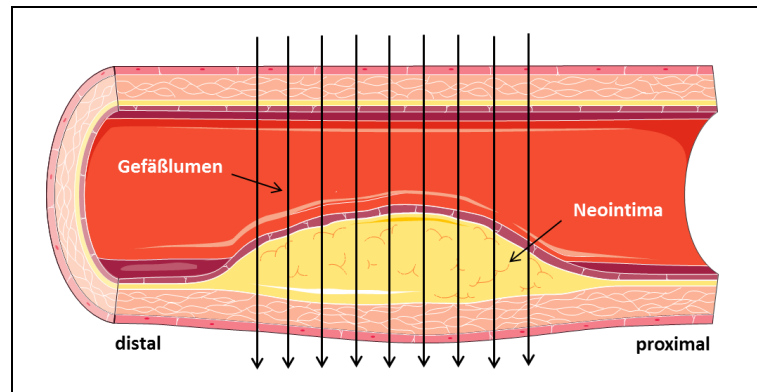
Zu Beginn einer histologischen Analyse steht die Paraffineinbettung des zu untersuchenden Gewebes. Hierzu wurden die zuvor in 4%iger Zinkformalin-Lösung fixierten und in 70%igem Ethanol gelagerten Karotisarterien (*sinister* und *dexter*) zunächst in beschriftete Einbettkassetten transferiert und für zwei Stunden unter fließendem Wasser gespült. Im Anschluss wurden sie in einen Einbettautomaten (LEICA TP1020) zur automatischen Gewebeeinfiltration überführt. Hier durchliefen die Gewebe eine aufsteigende Ethanolreihe zur Entwässerung, bevor sie in das Intermedium Xylool überführt und danach mit Paraffin infiltriert wurden. Danach wurden die Arterien mittels einer Paraffinausgießstation (LEICA EG1150 H) und entsprechenden Einbett-Ausgießformen senkrecht stehend in Paraffin eingeblockt. Hierzu ließ man das erhitzte Paraffin bei 4°C erkalten und aushärten. Nun konnten aus den Paraffinblöcken mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms 5 µm-dicke Serienschnitte angefertigt werden. Geschnitten wurde jeweils von proximal nach distal, beginnend am kaudalen Ende des Gefäßes, an welchem sich die Verletzungsstelle befand bis hin zur Karotisbifurkation. So konnte die neointimale Läsion auf ihrer gesamten Länge dargestellt werden (siehe Abb. 4-9). Pro Objektträger wurden vier Gewebeschnitte mit Vermerk der dazugehörigen Versuchstiernummer aufgezozen. Dies erfolgte mittels eines Kaltwasserbades (20°C) zum Auffangen der Gewebeschnitte und eines Heißwasserbades (45°C) zum Strecken der Schnitte. Dadurch wurde ein glattes Aufziehen der Gewebeschnitte auf die Objektträger gewährleistet. Vor Verwendung der

Schnitte für die Histologie wurden diese über Nacht bei 60°C im Wärme- und Trockenschrank getrocknet. In der nachfolgenden Tabelle ist das allgemeine Protokoll zur Paraffineinbettung dargestellt (siehe Tabelle 4-4).

**Tabelle 4-4: Protokoll zur Paraffineinbettung\***

<b>Protokoll zur Paraffineinbettung</b>		
<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Lösung/Reagenz</b>	<b>Dauer</b>
Fixierung	4%ige Zinkformalin-Lösung	4 bis 24 h
Lagerung	70%iger Ethanol	max. 7 d
Spülen	fließendes Leitungswasser	30 min
Entwässerung (Einbettautomat)	ddH <sub>2</sub> O	30 min
	70%iger Ethanol	120 min
	80%iger Ethanol	120 min
	96%iger Ethanol	120 min
	96%iger Ethanol	120 min
	100%iger Ethanol	120 min
	100%iger Ethanol	120 min
Intermedium (Einbettautomat)	Xylol	120 min
	Xylol	120 min
Gewebeinfiltration (Einbettautomat)	Paraffin	120 min
	Paraffin	240 min
Ausblocken (Paraffinausgießstation)	Paraffin	-

\*Gezeigt sind die einzelnen Arbeitsschritte von der Fixierung über die Gewebeeinbettung mittels Einbettautomaten bis hin zum Ausblocken mittels Paraffinausgießstation.



**Abb. 4-9: Schematische Darstellung zur Herstellung von Paraffinschnitten:** Längsschnitt durch die einzelnen Wandschichten 21 Tage nach Gefäßwandverletzung: Die Pfeile geben hierbei die Schnittrichtung an (Die Abbildung wurde unter Verwendung der *Powerpoint image bank* von Servier Medical Art erstellt).

#### 4.2.2 Verhoeff's Elastica-Färbung zur Darstellung der elastischen Fasern

Die Verhoeff's Elastica-Färbung wird im Allgemeinen zur Darstellung von elastischen Fasern verwendet. In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung war sie wesentlicher Bestandteil der morphometrischen Analyse der zu untersuchenden Karotisarterien. Mit ihrer Hilfe wurden die *Membrana elastica interna, media* und *externa* angefärbt, um diese besser voneinander differenzieren und somit eine Aussage über die Größe der Intima, Neointima, Media und Adventitia treffen zu können. Neben der Analyse der neointimalen Läsion konnte somit auch eine Übersichtsfärbung für spätere immunhistochemische Untersuchungen generiert werden. Zur Durchführung der Verhoeff's Elastica-Färbung wurden zunächst pro Arterie fünf bis sechs Paraffinschnitte, gleichmäßig verteilt über die gesamte Länge der Neointima, in einer Glasküvette gesammelt. Im Anschluss wurden diese anhand des nachfolgenden Färbeprotokolls der Verhoeff's Elastica-Färbung (siehe Tabelle 4-5) unterzogen. Die Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen sind der Tabelle unter 3.13.1 zu entnehmen. Sowohl die Verhoeff's Elastica-Färbelösung als auch die 2%ige Eisenchlorid- und die 5%ige Natriumthiosulfat-Lösung waren nur für den einmaligen Gebrauch vorgesehen und mussten deshalb vor jedem Färbedurchgang erneut angesetzt bzw. abgefüllt werden. Als kritisch war bei dieser Färbung vor allem der Differenzierungsschritt anzusehen. Hierbei war nach Inkubation mit Natriumthiosulfat mikroskopisch auf eine ausreichende Differenzierung der Laminae von der Gefäßwand zu achten. War dies nicht der Fall, wurde nochmals 20 sec mit frischer 2%iger Eisenchlorid-Lösung und anschließend mit frischer 5%iger Natriumthiosulfat-Lösung nachdifferenziert. Als Färbeargebnis erhielt man schwarz gefärbte elastische Fasern.



**Tabelle 4-5: Protokoll zur Verhoeff's Elastica-Färbung\***

<b>Protokoll zur Verhoeff's Elastica-Färbung</b>			
	<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Lösung/Reagenz</b>	<b>Dauer</b>
<b>1</b>	Entparaffinisieren	Xylol	3 x 5 min
<b>2</b>	Rehydrieren in absteigender Ethanolreihe	2 x 100%iger, 2 x 96%iger, 70%iger und 50%iger Ethanol	jeweils 2 min
<b>3</b>	Färben der elastischen Fasern	Verhoeff's Elastica-Färbelösung	15 min
<b>4</b>	Waschen	fließendes Leitungswasser	20 min
<b>5</b>	Spülen	ddH <sub>2</sub> O	5 min
<b>6</b>	Differenzieren	2%ige Eisenchlorid-Lösung	2.5 min
<b>7</b>	Differenzieren	5%ige Natriumthiosulfat-Lösung (Mikroskopische Kontrolle)	1 min
<b>8</b>	Waschen	fließendes Leitungswasser	5 min
<b>9</b>	Spülen	ddH <sub>2</sub> O	5 min
<b>10</b>	Gegenfärben	Van-Gieson-Lösung (wiederverwendbar)	<1 min
<b>11</b>	Spülen	ddH <sub>2</sub> O	5 min
<b>12</b>	Dehydrieren in aufsteigender Ethanolreihe	2 x 100%iger, 2 x 96%iger, 70%iger und 50%iger Ethanol	jeweils 2 min
<b>13</b>	Fixieren	Xylol	2 x 1 min
<b>14</b>	Eindecken mit Eindeckmedium	<i>Eukitt</i> <sup>®</sup>	-

\*Gezeigt sind die einzelnen Arbeitsschritte von der Entparaffinisierung und Rehydrierung über die jeweiligen Färbe- und Differenzierungsschritte bis zum Eindecken der Gewebeschnitte.

### 4.2.3 Masson-Trichrom-Färbung zur Visualisierung von Kollagenfasern und thrombotischem Material

Bei der Masson-Trichrom (MTC)-Färbung handelt es sich um eine sogenannte Trichromfärbung, welche auf Grundlage von drei Farbstoffen (Weigert's Eisenhämatoxylin, Biebrich-Scarlet-Acid-Fuchsin und Anilinblau) eine Differenzierung von Kollagen bzw. Bindegewebe und Muskelfasern bzw. Fibrin ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit wurde die MTC-Färbung sowohl zur Analyse der neointimalen Läsion 21 Tage nach Gefäßwandverletzung als auch zur Quantifizierung des thrombotischen Materials sechs Tage nach Gefäßwandverletzung angewandt. Zur Durchführung der MTC-Färbung wurde zunächst pro Arterie ein für die neointimale Läsion charakteristischer Paraffinschnitt in einer Glasküvette gesammelt und anhand des nachfolgenden Färbeprotokolls gefärbt (siehe Tabelle 4-6). Hierbei war darauf zu achten, dass die Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung vor jedem Färbedurchgang frisch angesetzt wurde und wie die Phosphomolybdic-Phosphotungstic-Lösung jeweils nur einmal verwendet wurde. Alle für die MTC-Färbung benötigten Lösungen und deren Zusammensetzungen sind in einer Tabelle unter 3.13.1 aufgelistet. Als Färbeergebnis erhielt man rot gefärbte Muskelfasern und Zytoplasma, hellrot gefärbtes Fibrin und blau angefärbte Kollagenfasern.

**Tabelle 4-6: Protokoll zur Masson-Trichrom-Färbung\***

<b>Protokoll zur Masson-Trichrom-Färbung</b>			
	<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Lösung/Reagenz</b>	<b>Dauer</b>
<b>1</b>	Entparaffinisieren	Xylol	3 x 5 min
<b>2</b>	Rehydrieren in absteigender Ethanolreihe	2 x 100%iger, 2 x 96%iger, 70%iger und 50%iger Ethanol	jeweils 2 min
<b>3</b>	Spülen	ddH <sub>2</sub> O	5 min
<b>4</b>	Nachfixieren	Bouin's Fixative	über Nacht
<b>5</b>	Auswaschen der Pikrinsäure	fließendes Leitungswasser	bis klar
<b>6</b>	Färben (Zellkernfärbung)	Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung	10 min
<b>7</b>	Waschen	fließendes Leitungswasser	10 min

8	Spülen	ddH <sub>2</sub> O	kurz
9	Färben (Zytoplasmafärbung)	Biebrich-Scarlet-Acid-Fuchsin (wiederverwendbar)	15 min
10	Spülen	ddH <sub>2</sub> O	bis klar
11	Differenzieren	1.25%ige Phosphomolybdic- Phosphotungstic-Lösung	10-15 min
12	Gegenfärben (Kollagenfärbung)	2.5%ige Anilinblau-Lösung (wiederverwendbar)	8 min
13	Spülen	ddH <sub>2</sub> O	bis klar
14	Differenzieren	1%ige Essigsäure	5 min
15	Dehydrieren in aufsteigender Ethanolreihe	2 x 100%iger, 2 x 96%iger, 70%iger und 50%iger Ethanol	jeweils 2 min
16	Fixieren	Xylol	2 x 5 min
17	Eindecken mit Eindeckmedium	<i>Eukitt</i> <sup>®</sup>	-

\*Gezeigt sind die einzelnen Arbeitsschritte von der Entparaffinisierung und Rehydrierung über die jeweiligen Färbe- und Differenzierungsschritte bis zum Eindecken der Gewebeschnitte.

#### 4.2.4 Picro-Siriusrot-Färbung zur Darstellung von Kollagenfasern

Zur Lokalisierung von interstitiellem Kollagen innerhalb der neointimalen Läsion 21 Tage nach Gefäßwandverletzung wurde die sogenannte Picro-Siriusrot-Färbung eingesetzt. Mit Hilfe eines Polarisationsmikroskops konnten somit dicke Kollagenfasern (Typ I) als gelb-orange leuchtend und dünne Kollagenfasern (Typ III) durch eine grünliche Doppelbrechung charakterisiert werden. Zur Durchführung der Picro-Siriusrot-Färbung wurde zunächst pro Arterie ein für die neointimale Läsion charakteristischer Paraffinschnitt in einer Glasküvette gesammelt und anhand des nachfolgenden Färbeprotokolls gefärbt (siehe Tabelle 4-7). Alle hierfür benötigten Lösungen und deren Zusammensetzungen sind der Tabelle unter 3.13.1 zu entnehmen.

Tabelle 4-7: Protokoll zur Picro-Siriusrot-Färbung\*

Protokoll zur Picro-Siriusrot-Färbung			
	Arbeitsschritt	Lösung/Reagenz	Dauer
1	Entparaffinisieren	Xylol	3 x 5 min
2	Rehydrieren in absteigender Ethanolreihe	2 x 100%iger, 2 x 96%iger, 70%iger und 50%iger Ethanol	jeweils 2 min
3	Spülen	ddH <sub>2</sub> O	5 min
4	Färben	1%ige Picro-Siriusrot-Lösung (wiederverwendbar)	60 min
5	Spülen	2 x 30%ige Essigsäure	jeweils 1 min
6	Spülen	ddH <sub>2</sub> O	kurz
7	Dehydrieren	3 x 100%iger Ethanol	jeweils 3 min
8	Fixieren	Xylol	2 x 5 min
9	Eindecken mit Eindeckmedium	<i>Eukitt</i> <sup>®</sup>	-

\*Gezeigt sind die einzelnen Arbeitsschritte von der Entparaffinisierung und Rehydrierung über den entsprechenden Färbeschritt bis zum Eindecken der Gewebeschnitte.

## 4.3 Immunhistochemische Färbungen

### 4.3.1 Allgemeines Prinzip der Immunhistochemie

Die Methode der Immunhistochemie macht sich die Antigen-Antikörper-Reaktion zu Nutze. Hierbei wird die Affinität von Antikörpern zu einem speziellen Antigen, einem sogenannten Epitop, verwendet. So ist es möglich, die Verteilung dieses spezifischen Antigens im Gewebeschnitt sichtbar zu machen. In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung wurde ausschließlich die ABC- (engl. *Avidin-Biotin-Complex*) Methode als Antigen-Antikörper-Reaktion angewandt. Bei dieser Methode bindet zunächst der Primärantikörper an das zu untersuchende Antigen. Durch

Verwendung eines Biotin-markierten Sekundärantikörpers, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet ist, kann dann der primäre Antikörper gebunden werden. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin (Vitamin H) und stellt durch seine sehr starke Affinität zu Avidin/Streptavidin die Verbindung für den Avidin-Biotin-Komplex her. Im weiteren Verlauf wird mit Hilfe eines Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes der Sekundärantikörper gebunden. Hierbei handelt es sich meist um das Enzym der Meerrettich-Peroxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*). Um den kompletten Antikörper-Komplex sichtbar zu machen, wird ein farbloses Substrat des Enzyms (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid, DAB oder 3-Amino-9-Ethylcarbazol, AEC), ein sogenanntes Chromogen, eingesetzt. Durch die Bindung des entsprechenden Enzyms, in diesem Fall der Peroxidase an das Substrat, kommt es zu einem Farbumschlag und somit zur Anfärbung der ursprünglich durch den Primärantikörper gebundenen Epitope.

### **4.3.2 Allgemeines Färbeprotokoll zur Immunhistochemie**

Alle für die Immunhistochemie benötigten Lösungen und deren Zusammensetzungen sind der Tabelle unter 3.13.2 zu entnehmen. Zur Durchführung einer immunhistochemischen Färbung wurde zunächst für jede zu untersuchende Arterie ein für die neointimale Läsion repräsentativer Paraffinschnitt identifiziert und in einem Färbegestell gesammelt. Diese wurden dann dreimal für jeweils 5 min in Xylol entparaffiniert und anschließend für jeweils 2 min in 100%igen Ethanol getaucht. Danach wurden die Schnitte für 10 min lichtgeschützt unter einer Styroporbox in 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung in Methanol inkubiert. Dadurch sollte die endogene Peroxidase-Aktivität (z.B. in Erythrozyten) blockiert und somit falsch positive Färbeergebnisse verhindert werden. Nach der Rehydrierung der Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (2 x 96%iger, 70%iger und 50%iger Ethanol) für jeweils 2 min, wurden diese für 5 min in ddH<sub>2</sub>O gespült. Je nach Antikörper wurde an dieser Stelle ein Permeabilisierungsschritt mit 0,05%igem bzw. 0,2%igem Triton-X100-Puffer für 10 min bei 37°C durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die sogenannte hitzeinduzierte Antigendemaskierung (engl. *heat induced antigen retrieval*). Hierzu wurden die Gewebeschnitte entweder in 500 ml einfach konzentriertem Citrat-Puffer (0,01 M Gebrauchslösung, pH 6,0) oder in 500 ml Tris/EDTA-Puffer (0,01M/0,001M Gebrauchslösung, pH 9,0) für 10-15 min bei 800 Watt in einem hitzebeständigen Gefäß in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Mit Hilfe der hitzeinduzierten Antigendemaskierung konnten fixierbedingte Quervernetzungen aufgebrochen werden,

um somit eine Permeabilitätssteigerung zu erreichen und die maskierten Epitope für den Antikörper wieder frei zugänglich zu machen. Am Ende der Mikrowellenbehandlung mussten die Objektträger für 20 min im Citrat-Puffer bei RT abkühlen. Danach wurden die einzelnen Gewebe mit Hilfe eines Fettstiftes (*ImmEdge<sup>TM</sup> Pen*) umrandet, sodass bei der späteren Antikörperbehandlung durch die hydrophobe Barriere sowohl ein Auslaufen als auch ein Ineinanderlaufen der Antikörperlösung von benachbartem Gewebe vermieden werden konnte. Anschließend wurden die im Gewebe vorhandenen unspezifischen Bindungsstellen für den Sekundärantikörper geblockt. Hierzu wurden die Schnitte für 30 min in 5%igem bzw. 10%igem Normalserum, entsprechend der Spezies des Sekundärantikörpers, inkubiert. (siehe Tabelle 4-8). Danach folgte die Inkubation der Schnitte in dem mit 1x PBS oder Antibody Diluent (AB Diluent, mit Hintergrundreduzierungskomponente, Dako) verdünnten Primärantikörper. Dazu wurden die Objektträger über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert, um sie so vor dem Austrocknen zu schützen. Als Negativkontrolle wurde auf jedem Objektträger ein Gewebeschnitt ausschließlich mit dem Verdünnungsmittel (1x PBS oder AB Diluent) anstatt des Primärantikörpers behandelt. Zusätzlich wurde bei jeder Färbung eine Positivkontrolle, sprich ein Gewebe mit bekannter Antigenexpression, mitgeführt. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger dreimal für je 5 min mit 1x PBS gewaschen, um überschüssigen, nicht gebundenem Antikörper zu entfernen. Anschließend folgte eine 60-minütige Inkubation bei RT mit dem biotinylierten Sekundärantikörper in einer 1:1.000-Verdünnung in PBS. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal für je 5 min in 1x PBS gewaschen. Nun konnte der Sekundärantikörper mit Hilfe des Peroxidase-gekoppelten Avidin-Biotin-Komplexes (ABC HRP Kit) markiert werden. Hierzu wurden die Gewebeschnitte mit einem Tropfen der nach Herstellerangaben angesetzten ABC-Lösung vollständig benetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren dreifachen Waschen in 1x PBS wurde der Antikörper-Komplex mittels Peroxidase-Substrat sichtbar gemacht. Dies erfolgte je nach Antikörper entweder mit AEC oder DAB als Chromogen, welches jeweils kurz vor Verwendung laut Herstellerangaben frisch angesetzt wurde. Die daraufhin eintretende enzymatische Umsetzung wurde mikroskopisch anhand des einsetzenden Farbumschlages beobachtet und je nach Ergebnis nach 5 bis maximal 30 min mit ddH<sub>2</sub>O abgestoppt. Zur Gegenfärbung wurden die Objektträger drei- bis viermal kurz in Gill's Hämatoxylinlösung Nr. 3 eingetaucht, unter fließendem Leitungswasser „gebläut“ und 2 min in ddH<sub>2</sub>O Wasser gespült bis das Wasser klar wurde. Abschließend wurden die Objektträger luftblasenfrei mit dem Eindeckmedium

*IMMU-MOUNT™* eingedeckt. Sofern DAB als Chromogen eingesetzt wurde, konnte *Eukitt®* als Xylol-haltiges Eindeckmedium verwendet werden, da DAB sowohl Alkohol- als auch Xylol-stabil ist. Zuvor wurden die Gewebeschnitte jedoch für jeweils 2 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (2 x 96%iger Ethanol, 2 x 100%iger Ethanol) dehydriert und schließlich für 5 min in Xylol fixiert.

### 4.3.3 Spezifische Färbebedingungen zur Immunhistochemie

Nachfolgend sind die spezifischen Färbebedingungen zur Durchführung der jeweiligen immunhistochemischen Färbungen zusammenfassend in einer Tabelle dargestellt. Hierbei wurde  **$\alpha$ -SMA** (engl. *smooth muscle  $\alpha$ -actin*) als Marker für glatte Gefäßmuskelzellen verwendet. Des Weiteren kam **CD31** (engl. *cluster of differentiation 31*) als Endothelzellmarker zum Einsatz. CD31 ist ein Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül (PECAM-1, engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) und wird stark auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Zum Nachweis proliferierender Zellen innerhalb der einzelnen Gefäßwandschichten wurde eine immunhistochemische Färbung auf **PCNA** (engl. *proliferating-cell-nuklear-antigen*) durchgeführt. Mesenchymale Zellen wurden sowohl mit Hilfe des Fibroblastenmarkers **FSP1** (engl. *fibroblast-specific protein-1*) als auch des Myofibroblastenmarkers **PDGFR $\beta$**  (engl. *platelet-derived growth factor receptor beta*) dargestellt. Beide Zelltypen spielen bei der vaskulären Wundheilung eine wichtige Rolle. Zur Detektion von Makrophagen in der Neointima und Media wurde der Makrophagenmarker **F4/80** verwendet. Hinsichtlich des TGF $\beta$ -Signalweges wurde die Expression des **TGF $\beta$ -Rezeptors Type I** und **Type II** im Bereich der vaskulären Läsion untersucht. Zudem wurde eine spezifische Färbung des TGF $\beta$ -Liganden **BMP7** (engl. *bone morphogenetic protein 7*) und des vorwiegend von Plättchen sekretierte Chemokin **SDF1 $\alpha$**  durchgeführt. Abschließend wurden die beiden Metalloproteinasen **MMP2** und **MMP9** sowie die Serinprotease **Thrombin** eingesetzt. Für den Nachweis von Thrombin wurde als Verdünnungsmedium, anders als im allgemeinen Färbeprotokoll zur Immunhistochemie beschrieben, 0,5%iges Milchpulver anstelle von 1x PBS bzw. AB-Diluent verwendet.

Tabelle 4-8: Spezifische Färbebedingungen der verwendeten Primärantikörper in der Immunhistochemie

Primär-Antikörper	Verdünnung	Permeabilisierung	Epitop Demaskierung	Blockierung	Sekundär-Antikörper	Chromogen
<b>Mouse anti-mouse <math>\alpha</math>-SMA</b>	1:500 in 1x PBS	-	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal <b>Goat</b> Serum	Biotin-xx-goat-anti-mouse IgG	AEC
<b>Rat anti-mouse CD31</b>	1:20 in AB Diluent	0,05% Triton-X100	0,01M Citrat-Puffer	5% Normal <b>Goat</b> Serum	Biotin-xx-goat-anti-rat IgG	AEC
<b>Rabbit anti-mouse BMP7</b>	1:400 in 1x PBS	-	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal <b>Goat</b> Serum	Biotin-xx-goat-anti-rabbit IgG	AEC
<b>Rabbit anti-mouse FSP1</b>	1:500 in 1x PBS	-	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal <b>Goat</b> Serum	Biotin-xx-goat-anti-rabbit IgG	AEC
<b>Rat anti-mouse F4/80</b>	1:200 in 1x PBS	-	0,01M Tris / 0.001M EDTA	5% Normal <b>Goat</b> Serum	Biotin-xx-goat-anti-rat IgG	DAB
<b>Rabbit anti-mouse MMP2</b>	1:50 in 1x PBS	-	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal <b>Goat</b> Serum	Biotin-xx-goat-anti-rabbit IgG	AEC
<b>Goat anti-mouse MMP9</b>	1:50 in 1x PBS	-	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal <b>Rabbit</b> Serum	Biotin-xx-rabbit-anti-goat IgG	AEC
<b>Mouse anti-mouse PCNA</b>	1:500 in 1x PBS	0,05% Triton-X100	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal <b>Goat</b> Serum	Biotin-xx-goat-anti-mouse IgG	DAB
<b>Rabbit anti-mouse PDGFR<math>\beta</math></b>	1:100 in 1x PBS	-	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal <b>Goat</b> Serum	Biotin-xx-goat-anti-rabbit IgG	DAB
<b>Rabbit anti-mouse SDF1<math>\alpha</math></b>	1:20 in 1x PBS	-	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal <b>Goat</b> Serum	Biotin-xx-goat-anti-rabbit IgG	AEC



<b>Rabbit anti-mouse TGFβRI</b>	1:400 in 1x PBS	-	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal Goat Serum	Biotin-xx-goat-anti-rabbit IgG	AEC
<b>Rabbit anti-mouse TGFβRII</b>	1:30 in 1x PBS	-	0,01M Citrat-Puffer	10% Normal Goat Serum	Biotin-xx-goat-anti-rabbit IgG	AEC
<b>Rabbit anti-mouse Thrombin</b>	1:50 in 0.5% Milchpulver	0,2% Triton-X100	0,01M Tris / 0,001M EDTA	5% Milchpulver in 1x PBS	Biotin-xx-goat-anti-rabbit IgG	AEC

#### 4.3.4 Auswertung immunhistochemischer Färbungen

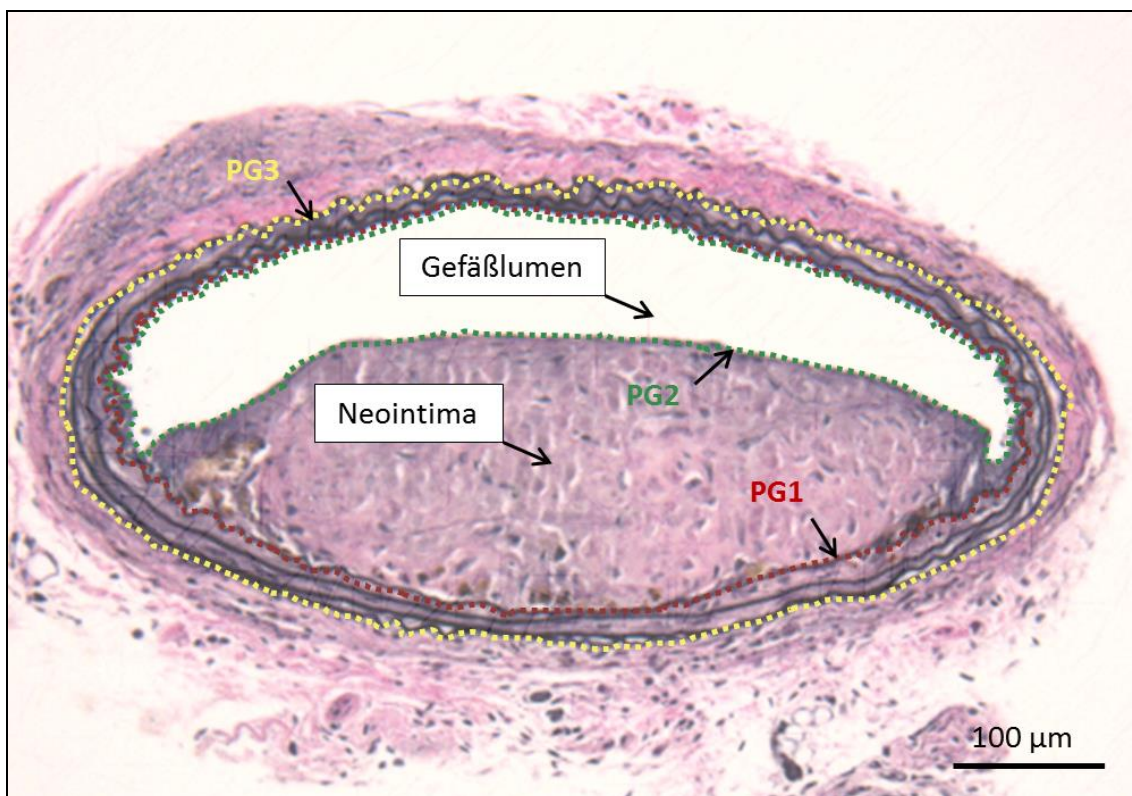
Mit Hilfe des Hellfeldmikroskops *OLYMPUS BX5* wurden die zuvor immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte in 20-facher, 40-facher und 100-facher Vergrößerung im Hellfeld bei Durchlicht fotografiert. Die morphometrische Analyse erfolgte unter Zuhilfenahme der Image-Pro® PLUS 7.0 Software. Zur Quantifizierung der neointimalen Reendothelialisierung wurde die relative Länge der CD31-positiven Endothelabschnitte bezogen auf die Lumengesamtlänge im Bereich der Neointima bestimmt. Die PCNA-Färbung wurde anhand der Zahl PCNA-positiver Zellen innerhalb der Neointima und Media, bezogen auf deren jeweilige Gesamtzellzahl, quantifiziert. Für alle anderen immunhistochemischen Färbungen wurde die immunpositive Fläche im Bereich der Neointima- und Media-Fläche ermittelt und deren prozentualer Anteil auf die jeweilige Gesamtfläche bestimmt. In Bezug auf die TGFβRI- und TGFβRII-Färbung wurde sowohl die Länge des immunpositiven Endothelabschnitts bezogen auf die neointimale Lumengesamtlänge als auch die immunpositive Fläche bezogen auf die Gesamtfläche der Neointima und Media ermittelt.

#### 4.4 Morphometrische Quantifizierung

Zur Analyse der Verhoeff's Elastica gefärbten Paraffinschnitte wurden diese zunächst unter Zuhilfenahme des Hellfeldmikroskops (*OLYMPUS BX5*) und der Software Image-Pro® PLUS 7.0 in 10-facher, 20-facher, 40-facher und 100-facher Vergrößerung im Hellfeld bei Durchlicht fotografiert. Die eigentliche morphometrische Quantifizierung erfolgte dann anhand der 10-fachen Vergrößerung und des nachfolgend beschriebenen Schemas.

#### 4.4.1 Ausmessen eines Arterienquerschnitts mit sichtbarer neointimaler Läsion

Zur Ausmessung des Arterienquerschnitts wurde das Programm Image Pro Plus verwendet. Es wurden ausschließlich Schnitte vermessen, die sichtbar eine neointimale Läsion bzw. thrombotisches Material vorwiesen. Hierzu wurde zunächst die *Membrana elastica interna* mit Hilfe eines Zeichentools markiert und als PG1 benannt. Als nächstes wurde das Gefäßlumen erfasst und als PG2 charakterisiert sowie die *Membrana elastica externa*, welche als PG3 markiert wurde (siehe Abb. 4-10). Aus diesen drei Markierungen resultierten jeweils Längen- und Flächengrößen, welche in eine speziell für die Morphometrie angefertigte Excel-Tabelle überführt wurden. Auf Grundlage dessen konnten sowohl die Fläche der Neointima und Media in  $\mu\text{m}^2$ , die Lumenstenose in Prozent als auch das Intima-Media-Verhältnis ermittelt werden. Nachfolgend sind die morphometrisch gemessenen Werte in einer Tabelle dargestellt (siehe Tabelle 4-9).



**Abb. 4-10: Darstellung eines Verhoeff's Elastica gefärbten Arterienquerschnitts mit neointimaler Läsion (Neointima):** rot gestrichelte Linie: PG1 (*Membrana elastica interna*); grün gestrichelte Linie: PG2 (Begrenzung Gefäßlumen); gelb gestrichelte Linie: PG3 (*Membrana elastica externa*).

**Tabelle 4-9: Auflistung der morphometrisch erhobenen Messwerte nach Durchführung der Verhoeff's Elastica-Färbung**

Parameter	Beschreibung
Neointima ( $\mu\text{m}^2$ )	Fläche PG1 – Fläche PG2
Lumenstenose (%)	$100 - (\text{Neointima}/\text{PG1}) * 100$
Media ( $\mu\text{m}^2$ )	Fläche PG3 – Fläche PG1
Intima/Media-Ratio	Neointima/Media
Länge der <i>Membrana Elastica externa</i> ( $\mu\text{m}$ )	Länge PG3
Gesamtfläche Gefäß ( $\mu\text{m}^2$ )	Fläche PG3

#### 4.4.2 Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Morphometrie wurden pro Arterie minimal drei, maximal fünf Schnitte von Beginn bis Ende der sichtbaren neointimalen Läsion in die unter 4.4.1 beschriebene Messung einbezogen und anschließend in die entsprechende Excel-Tabelle transferiert. Für jede Arterie wurde dann aus diesen maximal fünf Messwerten der in Tabelle 4-9 aufgezeigten Parameter der Mittelwert gebildet. Anschließend konnten die Mittelwerte jeder untersuchten Arterie entsprechend ihrer jeweiligen Versuchsgruppe (WT oder KO) in GraphPad Prism 5.01 überführt und statistisch ausgewertet werden.

#### 4.5 ELISA

Mit Hilfe des *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA), einem immunologischen Nachweisverfahren, wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteinkonzentration von aktivem TGF $\beta$ 1 in den Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen und deren Kontrollen untersucht. Dies erfolgte zum einen anhand von Plasmaproben und zum anderen anhand von sogenannten *Thrombozyten-Releasaten*, welche im Rahmen der murinen Thrombozytenisolation entstanden. Das allgemeine Prinzip des ELISAs beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, welche durch einen enzymatischen Farbumschlag detektiert wird. Im Falle des hier verwendeten TGF $\beta$ 1-ELISAs kam die sogenannte Sandwich-Methode zum Einsatz. Grundlage dieser Methode ist eine Mikrotiterplatte, welche mit einem sogenannten *coat*-Antikörper beschichtet ist. Durch

Zugabe der Probe und dem darin enthaltenen Antigen kommt es zur adsorptiven Bindung an den *coat*-Antikörper. Anschließend folgt ein Enzym-gekoppelter Detektions-Antikörper, welcher wiederum an ein anderes Epitop des Antigens bindet und so einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex („Sandwich“) erzeugt. In einem letzten Schritt wird dieser Komplex mit Hilfe eines entsprechenden Chromogens sichtbar gemacht. Die dadurch eintretende enzymatische Reaktion resultiert in einer Farb- bzw. Chemilumineszenz-Reaktion, welche durch eine Extinktionsmessung mittels Plattenphotometer detektiert und anhand einer mitgeführten Standardreihe quantifiziert werden kann.

Zur Quantifizierung von aktivem TGF $\beta$ 1 in Mausplasma und murinen Plättchen-*Releasaten* wurde in der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung der *Quantikine*<sup>®</sup> *ELISA Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF $\beta$ 1 Immunoassay* verwendet. Zur Durchführung dieses ELISAs musste das in der latenten Form vorliegende TGF $\beta$ 1 zunächst in seine aktive Form überführt werden. Hierzu wurde ein Volumen der Probensuspension mit 0,2 Volumen HCl (1 N) angesäuert, für 10 min bei RT inkubiert und im Anschluss mit 0,2 Volumen NaOH (1,2 N) in HEPES-Puffer (0,5 M) neutralisiert. Anschließend konnte der ELISA gemäß den Herstellerangaben durchgeführt werden.

## 4.6 Statistik

Zur Generierung der im Nachfolgenden dargestellten Abbildungen und die darin gezeigten statistischen Signifikanzen wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism 5.01 verwendet. Zu Beginn einer jeden statistischen Prüfung wurden die zu untersuchenden Werte zunächst auf ihre Normalverteilung getestet. Dies erfolgte je nach Stichprobenumfang anhand des *D'Agostino & Pearson Omnibus Normality-Tests* (bei  $n \geq 10$ ) oder des *Kolmogorov-Smirnov-Tests* ( $n = 5-6$ ). Sofern die Daten normalverteilt waren, wurden sie als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (engl. *standard error of mean*, SEM) dargestellt. Nicht normalverteilte Proben wurden hingegen als Median mit Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*, IQR) abgebildet. Für den Vergleich zweier unabhängiger Versuchsgruppen und dem Vorhandensein von Normalverteilung wurde der parametrische *Student's t-Test* angewandt. Waren die beiden zu vergleichenden Stichproben hingegen nicht normalverteilt, wurde der nichtparametrische *Mann-Whitney-Test* eingesetzt. Die statistischen Unterschiede von mehr als zwei Versuchsgruppen wurden mit Hilfe einer einfaktorischen Varianzanalyse (*1-Way-ANOVA*) mit anschließendem *Bonferroni-Test* oder *Dunnett's multiple*

*comparisons* Test als *Post-Hoc*-Test berechnet, sofern die Stichproben normalverteilt waren. Lag keine Normalverteilung vor, erfolgte der Vergleich der Stichproben mit dem nicht-parametrischen *Kruskal-Wallis* Test, gefolgt von dem *Dunn's multiple comparisons* Test als *Post-Hoc*-Test. Mit Hilfe eines sogenannten *Posts-Hoc*-Tests kann spezifiziert werden, welche Mittelwerte der zu vergleichenden Gruppen sich signifikant voneinander unterscheiden. Bei den vorliegenden statistischen Prüfungen wurden die Unterschiede innerhalb der zu vergleichenden Stichproben ab einem p-Wert (Signifikanzwert) von 0,05 als statistisch signifikant bezeichnet.

## 5 ERGEBNISSE

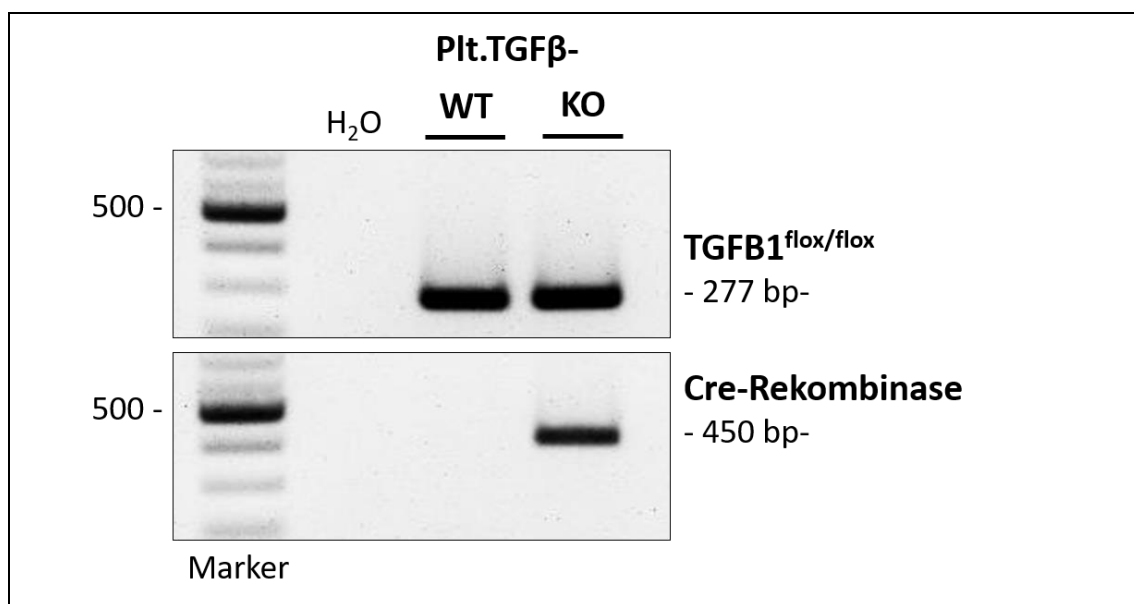
Ziel der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung war es, die Rolle des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ 1 in Blutplättchen für die akute Thrombusbildung und die chronische vaskuläre Wundheilung nach Gefäßwandverletzung zu untersuchen. Dazu wurde mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems eine Mauslinie mit konstitutiver Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-Deletion generiert. Hierbei wurde ein Mausstamm, der unter der Kontrolle des Megakaryozyten-spezifischen Pf4-Promotors eine Cre-Rekombinase exprimiert (C57BL/6-Tg(Pf4-Cre) Q3Rsko/J), mit einer homozygoten TGF $\beta$ 1 geflochten Maus gekreuzt. Die aus dieser und nachfolgender Verpaarung der heterozygoten Nachkommen hervorgehenden experimentellen Versuchstiergruppen wurden im weiteren Verlauf hinsichtlich ihres vaskulären Phänotyps *in vivo* und *ex vivo* unter Verwendung zahlreicher Methoden und Techniken charakterisiert und analysiert. Dabei wurde die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-WT-Gruppe als Plt.TGF $\beta$ -WT und die entsprechende KO-Gruppe als Plt.TGF $\beta$ -KO deklariert.

### 5.1 Nachweis der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion

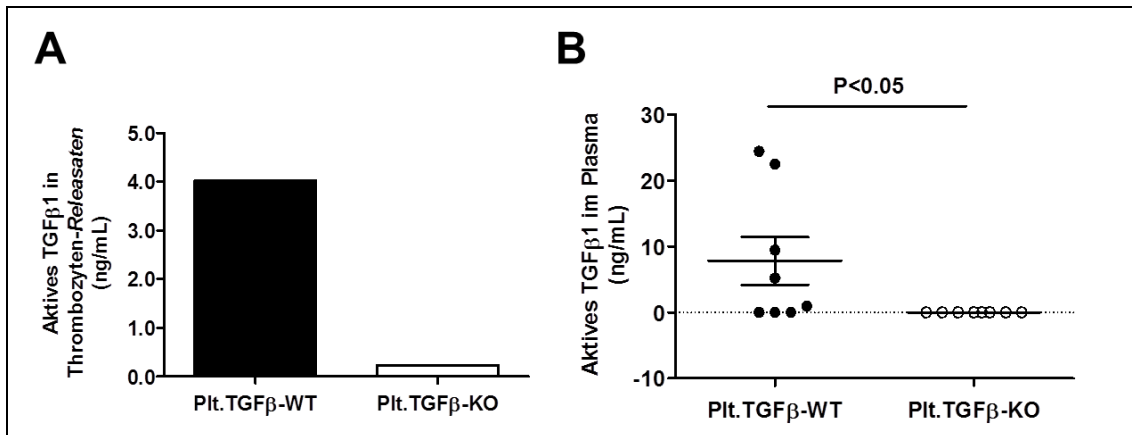
Zur funktionellen Charakterisierung der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion wurde zunächst eine Genotypisierungs-PCR mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Darüber hinaus wurde TGF $\beta$ 1 in Plättchen immunologisch mittels ELISA nachgewiesen.

Zur Genotypisierung wurde die zuvor aus Ohrstanz- bzw. Mausschwanzbiopsien extrahierte genomische DNA der Versuchstiere mit Hilfe entsprechender Primer amplifiziert. Für den Nachweis des von loxP-Sequenzen flankierten TGF $\beta$ 1-Gens wurden die unter 3.10 aufgeführten TGF $\beta$ 1 *forward* und *reverse* Primer verwendet. Dabei bestätigte ein 277 bp großes Produkt das Vorhandensein der homozygoten Variante des TGF $\beta$ 1-loxP-Allels (TGFB1<sup>flox/flox</sup>), was bei allen Versuchstieren der Fall war (siehe Abb. 5-1). Die Darstellung der spezifischen Cre-Rekombinase erfolgte mit Hilfe der entsprechenden Pf4-Cre *forward* und *reverse* Primer (siehe 3.10). Hier resultierte der erfolgreiche Nachweis in einem 450 bp großen Produkt (siehe Abb. 5-1). Entsprechend des Vorhandenseins oder Fehlens des Cre-Transgens konnten die Versuchstiere der Plt.TGF $\beta$ -KO- oder Plt.TGF $\beta$ -WT-Gruppe zugeordnet werden. Somit wurde die Plt.TGF $\beta$ -KO-Gruppe als Cre-positiv (Pf4-Cre<sup>+/+</sup>) und die Plt.TGF $\beta$ -WT-Gruppe als Cre-negativ (Pf4-Cre<sup>-/-</sup>) bezeichnet.

Zusätzlich zur genotypischen Charakterisierung konnte die erfolgreiche Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion immunologisch mit Hilfe eines ELISAs (*Quantikine<sup>®</sup> ELISA Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF $\beta$ 1 Immunoassays*) nachgewiesen werden. Dazu wurden die aktiven TGF $\beta$ 1-Plasmaspiegel in Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen analysiert. Dies erfolgte zum einen anhand von *Releasaten* aus Thrombin-aktivierten Thrombozyten und zum anderen mit Hilfe von EDTA-antikoagulierten Plasmaproben (n=8 pro Genotyp). Hierbei zeigte sich sowohl in den *Releasaten* als auch den Plasmaproben der Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse eine fast vollständige Reduktion von aktivem TGF $\beta$ 1. Im Mittel war der TGF $\beta$ 1-Spiegel in den Plasmaproben der Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse signifikant auf 0,0 [0,0 – 0,0] ng/ml reduziert (vs.  $7,8 \pm 3,6$  ng/ml in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p < 0,05$ , siehe Abb. 5-2 B), in den Thrombozyten-*Releasaten* der Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse auf 0,2 ng/ml (vs. 4,0 ng/ml in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen, siehe Abb. 5-2 A). Letztere wurden im Rahmen der Thrombozytenisolation aus dem gepoolten Blut von fünf Mäusen pro Genotyp gewonnen, daher wird hier nur ein Einzelwert gezeigt. Mit Hilfe dieses immunologischen Nachweises konnte somit die Effizienz der Plättchen-spezifischen Gendeletion dargestellt und die Thrombozyten als eine der Hauptproduktionsquelle von TGF $\beta$ 1 im Plasma verifiziert werden.



**Abb. 5-1: Repräsentativer genotypischer Nachweis der erfolgreichen Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion.** Ergebnisse der Genotypisierungs-PCR mit genomischer DNA von Ohrstanz- bzw. Mausschwanzbiopsien. Gezeigt ist die TGF $\beta$ 1- und Pf4-Cre-Genexpression in Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen (Plt.TGF $\beta$ -KO) und deren Kontrollen (Plt.TGF $\beta$ -WT) in Form eines Agarosegels (invers).



**Abb. 5-2: Repräsentativer immunologischer Nachweis der erfolgreichen Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion mittels ELISA.** Die Ergebnisse des *Quantikine® ELISA Mouse/Rat/Porcine/Canine TGFβ1 Immunoassays* bestätigen die Reduktion des aktiven TGFβ1 in Plt.TGFβ-KO-Mäusen. Die Analysen erfolgten zum einen mit Hilfe von **(A)** *Releasaten* aus Thrombin-aktivierten Thrombozyten (isoliert aus dem gepoolten Blut von fünf Mäusen pro Genotyp) und zum anderen anhand von **(B)** EDTA-antikoagulierten Plasmaproben. Der *Scatterplot* in **B** zeigt die individuellen Messwerte der einzelnen Versuchstiere sowie den Mittelwert ± SEM (Plt.TGFβ-WT, n=8) oder Median mit IQR (Plt.TGFβ-KO, n=8). Erhoben wurden die statistischen Unterschiede unter Zuhilfenahme des *Mann-Whitney*-Tests.

## 5.2 Untersuchung von Hämatopoese und Hämostase

### 5.2.1 Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf hämatologische Parameter

Um zu untersuchen, ob die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion Einfluss auf die Hämatopoese nimmt, wurde eine automatisierte laborchemische Blutzellanalyse im antikoagulierten Vollblut von weiblichen Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäusen (n=10 pro Genotyp) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass das Fehlen von TGFβ1 in Thrombozyten keine signifikante Auswirkung auf hämatologische Parameter hatte (siehe Tabelle 5-1). Weder die mittlere Thrombozytenzahl ( $495 \pm 23$  vs.  $445 \pm 54 \times 10^3/\mu\text{l}$  in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p=0,407$  siehe Tabelle 5-1) noch das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV, engl. *mean platelet volume*;  $6,0 \pm 0,1$  vs.  $6,0 \pm 0,1$  f in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p=0,593$  siehe Tabelle 5-1) waren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Plt.TGFβ-WT) signifikant verändert. Auch die restlichen, standardmäßig im Rahmen der Blutzellanalyse erhobenen Parameter waren unauffällig und differierten nicht zwischen den beiden Genotypen, so dass eine mögliche Beeinflussung der Hämatopoese ausgeschlossen werden konnte.



**Tabelle 5-1: Hämatologische Parameter der Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- (Plt.TGFβ-WT) und TGFβ1-KO- (Plt.TGFβ-KO) Mäuse\***

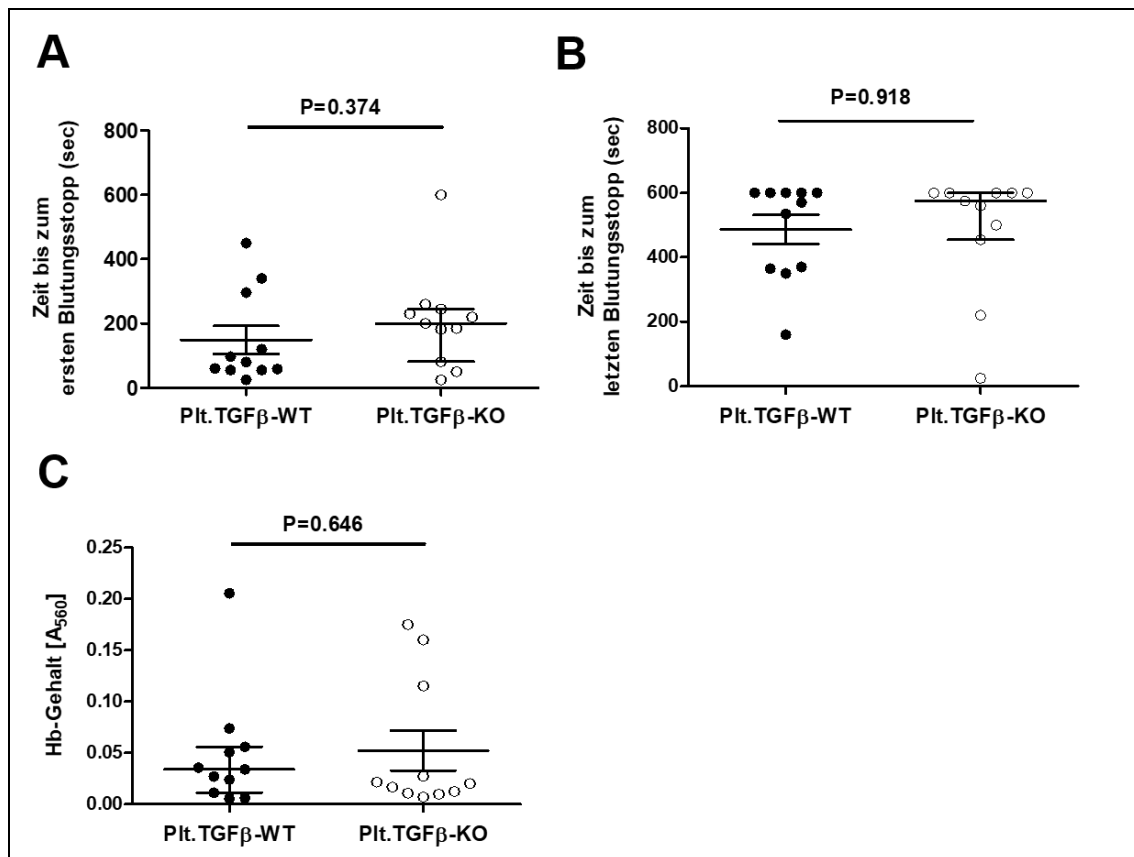
	Plt.TGFβ-WT	Plt.TGFβ-KO	p-Wert
<b>n</b>	10	10	
<b>Alter [Monate]</b>	13,6 ± 0,8	11,9 ± 0,9	0,100
<b>Thrombozyten [x10<sup>3</sup>/μl]</b>	445 ± 54	495 ± 23	0,407
<b>Leukozyten [x10<sup>3</sup>/μl]</b>	3,1 ± 0,2	4,0 ± 0,6	0,186
<b>Erythrozyten [x10<sup>6</sup>/μl]</b>	5,4 ± 0,5	5,6 ± 0,5	0,721
<b>MPV [fl]</b>	6,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	0,593
<b>MCV [fl]</b>	51,5 ± 0,8	50,7 ± 1,0	0,268
<b>MCH [pg]</b>	14,8 ± 0,2	15,3 ± 0,2	0,150
<b>Hämoglobin [g/dl]</b>	8,1 ± 0,8	8,6 ± 0,7	0,529
<b>Hämatokrit [%]</b>	27,9 ± 2,5	28,1 ± 2,2	0,944

\*Maschinell im Rahmen einer automatisierten Blutzellanalyse erhoben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM dargestellt. *Abkürzungen:* MCH, mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (engl. *mean corpuscular haemoglobin*); MCV, mittleres korpuskuläres Volumen (engl. *mean corpuscular volume*); MPV, mittleres Thrombozytenvolumen (engl. *mean platelet volume*). Die statistischen Unterschiede wurden unter Zuhilfenahme des *Student's t-Tests* bzw. *Mann-Whitney-Tests* erhoben.

### 5.2.2 Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die Blutgerinnung

Da Thrombozyten eine entscheidende Rolle bei der primären Hämostase spielen, wurde im Folgenden untersucht, ob die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion die Blutungszeit beeinflusst. Hierzu wurde der sogenannte *Tail tip bleeding-Assay* (siehe 4.1.8) an weiblichen Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäusen (n=11 pro Genotyp) durchgeführt. Dabei wurde nach Amputation der 2 mm langen distalen Schwanzspitze die Zeit bis zum kompletten Sistieren der Blutung innerhalb einer Messperiode von 10 min bestimmt. Diesbezüglich ergaben sich weder für die Zeit bis zum ersten Blutungsstopp (200,0 [81,0 – 245,0] vs. 148,7 ± 43,3 sec in Plt.TGFβ-WT-Mäusen; p=0,374, siehe Abb. 5-3 A) noch für die Zeit bis zum letzten Blutungsstopp (575,0 [455,0 – 600,0] vs. 486,4 ± 45,5 sec in Plt.TGFβ-WT-Mäusen; p=0,918, siehe Abb. 5-3

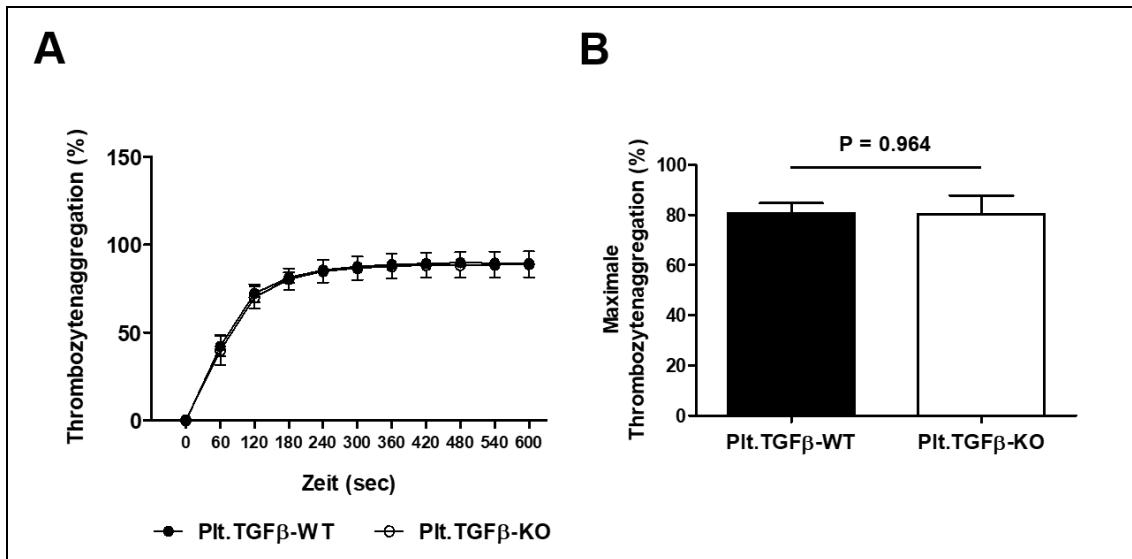
B) signifikante Unterschiede zwischen Plt.TGFβ-KO-Mäusen und deren Kontrollgruppe. Zusätzlich zur Blutungszeit wurde durch Messung der optischen Dichte die durch die Schwanzspitzenamputation verlorene Blutmenge ermittelt. Auch diese Messung erbrachte keine signifikanten Unterschiede und ergab für die Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse einen ähnlichen Hämoglobin- (Hb) Gehalt bei einer Wellenlänge von 560 nm ( $0,05 \pm 0,02$  vs.  $0,03$  [ $0,01 - 0,06$ ] in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p=0,646$ , siehe Abb. 5-3 C). Folglich konnten mit Hilfe des *Tail tip bleeding-Assays* wesentliche Blutungsdefekte und somit eine mögliche Beeinflussung der primären Hämostase durch die TGFβ1-Deletion ausgeschlossen werden.



**Abb. 5-3: Blutungszeiten und Hämoglobin-Gehalt der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse.** Mit Hilfe des sogenannten *Tail tip bleeding-Assays* wurde in den Plättchen-spezifischen TGFβ1-KO-Mäusen und deren Kontrollen die Blutungszeit und die dabei verlorene Blutmenge bestimmt. Durch Abtrennen der 2 mm langen distalen Schwanzspitze und anschließendes Eintauchen in eine 37°C warme 0,9%ige NaCl-Lösung wurde die Zeit (sec) bis zum ersten (A) und letzten (B) Blutungsstopp innerhalb einer 10-minütigen Messperiode ermittelt. In C wurde der Hämoglobin- (Hb) Gehalt anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch bestimmt. Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM (Plt.TGFβ-WT in A und B, Plt.TGFβ-KO in C) oder Median mit IQR (Plt.TGFβ-KO in A und B, Plt.TGFβ-WT in C) sind in einem *Scatterplot* dargestellt (n=11 pro Genotyp). Die statistischen Unterschiede wurden unter Zuhilfenahme des *Mann-Whitney-Tests* erhoben.

### 5.2.3 Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion auf die Thrombozytenaggregation

Zusätzlich zur Analyse der Blutungszeit wurde eine Thrombozytenaggregationsmessung zur Überprüfung der Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion auf die Thrombozytenfunktion durchgeführt (siehe 4.1.11). Diesbezüglich wurde in der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung die Lichttransmissionsaggregometrie genutzt, die auf der Messung der Lichtdurchlässigkeit der Thrombozytensuspension beruht. Hierzu wurden die zuvor mittels *washed platelets*-Technik (siehe 4.1.10) isolierten Thrombozyten mit dem Agonisten Thrombin (100 U/ml) stimuliert, um so die Thrombozytenaktivierung und -aggregation auszulösen. Die Thrombinstimulation führte zu einer Aufklärung der ursprünglich trüben Thrombozytensuspension und somit zu einer Transmissionsänderung, welche mit Hilfe des Aggregometers über einen Messzeitraum von 10 min detektiert wurde. Hierbei zeigte das Aggregationsverhalten der Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse über die Zeit keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (je Zeitpunkt  $p > 0,05$ , siehe Abb. 5-4 A). So wiesen die Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäuse eine maximale Aggregation von  $80,8 \pm 3,9\%$  und die Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse eine maximale Aggregation von  $80,4 \pm 7,4\%$  auf ( $p = 0,964$ , siehe Abb. 5-4 B). Die Datenanalyse stützte sich dabei auf drei unabhängige Experimente pro Genotyp, welche jeweils die Thrombozytenisolation aus Blut gepoolt von fünf weiblichen Plt.TGF $\beta$ -WT- bzw. Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen umfassten. Infolgedessen konnte auch in dieser Untersuchung ein möglicher Effekt der TGF $\beta$ 1-Deletion für die primäre Hämostase mit Hilfe der Thrombozytenaggregationsmessung ausgeschlossen werden.



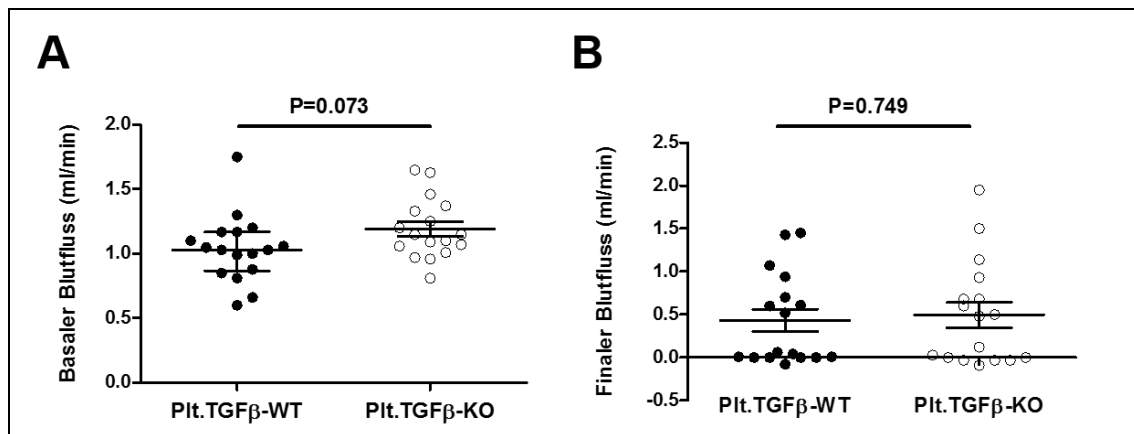
**Abb. 5-4: Aggregationsverhalten der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse.** Mit Hilfe der Lichttransmissionsaggregometrie wurde in den Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- und TGFβ1-KO-Mäusen die Thrombozytenaggregation und somit deren Funktion überprüft. Thrombozyten wurden mittels *washed-platelets*-Technik aus beiden Genotypen isoliert (gepooltes Blut von fünf Mäusen pro Genotyp) und ihre Aggregation in Antwort auf die Agonistenstimulation mit Thrombin (100 U/ml) über einen Zeitraum von 10 min aufgezeichnet (**A**). In **B** ist die maximale Aggregation der beiden Genotypen innerhalb der 10-minütigen Messperiode dargestellt. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten pro Genotyp. Die statistischen Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten und Genotypen in **A** wurden mit Hilfe des 2-Way-ANOVAs erhoben, die statistischen Unterschiede in **B** mittels des *Student's t-Tests*.

## 5.3 Hämodynamische Untersuchungen im Rahmen der akuten arteriellen Thrombose

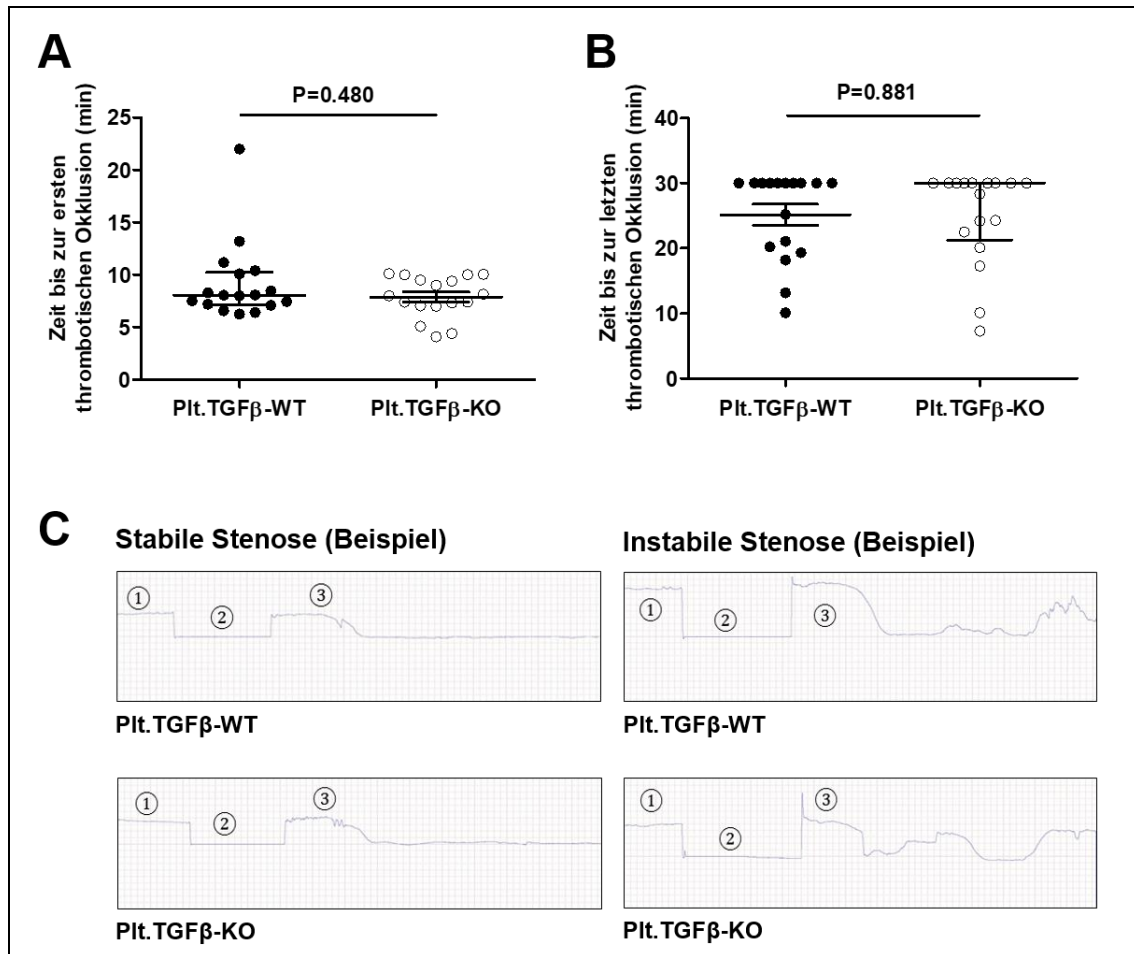
### 5.3.1 Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion auf die Blutflussgeschwindigkeit in der *A. carotis* und die Okklusionszeit

Unter Verwendung des Eisen-(III)-chlorid-Modells zur Induktion einer experimentellen Gefäßwandläsion (siehe 4.1.6) wurde nachfolgend die Bedeutung der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion für die arterielle Thrombose untersucht. Hierzu wurde ein in Eisen-(III)-chlorid (10%ig) getränktes Filterpapier für 3 min auf der Adventitia der *A. carotis sinister* der Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse (n=17 pro Genotyp) platziert. Dies führte zum Entstehen einer akuten arteriellen Thrombose, die mit einer Einengung des Gefäßlumens und demnach mit einer Verringerung der Blutflussgeschwindigkeit in der *A. carotis sinister* einherging. Letzteres wurde unter Verwendung einer Dopplersonde und eines Blutflussmessgerätes über einen Zeitraum von 35 min aufgezeichnet (siehe 4.1.7.1). Zur Analyse der Thrombusbildung wurde die Okklusionszeit nach Induktion der experimentellen Gefäßwandläsion (Zeit bis zur ersten und letzten thrombotischen Okklusion) ermittelt. Zudem wurde sowohl präoperativ vor Applikation des Filterpapiers als auch postoperativ nach Abschluss der Messperiode die Blutflussgeschwindigkeit (basaler und finaler Blutfluss) in der *A. carotis* gemessen. Diesbezüglich zeigte weder der basale ( $1,2 \pm 0,1$  vs.  $1,0$  [ $0,9 - 1,2$ ] ml/min in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen; p=0,073; siehe Abb. 5-5 A) noch der finale ( $0,5 \pm 0,1$  vs.  $0,4 \pm 0,1$  ml/min in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen; p=0,749; siehe Abb. 5-5 B) Blutfluss eine signifikante Veränderung zwischen den Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen. Gleichermäßen verhielt es sich bei der Okklusionszeit. Auch hier war sowohl in der Zeit bis zur ersten ( $7,9 \pm 0,5$  vs.  $8,1$  [ $7,2 - 10,3$ ] min in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen; p=0,480; siehe Abb. 5-6 A) als auch in der Zeit bis zur letzten thrombotischen Okklusion ( $30,0$  [ $21,3 - 30,0$ ] vs.  $25,1 \pm 1,6$  min in Plt.TGF $\beta$ -WT; p=0,881; siehe Abb. 5-6 B) kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu vermerken. Hierbei galt laut Herstellerangabe des technischen Messfehlers eine Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit auf  $\leq 0,2$  ml/min als regelrecht thrombotischer Verschluss, respektive Okklusion. Ergänzend zu den Okklusionszeiten wurde das Einsetzen der Thrombosierung graphisch in Form von Flusskurven detektiert. Diesbezüglich wurden sowohl in den Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen als auch in der Kontrollgruppe Flusskurven aufgezeichnet, bei denen nach Okklusion das Gefäß

verschlossen blieb (stabile Stenose) als auch Flusskurven mit einem instabilen Verschluss (instabile Stenose), bei dem der arterielle Thrombus innerhalb der Messperiode das Gefäß wiederholt embolisierte. Repräsentativ für jeden Genotyp sind in Abb. 5-6 C die beiden Flusskurvenbilder der stabilen und instabilen Stenose dargestellt. Dabei ist zu Beginn der Aufzeichnung der basale Blutfluss der Karotisarterie zu erkennen [1], gefolgt von einer kurzzeitigen Unterbrechung der Aufzeichnung durch die Entfernung des Flüssigmediums zur Applikation des in FeCl<sub>3</sub> getränkten Filterpapiers [2] und die anschließende Wiederaufnahme der Blutflussmessung für weitere 25 min [3]. Insgesamt resultierten sowohl die Befunde der Blutflussgeschwindigkeit in der *A. carotis* als auch der thrombotischen Okklusionszeit in keinem signifikanten Unterschied zwischen den Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäusen. Dies lässt darauf schließen, dass die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion keinen Einfluss auf die akute arterielle Thrombusbildung hat.



**Abb. 5-5: Blutflussgeschwindigkeit in der *A. carotis* der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse.** Gezeigt sind die Geschwindigkeiten des basalen (**A**) und finalen Blutflusses (**B**) in den Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- (n=17) und TGFβ1-KO-Mäusen (n=17), welche unter Verwendung einer Dopplersonde und einem Blutflussmessgerät über die Zeit aufgezeichnet wurden. Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert ± SEM (Plt.TGFβ-KO in **A** und Plt.TGFβ-WT und -KO in **B**) oder Median mit IQR (Plt.TGFβ-WT in **A**) sind in einem *Scatterplot* dargestellt (n=17 pro Genotyp). Die statistischen Unterschiede wurden unter Zuhilfenahme des *Student's t-Tests* (**B**) bzw. des *Mann-Whitney-Tests* erhoben (**A**).

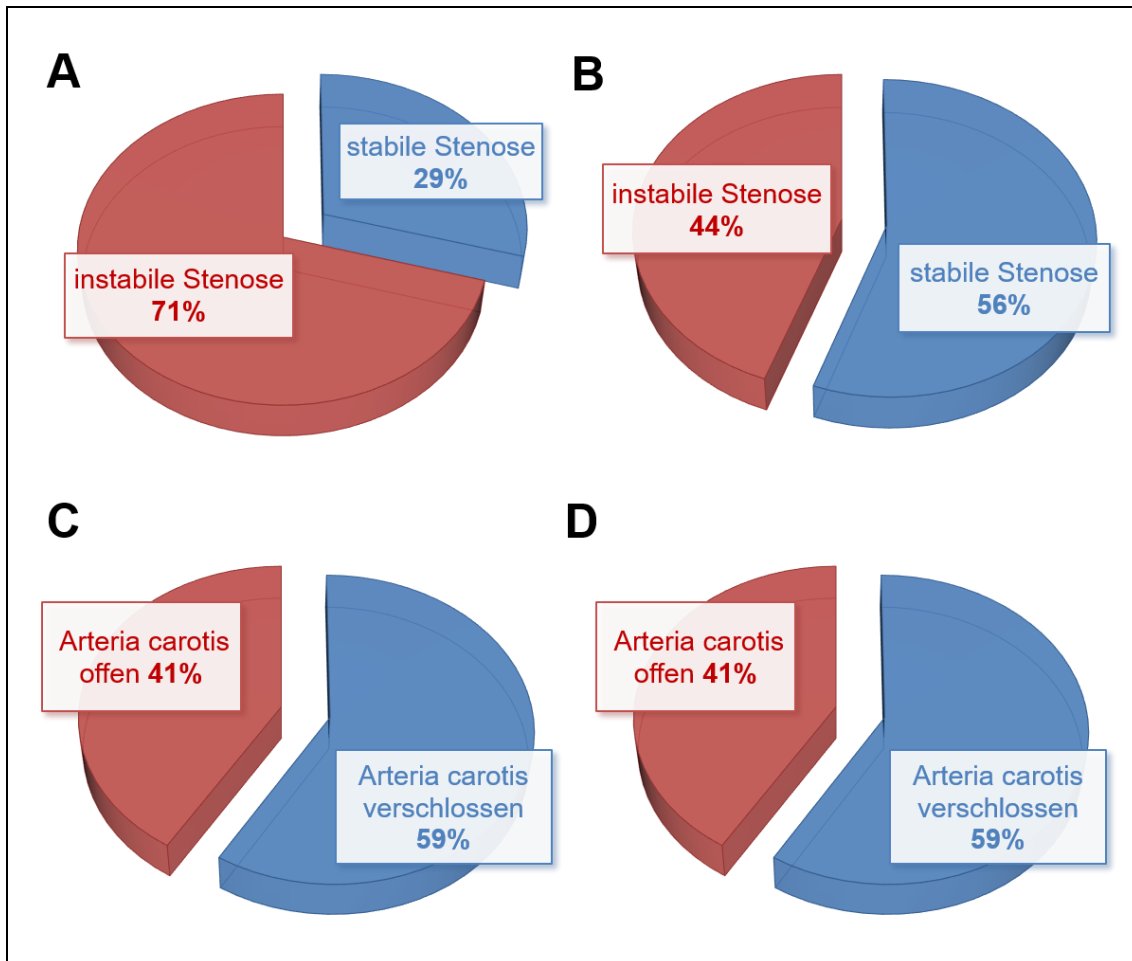


**Abb. 5-6: Hämodynamische Befunde nach FeCl<sub>3</sub>-induzierter Gefäßwandläsion und Thrombose der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse.** Nach Induktion der chemischen Gefäßwandverletzung mittels FeCl<sub>3</sub> wurde anhand der Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit in der *A. carotis* die Zeit bis zur ersten (A) und letzten (B) thrombotischen Okklusion bestimmt. Im *Scatterplot* sind die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM (Plt.TGF $\beta$ -KO in A und Plt.TGF $\beta$ -WT in B) oder Median mit IQR (Plt.TGF $\beta$ -WT in A und Plt.TGF $\beta$ -KO in B) dargestellt (n=17 pro Genotyp). Repräsentative Flusskurven der stabilen und instabilen Thrombusbildung (C) zeigen den basalen Blutfluss in der *A. carotis* (1) gefolgt von einer kurzzeitigen Unterbrechung der Messung während der Applikation von FeCl<sub>3</sub> (2) und die Wiederaufnahme der Blutflussmessung (3) für weitere 25 min (C). Die statistischen Unterschiede wurden unter Zuhilfenahme des *Mann-Whitney*-Tests erhoben.

### 5.3.2 Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion auf die Thrombusstabilität

Wie bereits erwähnt, resultierte die chemisch induzierte Gefäßwandläsion in einem thrombotischen Verschluss der *A. carotis sinister*, der sich im Verlauf der Messung als stabile oder instabile Stenose manifestierte. Hierbei sprach man von einer stabilen Stenose, sofern sich die Blutflussgeschwindigkeit in der *A. carotis sinister* auf einen Wert von mindestens 0,2 ml/min reduzierte und diesen innerhalb der restlichen Messperiode nicht mehr überstieg. Bei der instabilen Stenose rekanalisierte die zunächst verschlossene Karotisarterie innerhalb der Messung wieder und es kam zu einer Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit über den Grenzwert von 0,2 ml/min. In Folge dessen konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob das Gefäß am Ende der Messung wieder offen oder verschlossen war. In der nachfolgenden Abbildung (siehe Abb. 5-7) ist dieses Stenose-/Okklusionsverhalten anhand von Tortendiagrammen dargestellt. Hierbei zeigte die Quantifizierung der aufgezeichneten Blutflusskurven sowohl in den Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- als auch TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen eine ähnliche Verteilung an stabilen und instabilen Stenosen ohne statistisch-signifikante Unterschiede. So lag der prozentuale Anteil an instabilen Stenosen in den Plt.TGF $\beta$ -KO-Tieren bei 44% (siehe Abb. 5-7 B), in der entsprechenden Kontrollgruppe bei 71% (siehe Abb. 5-7 A; 8 von 17 Mäusen in der Plt.TGF $\beta$ -KO-Gruppe und 12 von 17 Mäusen in der Plt.TGF $\beta$ -WT-Gruppe;  $p=0,118$ ). Auch die Anzahl der Karotisarterien, die am Ende der Blutflussmessung verschlossen bzw. offen blieben, differierte nicht signifikant zwischen beiden Genotypen. Hier zeigte sich sogar eine exakt identische Verteilung. So waren in den Plt.TGF $\beta$ -KO- als auch in den Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen 59% der Karotisarterien (siehe Abb. 5-7 C und D) nach Beendigung der 35-minütigen Messperiode verschlossen (10 von 17 Mäusen in beiden Genotypen,  $p=1,000$ ). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untersuchungen der Thrombusstabilität die Ergebnisse der thrombotischen Okklusionszeit (siehe 5.3.1) bestätigen und somit eine mögliche Beeinflussung der akuten arteriellen Thrombose und Thrombusauflösung durch die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion ausgeschlossen werden kann.





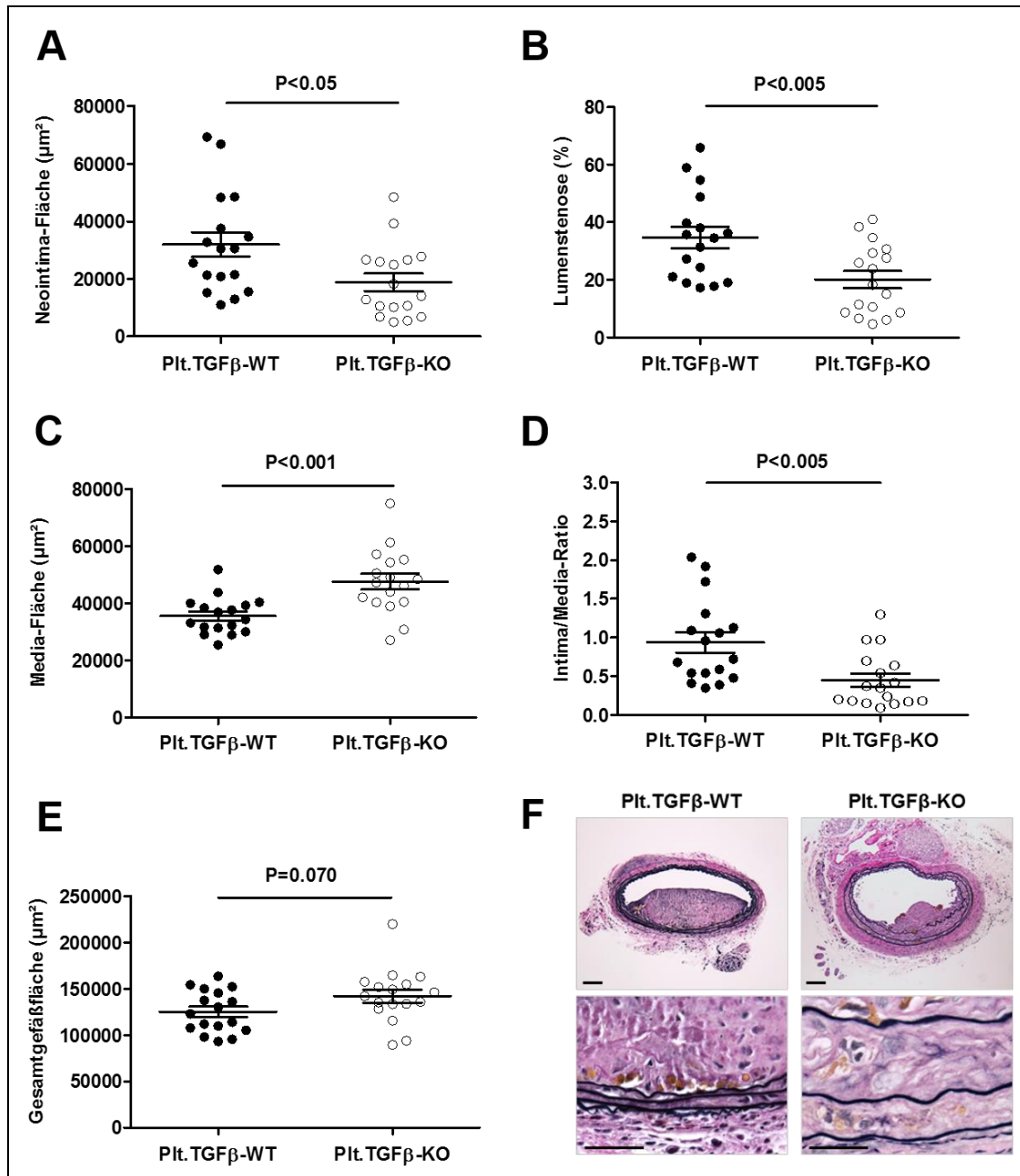
**Abb. 5-7: Stabilität der sich gebildeten Thromben in Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäusen (nach FeCl<sub>3</sub>-induzierter Gefäßwandläsion).** Gezeigt sind die Befunde der quantitativen Analyse der Blutflusskurven in der *A. carotis sinister* nach chemisch induzierter Gefäßwandläsion. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung von stabilen [blau] und instabilen [rot] Stenosen in den Plt.TGFβ-WT- (A) und Plt.TGFβ-KO-Mäusen (B) als auch das prozentuale Verhältnis der Karotisarterien, die nach Beendigung der Blutflussmessung offen [rot] bzw. verschlossen [blau] waren (Plt.TGFβ-WT-Mäuse (C) und Plt.TGFβ-KO-Mäuse (D)). Jeweils in Form eines Tortendiagramms dargestellt (n=17 pro Genotyp).

## 5.4 Morphometrische Untersuchung der chemisch induzierten Gefäßwandverletzung in der *A. carotis*

### 5.4.1 Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die Neointimabildung

Um den Effekt des Plättchen-spezifischen TGFβ1 auf die chronische vaskuläre Wundheilung zu untersuchen, wurde die postoperativ entstandene Intimahyperplasie (Neointima) in der *A. carotis* der Plt.TGFβ-WT- (n=17) und Plt.TGFβ-KO-Mäuse (n=17) morphometrisch analysiert. Hierzu erfolgte drei Wochen nach experimenteller

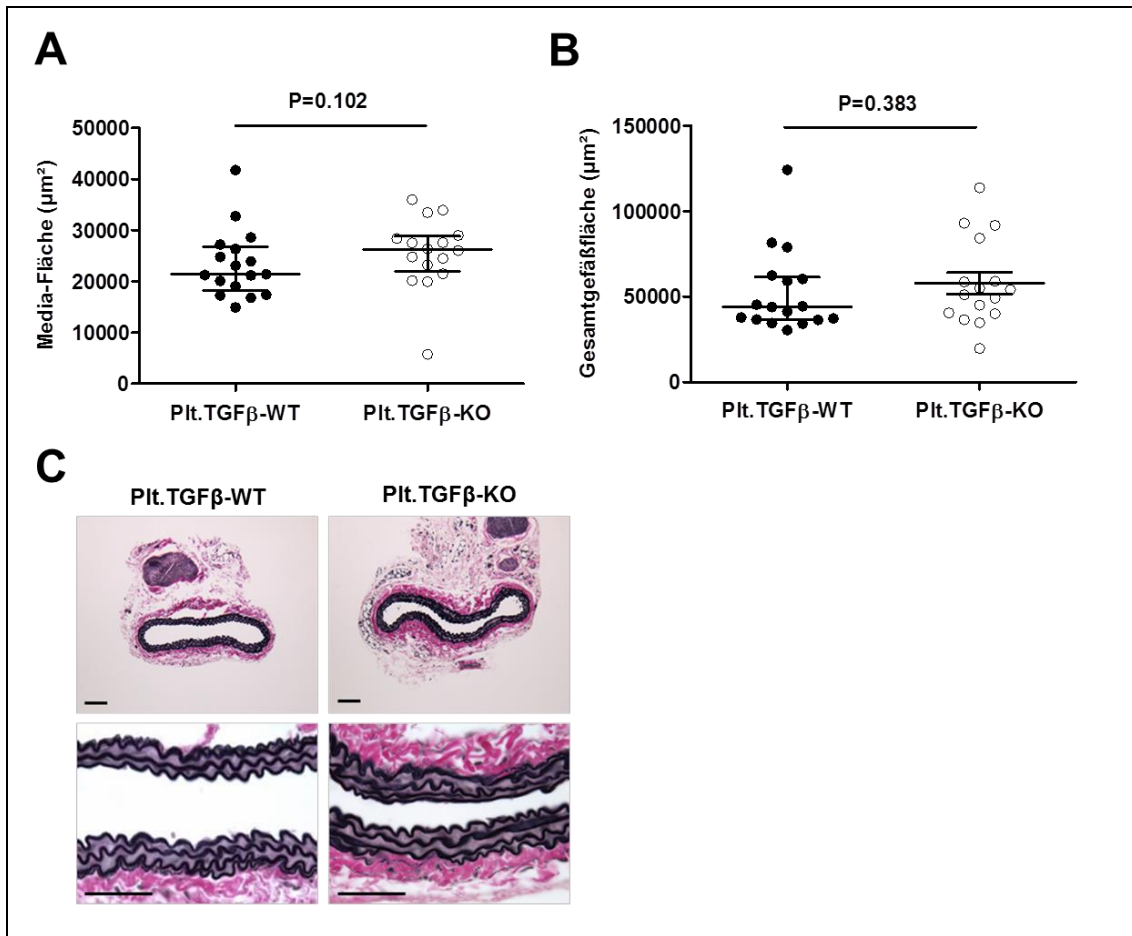
Gefäßwandverletzung die Entnahme der verletzten und unverletzten Karotisarterien mit anschließender Zinkformalinfixierung (4%ig) und Paraffineinbettung. Die darauffolgend angefertigten Serienschnitte durch die vaskulären Läsionen wurden mit Hilfe der Verhoeff's Elastica-Färbung angefärbt und nachfolgend morphometrisch untersucht. Repräsentative Bilder der verletzten, Verhoeff's Elastica gefärbten Karotisarterien der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse sind in Abb. 5-8 F dargestellt. Hinsichtlich der morphometrischen Quantifizierung resultierte die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion in einer deutlich reduzierten Neointimabildung, was an der signifikant verkleinerten Neointima-Fläche zu erkennen ist ( $18.868 \pm 3.037$  vs.  $31.941 \pm 4.257 \mu\text{m}^2$  in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p < 0,05$ ; siehe Abb. 5-8 A). Zudem konnte in den Plt.TGFβ-KO-Mäusen eine signifikante Vergrößerung der Media-Fläche beobachtet werden ( $47.581 \pm 2.761$  vs.  $35.565 \pm 1.575 \mu\text{m}^2$  in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p < 0,001$ ; siehe Abb. 5-8 C). Diese Befunde konnten durch das signifikant erniedrigte Intima/Media-Verhältnis in den Plt.TGFβ-KO-Mäusen bestätigt werden ( $0,45 \pm 0,09$  vs.  $0,94 \pm 0,13$  in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p < 0,005$ ; siehe Abb. 5-8 D). Zudem war das Plättchen-spezifische Fehlen von TGFβ1 mit einer erkennbaren Vergrößerung der Gesamtgefäßfläche assoziiert, allerdings ohne statistische Signifikanz ( $14.2149 \pm 7.125$  vs.  $12.5275 \pm 5.522 \mu\text{m}^2$  in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p = 0,070$ ; siehe Abb. 5-8 E). Trotz vergrößerter Media kam es aufgrund der tendentiellen Zunahme der Gesamtgefäßfläche und der reduzierten Neointimabildung zu einer verbesserten Gefäßdurchgängigkeit in den Plt.TGFβ-KO-Mäusen, erkennbar an deren signifikant reduzierten Lumenstenose ( $20,1 \pm 2,9$  vs.  $34,7 \pm 3,7\%$  in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p < 0,005$ ; siehe Abb. 5-8 B). Insgesamt lassen die Ergebnisse der morphometrischen Untersuchung darauf schließen, dass die Plt.TGFβ-KO-Tiere durch das Fehlen von TGFβ1 in den Plättchen vor einer übermäßigen Neointimabildung geschützt sind.



**Abb. 5-8: Morphometrische Analyse der Neointimabildung 21 Tage nach chemisch induzierter Gefäßwandläsion in den Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen.** Gezeigt ist die quantitative Analyse der Neointima-Fläche (A), Lumenstenose (B), Media-Fläche (C), Intima/Media-Ratio (D) und Gesamtgefäßfläche (E), durchgeführt an Verhoeff's Elastica gefärbten Paraffin-fixierten Serienschritten durch die verletzte *A. carotis sinister* der Plt.TGF $\beta$ -WT- (n=17) und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse (n=17). Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM sind in Form von Scatterplots dargestellt. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des Student's *t*-Tests erhoben. Repräsentative Bilder der Verhoeff's Elastica gefärbten Serienschritte zeigen die vaskuläre Läsion (Neointimabildung) in den Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen (F). Die Messbalken repräsentieren 100  $\mu\text{m}$  (obere Bildreihe) und 50  $\mu\text{m}$  (untere Bildreihe).

#### **5.4.2 Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die kontralaterale, unverletzte *A. carotis***

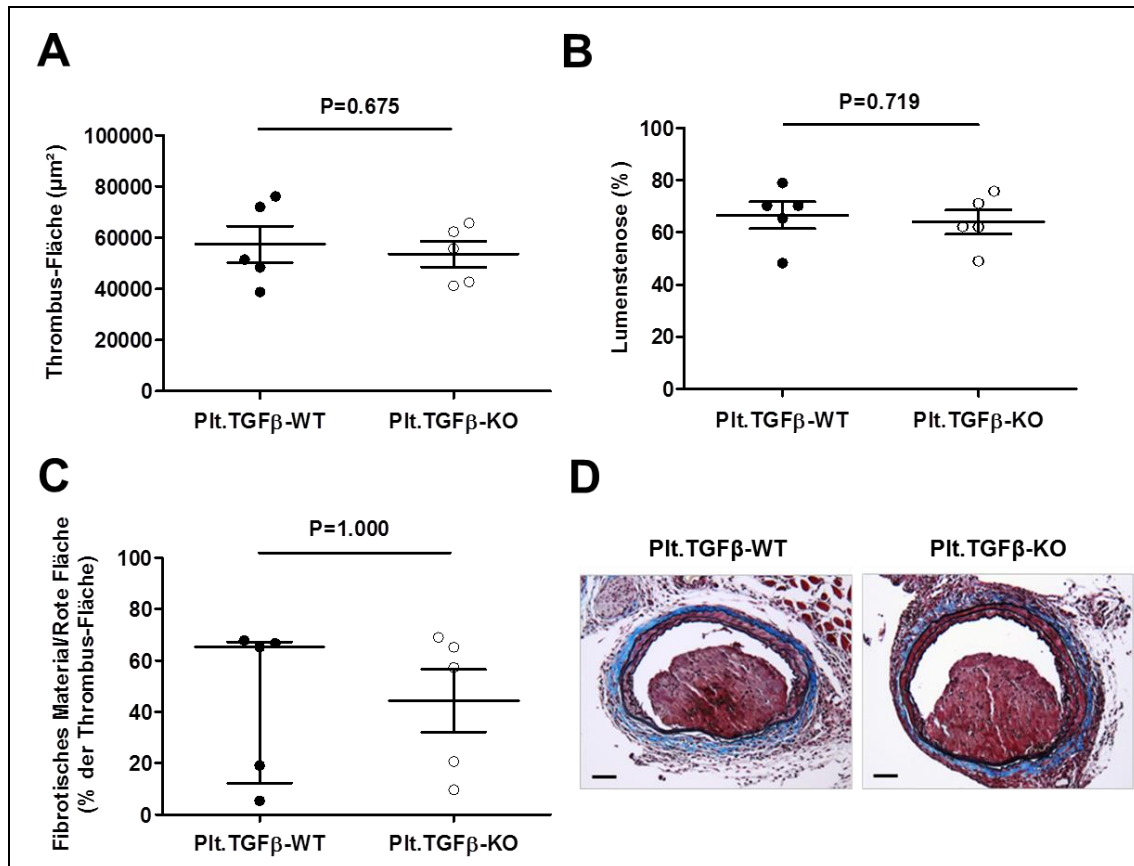
Aufgrund von Publikationen, welche im Verlauf der eigenen Untersuchungen über die Bedeutung von TGFβ1-Rezeptoren für die Funktion glatter Muskelzellen und deren Phänotyp berichteten [78, 79], wurden auch die unverletzten Karotisarterien der Plt.TGFβ-WT (n=17) und -KO-Mäuse (n=16) morphometrisch untersucht. Ziel war es einen bereits basal vorliegenden vaskulären Phänotyp bei Fehlen von TGFβ1 zu erkennen oder auszuschließen. Hierzu wurden die Verhoeff's Elastica gefärbten, Paraffin-fixierten Serienschnitte der kontralateralen, unverletzten Karotisarterien (*A. carotis dexter*) im Hinblick auf die aus glatten Muskelzellen bestehende Media und die Gesamtgefäßfläche quantifiziert. Hierbei zeigte weder die Media-Fläche (26.223 [21.957 – 28.854] vs. 21.442 [18.249 – 26.792] μm<sup>2</sup> in unverletzten Plt.TGFβ-WT-Mäusen; p=0,102; siehe Abb. 5-9 A) noch die Gesamtgefäßfläche (57.914 ± 6.322 vs. 43.886 [36.621 – 61.450] μm<sup>2</sup> in unverletzten Plt.TGFβ-WT-Mäusen; p=0,383; siehe Abb. 5-9 B) der unverletzten Plt.TGFβ-KO-Mäuse einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. In Abb. 5-9 C sind repräsentative Bilder der kontralateralen, unverletzten, Verhoeff's Elastica gefärbten Karotisarterien der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse dargestellt.



**Abb. 5-9: Morphometrische Analyse der kontralateralen, unverletzten Karotisarterien (A. carotis dexter) der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse.** Gezeigt ist die quantitative Analyse der Media-Fläche (A) und Gesamtgefäßfläche (B), durchgeführt an Verhoeff's Elastica gefärbten, Paraffin-fixierten Serienschnitten durch die unverletzte A. carotis dexter der Plt.TGFβ-WT- (n=17) und Plt.TGFβ-KO-Mäuse (n=16). Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert ± SEM (Plt.TGFβ-KO in B) oder Median mit IQR (A und Plt.TGFβ-WT in B) sind in Form von Scatterplots dargestellt. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests erhoben. Repräsentative Bilder der Verhoeff's Elastica gefärbten, unverletzten, kontralateralen Karotisarterien der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse sind in (C) dargestellt. Die Messbalken repräsentieren 100 µm (obere Bildreihe) und 50 µm (untere Bildreihe).

### 5.4.3 Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion auf die Thrombusauflösung

Um zu untersuchen, ob die unter 5.4.1 gezeigten Unterschiede bezüglich Neointimabildung eventuell das Ergebnis einer verschiedenartigen Thrombusauflösung sind, wurden weitere Versuchstiere der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- (n=5) und TGF $\beta$ 1-KO-Gruppe (n=5) einer FeCl<sub>3</sub>-induzierten Gefäßwandverletzung und Thrombose an der *A. carotis* unterzogen. Die Entnahme der verletzten Karotisarterien erfolgte postoperativ an Tag sechs nach Induktion der vaskulären Läsion und somit vor Entwicklung der Neointima. Mit Hilfe von Verhoeff's Elastica-MTC-gefärbten, Paraffinfixierten Serienschnitten wurde anschließend das Ausmaß der thrombotischen Okklusion morphometrisch untersucht. In Abb. 5-10 D sind repräsentative Bilder der verletzten, thrombotischen Karotisarterien der Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse dargestellt. Die morphometrische Analyse ergab, dass das Plättchen-spezifische Fehlen von TGF $\beta$ 1 weder mit einer signifikant veränderten Thrombus-Fläche ( $53.560 \pm 5.007$  vs.  $57.370 \pm 7.175 \mu\text{m}^2$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p=0,675$ ; siehe Abb. 5-10 A) noch mit einer signifikanten Änderung hinsichtlich der thrombotischen Lumenstenose ( $64,1 \pm 4,6$  vs.  $66,7 \pm 5,1\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p=0,719$ ; siehe Abb. 5-10 B) im Vergleich zur Kontrollgruppe assoziiert war. Des Weiteren konnten mit Hilfe der Verhoeff's Elastica kombinierten MTC-Färbung mögliche Unterschiede hinsichtlich der Organisation des thrombotischen Materials bzw. des relativen Anteils an fibrotischem Material ( $44,4 \pm 12,2$  vs.  $65,3 [12,3 - 67,3] \%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p=1,000$ ; siehe Abb. 5-10 C) zwischen den Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen ausgeschlossen werden. Somit lässt sich die reduzierte Neointimabildung der KO-Gruppe am ehesten nicht mit einer beschleunigten Thrombusauflösung in Verbindung bringen.

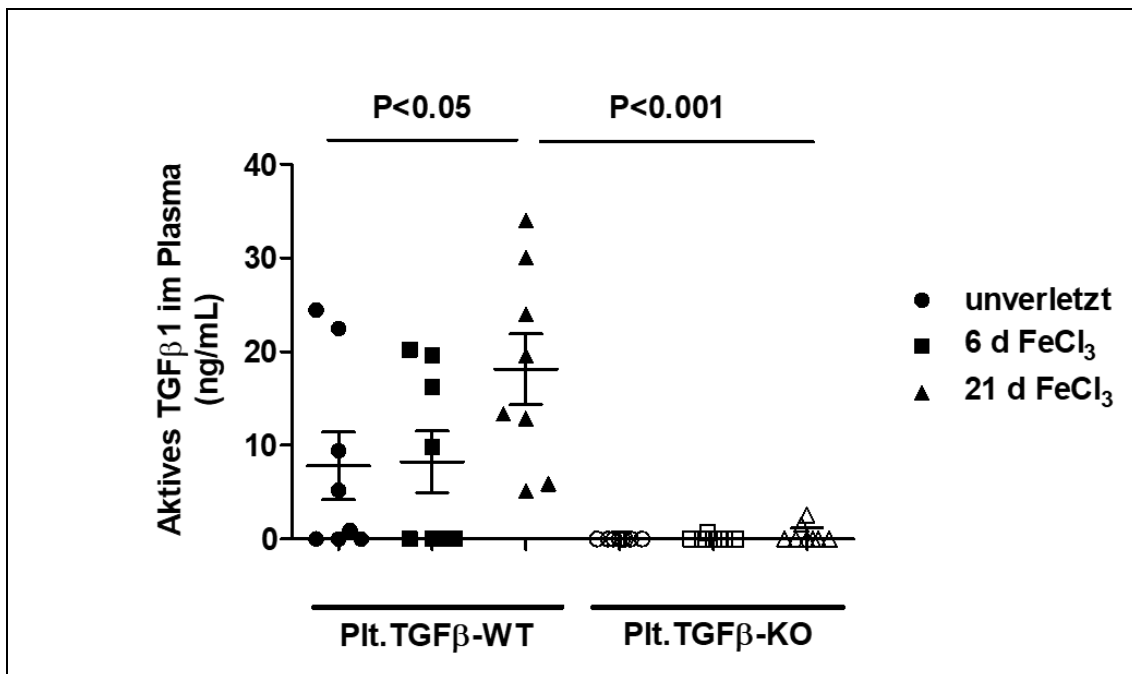


**Abb. 5-10: Morphometrische Analyse der arteriellen Thromben sechs Tage nach chemisch induzierter Gefäßwandläsion in den Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäusen.** Dargestellt ist die quantitative Analyse der Thrombus-Fläche (A), der thrombotischen Lumenstenose (B) und des fibrotischen Materials (rot-angefärbte Fläche) (C), durchgeführt an Verhoeff's Elastica-MTC-gefärbten, Paraffin-fixierten Serienschritten durch die verletzte *A. carotis sinister* der Plt.TGFβ-WT- (n=5) und Plt.TGFβ-KO-Mäuse (n=5). Scatterplots zeigen die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie den Mittelwert ± SEM (A und B und Plt.TGFβ-KO in C) oder Median mit IQR (Plt.TGFβ-WT in C). Die statistischen Unterschiede wurden unter Zuhilfenahme des *Student's t-Tests* (A und B) bzw. *Mann-Whitney-Tests* (C) erhoben. Repräsentative Bilder der Verhoeff's Elastica-MTC-gefärbten Serienschritte zeigen Thromben in den Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäusen sechs Tage nach Induktion der Gefäßwandläsion (D). Die Messbalken repräsentieren 100 µm.

## 5.5 Untersuchung der aktiven TGFβ1-Plasmaspiegel nach Gefäßwandverletzung in der *A. carotis*

Unter 5.1 konnte bereits immunologisch mit Hilfe eines spezifischen ELISAs die erfolgreiche TGFβ1-Deletion anhand einer signifikanten Reduktion der aktiven TGFβ1-Plasmaspiegel nachgewiesen werden. Um nun zu überprüfen, ob TGFβ1 bzw. dessen Freisetzung in Beziehung zur vaskulären Thrombose bzw. Wundheilung steht, wurden die TGFβ1-Plasma-Spiegel der unverletzten und verletzten Plt.TGFβ-WT- und

Plt.TGFβ-KO-Mäuse an Tag sechs und Tag 21 nach Gefäßverletzung (n=8 pro Zeitpunkt und Genotyp) im EDTA-antikoagulierem Plasma unter Verwendung des TGFβ1-ELISAs (*Quantikine® ELISA Mouse/Rat/Porcine/Canine TGFβ1 Immunoassays*) gemessen. Hierbei stieg der aktive TGFβ1-Plasmaspiegel der Plt.TGFβ-WT-Mäuse von im Mittel  $7,8 \pm 3,6$  ng/ml im unverletzten Zustand auf  $8,2 \pm 3,3$  ng/ml an Tag sechs und auf  $18,1 \pm 3,8$  ng/ml an Tag 21 nach Gefäßwandverletzung an ( $p < 0,05$  vs. Tag 6 FeCl<sub>3</sub>; siehe Abb. 5-11). In den Plättchen-spezifischen TGFβ1-KO-Mäusen ließ sich dagegen weder basal noch sechs Tage nach Induktion der Gefäßverletzung aktives TGFβ1 detektieren, wohingegen an Tag 21 zwei der acht Plasmaproben aktives TGFβ1 aufwiesen ( $0,0 [0,0 - 1,2]$  ng/ml;  $p < 0,001$  vs. Plt.TGFβ-WT-Mäuse an Tag 21 nach Gefäßwandverletzung, siehe Abb. 5-11)



**Abb. 5-11: Aktive TGFβ1-Plasmaspiegel der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse nach Gefäßwandverletzung in der *A. carotis*.** Gezeigt sind die aktiven TGFβ1-Spiegel im EDTA-antikoagulierem Plasma der Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäuse vor sowie sechs bzw. 21 Tage nach Induktion der Gefäßwandverletzung in der *A. carotis* (n=8 pro Genotyp und Zeitpunkt), durchgeführt unter Verwendung eines ELISAs. Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM (Plt.TGFβ-WT) oder Median mit IQR (Plt.TGFβ-KO) sind in Form eines *Scatterplots* dargestellt. Die statistischen Unterschiede wurden unter Zuhilfenahme des *1-Way-ANOVAs* mit anschließendem *Dunnnett's multiple comparisons Test* ( $p < 0,05$ ) bzw. *Kruskall-Wallis-Tests* mit anschließendem *Dunn's multiple comparisons Test* ( $p < 0,001$ ) erhoben.



## **5.6 Auswirkungen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion auf die zelluläre Zusammensetzung der vaskulären Läsion**

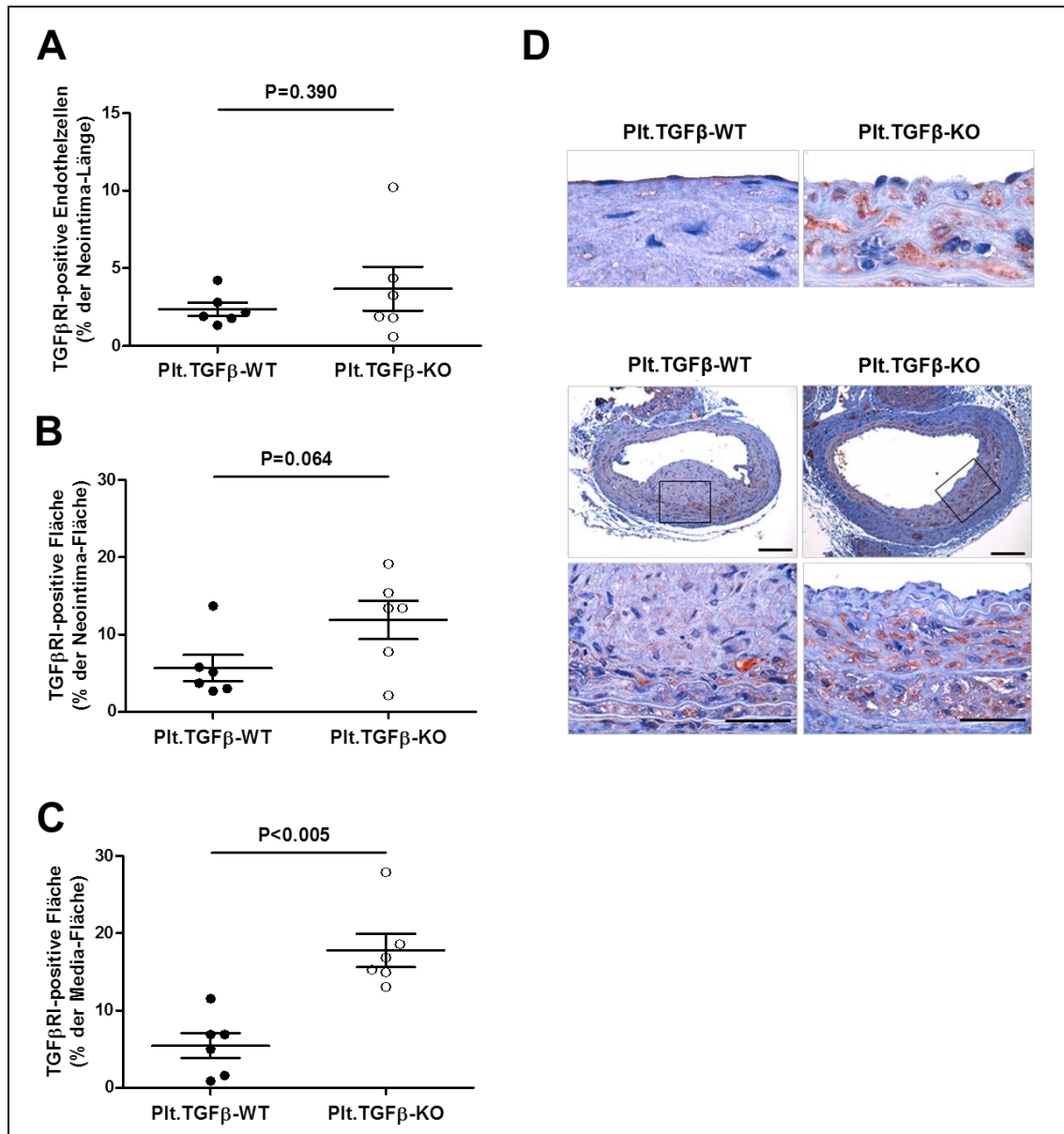
Im weiteren Verlauf der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit wurde die zelluläre Zusammensetzung der vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-Knockout-Mäuse untersucht. Hierzu wurde eine Vielzahl (immun)-histochemischer Analysen (in n=6-10 Mäusen pro Genotyp) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden nachfolgend näher erläutert.

### **5.6.1 Die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion resultierte in einer neointimalen und medialen Hochregulation der TGF $\beta$ Typ I- und Typ II-Rezeptoren**

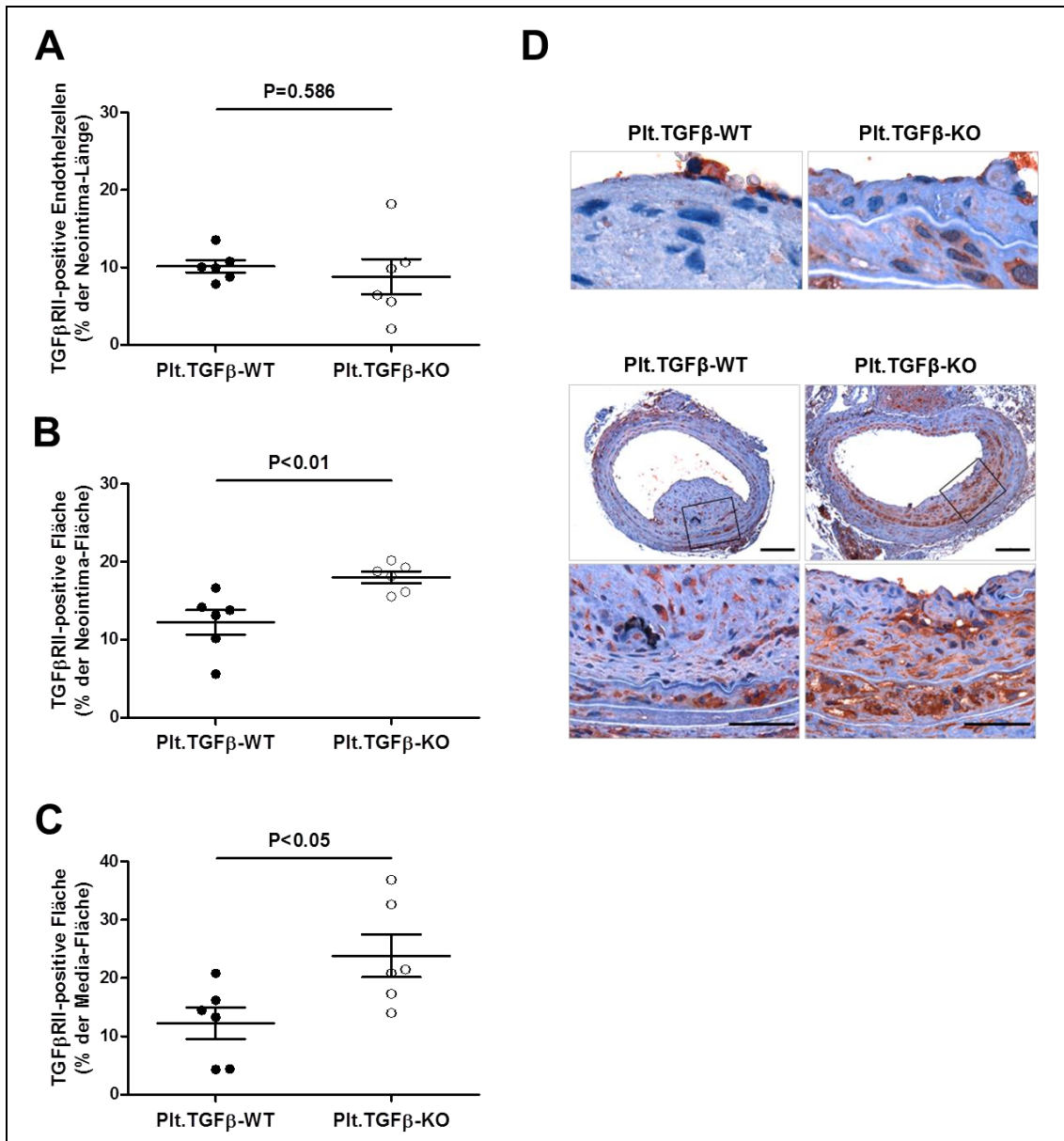
#### **Untersuchung der Expression von TGF $\beta$ -Rezeptoren in vaskulären Läsionen**

Zunächst wurde untersucht, ob bzw. in welchem Maße sich das Fehlen des von aktivierten Thrombozyten freigesetzten TGF $\beta$ 1 auf die Expression von TGF $\beta$  Typ I- und Typ II-Rezeptoren im Bereich der vaskulären Läsionen auswirkt. Als Bestandteil der TGF $\beta$ -Superfamilie sind sowohl der TGF $\beta$  Typ I- (ALK5) als auch der TGF $\beta$  Typ II-Rezeptor an der Aktivierung des TGF $\beta$ -Signalweges beteiligt. Beide Rezeptoren gehören zur Familie der transmembranen Serin/Threonin-Rezeptorkinasen und initiieren durch Komplexbildung die Bindung eines TGF $\beta$ -Liganden, was letztendlich zur Signaltransduktion „downstream“ des TGF $\beta$ -Signalweges führt [61, 77, 89]. Die immunhistochemische Analyse des TGF $\beta$  Typ I-Rezeptors (TGF $\beta$ RI) zeigte sowohl in der Neointima ( $11,9 \pm 2,5$  vs.  $5,7 \pm 1,7\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p=0,064$ ; siehe Abb. 5-12 B) als auch der Media ( $17,8 \pm 2,2$  vs.  $5,5 \pm 1,6\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p<0,005$ ; siehe Abb. 5-12 C) der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse eine erhöhte Expression. Ein ähnliches Bild ergab sich für den TGF $\beta$  Typ II-Rezeptor (TGF $\beta$ RII). Auch hier war im Bereich der Neointima ( $18,4 \pm 0,7$  vs.  $12,2 \pm 1,6\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p<0,01$ ; siehe Abb. 5-13 B) und Media ( $23,9 \pm 3,7$  vs.  $12,3 \pm 2,7\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p<0,05$ ; siehe Abb. 5-13 C) der Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse eine signifikant erhöhte TGF $\beta$ RII-positive Fläche zu verzeichnen. Im Vergleich hierzu konnten in den Endothelzellen, die die vaskulären Läsionen bedecken und positiv für den TGF $\beta$  Typ I- ( $3,7 \pm 1,4$  vs.  $2,4 \pm 0,4\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p=0,390$ ; siehe Abb. 5-12 A) und den TGF $\beta$  Typ II-Rezeptor ( $8,8 \pm 2,3$  vs.  $10,2 \pm 0,8\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p=0,586$ ; siehe Abb. 5-13 A) waren, keine signifikanten Unterschiede

zwischen beiden Genotypen detektiert werden. In Abb. 5-12 D und 5-13 D sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung der TGF $\beta$ -Rezeptoren (TGF $\beta$ RI und TGF $\beta$ RII) in vaskulären Läsionen der Plt.TGF $\beta$ -WT- und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse dargestellt.



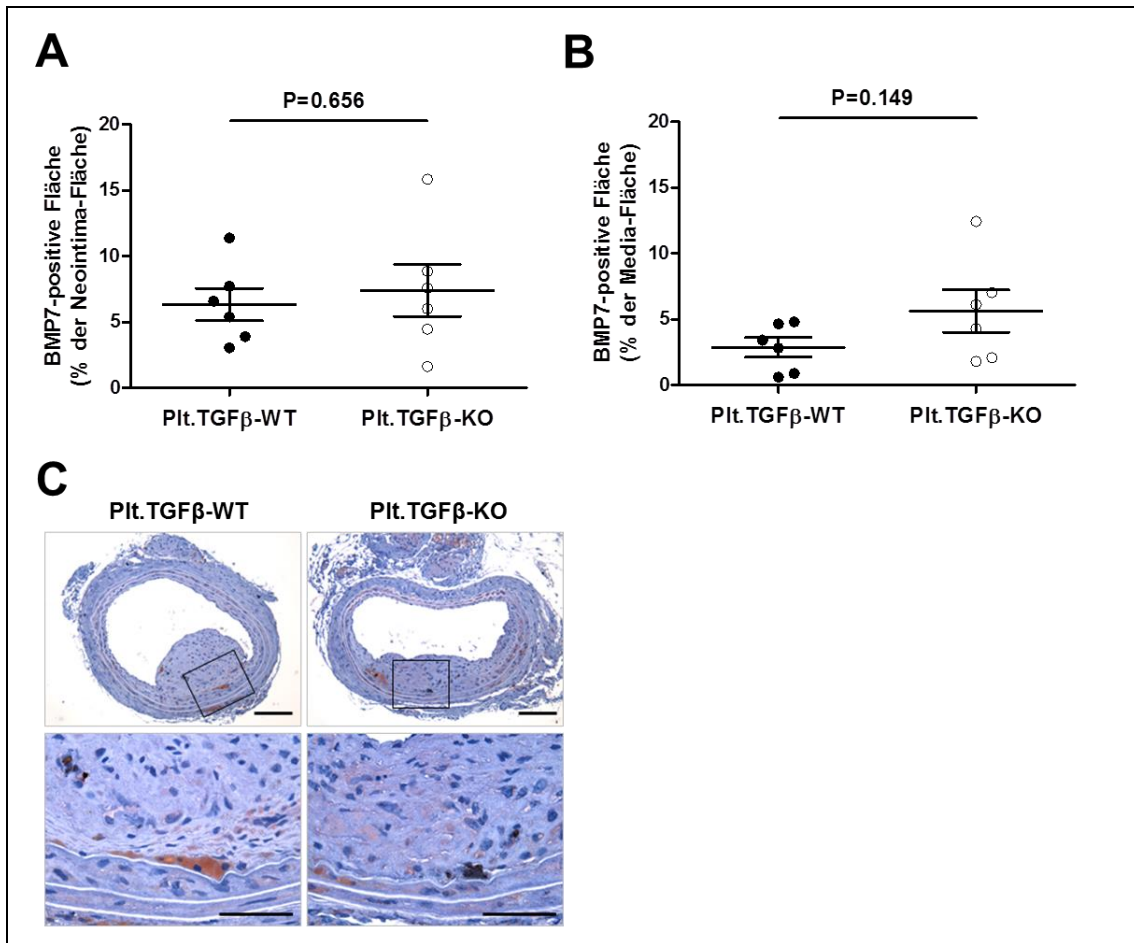
**Abb. 5-12: Expression des TGFβ Typ I-Rezeptors (TGFβRI/ALK5) in vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGFβ1-WT- und -KO-Mäuse.** Immunhistochemischer Nachweis und quantitative Analyse der TGFβRI-Expression in luminalen Endothelzellen der Neointima (A), der gesamten Neointima (B) und der Media (C) der vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGFβ1-WT- (n=6) und -KO-Mäuse (n=6). Scatterplots zeigen die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie den Mittelwert ± SEM. Die statistischen Unterschiede wurden unter Zuhilfenahme des Student's t-Tests erhoben. Repräsentative Bilder der IHC (Immunhistochemie)-gefärbten vaskulären Läsionen beider Genotypen sind in D dargestellt. Die Messbalken repräsentieren 100 µm (zweite Bildreihe) und 50 µm (dritte Bildreihe). Die erste Bildreihe zeigt eine manuelle Detailvergrößerung der luminalen Endothelzellen. Die in der zweiten Bildreihe eingezeichneten schwarzen Kästen umrahmen den in der dritten Bildreihe gezeigten vergrößerten Bildausschnitt.



**Abb. 5-13: Expression des TGFβ Typ II-Rezeptors (TGFβRII) in vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGFβ1-WT- und -KO-Mäuse.** Immunhistochemischer Nachweis und quantitative Analyse der TGFβRII-Expression in luminalen Endothelzellen der Neointima (A), der gesamten Neointima (B) und der Media (C) der vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGFβ1-WT- (n=6) und -KO-Mäuse (n=6). Scatterplots zeigen die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie den Mittelwert ± SEM. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Tests erhoben. Repräsentative Bilder der IHC-gefärbten vaskulären Läsionen beider Genotypen sind in D dargestellt. Die Messbalken repräsentieren 100 μm (zweite Bildreihe) und 50 μm (dritte Bildreihe). Die erste Bildreihe bildet die manuelle Detailvergrößerung der luminalen Endothelzellen ab. Die eingezeichneten schwarzen Kästen in der zweiten Bildreihe umrahmen den darunter dargestellten, vergrößerten Bildausschnitt, der in der dritten Bildreihe dargestellt ist.

**Untersuchung der Expression des TGF $\beta$ -Liganden BMP7 in vaskulären Läsionen**

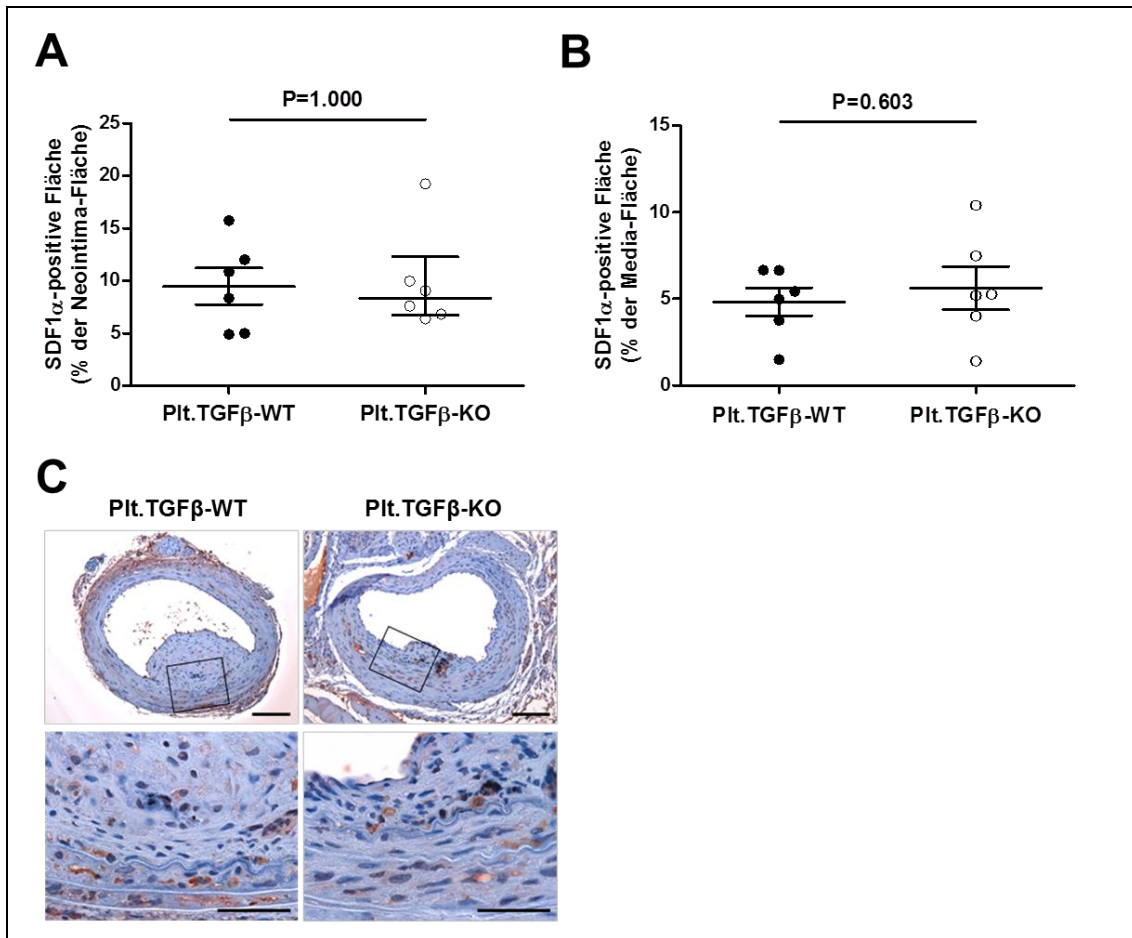
Ergänzend zur Detektion der TGF $\beta$ -Rezeptoren (TGF $\beta$ RI und TGF $\beta$ RII) wurde BMP7 (engl. *bone morphogenetic protein 7*) als TGF $\beta$ -Ligand und Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie in Hinblick auf seine Verteilung in vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäuse untersucht. BMP7 agiert im Rahmen des TGF $\beta$ -Signalweges als Signalmolekül und bindet wie TGF $\beta$ 1 an den TGF $\beta$ -Rezeptor Typ I/II-Komplex [61]. Die Verteilung von BMP7 in der Neointima und Media von vaskulären Läsionen 21 Tage nach Gefäßwandverletzung ist in nachfolgender Abbildung (siehe Abb. 5-14 C) repräsentativ dargestellt. Hierbei ergab die immunhistochemische Quantifizierung weder in der Neointima ( $7,4 \pm 2,0$  vs.  $6,3 \pm 1,2\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p=0,656$ ; siehe Abb. 5-14 A) noch in der Media ( $5,6 \pm 1,6$  vs.  $2,9 \pm 0,7\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p=0,149$ ; siehe Abb. 5-14 B) eine signifikante Änderung hinsichtlich des positiven BMP7-Signals zwischen den Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen und deren Kontrollgruppe.



**Abb. 5-14: Immunhistochemische Visualisierung BMP7-positiver Zellen in vaskulären Läsionen von Plt.TGFβ-WT- und Plt.TGFβ-KO-Mäusen.** Mit Hilfe der Immunhistochemie und spezifischen Antikörpern gegen BMP7 (engl. *bone morphogenetic protein 7*) wurde die BMP7-Expression in vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGFβ1-WT-(n=6) und -KO-Mäusen (n=6) detektiert. Die quantitative Analyse erfolgte anhand der BMP7-positiven Fläche pro gesamte Neointima- (A) bzw. Media-Fläche (B). Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert ± SEM sind in Form von *Scatterplots* dargestellt. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des *Student's t-Tests* erhoben. Repräsentative Bilder der IHC-gefärbten vaskulären Läsionen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- und -KO-Mäuse sind in (C) dargestellt. Die Messbalken repräsentieren 100 µm (obere Bildreihe) und 50 µm (untere Bildreihe). Die in der oberen Bildreihe eingezeichneten schwarzen Kästen umrahmen den in der unteren Bildreihe dargestellten vergrößerten Bildausschnitt.

**Untersuchung der Expression des Chemokins SDF1 $\alpha$  in vaskulären Läsionen**

Um des Weiteren zu untersuchen, ob die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion Auswirkungen auf andere in der thrombozytären  $\alpha$ -Granula enthaltene Faktoren mit Bedeutung für die Neointimabildung hat, wurde eine immunhistochemische Färbung gegen das chemotaktische Zytokin SDF1 $\alpha$  (engl. *stromal cell-derived factor 1 $\alpha$* ) durchgeführt. Hierbei konnte eine durch die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion bedingte Änderung hinsichtlich der SDF1 $\alpha$ -Expression ausgeschlossen werden. So zeigte die immunhistochemische Analyse der vaskulären Läsionen sowohl im Bereich der Neointima (8,4 [6,7 – 12,3] % vs. 9,5  $\pm$  1,7% in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen; p=1,000 siehe Abb. 5-15 A) als auch der Media (5,6  $\pm$  1,3% vs. 4,8  $\pm$  0,8% in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen; p=0,603; siehe Abb. 5-15 B) keine statistisch signifikant veränderte SDF1 $\alpha$ -positive Fläche zwischen den Plt.TGF $\beta$ -WT- und -KO-Mäusen. In Abb. 15-5 C sind repräsentative Bilder der beiden Genotypen dargestellt.



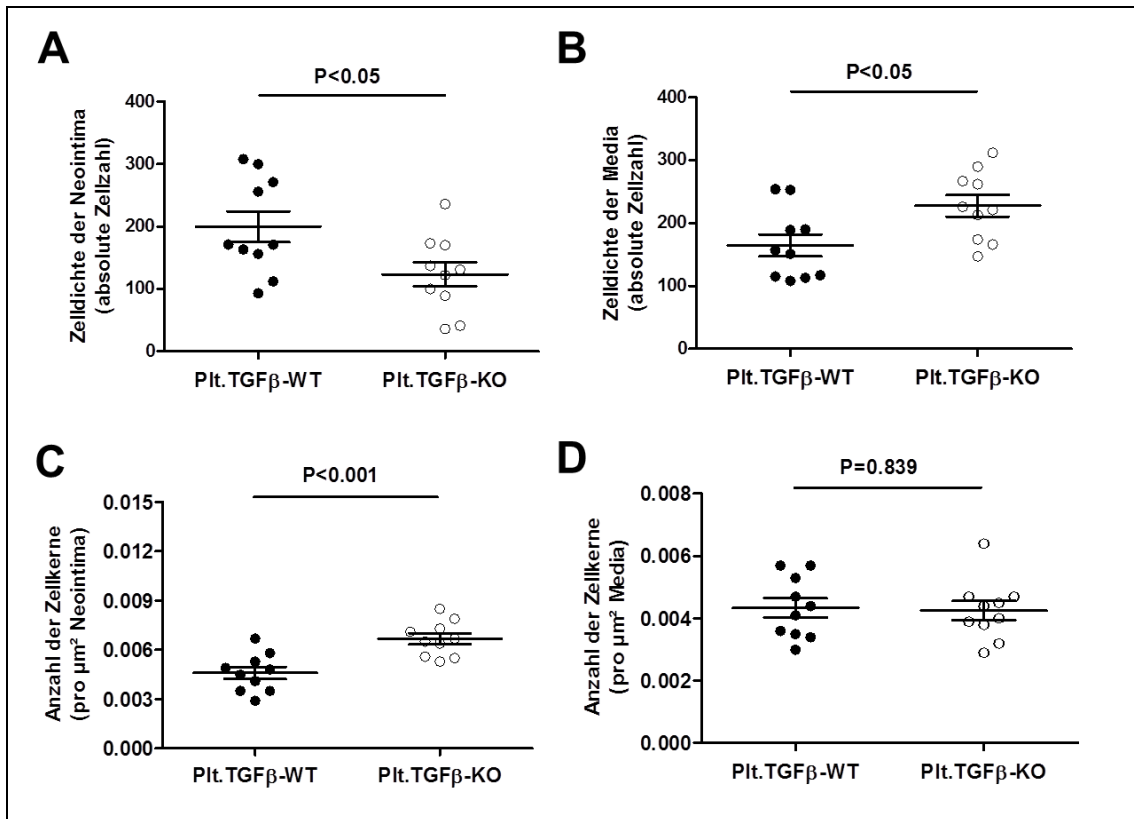
**Abb. 5-15: Immunhistochemische Detektion SDF1 $\alpha$ -positiver Zellen in vaskulären Läsionen von Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen.** Die SDF1 $\alpha$  (engl. *stromal cell-derived factor 1 $\alpha$* ) -Expression in vaskulären Läsionen von Pit.TGF $\beta$ -WT- (n=6) und Pit.TGF $\beta$ -KO-Mäusen (n=6) wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper immunhistochemisch untersucht. Quantitativ wurde die immunpositive Fläche pro gesamte Neointima- (A) bzw. Media-Fläche (B) ermittelt. *Scatterplots* zeigen die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie den Mittelwert  $\pm$  SEM (B und Pit.TGF $\beta$ -WT in A) oder Median mit IQR (Pit.TGF $\beta$ -KO in A). Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des *Student's t-Tests* (B) bzw. *Mann-Whitney-Tests* (A) erhoben. Repräsentative Bilder der IHC-gefärbten vaskulären Läsionen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäuse sind in (C) dargestellt. Die Messbalken repräsentieren 100  $\mu$ m (obere Bildreihe) und 50  $\mu$ m (untere Bildreihe). Die in der oberen Bildreihe eingezeichneten schwarzen Kästen umrahmen den in der unteren Bildreihe dargestellten vergrößerten Bildausschnitt.



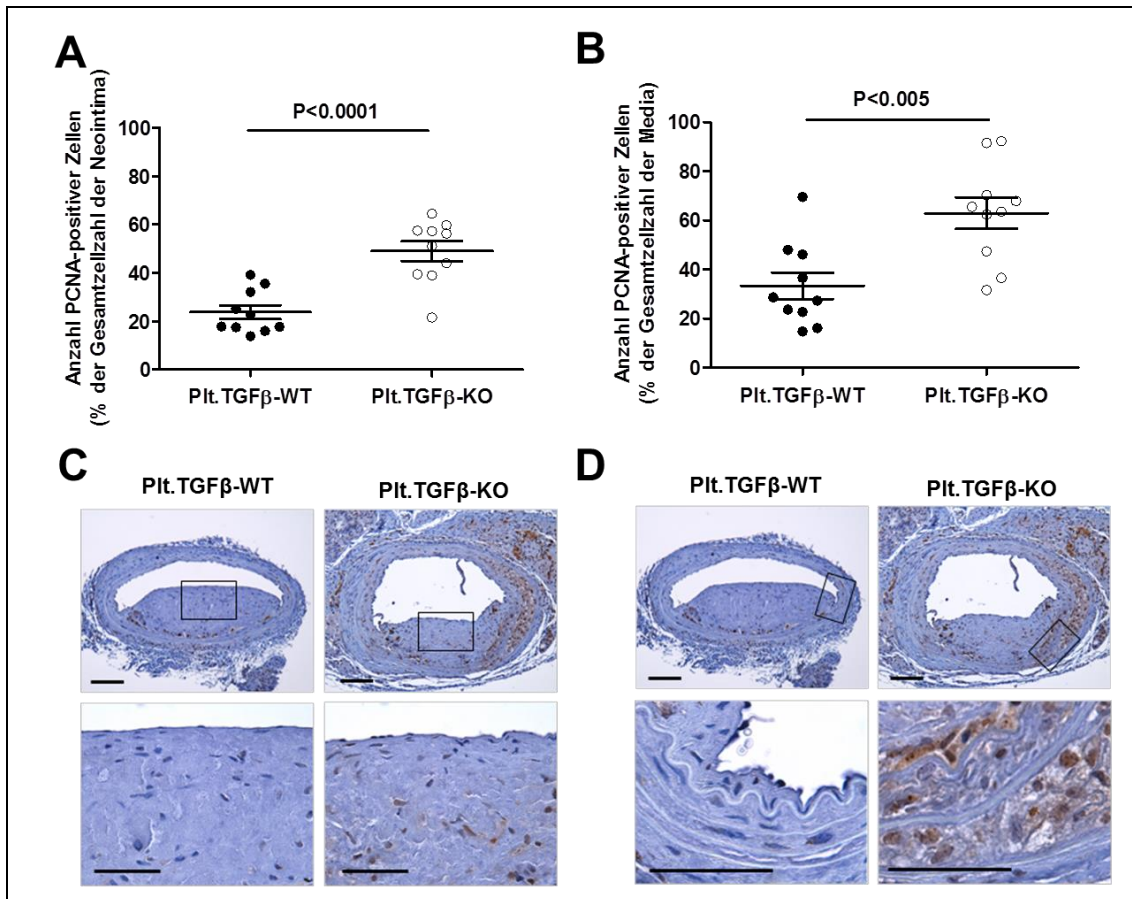
### **5.6.2 Die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion resultierte in kleineren, zellreicheren und stabileren vaskulären Läsionen**

#### **Untersuchung der Zellularität und Zellproliferation in vaskulären Läsionen**

Zur Untersuchung der Zellularität und Zelldichte als auch zum Nachweis proliferierender Zellen in vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäuse wurde eine immunhistochemische Färbung gegen den Proliferationsmarker PCNA (engl. *proliferating-cell-nuclear-antigen*) durchgeführt. PCNA wird ausschließlich im Zellkern proliferierender Zellen exprimiert, wo es als Ringklemmprotein eine schnelle Replikation der DNA gewährleistet. Die immunhistochemische Quantifizierung erfolgte durch manuelles Auszählen der Zellen. Dies ergab hinsichtlich der absoluten Zellzahl in der Neointima ( $124 \pm 19$  vs.  $200 \pm 25$  Zellen in Plt.TGF $\beta$ 1-WT-Mäusen;  $p < 0,05$ ; siehe Abb. 5-16 A) der Plt.TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse eine signifikante Abnahme, wohingegen in der Media ( $228 \pm 17$  vs.  $165 \pm 18$  Zellen in Plt.TGF $\beta$ 1-WT-Mäusen;  $p < 0,05$ ; siehe Abb. 5-16 B) eine signifikante Zunahme der absoluten Zellzahl zu verzeichnen war. Bezogen auf die jeweiligen Läsionsflächen zeigten die Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse im Bereich der Neointima ( $0,007 \pm 0,000$  vs.  $0,005 \pm 0,000$  Zellen/ $\mu\text{m}^2$  in Plt.TGF $\beta$ 1-WT-Mäusen;  $p < 0,001$ ; siehe Abb. 5-16 C) eine signifikant erhöhte Zelldichte, sprich eine erhöhte Anzahl der Zellkerne pro  $\mu\text{m}^2$  Neointima-Fläche. Die mediale Zelldichte ( $0,004 \pm 0,000$  vs.  $0,004 \pm 0,000$  Zellen/ $\mu\text{m}^2$  in Plt.TGF $\beta$ 1-WT-Mäusen;  $p = 0,839$ ; siehe Abb. 5-16 D) der vaskulären Läsionen wies dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen auf. Dementsprechend bestätigte die PCNA-Färbung eine signifikant erhöhte Anzahl PCNA-positiver, proliferierender Zellen pro Gesamtzellzahl innerhalb der Neointima ( $49,1 \pm 4,1$  vs.  $23,7 \pm 2,8\%$  in Plt.TGF $\beta$ 1-WT-Mäusen;  $p < 0,0001$ ; siehe Abb. 5-17 A), aber auch der Media ( $63,0 \pm 6,4$  vs.  $33,4 \pm 5,4\%$  in Plt.TGF $\beta$ 1-WT-Mäusen;  $p < 0,005$ ; siehe Abb. 5-17 B) von Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen. In Abb. 5-17 C und D sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung des Proliferationsmarkers PCNA in vaskulären Läsionen der Plt.TGF $\beta$ 1-WT- und Plt.TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse dargestellt.



**Abb. 5-16: Analyse der Zellularität bzw. Zelldichte der vaskulären Läsionen von Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- und TGFβ1-KO-Mäusen.** Die Zellularität/Zelldichte der vaskulären Läsionen von Plt.TGFβ-WT- (n=10) und Plt.TGFβ-KO-Mäusen (n=10) wurde durch manuelles Auszählen der Zellen in der Neointima und Media bestimmt und sowohl die absolute Zellzahl (**A** und **B**) als auch die Anzahl der Zellkerne pro  $\mu\text{m}^2$  Neointima- (**C**) bzw. Media-Fläche (**D**) dargestellt. Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM sind in Form von *Scatterplots* gezeigt. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des *Student's t-Tests* erhoben.

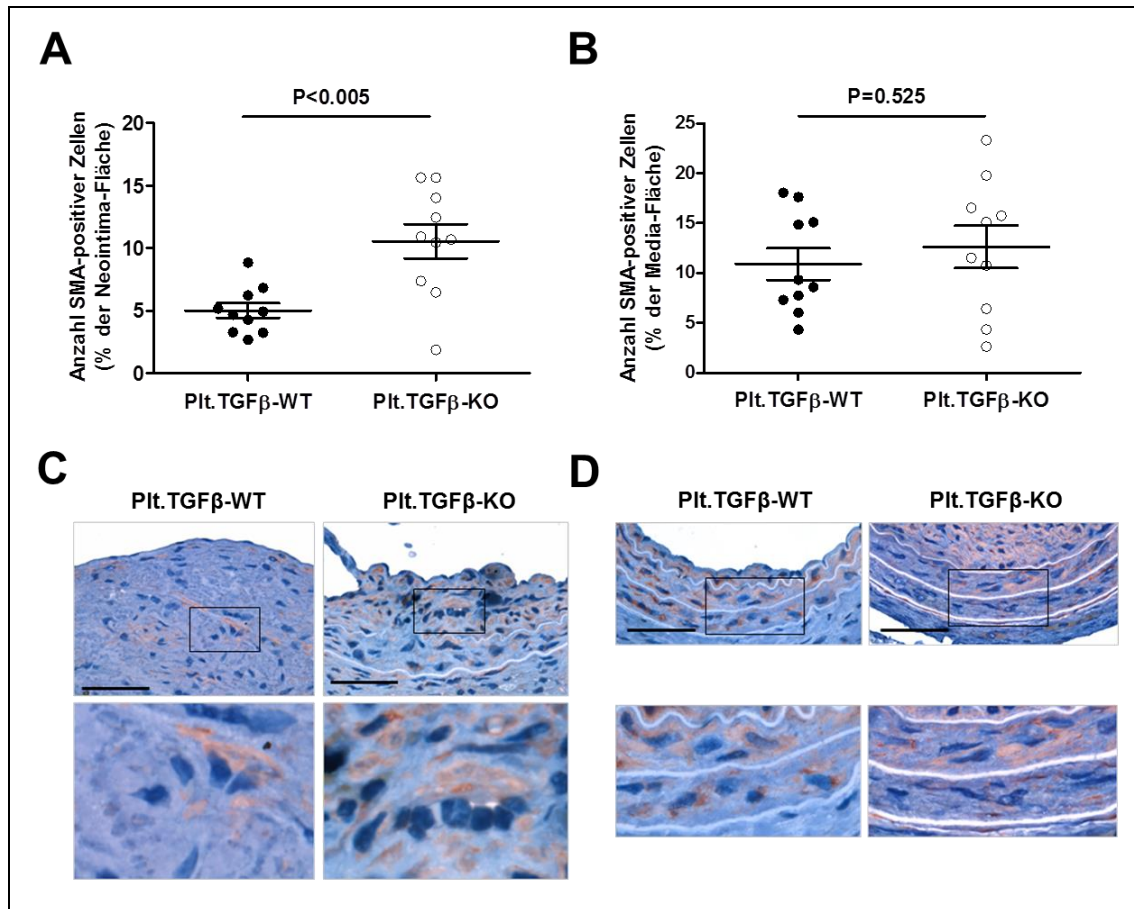


**Abb. 5-17: Untersuchung der Zellproliferation in vaskulären Läsionen von Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- und TGFβ1-KO-Mäusen.** Die immunhistochemische Visualisierung proliferierender Zellen in der Neointima und Media von Pit.TGFβ-WT- (n=10) und Pit.TGFβ-KO-Mäusen (n=10) erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen PCNA (engl. *proliferating-cell-nuclear-antigen*). Zur quantitativen Analyse wurde die Anzahl PCNA-positiver Zellen ermittelt und als prozentualer Anteil der neointimalen (**A**) bzw. medialen Gesamtzellzahl (**B**) dargestellt. *Scatterplots* zeigen die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie den Mittelwert ± SEM. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des *Student's t-Tests* erhoben. In **C** und **D** sind repräsentative Bilder der PCNA-positiven Zellen in der Neointima (**C**) und Media (**D**) von Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- und -KO-Mäusen dargestellt. Die Messbalken repräsentieren 100 µm (obere Bildreihe) und 50 µm (untere Bildreihe). Die in der oberen Bildreihe eingezeichneten schwarzen Kästen umrahmen den in der unteren Bildreihe dargestellten vergrößerten Bildausschnitt.

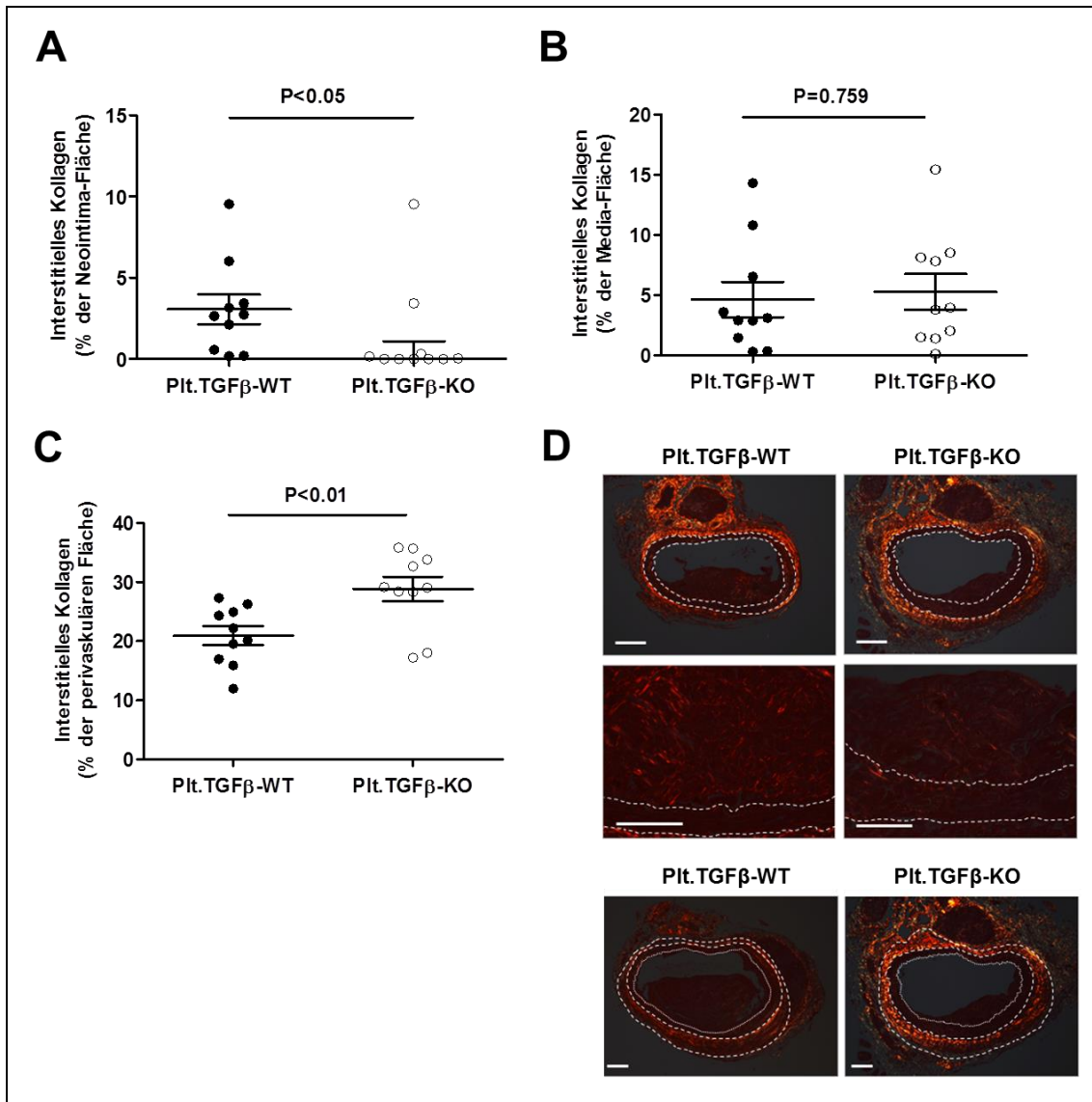
### **Untersuchung der zellulären Zusammensetzung und Reendothelialisierung vaskulärer Läsionen**

Entsprechend der *Response-to-injury*-Hypothese nach Ross *et al.* resultiert eine Endothelzellverletzung in der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen (SMC, engl. *smooth muscle cells*) aus der Media in die Intima. Dies führt wiederum zur übermäßigen Produktion von ECM-Proteinen wie Kollagen und elastischen Faser-Proteinen [9]. So entsteht eine zell- und matrixreiche Verdickung, die sogenannte Neointima, die so lange persistiert bis die neugebildeten Endothelzellen den Bereich der Gefäßverletzung komplett bedeckt haben und über parakrine Signale die Muskelzellproliferation stoppen [90]. Diesbezüglich wurden in der vorliegenden Arbeit (immun-) histochemische Analysen zum Nachweis des glatten Muskelzellmarkers  $\alpha$ -SMA, des Endothelzellmarkers PECAM-1 (CD31) und von interstitiellem Kollagen im Bereich der vaskulären Läsionen durchgeführt. Hierbei wies die Neointima der Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant vergrößerte  $\alpha$ -SMA-positive Fläche trotz reduzierter Neointima-Hyperplasie, auf ( $10,6 \pm 1,4$  vs.  $5,0 \pm 0,6\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p < 0,005$ ; siehe Abb. 5-18 A). Mit Hilfe der Picro-Siriusrot-Färbung konnte dagegen ein signifikant reduzierter relativer Anteil an interstitiellem Kollagen innerhalb der Neointima Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse visualisiert werden ( $0,02 [0,00 - 1,10]$  vs.  $3,1 \pm 0,9\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p < 0,05$ ; siehe Abb. 5-19 A). Die medialen Zellen zeigten indessen weder bei der  $\alpha$ -SMA-Expression ( $12,6 \pm 2,1$  vs.  $11,0 \pm 1,6\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p = 0,525$ ; siehe Abb. 5-18 B) noch beim interstitiellen Kollagen ( $5,3 \pm 1,5$  vs.  $4,6 \pm 1,5\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p = 0,759$ ; siehe Abb. 5-19 B) signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Allerdings konnte im perivaskulären Bereich, sprich der Adventitia der Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse ein signifikant verstärktes Siriusrot-Signal und demnach ein signifikant erhöhter Kollagengehalt detektiert werden ( $28,8 \pm 2,1$  vs.  $21,0 \pm 1,6\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p < 0,01$ ; siehe Abb. 5-19 C). Repräsentative Bilder der immunhistochemischen  $\alpha$ -SMA-Färbung und der histochemischen Picro-Siriusrot-Färbung sind in Abb. 5-18 C, D und 5-19 D dargestellt. Die Reendothelialisierung der vaskulären Läsionen wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen CD31 immunhistochemisch untersucht. Zu deren Quantifizierung wurde die relative Länge des mit CD31-positiven Endothelzellen bedeckten Gefäßlumens bestimmt. Dabei zeigte sich, wie in Abb. 5-20 B repräsentativ dargestellt, dass die Neointima der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse im Vergleich zu den Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen mit signifikant mehr CD31-positiven Endothelzellen bedeckt war ( $51,7 \pm 3,6$  vs.  $34,8 \pm$

3,7% in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p < 0,005$ ; siehe Abb. 5-20 A).

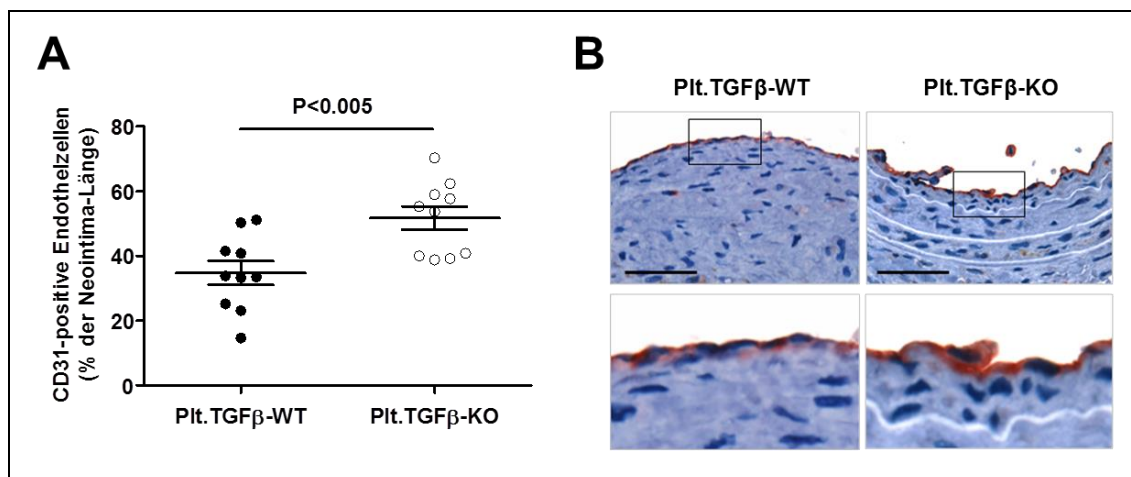


**Abb. 5-18: Immunhistochemische Detektion  $\alpha$ -SMA-positiver Zellen in der Neointima und Media von Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen.** Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen  $\alpha$ -SMA (engl. *smooth muscle  $\alpha$ -actin*) wurde die Expression glatter Muskelzellen in vaskulären Läsionen von Plt.TGF $\beta$ -WT- ( $n=10$ ) und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen ( $n=10$ ) immunhistochemisch untersucht. Zur quantitativen Analyse wurde die  $\alpha$ -SMA-immunpositive Fläche pro gesamte Neointima- (A) bzw. Media-Fläche (B) ermittelt. Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM sind in Form von *Scatterplots* dargestellt. Die statistischen Unterschiede wurden unter Zuhilfenahme des *Student's t-Tests* erhoben. Abbildung C und D zeigen repräsentative Bilder der  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen in der Neointima (C) und Media (D) von Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäusen. Die Messbalken repräsentieren 50  $\mu$ m. Die in der oberen Bildreihe eingezeichneten schwarzen Kästen umrahmen die in der unteren Bildreihe dargestellte manuelle Detailvergrößerung der Neointima (C) bzw. Media (D).



**Abb. 5-19: Visualisierung von interstitiellem Kollagen in vaskulären Läsionen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- und TGFβ1-KO-Mäuse.** Die Expression von interstitiellem Kollagen innerhalb der Neointima (A), Media (B) und Adventitia (perivaskulär, C) der Plt.TGFβ-WT- (n=10) und Plt.TGFβ-KO-Mäuse (n=10) wurde mit Hilfe der Picro-Siriusrot-Färbung unter dem Polarisationsmikroskop detektiert. Quantitativ wurde die Fläche der gelb-orange leuchtenden Kollagenfasern (Typ I) pro gesamte Neointima- (A), Media- (B) und Adventitia-Fläche (C) ermittelt. Scatterplots zeigen die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie den Mittelwert ± SEM (B, C und Plt.TGFβ-WT in A) oder Median mit IQR (Plt.TGFβ-KO in A). Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des Student's t-Tests (B, C) bzw. Mann-Whitney-Tests (A) erhoben. Repräsentative Bilder der Picro-Siriusrot gefärbten vaskulären Läsionen unter polarisiertem Licht sind in D dargestellt. Die Messbalken repräsentieren 100 µm (erste und dritte Bildreihe) und 50 µm (zweite Bildreihe). Die in der oberen Bildreihe eingezeichneten gestrichelten weißen Linien kennzeichnen die Membrana elastica interna und externa; die in der unteren Bildreihe gestrichelten weißen Linien die Membrana elastica interna bzw. Adventitia und die durchgezogenen weißen Linien die Membrana elastica interna.





**Abb. 5-20: Analyse der Reendothelialisierung der Neointima in Plt.TGFβ-WT- und -KO-Mäusen.** Die Reendothelialisierung in vaskulären Läsionen von Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- (n=10) und -KO-Mäusen (n=10) wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen CD31 (PECAM-1, engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule*) immunhistochemisch untersucht und in Bezug auf die relative Länge des mit CD31-positiven Endothelzellen bedeckten Gefäßlumens im Bereich der Neointima quantifiziert (A). *Scatterplots* zeigen die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie den Mittelwert ± SEM. Die statistischen Unterschiede wurden mittels *Student's t-Tests* erhoben. Repräsentative Bilder der CD31-positiven neointimalen Endothelzellen der Plt.TGFβ-WT- und -KO-Mäuse sind in B dargestellt. Die Messbalken der oberen Bildreihe repräsentieren 50 μm. Die untere Bildreihe zeigt die manuelle Detailvergrößerung der neointimalen Endothelzellen.

### 5.6.3 Die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion resultierte in einer medialen glatten Muskelzell-Dedifferenzierung und Inflammation

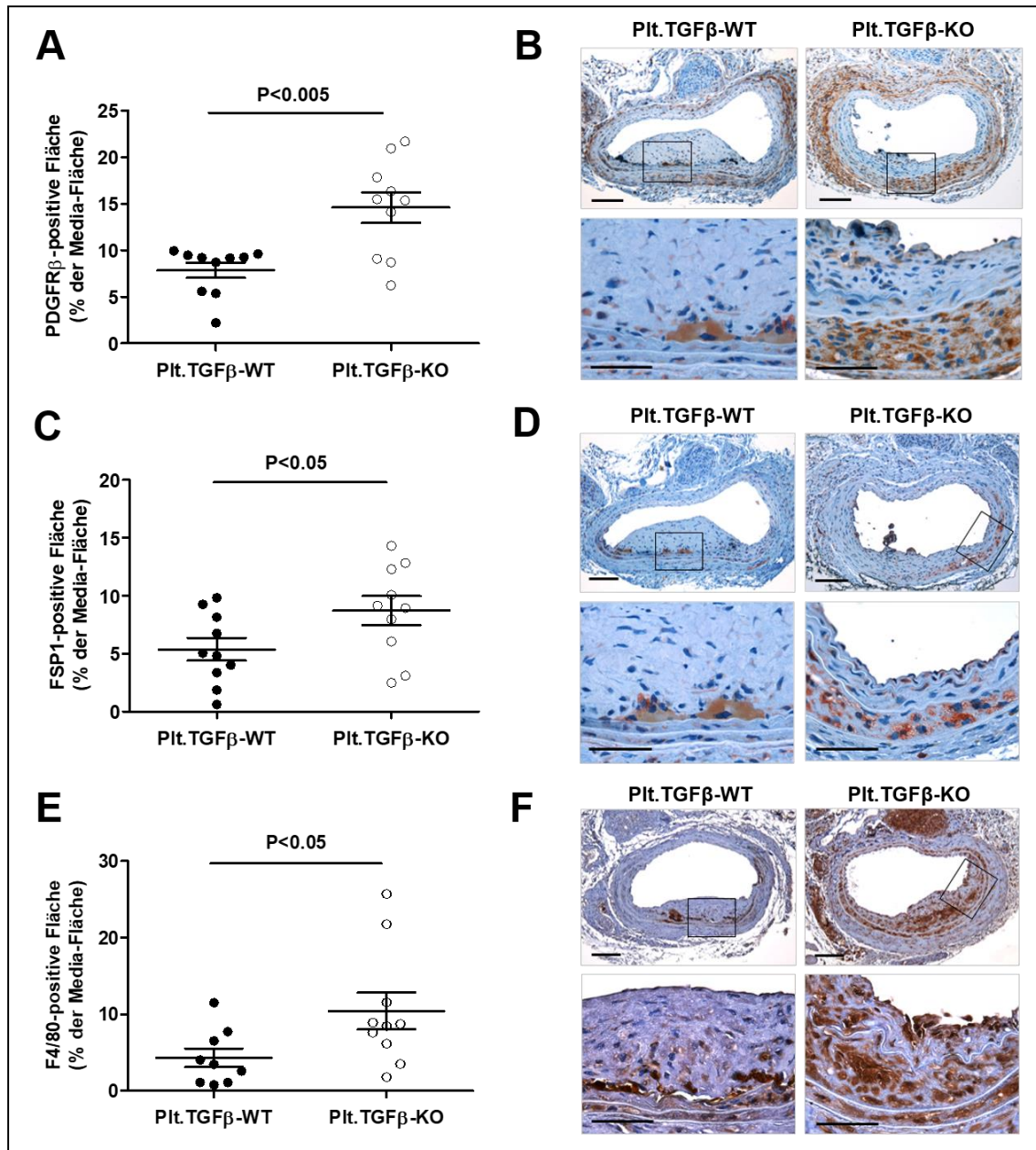
Wie bereits zuvor beschrieben (siehe 5.4.1), resultierte die Plättchen-spezifische TGFβ1-Deletion morphometrisch in einer signifikant vergrößerten Media-Fläche, auch wenn diese nicht mit einer Einengung des Gefäßlumens einherging. Diesbezüglich ließ sich jedoch weder bei der relativen α-SMA-positiven Fläche noch bei dem relativen Anteil an interstitiellem Kollagen ein signifikanter Unterschied in der Media der Plt.TGFβ-WT- und -KO-Mäuse erkennen (siehe 5.6.2). Allerdings zeigten die medialen glatten Muskelzellen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-KO-Mäuse einen dedifferenzierten Phänotyp. Auf Grundlage dessen wurde zum Nachweis mesenchymaler Zellen, die auch beim vaskulären Remodeling eine große Rolle spielen, die Expression des Fibroblastenmarkers FSP1 und des Myofibroblastenmarkers PDGFRβ untersucht. Da FSP1 auch in Monozyten exprimiert wird, wurde zur Detektion von Makrophagen der Marker F4/80 verwendet. Hierbei zeigte sich in der Media der Plt.TGFβ-KO-Mäuse sowohl für FSP1 ( $8,7 \pm 1,3$  vs.  $5,4 \pm 1,0$ % in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p < 0,05$  siehe Abb. 5-21 C) als auch für PDGFRβ ( $14,6 \pm 1,6$  vs.  $7,9 \pm 0,8$ % in Plt.TGFβ-WT-Mäusen;  $p < 0,005$ ; siehe Abb. 5-21 A) ein

signifikant stärkeres positives Signal. Darüber hinaus wies die Media der Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse eine signifikant erhöhte Infiltration mit F4/80-positiven Makrophagen auf ( $10,4 \pm 2,4$  vs.  $4,3 \pm 1,2\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p < 0,05$ ; siehe Abb. 5-21 E). Die Neointima der Plt.TGF $\beta$ -WT und -KO-Mäuse zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Expression von FSP1 ( $8,9 \pm 1,4$  vs.  $6,8 \pm 1,1\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p = 0,243$ ; siehe Abb. 5-23 B), PDGFR $\beta$  ( $5,8 \pm 1,6$  vs.  $6,2 \pm 0,9\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p = 0,814$ ; siehe Abb. 5-23 A) und F4/80 ( $13,2 \pm 3,5$  vs.  $10,0 \pm 2,6\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p = 0,485$ ; siehe Abb. 5-23 C). Repräsentative Bilder der FSP1-, PDGFR $\beta$ - und F4/80-Färbung sind in Abb. 5-21 B, D und F dargestellt.

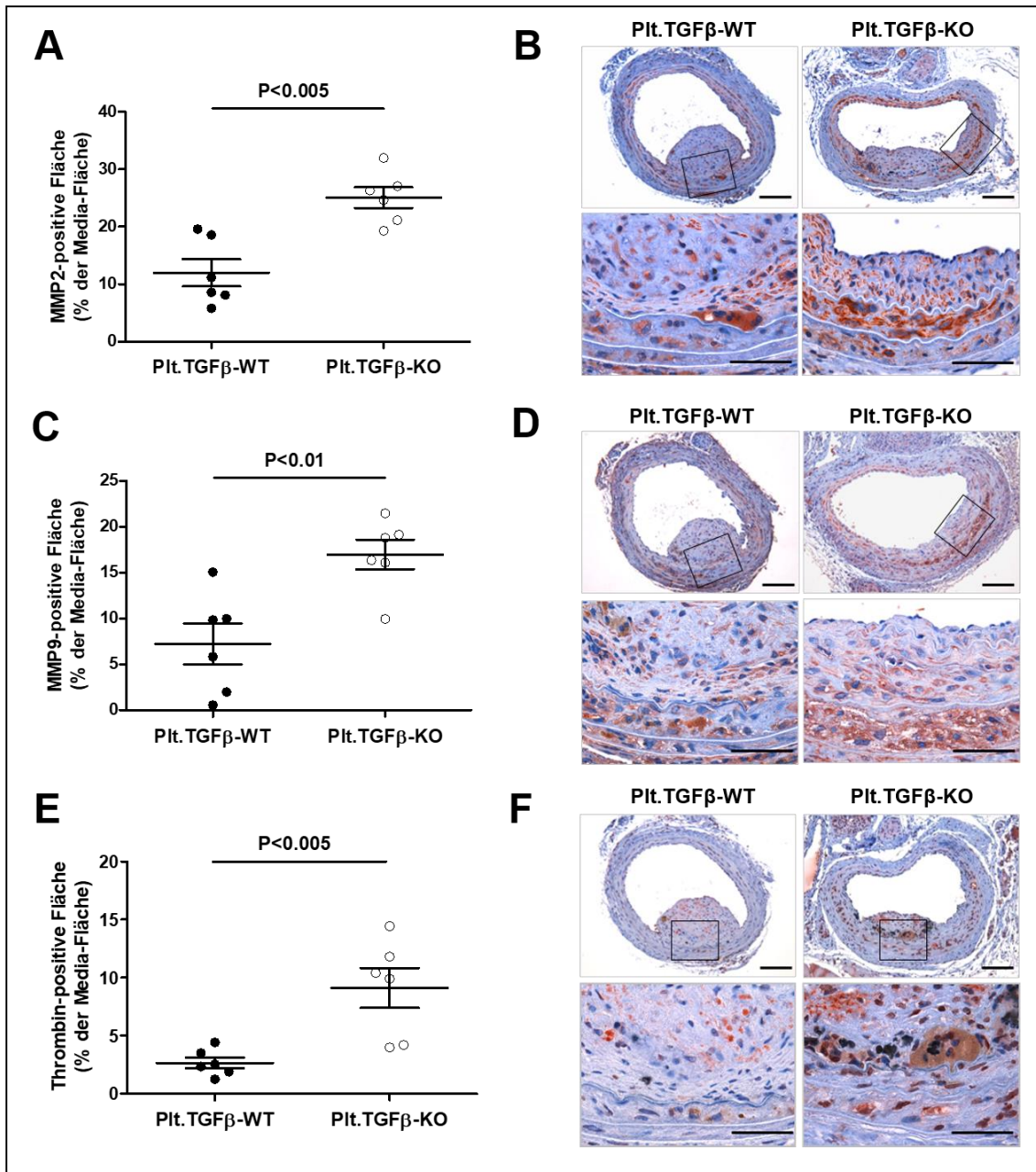
#### **5.6.4 Die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion resultierte in einer verstärkten medialen Proteasenexpression**

Da Proteasen eine entscheidende Rolle bei der TGF $\beta$ -Aktivierung spielen [48], aber auch beim Remodeling der Extrazellulärmatrix von Bedeutung sind, wurden die vaskulären Läsionen im Hinblick auf die Metalloproteinasen MMP2 und MMP9 als auch die Serinprotease Thrombin untersucht. Interessanterweise ergab die immunhistochemische Analyse eine signifikante Zunahme der MMP2- ( $25,1 \pm 1,8$  vs.  $12,0 \pm 2,4\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p < 0,005$ ; siehe Abb. 5-22 A), MMP9- ( $17,0 \pm 1,6$  vs.  $7,2 \pm 2,2\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p < 0,01$ ; siehe Abb. 5-22 C) als auch Thrombin- ( $9,1 \pm 1,7$  vs.  $2,7 \pm 0,5\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p < 0,005$ ; siehe Abb. 5-22 E) positiven Fläche im Bereich der Media der vaskulären Läsion von Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen. Dagegen war die Neointima der beiden Genotypen mit keiner signifikanten Änderung hinsichtlich der MMP2- ( $18,9 \pm 2,2$  vs.  $16,7$  [ $12,9 - 17,7$ ] % in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p = 0,240$ ; siehe Abb. 5-23 D), MMP9- ( $8,5 \pm 1,9$  vs.  $6,0 \pm 1,9\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p = 0,372$ ; siehe Abb. 5-23 E) und Thrombin- ( $14,2 \pm 2,6$  vs.  $14,5 \pm 1,9\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT-Mäusen;  $p = 0,912$ ; siehe Abb. 5-23 F) Expression assoziiert. Repräsentative Bilder der MMP2-, MMP9- und Thrombin-Färbung sind in Abb. 5-22 B, D und F dargestellt.

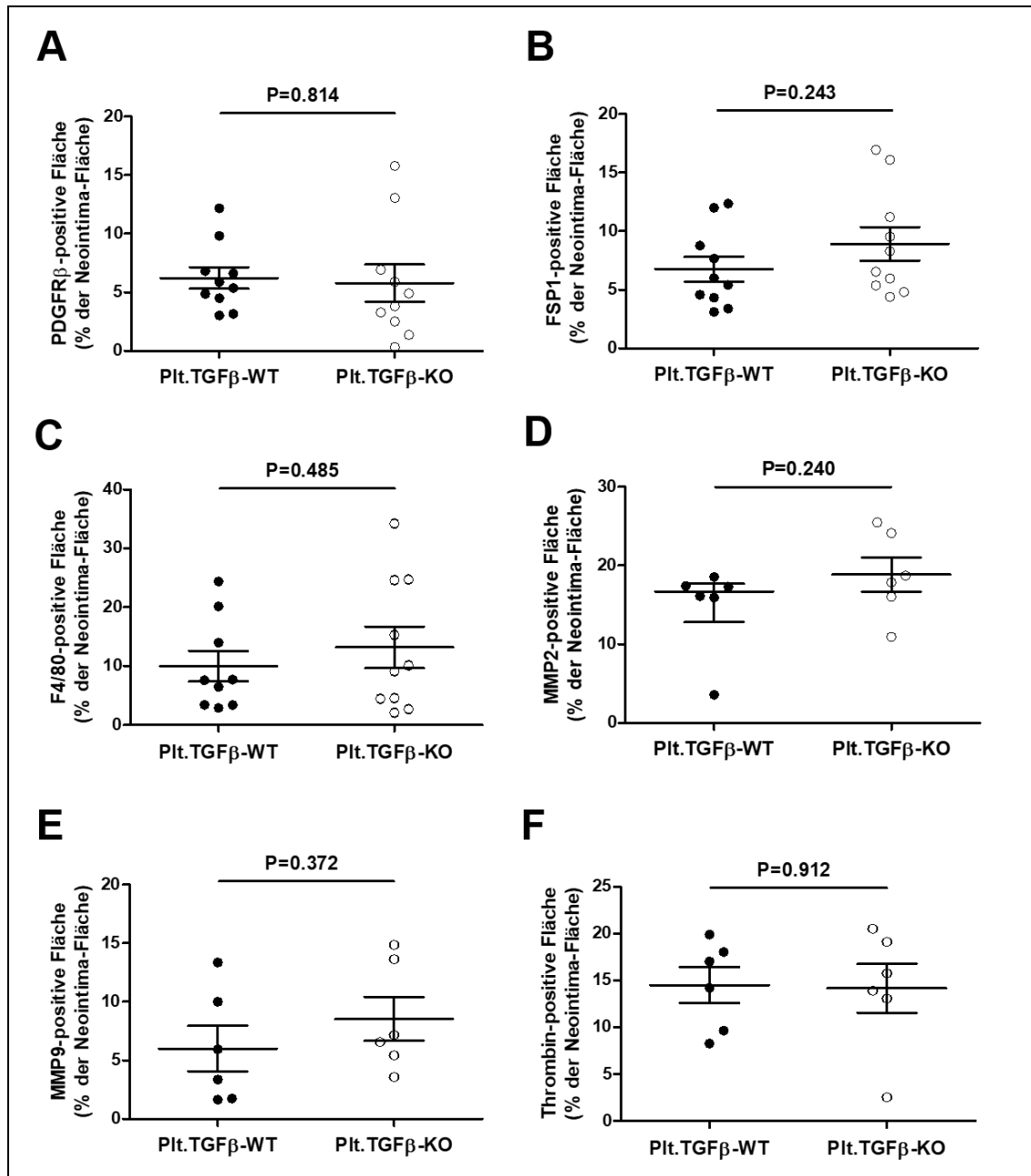




**Abb. 5-21: Zelluläre Zusammensetzung der Media 21 Tage nach induzierter Gefäßwandverletzung in Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäusen.** Mit Hilfe der Immunhistochemie und spezifischen Antikörpern gegen PDGFR $\beta$  (engl. *platelet-derived growth factor receptor beta*, **A**), FSP1 (engl. *fibroblast-specific protein-1*, **C**) und F4/80 (**E**) wurde deren Expression in den Zellen der Media vaskulärer Läsionen von Plt.TGF $\beta$ -WT- (n=9-10) und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen (n=10) detektiert und in Bezug auf die gesamte Media-Fläche quantifiziert. Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM sind in Form von *Scatterplots* dargestellt. Die statistischen Unterschiede wurden mittels *Student's t-Tests* erhoben. Zu sehen sind repräsentative Bilder der PDGFR $\beta$ - (**B**), FSP1- (**D**) und F4/80 (**F**) -Färbung. Die Messbalken repräsentieren 100  $\mu$ m (obere Bildreihe) und 50  $\mu$ m (untere Bildreihe). Die in der oberen Bildreihe eingezeichneten schwarzen Kästen umrahmen den in der unteren Bildreihe dargestellten vergrößerten Bildausschnitt.



**Abb. 5-22: Mediale Expression von Proteasen in Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- und -KO-Mäusen.** Die MMP2- (engl. *matrix metalloproteinase-2*, **A**), MMP9- (engl. *matrix metalloproteinase-9*, **C**) und Thrombin-Expression (**E**) in der Media der vaskulären Läsionen von Plt.TGFβ-WT- (n=6) und Plt.TGFβ-KO-Mäusen (n=6) wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper immunhistochemisch untersucht. Zur quantitativen Analyse wurde deren immunpositive Fläche ermittelt und in Bezug auf die gesamte Media-Fläche quantifiziert. *Scatterplots* zeigen die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie den Mittelwert ± SEM. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des *Student's t-Tests* erhoben. In Abbildung **B**, **D** und **F** sind repräsentative Bilder der MMP2- (**B**), MMP9- (**D**) und Thrombin- (**F**) positiven Zellen der Plättchen-spezifischen TGFβ1-WT- und -KO-Mäuse dargestellt. Die Messbalken repräsentieren 100 μm (obere Bildreihe) und 50 μm (untere Bildreihe). Die in der oberen Bildreihe eingezeichneten schwarzen Kästen umrahmen den in der unteren Bildreihe gezeigten vergrößerten Bildausschnitt.



**Abb. 5-23: Neointimale Expression von dedifferenzierten glatten Muskelzellen, inflammatorischen Zellen und Proteasen in Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäusen.** Mittels spezifischer Antikörper gegen PDGFR $\beta$  (engl. *platelet-derived growth factor-receptor beta*, **A**), FSP1 (engl. *fibroblast-specific protein-1*, **B**), F4/80 (**C**), MMP2 (engl. *matrix metalloproteinase-2*, **D**), MMP9 (engl. *matrix metalloproteinase-9*, **E**) und Thrombin (**F**) wurde deren Expression in der Neointima der Plt.TGF $\beta$ -WT- (n=6-10) und Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse (n=6-10) immunhistochemisch untersucht. Quantitativ wurde die relative immunpositive Fläche pro gesamte Neointima-Fläche bestimmt. Die individuellen Ergebnisse pro Maus sowie der Mittelwert  $\pm$  SEM (**A**, **B**, **C**, **E**, **F** und Plt.TGF $\beta$ -KO in **D**) oder Median mit IQR (Plt.TGF $\beta$ -WT in **D**) sind in Form von *Scatterplots* dargestellt. Die statistischen Unterschiede wurden mit Hilfe des *Student's t-Tests* (**A**, **B**, **C**, **E**, **F**) bzw. *Mann-Whitney-Tests* (**D**) erhoben.

Insgesamt zeigen diese Befunde, dass das Fehlen von TGF $\beta$ 1 in murinen Thrombozyten mit einer reduzierten Neointimabildung und einer geringeren Lumenstenose assoziiert ist. Allerdings kam es auch zu signifikanten Veränderungen bezüglich der Media und Adventitia der Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäuse, insbesondere zu einer TGF $\beta$ RI- und TGF $\beta$ RII-Überexpression, einer verstärkten Proteasenexpression, einer glatten Muskelzell-Dedifferenzierung und einer erhöhten Inflammation.

## 6 DISKUSSION

Die Thrombozytenaktivierung am Ort der Gefäßverletzung trägt durch Freisetzung und lokale Anreicherung potenter vaskulärer Wachstumsfaktoren, einschließlich des TGF $\beta$ 1, zur vaskulären Wundheilung, insbesondere der Neointimabildung, bei. In diesem Zusammenhang ist auf TGF $\beta$ -Rezeptoren zu verweisen, die auf Gefäßzellen exprimiert werden, mit TGF $\beta$ 1 interagieren und so Einfluss auf die Neointimabildung nehmen. Zur Vermeidung thrombotischer Komplikationen nach vaskulären Eingriffen, wie der Restenosebildung in Antwort auf eine Angioplastie, ist die Hemmung der Thrombozytenaktivierung Teil der Standardtherapie nach diesem Eingriff [91]. Zudem konnten in experimentellen Modellen zur Gefäßverletzung mittels TGF $\beta$ 1-Neutralisierung positive Effekte im Hinblick auf die Neointimabildung erzielt werden [72-74]. Da vaskuläre Verletzungen allerdings auch die TGF $\beta$ -Expression in der Gefäßwand hochregulieren, bleibt die relevante zelluläre Quelle und somit das primäre Ziel einer möglichen Anti-TGF $\beta$ -Therapie unklar. Darüber hinaus deuten neue Befunde darauf hin, dass die genetische Deletion von TGF $\beta$ -Rezeptoren in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand zu einer schweren Arteriopathie mit aneurysmatischer Dilatation führt [78-80]. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Auswirkungen einer zellspezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion in den Thrombozyten untersucht und gezeigt, dass der Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Knockout zu einer verbesserten Reendothelialisierung von neointimalen Läsionen und einer verminderten Neointimabildung nach chemisch induzierter Gefäßwandläsion in der *A. carotis* von Mäusen führt. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass dieser positive Effekt der Neointimareduktion von einem nicht signifikanten Trend in Richtung eines verstärkten vaskulären Remodelings nach außen sowie einer erhöhten Proliferation und Dedifferenzierung medialer glatter Muskelzellen und einer vermehrten medialen Inflammation begleitet wurde.

## **6.1 Einfluss der Plättchen-spezifischen TGFβ1-Deletion auf die hämatologischen Parameter, die Blutgerinnung, die Thrombozytenaggregation und die arterielle Thrombose**

*Das Fehlen von TGFβ1 in den Thrombozyten beeinflusst weder die Hämatopoese noch die Hämostase und hat auch keine Auswirkungen auf die Thrombozytenaggregation und die arterielle Thrombose.*

TGFβ1 ist ein ubiquitär exprimiertes Zytokin, dennoch konnten frühere Studien in Thrombozyten bis zu 100-fach mehr TGFβ als in anderen Zellen und Geweben nachweisen [50]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch in Thrombozytenaggregaten größere Mengen an TGFβ1 akkumulieren, die im Zuge der Thrombusauflösung sukzessiv aktiviert und freigesetzt werden und anschließend mit den auf Gefäßzellen exprimierten TGFβ-Rezeptoren interagieren und so lokal die Prozesse der Wundheilung beeinflussen [67]. TGFβ-Rezeptoren werden neben glatten Muskelzellen [57, 59] und Endothelzellen [58] auch von humanen Thrombozyten selbst exprimiert. Allerdings zeigte sich, dass eine Stimulation der Thrombozyten mit exogenem TGFβ1 selbst keine Aggregation induzierte, dagegen jedoch die Thrombozytenaggregation in Antwort auf schwächere Agonisten wie ADP [77], Kollagen und das Thrombinrezeptor-Peptid SFLLRNP (engl. seryl-phenylalanyl-leucyl-leucyl-arginyl-asparaginy-proline) steigerte [92]. Des Weiteren konnte in einer Studie von Hoying *et al.* nachgewiesen werden, dass Mäuse mit systemischem TGFβ1-Mangel (auf dem SCID- (engl. *severe combined immunodeficiency*) Hintergrund zur Verringerung des assoziierten inflammatorischen Phänotyps) über eine fehlerhafte Thrombozytenaggregation verfügen, die auf einen Ausfall der Thrombozyten-Fibrinogen-Bindung zurückzuführen war und lediglich in Abwesenheit von TGFβ1 auftrat [93]. In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit konnten in den untersuchten Plättchen-spezifischen TGFβ1-KO-Mäusen und deren Kontrollen keine Hinweise auf eine defizitäre Thrombozytenfunktion verzeichnet werden. Allerdings wurde die Bindung von Fibrinogen nicht spezifisch untersucht. Es ergaben sich weder in Bezug auf die Aggregation isolierter Thrombozyten nach Thrombinstimulation noch hinsichtlich der postoperativen akuten arteriellen Thrombose (in Form von Blutflussgeschwindigkeit, Okklusionszeit oder Thrombusstabilität) signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. In Übereinstimmung mit diesen Befunden, konnte auch Meyer *et al.* in einer 2012 durchgeführten Studie über die

Bedeutung von thrombozytärem TGF $\beta$ 1 für die kardiale Fibrose ähnliches beobachten [94]. Darüber hinaus wurde bereits in frühen Untersuchungen gezeigt, dass TGF $\beta$ 1 die Megakaryopoese *in vitro* hemmt [95] und ein systemischer TGF $\beta$ 1-Mangel mit einer Thrombozythämie, sprich einer Erhöhung der peripheren Thrombozytenzahl und einer leichten Blutungsstörung einhergeht [93]. Dies konnte in der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung mit Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäusen nicht bestätigt werden. Hier zeigte eine laborchemische Blutzellanalyse weder in Bezug auf Anzahl und Größe der Thrombozyten noch in den anderen untersuchten hämatologischen Parameter signifikante Genotyp-abhängige Unterschiede. Ebenso unterschieden sich auch die Blutungszeiten beider Genotypen nicht signifikant voneinander, was einen möglichen Effekt der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion auf die hämostatische Aktivität der Thrombozyten unwahrscheinlich macht.

## **6.2 Einfluss der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion auf die vaskuläre Wundheilung, insbesondere die Neointimabildung**

*Das Fehlen von TGF $\beta$ 1 in Thrombozyten geht nicht mit einer Änderung der Proteinkonzentration des thrombozytären Zytokins SDF1 $\alpha$  in vaskulären Läsionen einher, so dass eine Beeinflussung der postthrombotischen vaskulären Wundheilung durch SDF1 $\alpha$  unwahrscheinlich ist.*

Die Thrombozytenaktivierung am Ort der Gefäßverletzung ist nicht nur für die Akutreaktion auf eine Verletzung in Form der Plättchenaggregation und Thrombusbildung von großer Bedeutung, sondern dient auch als Stimulus für die Freisetzung der Inhaltsstoffe aus der Thrombozyten-Granula und nimmt so maßgeblich Einfluss auf die chronischen vaskulären Reperatur- und Regenerationsprozesse, einschließlich der Neointimabildung. Dies konnten unter anderem Kawasaki *et al.* in Mäusen mit partiell induzierter Thrombozytopenie bestätigen, welche auf eine Gefäßligatur mit reduzierter Neointimabildung reagierten [96]. Des Weiteren konnten mehrere experimentelle Untersuchungen zeigen, dass pharmakologische Interventionen zur Hemmung der Thrombozytenaggregation positive Auswirkungen auf die Entwicklung einer neointimalen Hyperplasie haben. So führte z.B. die Inhibition des Glykoprotein Ib-IX-V-Rezeptor-Komplexes (vWF-Rezeptor-Komplexes) im Kaninchenmodell zu einer verminderten Neointimabildung nach experimenteller

Karotisverletzung [97]. Neben dem Glykoprotein Ib-IX-V-Rezeptor-Komplex, welcher der Bindung des vWFs dient und für die Adhäsion der Thrombozyten verantwortlich ist [44, 45], sind auch die auf der Thrombozytenoberfläche lokalisierten P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoren für die Regulierung der Plättchenaggregation von zentraler Bedeutung. Diese G-Protein-gekoppelten ADP-Rezeptoren verstärken die Sekretion von ADP aus den thrombozytären  $\alpha$ -Granula und potenzieren bzw. vervollständigen so die ADP-induzierte Aggregation der Thrombozyten [98, 99]. In einer experimentellen Untersuchung mit P2Y<sub>12</sub>-defizienten Knochenmark transplantierten Mäusen wurde nach FeCl<sub>3</sub>-induzierter arterieller Verletzung im Vergleich zu den Kontrolltieren eine verringerte Neointimabildung beobachtet [98]. Ähnliches konnte auch Patil *et al.* in C57BL/6-Mäusen zeigen, die mit Ticagrelor, einem reversiblen P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten, behandelt wurden und nach Induktion einer experimentellen Gefäßwandläsion mit reduzierter Neointimabildung reagierten [100]. Auch wenn die genannten Studien die Bedeutung von aktivierten Thrombozyten für die postthrombotischen Wundheilungsprozesse durchgängig belegen, sind die thrombozytären Faktoren, die diese Effekte vermitteln, weniger bekannt. Dabei ist zu bedenken, dass Thrombozyten in ihrer Granula eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine (z.B. SDF1 $\alpha$ ), Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF und TGF $\alpha/\beta$ ), Gerinnungsfaktoren (z.B. Fibrinogen), Adhäsionsmoleküle (z.B. vWF) und andere Mediatoren enthalten [37, 41-43] und die Aktivierung der Thrombozyten *per se* möglicherweise nicht spezifisch genug ist, um die zellulären Prozesse zu regulieren, die die Entwicklung der Restenose/Neointima steuern. In diesem Zusammenhang konnten Rath *et al.* in einer kürzlich durchgeführten Studie beobachten, dass das thrombozytäre Zytokin SDF1 $\alpha$  die Bindung von TGF $\beta$ 1 auf der Oberfläche humaner Plättchen von symptomatischen KHK-Patienten signifikant erhöht [101]. Bereits 2005 zeigten Massberg *et al.*, dass SDF1 $\alpha$  durch Beeinflussung der Mobilisation hämatopoetischer Stammzellen einen wichtigen Beitrag zur vaskulären Wundheilung leistet, indem es die primäre Adhäsion von Knochenmarksvorläuferzellen auf der Oberfläche von arteriellen Thromben unterstützt [43]. In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung konnte kein Unterschied hinsichtlich der Proteinkonzentration von SDF1 $\alpha$  in den vaskulären Läsionen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-WT- und -KO-Mäuse beobachtet werden. Allerdings ist hierbei zu erwähnen, dass in der Untersuchung von Rath *et al.* die SDF1 $\alpha$ -abhängige Erhöhung der TGF $\beta$ 1-Spiegel ausschließlich nach Stimulation mit hohen SDF1 $\alpha$ -Dosen zu beobachten war und im Gegensatz dazu eine Stimulation mit TGF $\beta$ 1 keine Veränderung des Thrombozytenexpressionsniveaus von SDF1 $\alpha$  initiierte [101]. Auch



die Tatsache, dass die Studie von Rath *et al.* anhand von humanem, und nicht wie in der vorliegenden Arbeit mittels murinem Untersuchungsmaterial erfolgte, ist zu berücksichtigen.

*Eine TGFβ1-Deletion in den Thrombozyten resultiert nach Gefäßwandverletzung in einer verstärkten Expression von Proteasen in der Media, welche zu einem vermehrten Abbau von ECM, einem gesteigerten Kollagenumsatz und einer verstärkten Migration glatter Muskelzellen innerhalb der Neointima von Plt.TGFβ1-KO-Mäusen beigetragen haben könnte.*

Die Rolle von TGFβ1 als Regulator der vaskulären Wundheilung bestätigten weitere wissenschaftliche Untersuchungen. So führte sowohl eine lokale Überexpression von Plasmiden, die aktives TGFβ1 kodieren [71], als auch eine Verabreichung von rekombinantem TGFβ1 [57] zu einer verstärkten intimalen Hyperplasie in Antwort auf eine experimentelle arterielle Verletzung. Zusätzlich zur Freisetzung aus aktivierten Thrombozyten wird TGFβ1 jedoch auch von einer Reihe anderer an der vaskulären Wundheilung beteiligten Zelltypen exprimiert. So konnte zum Beispiel in früheren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass eine arterielle Verletzung in einer verstärkten TGFβ1-Expression sowohl in humanen als auch murinen restenosierten Läsionen resultiert [75, 76]. In diesem Zusammenhang ist auf die Zunahme neointimaler glatter Muskelzellen zu verweisen, die postoperativ vermehrt TGFβ1 exprimierten. So stiegen bereits wenige Stunden nach experimenteller Ratten-Ballonangioplastie die TGFβ1-mRNA-Spiegel deutlich an und blieben über zwei Wochen anhaltend hoch. Dies konnte durch immunhistochemische Untersuchungen mit dem Ergebnis eines verstärkten TGFβ1-Immunsignals in den neointimalen glatten Muskelzellen bestätigt werden [75]. Des Weiteren wurde auch in neointimalen Endothelzellen eine vermehrte mRNA-Expression von TGFβ1, aber auch von TGFβ2 verzeichnet [102]. Die erhöhte TGFβ1-Expression in vaskulären Zellen könnte zu den anhaltend hohen aktiven TGFβ1-Plasmaspiegeln beigetragen haben, die in der vorliegenden Arbeit 21 Tage nach experimenteller Gefäßwandverletzung in Plt.TGFβ1-WT-Mäusen, aber auch in einigen Plt.TGFβ1-KO-Mäusen beobachtet werden konnten. Die Aktivierung des latenten TGFβ kann durch unterschiedliche Faktoren und physikalische Prozesse beeinflusst werden, so auch durch erhöhte Temperaturen und extreme pH-Wert-Änderungen, was bei der Analyse der TGFβ1-Plasmaspiegel mittels

ELISA zu berücksichtigen ist. Auch Proteasen wie Plasmin, Thrombin, Elastase und die Metalloproteinasen MMP2 und MMP9 sind an der Aktivierung des latenten TGF $\beta$ -Komplexes beteiligt. [48, 51, 52, 56]. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Media der vaskulären Läsionen Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse eine verstärkte Expression von MMP2, MMP9 und Thrombin aufwies. Diese erhöhte Proteasenexpression könnte Einfluss auf die vaskulären Wundheilungsprozesse nehmen und eine Erklärung für den verstärkten Abbau von extrazellulärer Matrix, den gesteigerten Kollagenumsatz und die vermehrte Migration glatter Muskelzellen innerhalb der Neointima der Plt.TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse liefern. In Korrelation dazu wurde bereits in vorherigen Studien über eine erhöhte MMP2- und MMP9-Expression nach vaskulärer Verletzung berichtet, die in nicht kontraktile glatten Muskelzellen und Makrophagen lokalisiert werden konnte [103]. Die wissenschaftliche Untersuchung von Rath *et al.* aus dem Jahre 2014 unterstreicht die Bedeutung des thrombozytären TGF $\beta$ 1 für das vaskuläre Remodeling. Hierbei wurde gezeigt, dass die TGF $\beta$ 1-Bindung auf der Thrombozytenoberfläche von KHK-Patienten nach perkutaner koronarer Intervention signifikant erhöht war. Diese Befunde konnten jedoch nur in Patienten mit akutem Koronarsyndrom und nicht in Patienten mit stabiler KHK-Erkrankung erhoben werden und erfolgten unabhängig von Tod und/oder Myokardinfarkt innerhalb des 12-monatigen Follow-ups [104]. Darüber hinaus konnte in einer weiteren Studie eine Korrelation zwischen einer vermehrten Restenosebildung nach Stentimplantation und einem Polymorphismus im TGF $\beta$ 1-Gen beobachtet werden [105]. In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung konnten wir nun anhand von Mäusen mit Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-Deletion direkt die Bedeutung des TGF $\beta$ 1, freigesetzt von aktivierten Thrombozyten, für die vaskuläre Wundheilung, sprich Neointimabildung demonstrieren.

*Eine Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion führt nach experimenteller Gefäßwandverletzung neben einer reduzierten Neointimabildung und verminderten Lumenstenose zu einer medialen Verdickung und einer (nicht signifikanten) Vergrößerung der Gesamtgefäßfläche.*

Bei dem Prozess der Neointimabildung spielt die Migration und Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen und die Synthese extrazellulärer Matrixproteine, bedingt durch die Entdifferenzierung glatter Muskelzellen, eine entscheidende Rolle [26]. Hierbei zeigten frühere *in vitro*-Studien, dass TGF $\beta$ 1 nicht nur in der Lage ist die Proliferation glatter

Muskelzellen zu stimulieren, sondern auch zu inhibieren [68, 106]. Des Weiteren konnte in einer *in vivo*-Studie beobachtet werden, dass 15 Tage alte Mäuse mit systemischer, heterozygoter TGF $\beta$ 1-Deletion über eine reduzierte aortale Expression von SMC-Differenzierungsmarkern verfügen. Ebenso waren experimentell verletzte Karotisarterien adulter Wistar-Ratten sowohl prä- als auch postoperativ durch eine Verringerung an SMC-Differenzierungsmarkern (wie SM  $\alpha$ -actin (engl. *Smooth Muscle  $\alpha$ -actin*) und SM-MHC (engl. *Smooth Muscle-Myosin Heavy Chain*)) und einer gleichzeitigen Abnahme der aktiven TGF $\beta$ -Spiegel gekennzeichnet. Demnach scheint TGF $\beta$  maßgeblich die Differenzierung glatter Muskelzellen in murinen Arterien *in vivo* zu regulieren [107]. In ähnlicher Weise zeigten auch Probanden einer klinischen Studie mit heterozygoter Mutation des TGF $\beta$  Typ II-Rezeptors eine verminderte Expression kontraktiler Proteine in glatten Muskelzellen und Myofibroblasten, die aus aortalen Explantaten herauswuchsen [108]. Trotz dieser Befunde bleibt die Rolle, die die TGF $\beta$ -Signaltransduktion in glatten Muskelzellen *in vivo* spielt, weiterhin unklar. Dies ist unter anderem auf den schwerwiegenden Phänotyp der systemischen TGF $\beta$ -defizienten Mäuse zurückzuführen, der von multifokalen Entzündungen dominiert wird, welche durch massive Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen in zahlreichen Organen, vor allem aber in Herz und Lunge, bereits sehr früh (im Alter von 3-4 Wochen) zum Tod der Tiere führt [107]. Diesbezüglich wurde erst kürzlich gezeigt, dass eine postnatale Deletion des TGF $\beta$  Typ II-Rezeptors in murinen aortalen glatten Muskelzellen eine schwere Aortopathie einschließlich früh einsetzender medialer Verdickung, Blutung, Dissektion, Elastolyse, aneurysmatischer Dilatation und abweichender SMC-Genexpression verursacht [78]. In ähnlicher Weise resultierte die Deletion des TGF $\beta$  Typ I-Rezeptors in glatten Muskelzellen adulter Mäuse in einer schnellen und schweren aneurysmatischen Degeneration, wohingegen die Deletion des TGF $\beta$  Typ II-Rezeptors nur eine leichte pathologische Veränderung der Aorta mit geringer Läsionsprävalenz verursachte und bedingt durch die Abwesenheit von TGF $\beta$  Typ I-Rezeptoren einen abgeschwächten vaskulären Phänotyp hervorbrachte [79]. Des Weiteren förderte die Inhibition der TGF $\beta$ -Signaltransduktion durch Verabreichung rekombinanter löslicher TGF $\beta$  Typ II-Rezeptoren (TGF $\beta$ -Inhibitoren) nach Ballonkatheter-induzierter Verletzung der *A. carotis* in Ratten das vaskuläre Remodeling nach außen. Infolge dieser Gefäßvergrößerung änderte sich die verletzungsbedingte Lumenfläche trotz Neointimabildung nicht. Zudem ging die Gefäßvergrößerung mit einer verringerten perivaskulären Expression an Kollagen Typ I und Typ III bzw. Fibronectin einher [102, 109]. Auch in der vorliegenden

wissenschaftlichen Arbeit konnte in den verletzten Karotisarterien der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse sowohl eine mediale Verdickung als auch eine moderate, nicht signifikante Zunahme der Gesamtgefäßfläche beobachtet werden. Nichtsdestotrotz deuten diese Ergebnisse (einschließlich der Befunde, die in den unverletzten Karotisarterien erhoben wurden) darauf hin, dass der vaskuläre Phänotyp durch die Hemmung der thrombozytären TGF $\beta$ 1-Freisetzung weniger schädigend wirkt als die direkte Hemmung der TGF $\beta$ -Signaltransduktion in glatten Muskelzellen mittels Manipulation der TGF $\beta$ -Rezeptoren. Überraschenderweise zeigte sowohl die Media als auch die Neointima der hier untersuchten Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse eine signifikante Hochregulation an TGF $\beta$  Typ I- und Typ II-Rezeptoren.

*Das Fehlen von TGF $\beta$ 1 in Thrombozyten resultiert in einer verstärkten Expression des Makrophagen-Markers F4/80 in der Gefäßmedia.*

Neben einer verstärkten Proliferation und Dedifferenzierung medialer glatter Muskelzellen resultierte die hier beobachtete mediale Verdickung in den vaskulären Läsionen der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse in einer erhöhten Zahl immunpositiver F4/80-Makrophagen. Hinsichtlich dieses Befundes konnte bereits in vorherigen Studien verdeutlicht werden, dass TGF $\beta$ 1-defiziente Mäuse einen schwerwiegenden inflammatorischen Phänotyp aufzeigen, der von Gewebnekrose, Degeneration und frühem Tod begleitet wird. Demnach kann dem TGF $\beta$  eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Proliferation von Immunzellen und der Extravasation zugeschrieben werden [110, 111]. Des Weiteren konnte in einer Studie von Tsunawaki *et al.* veranschaulicht werden, dass TGF $\beta$  die Aktivierung von Makrophagen kontrolliert [112].

*Die Thrombozyten-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion geht mit einer verbesserten Reendothelialisierung der vaskulären Läsionen nach experimenteller Gefäßwandverletzung einher, was in Zusammenhang mit einem vermindert hemmenden, durch den ALK5 vermittelten, TGF $\beta$ -Signal stehen könnte.*

Die Reendothelialisierung vaskulärer Läsionen nach Gefäßverletzung spielt bei der Kontrolle der Proliferation glatter Muskelzellen und der Kontrolle der Restenosebildung eine wichtige Rolle. Bei dem Prozess der Reendothelialisierung bedecken

neugebildete Endothelzellen den Bereich der Gefäßverletzung und stoppen mittels parakriner Signale die Proliferation glatter Muskelzellen [90, 113, 114]. Für die Aktivierung des TGF $\beta$  sind innerhalb des Gefäßsystems neben glatten Muskelzellen auch Endothelzellen von grundlegender Bedeutung [56]. Zum einen ist bekannt, dass Endothelzellen selbst TGF $\beta$ -Rezeptoren exprimieren, die mit TGF $\beta$  interagieren und durch dessen Bindung die intrazelluläre Signaltransduktion induzieren [58]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass TGF $\beta$ , aufgereinigt aus humanen Plättchen, die Regeneration des Endothels hemmt [10]. Darüber hinaus weisen Mäuse mit systemischem TGF $\beta$ -Mangel Defekte in der Endothelzeldifferenzierung und der Vaskulogenese auf. In der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung stellte sich dagegen heraus, dass das Fehlen von TGF $\beta$ 1 in den Thrombozyten mit einer verbesserten Endothelialisierung der vaskulären Läsionen einherging, was auf die Rolle des TGF $\beta$ 1 als negativen Regulator der Endothelzellproliferation zurückzuführen sein könnte [10, 115]. Diesbezüglich zeigten Haudenschild *et al.* bereits im Jahre 1979, dass die verbesserte Regenerierung der endothelialen Integrität nach vaskulärer Verletzung in Abwesenheit von glatten Muskelzellen nur in den Bereichen der Intima zu beobachten ist, die nicht durch regeneriertes Endothel bedeckt werden. Dies ließ darauf schließen, dass die Endothelregeneration in Antwort auf eine intimale Verletzung der Ansammlung glatter Muskelzellen in der Intima vorausgeht und folglich die verletzten Intimabereiche, die schnell durch regeneriertes Endothel bedeckt werden, vor der Entwicklung einer intimalen Läsion geschützt sind [113]. Die Mechanismen, die der hier gezeigten verbesserten Reendothelialisierung in Abwesenheit von TGF $\beta$ 1 zugrunde liegen, könnten auf ein vermindert hemmendes, durch den TGF $\beta$  Typ I-Rezeptor (ALK5) vermitteltes, TGF $\beta$ -Signal zurückzuführen sein [116, 117], auch wenn die TGF $\beta$  Typ I-Rezeptor-Expression in Endothelzellen, die den Bereich der vaskulären Läsion bedecken, in den beiden Versuchsgruppen (Plt.TGF $\beta$ -WT- und KO-Mäuse) nicht differierten. Es muss jedoch auch die erhöhte ALK5-Expression in der Neointima und Media der Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse beachtet werden. Hierbei ist allerdings zu erwähnen, dass auch die Expression des ALK1, einem zusätzlichen TGF $\beta$  Typ I-Rezeptor, der mit ALK5 nur auf Endothelzellen co-exprimiert wird [118], für eine vollständige Verifizierung der Hypothese analysiert werden müsste. Dies konnte jedoch aufgrund des limitierenden histologischen Materials im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden und bedarf deshalb weiterer Analysen.

### 6.3 Fazit und Limitation der Arbeit

Zusammenfassend legen die Ergebnisse der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit nahe, dass ein Fehlen von TGF $\beta$ 1 in Thrombozyten die Regeneration des Endothels fördert und die Neointimabildung als auch den Lumenverlust nach vaskulärer Verletzung im Mausmodell mindert, ohne dabei die Aggregation der Thrombozyten oder die arterielle Thrombose zu beeinflussen. Eine verstärkte Expression von Proteasen (MMP2, MMP9 und Thrombin) in der Media könnte durch Steigerung des ECM-Abbaus, des Kollagenumsatzes und der Migration glatter Muskelzellen Einfluss auf den Prozess der vaskulären Wundheilung genommen haben und folglich zu der reduzierten Neointimabildung beigetragen haben. Hinsichtlich der gezeigten verbesserten Reendothelialisierung vaskulärer Läsionen in den Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen wurde TGF $\beta$ 1 als negativer Regulator der Endothelzellproliferation identifiziert. Als möglicher Mechanismus könnte eine durch den TGF $\beta$  Typ I-Rezeptor (ALK5) vermittelte verminderte hemmendes TGF $\beta$ -Signal in Frage kommen, allerdings konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht direkt gezeigt werden. Es muss außerdem in weiteren Analysen untersucht werden, ob auch die Expression des ALK1, einem zusätzlichen TGF $\beta$  Typ I-Rezeptor, der mit ALK5 auf Endothelzellen co-exprimiert wird, durch die Abwesenheit von TGF $\beta$ 1 beeinflusst wird. Darüber hinaus sollte erwähnt werden, dass hinsichtlich der TGF $\beta$ -Signaltransduktion auch die *downstream* gelegenen Effektormoleküle Smad 2, Smad 3 und deren Co-Smad (Smad 4) von grundlegender Bedeutung sind. Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Expressionsniveaus der genannten Effektormoleküle durch die TGF $\beta$ 1-Deletion in den Thrombozyten beeinflusst werden und sich auf die vaskuläre Wundheilung auswirken. Zudem handelt es sich bei dem verwendeten murinen Eisen-(III)-chlorid-Modell zur Induktion einer arteriellen Gefäßwandläsion um einen experimentellen Versuchsaufbau, welcher nicht den Gegebenheiten physiologischer Prozesse *in vivo* und nach Ruptur bzw. Dilatation menschlicher Plaques entspricht. Weitere Analysen sollten Aufschluss darüber geben, inwiefern das thrombozytäre Fehlen von TGF $\beta$ 1 als mögliche therapeutische Maßnahme bei einer Restenose, wie sie oftmals nach Koronarangioplastie beobachtet wird, zum Einsatz kommen und so die vaskuläre Wundheilung verbessern könnte. Durch die Verwendung medikamentenfreisetzender Stents (sogenannter Drug Eluting Stents) konnte zwar die Anzahl der Restenosen nach Koronarangioplastie reduziert werden, dies geht jedoch mit einem gehäuften Auftreten später Stent-Thrombosen einher. Demnach ist eine

Weiterentwicklung der Drug Eluting Stents notwendig, um sowohl die Neointimabildung zu reduzieren als auch eine verbesserte Reendothelialisierung sicherzustellen. Auch dies bedarf der Durchführung weiterer Untersuchungen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Koronarangioplastie als therapeutische Maßnahme der KHK ist mit einem erhöhten Risiko für Restenosen im behandelten Gefäßareal verbunden, dem mit Hilfe von Thrombozytenaggregationshemmern gegengesteuert wird. Die Aktivierung der Thrombozyten ist allerdings neben der akuten Thrombusbildung auch für die vaskuläre Wundheilung von zentraler Bedeutung, da durch diese unter anderem die Freisetzung des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ 1 aus der Thrombozytengranula stimuliert wird. Frühere Studien zeigten, dass eine genetische TGF $\beta$ 1-Überexpression in einer verstärkten intimalen Hyperplasie, eine Behandlung mit TGF $\beta$ 1-Antikörper dagegen in einer reduzierten Intimahyperplasie resultiert. In diesen Studien wurde jedoch nur das systemische TGF $\beta$ 1 berücksichtigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Bedeutung von TGF $\beta$ 1, exprimiert und freigesetzt von aktivierten Thrombozyten, für die akute Thrombusbildung und die chronische vaskuläre Wundheilung in Antwort auf eine arterielle Gefäßwandverletzung zu untersuchen.

Mäuse mit geflochten TGF $\beta$ 1-Allelen wurden mit Mäusen verpaart, die unter der Kontrolle des murinen Megakaryozyten-spezifischen Pf4-Promoters eine Cre-Rekombinase exprimierten. Die dabei entstandene Mauslinie mit konstitutiver Plättchen-spezifischer TGF $\beta$ 1-Deletion wurde hinsichtlich ihres vaskulären Phänotyps *in vivo* und *ex vivo* charakterisiert und analysiert. Zur Untersuchung der arteriellen Thrombose und Neointimabildung wurde mittels Eisen-(III)-chlorid-Modell eine experimentelle Gefäßwandläsion in der *Arteria carotis communis* induziert und sowohl prä- als auch postoperativ die Blutflussgeschwindigkeit im verletzten Gefäß gemessen. Die Morphometrie der arteriellen Läsion resultierte neben einer signifikant verkleinerten Intimahyperplasie und verminderten Lumenstenose in einer signifikanten Verdickung der Media und einer tendenziell (nicht signifikant) vergrößerten Gesamtgefäßfläche. Die Blutflussmessung ergab keinerlei Beeinflussung der akuten arteriellen Thrombose durch die Plättchen-spezifische TGF $\beta$ 1-Deletion. Auch eine Beeinträchtigung der Hämatopoese, der Hämostase und der Thrombozytenaggregation konnte ausgeschlossen werden. Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen wurde in den Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen nach vaskulärer Verletzung eine verstärkte mediale Proteasenexpression (MMP2, MMP9 und Thrombin) beobachtet. Diese könnte durch einen gesteigerten ECM-Abbau, einen vermehrten Kollagenumsatz und eine verstärkte Migration glatter Muskelzellen das vaskuläre Remodeling beeinflusst haben und demnach zur verminderten Neointimabildung beigetragen haben. Ebenfalls mit



Hilfe der Immunhistochemie nachweisbar war eine signifikant verbesserte Reendothelialisierung der vaskulären Läsionen in den Plättchen-spezifischen TGF $\beta$ 1-KO-Mäusen. Hierbei wurde TGF $\beta$ 1 als möglicher negativer Regulator der Endothelzellproliferation und ein vermutlich durch den TGF $\beta$  Typ I-Rezeptor (ALK5) vermitteltes vermindert hemmendes TGF $\beta$ -Signal als möglicher Mechanismus identifiziert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass aufgrund der Befunde der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung das Fehlen von TGF $\beta$ 1 in murinen Thrombozyten vor einer übermäßigen postoperativen Neointimabildung schützt und die Regeneration des Endothels fördert. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass Plättchen-spezifisches TGF $\beta$ 1 eine essentielle Rolle im chronischen vaskulären Remodeling-Prozess spielt. Zudem deuten die Ergebnisse darauf hin, dass zielgerichtetes TGF $\beta$ 1-Signaling die postthrombotischen Wundheilungsprozesse verbessert, ohne dabei die Hämostase oder arterielle Thrombose zu beeinflussen, sodass dies eine Erweiterung der Möglichkeiten zur Reduzierung der Restenoseraten nach vaskulären Verletzungen darstellen könnte.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Organization, W.H., *Cardiovascular diseases (CVDs): Key facts*. [Internet] [zitiert am 15.08.2019], 2017.
2. Tschoepe, D., et al., *Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA*. *Circulation*, 1993. **88**(1): p. 37-42.
3. Gruntzig, A., *Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis*. *Lancet*, 1978. **1**(8058): p. 263.
4. Chandrasekar, B. and J.-F. Tanguay, *Platelets and restenosis*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2000. **35**(3): p. 555-562.
5. Grines, C.L., et al., *Coronary angioplasty with or without stent implantation for acute myocardial infarction. Stent Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(26): p. 1949-56.
6. Tienush Rassaf, Stephan Steiner, and M. Kelm, *Patienten nach koronarer Stentimplantation: Nachsorge und Verlaufsbeobachtung*. *Deutsches Ärzteblatt*, 2013. **Jg. 110**(Heft 5): p. 83.
7. Bonello, L., et al., *Platelets and endothelium: two key players in percutaneous coronary intervention*. *Arch Cardiovasc Dis*, 2011. **104**(12): p. 601-3.
8. Gawaz, M. and T. Geisler, *Update orale Plättchenhemmer*. *Der Kardiologe*, 2012. **6**(3): p. 195-209.
9. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. *Am J Pathol*, 1977. **86**(3): p. 675-84.
10. Heimark, R.L., D.R. Twardzik, and S.M. Schwartz, *Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets*. *Science*, 1986. **233**(4768): p. 1078-80.
11. Blann, A.D., *How a damaged blood vessel wall contributes to thrombosis and hypertension*. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003. **33**(5-6): p. 445-8.
12. Ernst Mutschler, Hans-Georg Schaible, and P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2007. 6., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage: p. 981.
13. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
14. Robinson, S.T. and W.R. Taylor, *Beyond the adventitia: exploring the outer limits of the blood vessel wall*. *Circ Res*, 2009. **104**(4): p. 416-8.
15. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(2): p. 115-26.

16. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
17. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
18. Dawber, T.R., G.F. Meadors, and F.E. Moore, Jr., *Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study*. Am J Public Health Nations Health, 1951. **41**(3): p. 279-81.
19. Dawber, T.R., F.E. Moore, and G.V. Mann, *Coronary heart disease in the Framingham study*. Am J Public Health Nations Health, 1957. **47**(4 Pt 2): p. 4-24.
20. Grundy, S.M., et al., *Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology*. Circulation, 1999. **100**(13): p. 1481-92.
21. Carruthers, S.G., *Cardiovascular risk factors in perspective*. Can Fam Physician, 1993. **39**: p. 309-14.
22. Tabas, I., G. Garcia-Cardena, and G.K. Owens, *Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis*. J Cell Biol, 2015. **209**(1): p. 13-22.
23. Hansson, G.K., P. Libby, and I. Tabas, *Inflammation and plaque vulnerability*. J Intern Med, 2015. **278**(5): p. 483-93.
24. Debus, E.S., et al., *Manifestationen und Prävention der Arteriosklerose*. Gefässchirurgie, 2013. **7**: p. 644-651.
25. Alt, E., et al., *Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting: a new biodegradable stent coating releasing hirudin and the prostacyclin analogue iloprost*. Circulation, 2000. **101**(12): p. 1453-8.
26. ER, O.B., et al., *Pathogenesis of neointima formation following vascular injury*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2011. **11**(1): p. 30-9.
27. Majesky, M.W., *Neointima formation after acute vascular injury. Role of counteradhesive extracellular matrix proteins*. Tex Heart Inst J, 1994. **21**(1): p. 78-85.
28. De Meyer, G.R. and H. Bult, *Mechanisms of neointima formation--lessons from experimental models*. Vasc Med, 1997. **2**(3): p. 179-89.
29. Kwon, I., et al., *Thrombolytic effects of the snake venom disintegrin saxatilin determined by novel assessment methods: a FeCl3-induced thrombosis model in mice*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e81165.
30. Jeremy, J.Y. and A.C. Thomas, *Animal models for studying neointima formation*. Curr Vasc Pharmacol, 2010. **8**(2): p. 198-219.

31. Konstantinides, S., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice*. *Circulation*, 2001. **103**(4): p. 576-83.
32. Wright, M.B., R.A. Seifert, and D.F. Bowen-Pope, *Protein-Tyrosine Phosphatases in the Vessel Wall: Differential expression after acute arterial injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(5): p. 1189-1198.
33. Schafer, K., et al., *Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(1): p. 112-7.
34. Schafer, K., et al., *Different mechanisms of increased luminal stenosis after arterial injury in mice deficient for urokinase- or tissue-type plasminogen activator*. *Circulation*, 2002. **106**(14): p. 1847-52.
35. Welsch, U., *Sobotta Lehrbuch der Histologie*. Elsevier, 2006. 2., völlig überarbeitete Auflage: p. 117.
36. Renz, H., *Praktische Labordiagnostik: Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, klinischen Chemie und Hämatologie*. De Gruyter, 2018. 3., aktualisierte und erweiterte Auflage: p. 624.
37. George, J.N., *Platelets*. *The Lancet*, 2000. **355**(9214): p. 1531-1539.
38. Halwachs-Baumann, G., *Labormedizin: Klinik-Praxis-Fallbeispiele*. Springer Wien New York, 2006: p. 467.
39. Italiano, J.E., Jr., et al., *Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(6): p. 1299-312.
40. Piper, W., *Innere Medizin*. Springer, 2007: p. 1002.
41. Egger, G., *Die akute Entzündung: Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der Unspezifischen Immunität*. Springer Wien New York, 2005: p. 314.
42. King, S.M. and G.L. Reed, *Development of platelet secretory granules*. *Semin Cell Dev Biol*, 2002. **13**(4): p. 293-302.
43. Massberg, S., et al., *Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo*. *J Exp Med*, 2006. **203**(5): p. 1221-33.
44. Ueno, M., et al., *Role of platelets and antiplatelet therapy in cardiovascular disease*. *J Atheroscler Thromb*, 2011. **18**(6): p. 431-42.
45. Wei, A.H., et al., *New insights into the haemostatic function of platelets*. *Br J Haematol*, 2009. **147**(4): p. 415-30.
46. Yun, S.H., et al., *Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers*. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 9060143.

47. Watson, S.P., *Platelet activation by extracellular matrix proteins in haemostasis and thrombosis*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(12): p. 1358-72.
48. Jenkins, G., *The role of proteases in transforming growth factor-beta activation*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(6-7): p. 1068-78.
49. Lebrin, F., et al., *TGF-beta receptor function in the endothelium*. *Cardiovasc Res*, 2005. **65**(3): p. 599-608.
50. Assoian, R.K., et al., *Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(11): p. 7155-60.
51. Tirado-Rodriguez, B., et al., *TGF-beta: an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 318481.
52. Poniatowski, L.A., et al., *Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 137823.
53. Schultz-Cherry, S. and J.E. Murphy-Ullrich, *Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism*. *J Cell Biol*, 1993. **122**(4): p. 923-32.
54. Herpin, A., C. Lelong, and P. Favrel, *Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans*. *Dev Comp Immunol*, 2004. **28**(5): p. 461-85.
55. Blobel, G.A., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, *Role of transforming growth factor beta in human disease*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(18): p. 1350-8.
56. Wang, X.L., S.X. Liu, and D.E. Wilcken, *Circulating transforming growth factor beta 1 and coronary artery disease*. *Cardiovasc Res*, 1997. **34**(2): p. 404-10.
57. Kanzaki, T., et al., *In vivo effect of TGF-beta 1. Enhanced intimal thickening by administration of TGF-beta 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(11): p. 1951-7.
58. Fafeur, V., et al., *Basic FGF treatment of endothelial cells down-regulates the 85-KDa TGF beta receptor subtype and decreases the growth inhibitory response to TGF-beta 1*. *Growth Factors*, 1990. **3**(3): p. 237-45.
59. Ward, M.R., et al., *Vascular types I and II transforming growth factor-beta receptor expression: differential dependency on tyrosine kinases during induction by TGF-beta*. *FEBS Lett*, 1998. **422**(2): p. 197-200.
60. ten Dijke, P., K. Miyazono, and C.H. Heldin, *Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling*. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(2): p. 64-70.

61. Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke, *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 465-71.
62. Itoh, S., et al., *Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins*. Eur J Biochem, 2000. **267**(24): p. 6954-67.
63. Massague, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.
64. Massague, J. and Y.G. Chen, *Controlling TGF-beta signaling*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 627-44.
65. Bertolino, P., et al., *Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders*. Chest, 2005. **128**(6 Suppl): p. 585S-590S.
66. Messadi, D.V., et al., *Autocrine transforming growth factor-beta(1) activity and glycosaminoglycan synthesis by human cutaneous scar fibroblasts*. Wound Repair Regen, 1994. **2**(4): p. 284-91.
67. Grainger, D.J., et al., *Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin*. Nat Med, 1995. **1**(9): p. 932-7.
68. Battegay, E.J., et al., *TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop*. Cell, 1990. **63**(3): p. 515-24.
69. Petrov, V.V., R.H. Fagard, and P.J. Lijnen, *Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts*. Hypertension, 2002. **39**(2): p. 258-63.
70. Sigel, A.V., M. Centrella, and M. Eghbali-Webb, *Regulation of proliferative response of cardiac fibroblasts by transforming growth factor-beta 1*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(9): p. 1921-9.
71. Nabel, E.G., et al., *Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10759-63.
72. Wolf, Y.G., L.M. Rasmussen, and E. Ruoslahti, *Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model*. J Clin Invest, 1994. **93**(3): p. 1172-8.
73. Merrilees, M., et al., *Effect of TGF-beta(1) antisense S-oligonucleotide on synthesis and accumulation of matrix proteoglycans in balloon catheter-injured neointima of rabbit carotid arteries*. J Vasc Res, 2000. **37**(1): p. 50-60.
74. Yamamoto, K., et al., *Ribozyme oligonucleotides against transforming growth factor-beta inhibited neointimal formation after vascular injury in rat model: potential application of ribozyme strategy to treat cardiovascular disease*. Circulation, 2000. **102**(11): p. 1308-14.

75. Majesky, M.W., et al., *Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury*. J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 904-10.
76. Nikol, S., et al., *Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human vascular restenosis lesions*. J Clin Invest, 1992. **90**(4): p. 1582-92.
77. Lev, P.R., et al., *Platelets possess functional TGF-beta receptors and Smad2 protein*. Platelets, 2007. **18**(1): p. 35-42.
78. Hu, J.H., et al., *Postnatal Deletion of the Type II Transforming Growth Factor-beta Receptor in Smooth Muscle Cells Causes Severe Aortopathy in Mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(12): p. 2647-56.
79. Yang, P., et al., *Smooth muscle cell-specific Tgfbr1 deficiency promotes aortic aneurysm formation by stimulating multiple signaling events*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35444.
80. Li, W., et al., *Tgfbr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis*. J Clin Invest, 2014. **124**(2): p. 755-67.
81. Tiedt, R., et al., *Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo*. Blood, 2007. **109**(4): p. 1503-6.
82. Azhar, M., et al., *Generation of mice with a conditional allele for transforming growth factor beta 1 gene*. Genesis, 2009. **47**(6): p. 423-31.
83. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5166-70.
84. Peter K., T.I.S., *Cre/Lox breeding for dummies*. The Jackson Laboratory, Blog Post, 2011.
85. Drost, C.J., *Vessel diameter-independent volume flow measurements using ultrasound*. Proceedings of San Diego Biomedical Symposium, San Diego Biomedical Society, 1978. **Vol. 17**: p. 299-302.
86. Liu, Y., et al., *Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice*. World J Exp Med, 2012. **2**(2): p. 30-6.
87. Cazenave, J.P., et al., *[Platelet aggregation: a tool for clinical investigation and pharmacological study. Methodology]*. Ann Biol Clin (Paris), 1983. **41**(3): p. 167-79.
88. Mustard, J.F., et al., *Preparation of suspensions of washed platelets from humans*. Br J Haematol, 1972. **22**(2): p. 193-204.
89. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-84.
90. Sanders, M., *Molecular and cellular concepts in atherosclerosis*. Pharmacol Ther, 1994. **61**(1-2): p. 109-53.

91. Amsterdam, E.A., et al., *2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2014. **64**(24): p. e139-e228.
92. Soslau, G., et al., *Cytokine mRNA expression in human platelets and a megakaryocytic cell line and cytokine modulation of platelet function*. Cytokine, 1997. **9**(6): p. 405-11.
93. Hoying, J.B., et al., *Transforming growth factor beta1 enhances platelet aggregation through a non-transcriptional effect on the fibrinogen receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 31008-13.
94. Meyer, A., et al., *Platelet TGF-beta1 contributions to plasma TGF-beta1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload*. Blood, 2012. **119**(4): p. 1064-74.
95. Ishibashi, T., S.L. Miller, and S.A. Burstein, *Type beta transforming growth factor is a potent inhibitor of murine megakaryocytopoiesis in vitro*. Blood, 1987. **69**(6): p. 1737-41.
96. Kawasaki, T., et al., *Mouse carotid artery ligation induces platelet-leukocyte-dependent luminal fibrin, required for neointima development*. Circ Res, 2001. **88**(2): p. 159-66.
97. Golino, P., et al., *Inhibition of leucocyte and platelet adhesion reduces neointimal hyperplasia after arterial injury*. Thromb Haemost, 1997. **77**(4): p. 783-8.
98. Evans, D.J., et al., *Platelet P2Y(12) receptor influences the vessel wall response to arterial injury and thrombosis*. Circulation, 2009. **119**(1): p. 116-22.
99. Hechler, B. and C. Gachet, *P2 receptors and platelet function*. Purinergic Signal, 2011. **7**(3): p. 293-303.
100. Patil, S.B., et al., *Ticagrelor effectively and reversibly blocks murine platelet P2Y12-mediated thrombosis and demonstrates a requirement for sustained P2Y12 inhibition to prevent subsequent neointima*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(12): p. 2385-91.
101. Rath, D., et al., *Evidence of an interaction between TGF-beta1 and the SDF-1/CXCR4/CXCR7 axis in human platelets*. Thromb Res, 2016. **144**: p. 79-84.
102. Smith, J.D., et al., *Soluble transforming growth factor-beta type II receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth*. Circ Res, 1999. **84**(10): p. 1212-22.
103. Lijnen, H.R., et al., *Temporal and topographic matrix metalloproteinase expression after vascular injury in mice*. Thromb Haemost, 1999. **81**(5): p. 799-807.
104. Rath, D., et al., *Platelet expression of transforming growth factor beta 1 is enhanced and associated with cardiovascular prognosis in patients with acute coronary syndrome*. Atherosclerosis, 2014. **237**(2): p. 754-9.



105. Osadnik, T., et al., *The Relationships between Polymorphisms in Genes Encoding the Growth Factors TGF-beta1, PDGFB, EGF, bFGF and VEGF-A and the Restenosis Process in Patients with Stable Coronary Artery Disease Treated with Bare Metal Stent*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150500.
106. Feinberg, M.W., et al., *Transforming growth factor-beta1 inhibition of vascular smooth muscle cell activation is mediated via Smad3*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 16388-93.
107. Grainger, D.J., et al., *Transforming growth factor-beta dynamically regulates vascular smooth muscle differentiation in vivo*. J Cell Sci, 1998. **111 ( Pt 19)**: p. 2977-88.
108. Inamoto, S., et al., *TGFBR2 mutations alter smooth muscle cell phenotype and predispose to thoracic aortic aneurysms and dissections*. Cardiovasc Res, 2010. **88**(3): p. 520-9.
109. Ryan, S.T., et al., *Transforming growth factor-beta-dependent events in vascular remodeling following arterial injury*. J Vasc Res, 2003. **40**(1): p. 37-46.
110. Kulkarni, A.B., et al., *Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 770-4.
111. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease*. Nature, 1992. **359**(6397): p. 693-9.
112. Tsunawaki, S., et al., *Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta*. Nature, 1988. **334**(6179): p. 260-2.
113. Haudenschild, C.C. and S.M. Schwartz, *Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity*. Lab Invest, 1979. **41**(5): p. 407-18.
114. van den Brand, M.J., et al., *The effect of completeness of revascularization on event-free survival at one year in the ARTS trial*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(4): p. 559-64.
115. Takehara, K., E.C. LeRoy, and G.R. Grotendorst, *TGF-beta inhibition of endothelial cell proliferation: alteration of EGF binding and EGF-induced growth-regulatory (competence) gene expression*. Cell, 1987. **49**(3): p. 415-22.
116. Goumans, M.J., et al., *Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors*. Embo j, 2002. **21**(7): p. 1743-53.
117. Castanares, C., et al., *Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 7): p. 1256-66.
118. Oh, S.P., et al., *Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2626-31.

# ERKLÄRUNG

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Eva Schütz, geboren am 29.10.1987, ehrenwörtlich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

*„Die Rolle von TGF $\beta$ 1 in Thrombozyten im Rahmen der arteriellen Thrombose und Neointimabildung nach experimenteller Gefäßwandverletzung.“*

selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine anderen als in der Literatur angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe sowie die Stellen der Arbeit, die in anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind unter Angabe der Quelle als solche gekennzeichnet habe.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben kann.

Mainz, August 2019

---

Eva Schütz

## LEBENS LAUF

**Eva Schütz**, Master of Science (Biomedizin)

### Persönliche Daten

---

Geburtsdatum	29.10.1987
Geburtsort	St. Wendel
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Beruflicher Werdegang

---

07/2018 – heute	<b>GLP-Quality Assurance Manager</b> bei Pharmacelsus GmbH in Saarbrücken (Teil der GBA Pharma Group)
-----------------	---

### Promotion

---

02/2014 – 06/2020	<b>Promotion am Zentrum für Kardiologie</b> , Kardiologie I, Universitätsmedizin Mainz der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Anstellung als Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Doktorandin  Arbeitsgruppe „Translationale Vaskuläre Biologie“ - Prof. Dr. med. xxx  Titel der Doktorarbeit: <i>„Die Rolle von TGFβ1 in Thrombozyten im Rahmen der arteriellen Thrombose und Neointimabildung nach experimenteller Gefäßwandverletzung.“</i>
-------------------	---

### Hochschulstudium

---

10/2011 – 12/2013	<b>Master-Studium der Biomedizin</b> , Johannes Gutenberg-Universität Mainz  Abschluss: Master of Science (Note 1,1)  Masterarbeit am Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz, Arbeitsgruppe „Zell- und Redox-Signalwege“ – Herr Dr. rer. nat. habil. xxx, Titel: <i>„Die Rolle der PON-2 in der Aktivierung von Stress-Signalwegen durch den bakteriellen Virulenzfaktor 3OC12.“</i>
10/2007 – 01/2011	<b>Bachelor-Studium der Applied Life Sciences</b> , FH Kaiserslautern, Standort Zweibrücken  Abschluss: Bachelor of Science (Note 1,6)

Bachelorarbeit am Pathologischen Institut, Ludwigs-Maximilians-Universität München, Arbeitsgruppe „Tumormorphogenese“ – Herr Prof. Dr. xxx, Titel: „*Suche nach Polymorphismen in der codierenden Region des EGFR-Gens, die mit skin-rash korrelieren.*“

### Schulbildung

---

- 08/2004 – 06/2007      **Gesamtschule Marpingen**  
Abschluss. Allgemeine Hochschulreife
- 08/1998 – 07/2004      **Erweiterte Realschule Theley**  
Abschluss: Mittlere Reife

### Kongressteilnahmen

---

- 08/2016      **ESC-Kongress 2016 der European Society of Cardiology in Rom**  
Posterpräsentation mit dem Thema “*Absence of transforming growth factor beta 1 in murine platelets reduces neointima formation without affecting thrombosis*”  
(Kategorie: Best posters in vascular remodeling)
- 04/2016      **82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz-und Kreislaufforschung e.V. in Mannheim**  
Freier Vortrag mit dem Thema “*Absence of transforming growth factor beta 1 in murine platelets reduces neointima formation without affecting thrombosis,*”  
Freier Vortrag mit dem Thema „*Impact of age on the paracrine cardiovascular activities of perivascular adipose tissue*”

### Publikationen

---

Eva Schütz, Rajinikanth Gogiraju, Maria Pavlaki, Ioannis Drosos, George S. Georgiadis, Christos Argyriou, Amina Rim Ben Hallou, Fotios Konstantinou, Dimitrios Mikroulis, Rebecca Schüler, Magdalena L. Bochenek, Sogol Gachkar, Katja Buschmann, Mareike Lankeit, Susanne H. Karbach, Thomas Münzel, Dimitrios Tziakas, Stavros Konstantinides and Katrin Schäfer, **Age-Dependent and -Independent Effects of Perivascular Adipose Tissue and Its Paracrine Activities during Neointima Formation**, *Int.J.Mol.Sci.* 2020,21,282; doi: 10.3390/ijms21010282

Schütz E, Bochenek ML, Riehl DR, Bosmann M, Münzel T, Konstantinides S, Schäfer K, **Absence of transforming growth factor beta 1 in murine platelets reduces neointima formation without affecting arterial thrombosis**, *Thrombosis and Haemostasis*; 2017 Aug 31;117(9):1782-1797. doi: 10.1160/TH17-02-0112

Hubert A, Bochenek ML, Schütz E, Gogiraju R, Münzel T, Schäfer K, **Selective Deletion of Leptin Signaling in Endothelial Cells Enhances Neointima Formation and Phenocopies the Vascular Effects of Diet-Induced Obesity in Mice**, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2017 Sep;37(9):1683-1697. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309798. Epub 2017 Jul 13

Bochenek ML, Rosinus NS, Lankeit M, Hobohm L, Bremmer F, Schütz E, Klok FA, Horke S, Wiedenroth CB, Münzel T, Lang IM, Mayer E, Konstantinides S, Schäfer K, **From thrombosis to fibrosis in chronic thromboembolic pulmonary hypertension**, *Thrombosis and Haemostasis*, 2017; 117(4):769-783

Bochenek ML, Schütz E, Schäfer K, **Endothelial cell senescence and thrombosis: Ageing clots**, *Thrombosis Research*, 2016; Vol 147 (36-45) Review

Horke S, Xiao J, Schütz EM, Kramer GL, Wilgenbus P, Witte I, Selbach M, Teiber JF, **Novel Paraoxonase 2-dependent mechanism mediating the biological effects of the Pseudomonas aeruginosa quorum sensing molecule N-(3-oxo dodecanoyl)-L-homoserine lactone**, *Infection and Immunity*, 2015; 18(9)

---

Mainz, August 2019

# DANKSAGUNG

xxx