

Aus dem Zentrum für Kardiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Bedeutung des Transforming Growth Factor- $\beta$   
für vaskuläre Umbauprozesse nach venöser Thrombose –  
Untersuchungen im Mausmodell**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Christiane Franziska Leidinger  
aus Düsseldorf

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

08. Dezember 2020

*Meinen Eltern*

Publiziert in *Circulation Research*

Bochenek ML, Leidinger C, Rosinus N, Gogiraju R, Guth S, Hobohm L, Jurk K, Mayer E, Münzel T, Lankeit M, Bosmann M, Konstantinides S, Schäfer K.

**Activated Endothelial TGF $\beta$ 1 Signaling Promotes Venous Thrombus Non-Resolution in Mice Via Endothelin-1: Potential Role for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.** *Circ Res.* 2020 Jan 17;126(2):162-181. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315259. Epub 2019 Nov 21.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturdiskussion</b>	<b>3</b>
2.1	Der Lungenkreislauf	4
2.2	Pulmonale Hypertonie	5
2.2.1	Definition	5
2.2.2	Klassifikation nach Pathophysiologie	5
2.3	Histologie arterieller und venöser Gefäße	6
2.3.1	Arterielle Gefäße	7
2.3.2	Venöse Gefäße	7
2.4	Blutgerinnung und Entstehung von venösen Thrombosen	8
2.4.1	Blutgerinnung	8
2.4.2	Fibrinolyse	10
2.4.3	Definition und Pathophysiologie der Thrombose	10
2.5	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie	12
2.5.1	Makroskopische Pathologie	14
2.5.2	Histopathologie	15
2.5.3	Epidemiologie der CTEPH	18
2.6	Tiermodelle	18
2.6.1	Großtiermodelle	18
2.6.2	Kleintiermodelle	19
2.7	Die <i>Transforming-Growth-Factor-<math>\beta</math></i> -Superfamilie	20
2.7.1	Expression und Funktion von TGF $\beta$	20
2.7.2	Die Rolle von TGF $\beta$ bei pulmonaler Hypertonie	22
2.8	<i>Endothelial-to-Mesenchymal</i> -Transition	23
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>25</b>
3.1	Geräte	25
3.2	Software	27
3.3	Chemikalien und Reagenzien	28
3.4	Immunhistochemie-Kits	29
3.5	Enzyme	30

3.6	Marker und Farbstoffe .....	30
3.7	PCR-Reagenzien .....	30
3.8	Antikörper .....	32
3.9	Versuchstiere, Versuchstierhaltung und Futtermittel .....	33
3.10	Anästhesie.....	34
<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>35</b>
4.1	Versuchstiere .....	35
4.1.1	Tierschutzantrag und Genehmigung .....	35
4.1.2	Versuchstiere und Versuchstierhaltung .....	35
4.1.3	Generierung genmodifizierter Mauslinien.....	36
4.1.4	Genotypisierung .....	41
4.2	Ligatur der Vena cava inferior .....	45
4.2.1	Anästhesie und Vorbereitung .....	45
4.2.2	Durchführung .....	46
4.3	Ultraschalluntersuchung.....	47
4.3.1	Anästhesie und Vorbereitung .....	47
4.3.2	Durchführung .....	48
4.4	Gewebeentnahme und -aufbereitung .....	48
4.5	Histologische Färbungen.....	50
4.5.1	Carstairs.....	51
4.5.2	Pikro-Siriusrot.....	52
4.6	Immunhistochemie .....	53
4.7	Immunfluoreszenz .....	58
4.8	Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen .....	60
4.8.1	Größenbestimmung der Thromben und Fibrose .....	60
4.8.2	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	61
4.9	Statistische Auswertung .....	61
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>63</b>
5.1	Nachweis der plättchenspezifischen Deletion von TGF $\beta$ 1 .....	63
5.2	Nachweis der endothelspezifischen Deletion von TGF $\beta$ RII.....	64
5.3	VCI-Ligatur und postoperative Ultraschalluntersuchung.....	65
5.4	Histologische und immunhistochemische Untersuchung der venösen Thromben.. .....	67

<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>79</b>
6.1	Das VCI-Mausmodell .....	80
6.2	Folgen veränderter TGFβ1-Expression und Aktivität für die Entstehung und den Abbau venöser Thrombosen.....	80
6.3	Die Rolle aktivierter Plättchen bei der Entstehung venöser Thromben .....	81
6.4	Regulatoren der Revaskularisation venöser Thromben .....	82
6.5	Die Rolle von TGFβ während der Entwicklung des Organismus .....	83
6.6	Unterschiedliche Funktionen einzelner Mitglieder der TGFβ-Superfamilie in Bezug auf Angiogenese .....	84
6.7	Das Vorkommen von EndMT im Rahmen der CTEPH.....	85
6.8	Der Einfluss von Endothelin auf die TGFβ-Signaltransduktion und die Entstehung von EndMT .....	85
6.9	Fazit und Limitationen der Arbeit.....	87
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>103</b>
9.1	Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen .....	103
9.2	Weitere Ergebnisse .....	106
	<b>Danksagung</b> .....	<b>109</b>
	<b>Curriculum Vitae</b> .....	<b>110</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>avidin-biotin-complex</i> , Avidin-Biotin-Komplex
AEC	Amino-Ethylcarbazol
ANG2	Angiopoietin-2
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMPRII	<i>bone morphogenetic protein receptor 2</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
End.	Endothel, endothelial
EndMT	<i>Endothelial-to-mesenchymal-Transition</i>
ER <sup>T2</sup>	<i>estrogen receptor t2</i> , Östrogenrezeptor T2
ET-1	Endothelin 1
FGFR1	<i>fibroblast growth factor</i> -Rezeptor 1, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1
FSP-1	<i>fibroblast specific protein 1</i> , Fibroblasten-spezifisches Protein 1
GDF	<i>growth and differentiation factor</i> , Wachstums- und Differenzierungsfaktor
HPAEC	<i>human pulmonary artery endothelial cells</i> , humane pulmonal-arterielle Endothelzellen
HPV	<i>hypoxic pulmonary vasoconstriction</i> , hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LAE	Lungenarterienembolie
min	Minuten

miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i> , mikro-Ribonukleinsäure
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mPAP	<i>mean pulmonary arterial pressure</i> , mittlerer pulmonal-arterieller Druck
mPEC	<i>murine pulmonary endothelial cells</i> , murine pulmonale Endothelzellen
NaCl	Natriumchlorid
NGS	<i>normal goat serum</i> , normales Ziegen Serum
NMH	niedermolekulares Heparin
ns	nicht signifikant
NT-proBNP	<i>n-terminal prohormone of brain natriuretic peptide</i>
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEA	pulmonale Endarteriektomie
Pf4	Plättchenfaktor 4
PFA	Paraformaldehyd
PH	pulmonale Hypertonie
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PVR	<i>pulmonary vascular resistance</i> , pulmonal-vaskulärer Widerstand
SERM	<i>selective estrogen receptor modulator</i> , selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
SMA	<i>α smooth muscle actin</i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i> , glatte Muskelzelle
TAE	Tris-Acetat EDTA
TARC	<i>Translational Animal Research Center</i> , zentrale Versuchstiereinrichtung
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i> , transformierender Wachstumsfaktor β
TGFβRI/ II	<i>transforming growth factor β receptor I/ II</i> , transformierender Wachstumsfaktor Rezeptor I/II

TVT	tiefe Beinvenenthrombose
VCI	Vena cava inferior
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer Wachstumsfaktor
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> , vaskulärer Wachstumsfaktor Rezeptor 2
VKA	Vitamin-K-Antagonist
VTE	venöse Thrombembolie
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der arteriellen Gefäßwand.....	8
Abbildung 2: Grundlegendes Schema der Blutgerinnung. ....	10
Abbildung 3: Therapiealgorithmus der CTEPH.....	14
Abbildung 4: Die TGF $\beta$ -Signalkaskade. ....	22
Abbildung 5: Mausezucht. ....	38
Abbildung 6: Allgemeines Schema zum induzierbaren Knockout.....	40
Abbildung 7: Ablauf der VCI-Ligatur. ....	47
Abbildung 8: Schnittführung zur Anfertigung der Gewebeschnitte. ....	50
Abbildung 9: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.....	61
Abbildung 10: Ergebnisse der Genotypisierung der transgenen Mauslinien. ....	64
Abbildung 11: Postoperative Ultraschalluntersuchung der Plt.TGF $\beta$ -Versuchstiere..	66
Abbildung 12: Postoperative Ultraschalluntersuchungen der End.TGF $\beta$ RII- Versuchstiere. ....	67
Abbildung 13: Thrombusorganisation Plt.TGF $\beta$ 1-Kollektiv. ....	68
Abbildung 14: Thrombusorganisation End.TGF $\beta$ RII-Kollektiv. ....	69
Abbildung 15: Folgen der endothelspezifischen Deletion des TGF $\beta$ RII. ....	71
Abbildung 16: EndMT nach endothelspezifischer Deletion des TGF $\beta$ RII. ....	73
Abbildung 17: Vaskularisation muriner Thromben nach endothelspezifischer Deletion des TGF $\beta$ RII.....	74
Abbildung 18: Analyse der zellulären Zusammensetzung der venösen Thromben. ...	76
Abbildung 19: Expression von Gerinnungsfaktoren.....	78
Abbildung 20: Schematische Übersicht der Signaltransduktion .....	91
Abbildung 21: Expression von Mitgliedern der TGF $\beta$ 1-Signalkaskade nach endothelspezifischer Deletion des TGF $\beta$ RII. ....	106
Abbildung 22: Ergebnis der Durchflusszytometrie.....	107
Abbildung 23: ET-1-Signal nach endothelspezifischem Knockout des TGF $\beta$ RII. ....	107
Abbildung 24: Anzeichen für DNA-Synthese nach endothelialem Knockout des TGF $\beta$ RII. ....	108

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verkürzte Übersicht über die klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie .....	6
Tabelle 2: PEA-Klassifikation nach Jamieson .....	15
Tabelle 3: Histologie des endarteriektomierten Gewebes in Bezug auf die chirurgische Einteilung .....	17
Tabelle 4: Menge an Lyse-Reagenz zur DNA-Isolation.....	41
Tabelle 5: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR .....	42
Tabelle 6: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR .....	42
Tabelle 7: Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR .....	43
Tabelle 8: Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR .....	43
Tabelle 9: Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR .....	44
Tabelle 10: Protokoll Gewebeeinfiltrationsautomat .....	49
Tabelle 11: Standardprotokoll Vorbereitung histologischer Färbungen. ....	51
Tabelle 12: Standardprotokoll Nachbereitung histologischer Färbungen. ....	51
Tabelle 13: Färbeprotokoll Carstairs. ....	52
Tabelle 14: Färbeprotokoll Pikro-Siriusrot. ....	52
Tabelle 15: Standardprotokoll Vorbereitung immunhistochemische Färbung. ....	54
Tabelle 16: Übersicht Primärantikörper und korrespondierende Sekundärantikörper .....	56
Tabelle 17: Färbeprotokoll der ABC-Methode mit AEC-Chromogen. ....	57
Tabelle 18: Färbeprotokoll der ABC-Methode mit DAB-Chromogen. ....	58
Tabelle 19: Standardprotokoll Immunfluoreszenz. ....	59

# 1 Einleitung

Die chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) stellt eine schwere Form des Lungenhochdrucks dar, die ohne adäquate Therapie mit einer hohen Mortalität einhergeht (1). Die Weltgesundheitsorganisation (engl: *World Health Organization*; WHO) unterteilt die pulmonale Hypertonie (PH) in fünf Gruppen, wobei die CTEPH der Gruppe vier zugeordnet wird (2). Mit einer geschätzten Inzidenz von drei bis fünf Neuerkrankungen pro Jahr pro 100.000 Einwohner zählt sie zu den seltenen Erkrankungen (3). Als einzige Form der PH ist sie durch einen operativen Eingriff potentiell heilbar. Neben der pulmonalen Endarteriektomie (PEA) steht Betroffenen, die sich als nicht operabel erweisen, eine medikamentöse Therapie zur Verfügung, die den Krankheitsprogress jedoch lediglich verlangsamt und die Symptome abmildert (4). Die pathophysiologischen Grundlagen der CTEPH sind noch weitgehend unverstanden. Es wird angenommen, dass eine CTEPH als Folge einer fehlerhaften Reaktion der pulmonalen Gefäße auf eine Lungenarterienembolie (LAE) oder Thrombose entstehen kann. Studien zeigen, dass PatientInnen mit einer LAE in 0,9 bis 9,1 % der Fälle nachfolgend eine CTEPH entwickeln (5-12). Faktoren, die das Thromboserisiko erhöhen, wie z. B. ein erhöhter Faktor-VIII-Spiegel, oder das Tragen von Antiphospholipid-Antikörpern/Lupus-Antikoagulans, sind ebenfalls mit der Entwicklung einer CTEPH assoziiert. Klinische Daten unterstützen hingegen nur zum Teil die Auffassung, dass es sich bei der CTEPH um eine thromboembolische Folgeerkrankung handelt, da weitere Risikofaktoren für die Entstehung einer Thrombose, wie z. B. die Faktor-V-Leiden-Mutation oder ein Protein-C/S-Mangel, bei CTEPH-PatientInnen nicht häufiger gefunden werden konnte als bei Gesunden (13).

Die *Transforming-growth-factor- $\beta$* -Superfamilie (TGF $\beta$ ) setzt sich aus einer Reihe multifaktorieller Wachstumsfaktoren zusammen. Im Rahmen der Embryogenese aber auch im reifen Organismus ist TGF $\beta$  an der Regulation vielfältiger physiologischer Prozesse beteiligt (14) und wurde in Zusammenhang mit der Entstehung diverser Krankheiten gebracht. So ist bekannt, dass eine Mutation innerhalb der TGF $\beta$ -Superfamilie zur Entstehung der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) führt (15). Ob TGF $\beta$  jedoch auch bei der Pathogenese der CTEPH eine Rolle spielt, wurde bisher noch nicht direkt untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen von TGF $\beta$  für die vaskulären Umbauprozesse nach venöser Thrombose im Mausmodell zu untersuchen und möglichen ursächliche Faktoren in der Pathogenese der CTEPH besser zu verstehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden genetisch modifizierte Mäuse einer Ligatur der unteren Hohlvene (*Vena cava inferior*; VCI) unterzogen, um an dieser Stelle eine Blutflussverlangsamung und die Entstehung eines venösen Thrombus zu provozieren. Zwei Mauslinien wurden in diese Arbeit eingeschlossen. Das erste Versuchskollektiv setzte sich aus Mäusen mit thrombozytenspezifischer Deletion von TGF $\beta$ 1 und einer Kontrollgruppe zusammen, während bei der zweiten Mauslinie eine endothelspezifische Deletion des TGF $\beta$  Rezeptor-Typ 2 (TGF $\beta$ RII) induziert wurde. Im Anschluss an die Operation wurde die Bildung und Organisation der venösen Thromben mittels Ultraschall dokumentiert und nach drei Wochen das thrombotische Material entnommen und für histopathologische Analysen aufbereitet. In der Arbeitsgruppe von [REDACTED] [REDACTED] an der Universitätsmedizin Mainz konnte eine Biobank mit CTEPH-PEA Gewebe etabliert werden, so dass weiterführend an die vorliegenden Arbeit Vergleiche zwischen murinen und humanen Gewebeproben aufgestellt werden konnten.

## 2 Literaturdiskussion

Um den thematischen Hintergrund dieser Arbeit zu erläutern, wird zunächst der physiologische Lungenkreislauf beschrieben und anschließend die PH als Krankheit vorgestellt. Zum besseren Verständnis wird die Histologie von Blutgefäßen erklärt und die venöse Thrombose definiert und epidemiologisch bewertet. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt bei endothelialen Strukturveränderungen im Rahmen einer Sonderform der PH, der CTEPH, sodass diese Erkrankung hinsichtlich möglicher Risikofaktoren, zugrundeliegender Pathophysiologie und therapeutischer Ansätze näher erläutert wird. Tiermodelle der venösen Thrombose und CTEPH werden gesondert besprochen. Einen speziellen Aspekt endothelialer Strukturveränderungen stellt ein Prozess dar, der als *Endothelial-to Mesenchymal-Transition* (EndMT) bezeichnet wird und dessen Mechanismus zum besseren Verständnis ebenfalls erläutert werden soll. Abschließend befasst sich dieses Kapitel der Arbeit mit der TGF $\beta$ -Superfamilie und ihren vielfältigen Wirkmechanismen im menschlichen Organismus allgemein sowie im speziellen Kontext mit ihrer möglichen Rolle bei der Entstehung einer PH.

## 2.1 Der Lungenkreislauf

Der Lungenkreislauf, auch kleiner Kreislauf genannt, ist für die Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff zuständig. Das sauerstoffarme Blut aus dem Körperkreislauf wird über die großen Hohlvenen (*Vena cava superior* und *inferior*) durch den rechten Vorhof in die rechte Herzkammer und von dort über den *Truncus pulmonalis* und die Lungenarterien (*Arteriae pulmonales*) in die rechte und linke Lunge geführt. In den Lungenbläschen (*Alveolen*), der kleinsten Funktionseinheit der Lunge, findet schließlich der Gasaustausch statt, und das oxygenierte, mit Sauerstoff angereicherte Blut wird über die Lungenvenen (*Venae pulmonales*) zurück zum linken Herzen geführt und gelangt über den linken Vorhof in die linke Herzkammer und schließlich über die aufsteigende Aorta (*Aorta ascendens*) zurück in den Körperkreislauf (16).

Der kleine Kreislauf wird als Niederdrucksystem bezeichnet. Während im großen (Körper-) Kreislauf der Blutdruck im physiologischen Zustand 130 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) in der Systole und ca. 80 mmHg in der Diastole beträgt, liegt der Mitteldruck in der Arteria pulmonalis (engl.: *mean pulmonary arterial pressure*; mPAP) in Ruhe bei 14 mmHg (systolisch ca. 21 mmHg und diastolisch ca. 9 mmHg). Der pulmonal-vaskuläre Widerstand (engl.: *pulmonary vascular resistance*; PVR) des Lungenkreislaufes schwankt physiologischer Weise zwischen 40 und 100  $\text{dyn} \times \text{sec} \times \text{cm}^{-5}$  (17).

Um das Blut und damit den gesamten Organismus ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen, ist ein konstantes Verhältnis zwischen Perfusion und Ventilation der Lungenabschnitte von enormer Wichtigkeit. Wird ein Abschnitt der Lunge durchblutet, aber nicht belüftet, kommt es zum Abfall des Sauerstoffgehalts im Blut. Stellschrauben für das Aufrechterhalten des Perfusions-Ventilations-Verhältnisses sind der pulmonale Perfusionsdruck (engl.: *pulmonary ventilation pressure*; PVP) und der lokale Sauerstoffpartialdruck ( $\text{pO}_2$ ). Damit bleibt der Erhalt der Lungendurchblutung nahezu unabhängig von neuronalen oder humoralen Faktoren gesichert (18). Besondere Bedeutung kommt dabei dem sogenannten Euler-Liljestrand-Mechanismus zu. Im Jahre 1946 beschrieben Euler und Liljestrand das Konzept der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (engl.: *hypoxic pulmonary vasoconstriction*; HPV): In minderbelüfteten und in der Folge sauerstoffarmen (hypoxischen) Lungenarealen kommt es zu einer

Verengung (*Konstriktion*) der pulmonalen Gefäße, die eine Erhöhung des PVP mit sich bringt und in einer Abnahme der Lungenperfusion in diesen Gebieten resultiert. Somit werden vorrangig sauerstoffreiche Lungenabschnitte durchblutet, und ein konstantes Perfusions-Ventilations-Verhältnis bleibt in der gesunden Lunge bestehen (19).

## **2.2 Pulmonale Hypertonie**

Kommt es zu einer Erhöhung des arteriellen Drucks im Lungenkreislauf, spricht man von einer PH. Hierfür können sowohl intra- als auch extrapulmonale Veränderungen ursächlich sein. Klinisch präsentieren sich PatientInnen, die an einer PH leiden, mit verschiedenen und oft unspezifischen Symptomen. Dazu können Atemnot (*Dyspnoe*), Müdigkeit, Schwindel, kurzzeitige Ohnmacht (*Synkopen*) und Brustschmerzen (*Angina pectoris*) zählen. Ebenso können sich periphere Ödeme, eine obere Einflusstauung oder eine Stauungsleber als Hinweis auf eine Rechtsherzinsuffizienz zeigen. Dazu zählt auch ein erhöhtes NT-proBNP (engl.: *N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide*), welches bei Dehnung des rechten Vorhofs vermehrt ins Blut ausgeschüttet wird (18). Führende Todesursache im Rahmen einer PH ist das akute Rechtsherzversagen (2).

### **2.2.1 Definition**

Beträgt der im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung ermittelte mPAP  $\geq 25$  mmHg in Ruhe, spricht man von einer PH (2). Einen diagnostischen Grenzbereich stellen Werte zwischen 21 und 24 mmHg dar, bei denen das Vorliegen einer PH nicht sicher ausgeschlossen werden kann (20).

### **2.2.2 Klassifikation nach Pathophysiologie**

Das Krankheitsbild der PH wird heute in fünf Gruppen unterteilt. Wegweisend für die Einteilung der Gruppen sind dabei die zugrundeliegende Pathologie, die vorliegende Hämodynamik und das klinische Management der Erkrankung. Die aktuelle Einteilung erfolgt gemäß der Nizza-Klassifikation, die 2013 beim Weltsymposium zur pulmonalen

Hypertonie in Nizza, Frankreich, verabschiedet wurde (21). Gruppe eins bilden die pulmonal-arteriellen Hypertonien (PAH) und deren Subgruppen. Gruppe zwei beinhaltet die PH aufgrund von Linksherzerkrankungen. Die PH bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie werden der Gruppe drei zugeordnet. Die in dieser Dissertation ausführlicher behandelte Form der PH, die CTEPH, findet man in Gruppe vier. In Gruppe fünf werden seltene PH-Formen multifaktorieller Genese zusammengefasst (s. Tabelle 1).

<b>KLINISCHE KLASSIFIKATION DER PH</b>
<b>1. pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)</b> 1.1 idiopathische PAH 1.2 hereditäre PAH 1.3 Toxin-induzierte PAH 1.4 PAH assoziiert mit anderen Grunderkrankungen
<b>2. PH bei Linksherzerkrankungen</b> 2.1 systolische Dysfunktion 2.2 diastolische Dysfunktion 2.3 Herzklappenerkrankungen 2.4 kongenitale Herzerkrankungen
<b>3. PH bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie</b> 3.1 chronisch obstruktive Lungenerkrankung 3.2 interstitielle Lungenerkrankung 3.3 schlafbezogene Atemstörung 3.4 alveoläres Hypoventilationssyndrom 3.5 chronische Höhenexposition 3.6 Entwicklungsstörungen
<b>4. chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)</b>
<b>5. PH mit unklarem multifaktoriellem Mechanismus</b>

**Tabelle 1: Verkürzte Übersicht über die klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie.** Nach Simonneau et al. (21), modifiziert nach Galie et al. (2).

### 2.3 Histologie arterieller und venöser Gefäße

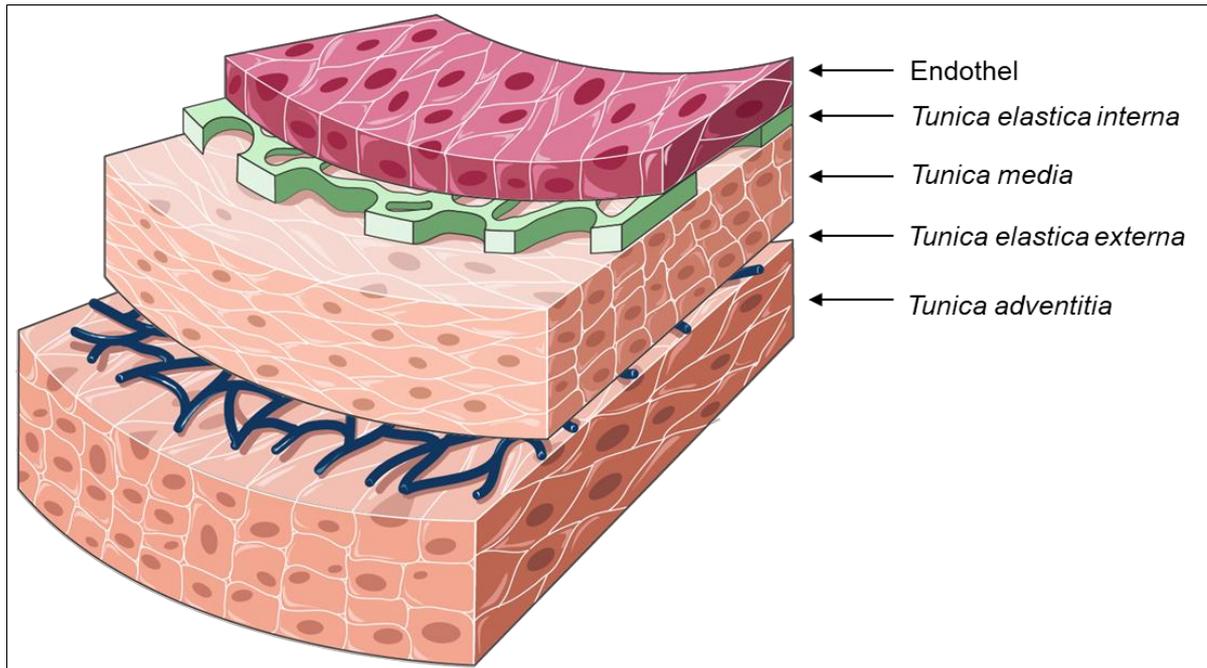
Um ein besseres Verständnis über den Aufbau und die Funktion des Gefäßsystems insgesamt zu erlauben und um gefäßspezifische Pathologien im Rahmen der CTEPH besser nachvollziehen zu können, soll an dieser Stelle ein Überblick über die Histologie der Arterien und Venen gegeben werden.

### 2.3.1 Arterielle Gefäße

Die Gefäßwand von Arterien besteht aus drei Schichten (s. Abbildung 1). Die innerste Schicht bildet die Intima (*Tunica intima*), die aus dem Endothel und einer subendothelialen Schicht gebildet wird. Sie trennt das Gefäßlumen und somit die Blutstrombahn durch einen lückenlosen Zellverband von tiefer liegenden Wandschichten. Die *Membrana elastica interna*, eine zweidimensionale Schicht, bestehend aus elastischen Fasern, trennt die Intima von der Media (*Tunica media*). Die Media bildet die mittlere und zugleich kräftigste Schicht der arteriellen Gefäßwand. Sie besteht aus glatten Muskelzellen und Extrazellulärmatrix. Die Extrazellulärmatrix beinhaltet elastische und kollagene Fasern. Die Media reguliert in Abhängigkeit von Faktoren aus dem Endothel die Gefäßweite. Außen an die Media angrenzend liegt die *Membrana elastica externa*, an die sich schließlich die Adventitia (*Tunica adventitia*) anlagert. Die Adventitia verankert als Bindegewebsschicht das Gefäß in der Umgebung. Zudem gewährleistet sie die Versorgung des Gefäßes, da sie Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven beinhaltet (22).

### 2.3.2 Venöse Gefäße

Im Vergleich zu Arterien zeigen Venen eine weniger deutliche Schichtengliederung und sind im Erscheinungsbild grundsätzlich variabler als Arterien. Die Intima ist ähnlich aufgebaut wie in arteriellen Gefäßen. Zusätzlich weisen jedoch manche Venen, besonders die der Extremitäten, Intimaduplikaturen in Form von Venenklappen auf. Die Venenklappen gewährleisten den Blutfluss zum Herzen und verhindern bei einer Strömungsumkehr einen Blutrückfluss in die Peripherie. Eine *Tunica elastica interna* ist in venösen Gefäßen nicht immer ausgebildet. Die Media zeigt je nach Lokalisation der Vene große regionale Unterschiede hinsichtlich ihrer Dicke auf. So ist sie in Halsgefäßen eher muskelschwach, im Rumpf kaliberstärker und in den Venen der Extremitäten am kräftigsten ausgebildet. Auch die Adventitia ist topografisch betrachtet unterschiedlich stark ausgeprägt. In den großen Venen des Bauchraums, der VCI und der *Vena portae* (Pfortader) bildet die Adventitia die dickste Schicht der Gefäßwand (22).



**Abbildung 1: Aufbau der arteriellen Gefäßwand.** Die Abbildung wurde mit Hilfe der *Powerpoint image bank* von Servier Medical Art erstellt und modifiziert.

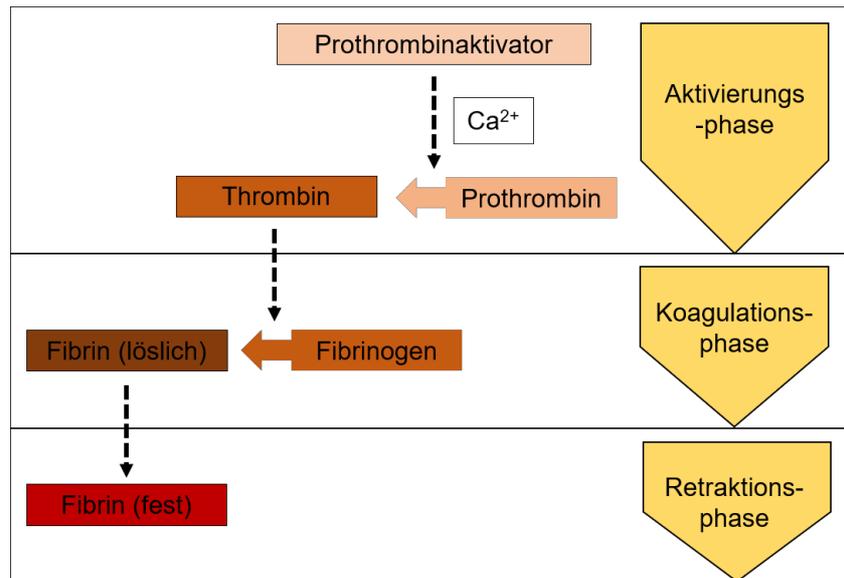
## 2.4 Blutgerinnung und Entstehung von venösen Thrombosen

Da mehr als die Hälfte aller CTEPH-PatientInnen in ihrer medizinischen Vorgeschichte über das Auftreten einer venösen Thrombose berichten (s. Kapitel 2.5) und da die Induktion einer venösen Thrombose im Mausmodell (s. Kapitel 4.2) einen Kernaspekt der in dieser Arbeit verwendeten Methoden darstellt, soll an dieser Stelle die Krankheitsentität näher beschrieben werden.

### 2.4.1 Blutgerinnung

Die Blutgerinnung (*Hämostase*) ist ein lebenswichtiger Prozess, der eine durch eine Gefäßverletzung entstandene Blutung zum Sistieren bringt (23). Man unterscheidet zwischen der primären und der sekundären Hämostase. Die primäre Hämostase ist durch Aktivierung und Zusammenlagerung (*Aggregation*) von zellulären Bestandteilen des Bluts gekennzeichnet. Wichtigster Vertreter sind hierbei die Blutplättchen (*Thrombozyten*). Durch die Verletzung des Endothels kommen die Thrombozyten mit kollagenösen Strukturen in Kontakt und heften sich mittels spezieller Rezeptoren der Zelloberfläche dort an (*Thrombozytenadhäsion*). Durch die Adhäsion wird die Aktivierung

der Blutplättchen ausgelöst. Aktivierte Thrombozyten sezernieren „Lockstoffe“, wodurch weitere Zellen derselben Abstammung und darüber hinaus Zellen der Immunabwehr (neutrophile Granulozyten, Monozyten) angelockt werden. Im aktivierten Zustand ändern Thrombozyten außerdem ihre Form und vergrößern durch das Ausbilden von Schein-Füßchen (*Pseudopodien*) ihre Oberfläche. Es kommt schließlich zur Aggregation der versammelten Plättchen und der Bildung eines Pfropfs. Damit endet die primäre Hämostase (23). Die sekundäre Hämostase, auch plasmatische Hämostase genannt, wird durch lösliche Bestandteile des Plasmas ausgeführt. Dabei bilden Thrombin und Fibrin die Schlüsselenzyme. Die sekundäre Hämostase lässt sich in drei Phasen einteilen (s. Abbildung 2). Während der Aktivierungsphase wandelt der Prothrombinaktivator durch den Einfluss von Kalzium das Proenzym Prothrombin in Thrombin um. In der Koagulationsphase spaltet Thrombin nun das lösliche Plasma-protein Fibrinogen und es entsteht (lösliches) Fibrin. Durch die sich anschließende Retraktionsphase wird das lösliche Fibrin in Anwesenheit von Kalzium fest und führt so das Blut aus einem flüssigen in einen gallertartigen Zustand über (23).



**Abbildung 2: Grundlegendes Schema der Blutgerinnung.** Modifiziert nach Schmidt et al. (23).

### 2.4.2 Fibrinolyse

Die Fibrinolyse löst Blutgerinnsel wieder auf und ist somit Gegenspieler der Hämostase. Hauptverantwortlich dafür ist das Plasmaglobulin Plasminogen bzw. seine aktive Form, das Plasmin. Mehrere Faktoren aus dem Gewebe, Urin oder auch dem Blut fungieren als Plasminogenaktivatoren. Plasmin spaltet lösliche Peptide aus Fibrin heraus, welche wiederum die Wirkung des Thrombin hemmen und somit der weiteren Bildung von Fibrin entgegenwirken (23).

### 2.4.3 Definition und Pathophysiologie der Thrombose

Eine Thrombose beschreibt die pathologische intravitale Bildung eines Blutgerinnsels in einem Blutgefäß (24). Grundsätzlich können sowohl das arterielle (Hochdruck-) Gefäßsystem als auch das venöse (Niederdruck-) Gefäßsystem von Thrombosen betroffen sein. Manifestiert sich eine Thrombose in den tief liegenden Venen, spricht man daher verallgemeinernd oft von tiefen Venenthrombosen (TVT) oder Phlebothrombosen (24). Der Pathologe Rudolf Virchow beschrieb 1865 erstmals mögliche Ursachen für die Entstehung einer TVT im Menschen. Die sogenannte Virchow-Trias bildet auch

heute noch die Grundlage unseres Verständnisses der Pathophysiologie in der Entstehung von Blutgerinnseln (25). Nach Virchow spielen vor allen Dingen folgende drei Faktoren eine übergeordnete Rolle in der Pathogenese venöser Thrombosen (26):

1. Veränderungen der innersten Gefäßwand, des Endothels. Dies kann zum Beispiel durch Entzündungen oder Traumata verursacht werden.
2. Blutstromveränderungen und -stase, beispielsweise als Folge von Immobilisation.
3. Veränderung der Blutzusammensetzung, insbesondere ein daraus resultierendes Ungleichgewicht zwischen gerinnungsfördernden und -hemmenden Faktoren.

Tritt eine Thrombose auf, entzündet sich zunächst das umliegende Gewebe und der Körper aktiviert reaktiv die körpereigene Auflösung des Gerinnsels (Fibrinolyse). Eine besondere Rolle spielen in diesem Zusammenhang die neutrophilen Granulozyten (*Neutrophile*). Sie infiltrieren den venösen Thrombus früh und tragen in diesem Stadium durch die Aktivierung von Plasmin zur Thrombusauflösung bei (27). Das Zusammenspiel von Entzündung, Fibrinolyse und bindegewebiger Vernarbung im Rahmen der Abheilung einer Thrombose wird auch Organisation genannt. Im Idealfall mündet die Organisation eines Thrombus in der Rekanalisation des betroffenen Gefäßes (28). Bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen einer TVT, z. B. Rötung, Überwärmung oder Schmerz, wird die Diagnose durch spezielle radiologische Verfahren wie Ultraschall, Phlebographie oder Angio-MR der betroffenen Extremität gesichert (29).

### **Therapie und mögliche Folgen**

Wurde eine TVT diagnostiziert, hat eine effektive Antikoagulation, umgangssprachlich auch „Blutverdünnung“ genannt, oberste Priorität in der Behandlung der Betroffenen. Trat die TVT erstmals auf, wird die Therapie in der Regel zunächst für drei bis sechs Monate angesetzt. Zugelassen für die Behandlung einer TVT sind in Deutschland Heparine, Pentasaccharide, Vitamin-K-Antagonisten (VKA) sowie direkte orale Antikoagulanzen (29).

Bleibt eine TVT unbemerkt oder wird sie nicht leitliniengerecht therapiert, besteht das Risiko, dass sich der Thrombus von der Gefäßwand löst und mit der Blutstrombahn in

andere Regionen des Körpers geschwemmt wird. Besonders gefährlich wird dies, wenn sich der Thrombus nach der Passage des rechten Herzens in einer Lungenarterie festsetzt und es somit zu einer LAE kommt. Akute LAEs präsentieren sich klinisch mit Thoraxschmerz, Dyspnoe sowie einem Anstieg der Herzfrequenz über das physiologische Maß hinaus (*Tachykardie*) und stellen einen potentiell lebensbedrohlichen Zustand dar. Die geeignete Therapie richtet sich nach dem Ausmaß der LAE. Eine wirksame Antikoagulation steht auch hier im Vordergrund. Zusätzlich kann eine medikamentöse Thrombolyse mit potenten Fibrinolytika oder eine mechanische Reperfusionstherapie notwendig werden. Eine LAE ist mit einer hohen Letalität verbunden. Man geht davon aus, dass in Europa jährlich 370.000 Todesfälle mit einer akuten LAE assoziiert sind (29).

### **Epidemiologie**

Das Risiko für die Entstehung einer TVT beträgt im Mittel 1:1000 Fälle pro Jahr (30) und steigt mit dem Alter. Für unter 60-Jährige liegt die Inzidenz bei ca. 1:10000 Fälle pro Jahr, für über 60-Jährige hingegen bei 1:100 Fälle pro Jahr (24). Damit handelt es sich insgesamt um eine häufige Erkrankung.

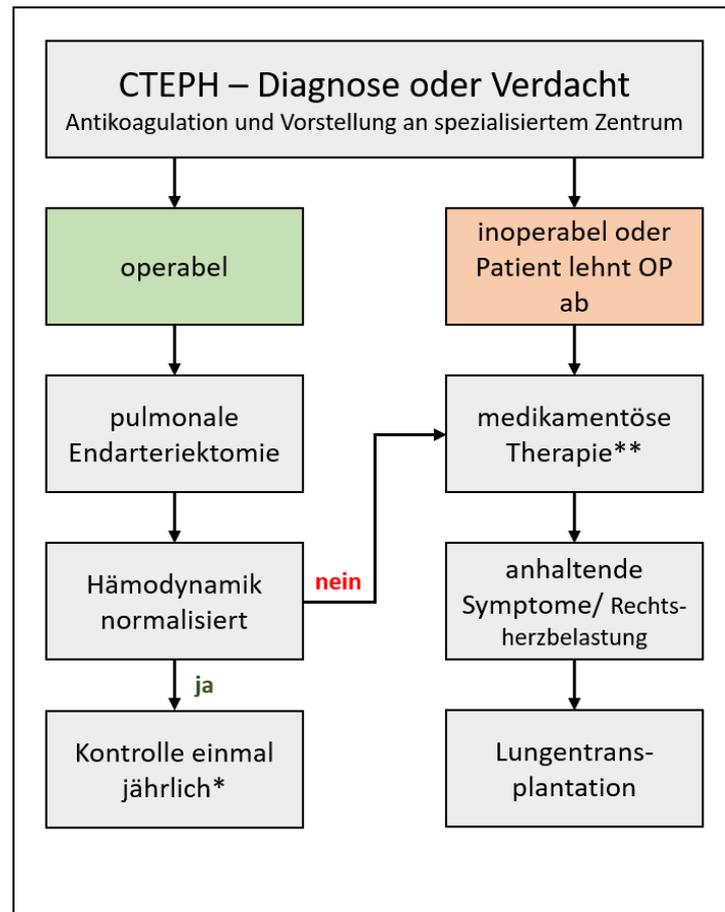
## **2.5 Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie**

Die CTEPH wird, wie in Kapitel 2.2 bereits erwähnt, aufgrund ihrer eigenständigen Pathophysiologie und dem besonderen klinischen Management als eigene Gruppe in der Klassifikation der PH aufgeführt. Mehrere Risikofaktoren konnten bisher für die Entstehung einer CTEPH benannt werden. So weisen ca. 74,8 % aller CTEPH-PatientInnen in ihrer Krankheitsgeschichte eine akute LAE auf, und 56,1 % berichteten von einer zurückliegenden TVT (31). Allerdings konnten akute thromboembolische Ereignisse bisher nicht als einzige Ursache für eine CTEPH bestätigt werden. Demnach konnten genetische Risikofaktoren, wie z. B. die Faktor-V-Leiden-Mutation, Protein-C/S-Mangel oder Antithrombin-Mutation, die bei betroffenen PatientInnen zu einem erhöhtem Thromboserisiko führen, bei CTEPH-PatientInnen nicht häufiger nachgewiesen werden, als in einer gesunden Kontrollgruppe (32). Darüber hinaus konnte in einer zwischen 1996 und 2006 multizentrisch durchgeführten europäischen Studie ein Zusammenhang zwischen malignen Erkrankungen und der Entstehung einer CTEPH

hergestellt werden (13). Ein Zustand nach Splenektomie, das Vorliegen chronisch-entzündlicher Erkrankungen, bakterielle Infektionen mit Staphylokokken oder bestimmte Blutgruppen (A, B, AB) gelten ebenfalls als Risikofaktoren (33, 34).

Gemäß der aktuellen Leitlinie kann die Diagnose einer CTEPH gestellt werden, wenn trotz dreimonatiger korrekt durchgeführter Antikoagulation der mittels Rechtsherzkatheter gemessene mPAP  $\geq 25$  mmHg beträgt und der pulmonal-kapilläre Verschlussdruck (Wedge-Druck)  $\leq 15$  mmHg beträgt (2). Zusätzliches Diagnosekriterium ist das Vorliegen mindestens eines Perfusionsdefekts in der Ventilations-Perfusions-Szintigrafie (V/P-Szintigrafie) der Lunge (35).

Als einzige Form der PH ist die CTEPH durch einen operativen Eingriff potentiell kurativ therapierbar. Bei der Operation handelt es sich um eine pulmonale Endarteriektomie (PEA), einem Verfahren, bei dem durch das Entfernen thrombotischen Materials aus dem Gefäßlumen ein suffizienter Blutfluss wieder hergestellt werden soll (36). Ist eine Operation nicht möglich oder stimmt der Patient dieser nicht zu, so ist seit 2014 als einzige medikamentöse Therapie in Deutschland das Mittel Riociguat zugelassen (37). Dabei handelt es sich um einen Guanylatzyklase-Stimulator, der gefäßerweiternd (*vasodilatatorisch*) wirkt (38). Aufgrund dieser etablierten Therapiemöglichkeiten benötigen PatientInnen mit einer CTEPH heutzutage nur noch sehr selten eine Lungentransplantation (37). Abbildung 3 gibt einen Überblick über das derzeitige Vorgehen hinsichtlich einer Therapieentscheidung nach Diagnosestellung einer CTEPH.



**Abbildung 3: Therapiealgorithmus der CTEPH,** \*Klinische Untersuchung und Echokardiografie in der Regel ausreichend. \*\* Derzeit ist in Deutschland nur Riociguat zugelassen. Modifiziert nach Olsson et al. (37).

### 2.5.1 Makroskopische Pathologie

Rückschlüsse auf das morphologische Korrelat einer CTEPH bietet die Jamieson-Klassifikation, die im Jahr 2000 etabliert wurde (39). Sie teilt das aus der PEA gewonnene Gewebe makroskopisch nach ihrer Lokalisation in den Lungengefäßen ein.

Jamieson-Klassifikation	Lokalisation
Typ 1	frischer Thrombus im proximalen Anteil der Lungenarterien
Typ 2	Intimaverdickung und Fibrose bis hin zu den proximalen Segmentarterien
Typ 3	Pathologien ausschließlich in den distalen Anteilen der Segmentarterien
Typ 4	distale Vaskulopathie der Arteriolen ohne sichtbares thrombotisches Material

**Tabelle 2: PEA-Klassifikation nach Jamieson (39).**

In einer sich daran anschließenden Studie konnte gezeigt werden, dass es sich bei der CTEPH meist um eine bilaterale Manifestation von makroskopisch sichtbaren Pathologien handelt. In weniger als 2 % der Fälle beschränkte sich das Geschehen auf eine Lungenhälfte (40). Zudem zeigten in derselben Studie PatientInnen mit Typ 3 oder 4 postoperativ deutlich instabilere hämodynamische Verhältnisse und hatten eine höhere perioperative Mortalität als Betroffene mit Typ 1 oder 2.

### 2.5.2 Histopathologie

Um mehr Aufschluss über die zugrundeliegende Pathophysiologie der CTEPH zu erlangen, haben sich eine Reihe internationaler Forschungsgruppen näher mit der Histopathologie dieser Erkrankung beschäftigt.

Im Jahr 2002 wurde eine Studie veröffentlicht, in der das Lungengewebe von 39 CTEPH-PatientInnen immunhistochemisch untersucht worden war. Die Biopsien wurden mit Antikörper-vermittelten Färbungen auf das Vorkommen von Fibrin, Plättchen, Entzündungszellen, glatten Muskelzellen (engl: *smooth muscle cells*; SMC) und Glycophorin A, einem Protein der Zellmembran von Erythrozyten, untersucht (41). Dabei konnten zwei verschiedene Muster von Intima-Läsionen identifiziert werden. Zum einen konnten fibrotische Plaques mit Zeichen stattfindender Angiogenese nachgewiesen werden. Zum anderen fand man atherosklerotische Plaques, also pathologische Cholesterin- und Fetteinlagerungen in der Intima, in den PEA-Proben.

Im darauffolgenden Jahr zeigte eine weitere Studie eine Assoziation zwischen atherosklerotischen Veränderungen und CTEPH auf, bei der Gewebeproben von 54 endarteriektomierten PatientInnen histopathologisch aufgearbeitet worden waren (42). In 32 % der Fälle konnte eine Atherosklerose festgestellt worden. Ein weiterer Fokus dieser Studie lag auf der grundsätzlichen Intimaverdickung der betroffenen Gefäßabschnitte. Die innerste Gefäßwandschicht war in allen PEA-Proben verdickt und in allen Proben konnte Kollagen nachgewiesen werden. In 67 % der Fälle wurde zusätzlich Elastin nachgewiesen, in 56 % Hämosiderin, in 53 % inflammatorische Zellen und in 15 % Kalzifikationen.

Im Jahr 2007 wurden Daten veröffentlicht, die weiteren Aufschluss über die Zusammensetzung des thrombotischen Materials aus PEA-Proben bei CTEPH-PatientInnen brachten. In jener Studie wurden die Thromben hinsichtlich ihres Fibringehaltes eingeteilt. Als frische Thromben wurden Thromben mit einem Fibrinanteil von  $\geq 90$  % bezeichnet, sich organisierende Thromben wiesen einen Fibrinanteil von 1 bis 90 % auf und organisierte Thromben verfügten über einen Fibrinanteil von  $\leq 1$  % (43).

Auch unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich eingehend mit der Organisation thrombotischen Materials aus PEA-Proben. Dafür wurden insgesamt 182 Gewebeproben von 31 CTEPH-PatientInnen makroskopisch-chirurgisch und histopathologisch aufgearbeitet. Tabelle 3 zeigt die Häufigkeit der verschiedenen Typen gemäß der Jamieson-Klassifikation (siehe Kapitel 2.5.1) in Zusammenhang mit der Histologie des PEA-Gewebes.

Histologie	Jamieson-Klassifikation		
	Typ 1**	Typ 2**	Typ 3**
Thrombus (%)*	83,3	50	25
Organisierter Thrombus (%)*	66,7	50	41,7
Myofibroblasten (%)*	100	100	100
Gefäße (%)*	83,3	100	66,7
Fibroblasten (%)*	83,3	50	100

**Tabelle 3: Histologie des endarteriektomierten Gewebes in Bezug auf die chirurgische Einteilung;** \* Angabe in %; da eine Gewebeprobe verschiedene Histologien aufweisen kann, beträgt die Summe mehr als 100 %. \*\* Eine CTEPH vom Typ 4 lag bei keinen der eingeschlossenen PatientInnen vor. Modifiziert nach Bochenek et al. (44).

Aus den oben gezeigten Ergebnissen lässt sich die Hypothese ableiten, dass sich eine CTEPH als Resultat konsekutiver Ereignisse im betroffenen Gefäß entwickelt, angefangen mit frischem und organisiertem Thrombus, über die Migration von Myofibroblasten und der Sprossung neuer Gefäße hin zur Fibrose. Da die histologische Betrachtung des PEA-Gewebes jedoch nur einen einzigen Zeitpunkt im Verlauf dieser chronisch-progressiven Erkrankung ablichtet, wurde das Modell der Vena-cava-Ligatur (siehe Kapitel 4.2) bei Mäusen angewandt, um weitergehende Untersuchungen zum chronischen Verlauf eines thrombotischen Geschehens unter standardisierten Bedingungen anzustellen (44). Die durch die Ligatur provozierten venösen Thromben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (ein Tag bis vier Wochen nach der Induktion) histopathologisch aufbereitet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die murinen Gewebeprobe, in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt, ähnliche histologische Merkmale wie das mittels PEA gewonnene humane Gewebe aufwies. Anfänglich (Gewebeentnahme einen Tag nach der Ligatur) zeigten sich die frischen Thromben fibrin- und erythrozytenreich, nach einer Woche konnten vermehrt Myofibroblasten und Endothelzellen als Hinweis für eine stattgefundene Vaskularisation des Gewebes detektiert werden und nach vier Wochen zeigte sich schließlich das Bild eines organisierten, fibrotischen Thrombus. Diese Studie unterstützt somit die Vermutung, dass sich eine CTEPH aus einer Folge chronifizierter thromboembolischer Ereignisse heraus etablieren kann.

### 2.5.3 Epidemiologie der CTEPH

Bei der CTEPH handelt es sich um eine sehr seltene Erkrankung, die unbehandelt oft einen tödlichen Verlauf nimmt. In Europa treten pro Jahr vier bis sechs Neuerkrankungen pro 1 Million Erwachsene auf (45). Im Mittel vergehen zwischen dem Auftreten erster Symptome bis zur Diagnosesicherung einer CTEPH 14,6 Monate (46), was die Chronifizierung der Erkrankung mitbegründet. Das Alter von CTEPH-PatientInnen beträgt im Mittel 63 Jahre, wobei die Erkrankung bei PatientInnen im Alter zwischen 15 Monaten und 90 Jahren nachgewiesen wurde (31, 39). Je nach initial gemessenem mPAP beträgt die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate nur 10 bis 30 % ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung (1). Todesursache ist meist das Rechtsherzversagen.

## 2.6 Tiermodelle

Aufgrund der Komplexität des Erscheinungsbildes der CTEPH und der noch unklaren Pathophysiologie dieser Erkrankung stellt die Entwicklung eines geeigneten Tiermodells zur Erforschung des Krankheitsbildes und seiner Behandlung eine Herausforderung dar. Zum einen müssten beim Tiermodell die hämodynamischen Veränderungen in der Lungenstrombahn nachweisbar sein, wie ein erhöhter mPAP und PVR und eine rechtsventrikuläre Dysfunktion. Zum anderen sollten sich im Verlauf die bekannten histopathologischen Veränderungen im Sinne einer proximalen Obstruktion, einer Intimahyperplasie, peripherer Arteriopathie und *In-situ*-Thrombusbildung darstellen. Obwohl genetisch veränderte Mauslinien ideal zur Analyse potentieller Kandidatengene wären, erschweren Unterschiede zwischen der humanen und murinen Hämodynamik und Besonderheiten des fibrinolytischen Systems der Maus die Etablierung einer geeigneten Methode. Diese Unterschiede sind in Großtiermodellen weniger stark ausgeprägt, in diesen sind jedoch genetische Modifikationen nicht oder nur teilweise durchführbar. Nachfolgend wird ein kurzer Überblick über die bisher in der Literatur verwendeten Tiermodelle gegeben.

### 2.6.1 Großtiermodelle

Anhand eines Schweinmodells wurde versucht, durch das Einbringen von sogenannten Coils und Gewebekleber die Obstruktion der Pulmonalarterien, wie sie im Rahmen

einer CTEPH auftritt, nachzubilden. Zwar bot diese Methode viel Aufschluss über das perioperative Management im Rahmen einer PEA, da diese hier nach einem Beobachtungszeitraum von fünf Wochen bei den Versuchstieren durchgeführt wurde. Jedoch entwickelten die betroffenen Schweine keine PH im Rahmen des Versuchsaufbaus (47). Die meisten pathophysiologischen Aspekte der CTEPH konnten in einem Tiermodell abgebildet werden, welches die Ligatur der linken Pulmonalarterie und die repetitive Injektion von Histoacrylkleber in den rechten unteren Lungenlappen kombiniert. Infolgedessen entwickelten die Schweine über einen Zeitraum von fünf Wochen einen erhöhten mPAP und PVR sowie einen Funktionsverlust und Hypertrophie des rechten Ventrikels (48). Histopathologisch wies das Lungengewebe der Versuchstiere ähnliche Strukturveränderungen auf, wie sie bei PEA-Proben von CTEPH-PatientInnen nachgewiesen werden konnten. Allerdings spielt Thrombose in diesem Modell keine Rolle und kann nicht untersucht werden.

### **2.6.2 Kleintiermodelle**

Bezüglich der Tierhaltung und der Durchführbarkeit von Eingriffen und unter Berücksichtigung der dadurch entstehenden Kosten, bieten Kleintiermodelle mit Ratten oder Mäusen viele Vorteile gegenüber Großtiermodellen. Jedoch stellt das sehr potente fibrinolytische System von Kleinnagetieren ein Hindernis dar, da es durch gerinnungshemmende Prozesse der chronischen Persistenz eines Thrombus entgegenwirkt.

In einer im Jahr 2011 etablierten Methode kam es durch die Ligatur der linken Pulmonalarterie von Ratten bei den Versuchstieren zur Erhöhung der linksseitigen Lungenperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dadurch konnten Rückschlüsse auf die Ausbildung neuer Blutgefäße (*Neovaskularisation*) geschlossen werden. Eine PH entwickelten die Tiere jedoch nicht (49). In einem weiteren Rattenmodell versuchte man durch die Injektion von autologem thrombosiertem Blut in die äußere Halsvene (*Vena jugularis externa*) der Tiere, eine CTEPH auszulösen. Zusätzlich wurde den Tieren Tranexamsäure als Antifibrinolytikum intraperitoneal injiziert, um so eine vorzeitige Auflösung der Blutgerinnsel zu verhindern (50). Abschließend konnte allerdings nicht bewiesen werden, dass die Ratten tatsächlich eine CTEPH entwickelten, da die Datenlage bezüglich der hämodynamisch relevanten Faktoren ungenügend blieb. Einen Durchbruch in der Etablierung eines geeigneten CTEPH-Modells in Kleintieren gelang im Jahr 2016 einer Forschungsgruppe, die den Versuchsratten über einen Zeitraum

von zwei Wochen insgesamt dreimal mit Thrombin kombinierte Mikrosphären über die Schwanzvene injizierte. Die Mikrosphären beinhalteten Polystyrol, Fibrinogen und Kollagen. Bei allen Versuchstieren konnten CTEPH-typische Veränderungen der Hämodynamik und Histopathologie nachgewiesen werden (51).

Beruhend auf der Annahme, dass eine CTEPH sich in Folge repetitiver thromboembolischer Ereignisse und Störungen in der Thrombusauflösung entwickelt, wurde das Modell der VCI-Ligatur in Mäusen als Grundlage dieser Arbeit ausgewählt. Dieses Modell bildet viele klinische und pathophysiologischen Aspekte in der Entstehung der humanen TVT ab und weist darüber hinaus auch Parallelen bezüglich der fibrinolytischen Abläufe und Auflösung von venösen Thromben, wie sie im menschlichen Organismus stattfinden, auf (52). Eine ausführliche Erläuterung dieser Methode findet sich in Kapitel 4.2.

## **2.7 Die Transforming-Growth-Factor- $\beta$ -Superfamilie**

Die TGF $\beta$ -Superfamilie besteht aus einer großen Anzahl strukturell miteinander verwandter polypeptidischer Zytokine, die diverse Prozesse im menschlichen Organismus auf zellulärer Ebene regulieren. Dazu zählen u. a. Zellproliferation und -differenzierung, Migration von Zellen und auch der programmierte Zelltod (*Apoptose*) (53). Innerhalb der TGF $\beta$ -Familie unterscheidet man zwischen mehr als 30 Mitgliedern, darunter die Isoformen TGF $\beta$  I, II und III, Activin, *bone morphogenetic proteins* (BMP) und *growth and differentiation factor* (GDF) (54). In diesem Kapitel wird zunächst allgemein auf das Vorkommen und die Funktion von TGF $\beta$  eingegangen. Anschließend wird die Rolle von TGF $\beta$  bei der PH näher erläutert und abschließend auf die Signaltransduktion von TGF $\beta$  im Gefäßendothel eingegangen.

### **2.7.1 Expression und Funktion von TGF $\beta$**

Die zur TGF $\beta$ -Familie gehörenden Zytokine sind sowohl während der Embryogenese als auch im reifen Organismus aktiv und konnten in diversen Spezies nachgewiesen werden, darunter Fliegen, Würmer und Säugetiere (14). Da TGF $\beta$ -Zytokine ubiquitär im menschlichen Körper vorkommen, sind ihre Funktionen und somit auch die Wirkung stark abhängig von der jeweiligen Sensitivität der Zielzelle (53). So ist bekannt, dass

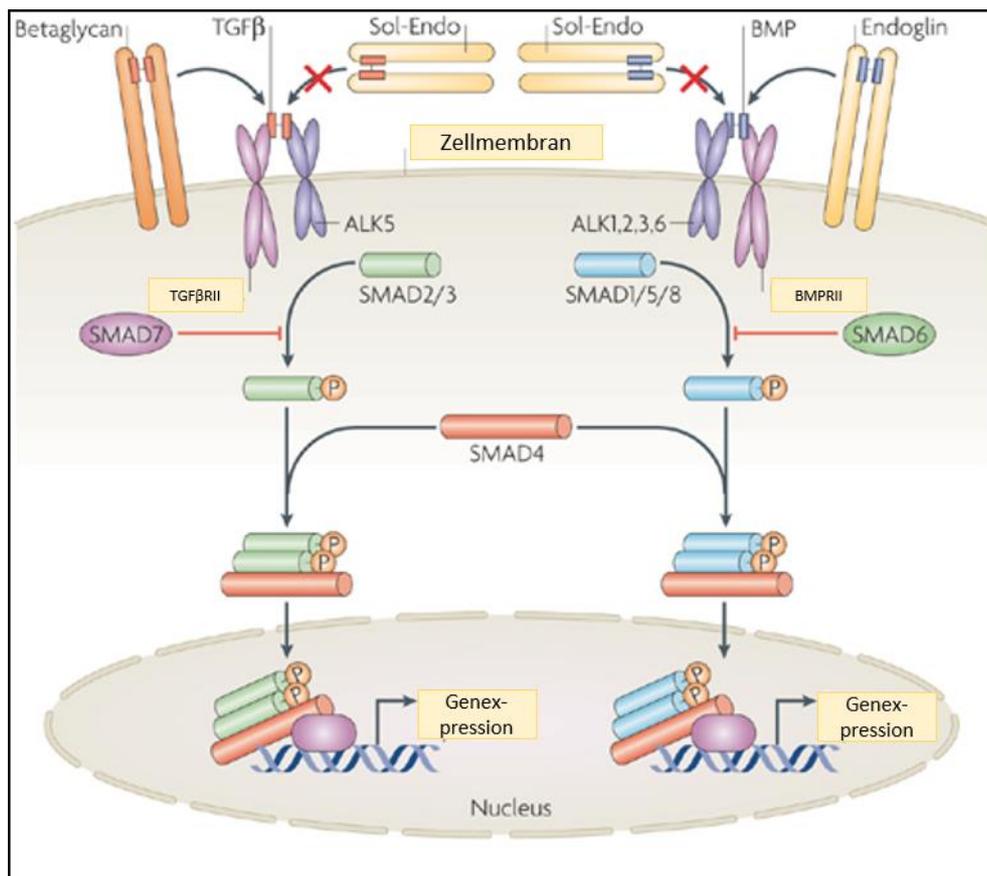
TGF $\beta$  als Inhibitor für epitheliales Wachstum agiert, das Immunsystem supprimiert und negativen Einfluss auf die Synthese von Blutzellen (*Hämatopoese*) hat. Andererseits fördert TGF $\beta$  die Bildung von bindegewebeartigen Strukturen (55). Trotz der vielfältigen und teils entgegengesetzten Wirkungsweise von TGF $\beta$ , unterliegt die Signaltransduktion von der Zellmembran bis in den Zellkern dabei einem relativ simplen Wechselspiel zwischen unterschiedlichen intrazellulären Prozessen. Nachfolgend wird ein schematischer Überblick über den Ablauf der Signalvermittlung gegeben.

Die Grundpfeiler dieser Signalkaskade bilden zwei TGF $\beta$ -Rezeptortypen, die jeweils aus einer Serin-/Threonin-Proteinkinase bestehen (TGF $\beta$ -Rezeptor I und II), und verschiedenen Rezeptorsubstraten, sogenannten Smad-Proteinen, die das Signal bis in den Zellkern transportieren (56). Im menschlichen Körper gibt es sieben Typ-I-Rezeptoren und fünf Typ-II-Rezeptoren. Die Typ-I-Rezeptoren sind auch als *activin-receptor-like kinase* (ALK) bekannt. Bindet ein Ligand an einen an der Zelloberfläche exprimierten TGF $\beta$ -Rezeptor II (TGF $\beta$ RII), führt dies zur Aktivierung des TGF $\beta$ -Rezeptor I (TGF $\beta$ RI) durch Phosphorylierung desselben. Durch die Aktivierung des TGF $\beta$ RI wird dieser in den Liganden-Rezeptor-Komplex eingebunden. Man geht jedoch davon aus, dass eine direkte Interaktion zwischen den zwei Rezeptortypen diese Bindung zusätzlich stabilisiert (57). Als modulierende Kofaktoren bei der Ligandenbindung dienen die in der Zelloberfläche verankerten Proteine Endoglin und Betaglykan (53). Betaglykan verbessert beispielsweise die Bindungsfähigkeit von TGF $\beta$ 2 an TGF $\beta$ RII, da TGF $\beta$ 2 für sich allein genommen nur eine geringe Affinität zum Rezeptor zeigt (58). Endoglin wiederum erleichtert die Ligandenbindung an den TGF $\beta$ RI ALK1 (53). Gelöstes Endoglin steht im Verdacht, Liganden abzufangen und somit eine Rezeptorbindung zu inhibieren (59).

Da der TGF $\beta$ RI dem TGF $\beta$ RII nachgeschaltet ist, entscheidet jener über die Spezifität des folgenden intrazellulären Signals (60). Die aktivierte Typ-I-Rezeptorkinase phosphoryliert *receptor regulated* Smads (R-Smads) und aktiviert diese somit. Je nachdem, welche R-Smads vom TGF $\beta$ RI aktiviert werden, kann man nochmals zwei Rezeptor-Subgruppen abgrenzen. Smad2 und Smad3 werden als Antwort auf *TGF $\beta$ -like-proteins* aktiviert, wogegen Smad1, 5 und 8 nach der Bindung eines BMP- oder GDF-Liganden aktiviert werden (61, 62). Nach einer erfolgreichen Phosphorylierung bilden zwei R-Smads einen Komplex mit einem *common* Smad (co-Smad), Smad4. Dieser heteromere Komplex gelangt nun in den Zellkern und kann dort in Kooperation mit Transkriptionsfaktoren genmodulierend wirken (63). Als regulatorische Gegenspieler

zu den R-Smads und co-Smads existieren noch zwei inhibitorische Smads, Smad6 und Smad7, die die Signalkaskade unterbrechen können (63). Abbildung 4 gibt einen Überblick über die TGF $\beta$ -Signalkaskade.

In welcher Art und Weise Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie in ihren Zielzellen genmodulierend Einfluss nehmen können, hängt von der Interaktion verschiedener Rezeptoren, von gebundenen oder gelösten Cofaktoren und von den Liganden ab (59).



**Abbildung 4: Die TGF $\beta$ -Signalkaskade.** Über die in der Zellmembran verankerten Rezeptoren werden die Liganden gebunden, die folglich zur Autophosphorylierung der Rezeptoren führen und wodurch diese sich in Komplexen zusammenschließen. Daraufhin erfolgt intrazellulär durch Phosphorylierung die Aktivierung der Signalkaskade, bis es schließlich im Zellkern (*Nucleus*) zur Genexpression kommt. Modifiziert nach ten Dijke et al. (59).

### 2.7.2 Die Rolle von TGF $\beta$ bei pulmonaler Hypertonie

Wie bereits im Kapitel 2.2 erläutert, wird die PH in fünf Subgruppen unterteilt. Gruppe eins bildet dabei die PAH, die mit pathologischer Neointimaproliferation, SMC-Hypertrophie und Expansion der umgebenden Adventitia der Pulmonalarterien einhergeht

und somit zur Okklusion der kleinsten Lungengefäße führt (20). In den 1950er Jahren wurde die PAH erstmals als Krankheit beschrieben, die sowohl isoliert als auch familiär gehäuft auftreten kann (64). Damals fehlten jedoch Erkenntnisse hinsichtlich genetischer Dispositionen, die die Entstehung einer PAH begünstigen. In den 1990er und 2000er Jahren gelang der Nachweis, dass ein genetisch mutierter BMP-Rezeptor Typ 2 (BMPRII) und somit ein Mitglied der TGF $\beta$ -Superfamilie, den größten Risikofaktor für das Auftreten familiär gehäufte PAH darstellt (15). Man geht sogar davon aus, dass in 75 % aller PAH-PatientInnen eine BMPRII-Mutation vorliegt. Ein kleiner Prozentsatz familiärer PAH-Fälle konnte zudem mit Mutationen in anderen TGF $\beta$ -Rezeptortypen sowie nachgeschalteten Signalträgern, wie z. B. ALK1, Endoglin und Smad9, in Zusammenhang gebracht werden (65).

Die Expression von TGF $\beta$  und eine tragende Rolle der TGF $\beta$ -Signalkaskade konnten ebenfalls in Fällen von experimentell via Hypoxie (66) oder Monocrotalin (67) induzierter PH nachgewiesen werden.

Die Rolle von TGF $\beta$  speziell bei der Auflösung venöser Thrombosen und der Ausbildung thrombofibrinotischer Areale in CTEPH wurde bisher jedoch noch nicht direkt untersucht und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

## **2.8 Endothelial-to-Mesenchymal-Transition**

Das Endothel bildet die innerste Schicht der Gefäßwand (*Tunica intima*) und ist in eine Reihe physiologischer Prozesse eingebunden. Unter anderem wird ihm eine tragende Rolle bei der Auflösung venöser Thromben zuteil. Einerseits sezernieren Endothelzellen den fibrinolytisch wirkenden und somit Blutgerinnsel-lösenden Gewebsplasminogenaktivator (engl.: *tissue-type plasminogen activator*; t-PA), andererseits erfolgt die Sprossung neuer, von bereits vorhandenen Blutgefäßen ausgehender Gefäße (*Angiogenese*) ebenfalls durch Endothelzellen (22). Experimentelle Studien konnten im Mausmodell zeigen, dass eine defekte Angiogenese aufgrund eingeschränkt funktionsfähiger Endothelzellen die Auflösung venöser Thrombosen verzögert (68). Die Annahme, dass eine unausgewogene und gestörte Angiogenese eine Rolle in der Entwicklung einer CTEPH spielt, konnte durch den Nachweis angiostatischer Wachstums-

faktoren in PEA-Gewebeproben von CTEPH-PatientInnen unterstützt werden (69). Zugleich deuten andere Forschungsergebnisse auf ein erhöhtes angiogenetisches Potential von PEA-Proben *in vitro* hin (70).

Es ist bekannt, dass Endothelzellen eine phänotypische Konversion hinzu mesenchymalen Zellen durchlaufen können, ein Prozess, der EndMT genannt wird. Im Laufe dieses Prozesses verlieren die Endothelzellen zunächst ihren Zell-Zell Kontakt, der durch Zellmembranproteine wie z. B. VE-Cadherin aufrechterhalten wird. Durch den Verlust dieser Kontakte lösen sich die Zellen aus dem abluminal gelegenen Zellverband und können in innen gelegene Gewebeschichten migrieren (71). Während der Migration verlieren die Zellen endothelspezifische Marker wie CD31 und exprimieren stattdessen mesenchymalspezifische Marker wie z. B. *α smooth muscle actin* (SMA) (72). EndMT ist verantwortlich für die Fibrosierung von Gewebe, u.a. von Lungengewebe (71, 73). Jedoch kann die phänotypische Konversion von Endothelzellen auch Zellen generieren, die für das Sprossen neuer Gefäße notwendig sind (74).

Zwar ist TGFβ ein bekannter Induktor von EndMT (75), jedoch wurden diese Zusammenhänge bisher noch nicht bezüglich der Pathogenese der CTEPH betrachtet.

## 3 Material

### 3.1 Geräte

Gerät	Firma
Eismaschine <i>AF 100</i>	Scotsman Ice System, Mailand, I
Elektrophorese System <i>Sub-Cell® GT</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
Feinwaage <i>MC1 Analytic AC 210 S</i>	Sartorius, Göttingen, DE
Gelgieß-Apparatur <i>Mini-PROTEAN® Tetra Cell</i>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
Kaltlichtquelle <i>KL 1500 compact</i> (Gewebeentnahme)	Schott AG, Mainz, DE
Kaltlichtquelle <i>high lighter 3100</i> (Maus-OP)	Olympus Europe, Hamburg, DE
Kamera <i>Moticam 5</i>	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, DE
Konfokalmikroskop <i>Leica LSM 710</i>	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, DE
Kryostat <i>Leica CM3050 S</i>	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, DE
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr-International AG, Bulle, CH
Lupenlampe <i>varioLEDflex</i>	Fine Science Tools®, Heidelberg, DE
Magnetheizrührer <i>VMS-C7</i>	VWR International, Radnor, PA, US
Magnetprüher <i>IKA® C-Mag MS 7</i>	IKA Werke GmbH & Co KG, Staufen, DE

Gerät	Firma
Magnetrührer <i>VS – C4</i>	VWR International, Radnor, PA, US
Mikroskop <i>Motic AE31</i>	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, DE
Mikroskop <i>Olympus BH2</i>	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Mikroskop <i>Olympus BX51</i> (Histologie)	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, DE
Mikrotom <i>Leica RM2245</i>	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, DE
Mikrowelle (Histologie)	Sharp K.K., Osaka, JPN
Mikrowelle (Agarosegel)	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, DE
Paraffinausgießstation <i>Leica EG 1150 H</i> mit Kühlplatte <i>EG 1150 C</i>	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, DE
pH-Meter <i>pH 1000 L</i>	VWR International, Radnor, PA, US
Schwenktisch ( <i>Duomax 1030; Polymax 1040; Titramax 1000</i> )	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, DE
Stereomikroskop <i>VisiScope® SZB 350 OH</i>	VWR International, Radnor, PA, US
Streckbadkombination	MEDAX GmbH & Co KG, Neumünster, DE
Stromquelle <i>PowerPac™ Power Supply</i> (Elektrophorese)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, US
Thermoblock <i>ThermoStat plus</i>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Thermocycler <i>Mastercycler® nexus gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Thermomixer <i>ThermoMixer C</i>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Trockenschrank <i>DRY-Line®</i>	VWR International, Radnor, PA, US
Ultraschallgerät <i>Vevo 3100 System</i>	VisualSonics, Amsterdam, NL
Ultraschallkopf 55MHz	VisualSonics, Amsterdam, NL
Ultratiefkühlschrank <i>New Brunswick™ Innova® U725-G</i>	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Gerät	Firma
UV-Geldokumentationskammer	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, DE
Vortexmischer <i>Vortex-Genie</i> <sup>®</sup> 2	Scientific Industries, Inc., New York, US
Waage <i>MC1 Laboratory LC 2200 P</i>	Sartorius, Göttingen, DE
Wärmeschrank <i>Heratherm</i> <sup>®</sup>	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, US
Wärmeplatte (Maus-OP)	Vogel GmbH & Co KG, Fernwald, DE
Wärmeplatte Hot Plate 062 mit Regler (Gewebeentnahme)	Labotect GmbH Labor-Technik-Göttingen, Rosdorf, DE
Wasseraufbereitungsanlage <i>PURELAB Ultra</i>	Elga LabWater by Veolia Water Technologies, Celle, DE
Zentrifuge <i>5424 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge mit Ausschwingrotor <i>5810 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge <i>FastGene Mini</i>	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, DE
Zentrifuge <i>miniSpin</i>	Eppendorf AG, Hamburg, DE

### 3.2 Software

Programm	Firma
GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, US
ImagePro Plus 7.0	Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, US
Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US

### 3.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/ Reagenz	Firma
Acid Fuchsin	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE
Agarose, Broad Range	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Ammoniumeisen(III)-sulfat-dodecahydrat	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Anilinblau	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Antibody (AB) Diluent	Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, US
Biebrich-Scarlett	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE
DirectPCR® Lysis Reagent Tail (mouse); Cell	Peqlab by VWR Life Science Competence Center, Erlangen, DE
Einbettmedium <i>Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound</i>	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen am Rhein, NL
Eindeckmittel <i>Entellan®</i>	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Eindeckmittel <i>Fluorescence Mounting Medium</i>	Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, US
Eindeckmittel <i>Immu-Mount</i>	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, US
Eisen(III)-chloride-Hexahydrate	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE
Essigsäure 100 %	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Ethanol vergällt ≥ 99,8 %	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Ethanol vergällt ≥ 96 %	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Ethanol vergällt ≥ 70 %	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Hämalaun nach Mayer	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE
Hämatoxylin Gill Nr. 3	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE
Methanol	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Milchpulver, Blotting-Grade, fettarm	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Natriumchloridlösung 0,9 %	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

Chemikalie/ Reagenz	Firma
Normal Goat Serum	Abcam <sup>®</sup> , Cambridge, UK
Orange G	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> GmbH, Steinheim, DE
Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7,4 (10x)	Gibco <sup>®</sup> by Life Technologies <sup>™</sup> , Carlsberg, CA, US
Phosphomolybdensäure	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Phosphotungstensäure	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> GmbH, Steinheim, DE
Pikrinsäure, gesättigt	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> GmbH, Steinheim, DE
Ponceau Xylidine	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> GmbH, Steinheim, DE
Roticlear	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Salzsäure 37 %	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Schnelldesinfektion <i>Terralin<sup>®</sup> liquid</i>	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE
Siriusrot (Direct Red)	Sigma-Aldrich <sup>®</sup> GmbH, Steinheim, DE
TAE Puffer <i>Rotiphorese<sup>®</sup></i> (50x)	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Triton <sup>®</sup> X-100	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Xylol ≥98 %	Carl Roth <sup>®</sup> GmbH + Co, Karlsruhe, DE
Zinkformalin Konzentrat <i>Zinc Formal-FIXX<sup>™</sup> Concentrate</i>	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, US

### 3.4 Immunhistochemie-Kits

Kit	Firma
VECTASTAIN <sup>®</sup> <i>Elite<sup>®</sup></i> ABC Kit (PK-6100)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, US
AEC Peroxidase Substrate Kit (SK-4200)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, US
DAB Peroxidase Substrate Kit (SK-4100)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, US

Kit	Firma
VECTOR® NovaRed™ Peroxidase Substrate Kit (SK-4800)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, US

### 3.5 Enzyme

Artikel	Firma
Proteinase K-Lösung <i>peqGOLD</i>	Peqlab by VWR Life Science Competence Center, Erlangen, DE

### 3.6 Marker und Farbstoffe

Artikel	Firma
<b><u>Marker:</u></b>	
- DNA-Ladder (100 bp) 500 µg/ml (N3231L)	New England Biolabs (NEB) Inc., Ipswich, MA, US
<b><u>Farbstoffe:</u></b>	
- DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
- Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE

### 3.7 PCR-Reagenzien

Artikel	Firma
DNA Polymerase <i>Go Taq</i> ® G2 Flexi (5 U/ µl) mit 5x Green <i>Go Taq</i> ® Flexi Buffer und 25 mM MgCl <sub>2</sub>	Promega Corporation, Fitchburg, WI, US
Genotypisierungs-Primer (Sequenzen siehe Abschnitt 3.10)	Eurofins MWG Operon ECommerce – Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

Artikel	Firma
MgCl <sub>2</sub> (25 mM; A 3511)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, US
M-MLV Reverse Transkriptase mit M-MLV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer (M1701)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, US
PCR Nucleotide Mix (10 mM dNTPs; C1145)	Promega Corporation, Fitchburg, WI, US
Wasser, nueklasefreies, DEPC- behandelt, steril und autoklaviert	Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe, DE

### Primer

Alle hier aufgeführten Primer wurden von *Eurofins Genomics*, Ebersberg, DE bezogen.

		Sequenz 5' – 3'	Verd.
<b>Pf4.Cre</b>	<i>forward</i>	CCC ATA CAG CAC ACC TTT TG	1:10
	<i>reverse</i>	TGC ACA GTC AGC AGG TT	1:10
<b>TGFβ1</b>	<i>forward</i>	AAG ACC TGG GTT GGA AGT G	1:10
	<i>reverse</i>	CTT CTC CGT TTC TCT GTC ACC CTA T	1:10
<b>Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup></b>	<i>forward</i>	CGA GTG ATG AGG TTC GCA AG	1:10
	<i>reverse</i>	TGA GTG AAC GAA CCT GGT CG	1:10
<b>TGFbRII<sup>flox</sup></b>	<i>forward</i>	GCA CAG GTA CAC ATC TCT GCA C	1:5
	<i>reverse</i>	TGT AAT CGT TGC ACT CTT CCA TGT	1:5

### 3.8 Antikörper

#### Primärantikörper

Antikörper	Art.-Nr.	Firma
BMP7	ab56023	Abcam®, Cambridge, UK
BMPRII	ab124463	Abcam®, Cambridge, UK
CD31	DIA-310	Dianova, Hamburg, DE
CD41	11-763-C100	EXBIO Praha, a.s., CZE
Endothelin	PA3-067	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, US
MAC2	CL8942AP	Cedarlane Laboratories, Bulington, CAN
MMP9	sc6840	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, US
PAI-1	ab66705	Abcam®, Cambridge, UK
PCNA	sc-56	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, US
SMA	A2547	Sigma-Aldrich® GmbH, Steinheim, DE
Ter119	MAB1125	R&D Systems™, Minneapolis, MI, US
TGFβRII	PA5-35076	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, US
Thrombin	ab83981	Abcam®, Cambridge, UK

#### Sekundärantikörper

Antigen	Art.-Nr.	Firma
Biotin-xx goat anti-mouse IgG	B27163	Molecular Probes® by Life Technologies™, Eugene, OR, US
Biotin-xx goat anti-rabbit IgG	B2270	Molecular Probes® by Life Technologies™, Eugene, OR, US
Biotin-xx goat anti-rat IgG	A10517	Molecular Probes® by Life Technologies™, Eugene, OR, US

Antigen	Art.-Nr.	Firma
FITC donkey anti-rat IgG	Novex A18746	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, US
555 goat anti-rabbit IgG	MFP-A2428	MoBiTech

### 3.9 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und Futtermittel

Mausstamm	Herkunft
Tie2.Cre.ER <sup>T2</sup>	Zur Verfügung gestellt von [REDACTED], Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, European Mouse Mutant Archive (EMMA), DE
TGFβRII flox Pf4.Cre TGFβ1 flox	Zur Verfügung gestellt von [REDACTED], Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) der Universitätsmedizin Mainz, DE

Haltungsfutter und Diäten	Firma
Alleinfuttermittel für die Haltung von Mäusen R/M-H  - TARC Mainz: Extrudat (V1536)	Ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, DE
Spezialfutter mit 400 mg Tamoxifen-Citrat/ kg Futter (TD55125)	Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis, IN, US

Käfig und Zubehör	Firma
TARC Mainz: Käfig Typ 2 (Laufbodenfläche 360 cm <sup>2</sup> ; Höhe 14 cm; innenliegender Gitterdeckel mit herausnehmbaren Trennblech; Filterhaube, Trinkflasche)	ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, DE
Einstreu- und Nistmaterial	Standardmaterial Versuchstiereinrichtung TARC

---

### 3.10 Anästhesie

Anästhetikum	Firma
Bepanthen Augensalbe	Bayer AG, Leverkusen, DE
Isofluran <i>Florene</i> <sup>®</sup> 100 % (V/V) Inhalationsnarkotikum	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, DE
isotone Natriumchloridlösung 0,9 % (steril, für Injektionen)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Medetomidin	Zoetis Inc, Parsippany, NJ, US
Midazolam	Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln, DE

---

## **4 Methoden**

### **4.1 Versuchstiere**

#### **4.1.1 Tierschutzantrag und Genehmigung**

Bei der tierexperimentellen Studie handelt es sich um das Versuchsvorhaben mit dem Aktenzeichen 23 177-07 / G14-1-044, welches gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz am 03.07.2014 genehmigt wurde. Die Tierhaltung und die Versuchsdurchführung entsprachen dabei den geltenden nationalen Bestimmungen.

#### **4.1.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung**

Für die vorliegende tierexperimentelle Untersuchung wurden ausschließlich männliche Wurfgeschwister verwendet. Im Alter von 12 bis 14 Wochen wurden diese einer subtotalen Ligatur der VCI unterzogen und für einen Zeitraum von drei Wochen postoperativ beobachtet. In diesem Zeitraum erfolgte wöchentliche eine nicht-invasive Ultraschallkontrolle der Thrombusbildung.

Das *Translational Animal Research Center* (TARC) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz war für die Unterbringung und Pflege der Versuchstiere verantwortlich sowie für die Einhaltung der hygienischen Standards in der Haltung von Versuchstieren. Die Tiere wurden in einem Typ 2 Käfig gehalten und eine

ausreichende Trinkwasser- und Futtermittelversorgung (Ssniff® R/M-H Extrudat) wurde von Seiten der beim TARC angestellten Tierpfleger sichergestellt. Die Mäuse des Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup> x TGFβRII<sub>flox/flox</sub> Genotyps erhielten ab einem Alter von sechs Wochen für weitere 6 Wochen Spezialfutter mit 400 mg Tamoxifen-Citrat pro kg Futter (TD55125). Die Unterbringung erfolgte in klimatisierten Räumen (20 bis 24 °C) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % (50 bis 70 %). Ein stetiger Tag-Nacht-Rhythmus im Wechsel von zwölf Stunden konnte durch eine automatisierte Lichtanlage simuliert werden, wobei die Dunkelphase von 18.00 bis 6.00 Uhr andauerte. Zum Identifikationsnachweis wurden alle Tiere mit einer fortlaufenden Registrierungsnummer im PyRAT (engl.: *Python-based Relational Animal Tracking*) - System erfasst und mit einer eindeutigen Ohrstanze markiert. Zusätzlich erhielt jedes Versuchstier eine eigene fortlaufende Nummerierung, zur Dokumentation der Arbeit mit Tieren und genetisch modifizierten Organismen, die sowohl elektronisch als auch in einem eigens dafür vorgesehenem „Maus-OP-Buch“ der Arbeitsgruppe festgehalten wurde.

#### 4.1.3 Generierung genmodifizierter Mauslinien

In der vorliegenden Arbeit wurden Eigenschaften zweier verschiedener genmodifizierter Mauslinien untersucht. Zum einen kamen plättchenspezifische TGFβ1-Knockout-Mäuse zum Einsatz. Des Weiteren wurden Mäuse mit endothelspezifischem Knockout des TGFβRII verwendet. Generiert wurden beide Mauslinien unter dem Einsatz des Cre/loxP-Rekombinationssystems. Im Folgenden werden das allgemeine Prinzip dieser Rekombinationstechnik sowie die hierfür nötigen Mauslinien näher beschrieben.

##### Das Cre/loxP-Rekombinationssystem

Mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems können gezielt Sequenzen aus der in der Desoxyribonukleidsäure (engl.: *desoxyribonucleic acid*; DNA) gespeicherten Erbinformation herausgeschnitten werden und somit gewebsspezifische Gen-Knockouts generiert werden. Hierfür macht man sich die katalytische Eigenschaft der Rekombinase Cre (engl.: *cyclization recombination*) zu Nutze. Genauer gesagt katalysiert Cre die Rekombination zwischen zwei 34 bp DNA-Restriktionsstellen, die als loxP (engl.: *locus of crossing-over of bacteriophage P1*) bezeichnet werden (76).

Die Flankierung eines bestimmten DNA-Abschnittes durch die loxP-Sequenzen wird auch *floxen* genannt (engl.: *flanked by loxP*). Die Cre-Rekombinase ist in der Lage, die geflochten Sequenzen in der DNA zu erkennen und zu deletieren. Diese ringförmigen DNA-Fragmente werden anschließend intrazellulär abgebaut (77).

Ein gewebsspezifischer Knockout wird möglich, wenn zusätzlich ein Promoter eingebracht wird. Um schwerwiegende Entwicklungsfehler während der Embryogenese durch das Fehlen von spezifischen Proteinen zu vermeiden, kann eine zeitspezifische Rekombination verwendet werden. Dieser induzierbare Knockout erfolgt meist mit Hilfe einer Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase. Details zu den verwendeten Promotoren für das Erreichen der Gewebsspezifität und zur Induktion des Knockouts sind den untenstehenden Beschreibungen der verwendeten Mauslinien zu entnehmen.

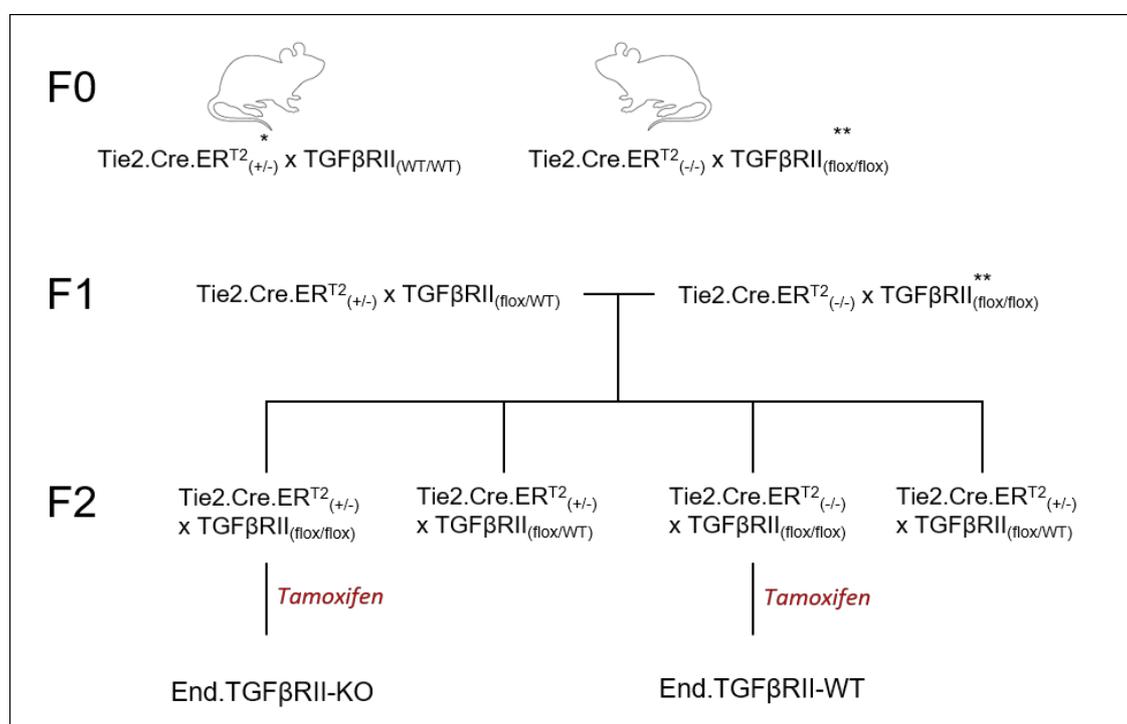
### **Cre/loxP vermittelte plättchenspezifische TGFβ1-Deletion**

Um einen gewebsspezifischen Knockout zu erzeugen, werden zwei Mauslinien benötigt. Ein Mausstamm, der die Cre-Rekombinase exprimiert und ein zweiter, der das geflochte DNA-Segment enthält.

Eine plättchenspezifische Deletion von TGFβ1 konnte von anderen Autoren durch die Verwendung der Plättchenfaktor-4-Cre-Mauslinie (engl.: *platelet factor 4*; Pf4), (Hintergrund: C57BL/6-Tg(Pf4-cre)Q3Rsko/J) erzielt werden (78). In dieser Mauslinie wird die Cre-Rekombinase durch den murinen Pf4-Promoter kontrolliert und dadurch in Megakaryozyten exprimiert. Da diese die Vorläuferzellen der Blutplättchen sind, wird so der spätere plättchenspezifische Knockout generiert. Eine Aktivierung des Promoters ist nicht nötig, da es sich bei diesem Modell nicht um einen induzierbaren Knockout handelt. Die zweite Mauslinie besitzt den geflochten DNA-Abschnitt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell TGFβ1<sub>flox/flox</sub> (Hintergrund: TGFβ1m2.1Doe/J) verwendet, welches im Jahr 2009 von einer anderen Arbeitsgruppe etabliert wurde (79). Durch die Verpaarung von Pf4.Cre-transgenen Mäusen mit TGFβ1<sub>flox/flox</sub>-Mäusen, entstehen nach mehreren Generationen Mäuse, die zu 50 % homozygot für das TGFβ1-loxP-Allel und gleichzeitig hemizygot/ heterozygot für das Cre-Transgen sind (Pf4.Cre<sup>+/-</sup> x TGFβ1<sub>flox/flox</sub>). Die Tiere dieses Genotyps bildeten in der vorliegenden Arbeit die Versuchsgruppe bzw. die Knockout (KO)-Gruppe und werden nachfolgend

Plt.TGF $\beta$ -KO genannt. Dieselbe Generation bringt Mäuse hervor, die zu 50 % ebenfalls homozygot für das TGF $\beta$ 1-loxP-Allel, jedoch negativ für das Cre-Transgen sind (Pf4.Cre<sup>-/-</sup> x TGF $\beta$ 1<sup>flox/flox</sup>). Diese Mäuse bildeten die Kontrollgruppe (folglich als Plt.TGF $\beta$ -WT bezeichnet). Die Mäuse zur Cre/loxP vermittelten plättchenspezifischen Deletion von TGF $\beta$ 1 wurden uns von [REDACTED], Centrum für Thrombose und Hämostase, Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt.

### Cre/loxP vermittelte endothelspezifische TGF $\beta$ RII – Deletion

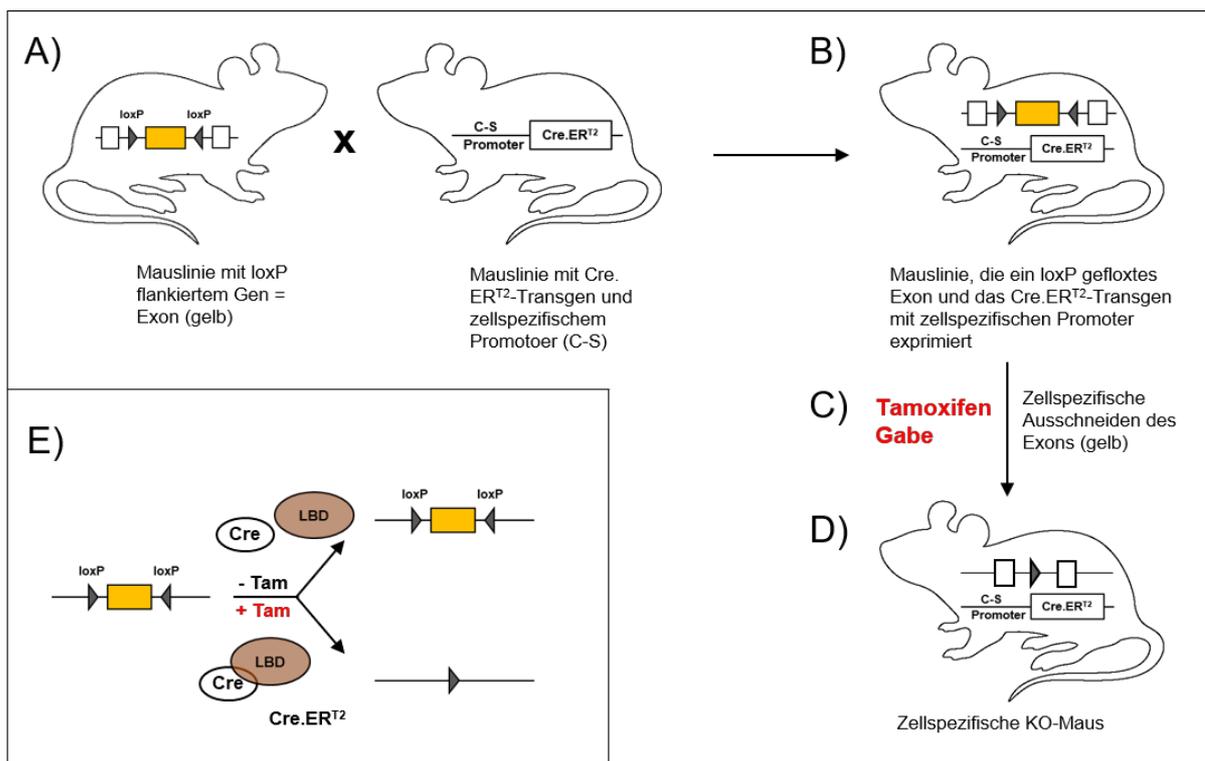


**Abbildung 5: Mauszucht.** F0: Parentalgeneration; F1: erste Filialgeneration; F2: zweite Filialgeneration. \*Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup>-transgene Mäuse, C57BL/6-Hintergrund, zur Verfügung gestellt von [REDACTED]; \*\* Mäuse mit loxP-flankiertem TGF $\beta$ RII-Gen, C57BL6J-Hintergrund, zur Verfügung gestellt von [REDACTED].

Mäuse mit endothelspezifischer Deletion des TGF $\beta$ RII wurden von uns aus zwei Mauslinien wie folgt generiert: Träger der Cre-Rekombinase waren C57BL/6 Mäuse, bei denen das Transgen unter die Regulation der Rezeptortyrosinkinase Tie2 (engl.: *tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains-2*) gestellt ist. Diese Mauslinie wurde uns freundlicherweise von [REDACTED], DKFZ Heidelberg, zur Verfügung gestellt (80). Eine Aktivierung des Tie2-Promoters und die daraus resultierende Expression von Cre führt jedoch während der

Embryonalentwicklung zu schweren Fehlbildungen und endet häufig letal (80). Daher ist es bei dieser Mauslinie sinnvoll, eine temporär induzierbare Aktivität von Cre zu generieren, um die Rekombinationsaktivität besser steuern zu können. Ermöglicht wird dies durch die Fusion von Cre mit der Liganden-bindenden Domäne eines mutierten Östrogenrezeptors (engl: *estrogen receptor t2*; ER<sup>T2</sup>). Bis zur Bindung eines Liganden an den Rezeptor bleibt Cre somit funktionell inaktiv. Analog zum Kreuzungsschema der transgenen Pf4-Cre Mäuse mit homozygot TGFβ1-geflochten Mäusen, wurden die Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup>-transgenen Mäuse mit homozygot TGFβRII-geflochten Mäusen verpaart. Diese Mäuse wurden uns freundlicherweise von [REDACTED] zur Verfügung gestellt. In der F1-Generation werden somit Mäuse geboren, die zu 50 % heterozygot für das TGFβRII-loxP-Allel und hemizygot/heterozygot für das Cre-Transgen sind. Anschließend erfolgte wiederum die Verpaarung von F1-Tieren mit homozygot TGFβRII-geflochten Mäusen. Die F2-Generation bringt Nachkommen hervor, die sowohl das Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup>-Transgen tragen, als auch homozygot flankierte TGFβRII-Allele aufweisen. Mäuse dieses Genotyps (Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup><sub>+/-</sub> x TGFβRII<sub>flox/flox</sub>) wurden in die Versuchsgruppe aufgenommen und werden im Folgenden als End.TGFβRII-KO bezeichnet. In der F2-Generation kommen auch Tiere ohne die Expression des Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup>-Transgens vor, die jedoch Träger des homozygot flankierten TGFβRII-Allels sind (Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup><sub>-/-</sub> x TGFβRII<sub>flox/flox</sub>). Mäuse mit diesem Genotyp dienten als Kontrolltiere und werden fortan End.TGFβRII-WT benannt. Die Mauszucht erfolgte analog zum Schema aus Abbildung 5.

Beide Gruppen erhielten ab einem Alter von fünf bis sechs Wochen für den Zeitraum von sechs Wochen Futter mit Tamoxifen-Zusatz. Tamoxifen ist ein selektiver Östrogenrezeptormodulator (engl: *selective estrogen receptor modulator*; SERM) und wirkt als Ligand für die ER<sup>T2</sup>-Domäne. Es erfolgte die Aktivierung der Cre-Rekombinase und die endothelspezifische Deletion des TGFβRII bei den Knockoutmäusen. Abbildung 6 veranschaulicht den Ablauf des zellspezifischen induzierbaren Knockouts in Mäusen.



**Abbildung 6: Allgemeines Schema zum induzierbaren Knockout.** Die Generierung und Induktion von zellspezifischen Knockouts in Mäusen mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinationssystems. **(A)** Paarung von Mäusen mit loxP flankiertem Gen und Mäusen mit zellspezifischem (engl.: *cell specific*; C-S) Promotor. **(B)** Mauslinie, die sowohl das loxP geflochte Exon als auch den C-S-Promotor exprimiert. **(C)** Aktivierung der Cre-Rekombinase nach Tamoxifen-Gabe über ER<sup>T2</sup>. **(D)** Zustand nach zellspezifischer Exzision des loxP-flankierten Exons. **(E)** Ablauf zellspezifische Exzision eines loxP-flankierten Exons. Durch die Gabe des Liganden Tamoxifen bindet dieser an die Liganden-bindende Domänen (LBD) des mutierten Cre.ERT<sup>2</sup>-Rezeptors und aktiviert somit die Cre-Rekombinase. Es kommt zum Ausschneiden des Exons. Modifiziert nach Feil et al. (81).

#### 4.1.4 Genotypisierung

##### Gewinnung der DNA

Zur Überprüfung der Genotypen der Mäuse erfolgte im Alter von vier bis sechs Wochen die Genotypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*; PCR). Dies diente je nach Mauslinie zum Nachweis des deletierten TGF $\beta$ 1- bzw. TGF $\beta$ RII-Gens. Um genomische DNA isolieren zu können, wurden Schwanz- oder Ohrstanzbiopsien verwendet und über Nacht in Lyse-Reagenz DirectPCR® zusammen mit 2  $\mu$ l Proteinkinase K lysiert (Thermomixer für 10 bis 16 Stunden bei 55 °C und 550 rpm). Je nach Herkunft der Biopsie (Schwanz oder Ohr), wurden unterschiedliche Mengen an Lyse-Reagenz verwendet (siehe Tabelle 4). Zum Stoppen der Reaktion wurden die Proben am darauffolgenden Tag für 60 Minuten auf 85 °C erhitzt. Anschließend erfolgte das Abzentrifugieren für ca. zehn Sekunden bei 13000 rpm, und der so entstandene Überstand wurde in ein neues 1,5 ml *Eppendorf Tube* überführt. Die Proben wurden bis zu Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Art der Biopsie	Menge <i>DirectPCR</i> ® Lyse-Reagent Tail/Ear
0,2 bis 0,3 cm Schwanzspitze	150 $\mu$ l
0,4 bis 0,5 cm Schwanzspitze	200 $\mu$ l
0,2 cm Ohrstanze	100 bis 200 $\mu$ l

Tabelle 4: Menge an Lyse-Reagenz zur DNA-Isolation.

##### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR lassen sich spezifische DNA-Abschnitte amplifizieren. Dazu werden die DNA-Stränge durch das Durchlaufen eines sich wiederholenden Zyklus verschiedener Temperaturen zunächst denaturiert, spezifische Primer werden angelagert und schließlich der fehlende DNA-Strang durch eine hitzebeständige Polymerase synthetisiert (82).

Zum Nachweis der jeweiligen Rekombinations-Produkte in der Gelelektrophorese, wurden diese durch PCR vervielfältigt. Das Pipettierschema zum Erstellen der Reaktionsansätze ist Tabelle 5 zu entnehmen und ist für die Bestimmung von Pf4.Cre,

TGF $\beta$ 1 und TGF $\beta$ RII identisch. Die Sequenzen der jeweiligen *forward* und *reverse* Primer, die in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt wurden, sind unter Kapitel 3.7 aufgeführt. Für den Nachweis von Tie.Cre.ER<sup>T2</sup> kam ein modifiziertes Pippetierschema zum Einsatz (siehe Tabelle 6).

Reagenz	$\mu$ l pro Ansatz
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	4,8
5x Puffer	4,0
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,6
dNTP's je 10 mM	0,4
10 $\mu$ M Primer <i>forward</i>	2,0
10 $\mu$ M Primer <i>reverse</i>	2,0
DNA	5
5 U/ $\mu$ l DNA Polymerase GoTaq® G2 Flexi	0,2
Gesamtvolumen	20

Tabelle 5: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR (Pf4.Cre; TGF $\beta$ 1; TGF $\beta$ RII).

Reagenz	$\mu$ l pro Ansatz
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	9,8
5x Puffer	4
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,6
dNTP's je 10 MM	0,4
10 $\mu$ M Primer <i>forward</i>	0,5
10 $\mu$ M Primer <i>reverse</i>	0,5
DNA	3
5 U/ $\mu$ l DNA Polymerase GoTaq® G2 Flexi	0,2
Gesamtvolumen	20

Tabelle 6: Reaktionsansatz der Genotypisierungs-PCR (Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup>).

Als Positivkontrolle dienten Proben schon zuvor genotypisierter Mäuse mit den Genotypen Pf4.Cre<sup>+/-</sup> x TGFβ1<sup>flox/flox</sup> bzw. Tie2.CreER<sup>T2+/-</sup> x TGFβRII<sup>flox/flox</sup>. Zur Negativkontrolle wurde nuklease-freies Wasser eingesetzt. Die Amplifizierung der Reaktionsansätze erfolgte mit Hilfe des *Eppendorf flexid Mastercycler® nexus gradient* über Nacht. Die Reaktionsprofile sind in Tabelle 7, Tabelle 8 und Tabelle 9 aufgelistet.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
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		

**Tabelle 7: Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR für den Pf4.Cre-Genotyp und das TGFβ1-Gen.**

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 min	35x
Annealing	58 °C	30 min	35x
Elongation	72 °C	90 min	35x
Extension	72 °C	10 min	1x
Kühlung	4 °C		

**Tabelle 8: Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR für das TGFβRII-Gen.**

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1x
Denaturierung	94 °C	30 min	35x
Annealing	60 °C	30 min	35x
Elongation	72 °C	30 min	35x
Extension	72 °C	10 min	1x
Kühlung	4 °C		

**Tabelle 9: Reaktionsprofil der Genotypisierungs-PCR für den Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup>-Genotyp.**

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese.

### Agarosegelelektrophorese

Mittels der Gelelektrophorese gelingt das Auftrennen von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Unter Anbringung eines elektrischen Feldes wandern die geladenen Teilchen vom Minus- zum Pluspol. Das Agarosegel als Trägermedium dient bei dieser Methode als Molekularsieb (82). Kleinere DNA-Fragmente passieren das Medium gegen weniger Widerstand und legen in derselben Zeit eine weitere Strecke im Gel zurück, als größere Fragmente. Die Konzentration des Agarosegels richtet sich nach der Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente, wobei in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Gel mit einem Agaroseanteil von 1,5 % zum Einsatz kam. Die Herstellung des Gels ist Kapitel 9.1 zu entnehmen.

Damit die Agarose sich vollständig in der Pufferlösung auflöst, wurde die Laborflasche mit der angesetzten Lösung mit locker aufliegendem Deckel in der Mikrowelle zum Sieden gebracht. Der Vorgang wurde mehrmals unterbrochen und die Flasche vorsichtig geschwenkt, um noch ungelöste Agaroseteilchen vollständig zu suspendieren. Das Abkühlen der Lösung erfolgte mit Hilfe eines Magnetrührers. Sobald die Zieltemperatur von ca. 50 bis 60 °C erreicht war, wurden 5 µl/100 ml *Midori Green*, ein DNA-interkalierender Farbstoff, zugefügt. Anschließend wurde das Gel in einen zuvor austarierten Gelträger gegossen. Durch das vorherige Einsetzen eines Kamms in den Gelträger wurden Geltaschen erzeugt, in die später die DNA-Proben pipettiert wurden. Nachdem das Agarosegel vollständig ausgehärtet war, wurde es vom Gelträger in die Pufferkammer des Elektrophorese-Systems (*Sub-Cell® GT Cell*) überführt. Der Kamm

wurde nun vorsichtig entfernt und die Pufferkammer mit 1x TAE-Puffer bis zu einer bestimmten Markierung befüllt, um das Gel vollständig mit Flüssigkeit zu bedecken. Im Anschluss erfolgte das Auftragen der DNA-Proben in die Geltaschen. Zusätzlich zu den PCR-Produkten lief separat im Gel ein Standard (100 bp Plus-DNA-Ladder) mit, der als Größenvergleich für die DNA-Fragmente diente. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte unter Anlegen einer Spannung von 100 Volt und über einen Zeitraum von 60 Minuten.

Da sich der sowohl im Agarosegel als auch in die PCR-Reaktionslösungen zugegebene Farbstoff *Midori Green* zwischen die Basen der DNA anlagert, konnte das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese mittels Fluoreszenz unter einem UV-Licht sichtbar gemacht werden (Intas-UV Geldokumentationskammer).

## 4.2 Ligatur der Vena cava inferior

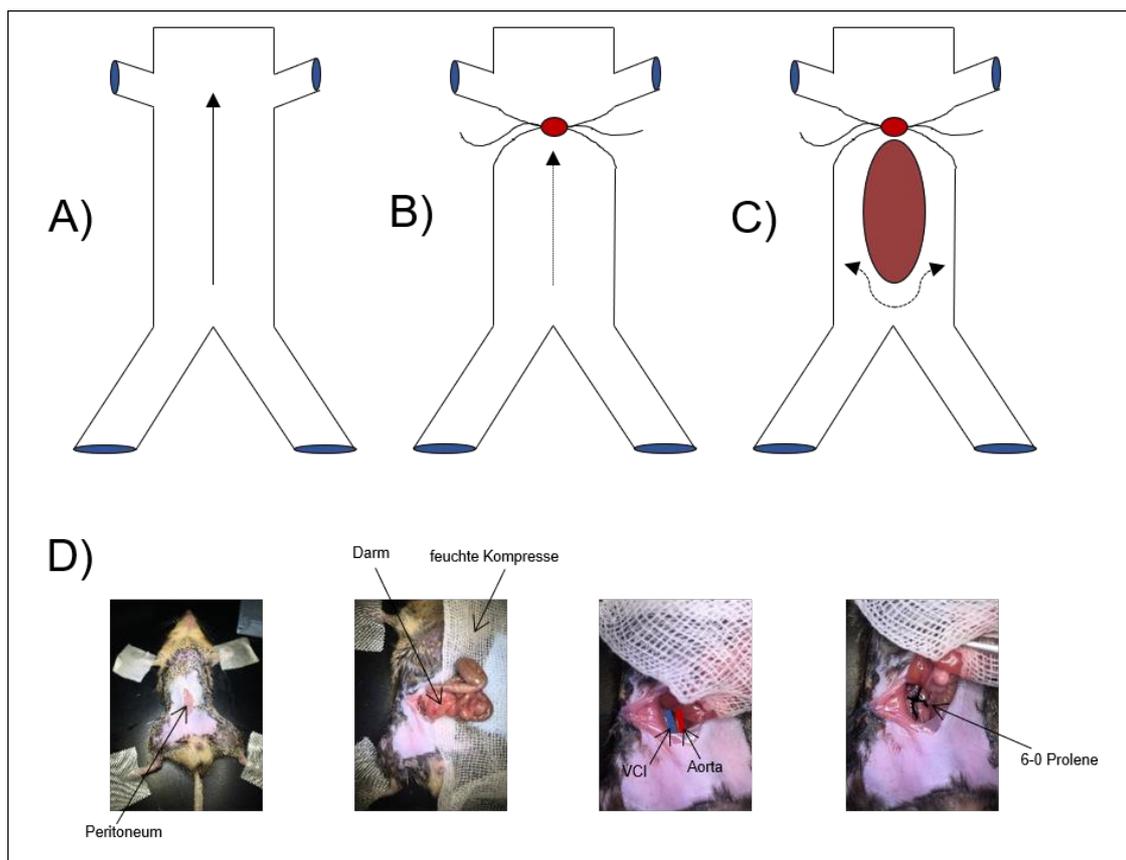
Um Erkenntnisse über die Unterschiede in der Reaktion auf eine venöse Thrombose zwischen den unterschiedlichen Mauslinien zu gewinnen, wurde das Maus-Modell der VCI-Ligatur verwendet. Durch den subtotalen Verschluss der VCI unterhalb des Zuflusses der Venae renales wird somit eine Blutstase erreicht, die im Verlauf von mehreren Stunden bis Tagen zur Bildung eines Thrombus führt. Erstmals wurde das Modell umfassend im Jahr 2012 beschrieben (83).

### 4.2.1 Anästhesie und Vorbereitung

Vor Beginn der Operation wurden die Mäuse mit 0,5 µg/g Körpergewicht (KG) Medetomidin (1 mg/ml), 5 µg/g KG Midazolam (5 mg/ml), 0,05 µg/g KG Fentanyl (0,05 mg/ml), verdünnt in 3,5 µl/g KG 0,9% Kochsalzlösung (NaCl), narkotisiert. Zunächst wurde 50 % des Anästhesiegemisches intraperitoneal injiziert. Um ein Austrocknen der Hornhaut zu verhindern, wurde Bepanthen Augensalbe aufgetragen. Vor Eröffnung der Bauchdecke wurde diese zunächst mit Hilfe einer Enthaarungscreme großflächig periumbilikal enthaart. Anschließend erfolgte die Verabreichung des restlichen Narkosegemisches. Während der Operation wurde das Versuchstier mit dem Rücken auf eine 37 °C warme Wärmeplatte platziert, wobei die Pfoten jeweils mit Leukoplast fixiert wurden, um optimalen Zugang zum Operationsfeld zu erlangen.

#### 4.2.2 Durchführung

Die Bauchdecke wurde nun auf einer Gesamtlänge von rund einem cm kranial und kaudal des Bauchnabels eröffnet. Nach Eröffnung des Peritoneums wurden die Darmschlingen vorsichtig gelockert und für die Restdauer der Operation extrakorporal auf einer mit 0,9 % NaCl angefeuchteten sterilen Kompresse gelagert, um so eine bessere Sicht auf die VCI zu gewinnen. Nach beidseitiger stumpfer Freipräparation und Mobilisation der VCI erfolgte die Ligatur über einem Platzhalter unterhalb des Zuflusses der Venae renales durch Verwendung eines 6-0 Seidenfadens, um einen subtotalen Verschluss zu erreichen. Anschließend wurden die Darmschlingen wieder nach intraabdominal verlagert und zunächst das Peritoneum mit einer fortlaufenden Naht mit 6-0 Prolene verschlossen. Zuletzt erfolgte der Schluss der Bauchdecke durch Einzelknopfnähte, ebenfalls unter Verwendung von 6-0 Prolene. Zur postoperativen Schmerzmedikation erfolgte eine subkutane Injektion in den Nacken von 100 µl Buprenorphin (324 µg/ml verdünnt auf 32,4 µg/ml), unabhängig vom Körpergewicht. Dieses Vorgehen wurde am Folgetag und bei Bedarf wiederholt. In Abbildung 7 ist eine schematische Übersicht der Operation sowie die fotografische Dokumentation der Abläufe zu finden.



**Abbildung 7: Ablauf der VCI-Ligatur. (A)** VCI zwischen den Zuflüssen der renalen Gefäße (kranial) und Bifurkation der Iliakalgefäße (kaudal) mit regelhaftem Blutfluss. **(B)** VCI nach infrarenaler subtotaler Ligatur. Der Blutfluss ist verlangsamt. **(C)** Bildung einer venösen Thrombose distal der Ligatur. **(D)** Fotografische Dokumentation der Maus-Operation.

### 4.3 Ultraschalluntersuchung

An Tag eins, Tag sieben, Tag 14 und Tag 21 wurde eine Kontrolle der Thrombusbildung in vivo per Ultraschall durchgeführt

#### 4.3.1 Anästhesie und Vorbereitung

Um optimale Untersuchungsbedingungen zu schaffen und um die Versuchstiere keinem unnötigen Stress auszusetzen, wurden diese vorab in einer Kammer, in die ein 10 %iges Isofluran-Luft-Gemisch eingeleitet wurde, narkotisiert. Die Analgosedierung wurde während der Ultraschalluntersuchung durch Inhalation eines 2,5 %igen Isofluran-Luft-Gemischs aufrechterhalten. Je nach Zeitpunkt der Untersuchung erfolgte

vorab eine erneute Enthaarung der Bauchhaut. Die Lagerung der Mäuse fand wie unter Kapitel 4.2.1 beschreiben statt.

### **4.3.2 Durchführung**

Für diese nichtinvasive Untersuchung wurde ein Ultraschallgerät speziell für Kleintiere (*Vevo 3100 System*) mit zugehörigem 55 MHz Schallkopf der Firma *VisualSonics* verwendet. Konnte ein Thrombus im Ultraschall nachgewiesen werden, so wurde dessen Größe im Längsschnitt vermessen.

## **4.4 Gewebeentnahme und -aufbereitung**

Jeweils an Tag 21 nach der Operation wurden die Versuchstiere zur Isolierung der okkludierten VCI durch Genickbruch getötet. Der Zugangsweg erfolgte analog zur Ligatur-Operation. Die zu entnehmenden VCI-Kompartimente wurden kranial und kaudal des Thrombus mit einer Schere durchtrennt und entnommen.

### **Paraffinschnitte**

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurde das Gewebe in Zinkformalin (4 %) (Zusammensetzung der hier genannten Lösungen s. Kapitel 9.1) fixiert und für bis zu sieben Tage in 70 %igem Ethanol gelagert. Um das Gewebe in Paraffin einzublocken und für (immun-) histologische Analysen aufzubereiten, wurde es für 60 bis 120 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Das eigentliche Paraffinieren erfolgte in einem Gewebeinfiltrationsautomaten (TP 1020, Leica). Die dafür erforderlichen Schritte sind der Tabelle 10 zu entnehmen:

Arbeitsschritt	Medium	Dauer
Spülen	dH2O	5 min
	dH2O	30 min
Dehydrieren	Ethanol 70 %	120 min
	Ethanol 80 %	120 min
	Ethanol 96 %	2 mal 120 min
	Ethanol 100 %	2 mal 120 min
Intermedium	Roticlear	2 mal 120 min
Paraffinieren	Paraffin	120 min
	Paraffin	240 min

**Tabelle 10: Protokoll Gewebeeinfiltrationsautomat** zur Herstellung von Paraffinschnitten.

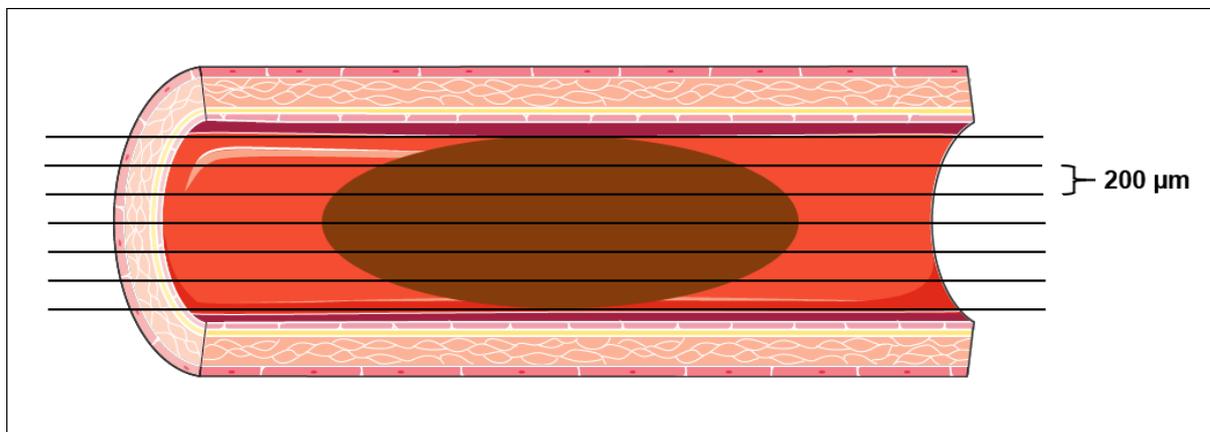
Unter Verwendung einer Paraffinausgießstation (Leica EG1150 H) und entsprechenden Ausgießformen wurden die VCI-Segmente in Paraffin ausgeblockt. Mittels eines Mikrotoms (Leica RM2245) entstanden fünf- $\mu$ m-dicke Serienschnitte. Das Gewebe wurde longitudinal angeschnitten, in einem Kaltwasserbad (20°C) aufgefangen und mit Hilfe eines Heißwasserbads (45°C) auf die Objektträger gestreckt. Pro Objektträger wurden vier Gewebeschnitte aufgetragen und mit der jeweiligen Versuchsternummer gekennzeichnet. Bevor die Objektträger zum Färben bereitgestellt werden konnten, wurden diese über Nacht in einem auf 60°C erhitzten Wärmeschrank getrocknet.

Die Anfertigung der Paraffinschnitte erfolgte durch [REDACTED], medizintechnische Laborassistentin der Arbeitsgruppe.

### Gefrierschnitte

Die Gewebeproben, die mittels Immunfluoreszenz analysiert werden sollten, wurden nach Entnahme umgehend in eiskaltes 4 % PFA überführt und bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert. Während des Inkubationsvorgangs wurde das Gefäß durchgehend auf einem Schwenktisch positioniert. Anschließend wurde das Gewebe in drei Zyklen mit 1 x PBS gewaschen. Nach jeweils 24 Stunden bei 4 °C in 15 % und nachfolgend 30 % Saccharose (Sucrose)-Lösung wurden die Gewebestücke in *Tissue Tek® O.C.T. Compound* eingebettet und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Kryoschnitte wurden wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt mit einer

Dicke von acht  $\mu\text{m}$  hergestellt und auf Objektträgern anschließend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Färbung aufbewahrt.



**Abbildung 8: Schnittführung zur Anfertigung der Gewebeschnitte.** Die Serienschritte wurden in einem regelmäßigen Abstand von  $200\ \mu\text{m}$  und einer Dicke von fünf  $\mu\text{m}$  (Paraffinschnitte) bzw. acht  $\mu\text{m}$  (Gefrierschnitte) hergestellt. Die Abbildung wurde mit Hilfe der *Powerpoint image bank* von Servier Medical Art erstellt.

Die Tierversuche wurden von [REDACTED] und [REDACTED] durchgeführt. Die Durchführung der Tierversuche war zuvor von der zuständigen Landesbehörde genehmigt worden (Landesuntersuchungsamt Koblenz, G14-1-044).

#### 4.5 Histologische Färbungen

Zur Übersicht und ersten Bewertung der Thromben wurde eine Übersichtsfärbung nach Carstairs, sowie die Siriusrot Färbung für interstitielles Kollagen angewandt. Eine Auflistung über die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist unter Kapitel 9.1 zu finden.

Da die Vor- und Nachbereitungen der Färbungen für beide Protokolle identisch sind, werden sie hier vorab beschrieben.

Vor der Färbung:

Arbeitsschritt	Medium	Dauer
Entparaffinisieren	Xylol	3 mal 5 min
Hydrieren	100 % Ethanol	2 mal 2 min
	96 % Ethanol	2 mal 2 min
	70 % Ethanol	1 mal 2 min
	50 % Ethanol	1 mal 2 min
Spülen	dH <sub>2</sub> O	5 min

**Tabelle 11: Standardprotokoll Vorbereitung histologischer Färbungen.**

Nach der Färbung:

Arbeitsschritt	Medium	Dauer
Dehydrieren	96 % Ethanol	2 mal 2 min
	100 % Ethanol	2 mal 2 min
Intermedium	Roticlear	2 mal 2 min
Eindecken	Entellan	

**Tabelle 12: Standardprotokoll Nachbereitung histologischer Färbungen.**

#### 4.5.1 Carstairs

Der britische Pathologe K.C. Carstairs veröffentlichte 1965 erstmals das Protokoll, welches eine Weiterentwicklung der Picro-Mallory-Methode darstellt (84). Die Färbung dient in erster Linie der Differenzierung zwischen Fibrin (rot-orange) und Thrombozyten (grau-blau). Des Weiteren stellen sich Erythrozyten gelb und kollagenöses Gewebe blau dar.

Arbeitsschritt	Medium	Dauer
Nachfixieren	Bouin's Fixative	60 min bei 60 °C
Spülen	Leitungswasser	bis klar
Färben	5 % Ammoniumeisen(III)sulfat	5 min
Spülen	Leitungswasser	bis klar
Färben (Zellkerne)	Mayer's Hämatoxylin (Hämalaun-Lösung nach Mayer)	5 min Mikroskopkontrolle
Spülen	Leitungswasser	bis klar
Färben (Erythrozyten)	Pikrinsäure-Orange G-Lösung	45 min Mikroskopkontrolle
Spülen	dH <sub>2</sub> O	bis klar
Differenzieren (Bindegewebe)	1 % Phosphotungstensäure	5 bis 6 min Mikroskopkontrolle
Spülen	dH <sub>2</sub> O	bis klar
Gegefärben (Bindegewebe)	1 % Anilinblau	2 min

Tabelle 13: Färbeprotokoll Carstairs.

#### 4.5.2 Pikro-Siriusrot

Mit der im Jahre 1964 etablierten Färbung lassen sich Kollagenfasern darstellen (85). Da die Aminosäuren der Kollagenkette basisch sind, kann sich der saure Siriusrot-Farbstoff an diese anlagern. Dies geschieht in paralleler Ausrichtung zur Längsachse der Kollagenmoleküle. Somit wird die natürliche Doppelbrechung der Kollagenfasern verstärkt und diese leuchten unter dem Polarisationsmikroskop rötlich-gelb (Kollagen Typ I) bis grünlich (Kollagen Typ IV) auf.

Arbeitsschritt	Medium	Dauer
Färben	1 % Picrosiriusrot-Lösung	60 min
Spülen	30 % Essigsäure	2 mal 1 min
Spülen	dH <sub>2</sub> O	kurz

Tabelle 14: Färbeprotokoll Pikro-Siriusrot.

## 4.6 Immunhistochemie

Zur weiteren Untersuchung histologischer Eigenschaften in den Gewebeproben der venösen Thromben wurden diese verschiedenen immunhistochemischen Färbungen unterzogen. Durch die Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen kann das Gewebe somit auf das Vorhandensein bestimmter Epitope untersucht werden. Die manuelle Durchführung der Färbungen erfolgte nach einem Standardprotokoll, dem als Grundlage die *Avidin-Biotin-Complex-Methode* (ABC-Methode) dient.

### ***Avidin-Biotin-Complex-Methode***

Die immunhistochemische Darstellung gewebsspezifischer Epitope erfolgt mit der ABC-Methode. Zunächst wird das histologische Präparat mit einem Primärantikörper markiert. Im nächsten Schritt wird dieser Primärantikörper mit einem biotinylierten Sekundärantikörper dargestellt. Möglich wird dies dadurch, dass der Sekundärantikörper gegen Immunglobulin G derjenigen Spezies gerichtet ist, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde und an dessen Fc-Region er bindet.

Aus dem Hühnereiweißprotein Avidin und einem biotinylierten Markerenzym (z. B. Peroxidase) wird der Avidin-Biotin-Komplex hergestellt, der sich an den Sekundärantikörper anlagert. Avidin zeigt eine sehr hohe Affinität zu Biotin und fungiert somit als Brücke zwischen dem biotinyliertem Sekundärantikörper und dem Markerenzym, wobei ein makromolekularer Komplex zu Stande kommt. Die im Komplex gebundene Peroxidase führt dazu, dass nachfolgend ein Chromogen zu einem farbigen Substrat umgesetzt und unter dem Lichtmikroskop sichtbar gemacht wird. Das Signal erscheint so unter Verwendung des Avidin-Biotin-Komplexes im Vergleich zu einer einfachen Immunmarkierung um ein Vielfaches verstärkt. Somit genügen geringere Primärantikörperkonzentrationen, wodurch auch die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Antikörperbindungen sinkt.

## Spezifität und Qualitätssicherung

Die zu verwendende Konzentration des Primärantikörpers wurde vorab auf Gewebe ermittelt, dessen Expressionsmuster für das jeweilige Antigen bekannt war. Als optimale Konzentration wurde diejenige ausgewählt, die ein möglichst kräftiges Signal bei zugleich günstigen Signal-Hintergrundverhältnissen generierte.

Um das Auftreten einer unspezifischen Umsetzung des Chromogens zu reduzieren, wurde die gewebeigene endogene Peroxidase durch Wasserstoffperoxid blockiert. Zusätzlich wurden auf jedem Gewebeschnitt unspezifische Bindungsstellen für den Sekundärantikörper blockiert, indem Normalserum der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt, aufgetragen wurde.

Bei jeder immunhistochemischen Färbung wurde eine Positivkontrolle aus Multiblockgewebe mitgeführt, bei dem das zu untersuchende Antigen sicher exprimiert wurde. Pro gefärbten Objektträger wurde zudem ein Gewebeschnitt lediglich mit dem Verdünnungsmedium (ohne Primärantikörper) inkubiert, um eine Negativprobe zu erhalten.

## Standardprotokoll Immunhistochemie

Das Entparaffinieren, Wässern und Blockieren der endogenen Peroxidase erfolgte unabhängig vom Primärantikörper nach folgendem Protokoll:

Arbeitsschritt	Medium	Dauer
Entparaffinieren	Xylol	3 mal 5 min
Hydrieren	100 % Ethanol	2 mal 2 min
Blockieren der endogenen Peroxidase	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol (in einer abgedunkelten Kammer)	10 min
Hydrieren	96 % Ethanol	2 mal 2 min
	70 % Ethanol	2 min
	50 % Ethanol	2 min
Spülen	dH <sub>2</sub> O	5 min

**Tabelle 15: Standardprotokoll Vorbereitung immunhistochemische Färbung.**

Je nach verwendetem Primärantikörper erfolgte als nächster Schritt zur Gewebe-Permeabilisierung die Inkubation mit 0,05 % Triton-X 100 in einem auf 37 °C erwärmten

Wärmeschrank für zehn Minuten. Nachfolgend wurden die Gewebeschnitte in 0,01 M Citrat-Puffer (pH 6,0) oder 0,01 M Tris/ 0,001 M EDTA-Puffer (pH 9,0) überführt und in der Mikrowelle bei 800 Watt für elf Minuten erhitzt. Anschließend verblieben die Schnitte für weitere 20 Minuten im Puffermedium, bis sie für den nächsten Arbeitsschritt abgekühlt waren. Dieses *heat induced epitope retrieval* (HIER) dient der Antigen-demaskierung. Somit wird sichergestellt, dass auch solche Epitope vom Primärantikörper erkannt werden, die zuvor noch, z. B. durch Aldehydvernetzung oder aber durch die Formalinfixierung, maskiert waren.

Vor dem Auftragen des Normalserums zum Blockieren wurden die einzelnen Gewebeschnitte auf jedem Objektträger mit einem hydrophoben Barrierestift umzirkelt.

Je nachdem, aus welcher Spezies der Sekundärantikörper gewonnen wurde, wurde das Gewebe für 30 Minuten mit normalem Ziegen Serum (engl.: *normal goat serum*; NGS) oder normalem Kaninchenserum (engl.: *normal rabbit serum*; NRS) inkubiert. Im Anschluss wurden pro eingezirkeltem Gewebeschnitt 25 µl des verdünnten Primärantikörpers gegeben und die Objektträger bei 4 °C über Nacht in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Kammer gelagert.

Ob die Permeabilisierung erfolgte, welcher Puffer für das HIER Verwendung fand, welches Normalserum für die Blockierung des Sekundärantikörpers benutzt wurde und in welcher Verdünnung der jeweilige Antikörper aufgetragen wurde, ist der Tabelle 16 zu entnehmen.

Primärantikörper	Herkunft	Verdünnung	Permeabilisierung	HIER	Blockierung 2.AK	Sekundärantikörper	Chromogen
BMP7	rab PAK	1:400 in PBS	-	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	10 % NGS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	AEC
BMPRII	rab PAK	1:400 in PBS	-	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	10 % NGS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	AEC
CD31	rat PAK	1:50 in AB-Diluent	+	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	5 % NGS	Biotin-xx goat-anti-rat IgG	AEC
Endothelin-1	rab PAK	1:1000 in 1x PBS	-	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	10 % NGS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	AEC
Integrin alIb (CD41)	rat PAK	1:50 in 1x PBS	+	10 mM Tris/ 1mM EDTA pH 9,0	5 % NGS	Biotin-xx goat-anti-rat IgG	NovaRed
MAC2	rat PAK	1:400 in AB-Diluent	-	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	10 % NGS	Biotin-xx goat-anti-rat IgG	AEC
MMP9	goat PAK	1:50 in 1x PBS	-	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	10 % NRS	Biotin-xx rabbit-anti-goat IgG	AEC
PAI-1	rab PAK	1:250 in 1x PBS	-	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	10 % NGS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	AEC
PCNA	mou MAK	1:500 in 1x PBS	-	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	10 % NGS	Biotin-xx goat-anti-mouse IgG	DAB
SMA	mou MAK	1:500 in 1x PBS	-	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	10 % NGS	Biotin-xx goat-anti-mouse IgG	AEC
Terr119	rat PAK	1:100 in AB-Diluent	-	10 mM Tris/ 1mM EDTA pH 9,0	5 % NGS	Biotin-xx goat-anti-rat IgG	AEC
TGFbRII	rab PAK	1:30 in 1x PBS	-	0,01 M Citrat-Puffer pH 6,0	10 % NGS	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	AEC
Thrombin	rab PAK	1:50 in 0,5 % Milchpulver	0,2%	10 mM Tris/ 1mM EDTA pH 9,0	5% Milchpulver	Biotin-xx goat-anti-rabbit IgG	AEC
			TTX100				

**Tabelle 16: Übersicht Primärantikörper und korrespondierende Sekundärantikörper Immunhistochemie.** rab = Kaninchen (rabbit), rat = Ratte (rat); PAK

= polyklonaler Antikörper, MAK = monoklonaler Antikörper, AEC = AEC-Chromogen (Aminoethylcarbazol), DAB = DAB-Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin).

Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst dreimal in 1x PBS für jeweils fünf Minuten gespült. Anschließend wurde der jeweilige Sekundärantikörper (s. Tabelle 16) in einer Verdünnung von 1:1000 auf das Gewebe pipettiert und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Färben nach der ABC-Methode und das Gegenfärben mit Gill's Hämatoxylin erfolgte je nach verwendetem Chromogen (siehe Tabelle 16) nach einem Standardprotokoll. Die Abläufe können Tabelle 17 und Tabelle 18 entnommen werden.

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Medium</b>	<b>Dauer</b>
Spülen	1x PBS	3 mal 5 min
ABC-Kopplung	Vectastain ABC-Kit Elite	30 min
Spülen	1x PBS	3 mal 5 min
Chromogen	AEC Substrat-Kit	10 bis 20 min Mikroskopkontrolle
Waschen	dH <sub>2</sub> O	5 min
Gegenfärben	Gill's Hämatoxylin	3 mal kurz eintauchen
Waschen	dH <sub>2</sub> O	5 min
Eindecken	ImmuMount, Deckgläschen	

**Tabelle 17: Färbeprotokoll der ABC-Methode mit AEC-Chromogen.**

Arbeitsschritt	Medium	Dauer
Spülen	1x PBS	3 mal 5 min
ABC-Kopplung	Vectastain ABC-Kit Elite	30 min
Spülen	1x PBS	3 mal 5 min
Chromogen	DAB Substrat-Kit	2 bis 3 min
Waschen	dH <sub>2</sub> O	5 min
Gegenfärben	Gill's Hämatoxylin	3 mal kurz eintauchen
Waschen	Leitungswasser	bis klar
Dehydrieren	96 % Ethanol	2 mal 2 min
	100 % Ethanol	2 mal 2 min
Intermedium	Roticlear	2 mal 5 min
Eindecken	Entellan, Deckgläschen	

**Tabelle 18: Färbeprotokoll der ABC-Methode mit DAB-Chromogen.**

## 4.7 Immunfluoreszenz

Neben der immunhistologischen Färbung stellt die Immunfluoreszenz eine weitere Möglichkeit dar, bestimmte Epitope in einem Gewebe sichtbar zu machen. Ähnlich wie in der Immunhistologie wird auch bei dieser Methode zunächst ein Primärantikörper aufgetragen, der sich an das zu untersuchende Antigen anlagert. Durch die anschließende Inkubation mit einem fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper können unter einem Fluoreszenzmikroskop Lichtemissionen einer bestimmten, je nach verwendetem Sekundärantikörper fest definierten, Wellenlänge detektiert werden (86). Bei einer Wellenlänge von 555 nm wird die Emission von rotem Licht angeregt, bei einer Wellenlänge von 488 nm die von grünem. Somit lässt sich die feingewebliche Verteilung des zu analysierenden Antigens darstellen.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse wurden nicht mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop begutachtet, sondern mit Hilfe eines Laser-Konfokalmikroskops (Leica LSM 100). Durch Verwendung des Lasers wird zu jedem Zeitpunkt nur eine bestimmte Bildebene beleuchtet und das zu untersuchende Gewebe wird rasterförmig durchfahren. Es wird nur die sich im Fokus befindliche Ebene scharf eingestellt und vom Laser erfasst, Licht aus anderen Ebenen wird blockiert. Erst im Anschluss wird ein vollständiges Bild erzeugt (87, 88). Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie

erlaubt so die Reduktion von Hintergrundsignalen, da der Kontrast im erzeugten Bild sehr viel höher eingestellt ist, als es bei der regulären Lichtmikroskopie der Fall ist. Die Immunfluoreszenzfärbung dieser Arbeit wurden als Doppelfärbung angefertigt, es wurden demnach zeitgleich zwei Primärantikörper aufgetragen und nach deren Inkubation ebenfalls zwei Sekundärantikörper verwendet.

Die Aufnahmen am Konfokalmikroskop wurden von [REDACTED] vorgenommen.

### Standardprotokoll Immunfluoreszenz

Das Auftauen, Wässern und Vorbereiten der Kryoschnitte für die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte von diesem unabhängig und umfasste folgende Arbeitsschritte:

Arbeitsschritt	Medium	Dauer
Auftauen	-	ca. 5 min
Hydrieren	1x PBS	5 min
Fixierung	Aceton	10 min bei -20 °C
Trocknen	unter dem Abzug	ca. 5 min
Hydrieren	1x PBS	5 min
Blockade und Permeabilisierung	0,05 % Triton X-100	10 min bei 37 °C
Hydrieren	1x PBS	3 mal 5 min
Gewebe einzirkeln	Roti-Liquid Barrier	

**Tabelle 19: Standardprotokoll Immunfluoreszenz.**

Im Anschluss an das Einzirkeln der Gewebeproben erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern. Antikörper gegen CD31 (Dianova, DIA-310) und gegen TGF $\beta$ RII (Thermo Scientific, PA5-35076) wurden jeweils im Verhältnis 1:100 in 1x PBS verdünnt und auf die Gewebeproben appliziert. Anschließend wurden die Präparate über Nacht bei 4 °C in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Box gelagert. Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst dreimal in 1x PBS für jeweils fünf Minuten gespült. Es erfolgte

die Inkubation mit den korrespondierenden sekundären Antikörpern. Zur Sichtbarmachung der Zellkerne wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) in einer Verdünnung von 1:1000 in 1x PBS verwendet und zeitgleich mit den Sekundärantikörpern (FITC *donkey anti-rat*, Emissionsmaximum bei 488 nm, Verdünnung 1:500 in 1x PBS; MFP 555 *goat anti-rabbit*, Emissionsmaximum 555 nm, Verdünnung 1:500 in 1x PBS) aufgetragen. Nach dem Auftragen der Antikörper-DAPI-Lösung wurden die Präparate in eine lichtundurchlässige Kammer überführt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimalig in 1x PBS für jeweils fünf Minuten gespült. Zum Abschluss wurden die Objektträger für zwei Minuten in destilliertes Wasser überführt. Das Eindecken der Objektträger erfolgte unter sparsamer Verwendung von *Fluorescence Mounting medium* und die fertigen Schnitte wurden bis zur zeitnahen Erstellung der Bilder lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

## **4.8 Auswertung der histologischen und immunhistochemischen Färbungen**

Die angefärbten Gewebeschnitte wurden unter dem Mikroskop (Olympus BX54) betrachtet und die Bilder mit Hilfe der eingebauten Digitalkamera (*MicroPublisher 5.0 RTV*) und dem Bildverarbeitungsprogramm *ImagePro Plus* Version 7 aufgenommen. Aufgrund der Größe der VCI-Kompartimente bedingt durch die longitudinale Schnittführung, wurden jeweils von einer Gewebeprobe mehrere Ausschnitte mit derselben Vergrößerung abfotografiert und durch die Software im Nachhinein zu einem kompletten Bild zusammengeführt. Die Aufnahmen der mit Pikro-Siriusrot angefärbten Gewebeschnitte wurden unter Zuhilfenahme eines Polarisators (U-Pot, Olympus) und der Verwendung eines speziellen Objektivträgers mit eingebautem Polarisator (U-D6RE, Olympus) angefertigt. Die Markierung spezieller Gewebeanteile erfolgte mittels der Farberkennung der *ImagePro Plus*-Software.

### **4.8.1 Größenbestimmung der Thromben und Fibrose**

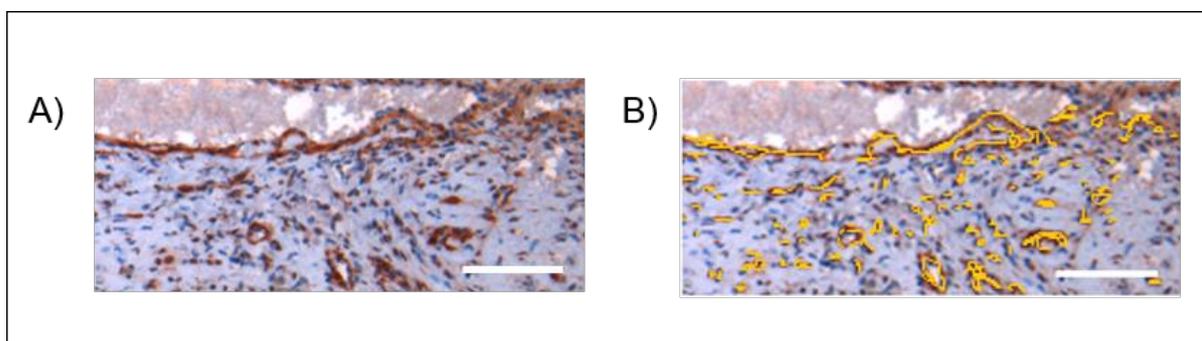
Das Ausmessen der Thromben erfolgte an nach der Carstairs-Methode gefärbten Schnitten. Pro Maus wurden wenn möglich mindestens drei Schnitte ausgewählt, um

die unterschiedlichen Schnitthöhen zu berücksichtigen. Die Thrombusfläche wurde als Mittelwert der erhobenen longitudinalen Schnittflächen in einer Excel-Tabelle berechnet. Da als Folge der Längsschnitte das Gefäßlumen der Vene auf den Objektträgern häufig nicht intakt war, konnte die durch den Thrombus verursachte Lumenstenose nicht ermittelt werden.

Zur Ermittlung der fibrinreichen und somit nicht fibrotischen Areale wurde bei den Aufnahmen der Carstairs-Färbung die rote Fläche innerhalb der Thromben in Relation zur gesamten Thrombusfläche gesetzt. Mittels der Markierung blau gefärbten Gewebes konnte prozentual der Anteil der Fibrose ermittelt werden. Analog hierzu wurde der Anteil kollagener Fasern durch die Piko-Siriusrot-Färbung bestimmt.

#### 4.8.2 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Zur Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden die Antikörperpositiven Areale markiert und in Relation zur Thrombusfläche gesetzt.



**Abbildung 9: Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.** (A) Exemplarische Aufnahme einer immunhistochemischen Färbung für TGFβRII. Maßstab 100 µm. (B) Farbauswahl der immunpositiven Fläche (gelb umrandet) in Image Pro Plus 7.0. Maßstab 100 µm.

### 4.9 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (engl.: *standard error of the mean*; SEM) dargestellt. Ob die gemessenen Daten normalverteilt waren, wurde durch den *D'Agostino and Pearson Omnibus*-Test ermittelt. War die Normalverteilung gegeben, so wurde zum Vergleich zweier voneinander unabhängiger Gruppen der *Student's t-Test* herangezogen. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde

der *ANOVA*-Test (engl.: *analysis of variance*) durchgeführt und anschließend die sich daraus ergebenden Mittelwerte durch den *Bonferroni*-Test verglichen. Lag in mindestens einer der Gruppen keine Normalverteilung der Messwerte vor, so wurde zur Gegenüberstellung der *Mann-Whitney*-Test angewandt. Wurden mehr als zwei Gruppen gegenübergestellt, wurde mit dem *Kruskal-Wallis*-Test gerechnet. Das statistische Signifikanzniveau wurde für Werte von  $p < 0,05$  angenommen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software *GraphPad Prism* Version 7.0.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Nachweis der plättchenspezifischen Deletion von TGF $\beta$ 1

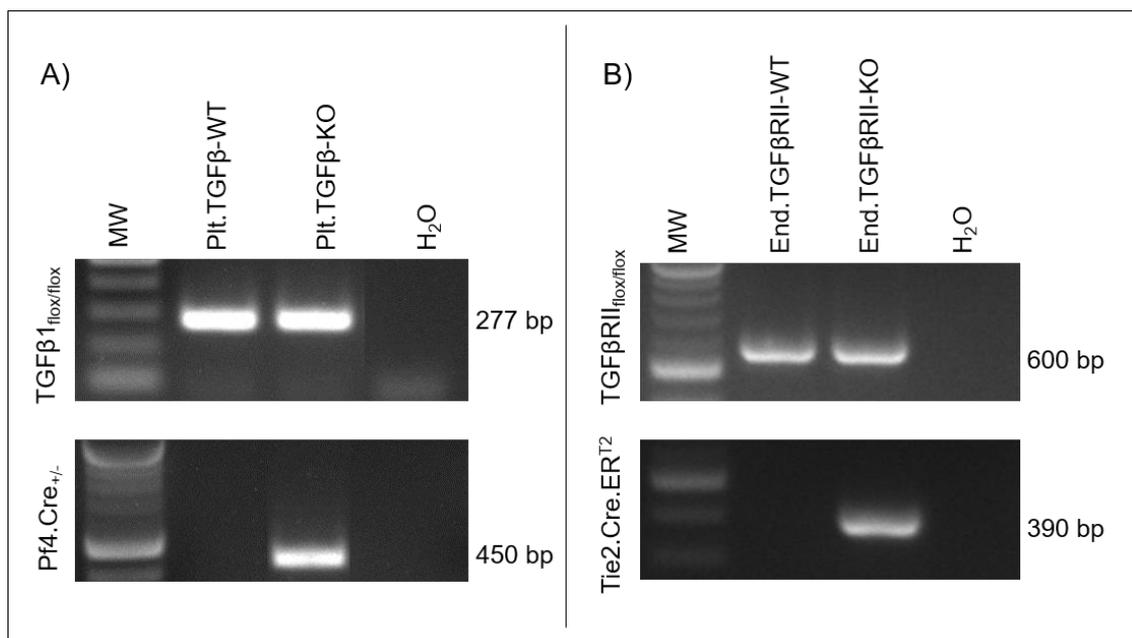
Um die Bedeutung von TGF $\beta$ , freigesetzt aus aktivierten Blutplättchen, für vaskuläre Umbauprozesse nach venöser Thrombose zu untersuchen, wurde eine Mauslinie verwendet, in der TGF $\beta$  in allen Pf4-exprimierenden Zellen (Megakaryozyten, Thrombozyten) deletiert wird, verwendet. Diese Tiere wurden uns über Professor Dr. Markus Bosman, Centrum für Thrombose und Hämostase, Universitätsmedizin Mainz, zur Verfügung gestellt. Um zunächst den Nachweis der plättchenspezifischen TGF $\beta$ 1-Deletion zu erbringen, wurde zunächst eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt und die DNA-Produkte anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Die zuvor aus Ohrstanz- bzw. Mausschwanzbiopsien isolierte genomische DNA der Versuchstiere wurde mit den unter Kapitel 3.7 aufgeführten Primern amplifiziert. Das Vorhandensein der homozygoten Variante des TGF $\beta$ 1-loxP-Allels (TGF $\beta$ 1<sub>flox/flox</sub>) konnte durch ein 277 bp großes Produkt bestätigt werden. Dieser Genotyp konnte sowohl für Versuchstiere der Wildtypgruppe als auch der Knockoutgruppe nachgewiesen werden. Mit einem 450 bp großen Produkt konnte für die Knockoutgruppe zusätzlich das Cre-Transgen nachgewiesen werden. Mäuse der Plt.TGF $\beta$ -KO-Gruppe waren Cre-positiv (Pf4.Cre+/-), die der Plt.TGF $\beta$ -WT-Gruppe Cre-negativ (Pf4.Cre-/-). In einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe (89) konnten wir bereits die signifikant erniedrigten TGF $\beta$ -Spiegel im Plasma von Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen nachweisen.

## 5.2 Nachweis der endothelspezifischen Deletion von TGF $\beta$ RII

Um mehr Aufschluss über die Rolle und Funktion weiterer Faktoren der TGF $\beta$ -Signalkaskade in Bezug auf vaskuläre Umbauprozesse nach venöser Thrombose zu erhalten, kam eine genmodifizierte Mauslinie zum Einsatz, in der das Gen für TGF $\beta$  Typ II-Rezeptoren spezifisch in Endothelzellen deletiert worden war.

Mittels Genotypisierungs-PCR konnte nachgewiesen werden, dass das TGF $\beta$ RII-loxP-Allel mit einer Größe von 600 bp homozygot vorhanden war. Des Weiteren konnte im End.TGF $\beta$ RII-KO-Genotyp auch das Vorhandensein des Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup>-Transgens mit einer Größe von 390 bp nachgewiesen werden. Der endothelspezifische Knockout des TGF $\beta$ RII und die damit einhergehende reduzierte Expression des Rezeptors im Endothel der transgenen Mäuse konnte darüber hinaus immunhistologisch bestätigt werden (s. Abbildung 15 auf Seite 72).



**Abbildung 10: Ergebnisse der Genotypisierung der transgenen Mauslinien.** Repräsentative Bilder.

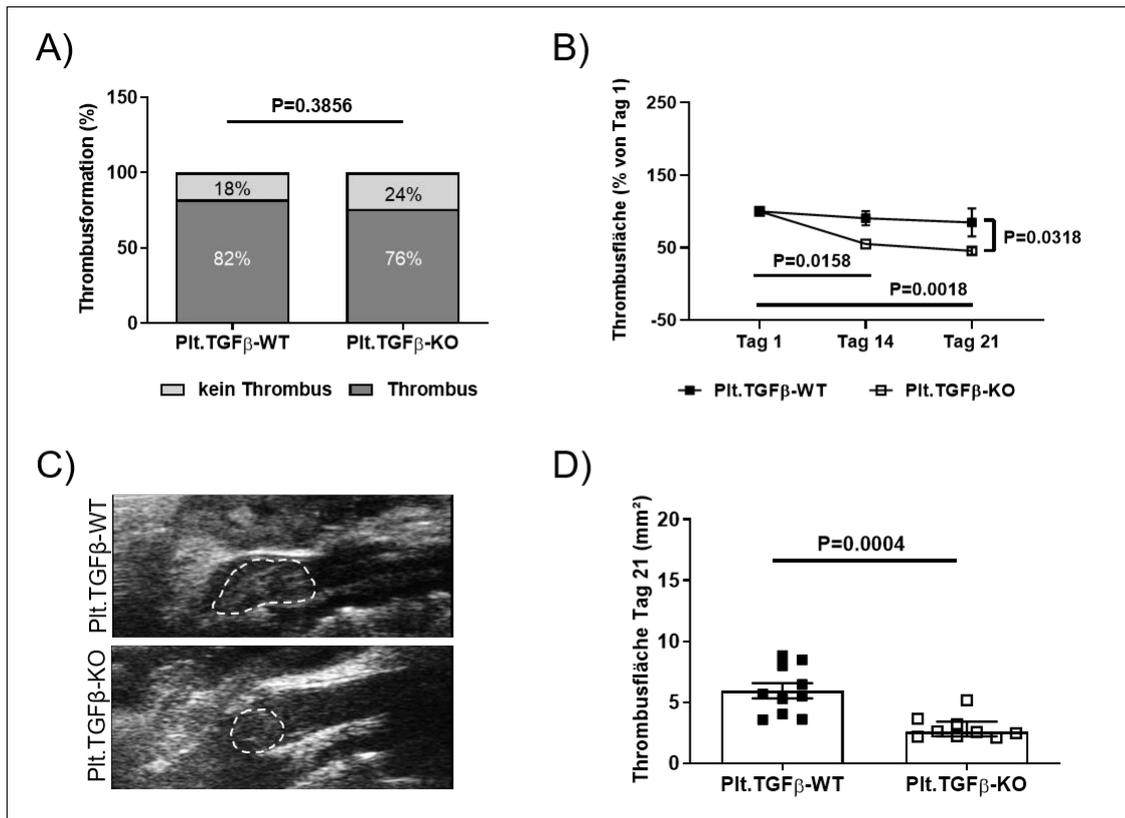
**(A)** Beide Mausgruppen sind homozygot positiv für das TGF $\beta$ 1<sub>flox/flox</sub>-Allel (277 bp Bande); nur die Plt.TGF $\beta$ 1-KO-Mäuse sind positiv für das Pf4.Cre-Transgen (450 bp Bande). **(B)** Beide Mausgruppen

sind homozygot positiv für das TGFβRII<sub>flox/flox</sub>-Allel (600 bp Bande); nur die End.TGFβRII-KO-Mäuse sind positiv für das Tie2.Cre.ER<sup>T2</sup>-Transgen (390 bp Bande).

### 5.3 VCI-Ligatur und postoperative Ultraschalluntersuchung

#### Plättchenspezifische Deletion von TGFβ1 resultiert in schnellerer Auflösung venöser Thrombosen

Um mehr über die Bedeutung und den Einfluss von TGFβ1 im Krankheitsbild der venösen Thrombose zu erfahren, wurden genetisch modifizierte Mäuse mit einem plättchenspezifischen Knockout von TGFβ1 (Plt.TGFβ-KO) und eine entsprechende Kontrollgruppe (Plt.TGFβ-WT) einer Ligatur der VCI unterzogen. Durch die so induzierte Blutflussverlangsamung und -stase entwickelten die Versuchstiere eine venöse Thrombose. Mittels einer sich anschließenden, nicht-invasiven Ultraschallkontrolle wurde über einen Zeitraum von drei Wochen in wöchentlichen Intervallen die Thrombusgröße dokumentiert. Hinsichtlich der initialen Formierung eines Thrombus am ersten postoperativen Tag, zeigten beide Gruppen ähnliche Häufigkeiten (76 vs. 82 % in Plt.TGFβ-WT;  $p = ns$ ). Zudem bestand zu diesem Zeitpunkt auch kein Unterschied in der Größe der Blutgerinnsel ( $p = ns$ ). Es konnte festgestellt werden, dass sich die Größe der Thromben über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg stetig verkleinerte, dass dies jedoch in der KO-Gruppe signifikant schneller stattfand ( $p = 0,0156$  an Tag 21). An Tag 21 war zudem auch die absolute Thrombusfläche der Plt.TGFβ-KO-Mäuse signifikant kleiner als die der WT-Gruppe ( $2,91 \pm 0,33$  vs.  $5,95 \pm 0,62$  mm<sup>2</sup>;  $p = 0,0004$ ) (s. Abbildung 11).

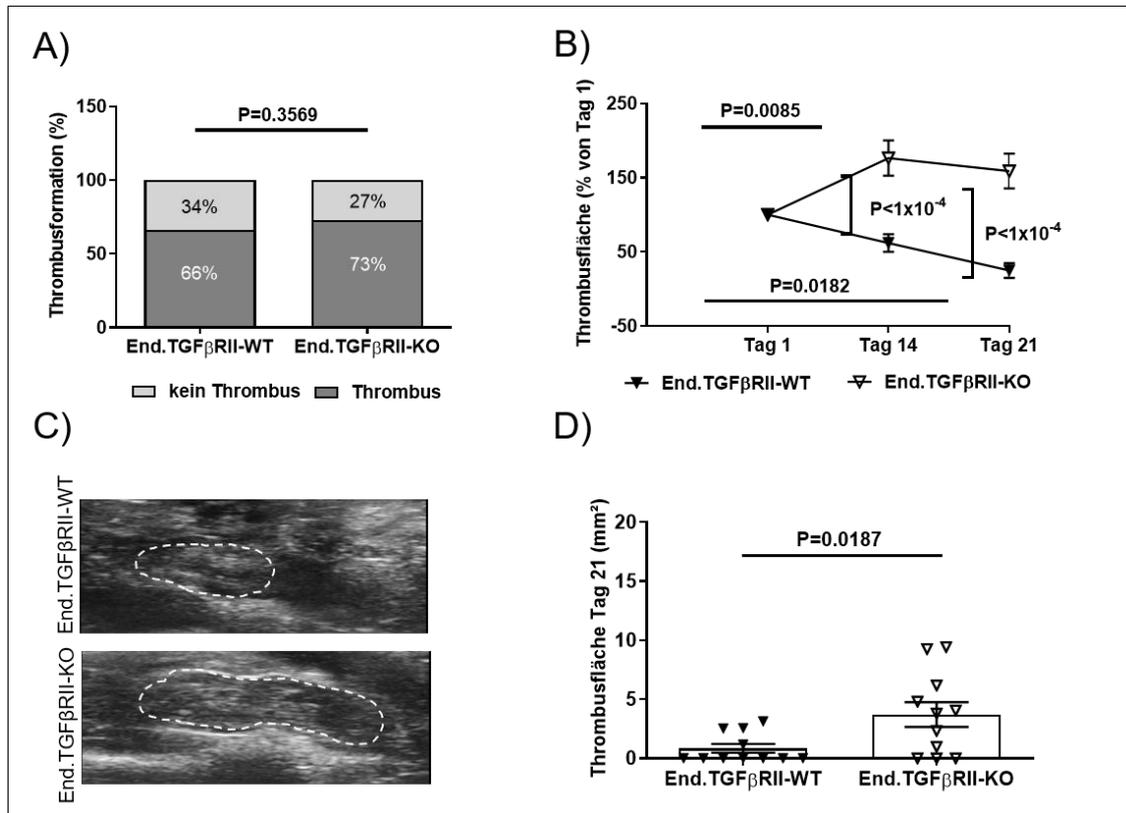


**Abbildung 11: Postoperative Ultraschalluntersuchung der Plt.TGFβ-Versuchstiere. (A)** Rate der Thrombusformation am ersten postoperativen Tag. **(B)** Verlauf der Größenentwicklung der Thromben in Relation zur Thrombusgröße am ersten postoperativen Tag. **(C)** Repräsentative Ultraschallbilder 21 Tage nach der VCI-Ligatur. **(D)** Absolute Thrombusgröße an Tag 21 nach VCI-Ligatur. Für Plt.TGFβ-WT und Plt.TGFβ-KO n=10.

### Die endothelspezifische Deletion des TGFβRII ist mit verlangsamter Thrombusauflösung assoziiert

Analog zu den Plt.TGFβ-Mäusen wurden auch die genetisch modifizierten Mäuse mit endothelspezifischem Knockout des TGFβRII und entsprechende Kontrolltiere einer VCI-Ligatur unterzogen und über einen Zeitraum von drei Wochen mittels Ultraschall auf das Vorhandensein eines venösen Thrombus und dessen Größenentwicklung hin untersucht. Hierbei zeigte sich, dass 73 % der End.TGFβRII-KO-Mäuse und 66 % der End.TGFβRII-WT-Mäuse als Folge der Operation eine Thrombose entwickelten ( $p = ns$ ). Gemessen zur Thrombusgröße an Tag eins fiel auf, dass eine endothelspezifische Deletion des TGFβRII eine signifikant langsamere Auflösung des Thrombus mit sich brachte. Bereits 14 Tage postoperativ waren die Thromben der KO-Mäuse signifikant größer als die der WT-Mäuse im Vergleich zur jeweiligen Thrombusfläche am ersten

postoperativen Tag ( $p < 1 \times 10^{-4}$ ) und bis Tag 21 waren diese Unterschiede weiter vorhanden. Absolut gesprochen waren die Thromben der End.TGF $\beta$ RII-KO-Tiere an Tag 21  $3,71 \pm 1,05 \text{ mm}^2$  groß, wohingegen die Thromben der Kontrollgruppe nur  $0,85 \pm 0,38 \text{ mm}^2$  maßen ( $p = 0,0187$ ).



**Abbildung 12: Postoperative Ultraschalluntersuchungen der End.TGF $\beta$ RII-Versuchstiere.** (A) Rate der Thrombusformation am ersten postoperativen Tag. (B) Verlauf der Größenentwicklung der Thromben in Relation zur Thrombusgröße am ersten postoperativen Tag. (C) Repräsentative Ultraschallbilder 21 Tage nach der VCI-Ligatur. (D) Absolute Thrombusgröße an Tag 21 nach VCI-Ligatur. End.TGF $\beta$ RII-WT n= 10, End.TGF $\beta$ RII-KO n=11.

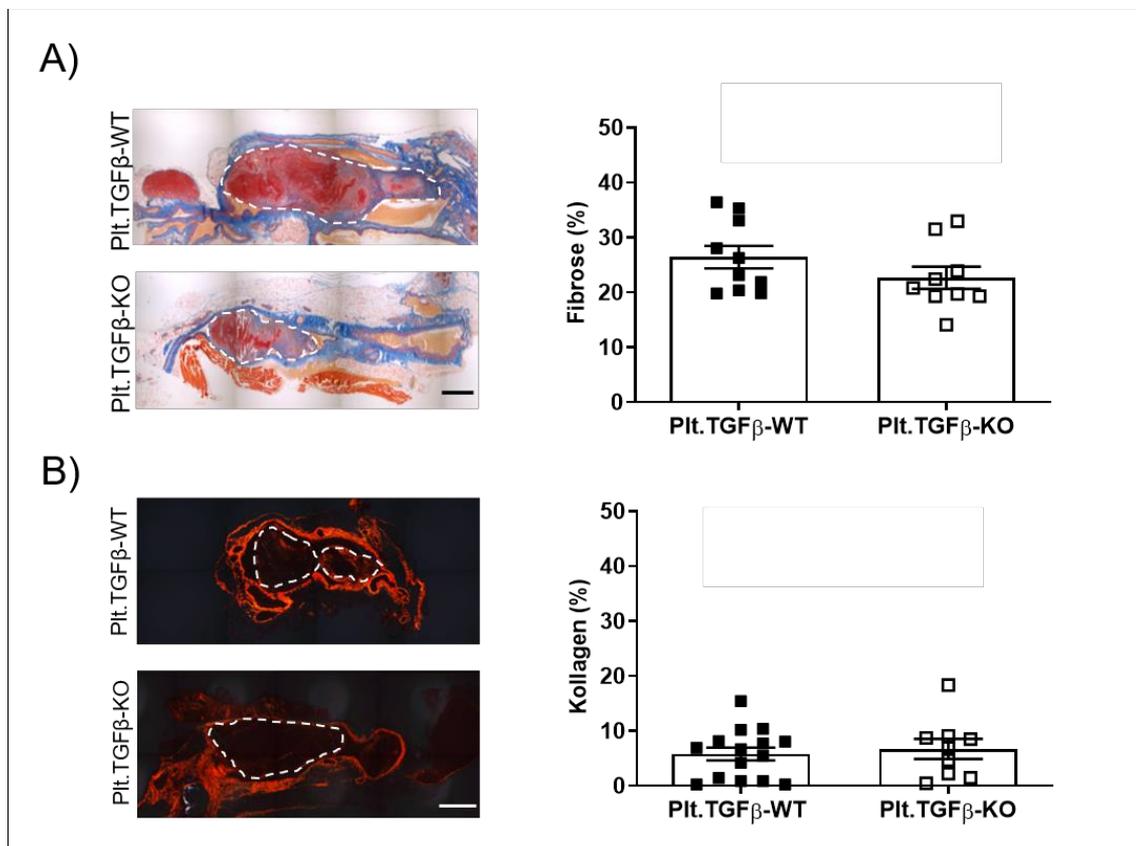
## 5.4 Histologische und immunhistochemische Untersuchung der venösen Thromben

Die Untersuchung der spezifischen morphologischen Eigenschaften der Thromben der unterschiedlichen Versuchskollektive fand nach der Gewebeentnahme und entsprechender Aufarbeitung des thrombotischen Materials (s. Kapitel 4.4) statt. An dieser Stelle sollen die unterschiedlichen Merkmale thematisch gruppiert präsentiert werden.

### Thrombusorganisation nach plättchenspezifischer Deletion von TGFβ1

Die histologische Färbung nach der Carstairs-Methode ließ erkennen, dass es keine Unterschiede bezüglich des Grads der Fibrosierung zwischen der KO- und WT-Gruppe gab ( $22,7 \pm 2,02$  vs.  $26,4 \pm 2,06$  %;  $p = ns$ ). Die Färbung mit Pikro-Siriusrot offenbarte ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich des Anteils an interstitiellem Kollagen bezogen auf die Gesamtgröße der Thromben ( $6,72 \pm 1,83$  vs.  $5,81 \pm 1,16$  %;  $p = ns$ ).

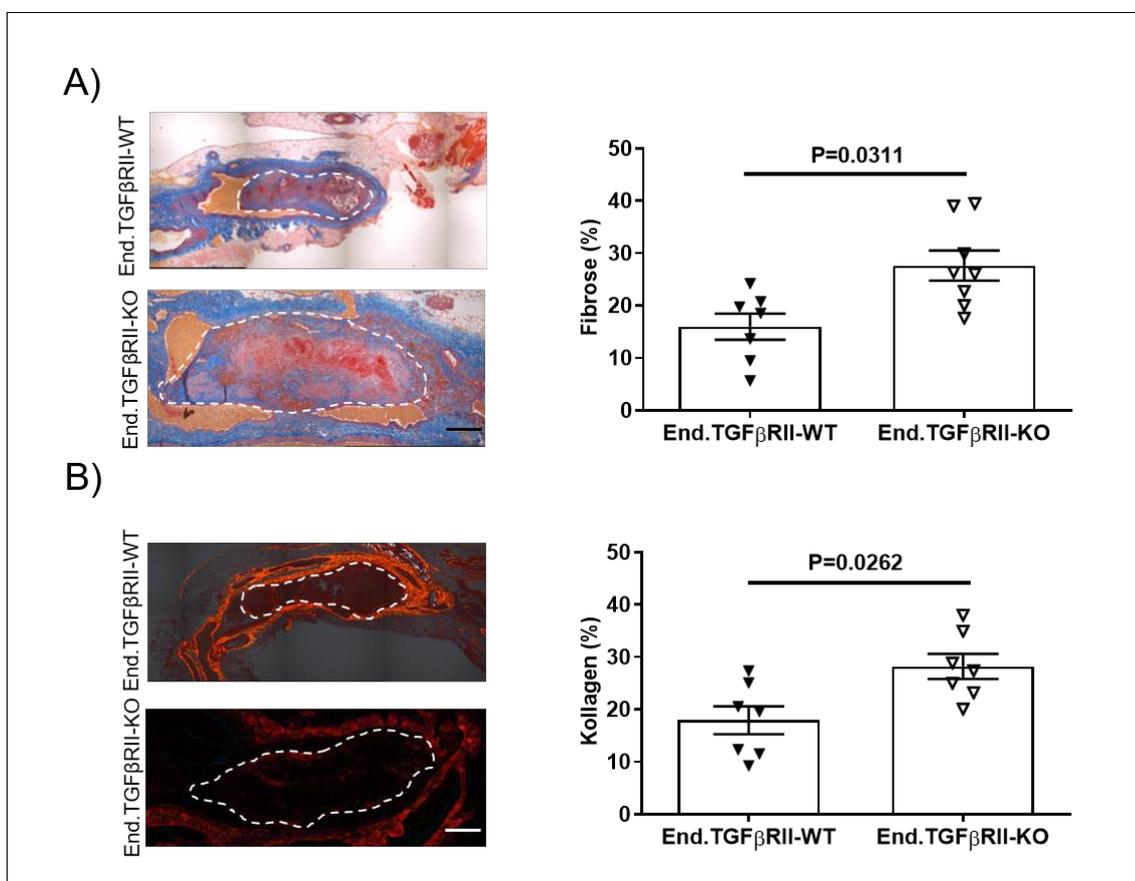
Die immunhistologische Analyse der Expression von SMA, einem Marker für mesenchymales Gewebe (90), lieferte ebenfalls keine Hinweise auf signifikante Unterschiede (Daten nicht gezeigt;  $p = ns$ ).



**Abbildung 13: Thrombusorganisation Plt.TGFβ1-Kollektiv.** Repräsentative Bilder. **(A)** Nachweis von Fibrose (blau) nach Carstairs. Plt.TGFβ-WT n=10, Plt.TGFβ-KO n=9. Maßstab 200 µm. **(B)** Nachweis von interstitiellem Kollagen mittels Pikro-Siriusrot. Plt.TGFβ-WT n=15, Plt.TGFβ-KO n=9. Maßstab 200 µm.

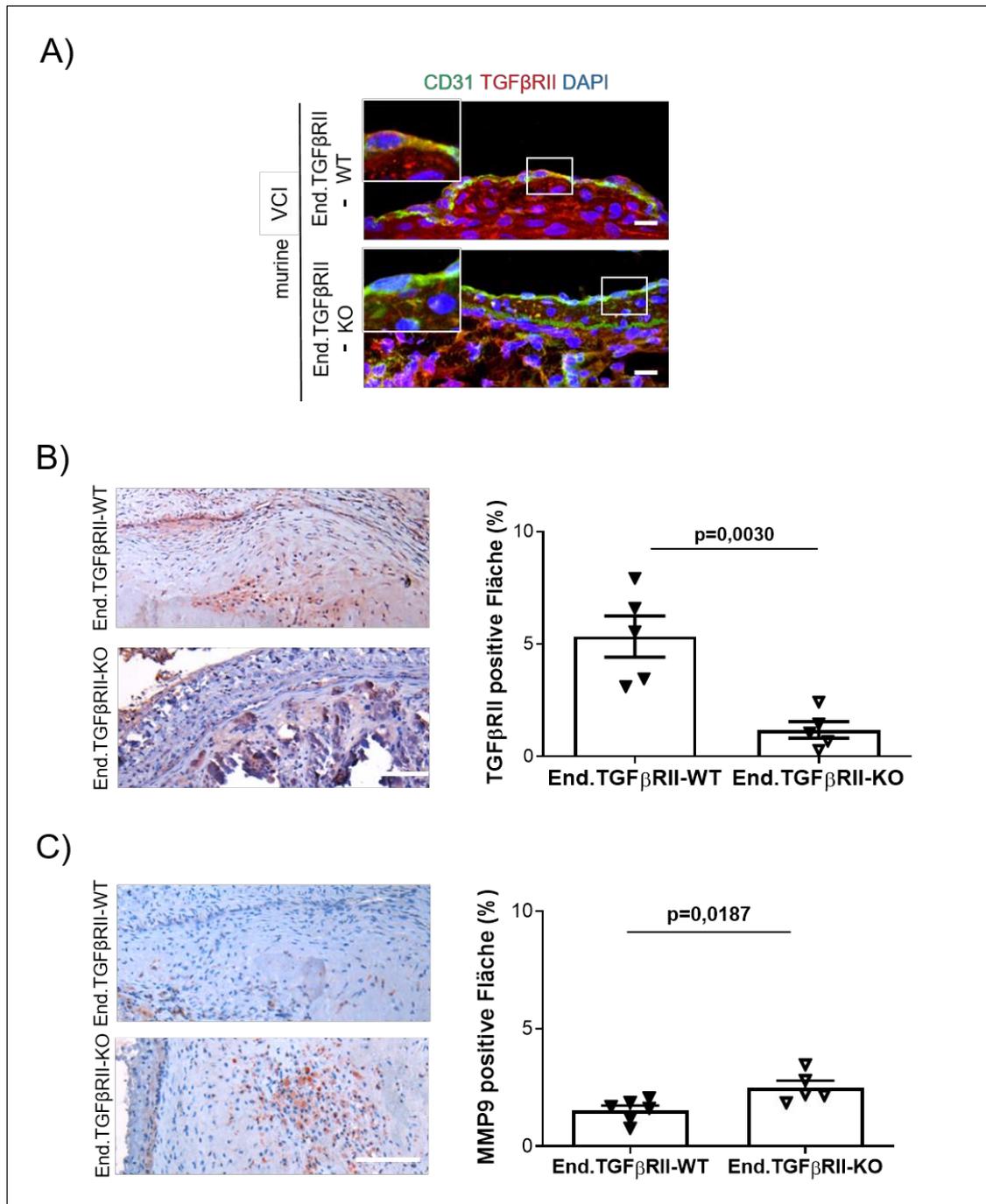
### Thrombusorganisation nach endothelspezifischer Deletion von TGF $\beta$ RII

Analog dazu wurden auch die Präparate des End.TGF $\beta$ RII-Kollektivs mit der Carstairs-Methode und der Piko-Siriusrot-Färbung gefärbt. Durch die Färbung nach Carstairs konnte gezeigt werden, dass die Thromben der Knockoutmäuse im Vergleich zu denen der Kontrollmäuse zu einem signifikant höheren Grad fibrotisch umgebaut waren ( $27,6 \pm 2,5$  vs.  $16,0 \pm 2,8$  %;  $p = 0,0311$ ) und mittels der Piko-Siriusrot-Färbung konnte ein signifikant erhöhter Gehalt interstitiellen Kollagens nachgewiesen werden ( $28,2 \pm 2,4$  vs.  $17,9 \pm 2,6$  %;  $p = 0,0262$ ).



**Abbildung 14: Thrombusorganisation End.TGF $\beta$ RII-Kollektiv.** Repräsentative Bilder. **(A)** Nachweis von Fibrose (blau) nach Carstairs. End.TGF $\beta$ RII-WT  $n=7$ , End.TGF $\beta$ RII-KO  $n=9$ . Maßstab 200  $\mu$ m. **(B)** Nachweis von interstitiellem Kollagen mittels Piko-Siriusrot. Für End.TGF $\beta$ RII-WT und End.TGF $\beta$ RII-KO  $n=7$ . Maßstab 200  $\mu$ m.





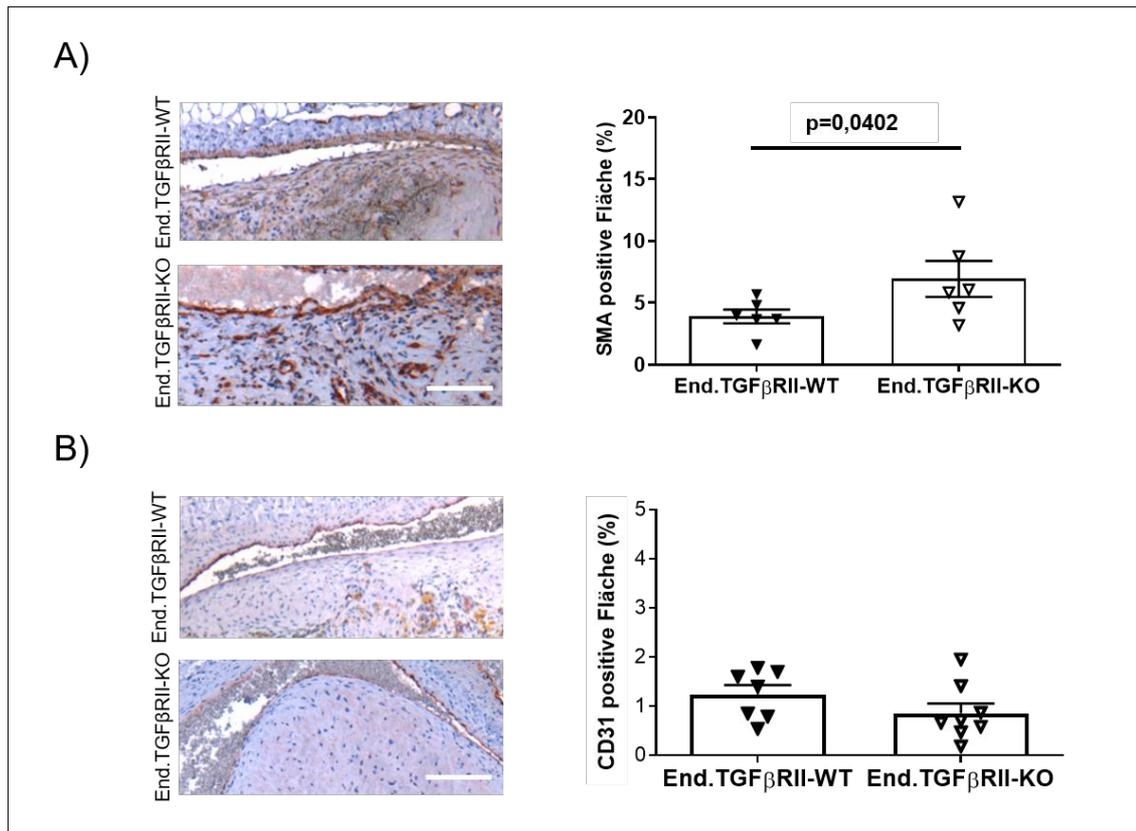
**Abbildung 15: Folgen der endothelspezifischen Deletion des TGFβRII.** Repräsentative Bilder. **(A)** CD31/TGFβRII-Doppelfärbung von VCI-Segmenten. Maßstab 10 µm. **(B)** Immunhistochemische Anfärbung von TGFβRII. Für End.TGFβRII-WT und End.TGFβRII-KO n=5. Maßstab 200 µm. **(C)** MMP9-immunpositive Fläche. End.TGFβRII-WT n=6. End.TGFβRII-KO n=5. Maßstab 200 µm.

## **Vermehrtes Auftreten einer EndMT nach endothelspezifischer Deletion von TGF $\beta$ RII**

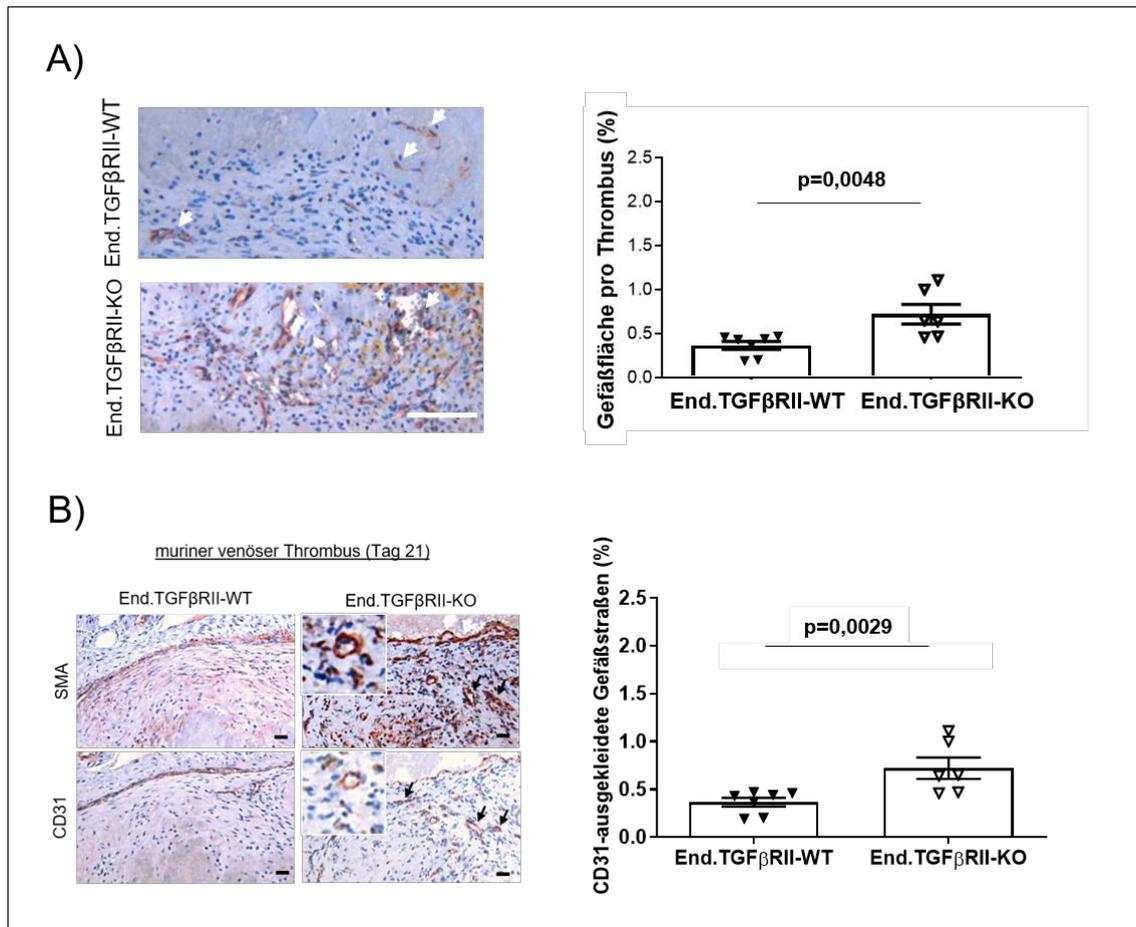
Die Analyse von Endothelzellen aus humanen CTEPH-PEAs und von humanen pulmonal-arteriellen Endothelzellen (engl.: *human pulmonary artery endothelial cells*; HPAEC), die mit TGF $\beta$ 1 stimuliert wurden, offenbarte eine Überexpression von Transkriptionsfaktoren, die bei der EndMT eine wichtige Rolle spielen (*Snail*, *Twist* und *Zeb1*; Daten nicht gezeigt). Diese Experimente waren Teil weiterführender Untersuchung im Rahmen des gesamten Projekts und wurden von [REDACTED] durchgeführt.

Passend hierzu ergab die immunhistochemische Analyse in Bezug auf den Nachweis des mesenchymalen Markers SMA signifikant größere SMA-immunpositive Areale in den End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen ( $6,9 \pm 0,5$  vs.  $3,9 \pm 1,4$  %;  $p = 0,0465$ ), wohingegen für die Expression des Endothelzellmarkers CD31 kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden konnte (s. Abbildung 16;  $p = ns$ ). Anhand der CD31-positiven endothelialen Strukturen konnten die angeschnittenen Gefäßlumina innerhalb des thrombotischen Gewebes quantifiziert werden. Es stellte sich heraus, dass die Thromben der End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäuse zu einem signifikant höheren Grad vaskularisiert waren ( $p = 0,0048$ ). Darüber hinaus fiel auf, dass SMA-Immunsignale häufig in Kolokalisation mit CD31-positiven Zellen auftraten, die entlang von Gefäßstraßen innerhalb der Thromben exprimiert wurden. Diese CD31-positiven Zellen waren in den Thromben der End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäuse signifikant stärker vertreten als in den WT-Mäusen (s. Abbildung 17;  $p = 0,0029$ ).

Um weitere Einflussfaktoren auf die Entstehung einer EndMT zu untersuchen, wurden murine Thromben auf das Vorkommen von Endothelin (ET-1) hin untersucht. ET-1 agiert als potenter physiologischer Vasokonstriktor und übt zusammen mit TGF $\beta$ 1 synergistisch Einfluss auf die Entstehung von extrazellulärer Matrix und Fibrose aus (94, 95). An Tag 21 nach der VCI-Ligatur konnte ein starkes ET-1-Immunsignal in den Thromben nachgewiesen werden, insbesondere in denen der End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäuse (Daten s. Abbildung 23 im Anhang;  $p = ns$ ).



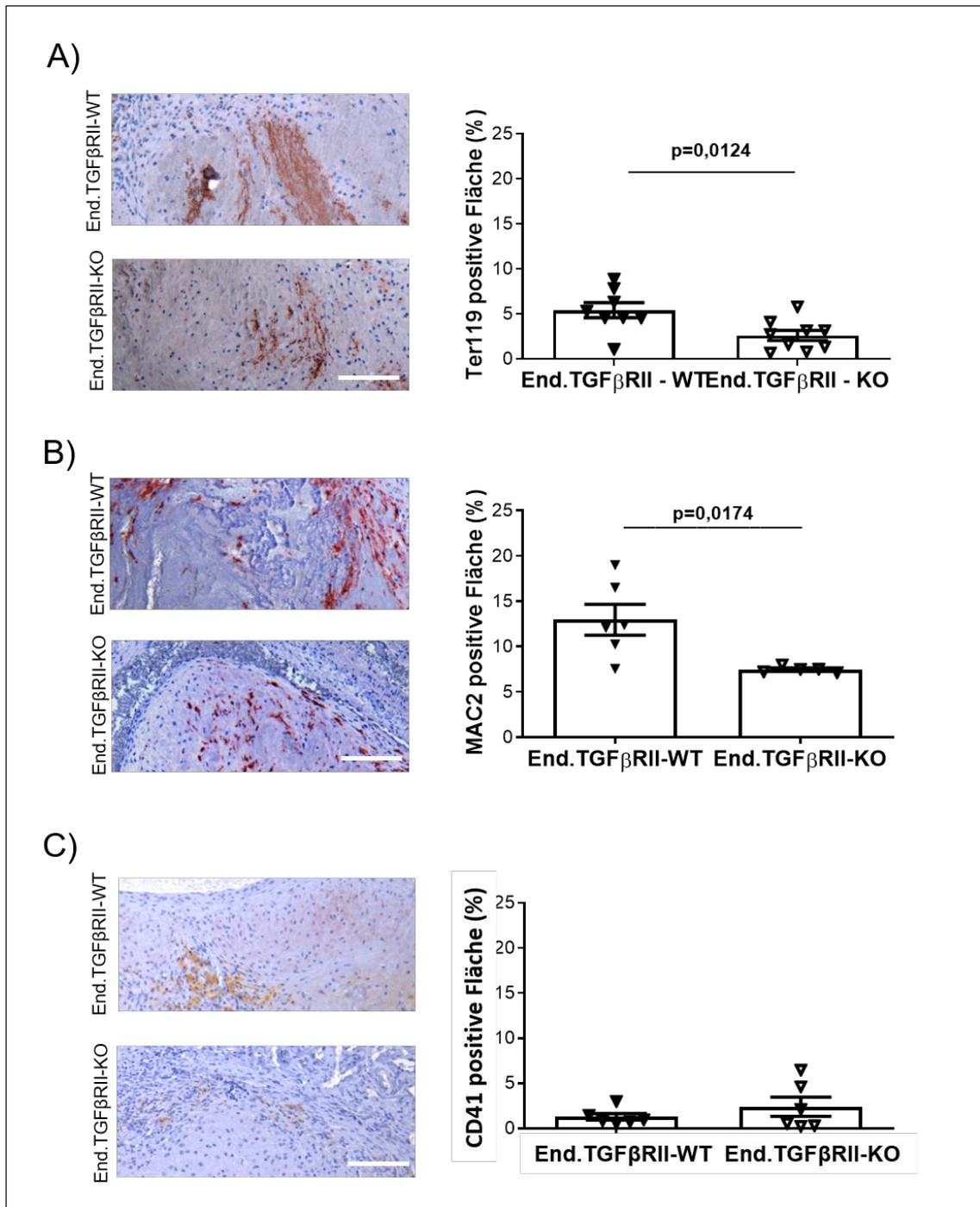
**Abbildung 16: EndMT nach endothelspezifischer Deletion des TGFβRII.** Repräsentative Bilder. .  
**(A)** SMA positives Immunsignal unabhängig von der Lokalisation innerhalb des Thrombus. Für End.TGFβRII-WT und End.TGFβRII-KO n=6. Maßstab 100 µm. **(B)** CD31 positives Immunsignal innerhalb des Thrombus unabhängig von der Lokalisation. End.TGFβRII-WT n=7, End.TGFβRII-KO n=8. Maßstab 100µm.



**Abbildung 17: Vaskularisation muriner Thromben nach endothelspezifischer Deletion des TGFβRII.** Repräsentative Bilder. **(A)** Die weißen Pfeile markieren die angeschnittenen Gefäßlumina innerhalb des Thrombus. Für End.TGFβRII-WT und End.TGFβ-KO n=6. Maßstab 100 μm. **(B)** Koexpression von CD31 und SMA in stark vaskularisierten Arealen des Thrombus bei End.TGFβRII-KO-Mäusen. Maßstab 10 μm. Graph unten rechts: Mit CD31-positiven Endothelzellen ausgekleidete Gefäßstraßen. End.TGFβRII-WT n=7, End.TGFβRII-KO n=6.

## Zellularität

Um mehr Aufschluss über die zellulären Bestandteile des thrombotischen Materials zu erhalten, wurden eine Reihe zellspezifischer Oberflächenantigene mittels Immunhistochemie sichtbar gemacht. Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche CD41, auch als  $\alpha$ IIb-Integrin bekannt (96), für welches zwischen den End.TGF $\beta$ RII-KO und WT-Mäusen kein Unterschied bezüglich der immunpositiven Fläche detektierbar war ( $p=ns$ ). Dies stützt unsere Ergebnisse bezüglich der gleichbleibenden Plättchenaktivität unabhängig vom Genotyp der Versuchskollektive (Daten nicht gezeigt) (93). Das Immunsignal des erythrozytenspezifischen Oberflächenmarkers Ter119 (97) hingegen war bei den KO-Mäusen signifikant weniger stark ausgeprägt als bei den WT-Mäusen ( $2,6 \pm 0,56$  vs.  $5,4 \pm 0,84$  %;  $p = 0,0124$ ). Von zusätzlichem Interesse war die Expression von Galectin-3, einem Protein, das unter anderem Einfluss auf die Aktivierung von Makrophagen hat (98). Mittels des Anti-MAC2-Antikörpers konnten Galectin-3-positive Flächen im Thrombus sichtbar gemacht werden. Drei Wochen nach erfolgter Ligatur der VCI war die MAC2-positive Fläche innerhalb der Thromben der Mäuse mit endothelspezifischem KO des TGF $\beta$ RII signifikant kleiner als beim Kontrollkollektiv ( $7,49 \pm 0,15$  vs.  $12,96 \pm 1,69$  %;  $p = 0,0174$ ).

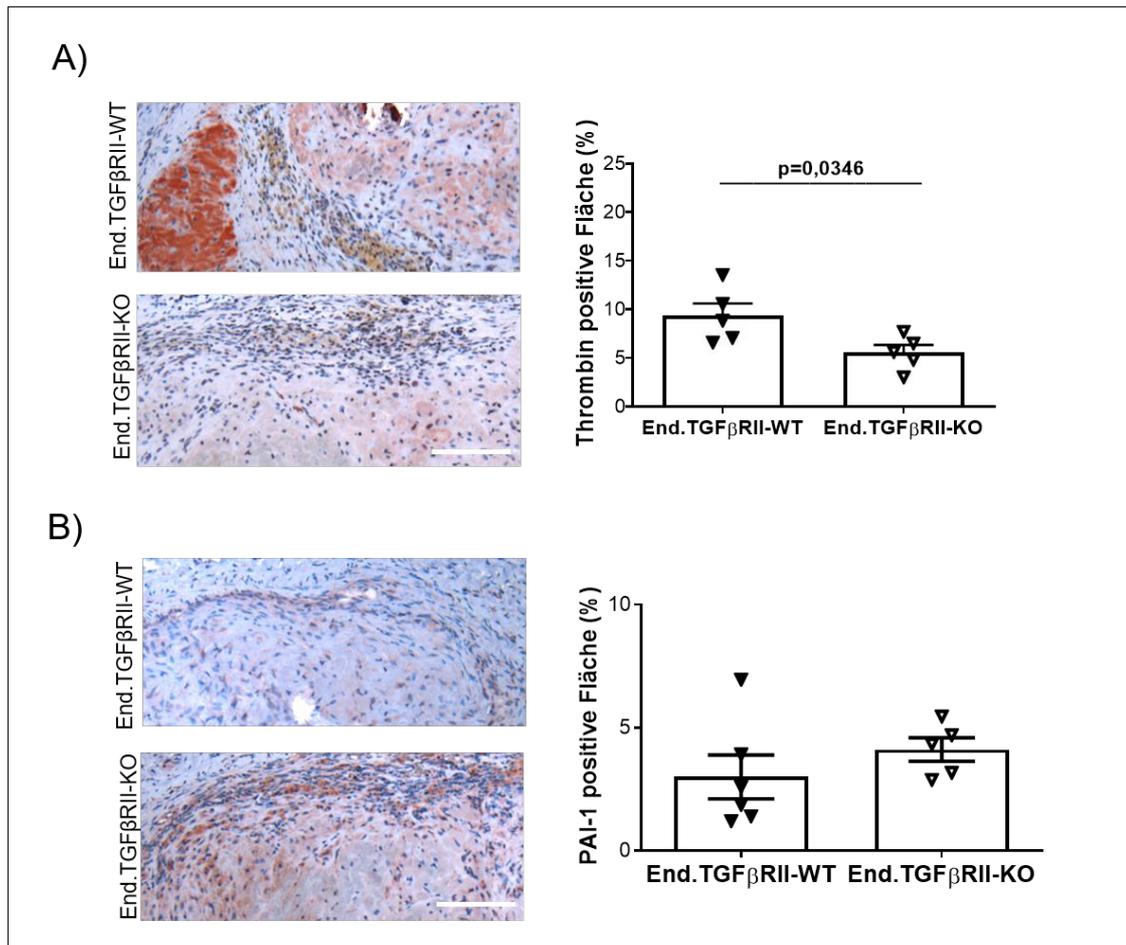


**Abbildung 18: Analyse der zellulären Zusammensetzung der venösen Thromben.** Repräsentative Bilder. **(A)** Ter119 positive Fläche. End.TGFβRII-WT n=8, End.TGFβRII-KO n=9. Maßstab 100 µm. **(B)** MAC2 positive Fläche. End.TGFβRII-WT n=6, End.TGFβRII-KO n=5. Maßstab 100 µm. **(C)** CD41 positive Fläche. Für End.TGFβRII-WT und End.TGFβRII-KO n=6. Maßstab 100µm.

## Blutgerinnung

Stellvertretend für die zahlreichen Faktoren, die das Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Fibrinolyse im menschlichen Körper aufrecht erhalten, wurden die durch die VCI-Ligatur entstandenen Thromben auf immunpositive Signale von Thrombin und dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) untersucht. Thrombin, auch als Faktor IIa bekannt, ist das wichtigste Enzym der sekundären Blutgerinnung. Es spaltet Fibrinogen zu Fibrin, welches sich daraufhin zu unlöslichen Polymeren zusammenlagert und durch Thrombusbildung die Blutgerinnung herbeiführt. Darüber hinaus aktiviert Thrombin weitere Faktoren der Gerinnungskaskade (23). Die Ermittlung der Thrombin-positiven Fläche ergab, dass diese bei End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen kleiner als bei den End.TGF $\beta$ RII-WT-Mäusen war, gemessen im Verhältnis zur Gesamtfläche der Thromben ( $5,55 \pm 2,45$  vs.  $9,35 \pm 1,49$  %;  $p = 0,0346$ ).

Plasminogen bzw. seine aktivierte Form Plasmin fungiert als wichtigster Gegenspieler zu Thrombin. Plasmin ist in der Lage, Fibrinpolymere aufzuspalten und unterstützt somit die Auflösung von Blutgerinnseln. PAI-1 wiederum inhibiert die Aktivierung von Plasminogen und stellt so einen Hemmstoff der Fibrinolyse dar (23). In Bezug auf das PAI-1-positive Signal innerhalb der Thromben konnte kein Unterschied zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe ermittelt werden ( $p = ns$ ).



**Abbildung 19: Expression von Gerinnungsfaktoren.** Repräsentative Bilder. **(A)** Thrombin positive Fläche. Für End.TGFβRII-WT und End.TGFβRII-KO n=5. Maßstab 100 µm. **(B)** PAI-1 positive Fläche. End.TGFβRII-WT n=6, End.TGFβRII-KO n=5. Maßstab 100 µm.

## Proliferation

Das *Proliferating-cell-nuclear*-Antigen (PCNA) ermöglicht die Vervielfältigung der gesamten DNA während der S-Phase des Zellzyklus (99). Somit kann PCNA als Marker für die DNA-Synthese fungieren und Aufschluss über die Proliferationsrate von Gewebe geben (100). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das murine venöse Gewebe mit einem gegen PCNA gerichteten Antikörper immunhistochemisch gefärbt und somit die Zellkerne sichtbar gemacht, in denen DNA-Synthese zum Endzeitpunkt des Untersuchungsraums (drei Wochen nach der VCI-Ligatur) stattgefunden hatte. In 86 % der Zellkerne von End.TGFβRII-KO-Mäusen konnte ein PCNA-Signal detektiert werden. Die Zellkerne der End.TGFβRII-WT-Mäuse waren nur zu 63 % für PCNA positiv. Obwohl sich daraus ein Trend ablesen lässt, ist das vorliegende Ergebnis statistisch nicht signifikant (Daten s. Abbildung 24 im Anhang;  $p = ns$ ).

## 6 Diskussion

Die CTEPH ist eine seltene, aber besonders schwere Form einer PH. Über die zugrundeliegenden Pathomechanismen, die die Entstehung einer CTEPH begünstigen, ist bisher wenig bekannt. Man geht jedoch davon aus, dass rezidivierende thromboembolische Ereignisse eine Rolle in der Pathogenese der CTEPH spielen. Ein operativer Eingriff im Sinne einer PEA stellt derzeit die einzige potentiell kurative Therapieoption dar.

Bei TGF $\beta$  handelt es um einen multifaktoriellen Wachstumsfaktor, der viele physiologische und pathologische Abläufe im menschlichen Organismus reguliert. Eine Mutation innerhalb der TGF $\beta$ -Superfamilie konnte als Hauptrisikofaktor in der Entstehung der PAH, einer weiteren Form der PH, identifiziert werden. Über die Rolle von TGF $\beta$  in der (Fehl-) Organisation von Thrombosen und seinen möglichen Einfluss auf die Entstehung einer CTEPH ist bisher jedoch wenig bekannt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es daher, die Auswirkung von TGF $\beta$  im vasculären Umbauprozess nach venöser Thrombose zu erfassen und den möglichen Einfluss von TGF $\beta$  auf die postthrombotische Entwicklung einer EndMT zu bestimmen. Dazu wurden Mäuse mit plättchenspezifischer Deletion von TGF $\beta$ 1 und Mäuse mit endothelspezifischer Deletion des TGF $\beta$ RII einer Ligatur der VCI unterzogen und die so erzeugten venösen Thromben zunächst *in vivo* mittels nicht-invasiver Ultraschalluntersuchungen beobachtet und nach Gewebeentnahme *ex vivo* histologisch und immunhistochemisch analysiert. In diese Arbeit weiterführende Experimenten wurden

auch Lungengewebe, Blutproben und isolierte Zelllinien der Versuchstiere näher untersucht. Ergänzend wurden die Ergebnisse der Mausmodelle mit den Analysen humaner CTEPH-Gewebe- und Plasmaproben verglichen (93).

## **6.1 Das VCI-Mausmodell**

Bisher konnte kein Kleintiermodell etabliert werden, das alle Aspekte der Erkrankung CTEPH abbildet (101). In einem dieser Arbeit vorausgegangenem Forschungsprojekt der Arbeitsgruppe von [REDACTED] an der Universitätsmedizin Mainz wurde das Modell der VCI-Ligatur jedoch schon erfolgreich eingesetzt, um Vergleiche zwischen humanen CTEPH-Proben und murinen Thromben zu ziehen (44). Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Thrombusorganisation im Mausmodell mit den fünf definierten histologischen Bereichen in den PEA-Proben wurden Ähnlichkeiten deutlich, die Rückschlüsse auf die zeitliche Abfolge der Entwicklung und (Fehl-) Auflösung thrombotischen Materials im Rahmen einer CTEPH zulassen. Vor dem Hintergrund, dass bereits Parallelen zwischen CTEPH-Gewebeproben und experimentell induzierten murinen venösen Thromben auf histologischer Ebene gezogen werden konnten, kam daher das VCI-Mausmodell für die vorliegende Arbeit zum Einsatz.

## **6.2 Folgen veränderter TGF $\beta$ 1-Expression und Aktivität für die Entstehung und den Abbau venöser Thrombosen**

Ein charakteristisches Merkmal von CTEPH ist die Verlegung von Pulmonalarterien durch thrombotisch-fibrotisches Material. TGF $\beta$  ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor, der diverse biologische Prozesse im Organismus reguliert, u. a. Angiogenese und Fibrose, wohingegen bezüglich seiner Rolle in der Thrombusorganisation bisher wenig bekannt ist. Vorgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass von aktivierten Thrombozyten sezerniertes TGF $\beta$  im Heilungsprozess verletzter Halsschlagadern (*Carotiden*) einen positiven Einfluss auf die Formation einer *Neointima* hat (89). Durch den Einsatz eines Mausmodells der venösen Thrombose konnte nun auch eine tragende Rolle von TGF $\beta$  während des postthrombotischen vaskulären Umbauprozesses im venösen Gefäßsystem gezeigt werden. Weiterführende

Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten bestätigen, dass die plättchenspezifische Deletion von TGF $\beta$ 1 keinen Einfluss auf die Anzahl der Plättchen oder deren Funktionsfähigkeit oder Aktivierungszustand hatte, wie auch schon in anderen Studien aufgezeigt wurde (83). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein Mangel an TGF $\beta$ 1 in aktivierten Plättchen im Mausmodell zur schnelleren Auflösung venöser Thrombosen führte. Dazu passend ließ sich nachweisen, dass erhöhte Spiegel von TGF $\beta$ 1 im Plasma, wie es nach der endothelspezifischen Deletion von TGF $\beta$ RII der Fall war, zu einer verzögerten Auflösung des venösen thrombotischen Materials führten und zusätzlich in einer persistierenden Obstruktion pulmonaler Gefäße mit plättchen- und fibrinreichem Material resultierten (93).

### **6.3 Die Rolle aktivierter Plättchen bei der Entstehung venöser Thromben**

Obwohl man primär davon ausgeht, dass die Gefäßpathologien im Rahmen einer CTEPH das Ergebnis von fehlender Rückbildung thrombotischer Ablagerungen sind (102), wurde diesbezüglich auch von postthrombotischen Veränderungen im Sinne einer erhöhten Plättchenaktivität und erhöhter spontaner Plättchenaggregation berichtet (103, 104). Diese Beobachtungen konnten im Rahmen ergänzender Versuche unserer Arbeitsgruppe nicht reproduziert werden. Die Plasmaspiegel des Plättchenfaktors-4, einem Bestandteil der Plättchen  $\alpha$ -Granula und daher ein Plättchenaktivierungsmarker, waren bei CTEPH-PatientInnen nicht erhöht im Vergleich zu PatientInnen mit nicht-thrombotischen Formen einer PH oder gesunden ProbandInnen (93). Unter physiologischen Umständen bewirken die Thrombozyten durch ihre Zusammenlagerung eine Blutstillung und verschließen dadurch Endothellücken in verletzten Gefäßabschnitten. Damit sich Plättchen zusammenlagern, müssen sie jedoch zunächst aktiviert werden. Dies geschieht durch den Kontakt zu Proteinen, die erst durch eine Gefäßverletzung in Berührung mit der Blutstrombahn gelangen. Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche wiederum spezifische Rezeptoren, die diese Proteine binden und somit zur Aktivierung der Plättchen führen (23). Ein wichtiger Hinweis gilt dem Umstand, dass die Deletion von TGF $\beta$ 1 in den Thrombozyten weder deren Anzahl noch das Aktivitätsmuster oder das Ansprechen auf Aggregationsstimulatoren beein-

flusste. Gleich den Ergebnissen für das Plt.TGF $\beta$ -Kollektiv, konnten keine Unterschiede bezüglich der Pf4-Spiegel im Plasma der End.TGF $\beta$ RII-Mausgruppen festgestellt werden. Des Weiteren unterschied sich weder die Expression von Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, als Hinweis auf Plättchenaktivität, noch änderten die Thrombozyten der unterschiedlichen Genotypen ihr Aggregationsverhalten unter Thrombin-Stimulation. Es ist demnach nicht davon auszugehen, dass die beobachteten Größenunterschiede der venösen Thromben auf einem veränderten Aggregationsverhalten der Plättchen von Plt.TGF $\beta$ -KO-Mäusen beruhen. Vielmehr lässt sich vermuten, dass die verringerte Thrombusgröße nach der Ligatur der VCI mit der reduzierten Sekretion von TGF $\beta$  aus aktivierten Plättchen und Störungen im Thrombusabbau zusammenhängen.

#### **6.4 Regulatoren der Revaskularisation venöser Thromben**

Eine defekte Angiogenese und gestörte Thrombus-Revaskularisation könnten ursächlich für die Akkumulierung thrombofibrotischen Materials in den Pulmonalarterien im Rahmen einer CTEPH sein. In Mäusen mit induzierter endothelspezifischer Deletion des TGF $\beta$ RII stellten sich die venösen Thromben vergrößert dar und beinhalteten vergrößerte vaskuläre Strukturen sowie einen erhöhten Anteil an Myofibroblasten und Kollagen. Somit ließen sich in diesen Mäusen typische Merkmale vaskulärer Läsionen nachweisen, wie sie auch in CTEPH-Gewebe vorzufinden sind (44). Die erhöhte Expression von MMP9, einem TGF $\beta$ -Aktivator, der in venöse Umbauprozesse eingebunden ist (105), könnte bei der verzögerten Thrombusauflösung unter erhöhten TGF $\beta$ 1-Spiegeln und aktivierter TGF $\beta$ -Signalkaskade eine Rolle spielen. Obwohl eine im Jahr 2015 veröffentlichte Arbeit über reduzierte tubuläre renale Fibrose in Mäusen mit endothelspezifischer heterozygoter TGF $\beta$ RII-Deletion berichtet (106), könnte das in diesem Fall verbliebene TGF $\beta$ RII-Allel einen Anstieg von TGF $\beta$ 1 verhindert haben, wie es nach der homozygoten Deletion in unsere Studie zu beobachten war.

Die Aufbereitung der Lungen der Versuchstiere und deren immunhistochemische Analyse im Rahmen weiterer Versuche der Arbeitsgruppe ließ erkennen, dass die Anzahl der mit thrombotischem Material okkludierten pulmonalen Gefäße signifikant erhöht war bei den End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen verglichen mit den End.TGF $\beta$ RII-WT-Mäusen. Die Okklusion von pulmonalen Gefäßen trat bei den Mäusen, die initial keinen Thrombus geformt hatten unabhängig vom Genotyp insgesamt seltener auf, und beim

Plt.TGF $\beta$ -Mauskollektiv konnte grundsätzlich keine Blockade der Lungengefäße nachgewiesen werden.

Das Verhindern der Aktivierung von Rezeptoren des vaskulären Wachstumsfaktor (engl: *vascular endothelial growth factor*; VEGF) (107) oder die Deletion des VEGF-Rezeptors (VEGFR) in Tie2-positiven Zellen (68) führt im murinen Organismus zur verzögerten Rückbildung venöser Thromben. Im Gegensatz dazu beschleunigt eine VEGF-Gentherapie diesen Prozess (108). TGF $\beta$ 1 senkt die Expression und Bindungsfähigkeit von VEGFR (109), und weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe wiesen auf, dass pulmonale Endothelzellen der End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäuse signifikant geringere Mengen an VEGF exprimierten, als die der Kontrolltiere. Zudem konnte die Gruppe zeigen, dass die mRNA-Expression von Angiopoietin-2 (ANG2), einem durch Bindung an Tie2 (110) negativen Regulator der Angiogenese, in Endothelzellen aus TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen signifikant erhöht war. Plasma und Gewebespiegel von ANG2 sind bei Patienten mit idiopathischer PAH ebenfalls erhöht, und ANG2 steht als Biomarker für diese Erkrankung zur Diskussion (111).

## 6.5 Die Rolle von TGF $\beta$ während der Entwicklung des Organismus

Bekanntermaßen ist TGF $\beta$  unverzichtbar im Rahmen der Angiogenese, die wiederum ein wesentlicher Bestandteil fast aller histologischen Umbauprozesse ist. Schwere vaskuläre Defekte und das Entstehen von mit dem Leben nicht vereinbaren embryonalen Phänotypen konnten nach globaler Geninaktivierung von TGF $\beta$  (112) oder konstitutiver Deletion des TGF $\beta$ RII in Tie1.Cre-Zellen (113) und Tie2.Cre-Zellen (114) beobachtet werden. Unreife, erweiterte und fusionierte Dottersackgefäße und das Versterben muriner Föten in der 12. Entwicklungswoche konnten bei Mäusen mit systemischer Inaktivierung von TGF $\beta$ RI festgestellt werden (115). Eine auf das Endothel begrenzte Deletion des TGF $\beta$ RII in adulten Mäusen hatte keinen Einfluss auf die Gefäßmorphogenese (116). Zudem konnten im Rahmen unserer Studie Veränderungen des vaskulären Phänotyps unter endothelspezifischer Deletion von TGF $\beta$ RII nur nach venöser Gefäßverletzung detektiert werden. In Studien anderer Forschungsgruppen konnte belegt werden, dass Thrombin die Rückverlagerung von TGF $\beta$ RII ins Zellinnere (*Endozytose*) in Endothelzellen fördert und diese somit funktionsunfähig werden (117). Dies

suggeriert eine Herabregulation von endothelialen TGF $\beta$ RII *in vivo* als Antwort auf prothrombotische Stimuli.

## 6.6 Unterschiedliche Funktionen einzelner Mitglieder der TGF $\beta$ -Superfamilie in Bezug auf Angiogenese

Inwiefern TGF $\beta$  auf die Angiogenese in einem Organismus Einfluss nimmt, ist abhängig vom Gleichgewicht zweier spezifischer TGF $\beta$  Typ I-Rezeptoren und von den sich anschließenden Signalkaskaden. Einerseits agiert ALK1 als Förderer endothelialer Zellproliferation, Migration und Sprossung neuer Gefäße, andererseits begünstigt der ubiquitär vorkommende ALK5 die Reifung von Blutgefäßen und die Synthese extrazellulärer Matrix (118, 119). Es konnte beobachtet werden, dass TGF $\beta$  eine höhere Affinität zu ALK5 als zu ALK1 aufweist (120). Obwohl Endothelsprossung und Wachstum des Endothels in End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen erhöht waren, zeigten sich Endothelzellen ohne Expression von TGF $\beta$ RII weniger ausgereift und exprimierten zudem auch mesenchymale Marker. In diese Arbeit ergänzenden Versuchen konnten durch quantitative PCR-Analysen von CD31-positiven murinen pulmonalen Endothelzellen (engl.: *murine pulmonary endothelial cells*; mPECs) nach Deletion des TGF $\beta$ RII höhere Level mesenchymaler Marker sowie eine erhöhte Expression von Transkriptionsfaktoren, die EndMT regulieren (*Snail*, *Twist*, *Zeb1*) belegt werden (93). Zeitgleich war die Expression von CDH5 (auch bekannt als VE-Cadherin), einem endothelialen Marker, signifikant erniedrigt. Das zeitgleiche Vorkommen mesenchymaler Marker und eine erhöhte Expression von EndMT-Transkriptionsfaktoren, konnten nicht nur in den mPECs, sondern darüber hinaus auch in aus humanen CTEPH-Gewebe isolierten Endothelzellen *ex vivo* und PEA-Gewebeproben *in situ* nachgewiesen werden. Die Expression mesenchymaler Marker in mit TGF $\beta$ 1-stimulierten HPAECs konnte durch die Blockade des ALK5-Signalwegs inhibiert werden, wohingegen die Blockade von ALK1 keinen Effekt zeigte. Die Stimulation von zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen mit TGF $\beta$  in einer weiteren Arbeit (121) zeigte, dass TGF $\beta$  proangiogenetisch wirken und zeitgleich EndMT induzieren kann. Die Veränderung des endothelialen Phänotyps mag demnach notwendig sein, um hochgradig invasive Zellen zu generieren und so eine Angiogenese zu initiieren.

## 6.7 Das Vorkommen von EndMT im Rahmen der CTEPH

Erhöhte Plasmalevel von TGF $\beta$ 1 und das Vorkommen von EndMT wurden in Patientinnen mit PAH oder Modellen dieser Erkrankung nachgewiesen (71, 73, 122). Trotz der starken Präsenz thrombofibrotischer Prozesse in CTEPH haben sich bisher wenige Studien mit dem Vorkommen von EndMT in dieser Subgruppe der PH beschäftigt. Ähnlich früheren Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe in Untersuchungen von PEA-Proben(44), konnten auch andere Arbeiten den Nachweis von Endothelzellen in CTEPH-PEA-Gewebe erbringen, die sowohl endotheliale Marker als auch Marker glatter Muskelzellen exprimierten (123). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das aufgereinigte Medium der Myofibroblasten-ähnlichen Zellen höhere Level an TGF $\beta$ 1 enthielt und zusätzlich die Expression von SMA in koinkubierten Endothelzellen induzierte (123). Eine aktivierte TGF $\beta$ -Signalkaskade mittels des Smad2/3-Slug-Signalwegs konnte auch für die Entwicklung von EndMT im Rahmen vaskulärer Umbauprozesse nach venösen Bypässen verantwortlich gemacht werden (124).

## 6.8 Der Einfluss von Endothelin auf die TGF $\beta$ -Signaltransduktion und die Entstehung von EndMT

Die Ergebnisse weiterführender Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe von [REDACTED] an der Universitätsmedizin Mainz betrachteten auch die Rolle von ET-1 und sein Wirken in der TGF $\beta$ 1-Signalkaskade während der EndMT (93). Endotheline sind Peptidhormone, die hauptsächlich in Endothelzellen produziert werden und als sehr potente Vasokonstriktoren bei Wirbeltieren fungieren (94). Unter ihnen stellt ET-1 die prädominierende Isoform dar und ist biologisch betrachtet am aktivsten (125). Frühere Studien anderer Arbeitsgruppen zu diesem Thema konnten beweisen, dass TGF $\beta$  als starker Induktor von ET-1 fungiert (126) und dass TGF $\beta$  und ET-1 synergistisch Einfluss auf die Entstehung extrazellulärer Matrix und Fibrose ausüben (95). Ein erhöhtes Vorkommen von ET-1 konnte in zahlreichen Erkrankungen des Menschen nachgewiesen werden, bei denen es zur pathologischen Fibrosierung von Gewebe kommt, darunter auch die PH (71, 127). So stellen Endothelin-Rrezeptor-Antagonisten, wie z. B. Bosentan, einen Schwerpunkt in der medikamentösen Therapie von Patienten mit PAH dar (2). Darüber hinaus finden sich in der Lite-

ratur Hinweise darauf, dass ET-1 den profibrotischen Effekt von TGF $\beta$  durch Mechanismen, zu denen auch EndMT gehört, in seiner Stärke potenziert (128). Bisher wurde eine erhöhte Expression von ET-1 v. a. in PatientInnen mit nicht-thrombotischen Formen einer PH beobachtet, und es konnte gezeigt werden, dass ET-1 Einfluss auf die pulmonalarterielle Vasokonstriktion und die Proliferation glatter Muskelzellen in Pulmonalarterien bei Vorliegen einer PH nimmt (129). Inwiefern ET-1 und TGF $\beta$  jedoch auch bei der CTEPH Einfluss auf die EndMT nehmen, wurde bisher noch nicht diskutiert. Diese Arbeit ergänzende Versuche konnten in mit TGF $\beta$ 1 stimulierten HPAECs erhöhte Level von ET-1 nachweisen (93). Dieser Effekt war unter Koinkubation der HPAECs mit ALK5- und ALK1-Inhibitoren reversibel. In der histologischen Aufbereitung von CTEPH-PEA-Proben fiel auf, dass ET-1 besonders prominent in gefäßreichen Regionen der Gewebeproben exprimiert wurde. Verglichen mit den Plasmaproben gesunder PatientInnen, konnten erhöhte Spiegel von ET-1 im Plasma an CTEPH erkrankter Personen festgestellt werden. Im Rahmen der verwendeten Tiermodelle wiesen die aus End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen isolierten Endothelzellen höhere ET-1 Werte auf als die Endothelzellen von End.TGF $\beta$ RII-WT-Mäusen. Die Analyse von Blutplasma dieser Versuchskollektive bestätigte auch hier signifikant erhöhte ET-1 Konzentrationen bei den KO-Tieren schon zu Beginn des Beobachtungszeitraums (am Tag der VCI-Ligatur). An Tag 21 war der Unterschied in seiner Signifikanz weiter gestiegen. Auch immunhistochemisch gelang der Nachweis erhöhter ET-1 Expression in den Thromben der End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäuse. Die Behandlung der Versuchstiere mit Bosentan im Anschluss an die VCI-Ligatur führte bei End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen zu signifikant kleineren Thromben an Tag 21 als beim Kollektiv der KO-Mäuse, die nicht mit Bosentan behandelt wurden. Eine Therapie mit Bosentan führte hier zu ähnlichen Thrombusgrößen, wie sie bei den End.TGF $\beta$ RII-WT-Mäusen ohne ET1-Antagonisierung beobachtet werden konnte. Auch die Anzahl okkludierter Pulmonalarterien in End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen konnte durch Bosentan reduziert werden. Die Koninkubation von HPAECs mit TGF $\beta$ 1 und Bosentan verhinderte zusätzlich die erhöhte Expression von *Snail* und *Zeb1*, beides bekannte Transkriptionsfaktoren für EndMT. Interessanterweise führte diese Konstellation auch zur erhöhten Expression des Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor 1 (engl.: *fibroblast growth factor receptor 1*; FGFR1), einem der Hauptinhibitoren von EndMT (93). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen der miRNA *let-7b* im Plasma von CTEPH-Patienten

tInnen im Vergleich zu gesunden ProbandInnen signifikant verringert war (130). In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl ET-1 als auch TGF $\beta$ 1 direkte Zielgene von *let-7b* darstellen. Die Plasmaspiegel von ET-1 der CTEPH-PatientInnen, die in jene Studie eingebunden wurden, verhielten sich antiproportional zu den gemessenen *let-7b*-Leveln derselben PatientInnen. Reduzierte miRNA *let-7b* könnte also durch die Regulierung von ET-1 und TGF $\beta$  eine Rolle in der Pathogenese von CTEPH spielen. Erhöhte ET-1-Spiegel konnten darüber hinaus sowohl in anderen Studien (131) als auch in weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe bestätigt werden. Abseits der bekannten vasokonstriktischen Eigenschaften von ET-1 und seinem positiven Einfluss auf die Zellteilung, konnte eine direkte Rolle von ET-1 bei der Thrombusrückbildung bisher noch nicht nachgewiesen werden. Jedoch konnte unsere Arbeitsgruppe aufzeigen, dass die Blockade des ET-Rezeptors die TGF $\beta$ 1-gesteuerte Expression von Rezeptoren und transkriptorischen Regulatoren verhinderte, die in die Entstehung von EndMT, die Bildung von SMA und die Expression von Kollagen involviert sind (93). Zusätzlich führte die ET-Rezeptorblockade zu einer Größenzunahme der venösen Thromben und zu einer erhöhten Präsenz von Gefäßokklusionen in der Lunge von End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen im Vergleich zu End.TGF $\beta$ RII-WT-Mäusen. Obwohl eine ursächliche Rolle für ET-1 in CTEPH noch nicht unmittelbar aufgezeigt werden konnte, werden ET-Rezeptor-Antagonisten in der Therapie inoperabler CTEPH-PatientInnen in anderen Ländern oder bei PatientInnen mit anhaltender PH trotz PEA eingesetzt und führen zu einer Verbesserung der hämodynamischen Parameter und auch des Überlebens (132, 133). Der Umstand erhöhter ET-1 Expression in murinen venösen Thromben, in humanen CTEPH-Endothelzellen und PEA-Proben und die Entdeckung unserer Arbeitsgruppe, dass durch ET-Rezeptor-Antagonisierung eine Aktivierung der TGF $\beta$ -Signalkaskade reversibel erscheint, liefern eine pathophysiologische Basis und Rechtfertigung für den Einsatz von ET-Antagonisten jenseits ihrer rein vasoaktiven Effekte.

## 6.9 Fazit und Limitationen der Arbeit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass eine aktivierte TGF $\beta$ -Signaltransduktion eine wichtige Rolle bei pathophysiologischen Prozessen im Rahmen vaskulärer Umbauprozesse nach venöser Thrombose spielt. Es konnte gezeigt

werden, dass erhöhte Spiegel von aktivem TGF $\beta$  mit verzögerter Rückbildung der Blutgerinnsel einhergehen und die Entstehung von fibrosierten und kollagenreichen Thromben begünstigen. Die Revaskularisation thrombotischer Ablagerungen stellt einen wichtigen Faktor in der Auflösung der Gefäßokklusion dar. Es konnte gezeigt werden, dass aktiviertes TGF $\beta$  zu einer gestörten Angiogenese beiträgt. Weitergehende Untersuchungen lassen die Vermutung zu, dass TGF $\beta$  gemeinsam mit ET-1 den Prozess der EndMT sowohl in murinen venösen Thromben als auch humanen CTEPH-PEA-Proben induziert. Die Ähnlichkeiten der mikroskopisch nachweisbaren Gewebepathologien zwischen denen im Rahmen dieser Arbeit generierten murinen venösen Thromben und dem unserer Arbeitsgruppe zugänglichen humanen CTEPH-Gewebe legitimieren die Verwendung des VCI-Mausmodells für unserer Zwecke. Jedoch bleibt zu betonen, dass es sich bei den murinen Gewebeproben um venöses Gewebe handelt, wohingegen die CTEPH eine pulmonal-arterielle Erkrankung ist. Die Etablierung eines geeigneten direkten CTEPH-Modells in Kleintieren ist allerdings bisher nicht gelungen. Zu beachten ist darüber hinaus, dass in unseren Versuchen ausschließlich männliche Mäuse verwendet wurden. Über den Einfluss weiblicher Sexualhormone auf die Aktivität von TGF $\beta$  kann somit keine Aussage getroffen werden. Zwar konnten durch die weitergehenden Versuche mit dem End.TGF $\beta$ RII-Mauskollektiv viele Aussagen über die Auswirkungen erhöhter TGF $\beta$ -Spiegel getroffen werden, jedoch stellt der plättchenspezifische Mangel an TGF $\beta$  ebenfalls einen interessanten Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dar und bietet sich als Fokus zukünftiger Forschungsprojekte an. Zu erwähnen ist außerdem, dass es sich bei der Ligatur der VCI um eine experimentell herbeigeführte Situation handelt, welche nicht deckungsgleich mit den pathophysiologischen Entwicklungen einer venösen Thrombose beim Menschen und damit auch nicht uneingeschränkt auf diese übertragbar ist. Darüber hinaus stellt die Immunhistochemie eine semi-quantitative Methode dar, die immer nur eine Momentaufnahme der Läsion erlaubt. Bezüglich der zeitlichen Entwicklung nach der Gefäßverletzung wäre die Analyse des Gewebes zu verschiedenen Zeitpunkten zukünftig von Interesse.

## 7 Zusammenfassung

Bei der CTEPH handelt sich um eine seltene und schwere Form der PH, die unbehandelt zum Tod aufgrund eines akuten Rechtsherzversagens führt. Charakterisiert wird die Erkrankung durch eine defekte Thrombusauflösung, konsekutive Obstruktion pulmonal-arterieller Gefäße und die nachfolgende Entwicklung Vaskulopathie.

Mutationen in der TGF $\beta$ -Signaltransduktion stellen eine genetische Ursache für die Entstehung einer PAH, einer weiteren Unterform der PH, dar. Die Rolle von TGF $\beta$  für die Pathophysiologie der CTEPH wurde bisher noch nicht direkt untersucht.

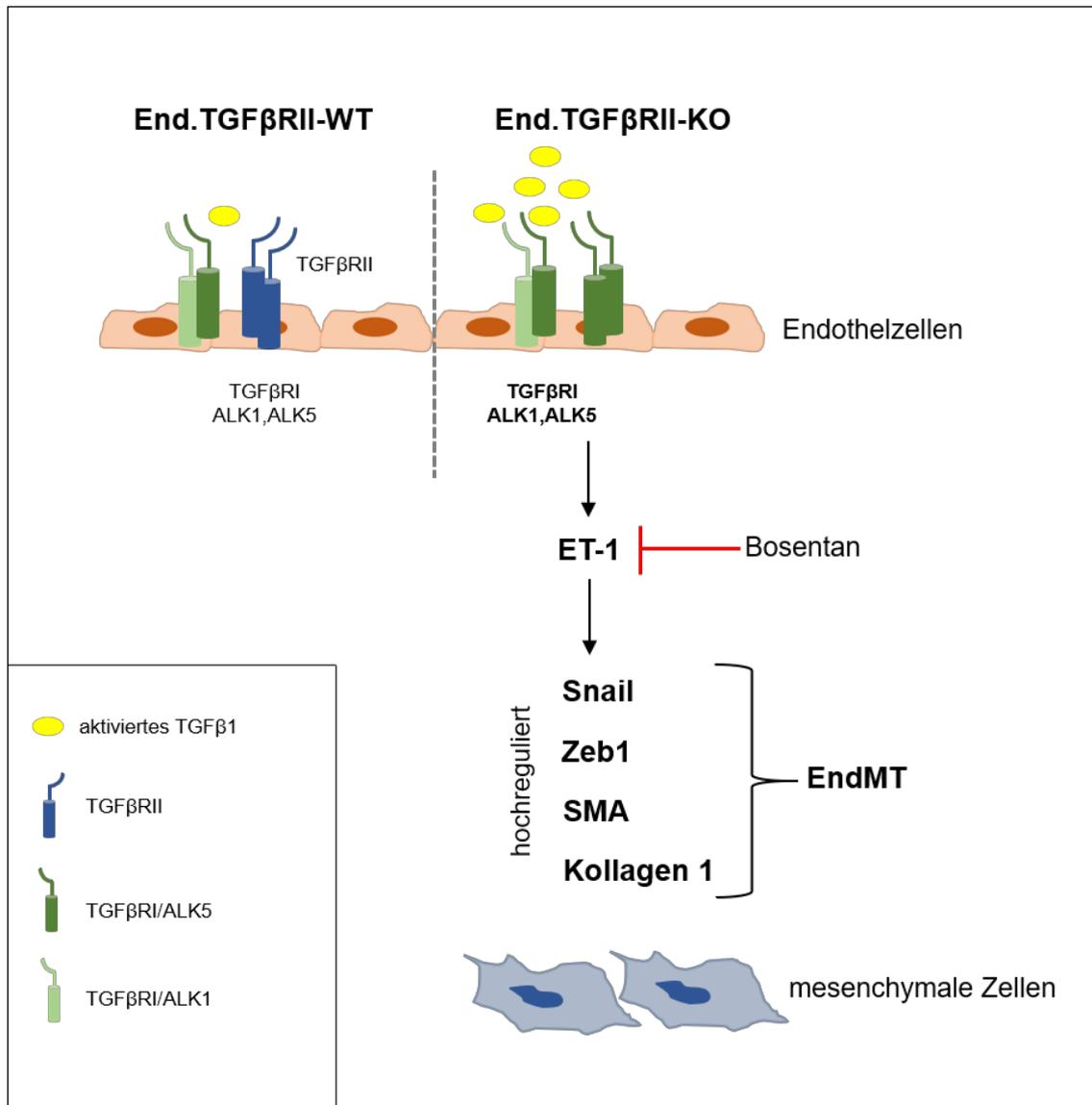
In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern eine veränderte TGF $\beta$ -Signalkaskade innerhalb von Endothelzellen zur Fehlaulösung venöser Thromben und Fibrosierung von Gewebe beiträgt.

Mittels einer Ligatur der VCI wurde in genmodifizierten Mäusen die Entstehung einer venösen Thrombose induziert. Dabei kam zum einen eine Mauslinie mit plättchenspezifischer Deletion von TGF $\beta$ 1 zum Einsatz. Zum anderen wurden Mäuse mit endothelspezifischer Deletion des TGF $\beta$ RII dem VCI-Modell zugeführt. Ein Mangel an TGF $\beta$ 1 hatte nachweislich keinen Einfluss auf Anzahl oder Funktion der Blutplättchen, führte jedoch zu einer schnelleren Auflösung des thrombotischen Materials. Die Deletion des endothelspezifischen TGF $\beta$ RII hingegen resultierte in größeren Thromben, die zu einem höheren Grad fibrotisch waren und auch stärker von Gefäßstraßen durchzogen waren. Zudem konnte in den Mäusen ohne endothelständigen TGF $\beta$ RII erhöhte Konzentrationen an aktivem TGF $\beta$ 1 sowie eine vermehrte endotheliale Expression der TGF $\beta$ 1-Rezeptoren ALK1 und ALK5 nachgewiesen werden. Vergleiche mit PEA-Ge-

webeproben von CTEPH-PatientInnen deckten zahlreiche Parallelen zwischen murinen und humanen Thromben auf. So konnte auch eine aktivierte TGF $\beta$ -Signalkaskade in stark vaskularisierten Bereichen von CTEPH-Gewebe nachgewiesen werden, ähnlich den Ergebnissen von End.TGF $\beta$ RII-KO-Thromben. Sowohl in humanen Endothelzellen, die aus den PEA-Proben isoliert wurden, als auch in murinen Endothelzellen ohne TGF $\beta$ RII kam es zur simultanen Expression von endothelialen und mesenchymalen Markern. Die vermehrte Expression von Transkriptionsfaktoren, die den Prozess der EndMT regulieren, konnte ebenfalls in beiden Spezies nachgewiesen werden.

Weiterführende Untersuchungen konnten erhöhte Spiegel von ET-1 in murinen Endothelzellen ohne TGF $\beta$ RII sowie in murinen venösen Thromben, humanen PEA – Proben und im Plasma von CTEPH-PatientInnen detektieren. Eine ET-1 Überexpression konnte durch die Inhibition von ALK5 verhindert werden. Die Blockade von ALK5 und die Verwendung eines ET-1-Rezeptorantagonisten inhibierte die mesenchymale Konversion von humanen und murinen Endothelzellen unter TGF $\beta$ 1 Stimulation. Darüber hinaus führte die ET-1-Rezeptorblockade zu einer verbesserten Auflösung venöser Thromben und verringerte die pulmonale Gefäßokklusion in End.TGF $\beta$ RII-KO-Mäusen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit Hinweise darauf, dass eine gesteigerte TGF $\beta$ 1-Signaltransduktion via Typ 1-Rezeptoren und eine Überexpression von ET-1 zur EndMT und Thrombofibrose in CTEPH beitragen und diese Prozesse durch die Blockade von ET-1-Rezeptoren aufgehalten werden könnten. Diese Resultate lassen wichtige Schlussfolgerungen für die Prävention und das klinische Management von CTEPH auch beim Menschen zu.



**Abbildung 20: Schematische Übersicht der Signaltransduktion** von aktiviertem TGFβ1 in Endothelzellen über TGFβRI and ET-1 und seiner Rolle im Rahmen von Thrombofibrose. Modifiziert nach Bochenek et al. (93).

## 8 Literaturverzeichnis

1. Riedel M, Stanek V, Widimsky J, Prerovsky I. **Longterm follow-up of patients with pulmonary thromboembolism. Late prognosis and evolution of hemodynamic and respiratory data.** Chest. 1982;81(2):151-8.
2. Galie N, et al. **2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT).** Eur Heart J. 2016;37(1):67-119.
3. Gall H, Hoepfer MM, Richter MJ, Cacheris W, Hinzmann B, Mayer E. **An epidemiological analysis of the burden of chronic thromboembolic pulmonary hypertension in the USA, Europe and Japan.** Eur Respir Rev. 2017;26(143).
4. Kim NH, et al. **Chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** J Am Coll Cardiol. 2013;62(25 Suppl):D92-9.
5. Fedullo PF, Auger WR, Kerr KM, Rubin LJ. **Chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** N Engl J Med. 2001;345(20):1465-72.
6. Becattini C, et al. **Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after a first episode of pulmonary embolism.** Chest. 2006;130(1):172-5.
7. Klok FA, van Kralingen KW, van Dijk AP, Heyning FH, Vliegen HW, Huisman MV. **Prospective cardiopulmonary screening program to detect chronic**

**thromboembolic pulmonary hypertension in patients after acute pulmonary embolism.** Haematologica. 2010;95(6):970-5.

8. Pengo V, et al. **Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism.** N Engl J Med. 2004;350(22):2257-64.

9. Dentali F, et al. **Incidence of chronic pulmonary hypertension in patients with previous pulmonary embolism.** Thromb Res. 2009;124(3):256-8.

10. Surie S, et al. **Active search for chronic thromboembolic pulmonary hypertension does not appear indicated after acute pulmonary embolism.** Thromb Res. 2010;125(5):e202-5.

11. Guerin L, et al. **Prevalence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism. Prevalence of CTEPH after pulmonary embolism.** Thromb Haemost. 2014;112(3):598-605.

12. Kayaalp I, et al. **The incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension secondary to acute pulmonary thromboembolism.** Tuberk Toraks. 2014;62(3):199-206.

13. Bonderman D, et al. **Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Eur Respir J. 2009;33(2):325-31.

14. Shi Y, Massague J. **Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.** Cell. 2003;113(6):685-700.

15. Lane KB, et al. **Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension.** Nat Genet. 2000;26(1):81-4.

16. Aumüller G, et al. **Duale Reihe Anatomie.** Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014. 1332 p.

17. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. **Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review.** Eur Respir J. 2009;34(4):888-94.

18. Pape H, Kurtz A, Silbernagl S. **Physiologie.** Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014. 1024 p.

19. Sommer N, et al. **Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms.** Eur Respir J. 2008;32(6):1639-51.

20. Hoeper MM, et al. **Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension.** J Am Coll Cardiol. 2013;62(25 Suppl):D42-50.

21. Simonneau G, et al. **Updated clinical classification of pulmonary hypertension.** J Am Coll Cardiol. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
22. Lüllmann-Rauch R. **Taschenlehrbuch Histologie.** Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009. 644 p.
23. Schmidt R, Lang F, Heckmann M. **Physiologie des Menschen.** Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2010. 979 p.
24. Herold G. **Innere Medizin.** Köln: Gerd Herold, Köln; 2020. 1002 p.
25. Monie DD, DeLoughery EP. **Pathogenesis of thrombosis: cellular and pharmacogenetic contributions.** Cardiovasc Diagn Ther. 2017;7(Suppl 3):S291-S8.
26. Esmon CT. **Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis.** Blood Rev. 2009;23(5):225-9.
27. Ortega-Gomez A, Perretti M, Soehnlein O. **Resolution of inflammation: an integrated view.** EMBO Mol Med. 2013;5(5):661-74.
28. Bruhn HD, Christophers E, Pohl J. **[The effect of the coagulation and fibrinolysis system on wound healing and thrombus organization].** Verh Dtsch Ges Inn Med. 1978(84):1345-8.
29. Hach-Wunderle V, et al. **S2-Leitlinie: Diagnostik und Therapie der Venenthrombose und der Lungenembolie.** AWMF Leitlinien-Register Nr 065/002. 2015:94.
30. Diehm C, Noppeney T, Nüllen H. **Epidemiologie der venösen Thrombose.** Gefässchirurgie. 2012(04/2012).
31. Pepke-Zaba J, et al. **Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): results from an international prospective registry.** Circulation. 2011;124(18):1973-81.
32. Wolf M, et al. **Thrombotic risk factors in pulmonary hypertension.** Eur Respir J. 2000;15(2):395-9.
33. Kim NH, Lang IM. **Risk factors for chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Eur Respir Rev. 2012;21(123):27-31.
34. Lang IM, Pesavento R, Bonderman D, Yuan JX. **Risk factors and basic mechanisms of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a current understanding.** Eur Respir J. 2013;41(2):462-8.

- 35. Kovacs G. Clinical classification and initial diagnosis of pulmonary hypertension: recommendations of the Cologne Consensus Conference 2016.** Dtsch Med Wochenschr. 2016.
- 36. Müller. Chirurgie für Studium und Praxis.** Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste; 2018/2019.
- 37. Olsson CG, et al. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Dtsch Arztebl Int. 2014.
- 38. Parikh V, Bhardwaj A, Nair A. Pharmacotherapy for pulmonary arterial hypertension.** J Thorac Dis. 2019;11(Suppl 14):S1767-S81.
- 39. Jamieson SW, Kapelanski DP. Pulmonary endarterectomy.** Curr Probl Surg. 2000;37(3):165-252.
- 40. Thistlethwaite PA, et al. Operative classification of thromboembolic disease determines outcome after pulmonary endarterectomy.** J Thorac Cardiovasc Surg. 2002;124(6):1203-11.
- 41. Arbustini E, et al. Plaque composition in plexogenic and thromboembolic pulmonary hypertension: the critical role of thrombotic material in pultaceous core formation.** Heart. 2002;88(2):177-82.
- 42. Blauwet LA, Edwards WD, Tazelaar HD, McGregor CG. Surgical pathology of pulmonary thromboendarterectomy: a study of 54 cases from 1990 to 2001.** Hum Pathol. 2003;34(12):1290-8.
- 43. Bernard J, Yi ES. Pulmonary thromboendarterectomy: a clinicopathologic study of 200 consecutive pulmonary thromboendarterectomy cases in one institution.** Hum Pathol. 2007;38(6):871-7.
- 44. Bochenek ML, et al. From thrombosis to fibrosis in chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Thromb Haemost. 2017;117(4):769-83.
- 45. Hoeper MM, et al. A global view of pulmonary hypertension.** Lancet Respir Med. 2016;4(4):306-22.
- 46. Mayer E, et al. Surgical management and outcome of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension: results from an international prospective registry.** J Thorac Cardiovasc Surg. 2011;141(3):702-10.
- 47. Fadel E, et al. Pulmonary thromboendarterectomy for chronic thromboembolic obstruction of the pulmonary artery in piglets.** J Thorac Cardiovasc Surg. 1999;117(4):787-93.

48. Mercier O, et al. **Piglet model of chronic pulmonary hypertension.** *Pulm Circ.* 2013;3(4):908-15.
49. Wagner EM, Jenkins J, Perino MG, Sukkar A, Mitzner W. **Lung and vascular function during chronic severe pulmonary ischemia.** *J Appl Physiol* (1985). 2011;110(2):538-44.
50. Li CY, Deng W, Liao XQ, Deng J, Zhang YK, Wang DX. **The effects and mechanism of ginsenoside Rg1 on myocardial remodeling in an animal model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** *Eur J Med Res.* 2013;18:16.
51. Arias-Loza PA, et al. **Development and Characterization of an Inducible Rat Model of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.** *Hypertension.* 2016;67(5):1000-5.
52. Mukhopadhyay S, et al. **Fibrinolysis and Inflammation in Venous Thrombus Resolution.** *Front Immunol.* 2019;10:1348.
53. Massague J. **TGF-beta signal transduction.** *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.
54. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. **Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins.** *Eur J Biochem.* 2000;267(24):6954-67.
55. Massague J, Chen YG. **Controlling TGF-beta signaling.** *Genes Dev.* 2000;14(6):627-44.
56. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. **TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.** *Nature.* 1997;390(6659):465-71.
57. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. **Mechanism of activation of the TGF-beta receptor.** *Nature.* 1994;370(6488):341-7.
58. Sankar S, Mahooti-Brooks N, Centrella M, McCarthy TL, Madri JA. **Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2.** *J Biol Chem.* 1995;270(22):13567-72.
59. ten Dijke P, Arthur HM. **Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(11):857-69.
60. Carcamo J, et al. **Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin.** *Mol Cell Biol.* 1994;14(6):3810-21.

61. Eppert K, et al. **MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma.** Cell. 1996;86(4):543-52.
62. Hoodless PA, et al. **MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways.** Cell. 1996;85(4):489-500.
63. Hata A, Chen YG. **TGF-beta Signaling from Receptors to Smads.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 2016;8(9).
64. Dresdale DT, Michtom RJ, Schultz M. **Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance.** Bull N Y Acad Med. 1954;30(3):195-207.
65. Austin ED, Loyd JE. **The genetics of pulmonary arterial hypertension.** Circ Res. 2014;115(1):189-202.
66. Gore B, et al. **Key role of the endothelial TGF-beta/ALK1/endothelin signaling pathway in humans and rodents pulmonary hypertension.** PLoS One. 2014;9(6):e100310.
67. Zaiman AL, et al. **Role of the TGF-beta/Alk5 signaling pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension.** Am J Respir Crit Care Med. 2008;177(8):896-905.
68. Alias S, et al. **Defective angiogenesis delays thrombus resolution: a potential pathogenetic mechanism underlying chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34(4):810-9.
69. Zabini D, et al. **Angiostatic factors in the pulmonary endarterectomy material from chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients cause endothelial dysfunction.** PLoS One. 2012;7(8):e43793.
70. Naito A, et al. **Endothelial cells from pulmonary endarterectomy specimens possess a high angiogenic potential and express high levels of hepatocyte growth factor.** BMC Pulm Med. 2018;18(1):197.
71. Ranchoux B, et al. **Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension.** Circulation. 2015;131(11):1006-18.
72. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. **Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis.** Circ Res. 2002;90(11):1189-96.
73. Qiao L, et al. **Endothelial fate mapping in mice with pulmonary hypertension.** Circulation. 2014;129(6):692-703.

74. Sun JX, et al. **SNAI1, an endothelial-mesenchymal transition transcription factor, promotes the early phase of ocular neovascularization.** *Angiogenesis.* 2018;21(3):635-52.
75. Pardali E, Sanchez-Duffhues G, Gomez-Puerto MC, Ten Dijke P. **TGF-beta-Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases.** *Int J Mol Sci.* 2017;18(10).
76. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. **Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237(3):752-7.
77. Sauer B, Henderson N. **Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(14):5166-70.
78. Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. **Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo.** *Blood.* 2007;109(4):1503-6.
79. Azhar M, et al. **Generation of mice with a conditional allele for transforming growth factor beta 1 gene.** *Genesis.* 2009;47(6):423-31.
80. Forde A, Constien R, Grone HJ, Hammerling G, Arnold B. **Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements.** *Genesis.* 2002;33(4):191-7.
81. Feil S, Valtcheva N, Feil R. **Inducible Cre mice.** *Methods Mol Biol.* 2009;530:343-63.
82. Schmidt O. **Genetik und Molekularbiologie. Kompaktwissen Biologie.** Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2017.
83. von Bruhl ML, et al. **Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo.** *J Exp Med.* 2012;209(4):819-35.
84. Carstairs KC. **The identification of platelets and platelet antigens in histological sections.** *J Pathol Bacteriol.* 1965;90(1):225-31.
85. Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. **SIRIUS RED F3BA AS A STAIN FOR CONNECTIVE TISSUE.** *Arch Pathol.* 1964;78:69-72.
86. G. L. **Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.** Vienna: Springer; 2013.

87. Brakenhoff GJ, van der Voort HT, van Spronsen EA, Nanninga N. **Three-dimensional imaging in fluorescence by confocal scanning microscopy.** J Microsc. 1989;153(Pt 2):151-9.
88. Amos WB, White JG, Fordham M. **Use of confocal imaging in the study of biological structures.** Appl Opt. 1987;26(16):3239-43.
89. Schutz E, et al. **Absence of transforming growth factor beta 1 in murine platelets reduces neointima formation without affecting arterial thrombosis.** Thromb Haemost. 2017;117(9):1782-97.
90. Bochaton-Pillat M-L, de Vries CJM, GJ vE. **Vascular smooth muscle cells.** New York: Oxford; 2017.
91. Yu Q, Stamenkovic I. **Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.** Genes Dev. 2000;14(2):163-76.
92. Mu D, et al. **The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1.** J Cell Biol. 2002;157(3):493-507.
93. Bochenek ML, et al. **Activated Endothelial TGFbeta1 Signaling Promotes Venous Thrombus Non-Resolution in Mice Via Endothelin-1: Potential Role for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.** Circ Res. 2019.
94. Yanagisawa M, et al. **A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells.** Nature. 1988;332(6163):411-5.
95. Lambers C, et al. **The interaction of endothelin-1 and TGF-beta1 mediates vascular cell remodeling.** PLoS One. 2013;8(8):e73399.
96. Liakhovitskaia A, et al. **Runx1 is required for progression of CD41+ embryonic precursors into HSCs but not prior to this.** Development. 2014;141(17):3319-23.
97. Kina T, et al. **The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage.** Br J Haematol. 2000;109(2):280-7.
98. Dunic J, Dabelic S, Flogel M. **Galectin-3: an open-ended story.** Biochim Biophys Acta. 2006;1760(4):616-35.
99. Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. **PCNA, the maestro of the replication fork.** Cell. 2007;129(4):665-79.
100. Tsurimoto T. **PCNA binding proteins.** Front Biosci. 1999;4:D849-58.

- 101.** Mercier O, Fadel E. **Chronic thromboembolic pulmonary hypertension: animal models.** Eur Respir J. 2013;41(5):1200-6.
- 102.** Simonneau G, Torbicki A, Dorfmüller P, Kim N. **The pathophysiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Eur Respir Rev. 2017;26(143).
- 103.** Yaoita N, et al. **Platelets are highly activated in patients of chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34(11):2486-94.
- 104.** Remkova A, Simkova I, Valkovicova T. **Platelet abnormalities in chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Int J Clin Exp Med. 2015;8(6):9700-7.
- 105.** Deatrick KB, et al. **Vein wall remodeling after deep vein thrombosis involves matrix metalloproteinases and late fibrosis in a mouse model.** J Vasc Surg. 2005;42(1):140-8.
- 106.** Xavier S, et al. **Curtailing endothelial TGF-beta signaling is sufficient to reduce endothelial-mesenchymal transition and fibrosis in CKD.** J Am Soc Nephrol. 2015;26(4):817-29.
- 107.** Evans CE, et al. **Antiangiogenic therapy inhibits venous thrombus resolution.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34(3):565-70.
- 108.** Modarai B, et al. **Adenovirus-mediated VEGF gene therapy enhances venous thrombus recanalization and resolution.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28(10):1753-9.
- 109.** Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS. **Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells.** J Biol Chem. 1996;271(19):11500-5.
- 110.** Felcht M, et al. **Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling.** J Clin Invest. 2012;122(6):1991-2005.
- 111.** Kumpers P, et al. **Circulating angiopoietins in idiopathic pulmonary arterial hypertension.** Eur Heart J. 2010;31(18):2291-300.
- 112.** Oshima M, Oshima H, Taketo MM. **TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis.** Dev Biol. 1996;179(1):297-302.
- 113.** Carvalho RL, et al. **Compensatory signalling induced in the yolk sac vasculature by deletion of TGFbeta receptors in mice.** J Cell Sci. 2007;120(Pt 24):4269-77.

114. Shang Y, et al. **Transcriptional corepressors HIPK1 and HIPK2 control angiogenesis via TGF-beta-TAK1-dependent mechanism.** PLoS Biol. 2013;11(4):e1001527.
115. Larsson J, et al. **Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice.** Embo j. 2001;20(7):1663-73.
116. Park SO, et al. **ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2.** Blood. 2008;111(2):633-42.
117. Tang H, Low B, Rutherford SA, Hao Q. **Thrombin induces endocytosis of endoglin and type-II TGF-beta receptor and down-regulation of TGF-beta signaling in endothelial cells.** Blood. 2005;105(5):1977-85.
118. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. **Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors.** EMBO J. 2002;21(7):1743-53.
119. Goumans MJ, et al. **Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling.** Mol Cell. 2003;12(4):817-28.
120. ten Dijke P, et al. **Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin.** Science. 1994;264(5155):101-4.
121. Krishnan S, Szabo E, Burghardt I, Frei K, Tabatabai G, Weller M. **Modulation of cerebral endothelial cell function by TGF-beta in glioblastoma: VEGF-dependent angiogenesis versus endothelial mesenchymal transition.** Oncotarget. 2015;6(26):22480-95.
122. Yan Y, et al. **Elevated levels of plasma transforming growth factor-beta1 in idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension.** Int J Cardiol. 2016;222:368-74.
123. Sakao S, Hao H, Tanabe N, Kasahara Y, Kurosu K, Tatsumi K. **Endothelial-like cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: crosstalk with myofibroblast-like cells.** Respir Res. 2011;12:109.
124. Cooley BC, et al. **TGF-beta signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling.** Sci Transl Med. 2014;6(227):227ra34.
125. Luscher TF, Barton M. **Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs.** Circulation. 2000;102(19):2434-40.

- 126.** Rodriguez-Pascual F, Reimunde FM, Redondo-Horcajo M, Lamas S. **Transforming growth factor-beta induces endothelin-1 expression through activation of the Smad signaling pathway.** J Cardiovasc Pharmacol. 2004;44 Suppl 1:S39-42.
- 127.** Swigris JJ, Brown KK. **The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis.** BioDrugs. 2010;24(1):49-54.
- 128.** Wermuth PJ, Li Z, Mendoza FA, Jimenez SA. **Stimulation of Transforming Growth Factor-beta1-Induced Endothelial-To-Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis by Endothelin-1 (ET-1): A Novel Profibrotic Effect of ET-1.** PLoS One. 2016;11(9):e0161988.
- 129.** Shao D, Park JE, Wort SJ. **The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension.** Pharmacol Res. 2011;63(6):504-11.
- 130.** Guo L, et al. **Differentially expressed plasma microRNAs and the potential regulatory function of Let-7b in chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** PLoS One. 2014;9(6):e101055.
- 131.** Reesink HJ, et al. **Hemodynamic and clinical correlates of endothelin-1 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Circ J. 2006;70(8):1058-63.
- 132.** Nishimura R, et al. **Improved survival in medically treated chronic thromboembolic pulmonary hypertension.** Circ J. 2013;77(8):2110-7.
- 133.** Jais X, et al. **Bosentan for treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension: BENEFiT (Bosentan Effects in iNopERable Forms of chronic Thromboembolic pulmonary hypertension), a randomized, placebo-controlled trial.** J Am Coll Cardiol. 2008;52(25):2127-34.

## 9 Anhang

### 9.1 Zusammensetzung und Herstellung der Lösungen

*Begriffserläuterung:* Bei der Verwendung von ddH<sub>2</sub>O handelt es sich um Reinstwasser, das mit Hilfe der Wasseraufbereitungsanlage *PURELAB ULTRA* aufbereitet wurde

#### Fixierung zur Paraffineinbettung

Zinkformalin Gebrauchslösung	Zinkformalinkonzentrat	200 ml
	ddH <sub>2</sub> O	800 ml

#### Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1x)	TAE (50x)	40 ml
	ddH <sub>2</sub> O	2000 ml

**Fixierung zur Gefriereinbettung**

4%ige Paraformaldehyd (PFA)-Lösung	Paraformaldehyd	4 g
	PBS (1x)	auf 100 ml
15%ige Saccharose-Lösung	D(+)-Saccharose	15 g
	PBS (1x)	auf 100 ml
30%ige Saccharose-Lösung	D(+)-Saccharose	30 g
	PBS (1x)	auf 100 ml

**Carstairs Färbung**

5%ige Ammoniumeisen(III)sulfat-Lösung	Ammoniumeisen(III)sulfat	10 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 200 ml
Hämalaun-Lösung nach Mayer	gebrauchsfertig von der Firma Carl Roth® GmbH + Co, Karlsruhe	
Pikrinsäure-Orange G-Lösung	Orange G	4 g
	gesättigte Pikrinsäure – Lösung	auf 200 ml
Ponceau-Fuchsin-Lösung	Acid Fuchsin	1 g
	Ponceau Xylidin	1 g
	1%ige Essigsäure	auf 200 ml
1%ige Phosphotungstensäure	Phosphotungstensäure	2 g
	ddH <sub>2</sub> O	auf 200 ml
1%ige Anilinblau-Lösung	Anilinblau	2 g
	1 %ige Essigsäure	auf 200 ml

**Pikro - Siriusrotfärbung**

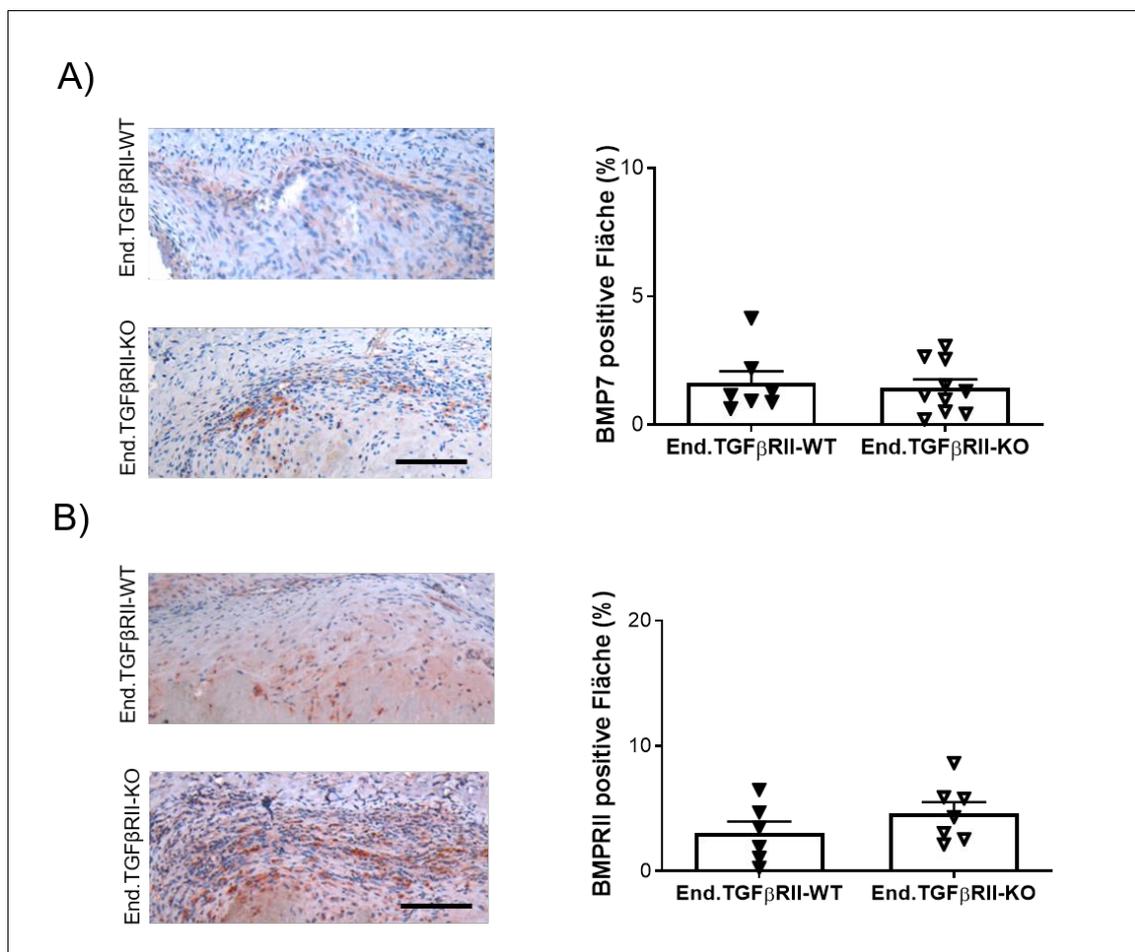
1%ige Picrosiriusrot-Lösung	Siriusrot	1 g
	gesättigte Prikrinsäure-Lösung	auf 100 ml
30%ige Essigsäure	100 %ige Essigsäure	120 ml
	ddH <sub>2</sub> O	280 ml

**Immunhistochemie (IHC)**

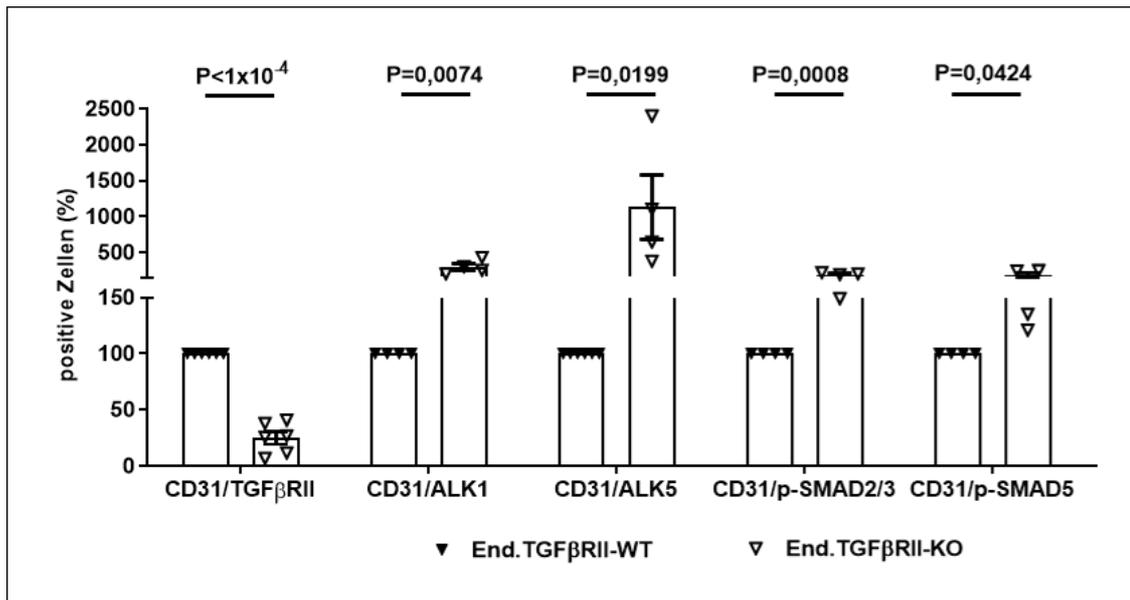
<i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i> <i>pH 7,4 (1x)</i>	PBS pH 7,4 (10x)	100ml
	ddH <sub>2</sub> O	900ml
3%ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung in Methanol	Methanol	450ml
	Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30%	50ml
50%iger Ethanol	Ethanol, vergällt ≥ 99,8%	500ml
	ddH <sub>2</sub> O	500ml

## 9.2 Weitere Ergebnisse

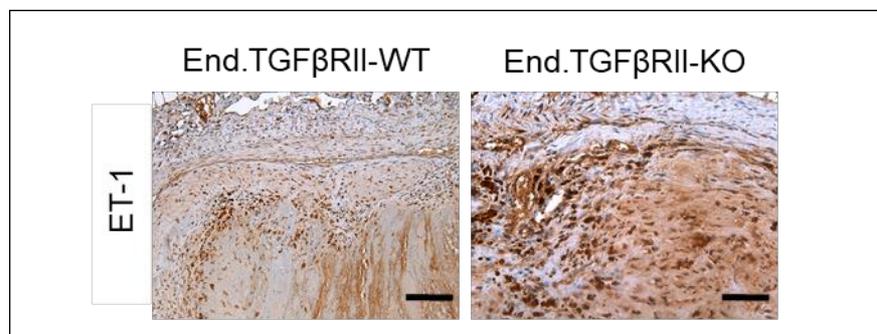
Bei den in diesem Kapitel gezeigten Daten handelt es sich entweder um Daten, die sich als statistisch nicht signifikant erwiesen oder nicht von mir persönlich erhoben wurden (dann entsprechend in der Beschriftung gekennzeichnet), zum Verständnis der Thematik jedoch beitragen.



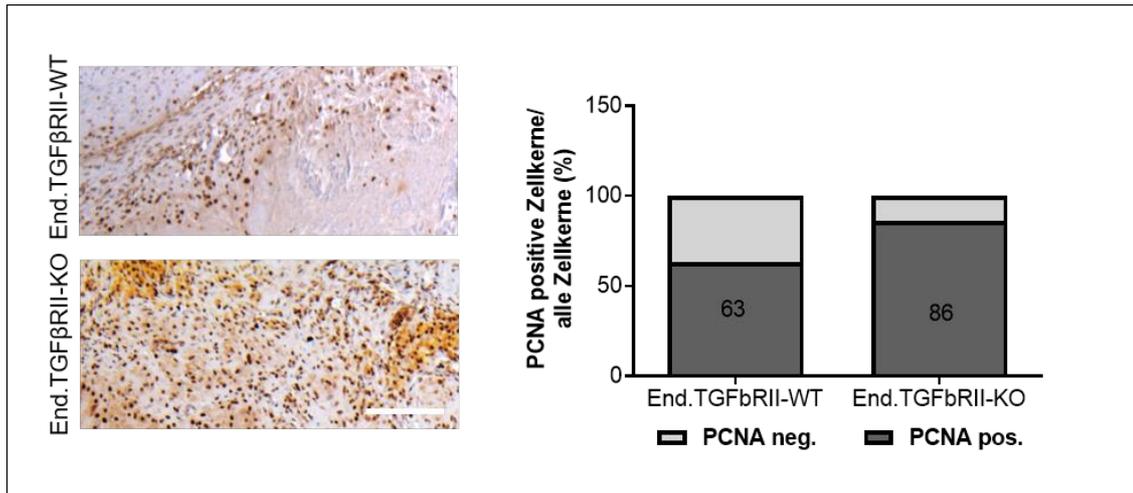
**Abbildung 21: Expression von Mitgliedern der TGFβ1-Signalkaskade nach endothelspezifischer Deletion des TGFβRII.** Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen. Repräsentative Bilder. **(A)** BMP7 positiven Fläche. End.TGFβRII-WT n=7, End.TGFβRII-KO n=10. p=ns. Maßstab 100 µm. **(B)** BMPRII positiven Fläche. End.TGFβRII-WT n=6, End.TGFβRII-KO n=7. p=ns. Maßstab 100 µm.



**Abbildung 22: Ergebnis der Durchflusszytometrie.** Analyse und Quantifizierung von CD31-positiven murinen Endothelzellen, die TGFβRII, TGFβRI/ALK1, TGFβRI/ALK5, pSmad2/3 und pSmad5 koexprimieren. Die gezeigten Daten wurden von [REDACTED] erhoben.



**Abbildung 23: ET-1-Signal nach endothelspezifischem Knockout des TGFβRII.** Ergebnis der immunhistochemischen Färbung. Repräsentative Bilder.  $p = ns$ . Maßstab 10  $\mu m$ .



**Abbildung 24: Anzeichen für DNA-Synthese nach endotheliale Kockout des TGFβRII.** Ergebnis der immunhistochemischen Färbung. Repräsentative Bilder. PCNA positive Zellkerne in Relation zu allen angefärbten Zellkernen innerhalb des murinen Gewebes.  $p = ns$ .

## **Danksagung**

*Aus Datenschutzgründen gelöscht*

## **Curriculum Vitae**

*Aus Datenschutzgründen gelöscht*

Curriculum Vitae Seite 2

*Aus Datenschutzgründen gelöscht*



# Activated Endothelial TGF $\beta$ 1 Signaling Promotes Venous Thrombus Nonresolution in Mice Via Endothelin-1

## Potential Role for Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension

Magdalena L. Bochenek, Christiane Leidinger, Nico S. Rosinus, Rajinikanth Gogiraju, Stefan Guth, Lukas Hobohm, Kerstin Jurk, Eckhard Mayer, Thomas Münzel, Mareike Lankeit, Markus Bosmann, Stavros Konstantinides, Katrin Schäfer

**RATIONALE:** Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is characterized by defective thrombus resolution, pulmonary artery obstruction, and vasculopathy. TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) signaling mutations have been implicated in pulmonary arterial hypertension, whereas the role of TGF $\beta$  in the pathophysiology of CTEPH is unknown.

**OBJECTIVE:** To determine whether defective TGF $\beta$  signaling in endothelial cells contributes to thrombus nonresolution and fibrosis.

**METHODS AND RESULTS:** Venous thrombosis was induced by inferior vena cava ligation in mice with genetic deletion of TGF $\beta$ 1 in platelets (Plt.TGF $\beta$ -KO) or TGF $\beta$  type II receptors in endothelial cells (End.TGF $\beta$ RII-KO). Pulmonary endarterectomy specimens from CTEPH patients were analyzed using immunohistochemistry. Primary human and mouse endothelial cells were studied using confocal microscopy, quantitative polymerase chain reaction, and Western blot. Absence of TGF $\beta$ 1 in platelets did not alter platelet number or function but was associated with faster venous thrombus resolution, whereas endothelial TGF $\beta$ RII deletion resulted in larger, more fibrotic and higher vascularized venous thrombi. Increased circulating active TGF $\beta$ 1 levels, endothelial TGF $\beta$ RI/ALK1 (activin receptor-like kinase), and TGF $\beta$ RI/ALK5 expression were detected in End.TGF $\beta$ RII-KO mice, and activated TGF $\beta$  signaling was present in vessel-rich areas of CTEPH specimens. CTEPH-endothelial cells and murine endothelial cells lacking TGF $\beta$ RII simultaneously expressed endothelial and mesenchymal markers and transcription factors regulating endothelial-to-mesenchymal transition, similar to TGF $\beta$ 1-stimulated endothelial cells. Mechanistically, increased endothelin-1 levels were detected in TGF $\beta$ RII-KO endothelial cells, murine venous thrombi, or endarterectomy specimens and plasma of CTEPH patients, and endothelin-1 overexpression was prevented by inhibition of ALK5, and to a lesser extent of ALK1. ALK5 inhibition and endothelin receptor antagonization inhibited mesenchymal lineage conversion in TGF $\beta$ 1-exposed human and murine endothelial cells and improved venous thrombus resolution and pulmonary vaso-occlusions in End.TGF $\beta$ RII-KO mice.

**CONCLUSIONS:** Endothelial TGF $\beta$ 1 signaling via type I receptors and endothelin-1 contribute to mesenchymal lineage transition and thrombofibrosis, which were prevented by blocking endothelin receptors. Our findings may have relevant implications for the prevention and management of CTEPH.

**VISUAL OVERVIEW:** An online [visual overview](#) is available for this article.

**Key Words:** endarterectomy ■ endothelial cells ■ endothelin-1 ■ pulmonary hypertension ■ thrombosis

---

**In This Issue, see p 159 | Meet the First Author, see p 160**

---

Correspondence to: Katrin Schäfer, MD, Center for Cardiology I, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Langenbeckstrasse 1, D-55131 Mainz, Germany. Email [katrin.schaefer@unimedizin-mainz.de](mailto:katrin.schaefer@unimedizin-mainz.de)

The online-only Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/CIRCRESAHA.119.315259>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 179.

© 2019 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at [www.ahajournals.org/journal/res](http://www.ahajournals.org/journal/res)

## Novelty and Significance

### What Is Known?

- Chronic thromboembolic pulmonary hypertension is a life-threatening cardiovascular disease characterized by obstruction of pulmonary artery branches by unresolved thrombofibrotic material.
- Currently, there is no therapy to prevent development of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after venous thromboembolism, and treatment consists mostly of surgical extraction of the thrombofibrotic material.
- Mutations of genes encoding TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) signaling molecules have been implicated in the pathophysiology of other forms of pulmonary arterial hypertension.

### What New Information Does This Article Contribute?

- We show that increased TGF $\beta$ 1 signaling in endothelial cells via ALK5 (activin receptor-like kinase)/TGF $\beta$ RI receptors delays the resolution of venous thrombi in mice and results in chronic pulmonary thromboembolism.
- We identified activated TGF $\beta$  signaling and plasma levels of ET-1 (endothelin-1) as a potential

pathomechanism underlying venous thrombus non-resolution and thromboembolism.

- Inhibition of ET-1 with bosentan, an ET-1 receptor antagonist, reversed the conversion of endothelial cells to myofibroblasts and improved venous thrombus resolution but also inhibited thrombotic pulmonary obstructions.

Our findings in 2 transgenic mouse strains following experimental thrombosis of the inferior vena cava are supported by pulmonary endarterectomy tissue microarrays of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension and analysis of human and mouse pulmonary endothelial cells. Taken together, our results suggest that ALK5/TGF $\beta$ RI-mediated induction of ET-1 promotes endothelial-to-mesenchymal lineage conversion and thrombofibrosis, and that these sequelae of increased circulating active TGF $\beta$ 1 levels and TGF $\beta$  signaling in endothelial cells are reversible on antagonization of endothelin receptors. They may thus have clinically relevant implications for patients with, or at risk of developing chronic thromboembolic pulmonary hypertension.

## Nonstandard Abbreviations and Acronyms

<b>ALK</b>	activin receptor-like kinase
<b>CTEPH</b>	chronic thromboembolic pulmonary hypertension
<b>CTEPH-ECs</b>	endothelial cells outgrown from CTEPH tissue
<b>EndMT</b>	endothelial-to-mesenchymal transition
<b>ET-1</b>	endothelin-1
<b>FGFR1</b>	fibroblast growth factor receptor 1
<b>FSP1</b>	fibroblast-specific protein-1
<b>HPAECs</b>	human pulmonary arterial endothelial cells
<b>HUVECs</b>	human umbilical vein endothelial cells
<b>IVC</b>	inferior vena cava
<b>MMP9</b>	matrix metalloproteinase-9
<b>mPECs</b>	mouse pulmonary endothelial cells
<b>PAH</b>	pulmonary arterial hypertension
<b>PAI-1</b>	plasminogen activator inhibitor-1
<b>PEA</b>	pulmonary endarterectomy
<b>PF4</b>	platelet factor 4
<b>SMA</b>	smooth muscle actin- $\alpha$
<b>SMAD</b>	small mothers against decapentaplegic homolog

<b>SNAIL</b>	snail family zinc finger 1
<b>TGF<math>\beta</math></b>	transforming growth factor- $\beta$
<b>Tie2</b>	endothelial receptor tyrosine kinase
<b>TSP1</b>	thrombospondin-1
<b>TWIST1</b>	twist-related protein 1
<b>ZEB1</b>	zinc finger E-box binding homeobox 1

**P**ulmonary hypertension encompasses a broad spectrum of cardiac and pulmonary diseases that lead to progressive right heart failure and ultimately death. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) is clinically classified as group 4 of pulmonary hypertension.<sup>1</sup> Histologically, CTEPH can be distinguished from other forms of pulmonary hypertension by the occlusion of pulmonary arteries by unresolved thrombofibrotic material partly recanalized by large and irregular neovessels.<sup>2,3</sup>

Previous studies suggested that CTEPH represents the result of an inadequate healing response to acute pulmonary embolism and incomplete resolution of thrombi.<sup>4</sup> Because the pathomechanisms underlying CTEPH are largely unknown and no therapy is available to reverse this process, surgical removal of the thrombofibrotic material obliterating the pulmonary arteries currently represents the only curative approach.

Endothelial cells are important during venous thrombus resolution, as suggested by findings in mice.<sup>5-7</sup>

Supporting a role for an imbalanced and defective angiogenesis in the pathogenesis of CTEPH, a higher expression of angiostatic growth factors has been reported in endothelial cells isolated from pulmonary endarterectomy (PEA) specimens,<sup>8</sup> whereas others found that they possess a highly increased in vitro angiogenic potential.<sup>9</sup> Endothelial cells may undergo phenotypic conversion into mesenchymal cells, a process termed endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT). EndMT was shown to contribute to tissue fibrosis, including the lung,<sup>10,11</sup> but endothelial phenotype switching may also generate migratory, invasive, and sprouting cells required for new vessel formation.<sup>12</sup>

TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) is a multifunctional cytokine affecting many cell types and tissue remodeling processes, including angiogenesis and organ fibrosis. In humans, the TGF $\beta$  family consists of >30 members, including the isoforms TGF $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3. Binding of TGF $\beta$  ligands assembles a heteromeric receptor complex consisting of 2 type I (TGF $\beta$ RI, also called activin receptor-like kinases or ALK1 and ALK5) and 2 type II (TGF $\beta$ RII) receptor components, serine-threonine protein kinases which regulate gene expression by activation of SMAD (small mothers against decapentaplegic homolog) transcription factors.<sup>13</sup> TGF $\beta$ RI/ALK5 receptors are broadly expressed and propagate the signal via phosphorylation of SMAD2 and SMAD3. In endothelial cells, TGF $\beta$  can also activate ALK1, which induces phosphorylation of SMAD1 and SMAD5. The diversity of the endothelial response to TGF $\beta$  is facilitated, at least in part, via the accessory TGF $\beta$  receptor endoglin.<sup>14</sup> TGF $\beta$ RIII (TGF $\beta$  type III receptors or  $\beta$  glycan) are ubiquitously expressed and present TGF $\beta$  ligands to type II receptors.<sup>15</sup>

Fibrotic lesions containing large, irregular vessels are typical histological findings in CTEPH. Interestingly, gene mutations of TGF $\beta$  signaling molecules, such as the bone morphogenetic protein receptor type 2, endoglin, ALK1, or SMAD9 have been reported in patients belonging to group 1 of pulmonary hypertension.<sup>16</sup> TGF $\beta$  expression and an important role of TGF $\beta$  signaling pathways have been demonstrated in pulmonary hypertension experimentally induced by hypoxia<sup>17</sup> or monocrotaline,<sup>18</sup> while TGF $\beta$  ligand trapping improved the hemodynamics, remodeling, and survival in preclinical pulmonary hypertension models.<sup>19</sup> However, the role of TGF $\beta$  signaling in venous thrombus resolution and thrombofibrosis in CTEPH has never been directly addressed. Using whole-genome microarray analysis of human endothelial cells outgrown from CTEPH PEA specimens, we observed a significant upregulation of TGF $\beta$  and associated signaling molecules (M.L. Bochenek, unpublished data). The present study was undertaken to examine the hypothesis that overexpression of TGF $\beta$ 1 and activated TGF $\beta$ 1 signaling in endothelial cells is causally involved in venous thrombus nonresolution and the development of thrombofibrosis in CTEPH.

## METHODS

A detailed description of all materials and methods is provided in the [Online Data Supplement](#) and are available from the corresponding author on reasonable request.

### Studies Involving Experimental Animals

#### Generation of Mice

Mice with platelet-specific deletion of transforming growth factor- $\beta$  1 (Plt.TGF $\beta$ -KO) were generated, as described.<sup>20</sup> To generate mice with inducible, endothelial-specific deletion of TGF $\beta$ RII, mice with loxP-flanked (floxed, flox/flox) TGF $\beta$ RII locus were mated with mice expressing a tamoxifen-inducible Cre recombinase-estrogen receptor ER<sup>T2</sup> fusion protein under control of the endothelial receptor Tie2 (tyrosine kinase) promoter. Mice expressing a green fluorescent reporter gene under control of the Tie2.CreERT2 promoter were described earlier.<sup>21</sup> Genotyping was performed using primer pairs shown in Online Table I. Cre recombinase activity was induced with tamoxifen citrate containing rodent chow (TD55125; Harlan Teklad). Age- and sex-matched littermates were used throughout the study. Mice were assigned a numerical code to ensure that experiments and analyses were performed in a blinded manner.

#### Induction of Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism

Venous thrombosis was induced in mice by subtotal ligation of the inferior vena cava (IVC) over a spaceholder (5-0 Prolene suture; Ethicon). Only male mice, aged between 12 and 14 weeks, were examined to minimize any effects of sex-specific differences in the susceptibility to venous thrombosis, as described before.<sup>22</sup> Surgical IVC ligation was performed by the same operator blinded to the mouse genotype/treatment group. In a subset of mice, bosentan (Tocris) was used to antagonize endothelin-1 signaling using littermate mice randomly assigned to the control or treatment group. Noninvasive hemodynamic measurements were performed to determine blood flow velocity and the extent of venous thrombosis using high-frequency ultrasound (Vevo 3100; VisualSonics). Mice that did not develop a thrombus on day 1 after surgery were excluded from the study. Three weeks after surgery, lungs and the IVC were either paraffin embedded and processed for histological analysis or digested and prepared for flow cytometry. Paraffin-embedded IVC segments were cut into 5- $\mu$ m thick serial longitudinal sections, and out of them, 5 sections (equally spaced through the thrombus) were stained using Carstairs' to simultaneously detect fibrin and fibrosis and to select the maximal thrombus area (Online Figure IA and IB). Paraffin-embedded lung tissue was cut into 5- $\mu$ m thick serial cross-sections and stained using Carstairs' or rabbit monoclonal antibodies against fibrinogen (abcam; ab189490), CD41 (exbio; 11-763-C100), or TGF $\beta$ 1 (Novus Biologicals; MAB240). All experiments involving animals had been approved by the Animal Research Committee of the University of Mainz and the authorities of Rhineland-Palatine and complied with national guidelines for the care and use of laboratory animals.

#### Enzyme-Linked Immunoassay

Plasma levels of active TGF $\beta$ 1, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), PF4 (platelet factor 4), and ET-1 (endothelin-1)

were determined using enzyme-linked immunoassay (TGF $\beta$ 1 from R&D Systems; PAI-1, PF4, and ET-1 from abcam).

### Aortic Ring Assay

Murine aortas cut into 2-mm-sized pieces were embedded in either matrigel or collagen type I (both Corning) and cultivated in Endothelial Cell Growth Medium MV2 kit (PromoCell). In some experiments, SB431542 (10  $\mu$ mol/L; to block ALK5; Tocris), K02288 (10  $\mu$ mol/L; to block ALK1; Selleckchem), or bosentan (10  $\mu$ mol/L; to block endothelin receptors; Tocris) were added.

## Studies Using Primary Endothelial Cells

### Isolation and Cultivation

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, PromoCell), human pulmonary arterial endothelial cells (HPAECs, ATCC), human pulmonary vein endothelial cells (CellBiologics), and endothelial cells outgrown from PEA tissue (CTEPH-ECs) were cultivated, as suggested by the supplier or as published.<sup>2</sup> Mouse primary endothelial cells (mPECs) were isolated from lungs of male and female mice using magnetic beads (Miltenyi Biotec).

### Immunofluorescence Confocal Microscopy

Cells were plated onto gelatin-coated coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized using 0.2% Triton X-100 (in PBS; Roth). After blocking of unspecific antigen binding, primary antibodies were added followed by incubation with fluorescence-conjugated secondary antibodies. Images were collected on a Leica LSM710 confocal microscope and analyzed with Leica software (LAS X). Isotype IgG controls (Dako; X0944 for mouse, X0936 for rabbit and Santa Cruz Biotechnology, sc-2026 for rat) were used to exclude unspecific background staining (Online Figure IIA and IIB).

## Studies Using Murine Platelets

Platelet counts in anticoagulated whole blood were determined using an automated hematology analyzer (KX-21N; Sysmex). Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation of citrated blood and processed for flow cytometry analysis of activated integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 expression or light transmission aggregometry in response to ADP (Sigma-Aldrich, A2754), thrombin (Sigma-Aldrich; T6624), or convulxin (EnzoLifeSciences, ALX-350-100-C050), respectively.

## Studies Involving Human Tissue

### Patient Recruitment

Tissue specimens were obtained from patients diagnosed with CTEPH who underwent PEA surgery at the Kerckhoff Clinic, Department of Thoracic Surgery, Bad Nauheim, Germany. All patients with confirmed CTEPH transferred for PEA were eligible for the study; only patients who refused or withdrew consent were excluded. Plasma samples used in the study were obtained from the Mainz Registry for Pulmonary Hypertension (PHYREM) at the University Medical Center Mainz, Germany. Out of 150 consecutive patients who had been prospectively enrolled in the registry at the time that plasma for the present study was requested, we selected samples ( $n=45$  in total), which met specific requirements, such as (1) plasma availability from 3 follow-up appointments; (2) absence of HIV infection;

(3) absence of inflammatory disease; and (4) absence of congenital heart disease. Of these patients, the diagnosis was CTEPH in 19 and pulmonary arterial hypertension in 26. Both studies were conducted in accordance with the amended Declaration of Helsinki and approved by the local ethics committee, and all patients gave written informed consent.

### Histology

Serial cross-sections and microarrays through PEA tissue specimens were stained using modified Carstairs' stain and classified into 5 distinct regions containing primarily fresh or organized thrombus, myofibroblasts, vessels, or fibrosis, as described.<sup>2</sup> Interstitial collagen was detected using picrosirius red staining followed by microscopy under polarized light.

### Flow Cytometry

Cells were fixed in 0.1% paraformaldehyde and permeabilized using 0.1% Triton X-100. Unspecific binding was blocked using FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec; 130-092-575) followed by incubation with fluorescence-labeled primary antibodies.

### Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Ambion), treated with DNase I (Promega) and reverse transcribed into cDNA using iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). Primer sequences and quantitative real-time polymerase chain reaction conditions are shown in Online Table II (human) and Online Table III (mouse).

### Western Blot

Cells were lysed in RIPA buffer (Cell Signaling Technology). Proteins were fractionated by gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Protran, Whatman). After blocking, membranes were incubated overnight with primary antibodies against ET-1 (ThermoFisher; PA3-067). Antibodies against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; HyTest; 5G4 Mab 6C5) were used to ensure total protein loading. Protein bands were visualized using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Amersham Biosciences; NA934V for rabbit and NA931V for mouse) and detected with SuperSignal West Pico Substrate (Pierce).

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 4% zinc formalin-fixed paraffin sections, as described.<sup>2</sup> For mouse thrombi, serial sections were used; for PEA specimens, tissue microarrays were prepared. Sections were photographed on an Olympus BX51 microscope and analyzed using analysis software (Image ProPlus). Isotype IgG controls were used to exclude unspecific background staining (Online Figure IIC and IID).

### Statistical Analysis

Quantitative data are presented as mean $\pm$ SEM. Normal distribution was examined using the D'Agostino-Pearson omnibus normality test. For comparison of 2 groups and normal distribution, Student's  $t$  test was performed. If  $>2$  groups and different

time points were compared, 1- resp. Two-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test were performed. Multiple test correction across experiments was not performed. Nonparametric tests were used if normal distribution was not present. All analyses were performed using GraphPad Prism version 7.04 for Windows (GraphPad Prism Software).

## RESULTS

### *Platelet-Specific Deletion of TGF $\beta$ 1 Results in Faster Venous Thrombus Resolution*

TGF $\beta$ 1, its receptors (TGF $\beta$ RII, TGF $\beta$ RI/ALK1, and TGF $\beta$ RI/ALK5) and phospho-SMAD2/3 or phospho-SMAD1/5 were expressed in resolving venous thrombi obtained from C57BL/6 wild-type mice at day 21 after IVC ligation (Online Figure IIIA). To study the role of TGF $\beta$  during venous thrombus resolution, mice with genetic deletion of TGF $\beta$ 1 in platelets (Plt.TGF $\beta$ -KO), the main source of circulating TGF $\beta$ 1,<sup>23</sup> were subjected to IVC ligation and venous thrombus resolution followed over 21 days. Of note, we and others had previously shown that absence of TGF $\beta$  in platelets does not affect platelet function<sup>24,25</sup> and that platelets contribute to venous thrombus progression in this model.<sup>26</sup> The presence and co-localization of TGF $\beta$ 1 and CD41-positive platelets in 2 days-old venous thrombi is shown in Online Figure IIIB. Noninvasive ultrasound imaging revealed that the percentage of mice forming a venous thrombus (76 versus 82% in Plt.TGF $\beta$ -WT;  $P=0.3856$ ; Figure 1A) was similar in the Plt.TGF $\beta$ -WT and Plt.TGF $\beta$ -KO group. In those mice that formed a thrombus and were included in the study, the thrombus area at day 1 after IVC ligation also did not differ ( $P=0.6818$ ; Online Figure IVA). Circulating platelet numbers ( $P=0.8359$  and  $P=0.7046$ , respectively; Online Figure VA) and plasma PF4 levels ( $P>0.9999$  for both; Online Figure VB) did not differ between Plt.TGF $\beta$ -WT and Plt.TGF $\beta$ -KO mice, uninjured or at day 21 after IVC ligation. Analysis of activated integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 expression, without and in response to ADP and thrombin (Online Figure VE and VF) and platelet aggregation in response to thrombin (Online Figure VIA and VIB) also revealed no differences between Plt.TGF $\beta$ -WT and Plt.TGF $\beta$ -KO mice. Venous thrombi resolved significantly faster in Plt.TGF $\beta$ -KO mice compared with Plt.TGF $\beta$ -WT controls ( $P=0.0156$  at day 21; Figure 1B) resulting in significantly smaller thrombi at day 21 ( $2.91\pm 0.33$  versus  $5.95\pm 0.62$  mm<sup>2</sup> in Plt.TGF $\beta$ -WT mice,  $P=0.0004$ ; Figure 1C and 1D;  $2.31\pm 0.65$  versus  $6.11\pm 0.67$  mm<sup>3</sup>,  $P=0.0067$ ; not shown). Carstairs' staining revealed no differences in the fibrotic area as proportion of the total thrombus area between Plt.TGF $\beta$ -KO and Plt.TGF $\beta$ -WT mice ( $22.7\pm 2.02\%$  versus  $26.4\pm 2.06\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT mice,  $P=0.2115$ ; Figure 1E and 1F). Similar findings were obtained after immunohistochemistry of smooth muscle actin- $\alpha$  ( $2.78\pm 0.28\%$  versus  $2.76\pm 0.69\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT mice,  $P=0.9838$ ; not shown) and sirius red staining of interstitial collagen ( $6.72\pm 1.83\%$  versus  $5.81\pm 1.16\%$  in Plt.TGF $\beta$ -WT mice,  $P=0.6615$ ; Figure 1G and 1H).

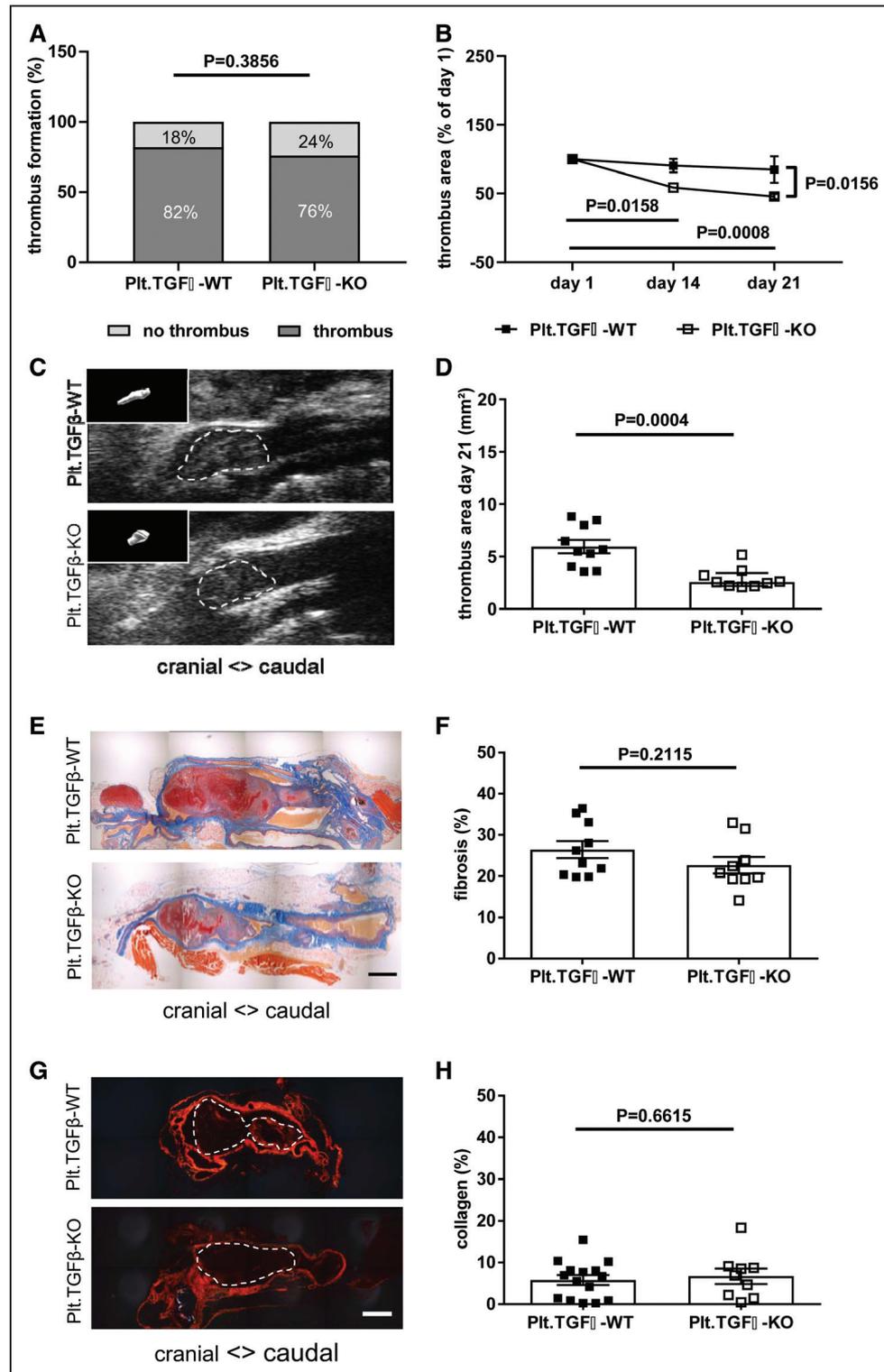
### *Deletion of TGF $\beta$ RII in Endothelial Cells Is Associated With Increased Expression of TGF $\beta$ Type I Receptors and Activated TGF $\beta$ 1 Signaling*

To examine the importance of TGF $\beta$  signaling in endothelial cells for thrombus (non)-resolution, we generated mice in which TGF $\beta$ RII was specifically deleted in endothelial cells (End.TGF $\beta$ RII-KO). Confocal microscopy analysis confirmed lower TGF $\beta$ RII expression in endothelial cells lining the IVC of End.TGF $\beta$ RII-KO mice compared with End.TGF $\beta$ RII-WT controls (Online Figure VIIA). Flow cytometry analysis of CD31-positive cells from mouse lungs demonstrated significantly reduced numbers of TGF $\beta$ RII-positive cells in End.TGF $\beta$ RII-KO mice compared with cells from End.TGF $\beta$ RII-WT mice (0.25-fold;  $P<1\times 10^{-4}$ ) but also revealed a significant increase in the number of CD31-positive cells expressing ALK1 (2.95-fold;  $P=0.0074$ ), ALK5 (11.3-fold;  $P=0.0199$ ), phospho-SMAD2/3 (1.89-fold;  $P=0.0008$ ), or phospho-SMAD5 (1.85-fold;  $P=0.0424$ ), whereas the number of CD31/TGF $\beta$ RIII-positive cells did not differ (1.08-fold;  $P=0.6189$ ; Online Figure VIIB). Confocal microscopy analysis confirmed higher TGF $\beta$ RI/ALK1 and TGF $\beta$ RI/ALK5 expression in mPECs isolated from End.TGF $\beta$ RII-KO mice compared with End.TGF $\beta$ RII-WT controls (Online Figure VIIC).

Total (ie, latent) TGF $\beta$ 1 levels in plasma did not differ; however, endothelial-specific deletion of TGF $\beta$ RII was associated with significantly increased plasma levels of activated TGF $\beta$ 1 ( $604\pm 1.5$  versus  $148\pm 3.2$  pg/mL in End.TGF $\beta$ RII-WT mice;  $P=0.0050$ ). In this regard, mPECs from End.TGF $\beta$ RII-KO mice were found to over-express factors involved in TGF $\beta$  activation, such as MMP9 (matrix metalloproteinase-9; 3.7-fold;  $P=0.0202$ ) or TSP1 (thrombospondin-1; 2.9-fold;  $P=0.0089$ ; Online Figure VIIIA). Activated TGF $\beta$ 1 plasma levels further increased at day 21 after IVC ligation in End.TGF $\beta$ RII-WT (25.8-fold) and to a greater extent in End.TGF $\beta$ RII-KO mice (27.4-fold;  $P=0.0377$ ).

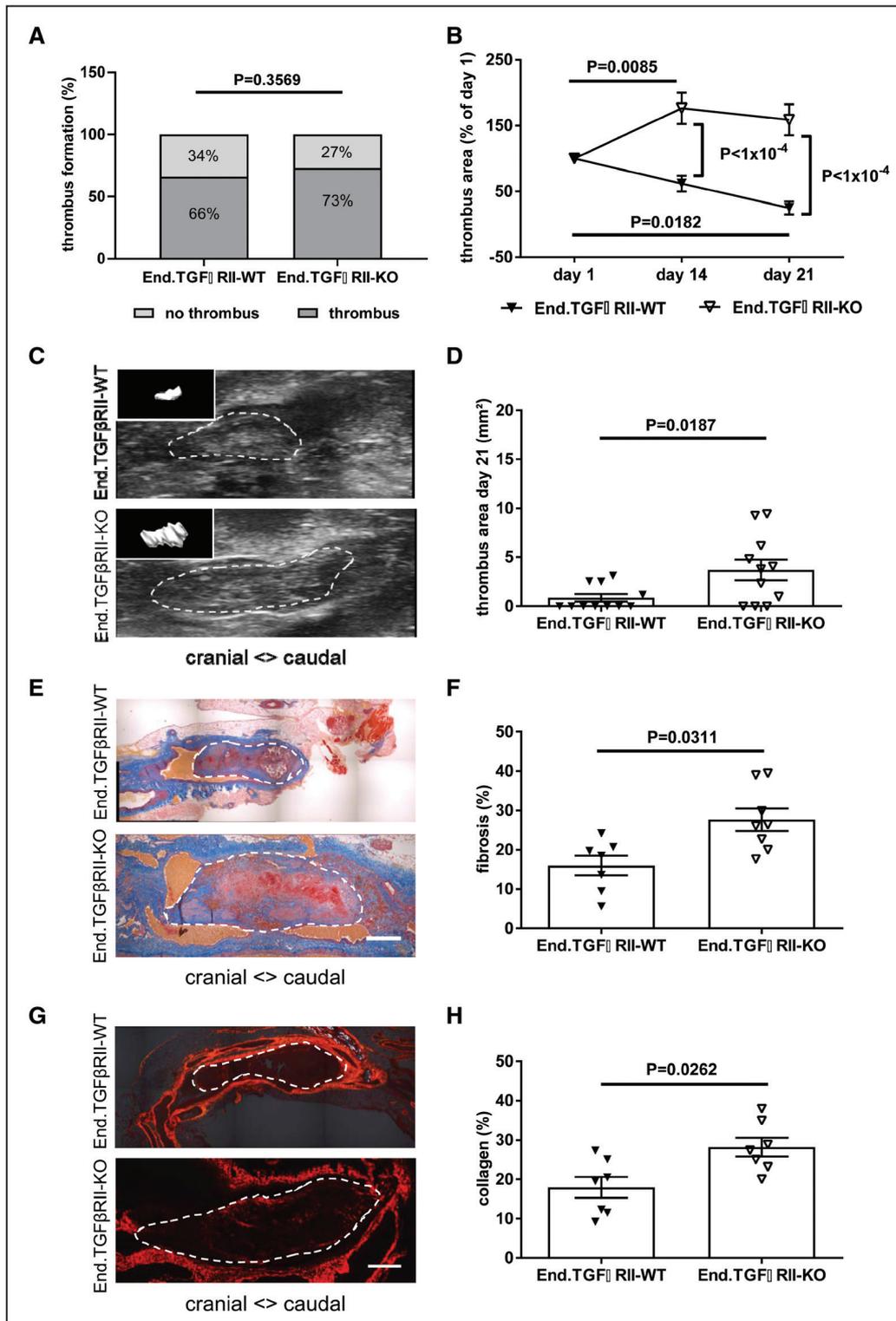
### *Activated TGF $\beta$ Signaling in Endothelial Cells Delays Thrombus Resolution and Promotes the Formation of Fibrotic, Vessel-Rich Thrombi*

Next, End.TGF $\beta$ RII-WT and End.TGF $\beta$ RII-KO mice were subjected to IVC ligation. The percentage of mice developing a venous thrombus (73% versus 66% in End.TGF $\beta$ RII-WT;  $P=0.3569$ ; Figure 2A) and the thrombus area at day 1 after surgery ( $P=0.3539$ ; Online Figure IVB) did not significantly differ between genotypes. Similar to Plt.TGF $\beta$  mice, plasma PF4 levels (Online Figure VC), platelet activated integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 expression (Online Figure VG and VH) and platelet aggregation in response to thrombin (Online Figure VIC and VID) did not differ in End.TGF $\beta$ RII-WT and End.TGF $\beta$ RII-KO mice, uninjured or at day 21 after IVC ligation. Preincubation of C57BL6/J mouse platelets with TGF $\beta$ 1 (10 ng/mL) did not alter their response to the platelet agonists thrombin



**Figure 1. Platelet-specific deletion of TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ ) and venous thrombus resolution.**

The percentage of mice that formed a venous thrombus on day 1 after inferior vena cava (IVC) ligation is shown (A). Thrombus resolution (B) and thrombus area at day 21 after IVC ligation (C and D) were measured by ultrasound in Pit.TGF $\beta$ -WT (n=10) and Pit.TGF $\beta$ -KO (n=9) mice. In B, thrombus area at day 21 is expressed relative to thrombus area at day 1 after surgery. In C, representative ultrasound snapshots of thrombosed IVC segments in Pit.TGF $\beta$ -WT and Pit.TGF $\beta$ -KO mice at day 21 after IVC ligation are shown (with 3-dimensional thrombus reconstruction as insert). Representative pictures of longitudinal cross-sections through the thrombosed IVC at day 21 after ligation following Carstairs' staining (E) and quantification of thrombofibrosis (blue signal; n=10 Pit.TGF $\beta$ -WT and n=9 Pit.TGF $\beta$ -KO mice; F). Representative pictures after Sirius red stain (G) and quantification of interstitial collagen (red signal; n=15 for Pit.TGF $\beta$ -WT and n=9 for Pit.TGF $\beta$ -KO mice; H). Exact P values, as determined by  $\chi^2$  test in (A), 2-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test (3 comparisons per genotype) in (B; nonsignificant P values are not shown), Mann-Whitney test in (D) and Student's t test in (F) and (H), are shown in the graphs. Scale bars in (E) and (G) represent 200  $\mu$ m.



**Figure 2. Endothelial-specific deletion of TGF $\beta$ RII (transforming growth factor- $\beta$ ) and venous thrombus remodeling.**

The percentage of mice that formed a venous thrombus on day 1 after inferior vena cava (IVC) ligation is shown (A). Thrombus resolution (B) and thrombus area (C and D) measured by ultrasound at day 21 after IVC ligation in End.TGF $\beta$ RII-WT and End.TGF $\beta$ RII-KO mice ( $n=11$  mice per group). In B, thrombus area at day 14 and 21 is expressed relative to thrombus area at day 1. In C, representative ultrasound snapshots of thrombosed IVC segments in End.TGF $\beta$ RII-WT and End.TGF $\beta$ RII-KO mice at day 21 after IVC ligation shown (with 3-dimensional thrombus reconstruction as insert). Representative pictures of longitudinal cross-sections through the thrombosed IVC at day 21 after ligation following Carstairs' staining (E) and quantification of thrombofibrosis (blue signal;  $n=7$  End.TGF $\beta$ RII-WT and  $n=9$  End.TGF $\beta$ RII-KO mice; F). Representative pictures after Sirius red stain (G) and quantification of interstitial collagen (red signal;  $n=7$  mice per group; H). Exact  $P$  values, as determined by  $\chi^2$  test in (A), 2-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test (3 comparisons per genotype) in (B; nonsignificant  $P$  values are not shown), and Mann-Whitney test in (D, F, and H) are shown in the graphs. Scale bars represent 200  $\mu$ m.

(Online Figure VIE) or convulxin (Online Figure VIF). Endothelial deletion of TGF $\beta$ RII was associated with significantly slower thrombus resolution ( $P < 1 \times 10^{-4}$  versus End.TGF $\beta$ RII-WT mice at day 14 and 21 after IVC ligation; Figure 2B) resulting in increased venous thrombus size at day 21 ( $3.71 \pm 1.05$  versus  $0.85 \pm 0.38$  mm<sup>2</sup> in End.TGF $\beta$ RII-WT mice,  $P = 0.0187$ ; Figure 2C and 2D;  $16.63 \pm 0.41$  versus  $5.23 \pm 1.05$  mm<sup>3</sup>,  $P = 0.0005$ ; not shown). Analysis of mouse lungs revealed significantly higher numbers of vessels occluded with fibrinogen-positive, unresolved thrombotic material in End.TGF $\beta$ RII-KO mice that had formed a thrombus compared with End.TGF $\beta$ RII-WT mice ( $6.6 \pm 0.53$  versus  $1.0 \pm 0.49$  occluded arteries in End.TGF $\beta$ RII-WT mice,  $P < 1 \times 10^{-4}$ ; Figure 3A through 3C). In these areas, CD41-positive platelets and strong TGF $\beta$ 1 immunosignals could also be observed (Figure 3D). Of note, clinical signs of respiratory insufficiency or increased mortality ( $< 1\%$  in both groups) were not observed in End.TGF $\beta$ RII-KO mice. Pulmonary artery obstructions were less frequent in mice that did not develop venous thrombosis, irrespective of their genotype ( $2.7 \pm 0.57$  versus  $2.0 \pm 0.65$  in End.TGF $\beta$ RII-WT mice,  $P = 0.9368$ ), and also not observed in Plt.TGF $\beta$  mice ( $P > 0.9999$ ; Online Figure IXA through IXC). Venous thrombi in End.TGF $\beta$ RII-KO mice contained significantly higher amounts of fibrotic material ( $27.6 \pm 2.5\%$  versus  $16.0 \pm 2.8\%$  in End.TGF $\beta$ RII-WT mice;  $P = 0.0311$ ; Figure 2E and 2F) and interstitial collagen ( $28.2 \pm 2.4\%$  versus  $17.9 \pm 2.6\%$ ;  $P = 0.0262$ ; Figure 2G and 2H) compared with End.TGF $\beta$ RII-WT animals. The SMA (smooth muscle actin- $\alpha$ )-positive area was also significantly increased ( $6.9 \pm 0.5\%$  versus  $3.9 \pm 1.4\%$  in End.TGF $\beta$ RII-WT mice;  $P = 0.0465$ ; Figure 4A and 4C). Furthermore, SMA immunosignals frequently colocalized with CD31-positive cells lining vascular channels, which were increased in thrombi of End.TGF $\beta$ RII-KO ( $P = 0.0029$  versus End.TGF $\beta$ RII-WT mice; Figure 4D), a finding reminiscent of vessels in patients with CTEPH (Figure 4B).

Flow cytometry analysis of venous thrombi 21 days after IVC ligation confirmed higher numbers of CD31-positive cells also expressing FSP1 (fibroblast-specific protein-1;  $65.9 \pm 3.2\%$  versus  $39.9 \pm 5.3\%$  in End.TGF $\beta$ RII-WT mice;  $P = 0.0286$ ; Figure 4E and 4F) or Cdh5 (cadherin 5/VE-cadherin)-positive cells also expressing SMA ( $23.6 \pm 1.7\%$  versus  $13.2 \pm 2.0\%$  in End.TGF $\beta$ RII-WT mice;  $P = 0.0286$ ; Figure 4G and 4H) in End.TGF $\beta$ RII-KO mice. Lineage tracing employing endothelial reporter animals and confocal microscopy confirmed that (GFP-positive) endothelial cells expressed the mesenchymal markers SMA, FSP1, or DDR2 at day 21 (Online Figure XA), in line with endothelial-to-mesenchymal phenotype conversion during venous thrombus remodeling. On the contrary, and regarding the possible expression of FSP1 in myelomonocytic cells, a cell type also involved in thrombus resolution, the number of Mac2-positive macrophages was decreased within

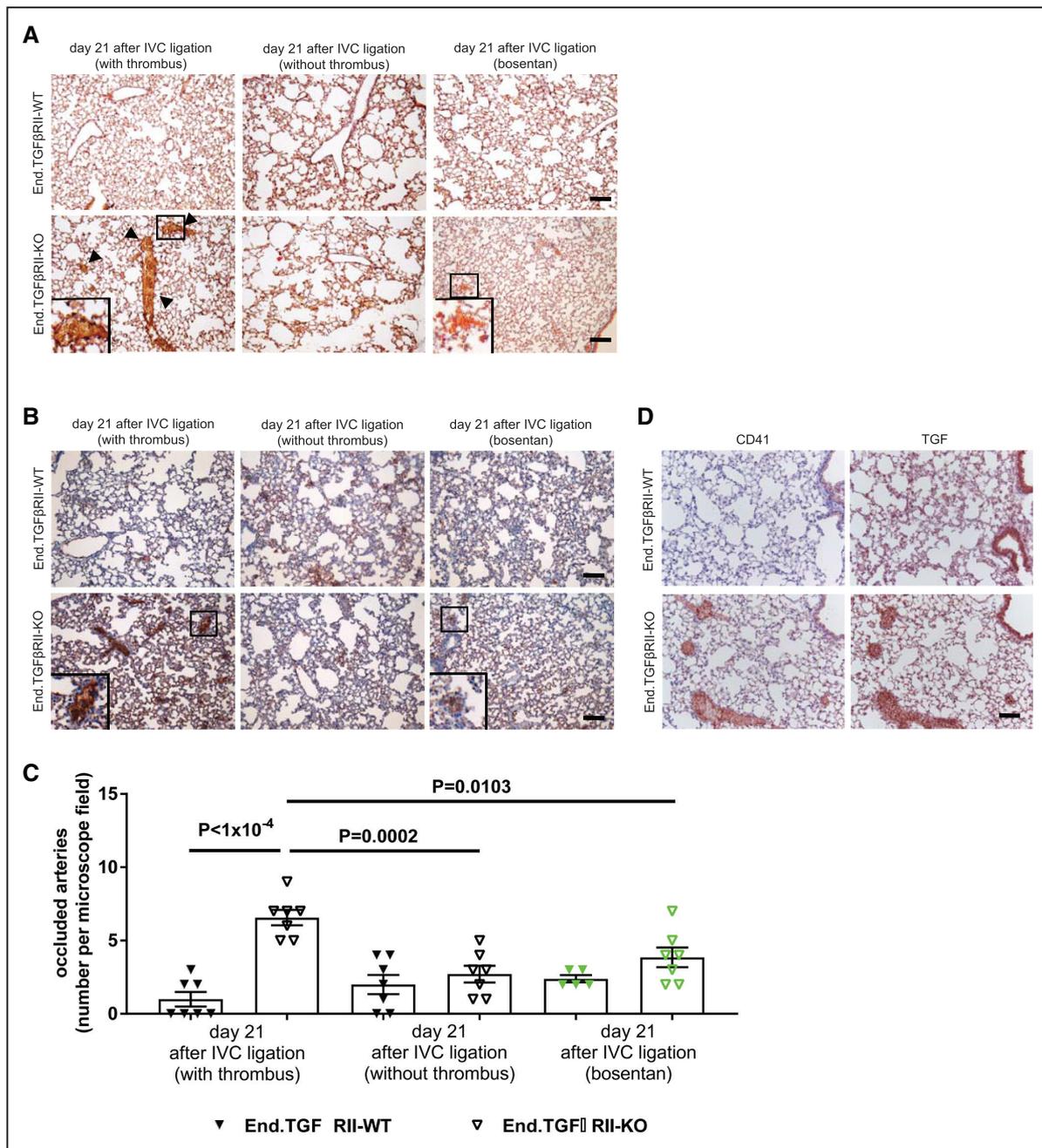
organizing thrombi of End.TGF $\beta$ RII-KO mice ( $7.5 \pm 0.15\%$  versus  $13.0 \pm 1.7\%$  in thrombi of End.TGF $\beta$ RII-WT mice;  $P = 0.0174$ ; not shown).

Quantitative polymerase chain reaction analysis of CD31-positive mPECs revealed significantly higher mRNA levels of mesenchymal markers and transcription factors involved in regulating EndMT (SNAIL [snail family zinc finger 1]; 3.0-fold,  $P = 0.0079$ ), TWIST (twist-related protein 1; 7.0-fold,  $P = 0.0119$ ), ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1; 3.6-fold,  $P = 0.0049$ ) on genetic deletion of TGF $\beta$ RII, whereas mRNA expression of the endothelial marker Cdh5 was significantly reduced (0.37-fold,  $P < 1 \times 10^{-4}$ ; Online Figure VIIIA). Interestingly, mRNA levels of FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1), an antagonist of TGF $\beta$  signaling involved in EndMT,<sup>27</sup> were significantly lower in endothelial cells lacking TGF $\beta$  type II receptors (0.16-fold,  $P = 0.0001$ ; Online Figure VIIIA), and decreased numbers of CD31/FGFR1-positive cells were confirmed using flow cytometry analysis of mouse lungs (3.0-fold,  $P < 1 \times 10^{-4}$ ; Online Figure VIIB). At the functional level, a higher number of endothelial lectin-positive cells co-expressing SMA or FSP1 ( $44.3 \pm 2.0\%$  versus  $1.0 \pm 1.0\%$  and  $49.7 \pm 1.2\%$  versus  $0.0 \pm 0\%$  in End.TGF $\beta$ RII-WT, respectively,  $P < 1 \times 10^{-4}$  for both; Online Figure XB and XC) and an increased sprouting into matrigel or collagen ( $342 \pm 42$  versus  $105 \pm 11$   $\mu$ m total sprout length in End.TGF $\beta$ RII-WT,  $P < 1 \times 10^{-4}$  and  $258 \pm 24$  versus  $94 \pm 15$   $\mu$ m,  $P < 1 \times 10^{-4}$ ; Online Figure XD) was observed in aortic rings from End.TGF $\beta$ RII-KO mice, whereas dual-positive cells were rarely detected in their End.TGF $\beta$ RII-WT counterparts. These findings in transgenic mice suggested that increased TGF $\beta$ 1 signaling via type I receptors in endothelial cells impairs venous thrombus resolution and that enhanced EndMT may play a role in this process.

### Evidence of Overactive TGF $\beta$ Signaling and EndMT in Patients With CTEPH

To examine the importance of our findings in mice for thrombus nonresolution in humans, tissue microarrays of PEA specimens from CTEPH patients were immunostained for components of the TGF $\beta$  signaling pathway. Expression of TGF $\beta$ 1 (Figure 5A and 5B) and its receptors TGF $\beta$ RII (Figure 5A and 5C), TGF $\beta$ RI/ALK1 (Figure 5A and 5D), and TGF $\beta$ RI/ALK5 (Figure 5A and 5E) was significantly increased in vessel-rich regions, and TGF $\beta$ RII- and ALK5-immunopositive cells were also observed at significantly increased numbers in areas containing myofibroblasts. Phospho-SMAD2/3 (Figure 5A and 5F) and phospho-SMAD5-positive cells (Figure 5A and 5G) were also significantly elevated in areas containing vessels compared with all other regions.

Immunohistochemical analysis of PEA tissue microarrays suggested co-localization of immunosignals for CD31 and CDH5 with FSP1, DDR2, or SMA in vessel-rich regions (Online Figure XIA through XIE). Confocal microscopy analysis confirmed that CDH5-positive cells

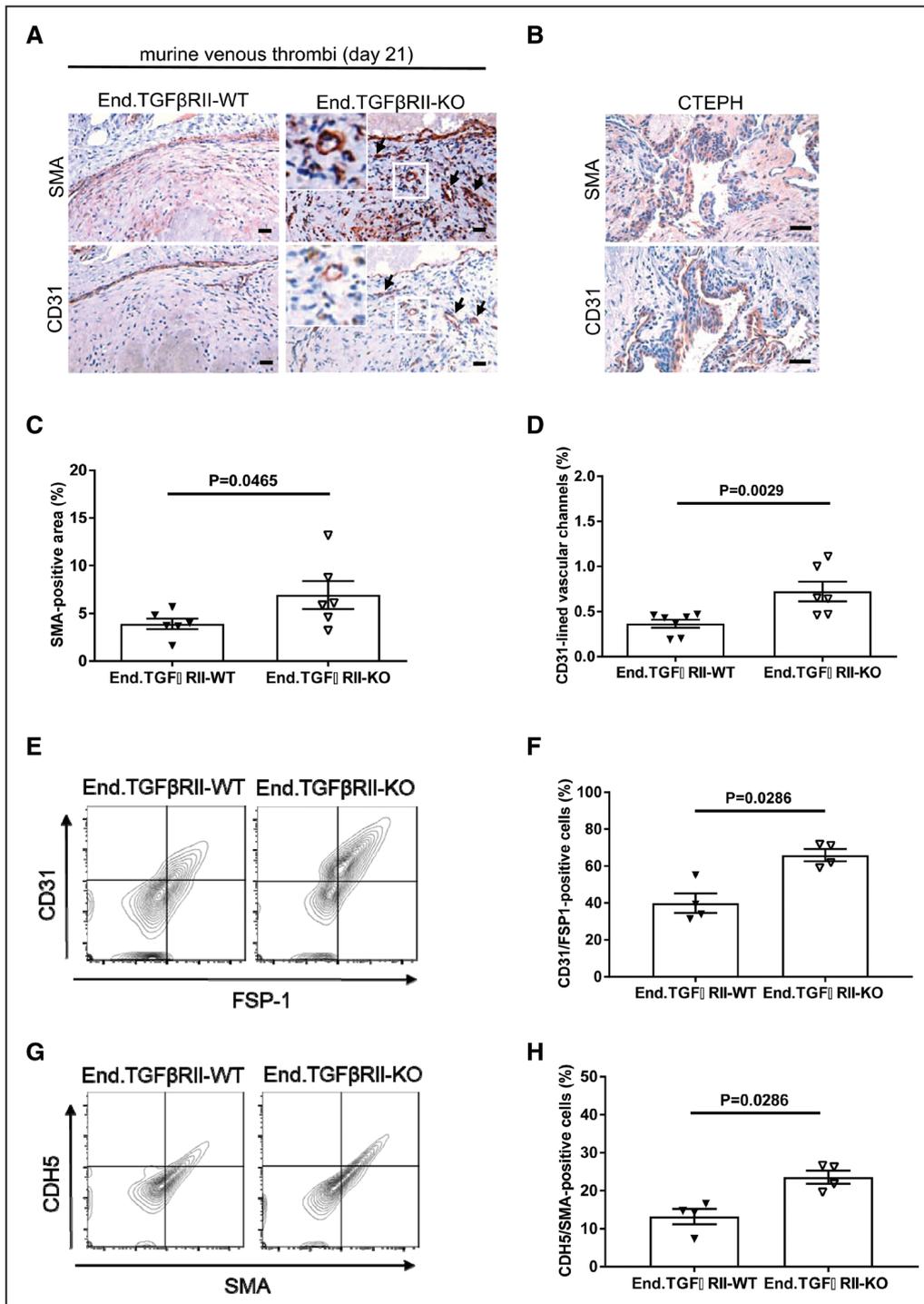


**Figure 3. Detection of pulmonary vascular occlusions following venous thrombosis.**

Representative images after analysis of pulmonary artery obstructions in PBS- and formalin-infused paraffin-embedded mouse lungs from End.TGF $\beta$ RII-WT and End.TGF $\beta$ RII-KO mice at day 21 after inferior vena cava (IVC) ligation using Carstairs' staining (**A**; arrows) or immunostaining of fibrinogen (**B**). Mice that developed a venous thrombus at day 1 and mice without a thrombus were examined separately to distinguish pulmonary embolization and in situ thrombosis (n=7 mice per group). End.TGF $\beta$ RII-KO mice treated with bosentan over 3 weeks were also examined (marked in green; n=5 End.TGF $\beta$ RII-WT and n=7 End.TGF $\beta$ RII-KO mice). Scale bars represent 10  $\mu$ m. The results of the quantitative analysis of red, fibrin-rich material (arrows in **A**) in the pulmonary parenchyma are shown (**C**). Exact *P* values, as determined by 1-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test (7 comparisons), are shown in **C**. Nonsignificant *P* values are not shown. **D**, Representative images of lungs from End.TGF $\beta$ RII-WT and End.TGF $\beta$ RII-KO mice at day 21 after IVC ligation showing results after immunostaining for the platelet marker CD41 and TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ ). Scale bar represent 10  $\mu$ m.

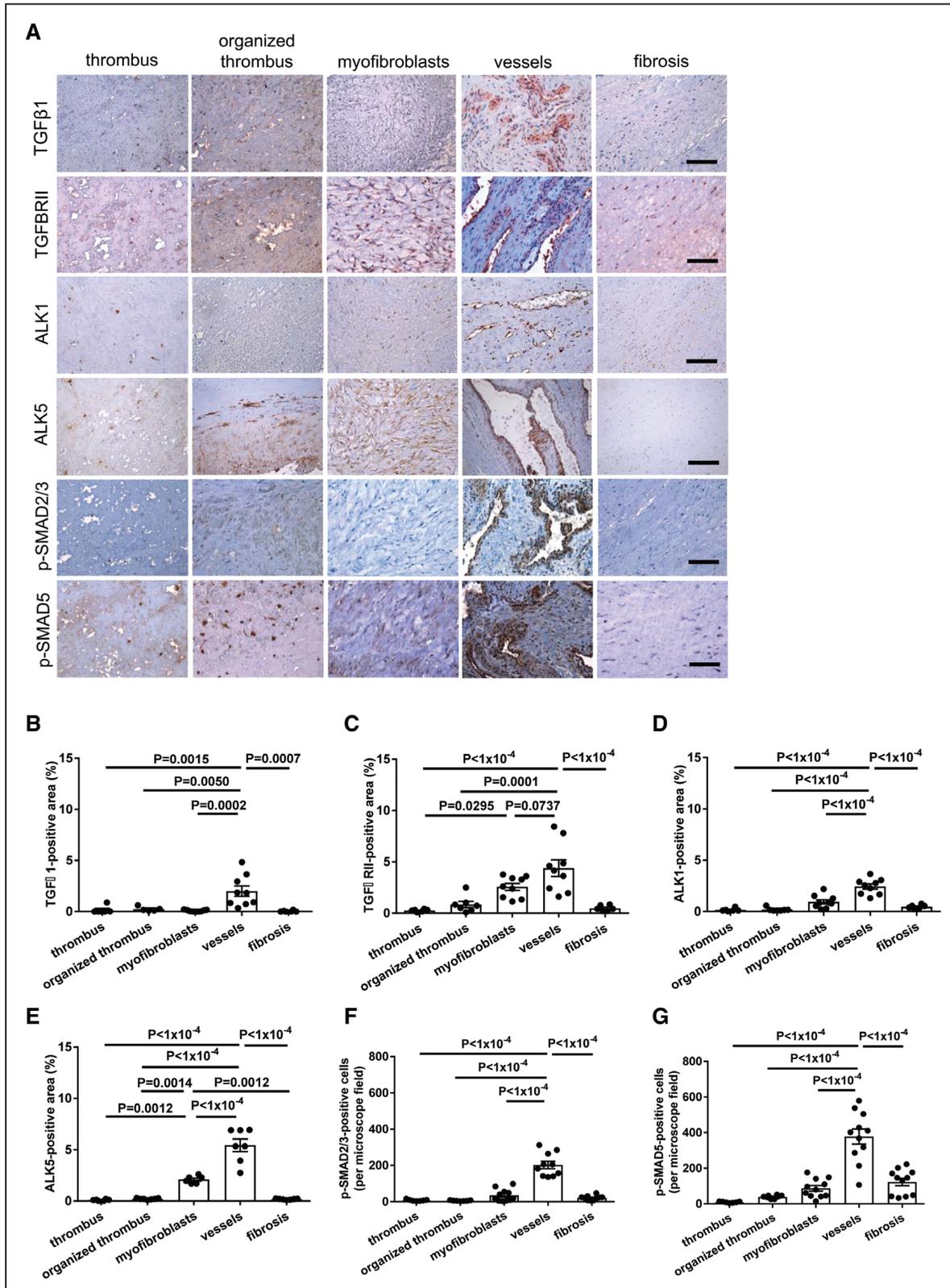
also express SMA, as shown in PEA specimens and primary endothelial cells isolated from CTEPH tissue (Figure 6A). HPAECs examined in parallel were found

to express endothelial but not mesenchymal markers. HPAECs were used as controls in these experiments because preliminary analyses confirmed significantly



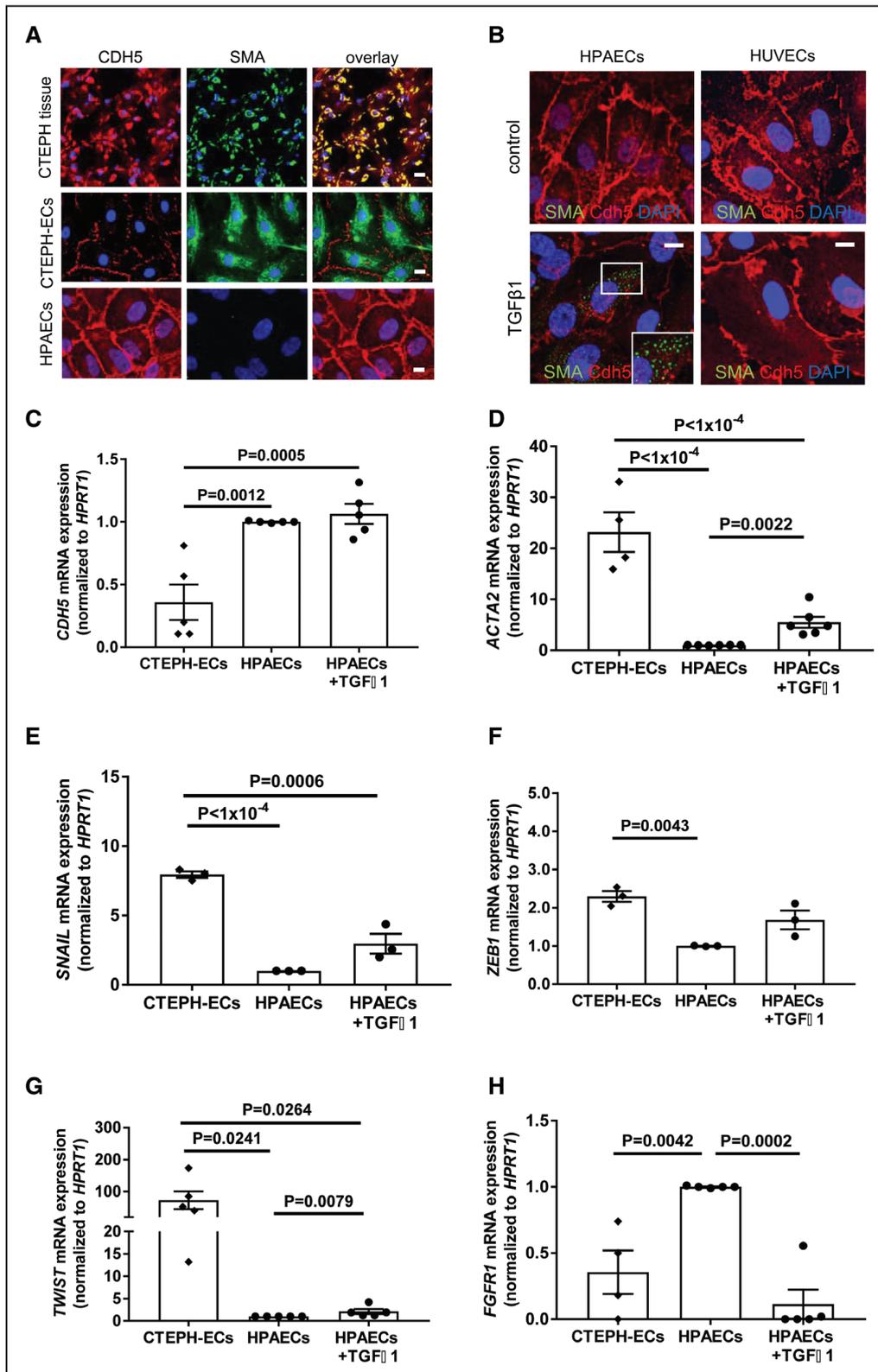
higher expression of TGF $\beta$ RII ( $P=0.0316$  versus HUVECs), ALK1 ( $P=0.0079$  versus human pulmonary vein endothelial cells and  $P=0.0047$  versus HUVECs),

ALK5 ( $P=0.0024$  versus human pulmonary vein endothelial cells and  $P=0.0012$  versus HUVECs) and endoglin ( $P=0.0126$  versus human pulmonary vein endothelial



**Figure 5. Expression of TGFβ1 (transforming growth factor-β), its receptors and downstream signaling mediators in pulmonary endarterectomy specimens of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH).**

Representative images in regions primarily containing fresh or organized thrombus, myofibroblasts, vessels or fibrosis (A) and the results of the quantitative analysis after immunohistochemical analysis of the expression of TGFβ1 (B), TGFβRII (C), TGFβRI/ALK1 (activin receptor-like kinase; D), TGFβRI/ALK5 (E), p-SMAD2/3 (F), and p-SMAD5 (G) in pulmonary endarterectomy (PEA) samples from n=9 CTEPH patients are shown. Scale bars represent 100 μm. Exact P values, as determined by 1-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test (10 comparisons), are shown in B–G. Nonsignificant P values are not shown.



**Figure 6.** Expression of endothelial and mesenchymal markers in primary human pulmonary endothelial cells from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): comparison to TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ ) stimulation.

Representative pictures after immunofluorescence confocal microscopy for VE-cadherin (CDH5) and SMA (smooth muscle actin- $\alpha$ ) in CTEPH tissue specimens, endothelial cells outgrown from CTEPH tissue (CTEPH-ECs) and human pulmonary arterial endothelial cells (HPAECs; **A**). Representative confocal pictures for CDH5 and SMA in HPAECs and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with and without TGF $\beta$ 1 stimulation (10 ng/mL for 7 days) to induce EndMT (endothelial-to-mesenchymal transition; **B**). Quantitative analysis of *CDH5* ( $n=5$  biological replicates; **C**), *SMA* (*ACTA2*;  $n=4$  for CTEPH and  $n=6$  for all others; **D**), *SNAIL* ( $n=3$ ; **E**), *ZEB1* ( $n=3$ ; **F**), *TWIST* ( $n=5$ ; **G**) and *FGFR1* (*Continued*)

cells and  $P=0.0088$  versus HUVECs; Online Figure XIIA through XIID). Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of CTEPH-ECs demonstrated that CDH5 mRNA expression levels were significantly reduced (0.36-fold,  $P=0.0012$ ; Figure 6C) and SMA (ACTA2) mRNA levels significantly increased (23.6-fold,  $P<1\times 10^{-4}$ ; Figure 6D) compared with HPAECs, and increased SMA expression was also observed in HPAECs following exposure to TGF $\beta$ 1, whereas HUVECs (lacking TGF $\beta$  receptor type I-III isoforms) did not respond to TGF $\beta$ 1 (Figure 6B).

Previous studies have shown that TGF $\beta$ 1 is a major inducer of EndMT.<sup>27</sup> To examine the importance of TGF $\beta$ 1 for EndMT in CTEPH, the expression of endothelial and mesenchymal markers and transcription factors regulating EndMT was examined in CTEPH-ECs and compared with those in HPAECs with and without TGF $\beta$ 1 stimulation. Highly elevated mRNA levels of transcription factors involved in EndMT, such as SNAIL (8.0-fold,  $P<1\times 10^{-4}$ ; Figure 6E), ZEB1 (2.3-fold,  $P=0.0043$ ; Figure 6F), and TWIST (73.4-fold,  $P=0.0241$ ; Figure 6G) were observed in CTEPH-ECs, similar to HPAECs stimulated with TGF $\beta$ 1. FGFR1 mRNA levels were significantly lower in CTEPH-ECs and TGF $\beta$ 1-stimulated HPAECs (0.36-fold,  $P=0.0042$ , and 0.12-fold,  $P=0.0002$ , respectively; Figure 6H). Taken together, increased TGF $\beta$ 1 expression and signaling, as well as EndMT were observed in vessel-rich areas of CTEPH tissue and primary endothelial cells outgrown from it, supporting a role during the development of thrombofibrotic lesions, similar to our findings in mice.

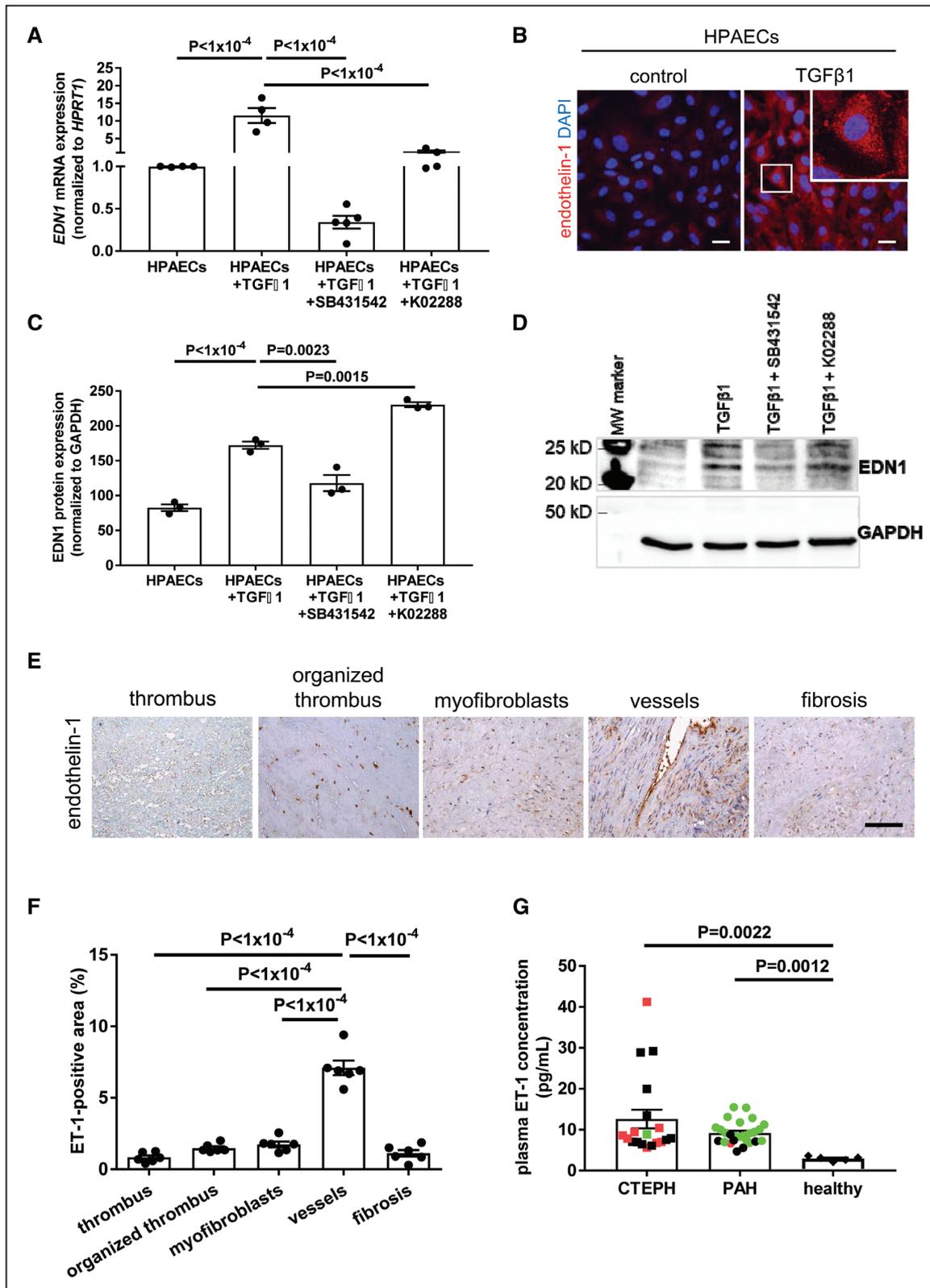
### **Endothelin-1 is Induced by TGF $\beta$ 1, Elevated in Human and Murine Thrombofibrosis and Endothelin Receptor Antagonization Prevents EndMT**

Endothelin receptor antagonists are one of the main therapeutic components in the management of patients with pulmonary arterial hypertension (PAH).<sup>1</sup> Stimulation of HPAECs with TGF $\beta$ 1 significantly increased ET-1 mRNA (11.5-fold,  $P<1\times 10^{-4}$  versus HPAECs; Figure 7A) and protein (2.1-fold,  $P<1\times 10^{-4}$ ; Figure 7B through 7D) expression, and this effect could be prevented by coin-cubation with the ALK5 inhibitor SB431542 ( $P<1\times 10^{-4}$  versus TGF $\beta$ 1-stimulated HPAECs for mRNA levels in Figure 7A;  $P=0.0023$  versus TGF $\beta$ 1-stimulated HPAECs for protein levels in Figure 7C) and, although to a lesser extent, by the ALK1 inhibitor K02288 ( $P<1\times 10^{-4}$ ; Figure 7A, 7C, and 7D). ET-1 was most prominently expressed in vessel-rich regions in CTEPH PEA specimens ( $P<1\times 10^{-4}$  versus all others; Figure 7E and 7F), and significantly increased ET-1 level were

detected in plasma of CTEPH patients ( $12.6\pm 2.29$  pg/mL) compared with healthy controls ( $2.92\pm 0.26$  pg/mL;  $P=0.0022$ ; mean age, 56 years; 40% male; Figure 7G), and ET-1 plasma levels in CTEPH patients were similar to those in patients with PAH ( $9.2\pm 0.54$  pg/mL;  $P>0.9999$ ). Although platelets are present in CTEPH PEA lesions,<sup>2</sup> plasma levels of PF4 (platelet factor 4) did not differ between patients with CTEPH ( $224\pm 19.6$  pg/mL) or PAH ( $250\pm 22.4$  pg/mL) and those from healthy controls ( $269\pm 22.3$  pg/mL,  $P=0.9902$  versus CTEPH and  $P>0.9999$  versus PAH; Online Figure VD). The clinical characteristics of both patient groups are shown in Online Table IV.

Elevated ET-1 mRNA (8.9-fold,  $P=0.0022$ ; Figure 8A) and protein (Figure 8B) expression was also observed in primary ECs isolated from End.TGF $\beta$ RII-KO mice compared with those from End.TGF $\beta$ RII-WT mice. Plasma ET-1 levels in End.TGF $\beta$ RII-KO animals were significantly elevated compared with End.TGF $\beta$ RII-WT mice at baseline ( $18.2\pm 2.09$  versus  $7.2\pm 0.71$  pg/mL in End.TGF $\beta$ RII-WT mice,  $P=0.0074$ ) and further increased to a significantly greater extent 21 days after IVC ligation ( $32.1\pm 4.6$  versus  $12.6\pm 3.2$  pg/mL in End.TGF $\beta$ RII-WT mice,  $P=0.0002$  versus End.TGF $\beta$ RII-WT and  $P=0.0030$  versus End.TGF $\beta$ RII-KO at baseline; Figure 8C). At this time point, a strong ET-1 immunosignal was observed in resolving murine thrombi, particularly in those of End.TGF $\beta$ RII-KO mice (Figure 8D). Of note, ET-1 plasma levels and immunosignals in thrombi of Plt.TGF $\beta$ -KO mice did not differ from those in their Plt.TGF $\beta$ -WT littermates ( $P>0.9999$ ; Online Figure XIIB and XIIC). Moreover, preincubation of C57BL6/J wild-type platelets with ET-1 (1  $\mu$ mol/L) did not alter their response to thrombin or convulxin stimulation (Online Figure VIE and VIF). Antagonization of endothelin receptors using bosentan reduced the outgrowth ( $P=0.0347$  in End.TGF $\beta$ RII-WT and  $P<1\times 10^{-4}$  in End.TGF $\beta$ RII-KO mice; Online Figure XIVA and XIVB) and mesenchymal marker expression (Online Figure XIVC) of endothelial sprouts from aortic rings of End.TGF $\beta$ RII-KO mice. Importantly, administration of bosentan following IVC ligation significantly reduced venous thrombus size at day 21 in End.TGF $\beta$ RII-KO mice ( $P=0.0079$  versus control-treated mice) to values similar to those observed in End.TGF $\beta$ RII-WT mice ( $1.4\pm 0.10$  versus  $2.3\pm 0.09$  mm<sup>2</sup> in End.TGF $\beta$ RII-WT mice,  $P>0.9999$ ; Figure 8E and 8F). The number of occluded pulmonary arteries also significantly decreased compared with control-treated End.TGF $\beta$ RII-KO mice ( $3.9\pm 0.67$  versus  $6.6\pm 0.53$  of occluded arteries per microscope field in End.TGF $\beta$ RII-KO,  $P=0.0103$ ; Figure 3A through 3C). Flow cytometry analysis of 21

**Figure 6 Continued.** (n=4 for CTEPH and n=5 for all others; H) mRNA expression in HPAECs with and without TGF $\beta$ 1 stimulation (10 ng/mL for 7 days) and CTEPH-ECs. Scale bars represent 10  $\mu$ m. Exact  $P$  values, as determined by 1-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test (3 comparisons) and by Mann-Whitney test for the comparison of HPAECs with and without TGF $\beta$ 1 stimulation, are shown in C–H. Nonsignificant  $P$  values are not shown.



**Figure 7. Endothelin-1 expression in primary human pulmonary endothelial cells and in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH): effect of TGFβ1 (transforming growth factor-β).**

Quantitative real-time polymerase chain reaction (n=4 biological replicates; **A**) and Western blot analysis (n=3 biological replicates; **C**) of EDN1 (endothelin-1) mRNA or protein expression in HPAECs treated with TGFβ1 (10 ng/mL for 7 days). A representative Western blot membrane is shown in (**D**). In some experiments, SB431542 (10 μmol/L) was added to block ALK5 (activin receptor-like kinase) or K02288 (10 μmol/L) to block ALK1 dependent signaling. Exact P values, as determined by 1-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test (*Continued*)

day-old venous thrombi showed that bosentan increased the relative number of CD31- or Cdh5-positive cells within thrombi (2.1- and 1.8-fold, respectively;  $P < 1 \times 10^{-4}$  and  $P < 0.0007$  versus control-treated End.TGF $\beta$ RII-KO mice), whereas the percentage of CD31- or Cdh5-positive cells simultaneously expressing FSP1 or SMA was significantly decreased compared with control-treated End.TGF $\beta$ RII-KO mice (0.07- and 0.32-fold;  $P < 1 \times 10^{-4}$  and  $P = 0.0006$  versus control-treated End.TGF $\beta$ RII-KO mice; Figure 8G and 8H), confirming our in vitro data and underlining the importance of endothelin-1 signaling during thrombus nonresolution and EndMT in vivo.

Coincubation of HPAECs with bosentan also completely prevented the increased expression of SNAIL ( $P = 0.0068$ ; Online Figure XVA), ZEB1 ( $P = 0.0005$ ; Online Figure XVB), SMA ( $P = 0.0013$ ; Online Figure XVC), and COL1A1 (collagen type 1 alpha 1 chain;  $P = 0.0009$ ; Online Figure XVD) in HPAECs stimulated with TGF $\beta$ 1, whereas it increased the expression of FGFR1, a major inhibitor of EndMT ( $P < 1 \times 10^{-4}$ ; Online Figure XVE). Of note, bosentan also normalized the TGF $\beta$ 1-induced mRNA overexpression of ET-1 to levels observed in unstimulated human endothelial cells ( $P = 0.0003$ ; Online Figure XVF). Findings very similar to those after bosentan with regard to SMA, COL1A1, and FGFR1 mRNA expression were observed in TGF $\beta$ 1-stimulated HPAECs treated with the ALK5 inhibitor SB431542 ( $P = 0.0011$ ,  $P = 0.0049$ , and  $P < 1 \times 10^{-4}$ , respectively), whereas inhibition of ALK1 using K02288 had no effect or increased the levels of the respective mRNAs ( $P = 0.0232$ ,  $P > 0.9999$ , and  $P > 0.9999$ , respectively; Online Figure XVIA through XVIC). Also, SB431542 and bosentan significantly increased the mRNA expression of ALK1 ( $P = 0.0001$  and  $P = 0.0033$ , respectively; Online Figure XVIIA), whereas K02288 reduced the expression of ALK5 in HPAECs stimulated with TGF $\beta$ 1 ( $P = 0.0428$ ; Online Figure XVIIB).

In summary, our findings in 2 transgenic mouse strains at late time points after experimental venous thrombosis, in PEA tissue microarrays of patients with CTEPH as well as in human and mouse pulmonary endothelial cells, suggest that TGF $\beta$ RI-mediated induction of ET-1 and signaling via ALK5 promotes endothelial-to-mesenchymal lineage conversion and thrombofibrosis and that these sequelae of increased circulating active TGF $\beta$ 1 levels and TGF $\beta$  signaling in endothelial cells

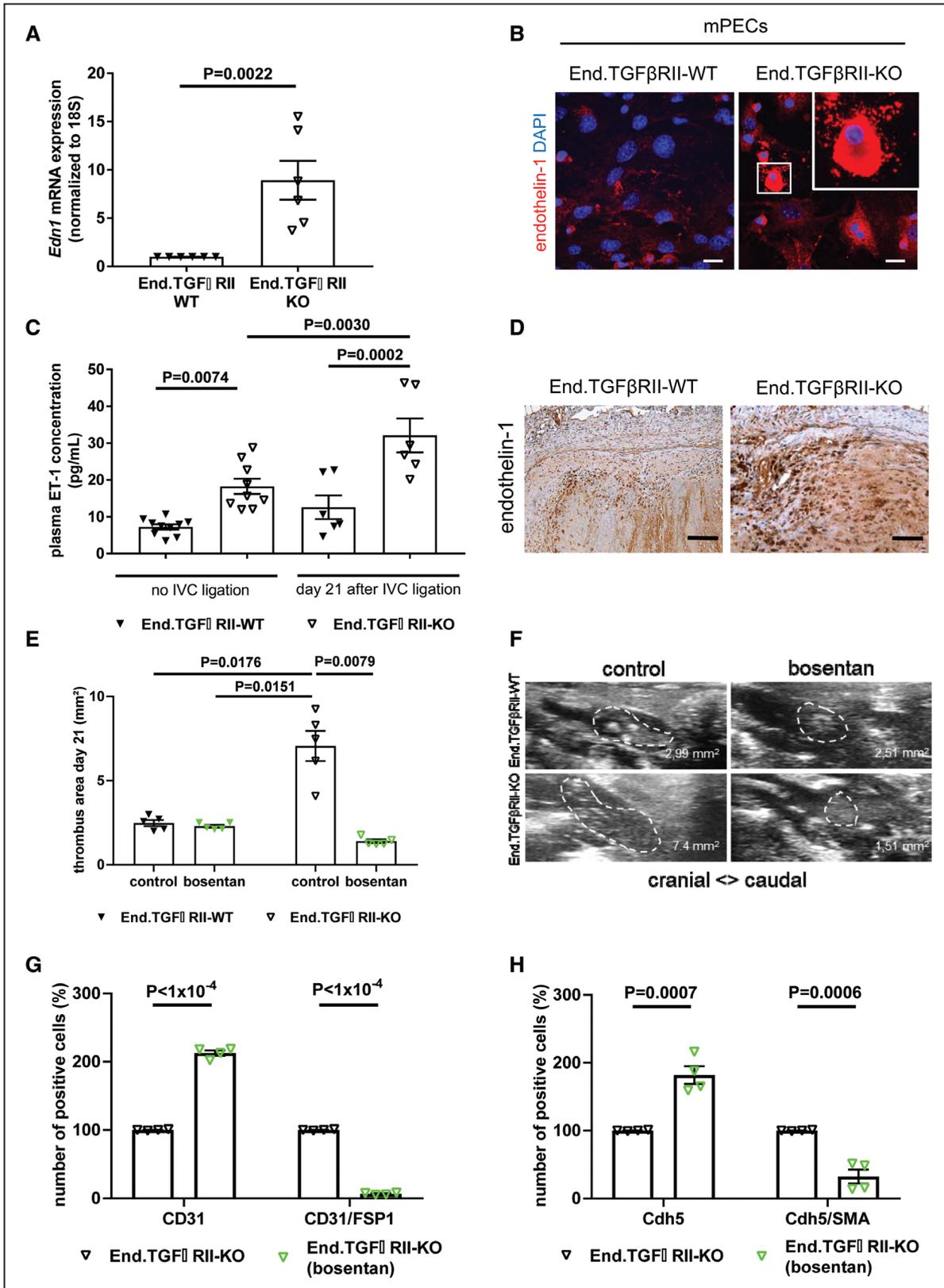
are reversible on antagonization of endothelin receptors (Online Figure XVIII).

## DISCUSSION

A distinctive feature of CTEPH is the obliteration of pulmonary arteries with thrombofibrotic material. TGF $\beta$  is a multifunctional growth factor regulating diverse biological processes including angiogenesis and fibrosis, whereas much less is known about its role during thrombus remodeling. Our group has recently shown that TGF $\beta$ 1 released from activated platelets promotes neointima formation following carotid artery injury and thrombosis.<sup>25</sup> Using a mouse model of venous thrombosis, we now demonstrate a major role of TGF $\beta$  signaling during postthrombotic vascular remodeling also in the venous system. More specifically, we showed that platelet-specific deletion of TGF $\beta$ 1 did not alter platelet number or activation or their response to agonist stimulation, in line with previous reports,<sup>25,26</sup> but accelerates the resolution of venous thrombi. On the contrary, increased levels of active TGF $\beta$ 1 in plasma, as observed after endothelial-specific TGF $\beta$ RII deletion possibly due to increased MMP9 and TSP1 expression and latent TGF $\beta$ 1 activation, resulted in delayed venous thrombus resolution and persistent pulmonary vascular obstructions with platelet-/fibrin-rich material also containing TGF $\beta$ 1. In these mice, overexpression of TGF $\beta$  type I receptors and endothelin-1 was observed, and activated TGF $\beta$  signaling and ET-1 overexpression was also present in plasma and PEA specimens of patients with CTEPH, particularly in areas containing vessels. Importantly, findings of enhanced endothelial sprouting, mesenchymal lineage transition, and venous thrombus nonresolution could be reversed by endothelin receptor antagonization.

Defective angiogenesis and impaired thrombus revascularization may underlie the accumulation of thrombofibrotic material in pulmonary arteries of patients with CTEPH. Mice with inducible genetic deletion of TGF $\beta$ RII in endothelial cells exhibited larger venous thrombi containing numerous enlarged vascular structures and increased amounts of myofibroblasts and collagen, thus recapitulating some of the typical features of the vascular lesions in CTEPH. Regarding the mechanisms underlying the delayed thrombus resolution in the presence of overactivated endothelial TGF $\beta$  signaling, differential expression of TGF $\beta$  target genes involved in vein wall remodeling, in particular, uPA and MMP9,<sup>28</sup> may have

**Figure 7 Continued.** (4 comparisons), are shown in **A** and **C**. Data are normalized to *HPRT1* and are expressed as fold change vs HPAECs (set at 1). Representative confocal pictures of HPAECs treated with TGF $\beta$ 1 after immunodetection of endothelin-1 (ET-1; **B**). Scale bars represent 10  $\mu$ m. Analysis of ET-1 expression in human  $n = 6$  pulmonary endarterectomy (PEA) specimens primarily containing fresh or organized thrombus, myofibroblasts, vessels or fibrosis. Representative pictures (**E**) and the results of the quantitative analysis (**F**) are shown. Scale bar represents 100  $\mu$ m. Exact *P* values, as determined by 1-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test (10 comparisons), are shown in **F**. Plasma levels of ET-1 in patients with CTEPH ( $n = 19$ ) or pulmonary arterial hypertension (PAH;  $n = 26$ ) and healthy individuals ( $n = 5$ ; **G**). Patients who received endothelin receptor antagonists are marked in green, patients who received soluble guanylate cyclase stimulators are marked in red. Exact *P* values, as determined by Kruskal-Wallis test followed by Dunn multiple comparisons test (3 comparisons), are shown in **G**. Nonsignificant *P* values are not shown.



**Figure 8. Endothelin-1 expression in mouse pulmonary endothelial cells or venous thrombi and effects of endothelin receptor antagonization on endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT).**

Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis (A) and representative confocal pictures (B) after analysis of EDN1 (endothelin-1) mRNA or protein expression in mouse pulmonary endothelial cells (mPECs) isolated from End.TGFβRII-WT and End.TGFβRII-KO mice and cultured in MV2 medium. Exact P values, as determined by Mann-Whitney test, are shown (n=6 biological replicates). Data are normalized to 18S and are expressed as fold change vs End.TGFβRII-WT mice (set at 1). Scale bars represents 10 μm. Plasma levels of ET-1 (C) in samples from End.TGFβRII-WT and End.TGFβRII-KO mice uninjured (no IVC ligation; n=10 per group) and 21 days after IVC (inferior vena cava) (Continued)

played a role, whereas plasma or endothelial mRNA levels of PAI-1 did not differ. In addition to fibrinolysis, blocking of ligand-induced VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) phosphorylation<sup>5</sup> or deletion of VEGFR receptors in Tie2-positive cells<sup>7</sup> was shown to delay the resolution of murine venous thrombi, whereas VEGF (vascular endothelial growth factor) gene therapy enhanced this process.<sup>6</sup> TGF $\beta$ 1 downregulates the expression and binding capacity of VEGF receptors,<sup>29</sup> and our analyses revealed significantly lower levels of VEGF and its main receptors in mPECs from End.TGF $\beta$ RII-KO mice. On the contrary, mRNA expression of angiotensin-2, a negative regulator of angiotensin-1–Tie2 signaling and angiogenesis,<sup>30</sup> was elevated in endothelial cells lacking TGF $\beta$ RII. Plasma and tissue levels of angiotensin-2 are upregulated in patients with idiopathic PAH and have been proposed as biomarker of disease severity.<sup>31</sup>

Although the vasculopathy in CTEPH is believed to be the result of thrombus nonresolution,<sup>3</sup> prothrombotic alterations such as highly activated platelets and increased spontaneous platelet aggregation have also been reported.<sup>32,33</sup> In this regard, plasma PF4 levels were not found to be elevated in patients with CTEPH compared with those with nonthrombotic forms of pulmonary hypertension or healthy controls in our study. Importantly, deletion of TGF $\beta$ 1 in platelets did not alter platelet number and activation or their aggregatory response to agonist stimulation, suggesting that the observed differences in vein thrombus size are not due to differences in the aggregatory response of platelets derived from Plt. TGF $\beta$ -KO mice, but a reduction in TGF $\beta$  released from activated platelets following IVC ligation.

Previous studies have shown that TGF $\beta$  is indispensable during angiogenesis, an integral part of almost every tissue remodeling process. Severe vascular defects and an embryonically lethal phenotype were observed in mice with global gene inactivation<sup>34</sup> or constitutive deletion of TGF $\beta$  type II receptors in Tie1.Cre<sup>35</sup> and Tie2.Cre<sup>36</sup> expressing cells. Immature, highly dilated and fused yolk sac blood vessels and resorption at E11.5 were present in mice with systemic inactivation of type I TGF $\beta$  receptors.<sup>37</sup> Endothelial-restricted deletion of TGF $\beta$ RII in adult mice did not affect vessel morphogenesis.<sup>38</sup> Also in our study, a vascular phenotype of endothelial TGF $\beta$ RII deficiency was only observed following thrombotic vein injury. Interestingly, thrombin was shown to promote the internalization of TGF $\beta$  type II receptors in endothelial cells<sup>39</sup>

suggesting that downregulation of endothelial TGF $\beta$ RII occurs *in vivo* in response to prothrombotic stimuli.

The angiogenic response to TGF $\beta$  depends on the balance between 2 distinct TGF $\beta$  type I receptor signaling pathways, with endothelial-restricted ALK1 promoting endothelial cell proliferation, migration, and sprouting, and the broadly expressed ALK5 favoring blood vessel maturation and extracellular matrix synthesis.<sup>40,41</sup> TGF $\beta$  has been shown to possess a higher affinity for ALK5 than ALK1.<sup>42</sup> Although basal endothelial sprouting and outgrowth activity was increased in End.TGF $\beta$ RII-KO mice, endothelial cells lacking TGF $\beta$  type II receptors were less mature (as indicated by lower CDH5 expression) and also expressed mesenchymal markers. Colocalization with mesenchymal markers and increased expression of transcriptional regulators of EndMT were also observed in murine venous thrombi and in human CTEPH-ECs *ex vivo* or PEA specimens *in situ*. Expression of mesenchymal markers in TGF $\beta$ 1-stimulated HPAECs could be inhibited blocking ALK5 signaling, whereas ALK1 inhibitors had no effect. Endothelial phenotype switching may be necessary to generate highly migratory and invasive cells and to initiate angiogenesis, as suggested by findings in brain-derived microvascular endothelial cells where stimulation with TGF $\beta$ 1 was shown to simultaneously induce angiogenesis and EndMT.<sup>43</sup>

Increased plasma levels of TGF $\beta$ 1 and the presence of EndMT has been reported in patients with PAH<sup>10,44</sup> or experimental models of the disease.<sup>11</sup> Despite the prominent presence of thrombofibrosis in CTEPH, few studies have examined EndMT in this subgroup of pulmonary hypertension. *Ex vivo*, transitional cells co-expressing endothelial and smooth muscle cell markers were observed in endarterectomy material of patients with CTEPH,<sup>45</sup> similar to our findings in PEA specimens. Moreover, conditioned medium from the myofibroblast-like cells was found to contain higher amounts of TGF $\beta$ 1 and to induce smooth muscle actin- $\alpha$  expression in co-cultured endothelial cells.<sup>45</sup> TGF $\beta$  signaling via SMAD2/3–SLUG was also shown to mediate EndMT during human interpositional vein graft remodeling.<sup>46</sup> Although a recent study reported reduced tubulointerstitial renal fibrosis in mice with endothelium-specific heterozygous TGF $\beta$  type II receptor deletion,<sup>47</sup> the remaining TGF $\beta$ RII allele may have prevented the increase in TGF $\beta$ 1 and TGF $\beta$ RI expression observed in our model.

The findings of this study also suggest a role for ET-1 during endothelial-to-mesenchymal lineage conversion

**Figure 8 Continued.** ligation (n=6 per group). Exact *P* values, as determined by 1-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test (4 comparisons), are shown. Nonsignificant *P* values are not shown. Representative images of endothelin-1 protein expression in thrombosed vein wall segments 21 days after IVC ligation of End.TGF $\beta$ RII-WT and End.TGF $\beta$ RII-KO mice (**D**). Scale bars represent 10  $\mu$ m. Quantitative analysis of thrombus area at day 21 after IVC ligation in End.TGF $\beta$ RII-WT and End.TGF $\beta$ RII-KO controls and mice treated with bosentan (n=5 per group; 5 mg/kg BW; **E**). Representative ultrasound images are shown in (**F**). Quantitative flow cytometry analysis of CD31- and CD31/FSP1 (n=4 per group; **G**) or CDH5- and CDH5/SMA (n=4 per group; **H**) double-positive cells residing within 21-day-old thrombi of End.TGF $\beta$ RII-KO control- and bosentan-treated mice. Results in mice treated with bosentan are labeled in green. Exact *P* values, as determined by 2-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons test (6 comparisons; **E**) and multiple *t* test (**G** and **H**), are shown. Nonsignificant *P* values are not shown.

and thrombofibrosis downstream of TGF $\beta$ 1 and its receptors. Previous studies have shown that TGF $\beta$  is a potent inducer of ET-1,<sup>48</sup> and that TGF $\beta$  and ET-1 synergistically promote extracellular matrix production and fibrosis.<sup>49</sup> Increased production of ET-1 has been observed in various human fibrotic diseases, including pulmonary hypertension,<sup>10,50</sup> and ET-1 may potentiate the profibrotic effects of TGF $\beta$  via mechanisms involving EndMT.<sup>51</sup> Increased ET-1 expression has been primarily reported in patients with nonthrombotic forms of pulmonary hypertension and shown to play a role in pulmonary artery vasoconstriction, pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation, and pulmonary hypertension.<sup>52</sup> A previous study examining the plasma miRNA profile of patients with CTEPH found miRNA let-7c to be downregulated and identified TGF $\beta$ 1 and ET-1 as its main targets.<sup>53</sup> In this and another study,<sup>54</sup> significantly higher plasma ET-1 levels were detected in patients with CTEPH, similar to our findings. Beyond the well-known vasoactive and mitogenic effects of ET-1, a direct role for ET-1 during thrombus resolution has never been shown. Of note, we also could not detect any effects of ET-1 (and of TGF $\beta$ 1) on wild-type platelet response to agonist stimulation. Here we demonstrate that endothelin receptor antagonization prevented the TGF $\beta$ 1-induced expression of receptors and transcriptional regulators involved in EndMT, SMA, and collagen expression and also restored venous thrombus size and the presence of pulmonary vaso-occlusions in End.TGF $\beta$ R11-KO mice to findings in End.TGF $\beta$ R11-WT mice. Although a causal role of endothelin-1 in CTEPH has not been directly demonstrated, ET receptor antagonists are prescribed in patients with inoperable CTEPH or persistent/recurrent pulmonary after PEA and have been shown to improve hemodynamic parameters and survival.<sup>55,56</sup> Our findings of increased ET-1 expression in chronic murine venous thrombi, human CTEPH endothelial cells or PEA specimens and reversal of overactivated endothelial TGF $\beta$  signaling following endothelin receptor antagonization provide a pathophysiological basis of this current clinical practice and also support the usefulness of blocking endothelin-1 signaling beyond its vasoactive effects.

## ARTICLE INFORMATION

Received April 23, 2019; revision received November 6, 2019; accepted November 19, 2019.

### Affiliations

From the Center for Cardiology, Cardiology I (M.L.B., C.L., N.S.R., R.G., L.H., T.M., K.S.) and Center for Thrombosis and Hemostasis (M.L.B., L.H., K.J., M.L., M.B., S.K.), University Medical Center Mainz, Germany; Thoracic Surgery, Kerckhoff Clinic, Bad Nauheim, Germany (S.G., E.M.); Department of Internal Medicine and Cardiology, Campus Virchow Klinikum, Charité-University Medicine, Berlin, Germany (M.L.); Department of Medicine, Boston University School of Medicine, MA (M.B.); Department of Cardiology, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece (S.K.); and German Center for Cardiovascular Research (DZHK e.V.; RheinMain) (M.L.B., N.S.R., R.G., E.M., T.M., K.S.).

## Acknowledgments

We would like to thank Marina Janocha (Center for Cardiology, Cardiology I, University Medical Center Mainz, Germany) and Kathrin Groß (Center for Thrombosis and Hemostasis, University Medical Center Mainz, Germany) for excellent technical assistance. We are also grateful to Sylvia Hoffmann (Center for Thrombosis and Hemostasis) for the transportation of human tissue samples. Results shown in this study are part of the medical thesis of C. Leidinger.

## Sources of Funding

This study was supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF 01E01003; Virchow fellowship and TRP X15 to M.L. Bochenek; and TRP X8 to K. Schäfer), the Deutsches Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung (DZHK e.V.; DZHK Doktorandenstipendium to N.S. Rosinus), the Robert-Müller-Stiftung (Universität Mainz; Doktorandenstipendium to C. Leidinger), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; INST 371/47-1 FUGG; and BOS 3482/3-1, BOS 3482/4 to M. Bosmann), and the National Institutes of Health (1R01HL141513 and 1R01HL139641 to M. Bosmann). The authors are responsible for the content of this publication.

## Disclosures

None.

## REFERENCES

- Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, et al; ESC Scientific Document Group. 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS); endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2016;37:67–119. doi: 10.1093/eurheartj/ehv317
- Bochenek ML, Rosinus NS, Lankeit M, Hobohm L, Bremmer F, Schütz E, Klok FA, Horke S, Wiedenroth CB, Münzel T, et al. From thrombosis to fibrosis in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Haemost*. 2017;117:769–783. doi: 10.1160/TH16-10-0790
- Simonneau G, Torbicki A, Dorfmueller P, Kim N. The pathophysiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir Rev*. 2017;26:160112. doi: 10.1183/16000617.0112-2016
- Sharma S, Lang IM. Current understanding of the pathophysiology of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Thromb Res*. 2018;164:136–144. doi: 10.1016/j.thromres.2017.06.011
- Evans CE, Grover SP, Humphries J, Saha P, Patel AP, Patel AS, Lyons OT, Waltham M, Modarai B, Smith A. Antiangiogenic therapy inhibits venous thrombus resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:565–570. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302998
- Modarai B, Humphries J, Burnand KG, Gossage JA, Waltham M, Wadoodi A, Kanaganayagam GS, Afuwape A, Paleolog E, Smith A. Adenovirus-mediated VEGF gene therapy enhances venous thrombus recanalization and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1753–1759. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.170571
- Alias S, Redwan B, Panzenboeck A, Winter MP, Schubert U, Voswinckel R, Frey MK, Jakowitsch J, Alimohammadi A, Hobohm L, et al. Defective angiogenesis delays thrombus resolution: a potential pathogenetic mechanism underlying chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:810–819. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302991
- Zabini D, Nagaraj C, Stacher E, Lang IM, Nierlich P, Klepetko W, Heinemann A, Olschewski H, Bálint Z, Olschewski A. Angiostatic factors in the pulmonary endarterectomy material from chronic thromboembolic pulmonary hypertension patients cause endothelial dysfunction. *PLoS One*. 2012;7:e43793. doi: 10.1371/journal.pone.0043793
- Naito A, Sakao S, Lang IM, Voelkel NF, Jujo T, Ishida K, Sugiura T, Matsumiya G, Yoshino I, Tanabe N, et al. Endothelial cells from pulmonary endarterectomy specimens possess a high angiogenic potential and express high levels of hepatocyte growth factor. *BMC Pulm Med*. 2018;18:197. doi: 10.1186/s12890-018-0769-3
- Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Pécoux C, Bogaard HJ, Dorfmueller P, Remy S, Lecerc F, Planté S, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2015;131:1006–1018. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008750

11. Qiao L, Nishimura T, Shi L, Sessions D, Thrasher A, Trudell JR, Berry GJ, Pearl RG, Kao PN. Endothelial fate mapping in mice with pulmonary hypertension. *Circulation*. 2014;129:692–703. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003734
12. Sun JX, Chang TF, Li MH, Sun LJ, Yan XC, Yang ZY, Liu Y, Xu WQ, Lv Y, Su JB, et al. SNAI1, an endothelial-mesenchymal transition transcription factor, promotes the early phase of ocular neovascularization. *Angiogenesis*. 2018;21:635–652. doi: 10.1007/s10456-018-9614-9
13. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113:685–700. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00432-x
14. Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- $\beta$  receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:301–307. doi: 10.1016/s1050-1738(03)00142-7
15. Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell*. 1991;67:797–805. doi: 10.1016/0092-8674(91)90074-9
16. Austin ED, Loyd JE. The genetics of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res*. 2014;115:189–202. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303404
17. Gore B, Izikki M, Mercier O, Dewachter L, Fadel E, Humbert M, Dartevielle P, Simonneau G, Naeije R, Lebrin F, et al. Key role of the endothelial TGF- $\beta$ /ALK1/endoglin signaling pathway in humans and rodents pulmonary hypertension. *PLoS One*. 2014;9:e100310. doi: 10.1371/journal.pone.0100310
18. Zaiman AL, Podowski M, Medicherla S, Gordy K, Xu F, Zhen L, Shimoda LA, Neptune E, Higgins L, Murphy A, et al. Role of the TGF-beta/Alk5 signaling pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:896–905. doi: 10.1164/rccm.200707-1083OC
19. Yung LM, Nikolic I, Paskin-Flerlage SD, Pearsall RS, Kumar R, Yu PB. A selective transforming growth factor- $\beta$  ligand trap attenuates pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;194:1140–1151. doi: 10.1164/rccm.201510-1955OC
20. Azhar M, Yin M, Bommireddy R, Duffy JJ, Yang J, Pawlowski SA, Boivin GP, Engle SJ, Sanford LP, Grisham C, et al. Generation of mice with a conditional allele for transforming growth factor beta 1 gene. *Genesis*. 2009;47:423–431. doi: 10.1002/dvg.20516
21. Jäger M, Hubert A, Gogiraju R, Bochenek ML, Münzel T, Schäfer K. Inducible knockdown of endothelial protein tyrosine phosphatase-1B promotes neointima formation in obese mice by enhancing endothelial senescence. *Antioxid Redox Signal*. 2019;30:927–944. doi: 10.1089/ars.2017.169
22. Alvarado CM, Diaz JA, Hawley AE, Wroblewski SK, Sigler RE, Myers DD Jr. Male mice have increased thrombotic potential: sex differences in a mouse model of venous thrombosis. *Thromb Res*. 2011;127:478–486. doi: 10.1016/j.thromres.2011.01.004
23. Grainger DJ, Wakefield L, Bethell HW, Farndale RW, Metcalfe JC. Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. *Nat Med*. 1995;1:932–937. doi: 10.1038/nm0995-932
24. Meyer A, Wang W, Qu J, Croft L, Degen JL, Collier BS, Ahamed J. Platelet TGF- $\beta$ 1 contributions to plasma TGF- $\beta$ 1, cardiac fibrosis, and systolic dysfunction in a mouse model of pressure overload. *Blood*. 2012;119:1064–1074. doi: 10.1182/blood-2011-09-377648
25. 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;117:1782–1797. doi: 10.1160/TH17-02-0112
26. von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209:819–835. doi: 10.1084/jem.20112322
27. Chen PY, Qin L, Tellides G, Simons M. Fibroblast growth factor receptor 1 is a key inhibitor of TGF $\beta$  signaling in the endothelium. *Sci Signal*. 2014;7:ra90. doi: 10.1126/scisignal.2005504
28. Deatrick KB, Eliason JL, Lynch EM, Moore AJ, Dewyer NA, Varma MR, Pearce CG, Upchurch GR, Wakefield TW, Henke PK. Vein wall remodeling after deep vein thrombosis involves matrix metalloproteinases and late fibrosis in a mouse model. *J Vasc Surg*. 2005;42:140–148. doi: 10.1016/j.jvs.2005.04.014
29. Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS. Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996;271:11500–11505. doi: 10.1074/jbc.271.19.11500
30. Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, Bartol A, Kienast Y, Vettel C, Loos EK, et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest*. 2012;122:1991–2005. doi: 10.1172/JCI58832
31. Kümpers P, Nickel N, Lukasz A, Golpon H, Westerkamp V, Olsson KM, Jonigk D, Maegel L, Bockmeyer CL, David S, et al. Circulating angiopoietins in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2010;31:2291–2300. doi: 10.1093/eurheartj/ehq226
32. Yaoita N, Shirakawa R, Fukumoto Y, Sugimura K, Miyata S, Miura Y, Nochioka K, Miura M, Tatebe S, Aoki T, et al. Platelets are highly activated in patients of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:2486–2494. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304404
33. Remková A, Šimková I, Valkovičová T. Platelet abnormalities in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:9700–9707.
34. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol*. 1996;179:297–302. doi: 10.1006/dbio.1996.0259
35. Carvalho RL, Itoh F, Goumans MJ, Lebrin F, Kato M, Takahashi S, Ema M, Itoh S, van Rooijen M, Bertolino P, et al. Compensatory signalling induced in the yolk sac vasculature by deletion of TGFbeta receptors in mice. *J Cell Sci*. 2007;120:4269–4277. doi: 10.1242/jcs.013169
36. Shang Y, Doan CN, Arnold TD, Lee S, Tang AA, Reichardt LF, Huang EJ. Transcriptional corepressors HIPK1 and HIPK2 control angiogenesis via TGF- $\beta$ -TAK1-dependent mechanism. *PLoS Biol*. 2013;11:e1001527. doi: 10.1371/journal.pbio.1001527
37. Larsson J, Goumans MJ, Sjöstrand LJ, van Rooijen MA, Ward D, Levéen P, Xu X, ten Dijke P, Mummery CL, Karlsson S. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J*. 2001;20:1663–1673. doi: 10.1093/emboj/20.7.1663
38. Park SO, Lee YJ, Seki T, Hong KH, Fliess N, Jiang Z, Park A, Wu X, Kaartinen V, Roman BL, et al. ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood*. 2008;111:633–642. doi: 10.1182/blood-2007-08-107359
39. Tang H, Low B, Rutherford SA, Hao Q. Thrombin induces endocytosis of endoglin and type-II TGF-beta receptor and down-regulation of TGF-beta signaling in endothelial cells. *Blood*. 2005;105:1977–1985. doi: 10.1182/blood-2004-08-3308
40. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*. 2002;21:1743–1753. doi: 10.1093/emboj/21.7.1743
41. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell*. 2003;12:817–828. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00386-1
42. ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH. Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science*. 1994;264:101–104. doi: 10.1126/science.8140412
43. Krishnan S, Szabo E, Burghardt I, Frei K, Tabatabai G, Weller M. Modulation of cerebral endothelial cell function by TGF- $\beta$  in glioblastoma: VEGF-dependent angiogenesis versus endothelial mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2015;6:22480–22495. doi: 10.18632/oncotarget.4310
44. Yan Y, Wang XJ, Li SQ, Yang SH, Lv ZC, Wang LT, He YY, Jiang X, Wang Y, Jing ZC. Elevated levels of plasma transforming growth factor- $\beta$ 1 in idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension. *Int J Cardiol*. 2016;222:368–374. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.07.192
45. Sakao S, Hao H, Tanabe N, Kasahara Y, Kurosu K, Tatsumi K. Endothelial-like cells in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: crosstalk with myofibroblast-like cells. *Respir Res*. 2011;12:109. doi: 10.1186/1465-9921-12-109
46. Cooley BC, Nevado J, Mellad J, Yang D, St Hilaire C, Negro A, Fang F, Chen G, San H, Walts AD, et al. TGF- $\beta$  signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci Transl Med*. 2014;6:227ra34. doi: 10.1126/scitranslmed.3006927
47. Xavier S, Vasko R, Matsumoto K, Zullo JA, Chen R, Maizel J, Chander PN, Goligorsky MS. Curtailing endothelial TGF- $\beta$  signaling is sufficient to reduce endothelial-mesenchymal transition and fibrosis in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:817–829. doi: 10.1681/ASN.2013101137
48. Rodríguez-Pascual F, Reimunde FM, Redondo-Horcajo M, Lamas S. Transforming growth factor-beta induces endothelin-1 expression through activation of the Smad signaling pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;44(suppl 1):S39–S42. doi: 10.1097/01.fjc.0000166216.27544.22
49. Lambers C, Roth M, Zhong J, Campregher C, Binder P, Burian B, Petkov V, Block LH. The interaction of endothelin-1 and TGF- $\beta$ 1 mediates

- vascular cell remodeling. *PLoS One*. 2013;8:e73399. doi: 10.1371/journal.pone.0073399
50. Swigris JJ, Brown KK. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *BioDrugs*. 2010;24:49–54. doi: 10.2165/11319550-000000000-00000
51. Wermuth PJ, Li Z, Mendoza FA, Jimenez SA. Stimulation of transforming growth factor- $\beta$ 1-induced endothelial-to-mesenchymal transition and tissue fibrosis by endothelin-1 (ET-1): a novel profibrotic effect of ET-1. *PLoS One*. 2016;11:e0161988. doi: 10.1371/journal.pone.0161988
52. Shao D, Park JE, Wort SJ. The role of endothelin-1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Res*. 2011;63:504–511. doi: 10.1016/j.phrs.2011.03.003
53. Guo L, Yang Y, Liu J, Wang L, Li J, Wang Y, Liu Y, Gu S, Gan H, Cai J, et al. Differentially expressed plasma microRNAs and the potential regulatory function of Let-7b in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *PLoS One*. 2014;9:e101055. doi: 10.1371/journal.pone.0101055
54. Reesink HJ, Meijer RC, Lutter R, Boomsma F, Jansen HM, Kloek JJ, Bresser P. Hemodynamic and clinical correlates of endothelin-1 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J*. 2006;70:1058–1063. doi: 10.1253/circj.70.1058
55. Nishimura R, Tanabe N, Sugiura T, Shigeta A, Jujo T, Sekine A, Sakao S, Kasahara Y, Tatsumi K. Improved survival in medically treated chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J*. 2013;77:2110–2117. doi: 10.1253/circj.12-1391
56. Jaïs X, D'Armini AM, Jansa P, Torbicki A, Delcroix M, Ghofrani HA, Hoeper MM, Lang IM, Mayer E, Pepke-Zaba J, et al; Bosentan Effects in iNoperable Forms of chronic Thromboembolic pulmonary hypertension Study Group. Bosentan for treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension: BENEFIT (Bosentan Effects in iNoperable Forms of chronic Thromboembolic pulmonary hypertension), a randomized, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:2127–2134. doi: 10.1016/j.jacc.2008.08.059