

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie der  
Universitätsmedizin Rostock

Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Relevanz von Protein Z (PZ) und vom Protein Z-abhängigen  
Protease Inhibitor (ZPI) in der vaskulären Homöostase**

Inauguraldissertation zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizinwissenschaften

*Doctor rerum humanarum (Dr. rer. hum.)*

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Antje Ladwig

geb. 04.01.1989 in Rostock

Rostock, 2020

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger

**Gutachter**

Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Universitätsmedizin Rostock, Rudolf-Zenker-Institut für  
Experimentelle Chirurgie

Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff, Universität Rostock, UMR/KHC

PD Dr. med. Nana Maria Wagner, Universitätsklinikum Münster, Klinik für Anästhesiologie

**Jahr der Einreichung: 2019**

**Jahr der Promotionsverteidigung: 2020**

**Lerne Leiden ohne zu klagen**

*Sebastian Ladwig*

*Headcoach und Inhaber von Crossfit Sturmflut*

# 1 Inhaltsverzeichnis

2 Einleitung .....	3
2.1. Die Hämostase als lebenswichtige Funktion .....	3
2.1.1. Primäre Hämostase .....	4
2.1.2. Sekundäre Hämostase (Prokoagulation) .....	4
2.2. Serpine .....	6
2.3. Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor (ZPI) – Struktur und Funktion .....	7
2.4. Protein Z – Struktur und Funktion .....	8
2.5. Protein Z und Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor in der Klinik .....	10
2.5.1. Blutungsneigung .....	10
2.5.2. Thrombotische Erkrankungen .....	11
2.5.3. Angiogenese .....	12
3 Zielstellung .....	14
4 Material und Methoden .....	15
4.1. <i>In vitro</i> Untersuchungen .....	15
4.1.1. Kultivierung von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) .....	15
4.1.2. Kultivierung von humanen glatten Muskelzellen aus der Aorta (AoSMC) .....	15
4.1.3. <i>tube-formation-Assay</i> von humanen Endothelzellen .....	16
4.1.4. <i>scratch-Assay</i> von humanen Endothelzellen und humanen glatten Muskelzellen.....	17
4.2. <i>In vivo</i> Untersuchungen .....	17
4.2.1. Haltungsbedingungen der Versuchstiere .....	17
4.2.2. Genotypisierung der Mäuse mittels Polymerasenkettreaktion (PCR) .....	18
4.2.3. Narkotisierung der Versuchstiere .....	19
4.2.4. Murines Modell der chronischen unilateralen Hinterlaufischämie .....	19
4.2.4.1. Präparation der Hinterlaufischämie .....	20
4.2.4.2. Thermografie .....	21
4.2.4.3. Gewebeasservierung und histologische Aufarbeitung .....	22
4.2.4.4. Datenakquise .....	23
4.2.4. Murines Modell der Carotisläsion mittels FeCl <sub>3</sub> .....	24
4.2.4.1. Gefäßverletzung durch FeCl <sub>3</sub> .....	24
4.2.4.2. Gewebeasservierung .....	25
4.2.4.3. Histologische Aufarbeitung der Gefäßsegmente .....	26
4.2.4.4. Datenakquise .....	27

4.3. Statistische Auswertung .....	27
5 Ergebnisse .....	29
5.1. Einfluss von ZPI auf die Thrombusformation .....	29
5.1.1. Einfluss von ZPI auf die Migration von glatten Muskelzellen <i>in vitro</i> .....	29
5.1.2. Einfluss von ZPI auf die luminalen Stenose der <i>A. carotis</i> .....	31
5.1.3. Einfluss einer PZ/ZPI-Defizienz auf die luminalen Stenose der <i>A. carotis</i> .....	33
5.2. Einfluss von ZPI auf die Angiogenese .....	35
5.2.1. Einfluss von ZPI auf die Migration von humanen Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	35
5.2.2. Einfluss von ZPI auf die Netzwerkbildung von humanen Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	37
5.2.3. Einfluss von ZPI auf die Reperfusion nach Ischämie .....	40
5.2.4. Einfluss von ZPI auf die Kapillardichte im ischämischen Hinterlauf.....	42
5.2.5. Einfluss einer PZ/ZPI-Defizienz auf die Reperfusion nach Ischämie.....	45
5.2.6. Einfluss einer PZ/ZPI-Defizienz auf die Kapillardichte im ischämischen Hinterlauf.....	47
6 Diskussion .....	49
6.1. PZ und ZPI in der Thrombose .....	49
6.1.1. ZPI zeigt keinen Einfluss auf die Migration von glatten Muskelzellen <i>in vitro</i> .....	50
6.1.2. Eine ZPI-Defizienz führt zu einer erhöhten luminalen Stenose <i>in vivo</i> .....	51
6.2. PZ und ZPI in der Angiogenese .....	55
6.2.1. ZPI hat keinen Einfluss auf die Migration und Netzwerkbildung von humanen Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	56
6.2.2. Eine isolierte ZPI-Defizienz und eine PZ/ZPI-Defizienz haben keinen Einfluss auf die Reperfusion nach Ischämie .....	57
6.3. PZ und ZPI als mögliche Therapeutika?.....	60
7 Zusammenfassung .....	62
8 Literaturverzeichnis .....	64
9 Anhang .....	78
9.1. Polymerasekettenreaktion - Reaktionsprotokoll .....	78
9.2. Abbildungsverzeichnis.....	80
9.3. Tabellenverzeichnis.....	81
9.4. Abkürzungsverzeichnis .....	82
9.5. Eidesstattliche Erklärung .....	84
9.6. Lebenslauf .....	85
9.7. Danksagung .....	86

## 2 Einleitung

Thrombotisch verursachte kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in den Industrieländern [Abegunde *et al.* 2007; Meadows & Bhatt 2007; Sanz *et al.* 2012; Silverstein *et al.* 2010]. Unter physiologischen Bedingungen wird der Blutfluss durch das feine Zusammenspiel zwischen Koagulation und Fibrinolyse aufrechterhalten. Kommt es zur Störung dieses sensiblen Systems zugunsten eines der beiden Seiten, entsteht entweder eine Hyperkoagulabilität oder eine verstärkte Blutungsneigung. Beide Zustände können je nach Lokalisation für den Organismus eine tödliche Folgeerscheinung nach sich ziehen. Ein hyperkoagulativer Status (Gerinnungsneigung) kann zu einer tiefen Beinvenenthrombose und einer Lungenembolie führen. Diese verlaufen nicht selten tödlich.

### 2.1. Die Hämostase als lebenswichtige Funktion

Ein funktionierendes Gerinnungssystem ist für jeden Organismus überlebensnotwendig. Kommt es zu einem Gefäßschaden, muss die Läsion behoben und ein massiver Blutverlust verhindert werden. Durch ein komplexes Zusammenspiel von gerinnungshemmenden (anti-koagulativen) und gerinnungsfördernden (prokoagulativen) Substanzen wird die Hämostase aufrechterhalten. Im Wesentlichen wird die Blutstillung durch 2 Prozesse gewährleistet, die zeitlich versetzt und kaskadenartig ablaufen: die primäre und die sekundäre Hämostase. Dabei greifen vaskuläre (verletztes Endothel), zelluläre (überwiegend Thrombozyten) und plasmatische (Gerinnungsfaktoren im Blutplasma) Faktoren ineinander. Diese Mechanismen führen zur Bildung eines Thrombus. Dieser Thrombus verschließt den Gefäßschaden und verhindert das Austreten von Blut. Die Größe des Thrombus richtet sich nach der Größe des Gefäßschadens und kann unter Umständen zu einem partiellen Verschluss des Gefäßes führen. Um eine Rekanalisation des geschädigten Gefäßes zu erreichen, schließt sich im letzten Schritt die Fibrinolyse an (Antikoagulation). Hierbei wird durch eine enzymatische Spaltung von Fibrin durch Plasmin eine Auflösung des Thrombus induziert. Blutgerinnung und Fibrinolyse sind enzymatisch

gesteuerte Vorgänge, die ständig nebeneinander ablaufen und sich unter physiologischen Bedingungen in einem Gleichgewicht befinden.

### **2.1.1. Primäre Hämostase**

Nach Verletzung eines Gefäßes kommt es zunächst zu einer Vasokonstriktion, um den Blutfluss zu verlangsamen. Dabei bewirken Substanzen wie Serotonin, Katecholamine und Thromboxan eine Vasokonstriktion des Gefäßes vor der Läsion (vaskuläre Gerinnung). Der resultierende verlangsamte Blutstrom und die damit verbundenen hämodynamischen Veränderungen begünstigen eine Aggregation von Thrombozyten. Diese verlangsamen ihren Fluss und rollen zunächst locker auf der Endothellschicht entlang. An der Läsion verbinden sie sich mit freiliegenden Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie subendothelialem Kollagen, Fibronektin und von Willebrand-Faktor (vWF). Die Bindung der extrazellulären Matrix mit den Thrombozyten resultiert in Plättchenadhäsion, -aktivierung und –aggregation, was in einer Thrombusformation endet [Jackson *et al.* 2003].

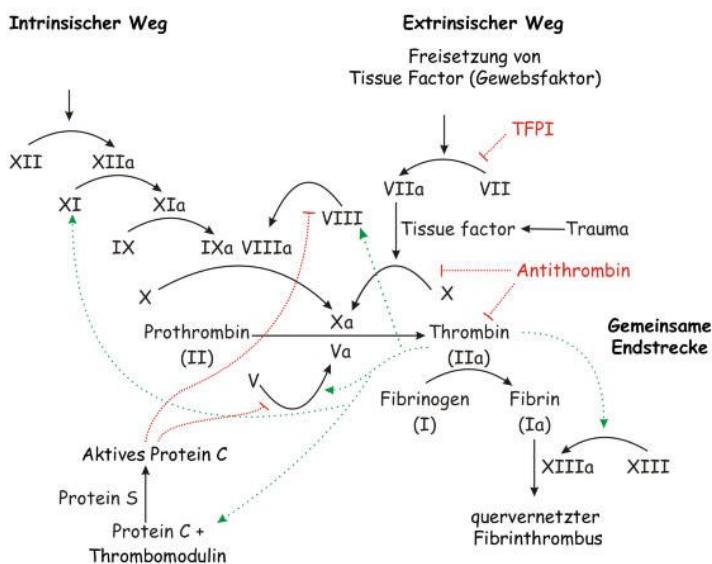
### **2.1.2. Sekundäre Hämostase (Prokoagulation)**

Neben den Thrombozyten spielen die zirkulierenden Gerinnungsfaktoren eine wesentliche Rolle bei der Blutgerinnung. Die sekundäre Hämostase, auch als eigentliche Blutgerinnung bezeichnet, nimmt etwa 6 bis 10 Minuten in Anspruch und resultiert in der Bildung eines Fibrinfasernetzes zur Abdichtung des Gefäßschadens. Die Blutgerinnung kann in 2 Systeme unterteilt werden: das intrinsische und das extrinsische System. In beiden werden verschiedenste Gerinnungsfaktoren in einer kaskadenartigen Signalkette aktiviert. In der gemeinsamen Endstrecke findet die Aktivierung des Gerinnungsfaktors Faktor FX zu FXa statt (Abbildung 1).

Der intrinsische Weg beginnt mit der Kontaktaktivierung des Hagemann-Faktors (FXII) mit aktivierten Thrombozyten (Polyphosphate) oder mit subendothelialen Strukturen wie Kollagen. Die proteolytische Signalkaskade setzt sich über die Aktivierung der Faktoren XI, FIX und schlussendlich von FXI fort. Der extrinsische Weg hingegen beginnt mit einer Exposition von Gewebsthromboplastin (*tissue factor*, TF) durch einen Endothellschaden und der Aktivierung des Faktors VII (Proconvertin) zu VIIa. Zusammen mit Kalzium-Ionen und TF wird der Faktor X zu FXa aktiviert (Abbildung 1).

In der gemeinsamen Endstrecke kommt es zur Umwandlung von Prothrombin (II) zu Thrombin (IIa) durch die Faktoren FXa und FVa (Prothrombinase-Komplex) und schlussendlich zur Spaltung von Fibrinogen (I) zu Fibrin (Ia). Die Quervernetzung der Fibrinmonomere zu Polymeren wird durch die Aktivierung des FXIII zu FXIIIa durch Thrombin vermittelt.

Thrombusformation und Fibrinablagerung finden zeitgleich statt, da Thrombin selbst die Plättchen aktivieren kann. Diese exponieren Phosphatidylserine auf ihrer Oberfläche, sodass eine Grundlage für Enzyme geschaffen ist, welche die Blutgerinnung fördern [Furie & Furie 2008].

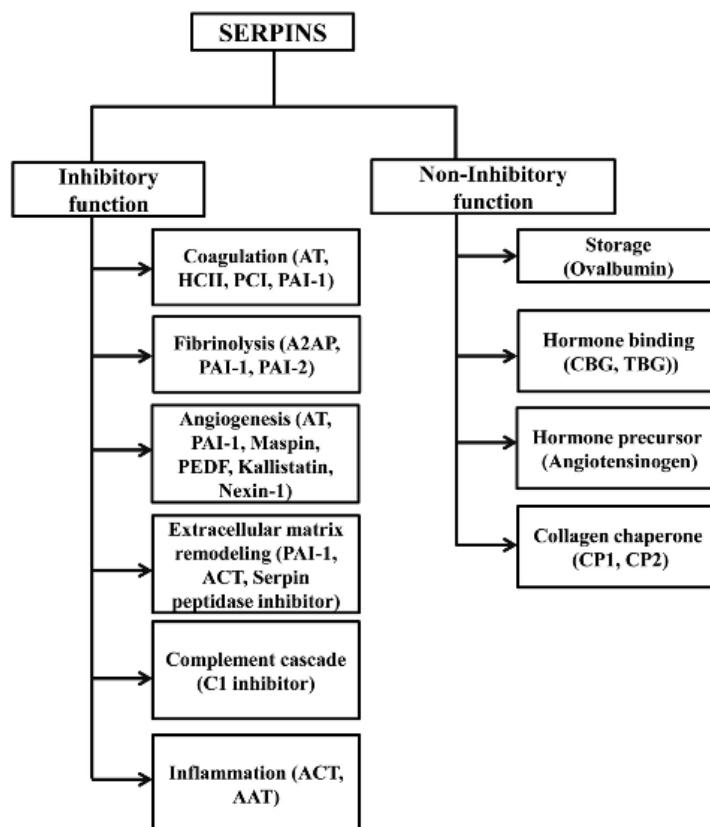


**Abbildung 1. Schematisch dargestellter Ablauf der sekundären Hämostase.** Die sekundäre Hämostase wird in den intrinsischen und den extrinsischen Weg unterteilt, die beide in einer gemeinsamen Endstrecke münden. Durch Aktivierung des Faktors FX zu FXa wird die Thrombingeneration und somit die Fibrinbildung initiiert. Bildquelle: Wikipedia.

Ein Ungleichgewicht zugunsten der Antikoagulation führt zu einer verstärkten Blutungsneigung, die unter Umständen zur Verblutung führen kann. Auf der anderen Seite bedingt eine Zunahme der Koagulation die Bildung von Thrombosen, was im schlimmsten Fall eine Okklusion der Gefäße und Ischämie-bedingte Schlaganfälle und Herzinfarkte zur Folge hat.

## 2.2. Serpine

Serpine (Serinprotease Inhibitoren) sind einzelkettige Proteine, die eine durchschnittliche Anzahl von 350 bis 500 Aminosäuren aufweisen und in nahezu allen Lebewesen gefunden wurden [Fortenberry 2015]. Mit rund 1000 Mitgliedern sind Serpine die größte Gruppe der Protease Inhibitoren überhaupt und sind an einer Vielzahl von intra- und extrazellulären Prozessen beteiligt. Dabei können sie entweder inhibitorisch (Koagulation, Fibrinolyse, Angiogenese, Remodelling der extrazellulären Matrix, Komplementkaskade, Tumorsuppression, Zellmigration und Inflammation) oder nicht-inhibitorisch (Speicherprotein, Hormontransport und –Bindung) wirksam werden [Bhakuni *et al.* 2016; Silverman *et al.* 2001] (Abbildung 2).



**Abbildung 2. Serpine und ihre Funktionen.** Serpine sind an einer Vielzahl von lebenswichtigen proteolytischen Stoffwechselwegen beteiligt und können ihre Funktion als inhibierendes oder nicht-inhibierendes Protein entfalten. Bei den inhibitorisch wirkenden Serpinen findet eine Konformationsänderung nach Bindung der Protease statt. Beide Proteine werden irreversibel inaktiviert. Die nicht-inhibitorisch wirkenden Serpene werden irreversibel inaktiviert, die Protease allerdings nicht. Abbildung aus Bhakuni *et al.* 2016.

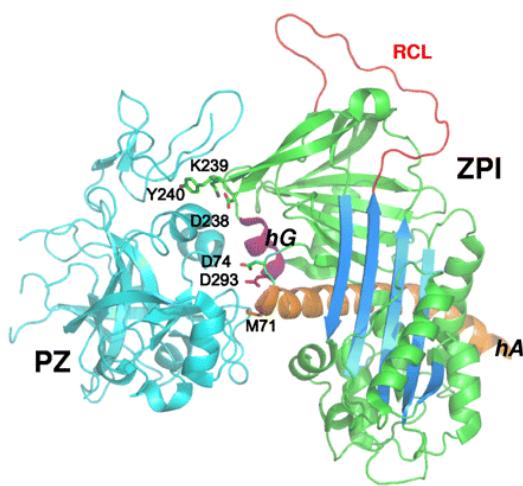
Im Menschen wurden bisher 36 verschiedene Serpine gefunden [Law *et al.* 2006], die phylogenetisch in 16 Klassen (A bis P) eingeteilt wurden [Bhakuni *et al.* 2016]. Die Mehrheit der Serinprotease Inhibitoren inhibiert, wie der Name schon sagt, Serinproteasen. Es gibt aber auch Caspase und Papain-*like* Cysteinprotease inhibierende Serpine [Schick *et al.* 1998]. Der Gruppe der Serpine ist in ihrer Struktur gleich: 3 beta-Faltblätter, 7 bis 9 alpha-Helices und ein RCL (*reactive center loop*) [Bhakuni *et al.* 2016]. Der RCL von inhibitorisch wirkenden Serpinen ahmt durch seine Struktur ein Substrat für die Proteasen nach. Die Protease erkennt diese Struktur, bindet an den RCL und es kommt zur Bildung des Michealis Komplexes. Das Serpin wird gespalten und das abgespaltene RCL heftet sich an anderer Stelle an das Serpin an [Fortenberry 2015]. Bei diesen Serpinen kommt es durch die Konformationsänderung nicht nur zur irreversiblen Inaktivierung des Enzyms, sondern auch die Protease wird mechanisch zerstört und irreversibel inaktiviert [Fortenberry 2015]. Zu den Serpinen gehören beispielsweise Antitrypsin, Protein C Inhibitor (PCI), Kallistatin, Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI), C1 Inhibitor, Angiotensinogen und Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor (ZPI).

### **2.3. Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor (ZPI) – Struktur und Funktion**

ZPI wurde 1998 erstmals von Han *et al.* beschrieben [Han *et al.* 1998]. Es ist ein einzelkettiges Protein, welches 72 kDa schwer ist [Han *et al.* 1998] und von der Leber synthetisiert wird [Han *et al.* 1999]. Es wurde eine 25-35 %-ige Übereinstimmung mit der Aminosäureabfolge von humanen Protease Inhibitoren, wie beispielweise Antithrombin und dem Heparin Co-Faktor II, gefunden, wobei der C-Terminus die größte Homologie aufwies. Anders als bei anderen Serpinen besitzt ZPI im aktiven Zentrum ein Tyrosin. Analysen, bei denen das Tyrosin ausgetauscht wurde, zeigten, dass diese Aminosäure im aktiven Zentrum von ZPI essentiell für die Bindung an einen Co-Faktor, Protein Z (PZ), ist [Han *et al.* 1999]. 2001 konnte gezeigt werden, dass PZ und ZPI im Plasma als Komplex zirkulieren [Tabatabai *et al.* 2001] (Abbildung 3).

Dieser Komplex ist in der Lage, zusammen mit Kalzium-Ionen und Phospholipiden, den FXa zu inhibieren. Dabei entfaltet der Komplex eine hundertfach stärkere Wirkung als ZPI alleine [Han *et al.* 2000]. Es konnte herausgefunden werden, dass ein Tyrosin im aktiven Zentrum von ZPI für die Inhibition des FXa verantwortlich ist [Han *et al.* 1999]. Neben der Hemmung von FXa wurde für das Serpin noch eine weitere Stelle der Inhibition gefunden.

Co-Faktoren-unabhängig wird FXIa durch ZPI in seiner Aktivität gehemmt, wobei Heparin eine verstärkende Wirkung erzielt [Han *et al.* 2000]. Für beide Interaktionen ist die gleiche Aminosäure notwendig (TyrosinY387) und in beiden enzymatischen Schritten wird ZPI proteolytisch gespalten und verliert damit seine Aktivität [Han *et al.* 2000]. Damit lassen sich im Serum nach Aktivierung der Gerinnung verminderte ZPI-Konzentrationen feststellen [Han *et al.* 2000].

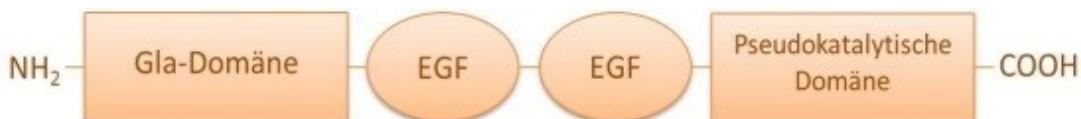


**Abbildung 3. Kristallographische Darstellung des PZ/ZPI-Komplexes.** ZPI ist in grün dargestellt (*reactive center loop* in rot, Faltblatt A in blau, Helix A in orange und Helix G in lila). Die Kontaktstellen zwischen PZ und ZPI in Helix A (hA), Helix G (hG) und Faltblatt C sind mit Benennung der Aminosäurereste angedeutet. Abbildung aus Huang *et al.* 2012.

## 2.4. Protein Z – Struktur und Funktion

PZ ist ein 62 kDa schweres Vitamin K-abhängiges Glykoprotein, dessen Entdeckung mehr als 40 Jahre zurückliegt. Zunächst vermutete man, dass es sich um eine einzelkettige Form des bovinen Gerinnungsfaktors FX handelte [Mattock & Esnouf 1973]. Erst 4 Jahre später konnte gezeigt werden, dass PZ ein eigenständiges Protein ist [Prowse & Esnouf 1977]. 1984 konnten Broze und Kollegen das humane Äquivalent des bovinen PZ isolieren [Broze & Miletich 1984]. Mit Aufklärung der Primärstruktur von PZ in den 90er Jahren stand fest, dass es aus 360 Aminosäureresten besteht, die sich N-terminal durch eine γ-Carboxyglutaminsäure (Gla-Domäne), 2 *epidermal growth factor-like domains* (*EGF-like domains*) und C-terminal eine katalytische Domäne zusammensetzen [Sejima *et al.* 1990] (Abbildung 4). Damit hat PZ eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit anderen Gerinnungsfaktoren, wie beispielsweise FVII, IX, X und PC [Hojrup *et al.* 1982; Sejima *et al.*

1990]. Der C-Terminus ist dabei der Struktur von Serinproteasen sehr gleich, allerdings sind einige Abweichungen in der Struktur detektiert worden [Sejima *et al.* 1990]. Damit lag die Vermutung nahe, dass PZ eine Bindung mit einem Serpin eingehen könnte. PZ wird von der Leber synthetisiert [Han *et al.* 1999] und dann in das Plasma sezerniert.



**Abbildung 4. Schematische Darstellung von PZ.** Humanes PZ besteht aus einer N-terminalen Gla-Domäne, der sich 2 EGFR-ähnliche-Domänen anschließen. Die pseudokatalytische Domäne befindet sich am Carboxyterminus.

Trotz guter Methoden um PZ sowohl aus bovinem als auch humanem Plasma zu isolieren, war lange Zeit nur sehr wenig über die physiologische Funktion des Proteins bekannt. Die große Homologie von PZ zu anderen Serinproteasen, besonders zu FIX und PC, spiegelt dennoch nicht die Wirkungsweise von PZ vollständig wieder. Im Gegensatz zu anderen Vitamin K-abhängigen Proteasen der Gerinnungskaskade ist PZ keine Serinprotease, da die typische kanonische katalytische Triade des aktiven Zentrums dieser Enzyme bei PZ fehlt, beziehungsweise verändert ist [Sejima *et al.* 1990]. Aufgrund dessen hat PZ keine proteolytische Aktivität.

Han *et al.* zeigten 1998 durch verschiedene *in vitro* Koagulations-Assays, dass PZ die Inhibierung des Faktors FXa durch Antithrombin III bremst [Han *et al.* 1998]. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass eine Inkubation des FXa mit PZ die prokoagulative Wirkung des FXa deutlich herabsetzt [Han *et al.* 1998]. Dieser Prozess ist zeitabhängig und benötigt Kalzium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und Phospholipide. Bei diesen Untersuchungen fiel allerdings auch auf, dass PZ zusätzlich die Wirkung eines anderen Proteins bei der FXa-Inhibierung zu verstärken scheint. Dabei bilden sie einen stabilen Komplex [Tabatabai *et al.* 2001], deren Menge durch die vorherrschenden PZ-Mengen limitiert [Miletich & Broze 1987] wird. Bei der Komplexbildung stellen zwei von sechs Kontaktstellen die Hauptakteure der Protein-Protein-Interaktion dar: Asp-293 und Tyr-240 [Huang *et al.* 2012] (Abbildung 3).

## 2.5. Protein Z und Protein Z-abhängiger Protease Inhibitor in der Klinik

Obwohl PZ bereits vor 40 Jahren entdeckt wurde, blieb seine physiologische Funktion für eine sehr lange Zeit unbekannt. Erst mit der Entdeckung von ZPI in den späten 1990er Jahren konnte eine Rolle in der Koagulation für PZ und auch ZPI nachgewiesen werden. Die Rolle beider Proteine in der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen wie beispielsweise Thrombosen, kardiovaskulären Ereignissen, Blutungsneigungen und Angiogenese ist in vielen klinischen Studien untersucht worden. Dabei wurden die unterschiedlichsten Ergebnisse beschrieben und kontrovers diskutiert.

### 2.5.1. Blutungsneigung

Bedingt durch die Rolle des PZ/ZPI-Komplexes in der sekundären Homöostase und durch die Beobachtung von Hogg & Stenflo, dass PZ eine Bindung von Thrombin an Phospholipidoberflächen ermöglicht [Hogg & Stenflo 1991], entstand die Hypothese, dass möglicherweise ein Mangel an PZ ursächlich für die Blutungsneigung von Patienten mit ungeklärter Pathogenese sein könnte. Dazu wurden verschiedenste Studien durchgeführt. So konnten Kemkes-Matthes & Matthes zeigen, dass in einer Gruppe von 36 Patienten mit Blutungsneigung unklarer Pathogenese bei 21 Personen die PZ-Plasmakonzentration unter dem der niedrigsten PZ-Konzentration aus der Kontrollgruppe lag [Kemkes-Matthes & Matthes 1995a]. Weitere Untersuchungen zeigten einen deutlich erhöhten peri- und postoperativen Blutverlust nach Tonsillektomie, Adenotomie [Kemkes-Matthes *et al.* 2000b], kieferchirurgischen [Kemkes-Matthes *et al.* 1999] und kardialen Eingriffen [Kemkes-Matthes *et al.* 1998] bei Patienten mit niedrigen PZ-Mengen im Vergleich zu den gesunden Kontrollpatienten.

Im Gegensatz dazu fanden Gamba *et al.* keine Unterschiede zwischen den PZ-Plasmakonzentrationen bei gesunden und kranken Patienten [Gamba *et al.* 1998]. Auch Ravi *et al.* konnten mit ihren Ergebnissen die Hypothese nicht unterstützen, dass eine verminderte PZ-Konzentration für eine Blutungsneigung ursächlich ist [Ravi *et al.* 1998]. Unveröffentlichte Daten von Vasse zeigte ebenfalls eine gleiche Verteilung der PZ-Konzentration innerhalb der Kontroll- und Patientengruppe [Vasse 2008].

Dennoch konnten Studien zeigen, dass die perioperative Gabe von Prothrombinkonzentraten bei Patienten mit ungeklärter Blutungsneigung und

pathologisch niedrigen PZ-Plasmakonzentrationen zu einer normalen Hämostase und somit zu keinen unerwarteten Zwischenblutungen führt [Barth *et al.* 2003; Greten *et al.* 1995; Kemkes-Matthes & Matthes 2000].

### **2.5.2. Thrombotische Erkrankungen**

In Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass eine PZ-Defizienz zusätzlich zu einem Faktor V-Leiden die Schwere des prothrombotischen Phänotyps deutlich verstärkt [Yin *et al.* 2000]. So starben viele Mäuse, die sowohl ein Faktor V-Leiden als auch eine PZ-Defizienz aufwiesen, bereits *in utero* [Yin *et al.* 2000]. Auch bei Patienten konnte eine deutliche Verschiebung zu Gunsten des prothrombotischen Phänotyps bei abweichenden PZ-Mengen beobachtet werden. Patienten mit einem Faktor V Leiden und PZ-Plasmakonzentrationen unter 1 µg/ml zeigten deutlich früher und häufiger thromboembolische Komplikationen als Patienten mit einem Wert von über 1 µg/ml [Kemkes-Matthes *et al.* 2000a].

Viele verschiedene Studien zur Untersuchung von veränderten PZ-Plasmakonzentrationen wurden bisher durchgeführt, mit zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnissen. Mehrere Beobachtungen zeigten einen Zusammenhang zwischen niedrigen PZ-Konzentrationen und dem Auftreten und der Progression von ischämisch-vaskulären Erkrankungen [zusammengefasst in Sofi *et al.* 2010]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen gibt es eine Reihe von Meldungen, die entweder einen Zusammenhang zwischen erhöhten PZ-Plasmakonzentrationen und dem Auftreten von den genannten Erkrankungen zeigten [Kobelt *et al.* 2001; Lopaciuk *et al.* 2002; McQuillan *et al.* 2003; Kolaitis *et al.* 2007] oder aber keine Korrelation finden konnten [Al-Shanqeeti *et al.* 2005; Grandone *et al.* 2004; Grandone *et al.* 2009; Koren-Michowitz *et al.* 2005; LeCam-Duchez *et al.* 2009; Martinelli *et al.* 2005; Morange *et al.* 2004]. Sofi *et al.* adressierten in einer Meta-Analyse die Rolle von geringen PZ-Plasmakonzentrationen als potentieller Risikofaktor für das Auftreten von Krankheiten, die mit einer vaskulären Thrombose assoziiert sind (ischämisch bedingter Schlaganfall, Erkrankungen der Koronararterien, venöse thromboembolische Erkrankungen, Fetusverlust). Dabei zogen sie insgesamt 28 Studien mit 4.218 Patienten in ihre Analyse ein. 17 der Untersuchungen zeigten dabei eine Begünstigung der thromboembolischen Ereignisse durch niedrige PZ-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu konnten 11 Studien dieses Ergebnis nicht bestätigen [Sofi *et al.* 2010].

Mehrere Untersuchungen bei Patienten mit venösen Thromboembolien zeigten, dass die PZ- Konzentrationen der Patienten sich kaum von denen der gesunden Probanden unterschieden [Santacroce *et al.* 2006; Al-Shanqeeti *et al.* 2005; Vasse *et al.* 2001; Martinelli *et al.* 2005]. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sehr geringe PZ-Mengen (unterhalb des 5. oder 2,5. Perzentil) ein unabhängiger Risikofaktor für venöse Thrombosen sein können [Santacroce *et al.* 2006].

Die Kombination einer niedrigen PZ-Plasmakonzentration mit einer anderen Erkrankung wie beispielsweise Faktor V Leiden [Kemkes-Matthes *et al.* 2002] oder Hyperhomocysteinämie [Martinelli *et al.* 2005] äußern sich hingegen in einer deutlich früheren Manifestation der Primärerkrankung oder einem höheren Risiko diese Krankheit zu entwickeln. Die übergeordnete Analyse von Sofi *et al.* zeigte allerdings einen Zusammenhang zwischen gesenkten PZ- Plasmakonzentrationen und einem gesteigerten Risiko an einer Thrombose zu erkranken [Sofi *et al.* 2010].

Für ZPI sind ähnliche Beobachtungen beschrieben worden. So konnten van de Water *et al.* zeigen, dass *missense*- und *nonsense* Mutationen im *SERPINA10*-Gen (kodierende Region), die zu einer veränderten Proteinexpression oder –Funktion von ZPI führten, in 4,4 % der Patienten mit Thrombose gefunden werden konnten. Hingegen wurden diese Mutationen nur in 0,8 % der gesunden Kontrollprobanden identifiziert [Van de Water *et al.* 2004]. Dennoch konnten auch hier innerhalb der Patientenkollekte andere thrombotische Risikofaktoren beobachtet werden (veränderte Protein S- und PC-Konzentrationen, Faktor V-Leiden; heterozygote Prothrombin Varianten).

Zusammenfassend lässt sich dennoch feststellen, dass ein Zusammenhang zwischen gesenkten PZ- Plasmakonzentrationen und einem erhöhten Risiko eine Thrombose zu entwickeln, äußerst kontrovers diskutiert werden muss. Hinzu kommt, dass ZPI nur in sehr wenigen Untersuchungen berücksichtigt wird.

### **2.5.3. Angiogenese**

Mehrere Studien deuteten bereits darauf hin, dass Gerinnungsfaktoren und Serpine eine Rolle in angiogenen Prozessen spielen könnten.

Der TF und Faktor VIIa werden als proangiogene Faktoren diskutiert. So wurde gezeigt, dass beide unter anderem eine Expression von VEGF induzieren [Rao & Pendurthi 2001]. Außerdem wird spekuliert, dass TF (exprimiert von glatten Muskelzellen) zusammen mit FVIIa die Rekrutierung von glatten Muskelzellen bei der Bildung von stabilen Gefäßen durch Verstärkung der PDGF-Aktivität begünstigt [Carmeliet 2001]. Thrombin hingegen verstärkt die Expression von VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen und induziert Endothelzellmigration und –Proliferation [Coughlin 2000; O'Brien *et al.* 2001].

Für PC wurden ähnliche Eigenschaften nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe von Uchiba *et al.* konnte bereits 1990 zeigen, dass aktiviertes PC (aPC) *in vitro* nicht nur zu einer Proliferation von humanen Endothelzellen führte, sondern ebenfalls durch topische Applikation auf die Cornea der Maus eine deutliche Induktion der Angiogenese herbeiführt [Uchiba *et al.* 2004]. Nebst einer Induktion der Proliferation wurde ebenfalls nachgewiesen, dass aPC die Barrierefunktion von humanen Endothelzellen *in vitro* verstärkt [Minhas *et al.* 2010] und die Zellen stimuliert, sich netzartig zu formieren (*tube-like structures*) [Uchiba *et al.* 2004]. Das dem PC strukturell ähnliche PZ wurde seit den späten 1990er Jahren vermehrt in den Fokus der Forscher gerückt. Studien zeigten, dass möglicherweise proangiogene und antithrombotische Eigenschaften vorliegen könnten [Butschkau *et al.* 2013; Butschkau *et al.* 2014a; Butschkau *et al.* 2014b].

Auch für Serpine sind proangiogene Wirkungen beschrieben worden. So zeigten beispielweise Ikeda und Kollegen, dass Heparin-Cofaktor II (ein Serinprotease Inhibitor) im Mausmodell der Hinterlaufischämie eine Revaskularisierung induziert. Gleichzeitig konnte eine Steigerung der Aktivierung von Endothelzellen und somit eine Induktion der Angiogenese beobachtet werden [Ikeda *et al.* 2012]. PAI-1 unterstützt beispielweise das Wachstum von Tumorzellen und die (Tumor-) Angiogenese unter physiologischen Konzentrationen [zusammengefasst in Placencio & DeClerck 2015].

## 3 Zielstellung

Für einige Komponenten des Gerinnungssystems konnten bereits proangiogene Eigenschaften nachgewiesen werden. Da PZ und PC strukturell sehr ähnlich aufgebaut sind und jeweils von Endothelzellen synthetisiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass sie auch hinsichtlich einer proangiogenen Wirksamkeit Ähnlichkeiten aufweisen.

Die Arbeiten von Butschkau *et al.* 2014 zeigten in einem *in vitro* Angiogenesemodell einen proangiogenen Effekt von PZ auf humane Endothelzellen (HUVEC) nach 8-stündiger Stimulation der Zellen mit PZ. Im chronischen Hinterlaufischämiede Modell der Maus wirkte sich eine PZ-Defizienz negativ auf die Reperfusion nach Ischämie aus, sodass geschlussfolgert wurde, dass PZ an der Angiogenese beteiligt sein könnte. Basierend auf diesen Befunden und der Tatsache, dass PZ und ZPI im Blut als Komplex zirkulieren [Tabatabai *et al.* 2001], stellten wir folgende Hypothese auf:

- **ZPI hat *in vitro* und *in vivo* einen proangiogenen Effekt**

Des Weiteren konnte bereits herausgefunden werden, dass eine PZ-Defizienz im Carotisläsionsmodell der Maus zu einer verstärkten luminalen Stenose mit einer deutlich dickeren Neointima im Vergleich zu den Wildtypieren führt [Butschkau *et al.* 2014a]. Die *in vitro* Beurteilung des Einflusses von PZ auf die Migration von humanen glatten Muskelzellen zeigte einen positiven Effekt [Butschkau *et al.* 2014a]. Ebenso konnte *in vivo* in der dorsalen Rückenhautkammer gezeigt werden, dass eine ZPI-Defizienz einen prothrombotischen Phänotyp unterstützt [Butschkau *et al.* 2013].

Aus diesen Resultaten ergab sich folgende Arbeitshypothese:

- **Eine ZPI-Defizienz hat *in vitro* und *in vivo* einen deutlich prothrombotischen Effekt**

Außerdem standen bisher die Untersuchungen in den PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren aus. Hier wurde vermutet, dass das Fehlen beider Koagulationsfaktoren zu einer massiven Verstärkung des thrombotischen und anti-angiogenen Phänotyps führt:

- **Eine kombinierte Defizienz von PZ und ZPI führt zu einer massiven Stenose nach Thrombusinduktion und zu einer ausbleibender Reperfusion nach Ischämie *in vivo***

Zur Untersuchung der genannten Hypothesen wurden bereits gut etablierte *in vitro* und *in vivo* Modelle herangezogen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1. *In vitro* Untersuchungen

#### 4.1.1. Kultivierung von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)

Humane Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, Lonza, Schweiz) wurden in 60,1 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen (TPP, Schweiz), beschichtet mit Attachment Factor (AF, Gibco, USA), bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % unter Standardzellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, hohe Luftfeuchtigkeit ) nach Anweisung des Herstellers in EBM-2 supplementiert mit Clonetics®EGM-2™ SingleQuots (Lonza, Schweiz), 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin (Penicillin (100 U/ml); Streptomycin (100 µg/ml), Biochrom, Deutschland) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei Erreichen der gewünschten Konfluenz wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml warmem PBS (phosphate buffered saline, Gibco, USA) vorsichtig gewaschen. Durch Trypsinierung (Trypsin-EDTA, 1x, Biochrom, Deutschland) wurden die Zellen geerntet, für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert (Allegra X-12R Centrifuge, Beckman Coulter, USA) und das Pellet anschließend in 1 bis 2 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zählung der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählekammer durchgeführt. Dazu wurden 10 µl der resuspendierten Zellsuspension auf einen Parafilmstreifen mit ebenfalls 10 µl Trypanblau vermischt und anschließend 10 µl der Suspension in die vorbereitete Zählekammer gegeben. Unter dem Mikroskop (Leica DMI4000B Fluoreszenzmikroskop, Leica, Deutschland) wurden alle Trypanblau-negativen Zellen als vitale Zellen gezählt und für alle weiteren *in vitro* Versuche in den Passagen 2 bis 5 verwendet.

#### 4.1.2. Kultivierung von humanen glatten Muskelzellen aus der Aorta (AoSMC)

Humane glatte Muskelzellen aus der Aorta (*human aortic smooth muscle cells*, Lonza, Schweiz) wurden ebenfalls wie die Endothelzellen in 60,1 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen (TPP, Schweiz) bis zu einer Konfluenz von 80-90 % unter Standardzellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) in 10 ml SmBM™-2 supplementiert mit SmGM™-2 SingleQuots™ (Lonza, Schweiz) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Penicillin (100 U/ml); Streptomycin (100 µg/ml), Biochrom, Deutschland) und 10 % FCS kultiviert. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Die

Passagierung der Zellen erfolgte, wie für die Endothelzellen oben beschrieben. Die glatten Muskelzellen wurden von Passage 5 bis 10 verwendet.

#### **4.1.3. *tube-formation-Assay* von humanen Endothelzellen**

Um das Potential von humanen Endothelzellen hinsichtlich der Ausbildung von netzwerkähnlichen Strukturen zu analysieren, wurde der *tube-formation-Assay* herangezogen. Als Untergrund für die Zellen wurde Wachstumsfaktor-reduziertes Matrigel (Growth Factor reduced BD Matrigel™ Matrix, BD Bioscience, USA) auf Eis aufgetaut und 70 µl in die Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte (Cell star cell culture plate, Greiner Bio-One, Österreich) ohne Erzeugung von Blasen pipettiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die konfluenten HUVECs geerntet, gezählt und nach der Zentrifugation in Wachstumsfaktor- und Serumreduziertem EGM-2 („Hungermedium“, 5 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin (Penicillin (100 U/ml); Streptomycin (100 µg/ml), Biochrom, Deutschland), *endothelial growth factor* (EGF), Ascorbinsäure, Hydrocortison aus Clonetics®EGM-2™ SingleQuots) resuspendiert. Nach Polymerisierung des Matrigels wurden die resuspendierten Zellen ( $10^4$  pro Well in 100 µl) über das Matrigel geschichtet. Dabei durfte die Matrix nicht mit der Pipettenspitze berührt werden. Für die entsprechenden Ansätze kamen humanes PZ (3 µg/ml, Enzyme Research Laboratories, USA), *stromal derived factor-1α* (SDF-1α, 50 ng/ml, R&D Systems, USA), ZPI (4 µg/ml, R&D Systems, USA), *vascular endothelial growth factor* (VEGF, 10 ng/ml, R&D Systems, USA) oder Puffer von PZ (50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 0,1 M NaCl) in je 100 µl Hungermedium zu den entsprechenden Wells dazu. Alle Ansätze wurden in Triplikaten ausgeführt. Nach 8 h Inkubation unter normalen Zellkulturbedingungen wurden 12 repräsentative Aufnahmen der gebildeten Netzwerke von jedem Ansatz mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Deutschland) in 100-facher Vergrößerung angefertigt. Für die quantitative Auswertung der einzelnen Versuchsansätze wurde die Software ImagePro Plus (CA, USA) eingesetzt. Für jedes unabhängige Experiment wurde die kumulative Netzwerklänge für jedes Gesichtsfeld gemessen und als relativer Wert zur Kontrolle angegeben (x-fach vs. Kontrolle, ktrl=1,0). Die Mediane der berechneten Werte wurden final als Boxplotdarstellungen mit 25. und 75. Perzentil graphisch dargestellt.

#### **4.1.4. scratch-Assay von humanen Endothelzellen und humanen glatten Muskelzellen**

Für die Bestimmung der Migrationsfähigkeit von humanen Endothel- und glatten Muskelzellen, wurden die Zellen in 12-Well-Mikrotiterplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 85-90 % in EGM-2 unter Standardzellkulturbedingungen (siehe oben) kultiviert. Anschließend wurden mit einer weißen Pipettenspitze in den konfluenten Zellrasen je vier Kreuze geritzt. Ein zweimaliges Waschen mit dem entsprechenden Medium entfernte alle abgelösten Zellen. Zum Schluss wurde 1 ml Hungermedium, versetzt mit entweder PZ (3 µg/ml), ZPI (4 µg/ml), Vehicle (50 mM Tris-HCL/0,1 M NaCL, pH 7,5) oder *stromal derived factor-1α* (SDF-1α, 50 ng/ml, für die Endothelzellen) über die Zellen geschichtet. Rasch wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Schweiz) in der Phasenkontrastdarstellung jedes Kreuz fotografiert. Nach einer Inkubationszeit von 8 h unter standardisierten Zellkulturbedingungen wurden erneut Aufnahmen wie bereits beschrieben angefertigt. Die quantitative Auswertung der Migrationsfähigkeit erfolgte durch Ausmessen der freien Welloberfläche (Kreuze) zu beiden Zeitpunkten innerhalb einer Versuchsgruppe. Der sich daraus ergebende Verschluss über den Zeitraum von 8 h wurde als Prozentsatz angegeben. Für n=7 (glatte Muskelzellen) und n=8 (Endothelzellen) unabhängige Experimente wurden die Mediane in der Boxplotdarstellung aufgezeigt.

Für die humanen glatten Muskelzellen wurde ein ähnliches Protokoll angewendet. Die Zellen wurden allerdings in SmGM™-2 bis zu einer 90-95 %-igen Konfluenz kultiviert. Die verschiedenen Testansätze beinhalteten neben PZ, ZPI und Vehicle (wie oben beschrieben) auch einen Ansatz mit *tumor necrosis factor-α* (TNF-α, 10 ng/ml, R&D Systems, USA) als Positivkontrolle.

### **4.2. *In vivo* Untersuchungen**

#### **4.2.1. Haltungsbedingungen der Versuchstiere**

Die Haltung und Zucht der Versuchstiere obliegt der Zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock und wird durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) kontrolliert und überwacht. Alle Tierversuche wurden gemäß den gültigen Richtlinien für den Gebrauch von Versuchstieren und der Tierschutz- und Ethikkommission der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Für dieses Versuchsvorhaben liegt eine Genehmigung der genannten Behörde mit dem Aktenzeichen

LALLF 7221.3-1-055/13 vor. Die Tiere werden in kleinen Gruppen bei ständigem Zugang zu Standardlaborfutter für Nagetiere und freiem Zugang zu Trinkwasser in einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Käfiggröße entspricht den Anforderungen des Tierschutzgesetztes und enthält neben Einstreu auch Nistmaterial und leere Papierrollen zur Beschäftigung der Tiere. Futter- und Wasserwechsel erfolgt täglich, die Erneuerung der Einstreu wöchentlich durch die Tierpfleger.

#### **4.2.2. Genotypisierung der Mäuse mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde den Tieren durch die Tierpfleger ein kleines Stück der Schwanzspitze entnommen und mit 500 µl NaOH und 50 µl TRIS bei einem pH 8 für 24 h gekocht und anschließend 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt.

Für die PCR wurden zunächst 2 unterschiedliche 10x PrimerMixe zu je 5 µM pro Genotyp angesetzt. Diese Mastermixe enthielten jeweils einen *forward* und einen *reverse* Primer pro Genotyp. Auf Eis wurde im Folgenden der Mastermix für die PCR für ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe vorbereitet. Die Pipettierschemata mit den entsprechenden Konzentrationen und Volumina sind im Anhang aufgeführt (Anhang 9.1).

Nach Vorbereitung des Mastermixes, welcher noch keine genomische DNA enthält, wurden 18 µl pro Ansatz in PCR-Tubes auf den Boden pipettiert und anschließend die genomische DNA (2 µl) in den Deckel des Tubes gegeben. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Tube sorgfältig geschlossen und in den Cycler gestellt. Die Programme für die Wildtyp- (+/+) beziehungsweise Knock-out-Primer (-/-) unterscheiden sich und sind im Anhang beigefügt (Anhang 9.1., durchgeführt auf dem Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Deutschland)).

Für die Agarosegelektrophorese wurden in der Zwischenzeit 3 g Agarose (peqGOLD Universal Agarose, peqlab, Deutschland) in 100 ml 1x TAE gelöst und anschließend in einer Mikrowelle gekocht. Nach dem Abkühlen wurden 2 µl GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, Schweiz) beigemischt und die Agaroselösung in einen Gelschlitten luftblasenfrei gegossen. Nach Polymerisierung des Gels wurde dieses in eine horizontale Phoresekammer gelegt und diese mit 1x TAE befüllt, bis das Gel vollständig mit Puffer bedeckt und die Taschen gefüllt waren. Anschließend wurden 2 µl jedes PCR-Produktes (zusammen mit 2 µl DNA-Marker) in eine Tasche pipettiert, die Kammer verschlossen und die Elektroden

angeschlossen. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gel unter einem UV-Lampe platziert und die sichtbaren Banden abfotografiert (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System, BioRad Laboratories, USA). Im Folgenden sind die Bandengrößen der einzelnen Genotypen aufgeführt.

Genotyp	Bandengröße [bp]
PZ <sup>+/+</sup>	300
PZ <sup>-/-</sup>	214
ZPI <sup>+/+</sup>	256
ZPI <sup>-/-</sup>	376

**Tabelle 1. Bandengrößen der zu erwartenden PCR-Produkte einer PZ- und ZPI-Genotypisierung.** Die Bande des Genproduktes von ZPI<sup>-/-</sup> ist mit 376 Basenpaaren die größte und PZ<sup>-/-</sup> mit 214 Basenpaaren die kleinste.

#### 4.2.3. Narkotisierung der Versuchstiere

Vor jedem Eingriff wurden die Tiere gewogen und durch eine gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektionsnarkose (5 mg/kg Xylazin (Rompun 2,5 %, Bayer, Deutschland) und 75 mg/kg Ketamin (10% bela-pharm GmbH & Co. KG, Deutschland)) sediert. In ausreichender Narkosetiefe (definiert mit einer Atemfrequenz von 60-80 Atemzüge/min und dem Ausbleiben einer Reaktion auf den Zehen-Kneif-Reflex) wurden die Augen mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Bayer, Deutschland) bedeckt und die Maus mit dem Rücken auf einer Lagerungsbühne mit integrierter Heizplatte platziert. Nach Fixierung der Extremitäten mit Pflaster und Desinfektion des Operationsfeldes mit 70 %-igem Ethanol wurde mit den chirurgischen Eingriffen begonnen.

#### 4.2.4. Murines Modell der chronischen unilateralen Hinterlaufischämie

Sowohl die Angiogenese als auch die Arteriogenese sind wichtige physiologische Prozesse zur Adaptation und Regeneration als Antwort auf pathophysiologische Zustände [Simons & Ware 2003]. Daher sind Untersuchungen der zugrundeliegenden Mechanismen von besonderer Bedeutung.

Das Modell der rechtsseitigen, unilateralen, chronischen Hinterlaufischämie der Maus eignet sich für diese Fragestellung hervorragend.

Durch Ligatur und anschließende Entfernung der *A. femoralis communis* wird in dem distalen Hinterlauf eine Ischämie herbeigeführt. Diese führt zu einer hypoxie-induzierten

Angiogenese im *M. gastrocnemius* (Unterschenkelmuskel). Gleichzeitig kommt es proximal im Oberschenkel zu einer Scherstress-getriggerten Arteriogenese und zum Umbau der Kollateralgefäß zu großen Leitgefäßen [Limbourg et al. 2009]. Durch Wärmebildaufnahmen und eine histologische Evaluierung des ischämischen *M. gastrocnemius* konnte die Ausprägung der Ischämie mit Fokus auf die verschiedenen Versuchstiergruppen untersucht werden.

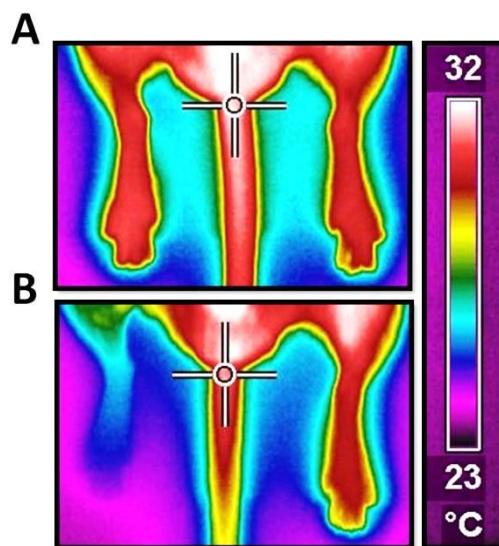
#### **4.2.4.1. Präparation der Hinterlaufischämie**

Nach Platzierung der Maus auf dem Operationstisch unter einem Stereomikroskop (Leica M651/M655, Leica Microsystems, Schweiz) und Fixierung der Extremitäten wurde die Haut des rechten Hinterlaufes mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und die Haare gescheitelt. Nach Inzision der Haut (ca. 2 mm groß) auf Höhe des Kniegelenkes konnte das darunterliegende Bindegewebe durch stumpfe Präparation mit mikrochirurgischem Präparationsbesteck vorsichtig entfernt und die prominente *A. femoralis* vom begleitenden Nerv und der Vene separiert werden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass weder der Nerv noch die Vene beschädigt wurden. Im Anschluss an die Ligation der Arterie mit einem Nylonfaden der Stärke 7-0 (Prolene™, Ethicon, Deutschland) und 2 chirurgischen Knoten, erfolgte die Durchtrennung und Verödung des Gefäßes mit einem Kauter. Um eine suffiziente Ischämie zu erzeugen, wurde proximal in der Leistengegend ebenfalls eine Hautinzision (ca. 3 mm) gesetzt, das Bindegewebe stumpf disseziert und die *A. femoralis communis* unterhalb des Leistenbandes von Vene und Nerv freipräpariert. Ebenfalls wurde eine Ligatur (Fadenstärke 7-0) gesetzt und die Arterie mit dem Kauter distal der Ligatur durchtrennt. Durch leichten Zug an der verödeten Arterie auf Kniehöhe konnte das Gefäßsegment zwischen den beiden Ligaturen vorsichtig entfernt werden. Zum Abschluss des Eingriffs sind die Inzisionen mit je einer Hautnaht (Fadenstärke 6-0, Prolene™, Ethicon, Deutschland) verschlossen und die Wunden mit Ethanol desinfiziert worden.

Zur postoperativen Beobachtung befanden sich die Mäuse in ihren Käfigen unter einer Wärmelampe und kehrten erst nach vollständigem Erwachen aus der Narkose wieder in die Zentrale Versuchstierhaltung zurück.

#### 4.2.4.2. Thermografie

Zur Evaluierung der erzeugten Ischämie und des Verlaufes der Reperfusion in dem operierten Hinterlauf, wurden zu distinkten Zeitpunkten Wärmebildaufnahmen mit Hilfe einer Thermokamera (ThermaCam B20 HS, Flir Systems, Deutschland) durchgeführt. Dazu befanden sich die Mäuse unter Narkose zunächst für 6 Minuten auf dem Bauch liegend auf einer 40 °C warmen Heizplatte, wobei sich der ventrale Hinterlauf erwärmte. Nach Ablauf der 6 Minuten wurden die Tiere mit dem Rücken auf eine unbeheizte Tischplatte gelegt und die Hinterpfoten auf einem Klebeband fixiert. Nach 3 Minuten konnte eine Thermografieaufnahme gemacht und die Temperatur der Hinterläufe mit der entsprechenden Software im Nachhinein (FLIR QuickReport 1.2, FlirSystems, Deutschland) ermittelt werden. Die Aufnahmen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten: prä operativ zur Sicherstellung, dass beide Hinterläufe dieselbe Ausgangstemperatur aufweisen und die Maus somit operiert werden kann, direkt post operativ zur Überprüfung der erzeugten Ischämie und final an Tag 21 post operativ (POT 21) zur abschließenden Erfassung der Reperfusion des ischämischen Hinterlaufes (Abbildung 5).



**Abbildung 5. Thermografieaufnahmen prä und post operativ.** In Abbildung (A) sind durch eine rote Färbung beide Hinterläufe als gleichwarm aus zu machen. In Abbildung (B) zeigte sich hingegen eine deutliche Abkühlung des operierten Hinterlaufes (rechte Pfote), was durch eine blaue Färbung verdeutlicht wird.

#### **4.2.4.3. Gewebeasservierung und histologische Aufarbeitung**

Um in den später angefertigten Gewebeschnitten perfundierte Mikrogefäße lokalisieren und zählen zu können, wurde am Tag 21 post operativ jeder Maus nach der Thermografieaufnahme Fluorescein-konjugiertes Lektin I (Fluorescein *Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia* Lectin I, Vector Laboratories, USA) intrakardial injiziert. Das Lektin zirkuliert im Körper und bindet an Kohlenhydratstrukturen auf der Zellmembran von Endothelzellen. Durch die Konjugation des Lektins mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein ist eine Visualisierung von Mikrogefäßen in histologischen Muskelschnitten unter Blaulicht möglich.

Nach intraperitonealer Narkose und Abschluss der Thermografieaufnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation euthanasiert und anschließend unter einem Operationsmikroskop platziert. Nach Fixierung der Hinterbeine und Befeuchtung mit Ethanol konnte die großzügige Hautinzision beginnend an der Ferse bis zur Leiste gesetzt werden. Die Haut wurde vorsichtig mit einer Pinzette und einer Mikroschere von dem darunterliegenden Muskelgewebe getrennt. Nachdem die Haut großflächig und vollständig von dem Hinterlauf beseitigt wurde, konnte die Oberschenkelmuskulatur entlang der Femoralarterie nach distal dissekiert und entfernt werden. Um den *M. gastrocnemius* entnehmen zu können, musste zunächst die Achilles-Sehne distal mit einer Pinzette fest gefasst werden. Mit einer Mikroschere wurde dann entlang am Unterschenkelknochens nach proximal der Muskel gelöst. Durch einen horizontalen Schnitt im Muskelgewebe auf Höhe des Kniegelenks konnte der Muskel entnommen werden. Ein vorgekühlter Präparatehalter (Cryoblock) wurde mit ausreichend Einbettgel (TissueTek, Sakura Finetek, Niederlande) bedeckt und der entnommene Muskel einmal durch dieses gezogen. Anschließend wurde der Muskel aufrecht mit dem Ende der Sehne nach oben auf den Stempel gesetzt und zügig in flüssigem Stickstoff in einem dafür geeigneten Behältnis eingefroren. Die Lagerung der in Alufolie verpackten Gewebeproben erfolgte bei -20 °C. Die Entnahme wurde sowohl für den ischämischen als auch für den nicht ischämischen Hinterlauf wie beschrieben durchgeführt.

Nach Asservierung und Kryokonservierung der Gewebe erfolgte die histologische Aufarbeitung. Dazu wurden die Proben mit Hilfe eines Cryostaten (Schneidemaschine Cryostat Jung Frigocut 2800N, Leica, Deutschland) bei -20 °C im Abstand von 200 µm in 6

um dicke Schnitte gebracht. Jeweils 4 Schnitte fanden auf einen Objektträger (Thermo Scientific, USA) Platz. Nach entsprechender Beschriftung und Trocknung für mindestens 24 h bei Raumtemperatur (RT) wurden die Schnitte in kaltem Aceton (-20 °C) für 10 Minuten fixiert. Nach darauffolgender Trocknung erfolgte ein 3-maliger Waschschritt mit Leitungswasser. Anschließend wurde die Schnitte in eine „feuchte Kammer“ gegeben. Diese Kammer ist mit Wasser gefüllt und verhindert ein Austrocknen der Präparate. Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper zu verhindern, erhielten alle Schnitte den Protein Block Serum-Free (Dako, Denmark) und wurden für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nachdem der Proteinblock abgekippt wurde, konnten pro Objektträger circa 80 µl der Arbeitslösung des Primärantikörpers gegen CD31 (PECAM-1, rat anti-mouse, Santa Cruz, USA 1:50, gelöst in Antibody Diluent (Dako, Dänemark) auf jeden Schnitt pipettiert werden. Anschließend inkubierten die Proben über Nacht in der „feuchten Kammer“ bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst auf RT gebracht, bevor die Primärantikörperlösung vorsichtig abgeklopft und die Schnitte 3x mit Leitungswasser gewaschen wurden. Für die Visualisierung der Bindung des Primärantikörpers fand ein AlexaFluor®555-gekoppelter Sekundärantikörper (goat anti-rat IgG, Invitrogen, USA) in einer 1:400 Verdünnung (in Antibody Diluent, Dako, Dänemark) Anwendung. Pro Objektträger wurden circa 150 µl Lösung benutzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT in der lichtundurchlässigen „feuchten Kammer“ wurde die Antikörperlösung abgeklopft und alle Schnitte 3x gewaschen. Um eine Kernfärbung mit DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, AppliChem, Deutschland) durchzuführen, wurde dieser Farbstoff in kaltem PBS (1:100) verdünnt und die Lösung auf die Schnitte gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei RT konnte die Lösung abgekippt werden. Nach einem finalen Waschschritt wurden die Objektträger sorgfältig abgeklopft, mit Eindeckmedium (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako, Dänemark) beträufelt und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei bedeckt. Die Lagerung bei 4 °C in Dunkelheit ermöglichte die Aufnahme der Fluoreszenzbilder zu einem späteren Zeitpunkt.

#### **4.2.4.4. Datenakquise**

Die Aufnahmen der Muskelquerschnitte erfolgten mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Deutschland) in 200-facher Vergrößerung. Dazu wurde in jedem Präparat das entsprechende Muskelareal, erkennbar an quer angeschnittenen

Muskelfaserbündeln, aufgesucht und nacheinander die Einzelbilder der DAPI (blau)-, CD31 (rot)- und Lektinfärbungen (grün) aufgenommen. Später wurden die Einzelbilder der Lektin- und CD31-Färbungen ein und desselben Muskelareals übereinandergelegt und die Lektin/CD31-positiven Zellen pro Gesichtsfeld manuell ausgezählt. Anschließend wurden die Werte als Lektin/CD31-positive und DAPI/CD31-positive Zellen pro mm<sup>2</sup> Gewebeschnitt ermittelt.

#### **4.2.4. Murines Modell der Carotisläsion mittels FeCl<sub>3</sub>**

Die Gefäßwand ist ein hochkomplexes System, welches durch eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird. Dazu gehören beispielsweise der Scherstress, zirkulierende Blutzellen, Hormone und Zytokine sowie oxidativer Stress [Libby 2002; Fearon *et al.* 2009]. Eine *in vitro* Zellkultur kann dieses komplexe System nicht erfassen, weshalb Untersuchungen zu Prozessen in der Arterienwand nur im Tiermodell umfassend geklärt werden können. Der Einsatz von FeCl<sub>3</sub> zur Induktion einer vaskulären Verletzung ist ein weit verbreiteter Ansatz zur Untersuchung von thrombotischen Ereignissen [Day *et al.* 2004; Whinna 2008]. Nach FeCl<sub>3</sub>-Applikation auf der äußersten Schicht des Gefäßes kommt es durch Induktion von oxidativem Stress [Chen *et al.* 2011; Ghosh *et al.* 2008] zum Integrationsverlust der Endothelzellen mit Untergang des Schutzes vor zirkulierenden Thrombozyten und Komponenten der Gerinnungskaskade [Wei *et al.* 2013]. Als Ergebnis entsteht ein Gefäßwandschaden mit Aktivierung der Gerinnungskaskade und Entstehung eines Thrombus infolge der Neointimaproliferation. In diesem Versuchsansatz wurde das Modell der Carotisläsion mittels FeCl<sub>3</sub> angewendet, um den Einfluss einer ZPI- und PZ/ZPI-Defizienz auf die Bildung einer Neointima zu evaluieren.

##### **4.2.4.1. Gefäßverletzung durch FeCl<sub>3</sub>**

Zu Beginn werden die Mäuse wie bereits beschrieben mit einer intraperitonealen Injektion von Rompun und Ketamin (siehe 4.2.3.) narkotisiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurden die Mäuse mit dem Rücken auf einer Wärmeplatte unter einem Stereomikroskop platziert und alle vier Extremitäten mit Pflaster fixiert. Nach Befeuchtung des Fells mit Ethanol und Setzung der Hautinzision mit einer Schere traten die Speicheldrüsen prominent hervor. Diese mussten zunächst getrennt und dann temporär aus dem Operationsfeld verlegt werden. Durch Überstreckung des Nackens der Maus

konnte nun die *A. carotis* besser freipräpariert werden. Die linke *A. carotis* musste im nächsten Schritt vom umliegenden Bindegewebe durch stumpfe Präparation mit zwei Pinzetten vorsichtig befreit werden. Anschließend wurden zwei ca. 10 cm lange 4-0 Prolene Fäden einseitig schräg angeschnitten und unter der *A. carotis* durchgeführt, um diese etwas höher zu lagern. Im Vorfeld zugeschnittene, dreieckige Stücke Filterpapier unter der *A. carotis* verhinderten, dass FeCl<sub>3</sub> mit dem umliegenden Gewebe in Kontakt kam. Ein sehr kleines Stückchen Filterpapier (ca. 1x1 mm, Faltenfilter Cellulose, GE Healthcare, UK) wurde in FeCl<sub>3</sub> getränkt und für exakt 3 Minuten auf die *A. carotis* gelegt. Nach Entfernung des Papierstückchens musste die Stelle ein wenig abgetupft werden. Die Filterpapierdreiecke konnten nun ebenfalls entfernt und die Fäden vorsichtig unter der *A. carotis* herausgezogen werden. Die finale Applikation von steriler Kochsalzlösung verhindert ein Austrocknen der Läsion. Abschließend wurde die Naht desinfiziert und die Maus zurück in den Käfig gesetzt. Um die Körpertemperatur weiterhin aufrecht zu erhalten, befanden sich alle Käfige vor einer Wärmelampe. Nach Erwachen der Tiere wurden diese wieder zurück in die Tierhaltungsräume gebracht. Es erfolgt eine Begutachtung des Wohlbefindens am nächsten Tag durch den Operateur.

#### **4.2.4.2. Gewebeasservierung**

Nach 21 Tagen post operativ wurden die Tiere wie bereits beschrieben narkotisiert. Nach Platzierung der Maus unter dem Stereomikroskop wurde die Naht eröffnet und die *A. carotis* wie bereits beschrieben freipräpariert. Die Läsion zeichnete sich deutlich durch eine weiße Färbung vom unbeschädigten Gefäßteil ab. Um die Gewebeentnahme vorzubereiten, ist ein Austausch des Blutes durch Formalin nötig. Dazu musste zunächst der Bauchraum eröffnet und das Zwerchfell durchtrennt werden. Schnell wurde das Herz mit einer Pinzette gefasst und ca. 5 ml Kochsalzlösung, gefolgt von ca. 2 ml Formafix 4 %-ig (Grimm med. Logistik GmbH, Deutschland) intrakardial injiziert. Eine ausreichende Perfusion des Gefäßsystems ist an einer deutlichen Weißfärbung der Gewebe zu erkennen. Die *A. carotis* wurde nun mit einer Pinzette ca. 1-2 mm oberhalb der Läsion gefasst und sowohl oberhalb der Läsion als auch unterhalb durchtrennt. Das ca. 2-3 mm lange Gefäßstück wurde nun unter mikroskopischer Kontrolle zunächst in einer Biopsiekapsel (CellSafe Biopsiekapseln, Leica, Deutschland) und die Kapsel in einer Einbettkassette (Jet

Cassette II, Leica, Deutschland) möglichst gerade platziert und für mindestens 24 h in Formalin fixiert.

#### **4.2.4.3. Histologische Aufarbeitung der Gefäßsegmente**

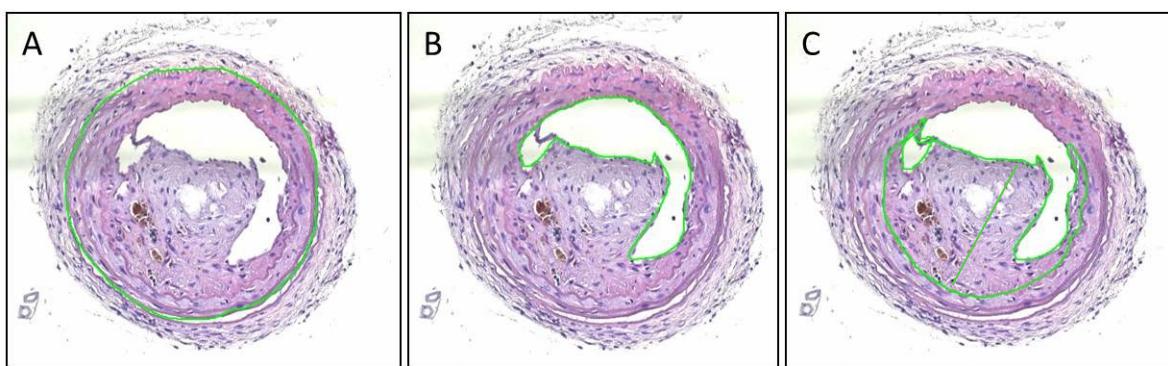
Die histologische Aufarbeitung der entnommenen Carotiden begann mit der Entwässerung in einer Histokinette. Nach aufrechter Paraffineinbettung wurden die Gefäße mit einem Mikrotom in 4 µm dicke Segmente geschnitten. Nach Streckung in einem 40 °C warmen Wasserbad wurden die Schnitte auf unbeschichtete Glasobjektträger und auf Polylysinsbeschichtete Glasobjektträger gebracht und anschließend bei 60°C für mindestens 60 Minuten getrocknet. Um einen Überblick über den Stenosegrad der Gefäße zu erhalten, erfolgte eine Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin (HE-Färbung). Dafür werden die Objektträger in einer zeitlichen Abfolge zuerst gefärbt, gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, final fixiert und eingedeckt (Tabelle 2). Dabei stellen sich die Zellkerne durch die Hämalaunfärbung blau und das Zytoplasma durch das Eosin rötlich bis rosa dar.

Schritt	Reagenz	Zeit
Färben	Hämalaun (1:5)	5 min RT
Bläuen	Leitungswasser	10 min RT
Färben	Eosin (0,5 %)	1 min RT
Waschen	Leitungswasser	
Entwässern	Ethanol (70 %)	1 min RT
Entwässern	Ethanol (96 %)	1 min RT
Entwässern	Ethanol (100 %)	1 min RT
Entwässern	Ethanol (100 %)	1 min RT
Fixierung	X-TRA	1 min RT
Fixierung	X-TRA	1 min RT
Eindecken	X-TRA Kitt	

**Tabelle 2. Ablauf für die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung).** Die Färbung mit Hämalaun und Eosin ist ein mehrstufiger Prozess mit verschiedenen Entwässerungsstufen, Waschschritten und Fixierungen.

#### 4.2.4.4. Datenakquise

Um Daten hinsichtlich der Morphometrie aller Gefäßquerschnitte zu erhalten, wurden Aufnahmen aller Präparate in einer 200-fachen Vergrößerung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Deutschland) aufgenommen. Anschließend erfolgte die Ausmessungen des originalen Lumens und des restlichen nicht okkludierten Lumens, sowie der Dicke und der Fläche der Neointima mit der Grafiksoftware ImagePro Plus (Abbildung 6).



**Abbildung 6. Schematische Darstellung der Vermessung der HE-gefärbten Carotidensegmente.** (A) Das Originallumen wird durch Umkreisen des Außenradius der Media bestimmt. (B) Das residente Lumen wird im zweiten Schritt durch Flächenbestimmung ausgemessen. (C) Die Neointimafläche wird ebenfalls direkt ausgemessen. Dabei wird die Fläche der Okklusion, die in das Lumen hineinragt, bis zu der *Membrana elastica interna* ermittelt. Die Dicke der neugebildeten Intima kann im letzten Schritt durch eine Messung der Strecke von der *Membrana elastica interna* bestimmt werden.

#### 4.3. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden verschiedene Herangehensweisen verwendet. Bei dem Scratch-Assay wurde die zellfreie Fläche eines jeden Ansatzes nach 8 h zu der Wundfläche zum Ausgangszeitpunkt  $t_0$  ins Verhältnis gesetzt (prozentualer Wundverschluss). Für die Auswertung des *tube-formation*-Assays wurden die entsprechenden kumulativen Netzwerklängen als x-faches gegenüber der Kontrolle (Mediumansatz) angegeben. Für die *in vivo*-Experimente wurden absolute Werte (als Prozentwerte oder Differenzen) in den graphischen Darstellungen abgebildet. Entsprechende Einheiten sind den Diagrammachsen zu entnehmen.

Die statistische Auswertung wurden mit der Software SigmaPlot Version 12.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) erstellt. Statistische Unterschiede zwischen Stichproben zweier Gruppen wurden mit dem t-Test für normalverteilte Werte beziehungsweise mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test für nicht normalverteilte Stichproben ermittelt. Für den Vergleich von mehreren Stichproben (keine Normalverteilung) wurde der ANOVA on Ranks (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) herangezogen. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Für die Auswertungen sind die Boxplotdarstellungen mit Median, 25. und 75. Perzentil gewählt worden. Gruppengrößen wurden in den entsprechenden Abbildungen kenntlich gemacht. Für die Erstellung der Grafen wurde die Software GraphPad Prism 5 (Version 5.04, GraphPad Software, Inc., USA) verwendet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1. Einfluss von ZPI auf die Thrombusformation

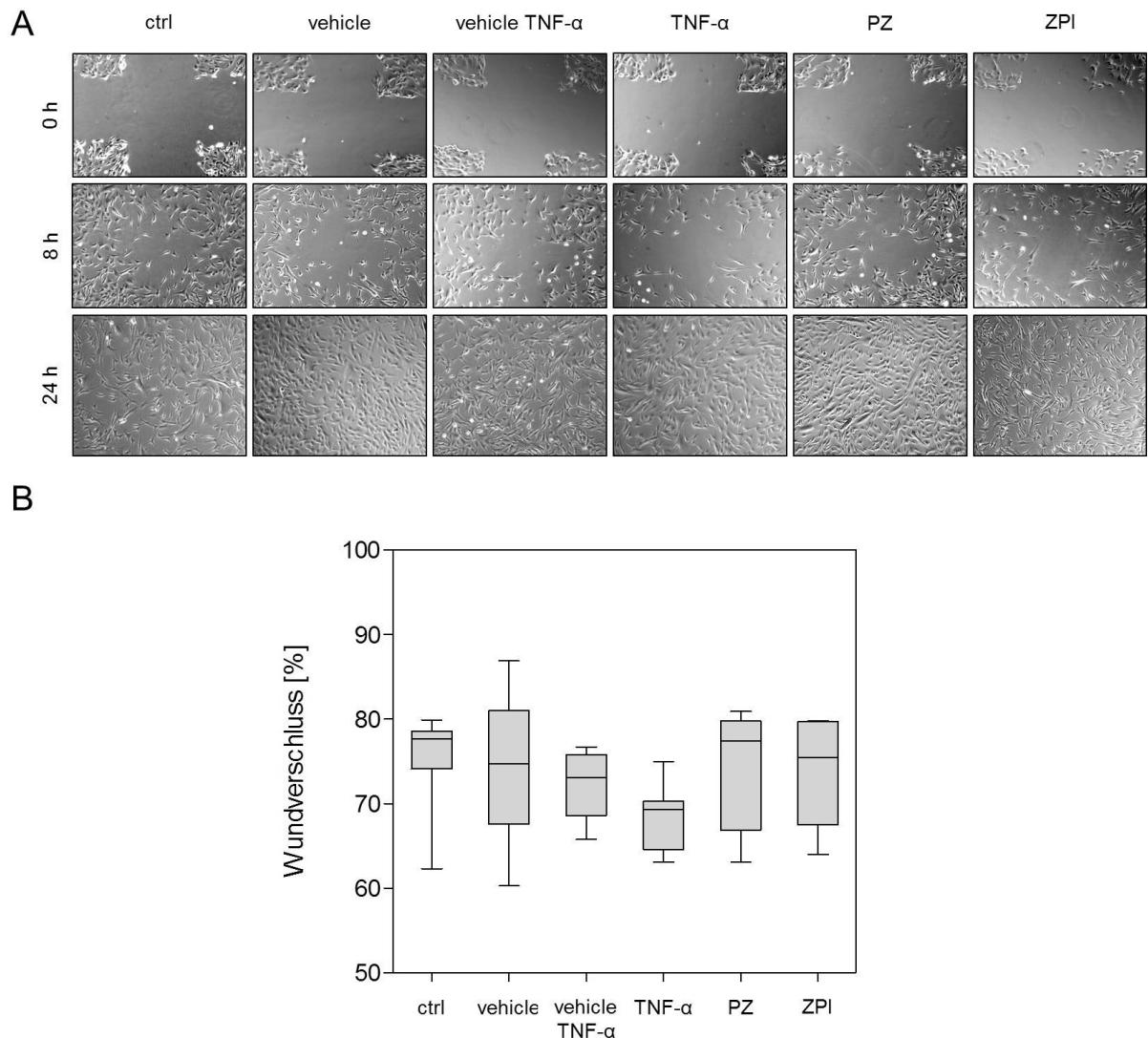
#### 5.1.1. Einfluss von ZPI auf die Migration von glatten Muskelzellen *in vitro*

Da der Migration von glatten Muskelzellen bei der Bildung einer Neointima eine bedeutende Rolle zukommt, wurde zunächst *in vitro* mithilfe des *scratch*-Assays (Migrations-Assay) der Einfluss von PZ und ZPI auf die Migration von humanen glatten Muskelzellen (hAoSMC) untersucht. Der *scratch*-Assay eignet sich dabei sehr gut als *in vitro*-Modell, da eine einfache Durchführung und eine schnelle quantitative Auswertung nach einem kurzen Zeitraum möglich sind. In einen konfluenten Zellrasen wurden mithilfe einer Pipettenspitze 4 Kreuze geritzt (engl. *scratch*), die Zellen gewaschen, um nicht-adhärente Zellen zu entfernen und die entsprechenden Untersuchungsreagenzien zugegeben. Nach 8 h Inkubation mit den Reagenzien wurden die finalen Aufnahmen angefertigt, die verbliebene zellfreie Fläche zu der Anfangsfläche (ebenfalls zellfrei) ins Verhältnis gesetzt und als prozentualer Wundverschluss angegeben.

Abbildung 7 zeigt in Teil A repräsentative Mikroskopie-Aufnahmen der humanen glatten Muskelzellen in einer Zellkulturschale zu den Zeitpunkten 0 h (Referenzzeitpunkt), 8 h und 24 h. Zum Referenzzeitpunkt (0 h) konnte man die Kreuze mittig sehr gut erkennen, die Ränder zum Zellrasen waren klar abgegrenzt und es befanden sich keine frei schwimmenden Zellen im Medium. Nach einer Inkubationszeit von 8 h konnte in allen Versuchsansätzen eine Reduktion der Kreuzfläche beobachtet werden. Die Zellen migrierten in das freie Areal hinein und verkleinerten so die Kreuzfläche.

Nach 8 h verringerte sich die zellfreie Fläche deutlich und nach 24 h Inkubation konnten keine freien Flächen mehr beobachtet werden. Die Zellen erreichten eine 100 %-ige Konfluenz. Die quantitative Auswertung zeigte, dass der Medium-Kontrollansatz einen Wundverschluss von 77,7 % nach 8 h erreichte. Im Gegensatz dazu zeigten die Versuchsansätze der Vehicle-Kontrollen eine leicht verringerte Migration (Vehicle 74,8 % vs. Vehicle TNF- $\alpha$  73,1 %) gegenüber der Medium-Kontrolle. TNF- $\alpha$  hingegen induzierte eine Hemmung der Migration. Lediglich 69,3 % der zellfreien Fläche waren nach 8 h mit Zellen besiedelt. Die zu testenden Substanzen PZ und ZPI wiesen nach Inkubation ähnliche

Ergebnisse auf. So konnte ein Wundverschluss von 77,4 % (PZ) und 75,5 % (ZPI) erreicht werden. Verglichen mit den Kontrollansätzen lagen beide auf dem Niveau der Medium-Kontrolle, allerdings deutlich über der Positivkontrolle TNF- $\alpha$  (Abbildung 7 B).



**Abbildung 7. Wundverschluss von humanen glatten Muskelzellen nach Applikation von TNF- $\alpha$ , PZ und ZPI sowie den entsprechenden Trägersubstanzen.** (A) Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des Wundverschlusses der SMCs nach 0 h, 8 h und 24 h in 50-facher Vergrößerung. (B) Graphische Erfassung des Wundverschlusses nach 8 h. Boxplotdarstellung mit 25%-igem und 75%-igem Perzentil, ANOVA on Ranks, n=7.

### 5.1.2. Einfluss von ZPI auf die luminale Stenose der A. carotis

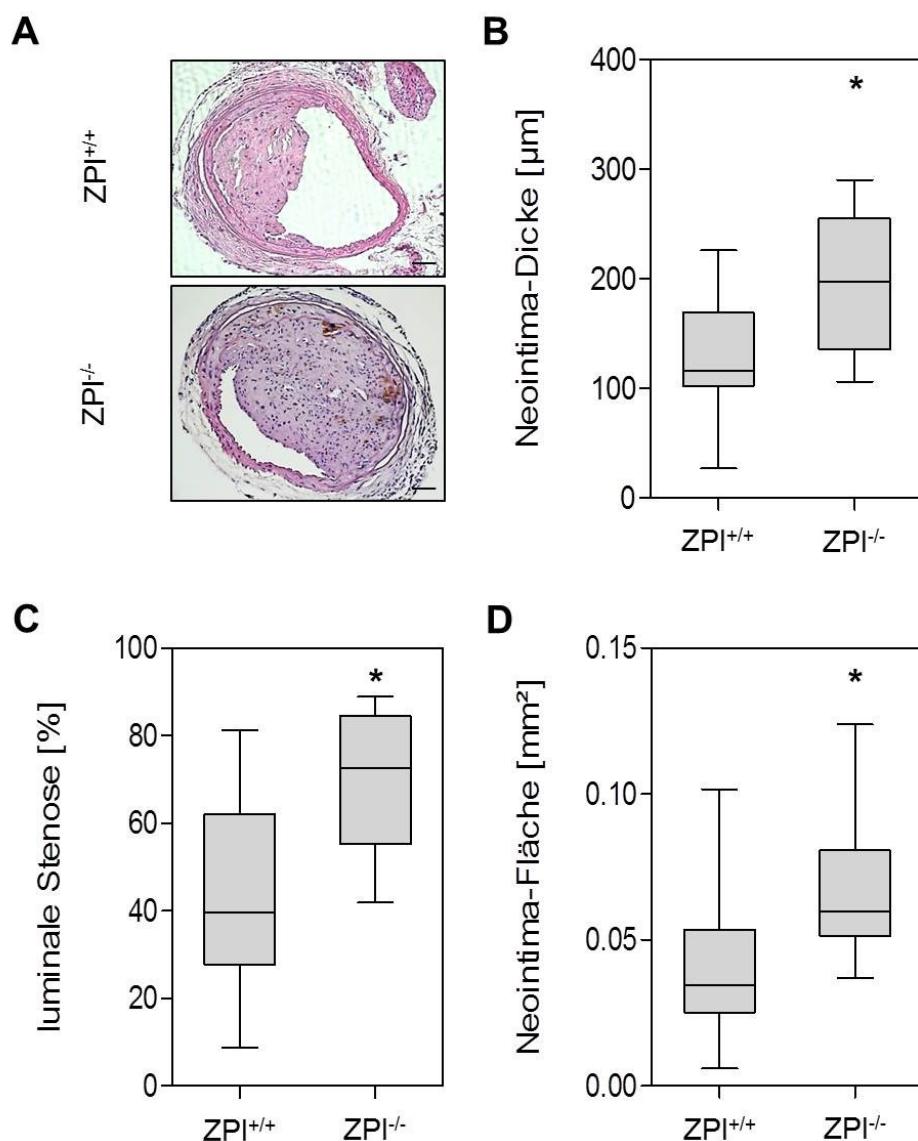
Da für das Fehlen von PZ bereits prothrombotische Erscheinungen *in vivo* berichtet wurden [Butschkau *et al.* 2014a] und der *scratch*-Assay für ZPI eine leicht inhibitorische Tendenz vermuten ließ, wurde in einem Tierexperiment der Einfluss einer ZPI-Defizienz auf die Thrombusbildung untersucht.

Zur Evaluierung wurde das Neointima-Läsionsmodell der Maus genutzt. Hierbei wurde durch lokale Applikation von FeCl<sub>3</sub> auf der linken A. carotis ein inflammatorischer Reiz gesetzt. Durch Umbauprozesse in der Intima kam es zur Bildung einer Neointima. In Abhängigkeit von der Stärke des Reizes resultierte dieser Umbau in einem Verschluss der A. carotis. Durch morphometrische Erfassung des verbliebenen Lumens in histologisch aufgearbeiteten Gefäßquerschnitten wurde der Stenosegrad der A. carotis bestimmt. Neben dem verbliebenen Lumen wurden ebenfalls die Neointimadicke und –fläche ermittelt. Die Untersuchungen wurden in ZPI<sup>-/-</sup>- und PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren sowie den entsprechenden Wildtypwurfgeschwistern durchgeführt.

In Abbildung 8 A sind zwei repräsentative Beispilaufnahmen eines histologisch aufgearbeiteten und anschließend HE-gefärbten Gefäßquerschnittes der A. carotis von jeweils einer ZPI<sup>-/-</sup>-Maus und einer ZPI<sup>+/+</sup>-Maus gezeigt. Zellkerne stellten sich in dieser Färbung dunkel-lila bis bläulich und das Zytoplasma hellrosa bis hell-violett dar. Deutlich zu erkennen ist, dass die luminale Stenose in der A. carotis der ZPI<sup>+/+</sup>-Mäuse (oberes Bild, Abbildung A) deutlich geringer war als der Stenosegrad der A. carotis der ZPI-defizienten Tiere (unteres Bild, Abbildung A).

Die Abbildungen B bis D zeigen die quantitativen Auswertungen einzelner Parameter. So war in allen Graphen zu erkennen, dass das Ausmaß der Neointimbildung in den Carotiden der ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu den ZPI<sup>+/+</sup>-Tieren deutlich stärker war. Die Dicke der neu gebildeten Intima war in den ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren um 81 µm größer als in der Kontrollgruppe (116 µm vs. 197 µm, p<0,01). Ein ähnliches Ergebnis konnte bei der Messung der Neointima-Fläche gefunden werden. Auch hier übertrafen die Werte der ZPI<sup>-/-</sup>-Tiere mit einem Median von 0,056 µm<sup>2</sup> die Werte der ZPI<sup>+/+</sup>-Tiere (0,034 µm<sup>2</sup>, p<0,01). Als Konsequenz einer erhöhten Neointimadicke und –fläche ergab sich eine luminale Stenose.

In Abbildung 8 C ist die Stenose sowohl für die ZPI<sup>-/-</sup>-Tiere als auch für die Wildtypwurfgeschwister dargestellt. Mit einer statistischen Signifikanz von  $p<0,01$  zeigte sich, dass die ZPI-defizienten Tiere mit einem Median von 72,5 % deutlich stärkere Stenosen der A. carotis als die ZPI<sup>+/+</sup>-Tiere zeigten (39,4 %,  $p<0,01$ ). In einem Fall verschloss sich das Gefäß sogar vollständig (100 %).

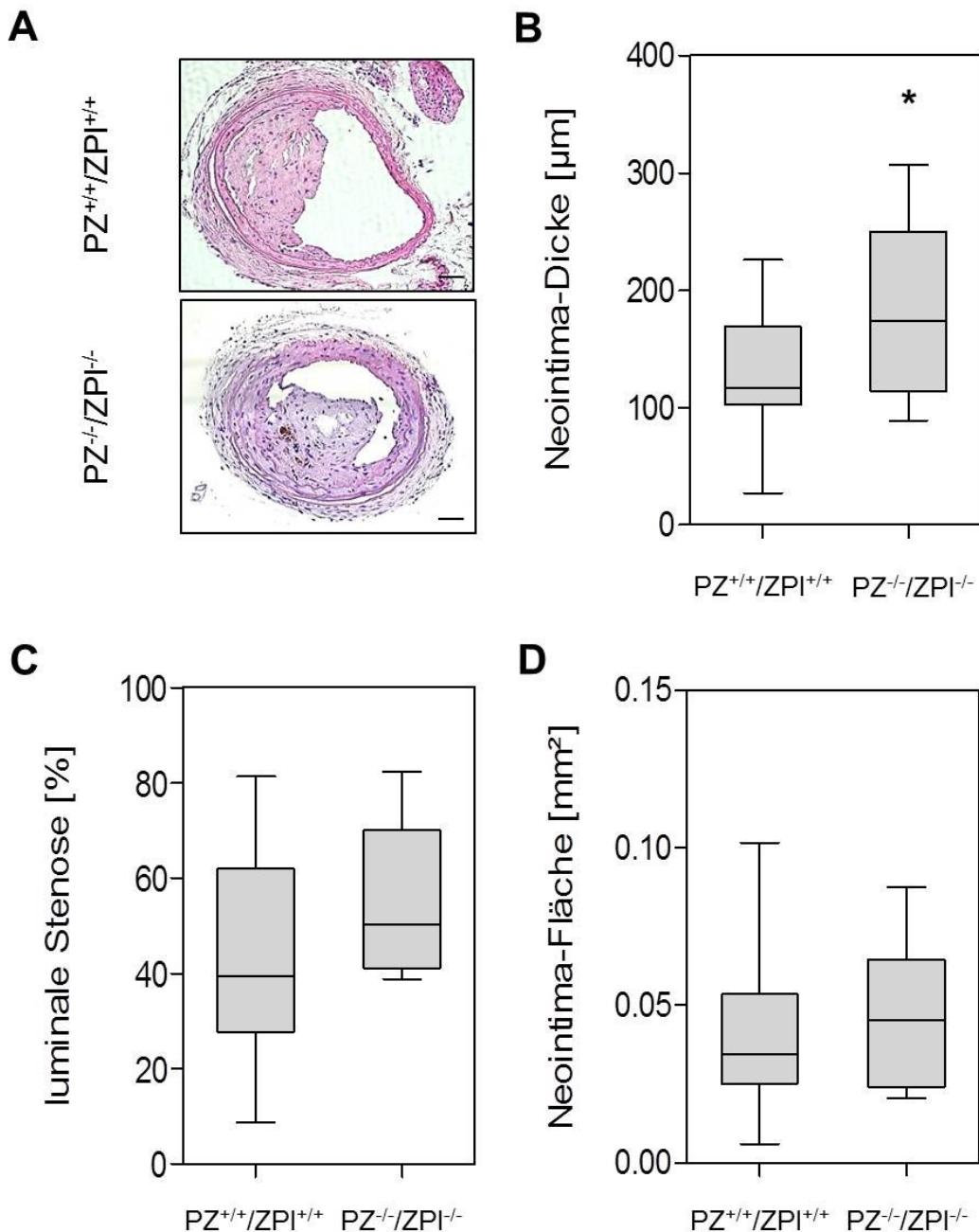


**Abbildung 8. Morphometrische Analyse der Thrombusbildung in der A. carotis ZPI<sup>-/-</sup>- und ZPI<sup>+/+</sup>-Mäusen nach Applikation von 10%-igem Eisen-(iii)-Chlorid.** (A) Morphometrische Analyse von HE-gefärbten Gefäßquerschnitten der A. carotis von ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren und deren Wildtypwurfgeschwistern (ZPI<sup>+/+</sup>). Vergrößerung: 20-fach. (B) Quantitative Erfassung der Neointima-Dicke. (C) Quantitative Erfassung der luminalen Stenose. (D) Quantitative Erfassung der Neointimafläche. Boxplotdarstellung mit 25 %-igem und 75 %-igem Perzentil. T-Test und Mann-Whitney Rank Sum Test, \* $p<0,01$  gegenüber Wildtyp-Maus, n=12-16.

### 5.1.3. Einfluss einer PZ/ZPI-Defizienz auf die lumenale Stenose der *A. carotis*

Da sowohl für PZ- als auch für ZPI-defizierte Mäuse eine Verstärkung der luminalen Stenose *in vivo* dargestellt werden konnte, war interessant zu untersuchen, ob eine PZ/ZPI-Defizienz ähnliche oder sogar starke Effekte verursachen würde. In Abbildung 9 A sind zwei repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung von Gefäßquerschnitten eines PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/−</sup>- (oben) und eines PZ<sup>−/−</sup>/ZPI<sup>−/−</sup>-Tieres gezeigt. Deutlich zu erkennen ist die Umfangsvermehrung des Thrombus in der PZ<sup>−/−</sup>/ZPI<sup>−/−</sup>-Maus (unten). Die quantitative Auswertung der Neointimadicke (Abbildung B) ergab einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen (116 µm vs. 174 µm, p<0,05).

Die lumrale Stenose war in der PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/−</sup>-Gruppe niedriger als in der PZ<sup>−/−</sup>/ZPI<sup>−/−</sup>-Gruppe (39,4 % vs. 50,23 %), dennoch konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden (Abbildung 9 C). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Evaluierung der Neointima-Fläche (0,034 µm<sup>2</sup> vs. 0,045 µm<sup>2</sup>, Abbildung 9 D).



**Abbildung 9. Morphometrische Analyse der Thrombusbildung in der A. carotis von PZ<sup>-/+</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>- und PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Mäusen nach Applikation von 10%-igem Eisen-(iii)-Chlorid.** (A) Morphometrische Analyse von HE-gefärbten Gefäßquerschnitten der A. carotis von PZ<sup>-/+</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Mäusen und deren Wildtypwurfgeschwistern. Vergrößerung: 20-fach. (B) Quantitative Erfassung der Neointima-Dicke. (C) Quantitative Erfassung der luminalen Stenose. (D) Quantitative Erfassung der Neointimafläche. Darstellung: Boxplot mit 25 %-igem und 75 %-igem Perzentil. T-Test, \*p<0,05 gegenüber PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Tieren, n=8-16.

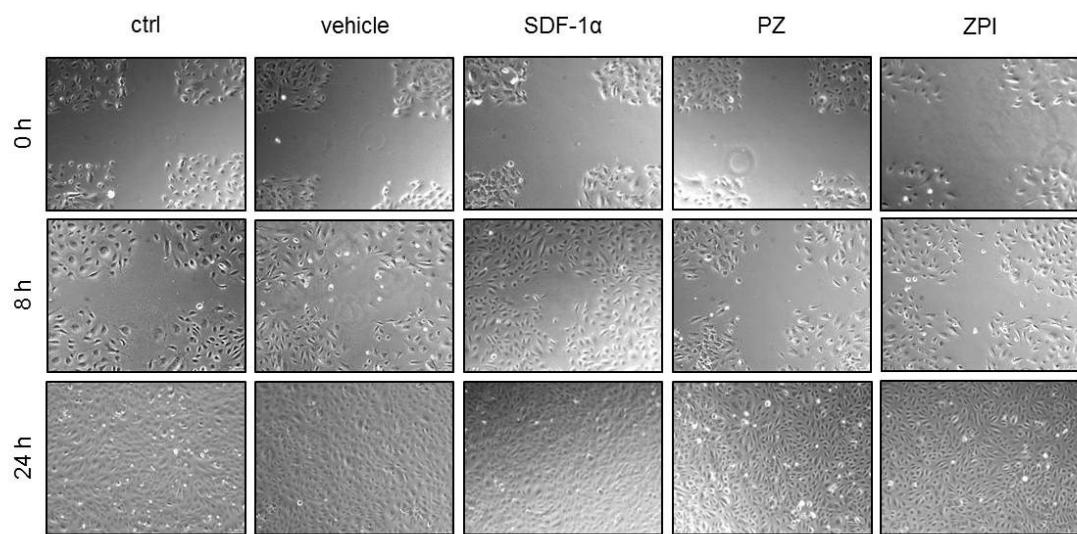
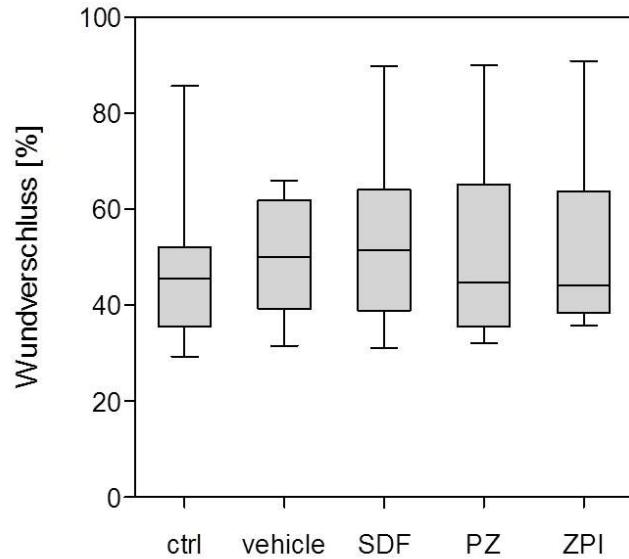
## 5.2. Einfluss von ZPI auf die Angiogenese

Da in vorrangingen Arbeiten bereits gezeigt werden konnte, dass PZ einen positiven Einfluss auf die Angiogenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu haben scheint, wurde in einem zweiten Arbeitspaket die Fragestellung bearbeitet, inwiefern ZPI die Angiogenese beeinflusst.

### 5.2.1. Einfluss von ZPI auf die Migration von humanen Endothelzellen *in vitro*

Die Migration von Endothelzellen stellt einen initialen Schritt in der Blutgefäßneubildung dar. Um den Einfluss der beiden Testsubstanzen PZ und ZPI zu untersuchen, wurde der scratch-Assay auch für die Endothelzellen angewendet. Das experimentelle Setup entspricht dem der glatten Muskelzellen.

In Abbildung 10 A sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellkulturen für die Zeitpunkte 0, 8 und 24 h dargestellt. Deutlich abgezeichnete Zellgrenzen waren zu Beginn sichtbar, die über die 8 h bis hin zu 24 h verschwanden. Eine Abnahme der zellfreien Fläche innerhalb von 24 h war deutlich in allen Versuchsansätzen zu erkennen. Die stärkste Migration wurde in der Positivkontrolle (SDF-1 $\alpha$ ) mit 51,5 % beobachtet. Der Vehicle-Kontrollansatz (Medium plus Trägersubstanz) zeigte einen Verschluss von 50,0 %, dicht gefolgt von der Kontrolle (nur Medium) mit 45,5 %. Ebenfalls sehr dicht bei einander lagen die Versuchsansätze mit PZ und ZPI (44,7 % und 44,1 %) (Abbildung 10 B). Nach 24 h Inkubation war in allen Versuchsansätzen ein konfluenter Zellrasen zu beobachten, die Kreuze waren vollständig zugewachsen. Signifikante Unterschiede wurden nicht erreicht.

**A****B**

**Abbildung 10. Wundverschluss von humanen Endothelzellen nach Applikation von SDF-1 $\alpha$ , PZ und ZPI.**  
**(A)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des Wundverschlusses der HUVECs nach 0 h, 8 h und 24 h in 50-facher Vergrößerung. **(B)** Graphische Erfassung des Wundverschlusses nach 8 h. Boxplotdarstellung mit 25%-igem und 75%-igem Perzentil, ANOVA on Ranks, n=8.

### 5.2.2. Einfluss von ZPI auf die Netzwerkbildung von humanen Endothelzellen *in vitro*

Um den bereits beschriebenen Einfluss von PZ auf die Netzwerkbildung zu bestätigen und mögliche Effekte von ZPI zu untersuchen, wurde der *tube-formation-Assay* eingesetzt. Dieser Assay beruht auf der Fähigkeit von Endothelzellen, nach Aussaat auf einer extrazellulären Matrix zweidimensionale Netzwerke zu bilden [Arnaoutova *et al.* 2009; Arnaoutova *et al.* 2010; Kubota *et al.* 1988; Walter-Yohrling *et al.* 2004]. Diese Netzwerke können als Vorläufer von Blutgefäßen angesehen werden.

Das Ausmaß der Netzwerkbildung gibt somit eine Aussage über die Fähigkeit von Substanzen, die Angiogenese zu beeinflussen. Da Endothelzellen von Natur aus solche Netzwerke bilden, wurden unbehandelte Zellen als Referenz verwendet. Die Endothelzellen wurden zusammen mit den entsprechenden Substanzen (Medium, Vehicle, VEGF, PZ und ZPI) für 8 h inkubiert. Anschließend wurden von den Zellen lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht und die Netzwerke hinsichtlich kumulativer Netzwerklänge (Summe aller Verbindungen innerhalb eines Gesichtsfeldes) und Knotenpunkte verglichen.

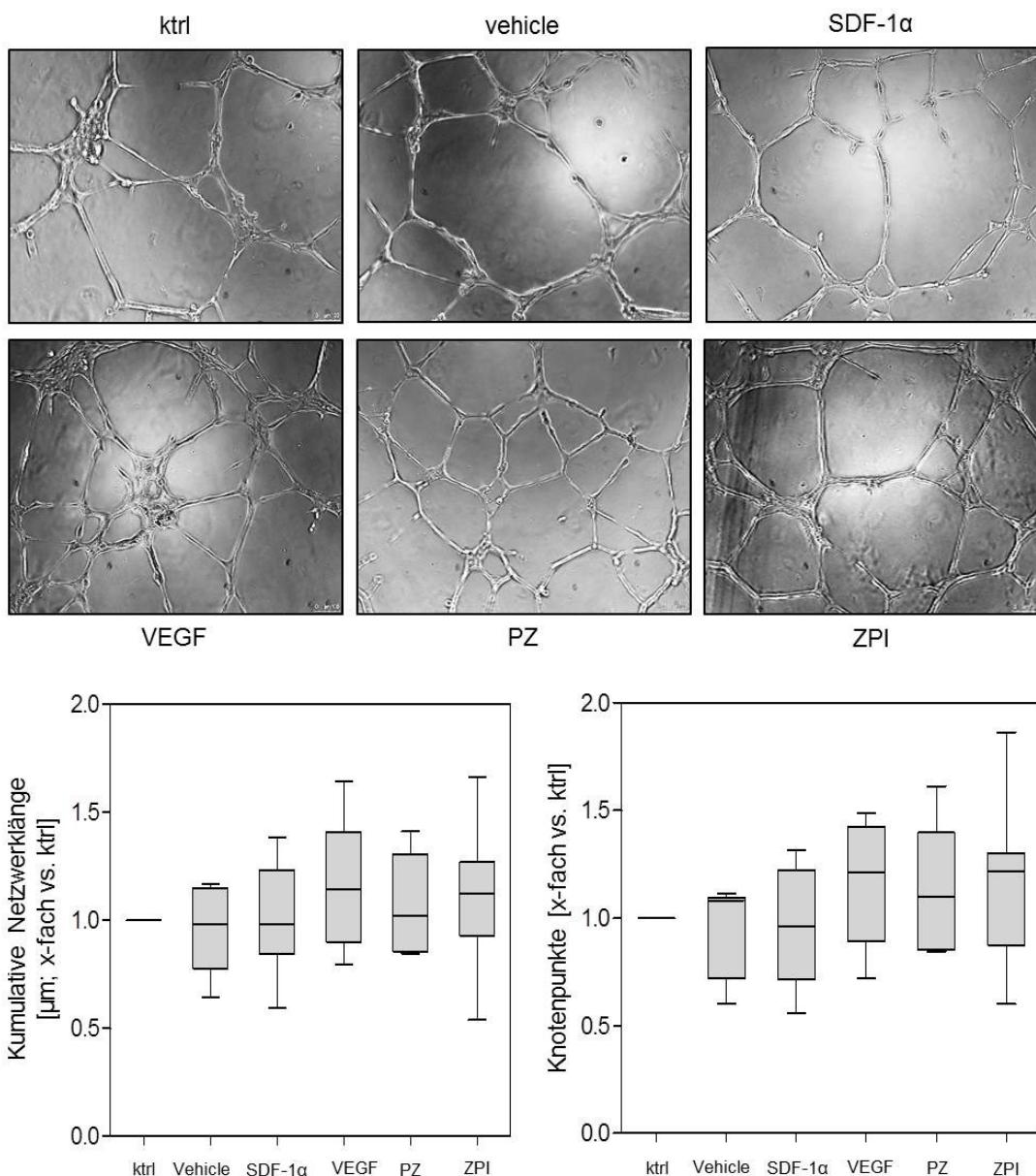
In Abbildung 11 A sind die Aufnahmen der verschiedenen Ansätze nach 8 h gezeigt. Deutlich zu erkennen waren die Zellverbindungen und die Knotenpunkte in allen Ansätzen.

Die quantitative Erfassung der genannten Parameter ist in der Abbildung 11 B dargestellt. Angegeben ist hier die x-fache kumulative Netzwerklänge beziehungsweise Knotenpunktanzahl pro Gesichtsfeld bezogen auf den Kontrollansatz (nur Medium). Zu erkennen war, dass sowohl der Vehicle-Ansatz als auch die SDF-1 $\alpha$ -Kontrolle den Medium-Kontrollwert nicht überstiegen (Vehicle 0,98 und SDF-1 $\alpha$  0,98 vs. ktrl 1). VEGF als bekannter Induktor der Angiogenese forcierte die Netzwerkbildung hingegen um das 1,15-fache gegenüber der Medium-Kontrolle. Eine PZ-Stimulation bewirkte keinerlei positiven Einfluss auf die Netzwerklänge (PZ 1,0 vs. ktrl 1,0). Eine Inkubation mit ZPI hingegen zeigte einen deutlichen Anstieg der kumulativen Netzwerklänge im Vergleich zu der Medium-Kontrolle und erreichte sogar annähernd das Niveau des Angiogenese-Induktors VEGF (ZPI 1,12 vs. VEGF 1,15).

Hinsichtlich der Knotenpunkte ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Die stärksten Induktoren waren VEGF und ZPI (1,21 und 1,22 vs. ktrl). PZ erreichte zwar nicht den Wert von ZPI oder

VEGF, lag aber dennoch mit 1,10-fach mehr Knotenpunkten über dem Wert der Medium-Kontrolle.

Die Vehicle-Kontrolle erreichte knapp einen Wert über der Medium-Kontrolle, SDF-1 $\alpha$  hingegen bewirkte einen leicht negativen (Vehicle 1,08 und SDF-1 $\alpha$  0,96 vs. ktrl 1). Die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen den Gruppen sind nicht groß genug, um auszuschließen, dass der Unterschied aufgrund der Stichprobenvariabilität zustande kommt, die Unterschiede sind demnach nicht signifikant. Die Aussage gilt sowohl für die Netzwerklänge als auch die Auswertung der Knotenpunktanzahl.



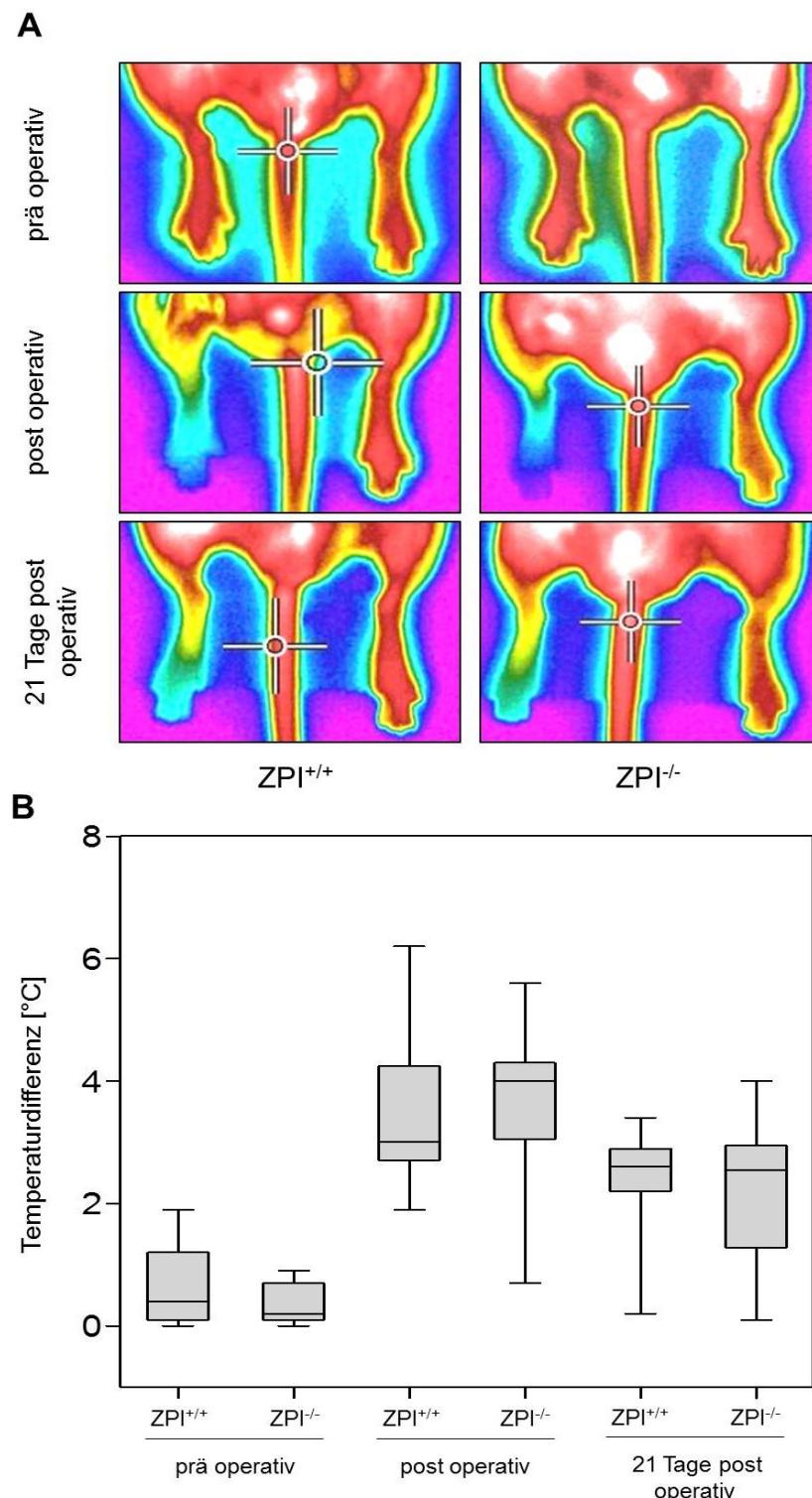
**Abbildung 11. Netzwerkformation von humanen Endothelzellen *in vitro*.** **(A)** Repräsentative Abbildungen der endothelialen Netzwerkbildung von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) nach 8 h Inkubation mit Medium (ktrl), Trägersubstanz (vehicle), SDF-1 $\alpha$ , VEGF, PZ oder ZPI. **(B)** Quantitative Zusammenfassung der kumulativen Netzwerklänge (links) und der Knotenpunkte (rechts) pro Gesichtsfeld. Boxplotdarstellung mit 25%-igem und 75%-igem Perzentil, Varianzanalyse (One Way ANOVA), n=7.

### 5.2.3. Einfluss von ZPI auf die Reperfusion nach Ischämie

Zur Bestimmung des Einflusses einer ZPI-Defizienz auf die Revaskularisierung wurde das Hinterlaufischämiemodell der Maus in ZPI<sup>+/−</sup>-Tieren als auch den entsprechenden Wildtypwurfgeschwistern herangezogen. Da bei Mäusen die Oberflächentemperatur stark von der Perfusion des entsprechenden Körperteils abhängt, kann die Thermografie der Hinterläufe Rückschlüsse auf das Ausmaß der Reperfusion geben [Gul *et al.* 2009]. Durch die Temperaturbestimmung zu bestimmten Zeitpunkten (prä und post operativ, sowie nach 21 Tagen post operativ) konnten somit das Ausmaß der Reperfusion zwischen zwei Versuchsgruppen ermittelt und verglichen werden. Dabei wurde der Temperaturunterschied zwischen dem operierten und dem gesunden Hinterlauf zu den genannten drei Zeitpunkten innerhalb einer Versuchsgruppe rechnerisch bestimmt.

In Abbildung 12 A sind repräsentative thermographische Aufnahmen der Hinterläufe beider Versuchsgruppen zu den drei Zeitpunkten (prä, post und 21 Tage post operativ) dargestellt. Eine tiefrote Färbung zeigt einen sehr warmen und lila einen kalten (in diesen Fällen RT) Bereich an. Gut zu erkennen war, dass vor dem operativen Eingriff alle Versuchstiere gleich warme Hinterläufe aufwiesen. Direkt nach dem Entfernen der *A. femoralis* war deutlich zu sehen, dass der operierte Hinterlauf infolge der verringerten Durchblutung einen erkennbaren Farbumschlag von Rot auf Blau entwickelte. Nach 21 Tagen post operativ zeigte sich erneut eine farbliche Veränderung von blau zu gelb im operierten Hinterlauf. Die nicht operierten Pfoten verblieben stets bei einer roten Färbung in beiden Gruppen. Das darunterliegende Boxplot-Diagramm (Abbildung 12 B) stellt die Temperaturdifferenz zwischen dem ischämischen und dem nicht ischämischen Hinterlauf für beide Gruppen zu den genannten 3 Zeitpunkten dar. Durch Erfassung der Temperaturen vor der Operation konnte festgestellt werden, dass Temperaturdifferenzen zwischen beiden Hinterläufen in beiden Versuchsgruppen kaum vorhanden waren (ZPI<sup>+/+</sup> 0,4 °C vs. ZPI<sup>+/−</sup> 0,2 °C, Abbildung 12 B), die Füße also gleich warm waren. Zum Zeitpunkt post operativ zeigte sich ein deutlich anderes Bild: Die ZPI<sup>+/+</sup>-Tiere wiesen eine Temperaturdifferenz der Hinterläufe von 3,0 °C auf, die ZPI<sup>+/−</sup>-Tiere hingegen einen Wert von 4,0°C. Die Mediane der Testgruppen zeigten demnach einen Unterschied von 1,0 °C. Dieser Unterschied ist nach 21 Tagen post operativ nicht mehr zu verzeichnen.

Die Versuchsgruppen erreichten bis zu diesem Zeitpunkt ein gleiches Differenzniveau ( $ZPI^{+/+}$  2,60 °C vs.  $ZPI^{-/-}$  2,65 °C). Alle Ergebnisse waren nicht signifikant.



**Abbildung 12. Thermografie im Hinterlaufschämiemodell von  $ZPI^{+/+}$  und  $ZPI^{-/-}$ -Mäusen. (A)** Thermografieaufnahmen der Hinterpfoten prä, post und 21 Tage post operativ, rote Areal haben eine hohe Temperatur, blaue eine niedrige. **(B)** Quantitative Erfassung der Temperaturunterschiede zwischen dem operierten und nicht operierten Hinterlauf zu den genannten Zeitpunkten beider Versuchsgruppen in der Boxplotdarstellung mit 25 %-igem und 75%-igem Perzentil, Mann-Whitney Rank Sum Test und t-Test, n=11-16.

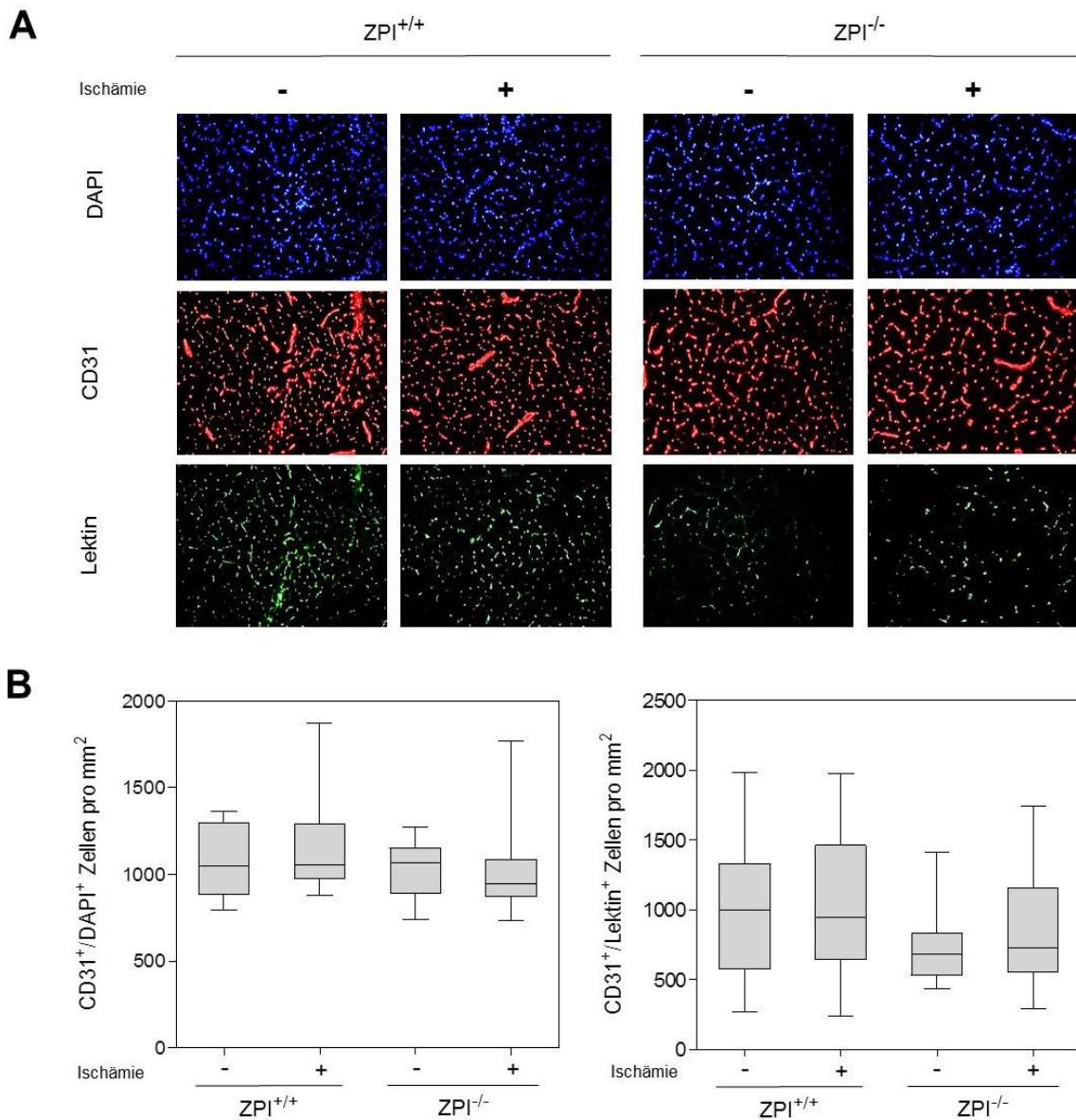
#### 5.2.4. Einfluss von ZPI auf die Kapillardichte im ischämischen Hinterlauf

Neben einer thermographischen Auswertung wurde nach 21 Tagen post operativ der *M. gastrocnemius* sowohl des ischämischen als auch des nicht ischämischen Hinterlaufs von allen Mäusen entnommen, histologisch aufgearbeitet und analysiert. Dabei wurden die Zellkerne mit einer DAPI-Färbung (blau) und Endothelzellen durch Markierung des Oberflächenantigens CD31 (rot) angefärbt. Eine intrakardiale Injektion des FITC-markierten Farbstoffs Lektin vor der Tötung der Tiere erlaubte eine Darstellung von perfundierten Kapillaren (grün). Funktionelle Gefäße stellen sich somit in der histologischen Aufarbeitung grün dar [Gee *et al.* 2003].

Für die Auswertung wurden pro Tier bis zu 12 Aufnahmen (je nach Qualität der Schnitte) aus 4 verschiedenen Schnittebenen angefertigt und DAPI/CD31-positive Zellen zum einen und CD31/Lektin-positive Zellen zum anderen quantitativ erfasst. Durch eine Positivität von CD31 und DAPI konnten Artefakte ausgeschlossen und nur Endothelzellen in die Betrachtung einbezogen werden. Die ausgezählten Zellen werden als absolute Anzahl/mm<sup>2</sup> angegeben (Abbildung 13 A).

In Abbildung A sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Hinterläufe in den Färbungen mit DAPI, CD31 und Lektin für die ischämischen und nicht ischämischen Hinterläufe beider Genotypen gezeigt. Optisch war hierbei kein Unterschied zwischen den defizienten Tieren und den Wildtypwurfgeschwistern auszumachen. Die Abbildung 13 B stellt die quantitative Erfassung der DAPI/CD31- (links) beziehungsweise der CD31/Lektin-positiven Zellen/mm<sup>2</sup> Gewebschnitt dar. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die nicht ischämischen Hinterläufe beider Versuchsgruppen im Median annährend die gleiche Anzahl von Kapillaren/mm<sup>2</sup> zeigten (ZPI<sup>+/+</sup> 1050 CD31/DAPI-positive Zellen vs. ZPI<sup>-/-</sup> 1024 CD31/DAPI-positive Zellen/mm<sup>2</sup>). Betrachtet man die ischämischen Hinterläufe, so wiesen die ZPI<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu den ZPI<sup>+/+</sup>-Tieren eine geringere Anzahl von CD31/DAPI-positiven Zellen auf (Abbildung 13 B, ZPI<sup>+/+</sup> 1166 vs. ZPI<sup>-/-</sup> 948 CD31/DAPI-positive Zellen/mm<sup>2</sup>). Innerhalb des ZPI<sup>-/-</sup> Genotyps fand sich ein Unterschied in der Zelldichte in beiden Hinterläufen von 18 Zellen/mm<sup>2</sup> (1024 CD31/DAPI-positive Zellen/mm<sup>2</sup> nicht ischämisches Bein von ZPI<sup>-/-</sup> vs. 1006 CD31/DAPI-positive Zellen/mm<sup>2</sup> ischämisches Bein von ZPI<sup>-/-</sup>). Beide Unterschiede sind statistisch nicht signifikant und nur sehr gering. Funktionelle Kapillaren wurden durch intrakardiale Injektion mit FITC-markiertem Lektin

und der gleichzeitigen Positivität von CD31 dargestellt. Abbildung 13 B (links) stellt die quantitative Erfassung der CD31/Lektin-positiven Zellen/mm<sup>2</sup> in ZPI<sup>-/-</sup> und ZPI<sup>+/+</sup>-Tieren dar. Auch hier zeigte sich, dass innerhalb eines Genotyps die absoluten Zellzahlen/mm<sup>2</sup> sehr dicht beieinanderlagen (ZPI<sup>+/+</sup> 995 vs. 948 CD31/Lektin-positiven Zellen/mm<sup>2</sup> und ZPI<sup>-/-</sup> 683 vs. 726 CD31/Lektin-positiven Zellen/mm<sup>2</sup>, nicht ischämischer vs. ischämischer Hinterlauf). Bei Betrachtung der ischämischen Hinterläufe beider Versuchsgruppen konnte man zwar einen Unterschied im Hinblick auf die funktionellen Kapillaren feststellen, dennoch war dieser nicht signifikant (ZPI<sup>+/+</sup> 948 vs. ZPI<sup>-/-</sup> 726 CD31/Lektin-positiven Zellen/mm<sup>2</sup>).

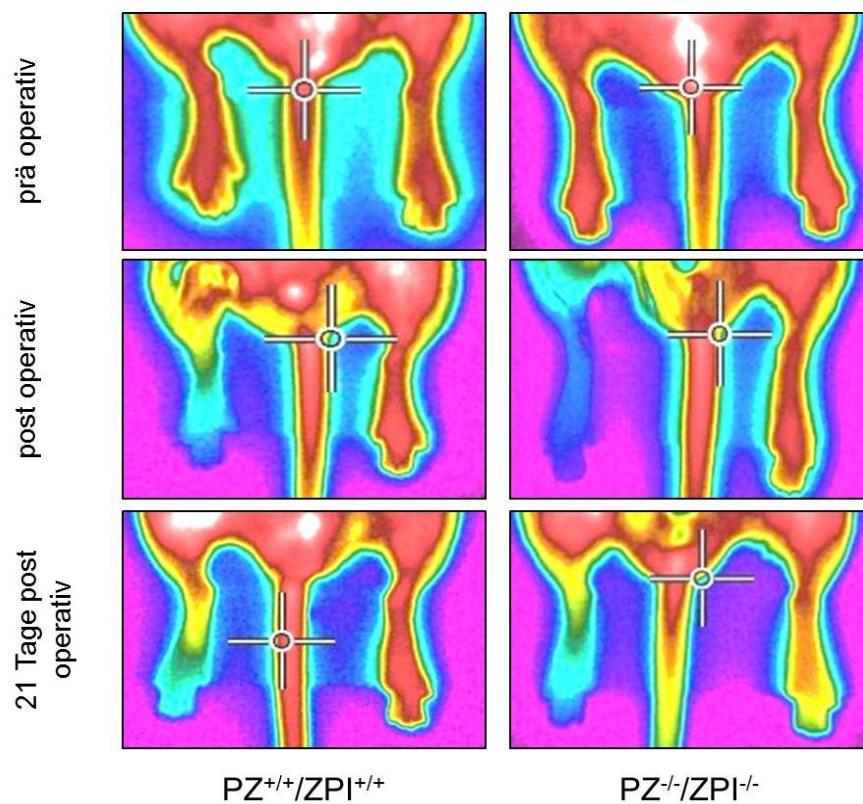
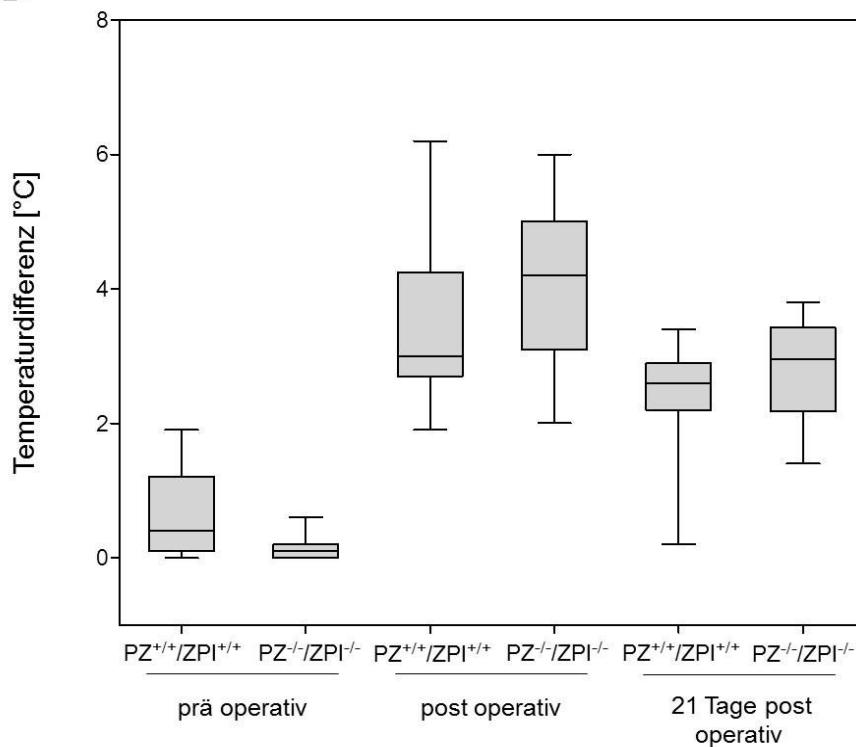


**Abbildung 13. Immunhistochemische Auswertung des *M. gastrocnemius* im Hinterlaufischämiemodell von  $ZPI^{-/-}$ - und  $ZPI^{+/+}$ -Tieren.** (A) Graphische Darstellung von Schnittsegmenten des *M. gastrocnemius* bei 200-facher Vergrößerung, blau (DAPI, Kernfärbung), rot (CD31, Endothelzellen), grün (intravasale Lektinfärbung, perfundierte Kapillaren). (B) Quantitative Erfassung der CD31/DAPI-positiven Zellen/mm<sup>2</sup>. Rechts: Darstellung der Endothelzelldichte, links: Darstellung der perfundierten Kapillaren im Muskelquerschnitt, Boxplotdarstellung mit 25 %-igem und 75 %-igem Perzentil, Mann-Whitney Rank Sum Test und verbundener und unverbundener t-Test, n=10-17.

### 5.2.5. Einfluss einer PZ/ZPI-Defizienz auf die Reperfusion nach Ischämie

Da in vorangegangenen Untersuchungen bereits gezeigt werden konnte, dass PZ-defiziente Tiere eine deutlich verminderte Reperfusion im Vergleich zu Wildtypieren aufwiesen, wurde weiterführend nicht nur der Einfluss einer ZPI-Defizienz, sondern auch der einer PZ/ZPI-Defizienz untersucht. Hierfür fand ebenfalls wie bereits beschrieben das Modell der chronischen Hinterlaufischämie der Maus Anwendung. In Abbildung 14 A sind die repräsentativen Thermografieaufnahmen zu den distinkten Zeitpunkten dargestellt. Zu Beginn war durch eine einheitliche Rotfärbung aller Hinterläufe deutlich erkennbar, dass keine Unterschiede zwischen den Hinterläufen bestanden. Nach der Operation signalisierte eine Blaufärbung die Reduktion der Temperatur im ischämischen Hinterlauf. Das nicht operierte Bein war weiterhin rot gefärbt. Nach 21 Tagen post operativ zeigte das operierte Bein zwar immer noch eine bläuliche Färbung, dennoch war eine Zunahme der gelben Bereiche sichtbar, welche eine Anhebung der Temperatur andeutete. Zu erkennen war weiterhin, dass der Hinterlauf des Wildtypieres weniger blau ist als der Hinterlauf des PZ/ZPI-defizienten Tieres.

In Abbildung 14 B sind quantitativ die Temperaturdifferenzen zu den bereits beschriebenen Zeitpunkten in der Boxplotdarstellung aufgeführt. Die Messung vor der Operation zeigte keinen Temperaturunterschied zwischen den Hinterläufen der Tiere. Nach dem Eingriff konnte in beiden Versuchsgruppen eine Reduktion der Temperatur im operierten Hinterlauf (kenntlich gemacht durch einen größeren Temperaturunterschied zwischen ischämischem und nicht ischämischem Hinterlauf einer Maus) dargestellt werden ( $PZ^{-/-}/ZPI^{-/-}$  4,2 °C vs.  $PZ^{+/+}/ZPI^{+/+}$  3 °C). Dieser Unterschied erwies sich allerdings als nicht signifikant. Nach 21 Tagen post operativ reduzierten sich die Temperaturunterschiede in beiden Versuchsgruppen, allerdings mit leicht unterschiedlichem Ausmaß: Die  $PZ^{-/-}/ZPI^{-/-}$ -Tiere erreichten eine Temperaturdifferenz von 2,9°C und die  $PZ^{+/+}/ZPI^{+/+}$ -Tiere von 2,6 °C (Abbildung 14 B).

**A****B**

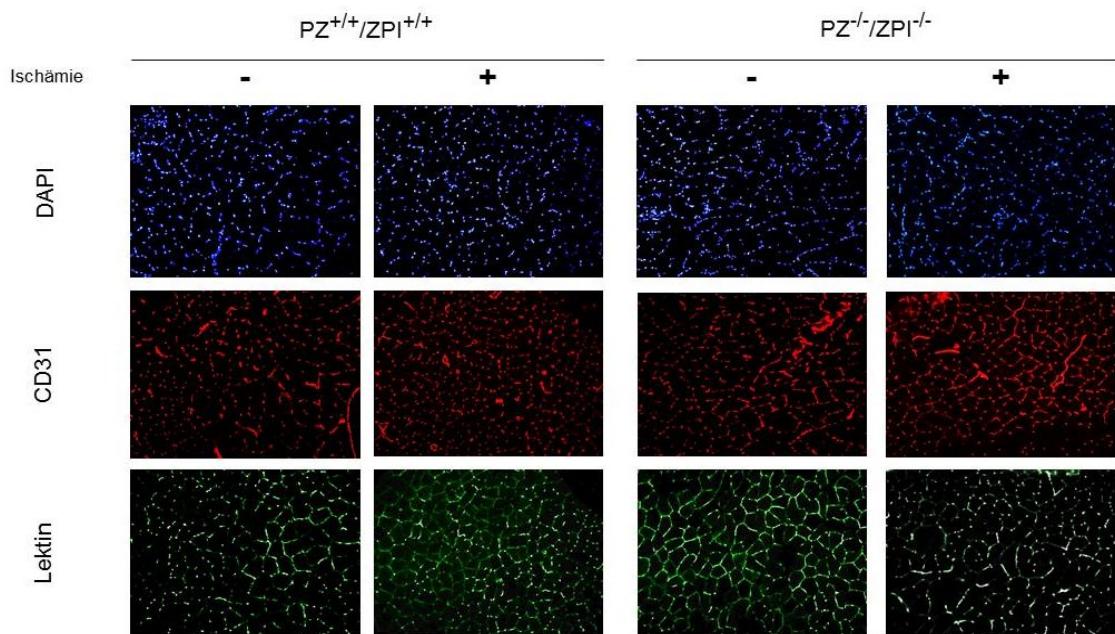
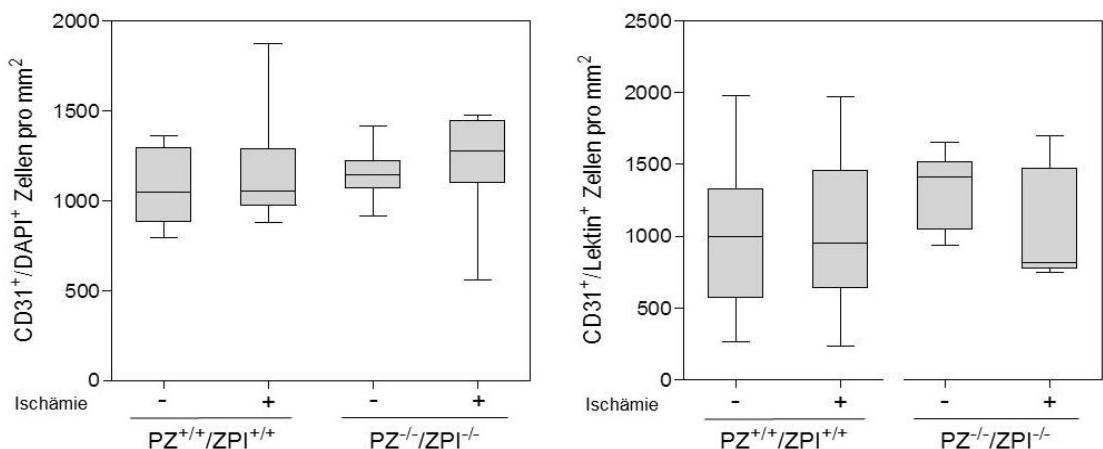
**Abbildung 14. Thermografie im Hinterlaufschämiemodell von  $PZ^{+/+}/ZPI^{+/+}$ - und  $PZ^{-/-}/ZPI^{-/-}$ -Mäusen.**  
**(A)** Thermografieaufnahmen der Hinterpfoten prä-, post und 21 Tage post operativ, rote Areal haben eine hohe Temperatur, blaue eine niedrige. **(B)** Quantitative Erfassung der Temperaturunterschiede zwischen dem operierten und nicht operierten Hinterlauf zu den genannten Zeitpunkten beider Versuchsgruppen in der Boxplotdarstellung mit 25 %-igem und 75 %-igem Perzentil, Mann-Whitney Rank Sum Test und t-Test, n=10-15.

### 5.2.6. Einfluss einer PZ/ZPI-Defizienz auf die Kapillardichte im ischämischen Hinterlauf

Nach 21 Tagen post operativ wurde auch bei diesen Versuchsgruppen der *M. gastrocnemius* entnommen und histologisch aufgearbeitet. Die Abbildung 15 A zeigt repräsentative Aufnahmen der Muskelquerschnitte in den 3 Färbungen für DAPI (blau, Kernfärbung), CD31 (rot, Oberflächenantigen auf Endothelzellen) und intrakardial injiziertes FITC-markiertes Lektin (grün, Darstellung funktioneller Kapillaren). Anhand der Fluoreszenzaufnahmen lässt sich bereits feststellen, dass die Lektin-Färbung in dem nicht ischämischen Hinterlauf der PZ/ZPI-defizienten Tiere am stärksten ausgeprägt war. In der quantitativen Auswertung (Abbildung 15 B) konnte gezeigt werden, dass sich die DAPI/CD31-Positivität in den PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Tieren in beiden Hinterläufen nicht voneinander unterschied (1050 DAPI/CD31-positive Zellen/mm<sup>2</sup> gesundes Bein vs. 1055 DAPI/CD31-positive Zellen/mm<sup>2</sup> im ischämischen Hinterlauf). Bei den defizienten Tieren ergab sich eine andere Tendenz. Obwohl keine statistische Signifikanz ermittelt werden konnte, ist ersichtlich, dass die Mediane der ischämischen Hinterläufe etwas über dem Median des nicht ischämischen Hinterlaufs lagen (1276 vs. 1142 CD31/DAPI-positive Zellen/mm<sup>2</sup>, Abbildung 15 B, linkes Diagramm). Vergleicht man zwischen den beiden Versuchsgruppen jeweils das ischämische und das nicht ischämische Bein miteinander, so kann festgestellt werden, dass in den gesunden Hinterläufen nur ein Unterschied von 92 Zellen/mm<sup>2</sup> bestand (1050 CD31/DAPI-positive Zellen/mm<sup>2</sup> PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Tier vs. 1142 CD31/DAPI-positive Zellen/mm<sup>2</sup> PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Tier). Die ischämischen Hinterläufe der defizienten Tiere weisen eine höhere Zelldichte auf als die PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Tiere (1055 CD31/DAPI-positive Zellen/mm<sup>2</sup> PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Tier vs. 1276 CD31/DAPI-positive Zellen/mm<sup>2</sup> PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Tier), allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

Die quantitative Auswertung der funktionellen Kapillaren (CD31/Lektin-Positivität) zeigte, dass eine induzierte Ischämie in den PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Tieren keinen Einfluss auf die Gefäßneubildung zu haben scheint (Abbildung 15 B rechtes Diagramm). In den PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren konnte hingegen ein signifikanter Unterschied in der funktionellen Kapillardichte ermittelt werden (1407 CD31/Lektin-positive Zellen/mm<sup>2</sup> im Kontrollbein vs. 816 CD31/Lektin-positive Zellen/mm<sup>2</sup>, p=0,049). Verglichen mit dem ischämischen Hinterlauf der PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Tieren verfügten die defizienten Tiere zwar über eine geringere

Kapillardichte, dennoch war dieser Unterschied nicht signifikant (948 CD31/Lektin-positive Zellen/mm<sup>2</sup> im PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Tier vs. 749 CD31/Lektin-positive Zellen/mm<sup>2</sup> PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Tier).

**A****B**

**Abbildung 15. Immunhistochemische Auswertung des *M. gastrocnemius* im Hinterlaufischämiemodell von PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>- und PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Mäusen.** (A) Graphische Darstellung von Schnittsegmenten des *M. gastrocnemius* bei 200-facher Vergrößerung, blau (DAPI, Kernfärbung), rot (CD31, Endothelzellen), grün (intravasale Lektinfärbung, funktionelle Kapillaren). (B) Quantitative Erfassung der CD31/DAPI-positiven Zellen/mm<sup>2</sup>. Mann-Whitney Rank Sum Test beziehungsweise verbundener und unverbundener t-Test, n=8-15.

## 6 Diskussion

### 6.1. PZ und ZPI in der Thrombose

Im Jahre 2015 starben laut Statistischem Bundesamt ca. 356.000 Menschen an den Folgen einer Herz-Kreislauferkrankung [Statistisches Bundesamt]. Diese Anzahl entspricht einem Anteil von mehr als 38 % an der gesamten Sterbeanzahl, wobei der Anteil der Frauen mit knapp 56 % deutlich über dem der Männer (44 %) lag [Statistisches Bundesamt]. Ursächlich sind atherosklerotische Veränderungen, welche vor allem in arteriellen Gefäßen die Entstehung einer Thrombose verursachen.

Die Pathologie der Atherosklerose wird heute als inflammatorische Erkrankung der Gefäßwände verstanden, welche durch die Beteiligung von zellulären und humoralen Faktoren des Immunsystems bedingt ist [Krychtiuk *et al.* 2013]. Die gefährlichste Komplikation einer Atherosklerose, beispielsweise in den Koronararterien, ist die Ruptur einer solchen atherosklerotischen Plaque. Die Exposition der hoch prokoagulativen Bestandteile dieser Plaques führt zu einer Aktivierung der Blutgerinnung und schlussendlich zu einer Thrombose mit Gefäßverschluss. Schon Virchow postulierte 1855 seine Trias zur Entstehung einer Thrombose [zusammengefasst in Bagot & Arya 2008]:

- i) Endothelialer Veränderungen (Veränderungen bzw. Schäden an der Gefäßwand)
- ii) Veränderungen in der Hämodynamik (Stase)
- iii) Hyperkoagulabilität (Verschiebung zugunsten einer Aktivierung der Gerinnungskaskade)

Die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in der Intima sind ein wichtiger Schritt in der Pathophysiologie der Entstehung einer Neointima. Daher ging den *in vivo* Untersuchungen ein *in vitro* Migrations-Assay mit glatten Muskelzellen mit PZ und ZPI Inkubation voraus. Um danach den Einfluss der Gerinnungsfaktoren PZ und ZPI auf die Neointimaproliferation und die daraus resultierende Thrombose unter den komplexen physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wurde das Carotisläsionsmodell der Maus angewendet. Dabei wurde auf eine ZPI-Defizienz fokussiert, da Untersuchungen zu einer isolierten PZ-Defizienz bereits von der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden

[Butschkau *et al.* 2013; Butschkau *et al.* 2014a; Butschkau *et al.* 2014b]. Komplettierend wurden parallel Tiere mit einer PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Defizienz in dem gleichen Modell untersucht.

#### **6.1.1. ZPI zeigt keinen Einfluss auf die Migration von glatten Muskelzellen *in vitro***

Humane und tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass nach Gefäßverletzungen ein Influx von inflammatorischen Zellen, glatten Muskelzellen und Myofibroblasten in die Intima zur Produktion von extrazellulärer Matrix führte [Glover *et al.* 2000 & 2002]. Diese Hyperplasie bedingt langfristig eine Stenose des betroffenen Gefäßareals.

In vergangenen Untersuchungen von Butschkau *et al.* wurde PZ als Inhibitor für die Migration humaner glatter Muskelzellen *in vitro* beschrieben [Butschkau *et al.* 2014a]. Da PZ und ZPI im Plasma als Komplex vorliegen [Tabatabi *et al.* 2001], stellte sich die Frage, ob ZPI alleine ebenfalls diesen Effekt erzielen kann. In den *in vitro* Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass ZPI nur einen sehr schwach hemmenden Einfluss auf die glatten Muskelzellen hatte. Da allerdings das Lösungsmittel selbst bereits eine sehr schwache Hemmung der Migration zeigte, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der Effekt durch die Trägersubstanz, nicht aber durch ZPI selbst, vermittelt wurde. Weiterhin konnte für PZ kein Effekt festgestellt werden. Da beide Proteine in Tris/HCL und NaCl gelöst sind und die Vehikelsubstanzen, PZ- und ZPI-ähnliche Werte in dem scratch-Assay erzielten, lag die Schlussfolgerung nahe, dass weder PZ noch ZPI einen Einfluss auf die Migration von humanen glatten Muskelzellen haben. Die Vergleichsdaten von Butschkau *et al.* [Butschkau *et al.* 2014a] bezüglich PZ beinhalteten keine Untersuchungen der Trägerlösungen Tris/HCL/NaCl von PZ, sodass auch hier ein möglicher Effekt seitens der Vehikelsubstanzen nicht ausgeschlossen werden kann.

Serpine interagieren mit und binden an eine Vielzahl von Faktoren. Daher werden sie mittlerweile nicht mehr nur als Inhibitor für einzelne Moleküle angesehen, sondern als komplexe biologische Moleküle eingestuft [Fortenberry 2015]. Besonders für Tumorzellen sind in der Literatur für verschiedene Serpine Effekte auf die Migration beschrieben worden. So konnte gezeigt werden, dass PAI-1 (SERPINE1) konzentrationsabhängig und bei kurzer Expositionsdauer eine promigratorische Wirkung auf humane glatte Muskelzellen *in vitro* hat [Degryse *et al.* 2004]. Für den Heparin-Kofaktor II sind ebenfalls promigratorische Eigenschaften auf Lungenkrebszellen beschrieben worden

[Liao *et al.* 2014]. Antithrombin hingegen scheint eine Migrationshemmung auf Tumorzellen *in vitro* zu haben [Luengo-Gil *et al.* 2016]. Aktuell sind nach unserem Wissen keine weiteren Untersuchungen zu dem Einfluss von PZ und ZPI auf die Migration von glatten Muskelzellen unternommen worden, sodass ein Abgleich mit anderen Ergebnissen bisher nicht möglich ist. Die stark unterschiedlichen Plasmakonzentrationen von PZ und die relativ selten gemessenen Werte von ZPI in den klinischen Studien machen *in vitro* Untersuchungen prinzipiell schwierig. Durch große interindividuelle Unterschiede in den Plasmakonzentrationen [Kemkes-Matthes & Matthes 1995b; Miletich & Broze 1987] beider Proteine ist es nicht möglich, einen distinkten Wert als physiologisch zu bezeichnen und diese Konzentration für die *in vitro*-Untersuchungen anzuwenden. Weiterhin ist nicht geklärt, inwiefern PZ und ZPI möglicherweise weitere Bindungspartner oder Interaktionspartner besitzen.

Um den Informationsgehalt der Ergebnisse zu vertiefen, müsste ein größerer Bereich von physiologisch beschriebenen Plasmakonzentrationen untersucht werden, möglicherweise zeichnet sich ein deutlicheres Ergebnis bei stark erhöhten beziehungsweise erniedrigten Konzentrationen ab.

#### **6.1.2. Eine ZPI-Defizienz führt zu einer erhöhten luminalen Stenose *in vivo***

Einen wichtigen Hinweis darauf, dass Gerinnungsfaktoren eine Rolle in der Atherogenese spielen, lieferte die Erkenntnis, dass in histologisch aufgearbeiteten Plaques nahezu alle Gerinnungsfaktoren nachgewiesen werden konnten [Krychtiuk 2013]. Daten aus Tierversuchen unterstützen die Hypothese dahingehend, dass Mäuse mit einer PC-Defizienz oder FV-Leiden eine deutlich gesteigerte Ausprägung der Atherosklerose als die Wildtypiere zeigten [Loeffen *et al.* 2012; Rosendaal 2009; Esmon und Schwarz 1995].

Da PC und PZ strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen [Højrup *et al.* 1982], wurde angenommen, dass auch PZ und das im Komplex zirkulierende ZPI einen Effekt hinsichtlich einer Thrombusformation haben könnten. Im Umkehrschluss müsste eine entsprechende Defizienz eine verstärkte Thrombose induzieren. Es konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass PZ-defizierte Mäuse eine deutlich stärkere Thromboseausprägung als die Wildtypwurfgeschwister aufwiesen [Butschkau *et al.* 2014a].

Unsere *in vivo* Daten zeigten ebenfalls eine deutliche Zunahme des thrombotischen Phänotyps in ZPI<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den ZPI<sup>+/+</sup>-Mäusen nach arterieller Läsion. Es wurden eine signifikant gesteigerte luminaire Stenose sowie eine erhöhte Neointimafläche und –Dicke festgestellt. Diese Ergebnisse gehen mit Befunden von Zhang *et al.* aus dem Jahre 2008 einher. Die Gruppe fand heraus, dass PZ- und ZPI-defiziente Mäuse eine deutlich stärkere Thrombose nach arterieller Gefäßverletzung als die Kontrollgruppe aufwiesen [Zhang *et al.* 2008]. Wenn eine Faktor V-Leiden Erkrankung vorlag, wirkte sich eine ZPI-Defizienz sogar schwerwiegender auf die Thrombusbildung aus als eine PZ-Defizienz [Zhang *et al.* 2008; Kemkes-Matthes *et al.* 2002]. In Anbetracht der Tatsache, dass ZPI in der Lage ist, die Koagulation an zwei Stellen zu inhibieren (Hemmung FXa und FXIa [Han *et al.* 2000]), ist es nicht überraschend, dass in unseren Versuchen eine isolierte ZPI-Defizienz eine stärkere Thrombose als eine PZ-Defizienz induzierte (Daten verglichen mit Butschkau *et al.* aus 2014a).

Dass die *in vitro* Daten die Ergebnisse aus den *in vivo* Untersuchungen nur tendenziell unterstützen, ist nicht zwingend als Widerspruch zu deuten. Antithrombin beispielsweise entfaltet seine inhibitorische Wirkung nicht in isolierter Form, sondern vielmehr über die Hemmung eines weiteren Proteins [Luengo-Gil *et al.* 2016]. Ein solcher Mechanismus wäre für ZPI ebenfalls denkbar und würde den thrombotischen Phänotyp im Mausmodell bei ZPI-Defizienz erklären.

Die bisher veröffentlichte Literatur diskutiert den Zusammenhang zwischen veränderten PZ- und ZPI-Konzentrationen im Plasma und dem Auftreten von atherosklerotischen und thrombotischen Ereignissen äußerst kontrovers. So konnten in klinischen Beobachtungsstudien an Patienten und in Versuchen an Mäusen positive [Martinelli *et al.* 2005; Kemkes-Matthes *et al.* 2002; Vasse *et al.* 2001; Heeb *et al.* 2002; Santacroce *et al.* 2006; Al-Shanqeeti *et al.* 2005], negative sowie gar keine Zusammenhänge beobachtet werden [Lopaciuk *et al.* 2002; McQuillan *et al.* 2003; Morange *et al.* 2004; Refaai *et al.* 2006; Al-Shanqeeti *et al.* 2005].

Untersuchungen von Polymorphismen im SERPINA10-Gen (ZPI), welche eine Funktionseinschränkung von ZPI nach sich ziehen, zeigten ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. So konnten Young *et al.* 2012 in einer klinischen Studie mit 550 Thrombosepatienten und 600 Kontrollen lediglich eine *nonsense* Mutation gehäuft in der

Patientenkollektiv finden, wohingegen zwei andere Mutationen gleichermaßen auf beide Gruppen verteilt waren. Daraus schlossen die Autoren, dass es keinen aussagekräftigen Zusammenhang zwischen einer ZPI-Defizienz und dem Auftreten einer tiefen Beinvenenthrombose gibt [Young *et al.* 2012]. Razzari *et al.* bestätigten diesen Befund mit ihren Untersuchungen an italienischen Patienten. Die Gruppe konnte keinen Zusammenhang in der Prävalenz von zwei ZPI *nonsense* Mutationen und dem Auftreten einer venösen Thrombose feststellen.

Im Gegensatz dazu fanden Van de Water *et al.* 2004 heraus, dass in einer Patientenkollektiv von 250 Patienten in 4,4 % der Fälle eine Häufung von Mutationen im SERPINA10-Gen zu finden war. Die Kontrollen wiesen lediglich in 0,8 % der Fälle eine Mutation auf [van de Water *et al.* 2004]. Corral *et al.* bestätigten einen Zusammenhang zwischen einer *nonsense* Mutation (Stopkodon) und einem 3,3-fach erhöhtem Thromboserisiko, wobei das Auftreten dieser Mutation gehäuft bei Thrombosepatienten mit familiärer Anamnese zu finden war [Corral *et al.* 2006].

Weitere Studien, die die Plasmakonzentrationen beider Proteine untersuchten, ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Im Rahmen der LETS-Studie konnten Al-Shanqeeti *et al.* 2005 zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen veränderten PZ- oder ZPI-Plasmakonzentration und dem Auftreten einer Thrombose bestand. Lediglich eine Subgruppen-Analyse deutete darauf hin, dass bei älteren Patienten (>55 Jahre) und bei Männern ein Absinken der PZ-Plasmawerte ein möglicher Risikofaktor für eine venöse Thrombose darstellt [Al-Shanqeeti *et al.* 2005]. Martinelli *et al.* konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen erniedrigten PZ-Plasmakonzentration und einem erhöhten Thromboserisiko feststellen [Martinelli *et al.* 2005]. Es existieren sogar Studien, die einen positiven Zusammenhang zwischen erhöhten PZ-Werten und dem Auftreten einer Thrombose beschreiben [Lopaciuk *et al.* 2002; McQuillan *et al.* 2003; Kolaotis *et al.* 2007]. Die Übersicht über die durchgeführten Studien veranlasste im Jahr 2010 die Gruppe um Sofi *et al.*, eine systematische Zusammenfassung aller bis dahin veröffentlichten Studien zu verfassen. Insgesamt wurden 28 Fall-Kontroll-Studien (veröffentlicht bis Oktober 2009) eingeschlossen. Die globale Analyse zeigte, dass eine verringerte PZ-Konzentration mit einem 3-fach erhöhten Risiko für die Ausprägung einer venösen und arteriellen Thrombose, sowie für Schwangerschaftskomplikationen einhergeht [Sofi *et al.* 2010]. Eine

Untersuchung des Zusammenhangs zwischen veränderten ZPI-Plasmakonzentration und der Ausprägung einer Thrombose wurde in dieser Studie nicht vorgenommen.

Da sowohl eine PZ- als auch eine ZPI-Defizienz eine gesteigerte Neointimaproliferation zeigten, stellte sich die Frage, ob eine PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Defizienz einen deutlich schwerwiegenderen Phänotypen als die Defizienz eines einzelnen Proteins hervorbringt. Etwaige Untersuchungen und klinische Studien, die eine PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Defizienz untersuchten, fehlen bisher. Aus unseren Beobachtungen schließen wir, dass die Abwesenheit beider Proteine zu einer deutlich stärkeren Thrombose führte als in den Wildtypwurgeschwistern. Dabei beobachteten wir deutlich höhere luminaire Stenosen in den ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren und auch in PZ<sup>-/-</sup>-Tieren [Butschkau *et al.* 2014a] im Vergleich zu den PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren.

Es gibt kaum Studien, die sowohl die PZ- als auch ZPI-Plasmakonzentrationen bestimmt haben. Sofi *et al.* untersuchten 2009 PZ- und ZPI-Antigenkonzentrationen in Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (*peripheral artery disease*, PAD) als Folge einer Atherosklerose. Sie fanden heraus, dass in den Patientenkohorten sowohl die PZ- als auch die ZPI-Antigenkonzentrationen deutlich gesenkt waren und dass sogar eine Einschränkung der ZPI-Funktionalität in der PAD-Gruppe zu finden war [Sofi *et al.* 2009]. Dennoch können keine Aussagen getroffen werden, ob die Ausprägung einer PAD vor dem Hintergrund gleichzeitig reduzierten PZ- und ZPI-Plasmakonzentrationen deutlich schwerer ausfällt als bei alleinigem Mangel eines Proteins.

Prinzipiell ist eine Vergleichbarkeit aller veröffentlichten Studien als sehr schwierig einzustufen, da jede Studie andere Aus- und Einschlusskriterien der Patienten vorgibt. Außerdem erschweren stark schwankende PZ- und ZPI-Plasmakonzentration in den Kontrollgruppen sowohl innerhalb einer Studie, als auch zwischen den verschiedenen Studien die Interpretation der Ergebnisse. Han *et al.* berichteten zunächst von einer Plasmakonzentration von 1,0 – 1,6 µg/ml in Citratplasma, welche 2 Jahre später nach oben korrigiert wurde (3,84 µg/ml) [Han *et al.* 2000]. Szumowska *et al.* fanden 4,41 µg/ml ZPI im Plasma gesunder Patienten [Szumowska *et al.* 2015]. Diverse Studien beschrieben stark variierende ZPI-Konzentrationen im Plasma innerhalb von gesunden Kontrollgruppen, die für klinische Studien herangezogen wurden [Kemkes-Matthes *et al.* 1995b]. Auch für PZ sind breite Schwankungen im Plasmaspiegel beschrieben worden. Miletich und Broze analysierten 1987 450 gesunde Probanden und stellten große Schwankungen der PZ-

Plasmakonzentrationen von 0,6 µg/ml bis 5,7 µg/ml (mittlere Konzentration  $2,9 \pm 1,0$  µg/ml in EDTA antikoaguliertem Plasma) fest [Miletich & Broze 1987].

Um PZ und ZPI als unabhängige Risikofaktoren benennen zu können, wäre es notwendig, Thrombose-Patienten zu identifizieren, die keinerlei Grunderkrankungen aufweisen. Dies stellt sich gerade in älteren Patienten als sehr schwierig heraus, da fast alle eine Grunderkrankung oder andere Thromboserisiken aufweisen. Ein weiterer Nachteil ist, dass die klinischen Studien retrospektiv erhoben wurden, sodass nicht eindeutig gesagt werden kann, ob alternierende PZ- oder ZPI-Plasmakonzentrationen ursächlich sind oder lediglich eine Folgeerscheinung der Thrombose darstellen. So können erniedrigte Plasmamengen beispielsweise auch durch Verbrauch der beiden Faktoren im Rahmen der sekundären Homöostase entstehen. Aussagekräftiger wären Studiendesigns, die Patienten mit erniedrigten gegen Patienten mit normalen Konzentrationen von PZ und ZPI über einen langen Zeitraum hinweg begleiten und nach kardiovaskulären Ereignissen screenen.

## 6.2. PZ und ZPI in der Angiogenese

Als Angiogenese bezeichnet man die Entstehung von neuen Blutgefäßen aus bereits existierenden. Sie spielt eine zentrale Rolle in der vaskulären Regeneration, der diabetischen Retinopathie, der chronischen Inflammation und der Tumorprogression. Ischämie ist dabei einer der stärksten Induktoren für die Neoangiogenese [Carmiet 2000]. Auf den ersten Blick scheinen Gerinnungsfaktoren und Blutgefäßneubildung nicht viel miteinander zu tun zu haben. Dennoch deuten verschiedene Studien auf einen positiven Effekt von Koagulationsfaktoren auf die Angiogenese hin. Da bereits Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass PZ einen proangiogenen Stimulus im Mausmodell darstellt [Butschkau *et al.* 2014b], war es nun Gegenstand der Untersuchungen:

- i) den Einfluss von ZPI auf die Migration und Netzwerkbildung von humanen Endothelzellen *in vitro* und
  - ii) den Einfluss einer ZPI- und PZ/ZPI-Defizienz auf die Reperfusion im ischämischen Hinterlauf der Maus
- zu analysieren.

### **6.2.1. ZPI hat keinen Einfluss auf die Migration und Netzwerkbildung von humanen Endothelzellen *in vitro***

Anhand des Migrations-Assays und des *tube-formation*-Assays wurde zunächst der Einfluss von ZPI auf die Migration und die Netzwerkbildung auf humane Endothelzellen *in vitro* bestimmt. Unsere Versuche zeigten, dass weder PZ noch ZPI einen Einfluss auf die Endothelzellen in beiden Versuchsansätzen hatten. Für den Migrations-Assay wurde SDF-1 $\alpha$  als Positivkontrolle eingesetzt. Dieser konnte zuvor bereits eine Stimulierung der Migration hervorrufen [Butschkau *et al.* 2014b]. Unsere Ergebnisse bestätigten dies allerdings nicht. Sowohl SDF-1 $\alpha$  als auch PZ und ZPI hatten keinerlei Einfluss auf die Migration der Endothelzellen.

Gleiche Ergebnisse wurden durch den *tube-formation*-Assay ermittelt. Hier zeigte sich ebenfalls, dass weder PZ noch ZPI einen Effekt auf die Netzwerkbildung der Endothelzellen hatten. VEGF als stark pro-angiogener Faktor konnte hier nur einen schwachen positiven Effekt erzielen, SDF-1 $\alpha$  und PZ keinen. Einzig ZPI zeigte eine leichte Tendenz in Richtung Induktion der Netzwerkformation, allerdings streuten die Werte sehr stark. Obwohl für PZ bereits *in vitro* pro-angiogene Eigenschaften nachgewiesen wurden [Butschkau *et al.* 2014a und 2014b], konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. Ähnliche Untersuchungen zu ZPI sind bisher nicht verfügbar, sodass ein Vergleich nicht möglich ist. Da in den Versuchen beide Positivkontrollen nicht die zu erwartenden Effekte zeigten, ist das Design der Experimente hinsichtlich Dosis und der Applikationsdauer zu hinterfragen.

In der Literatur sind für Serpine sowohl pro- als auch antiangiogene Wirkungen beschrieben worden. Für den Heparin Co-Faktor II (Serpine D1) beispielsweise konnte *in vitro* eine Steigerung der Netzwerkbildung, der Proliferation und auch der Migration von Endothelzellen beobachtet werden [Ikeda *et al.* 2012]. Spaltprodukte von Antithrombin (Serpine C1) beispielweise blockierten *in vitro* die Netzwerkbildung [Luengo-Gil *et al.* 2016]. Ebenso sind für Mitglieder der Serpin A-Familie, zu der auch ZPI gehört, anti-angiogene Eigenschaften aufgezeigt worden. Kallistatin (Serpine A4) beispielsweise inhibiert die Expression von VEGF und anderen proangiogenen Faktoren [Huang *et al.* 2014a; Huang *et al.* 2014b] und hemmt die VEGF- und bFGF-induzierte Proliferation, Migration und Adhäsion von kultivierten Endothelzellen [Miao *et al.* 2002]. Für den PC Inhibitor (PCI, Serpin A5) konnten Asanuma *et al.* zeigen, dass eine Netzwerkbildung von humanen

Endothelzellen *in vitro* durch die Zugabe von PCI deutlich gesenkt wurde [Asanuma *et al.* 2007]. Dieser Effekt war sogar unabhängig von der Proteaseaktivität, bedarf allerdings der Tertiärstruktur des Serpins, da denaturiertes PCI keinen Effekt mehr aufwies [Asanuma *et al.* 2007]. Für gespaltenes Antithrombin [O'Reilly *et al.* 1999], PAI-1 [Stefansson *et al.* 2001] und *pigment epithelium-derived factor (PEDF)* [Wang *et al.* 2003] sind ebenfalls antiangiogene Eigenschaften nachgewiesen worden. Da ZPI ebenfalls zu der Gruppe der Serpine gehört, kann eine antiangiogene Wirkung von ZPI unter Umständen angenommen werden. Dennoch sind für ZPI selbst solche Untersuchungen bisher noch nicht durchgeführt worden.

#### **6.2.2. Eine isolierte ZPI-Defizienz und eine PZ/ZPI-Defizienz haben keinen Einfluss auf die Reperfusion nach Ischämie**

Um den Einfluss von ZPI auf die Revaskularisierung eines ischämischen Hinterlaufes zu evaluieren, wurden ZPI- und PZ/ZPI-defizierte Mäuse einer unilateralen Resektion der *A. femoralis* unterzogen. Nach 21 Tagen post operativ wurden die Temperaturen der Hinterläufe gemessen und die Anzahl der neu gebildeten Kapillaren im Muskelquerschnitt ermittelt. Eine Induktion der Revaskularisierung ist erkennbar an einem Temperaturanstieg in den operierten Hinterläufen zum Endpunkt des Experimentes. In den ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren wurde eine Temperaturanpassung der Hinterläufe an das nicht operierte Hinterbein beobachtet. Die Temperaturdifferenz konnte um ca. 1 °C verringert werden. Dies spricht für eine Induktion der Reperfusion 21 Tage post operativ. Dem widerspricht das Ergebnis der quantitativen Erfassung der Kapillaren im Muskelquerschnitt des *M. gastrocnemius*. Hier waren keine Unterschiede zwischen der Kapillardichte der operierten Hinterläufe beider Genotypen zu beobachten.

Als kontrovers muss die Temperaturdifferenz der ZPI<sup>-/-</sup>-Tiere zum Zeitpunkt prä operativ betrachtet werden. Sie liegt über dem der ZPI<sup>+/+</sup>-Tiere und bedingt somit unterschiedliche Ausgangswerte. Zum letzten Zeitpunkt war allerdings kein Unterschied zwischen beiden Genotypen festzustellen.

Betrachtet man die Temperaturanpassung der ZPI<sup>-/-</sup>-Tiere zwischen dem post operativen Zeitpunkt und 21 Tage danach, entsteht der Eindruck, dass eine ZPI-Defizienz sogar einen positiven Einfluss auf die Reperfusion haben könnte. Dem widerspricht allerdings wie oben beschrieben das Resultat aus den histologischen Untersuchungen.

Letztlich ist nicht festzustellen, ob die ZPI<sup>+/+</sup>-Tiere direkt nach der Operation zu warme operierte Hinterläufe zeigten oder die ZPI<sup>-/-</sup>-Tiere zu kalte. Da ZPI weder eine Induktion der Netzwerkbildung noch eine Verstärkung der Migration und eine ZPI-Defizienz keine erhöhte Kapillardichte im Muskelquerschnitt zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass ZPI an angiogenen Prozessen nicht wesentlich beteiligt ist.

In der vorrangingen Arbeit von Butschkau *et al.* konnte eine Verbesserung der Reperfusion im gleichen experimentellen Setup, allerdings in PZ-defizienten Mäusen, nicht beobachtet werden [Butschkau *et al.* 2014b]. Hier erreichten die defizienten Tiere zwar eine Verbesserung der Durchblutung, verglichen mit der Wildtypkontrollgruppe war dieser Effekt jedoch deutlich schwächer. Daraus wurde geschlussfolgert, dass eine PZ-Defizienz einen negativen Einfluss auf die Ischämie-induzierte Reperfusion hat [Butschkau *et al.* 2014b]. Werden nur die absoluten Temperaturdifferenzen beider Untersuchungen zum Zeitpunkt nach 21 Tagen post operativ isoliert betrachtet, so zeigten sowohl die PZ<sup>-/-</sup>-Tiere als auch die ZPI<sup>-/-</sup>-Tiere ein gleiches Temperaturniveau. Der gravierende Unterschied zwischen Butschkau *et al.* und den hier vorliegenden Ergebnissen resultiert letztlich aus den unterschiedlichen Werten direkt post operativ und den Ergebnissen der Wildtypiere. Bei Butschkau *et al.* zeigte sich eine deutliche Verbesserung der Revaskularisierung der Wildtypiere, in den vorliegenden Ergebnissen nicht. Wagner *et al.* hatten einen ähnlichen Versuchsaufbau und auch hier zeigten die Wildtypen keine Verbesserung der Reperfusion [Wagner *et al.* 2013a; Wagner *et al.* 2013b]. Hätten also die ZPI<sup>-/-</sup>-Tiere in den vorliegenden Untersuchungen direkt post operativ eine geringere Temperaturdifferenz auf dem Niveau der ZPI<sup>+/+</sup>-Tiere, wären die histologischen Daten bestätigt.

Die Untersuchungen der PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Tiere zeigten ähnliche Ergebnisse und Verhältnisse. So ist eine Erwärmung des operierten Hinterlaufes nach 21 Tagen im Vergleich zum post operativen Zeitpunkt zu verzeichnen. Dennoch relativieren die PZ<sup>+/+</sup>/ZPI<sup>+/+</sup>-Tiere auch hier das Ergebnis. Diese Gruppe zeigte keine Verbesserung der Reperfusion nach 21 Tagen verglichen mit dem post operativem Zeitpunkt, dennoch waren die absoluten Werte nach 21 Tagen beider Versuchsgruppen annährend gleich.

Der Einfluss von Koagulationsfaktoren auf die Angiogenese wurde bereits von verschiedenen Studien untersucht. So konnten Ideka und Kollegen 2012 zeigen, dass eine heterogene Heparin Co-Faktor II-Defizienz in Mäusen, nach einer induzierten Hinterlaufischämie, eine deutlich abgeschwächte Gefäßneubildung verursachte im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrollgruppe. Die Gabe von aufgereinigtem Heparin Co-Faktor II hingegen revertierte den Effekt [Ikeda *et al.* 2012].

Durch Uchiba und Kollegen wurde 2004 gezeigt, dass das aktivierte PC (ein strukturelles Homolog von PZ) *in vitro* möglicherweise in der Lage ist, die gleichen Signalkaskaden zu aktivieren wie VEGF [Uchiba *et al.* 2004]. So verstärkt aPC die Proliferation und die Netzwerkbildung von Endothelzellen *in vitro* und die Angiogenese in der Cornea der Maus [Uchiba *et al.* 2004]. Auch prokoagulative Faktoren, wie beispielweise FXa [Hollborn *et al.* 2012] und Thrombin [Coughlin *et al.* 2001], können proangiogene Stimuli setzen, beispielsweise durch die Induktion der Expression von VEGF. Des Weiteren kann Thrombin durch Stimulierung des HIF-1a (*hypoxia-inducable transcription factor 1a*) die Sekretion einer Reihe von proangiogenen Faktoren (VEGF, PDGF) induzieren [Carmeliet 2003] und somit zur Angiogenese indirekt beitragen.

Obwohl ZPI strukturell zu der Gruppe der Serpine zuzuordnen ist, muss das nicht zwangsläufig bedeuten, dass es ebenso wie Heparin Co-Faktor II und aktivierte PC auch die Angiogenese unterstützt. So gibt es auch Gerinnungsfaktoren, die eine Angiogenese unterbinden. Für die konvertierten Formen des Antithrombin (latent und gespaltenes Antithrombin) konnte in mehreren Untersuchungen an Endothelzellen beispielsweise eine antiangiogene Wirkung beschrieben werden [O'Reilly *et al.* 1999; Azhar *et al.* 2013; Luengo-Gil *et al.* 2016; Azhar *et al.* 2016]. Für Kallistatin (Serpine A-Unterfamilie) konnten ebenso antiangiogene Wirkungen in einem Hinterlaufischämiemodell gezeigt werden [Miao *et al.* 2002]. Für den PC Inhibitor (PCI) wurde in einem Implantationsmodell an der Rattencornea gezeigt, dass eine Angiogenese bei Expression von PCI deutlich eingeschränkt ist [Asanuma *et al.* 2007].

Die hier durchgeführten Untersuchungen an den ZPI-defizienten Mäusen sind zur vollständigen Beurteilung des Einflusses von ZPI auf die Revaskularisierung und somit auf die Angiogenese nur bedingt heranzuziehen. Zum einen ist die Gruppengröße mit 10 Tieren pro Genotyp zu gering, als dass sich statistische Signifikanzen herausarbeiten ließen. Des

Weiteren kann lediglich eine Aussage über den Einfluss einer ZPI-Defizienz getroffen werden. Der Gegenversuch mit einer Überexpression von ZPI *in vivo* steht bisher aus.

### 6.3. PZ und ZPI als mögliche Therapeutika?

Da ZPI nachweislich die plasmatische Blutgerinnung an zwei unterschiedlichen Stellen inhibiert (FXa und FXIa) [Han *et al.* 2000], ist es nicht überraschend, dass eine ZPI-Defizienz einen stärkeren thrombotischen Phänotyp verursacht als ein isoliertes Fehlen von PZ. Auf andere Gerinnungsfaktoren wie Thrombin, Meizothrombin, Faktor VIIa, Faktor IXa, aPC, t-PA (*tissue plasminogen activator*), u-PA (Urokinase), Plasmin, Trypsin, Leukocyte Elastase, Chymotrypsin oder Cathepsin G wurden bisher keine hemmenden Eigenschaften seitens ZPI nachgewiesen [Han *et al.* 1999]. Im Gegensatz zu ZPI gibt es universelle Serpine, welche die Gerinnungskaskade an mehreren Stellen inhibieren. Antithrombin beispielsweise kann alle Proteasen der intrinsischen und extrinsischen Kaskade inhibieren [Olson *et al.* 2010; Zhou *et al.* 1999]. Des Weiteren ist bekannt, dass Heparin als ein bedeutender Co-Faktor für einige Serpine dient. Durch eine Beschleunigung der Aktivität beispielsweise von Antithrombin [Olson *et al.* 2010; Zhou *et al.* 1999], ZPI [Han *et al.* 2000], wird die Blutgerinnung effektiv gehemmt, sodass sich Heparin als gutes Antikoagulanz etabliert hat. Die Entwicklung eines Arzneimittels, welches die ZPI-Wirkung unterstützt, ist schwierig. Zum einen fehlt es nach wie vor an klaren Beweisen, dass alternierende ZPI- und auch PZ-Plasmakonzentrationen die primäre Ursache für das Auftreten von thrombotischen Erkrankungen sind. Eine PZ- beziehungsweise ZPI-Defizienz in gesunden Mäusen zeigte beispielsweise keine gesteigerte Thromboseneigung, lediglich die Grunderkrankung FV-Leiden wurde durch eine ZPI-Defizienz deutlich mehr verstärkt als durch eine PZ-Defizienz [Yin *et al.* 2000]. Eine erniedrigte PZ- Plasmakonzentration scheint nach verschiedenen Beobachtungen eine bereits bestehende Thromboseneigung zu unterstützen und das Risiko zu erhöhen [Kemkes-Matthes *et al.* 2002; Martinelli *et al.* 2005]. Es existieren unterstützend Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen erhöhten PZ und ZPI-Plasmakonzentrationen in Patienten und der Schwere einer Hämophilie A-Grunderkrankung (Blutungsneigung) aufzeigten [Galar *et al.* 2012]. Die Tatsache, dass bei den meisten Studien die Patientenkohorten bereits Grunderkrankungen aufwiesen (bestehende Blutungsneigungen, Folgeerkrankungen durch Rauchen, Diabetes etc.), lässt schlussfolgern, dass eine PZ- beziehungsweise ZPI-Defizienz nicht alleine als der

ausschlaggebende Risikofaktor für die Entstehung einer Thrombose oder einer anderen vaskulären Erkrankung einzustufen ist. Außerdem ist die Bestimmung der Plasmakonzentration von PZ und ZPI kein geeigneter diagnostischer Marker, da die Schwankungsbreite zu groß ist und von vielen Einflussfaktoren abhängt (ethnische Gruppe, Geschlecht, Alter) und interindividuell verschieden ausfallen kann. Aufgrund der Seltenheit der Diagnose eines PZ-Mangels wäre eine Testung darauf ökonomisch nicht vertretbar.

In Anbetracht der Tatsache, dass heutzutage sehr gute Antikoagulantia zur Verfügung stehen und es nach wie vor nicht eindeutig geklärt ist, ob und in welchem Umfang alternierende PZ- und ZPI-Plasmakonzentrationen eine Thrombose derart stark induzieren, dass diese beiden Proteine als therapeutisches Target einzustufen sind, ist eine Fokussierung auf die Entwicklung von Therapeutika eher auf bereits bekannte Stoffe zu lenken.

## 7 Zusammenfassung

Thrombotisch verursachte kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in den Industrieländern [Abegunde *et al.* 2007; Meadows und Bhatt 2007; Sanz *et al.* 2012; Silverstein *et al.* 2010]. Dabei verlaufen Thrombosen nicht selten tödlich. Unter physiologischen Bedingungen werden durch die Regulation des Gerinnungssystems eine Koagulation und eine daraus folgende Thrombose vermieden.

Kürzlich sind die beiden Koagulationsfaktoren PZ und ZPI in den Fokus der Forschung gerückt. Studien konnten zeigen, dass verringerte PZ-Plasmakonzentrationen zu einem 3-fach erhöhten Risiko für die Ausprägung einer Thrombose führten [Sofi *et al.* 2010]. Vorrangigegangene Arbeiten konnten bereits zeigen, dass in PZ<sup>-/-</sup>-Tieren eine verstärkte Thromboseneigung und eine geringere Angiogenese stattfindet als in PZ<sup>+/+</sup>-Tieren. Da PZ unter physiologischen Bedingungen im Plasma im Komplex mit ZPI zirkuliert, war es Gegenstand dieser Arbeit, den Einfluss von ZPI auf die Thromboseentwicklung und auch auf die Angiogenese zu untersuchen. In einem Carotisläsionsmodell der Maus konnte gezeigt werden, dass in ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren eine deutlich stärkere Thromboseneigung zu finden war als in den PZ<sup>+/+</sup>-Tieren. Dieses Ergebnis konnte allerdings durch die *in vitro* Untersuchungen weder für PZ noch für ZPI bestätigt werden. In PZ<sup>-/-</sup>/ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren wurden die gleichen Ergebnisse hinsichtlich einer Stenoseneigung wie in ZPI<sup>-/-</sup>-Tieren ermittelt.

Als zweiter Themenkomplex wurde der Einfluss von PZ und ZPI auf die Angiogenese untersucht. Auch hier wurde durch Vorarbeiten gezeigt, dass PZ einen positiven Einfluss auf die Netzwerkbildung und Reperfusion im Ischämiemodell hat. Für ZPI konnte jedoch kein Effekt *in vitro* gezeigt werden. Die *in vivo* Daten sind nicht eindeutig und müssen sehr kontrovers diskutiert werden. Je nach Betrachtungsweise konnte kein Effekt bzw. ein leicht positiver Einfluss beobachtet werden. ZPI spielt nach bisherigen Erkenntnissen somit eine Rolle in der Hämostase, jedoch nicht in der Angiogenese.

Das therapeutische Potential von Gerinnungsfaktoren ist noch nicht endgültig erforscht. Thrombozyten sind umstritten als Ursache für eine Atherothrombose, aber die Rolle von Gerinnungsfaktoren ist bisher weniger gut etabliert [Lipinski *et al.* 2011]. Obwohl ZPI die Blutgerinnung an zwei unterschiedlichen Stellen inhibiert, sind klinische Studien, die einen

Zusammenhang zwischen alternierenden ZPI (oder PZ) Plasmakonzentrationen und dem Risiko eine Thrombose zu entwickeln, äußerst kontrovers diskutiert. So lange hier kein eindeutiges Ergebnis gefunden werden kann, ist die klinische Relevanz einer ZPI-Defizienz zur therapeutischen Anwendung nicht Bestandteil von Untersuchungen. Ebenso ist das Heranziehen von PZ und ZPI als diagnostischer Marker beziehungsweise Indikator nach bisherigen Erkenntnissen nicht relevant.

## 8 Literaturverzeichnis

**Abegunde DO**, Mathers CD, Adam T, Ortegon M, Strong K: The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *Lancet* 2007, 370(9603):1929-1938.

**Al-Shanqeeti A**, van Hylckama Vlieg A, Berntorp E, Rosendaal FR, Broze GJ Jr: Protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor. Determinants of levels and risk of venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2005, 93: 411–413.

**Arnaoutova I**, George J, Kleinman HK, Benton G: The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*. 2009, 12(3):267-274.

**Arnaoutova I**, Kleinman HK: In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat. Protoc.* 2010, 5(4):628-635.

**Asanuma K**, Yoshikawa T, Hayashi T, Akita N, Nakagawa N, Hamada Y, Nishioka J, Kamada H, Gabazza EC, Ido M, Uchida A, Suzuki K: Protein C inhibitor inhibits breast cancer cell growth, metastasis and angiogenesis independently of its protease inhibitory activity. *Int. J. Cancer*. 2007. 121(5):955-965.

**Azhar A**, Singh P, Rashid Q, Naseem A, Khan MS, Jairajpuri MA: Antiangiogenic function of antithrombin is dependent on its conformational variation: implication for other serpins. *Protein Pept. Lett.* 2013, 20(4):403-411.

**Azhar A**, Khan MS, Swaminathan A, Naseem A, Chatterjee S, Jairajpuri MA. Oxidized antithrombin is a dual inhibitor of coagulation and angiogenesis: Importance of low heparin affinity. *Int J Biol Macromol*. 2016, 82:541-550.

**Bagot CN**, Arya R: Virchow and his triad: a question of attribution. *Br. J. Haematol.* 2008, 143(2):180-190.

**Barth J, Röhl K, Jäger D:** Protein-z-deficiency as a rare case of perioperative bleeding. Anasthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 2003, 38(9):605-608.

**Bhakuni T, Ali MF, Ahmad I, Bano S, Ansari S, Jairajpuri MA:** Role of heparin and non heparin binding serpins in coagulation and angiogenesis: A complex interplay. Arch. Biochem. Biophys. 2016, 604:128-142.

**Bolkun L, Galar M, Piszcz J, Lemancewicz D, Kloczko J:** Plasma concentration of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in patients with haemophilia A. Thromb. Res. 2013, 131(3):110-113.

**Broze GJ Jr, Miletich JP:** Human Protein Z. J Clin Invest. 1984;73(4):933-938.

**Butschkau A, Nagel P, Grambow E, Zechner D, Broze GJ Jr, Vollmar B:** Contribution of protein Z and protein Z-dependent protease inhibitor in generalized Shwartzman reaction. Crit. Care Med. 2013, 41(12):447-456.

**Butschkau A, Wagner NM, Bierhansl L, Genz B, Vollmar B:** Protein Z-deficiency is associated with enhanced neointima formation and inflammatory response after vascular injury in mice. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2014a, 7(9):6064-6071.

**Butschkau A, Wagner NM, Genz B, Vollmar B:** Protein z exerts pro-angiogenic effects and upregulates CXCR4. PLoS One. 2014b, 9(12):e113554.

**Carmeliet P:** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat. Med. 2000, 6(4):389-395.

**Carmeliet P:** Clotting Factors Build Blood Vessels. Science 2001, 293(5535):1602-1604.

**Chen K, Li W, Major J, Rahaman SO, Febbraio M, Silverstein RL:** Vav guanine nucleotide exchange factors link hyperlipidemia and a prothrombotic state, Blood (2011) 22.

**Corral J**, González-Conejero R, Soria JM, González-Porras JR, Pérez-Ceballos E, Lecumberri R, Roldán V, Souto JC, Miñano A, Hernández-Espinosa D, Alberca I, Fontcuberta J, Vicente V: A nonsense polymorphism in the protein Z-dependent protease inhibitor increases the risk for venous thrombosis. *Blood*. 2006, 108(1):177-183.

**Coughlin SR**: Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000, 407, 258 (6801):258-264.

**Day SM**, Reeve JL, Myers DD, Fay WP: Murine thrombosis models. *Thromb Haemost*. 2004, 92(3):486–494.

**Degryse B**, Neels JG, Czekay RP, Aertgeerts K, Kamikubo Y, Loskutoff DJ: The low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* 2004, 279(21):22595-22604.

**Esmon CT**, Schwarz HP: An update on clinical and basic aspects of the protein C anticoagulant pathway. *Trends Cardiovasc. Med.* 1995, 5:141–148.

**Fearon IM**, Faux SP: Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009, 47(3): 372–381.

**Fortenberry Y**: The role of serpins in tumor cell migration. *Biol. Chem.* 2015, 396 (3): 205-213.

**Furie B**, Furie BC: Mechanisms of thrombus formation. *N. Engl. J. Med.* 2008, 359:938-949.

**Gamba G**, Bertolino G, Montani N, Spedini P, Balduini C: Bleeding tendency of unknown origin and protein Z levels. *Thromb. Res.* 1998, 90 291-295.

**Gee MS**, Procopio WN, Makonnen S, Feldman MD, Yeilding NM, Lee WM: Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. *Am. J. Pathol.* 2003, 162(1):183-193.

**Ghosh A, Li W, Febbraio M, Espinola RG, McCrae KR, Cockrell E:** Platelet CD36 mediates interactions with endothelial cell-derived microparticles and contributes to thrombosis in mice.

J. Clin. Invest. 2008, 118(5):1934-1943.

**Glover C, Ma X, Chen YX, Miller H, Veinot J, Labinaz M, O'Brien E:** Human in-stent restenosis tissue obtained by means of coronary atherectomy consists of an abundant proteoglycan matrix with a paucity of cell proliferation. Am. Heart J. 2002, 144(4):702-709.

**Glover C, O'Brien ER:** Pathophysiological insights from studies of retrieved coronary atherectomy tissue. Semin. Interv. Cardiol. 2000, 5(4):167-173.

**Grandone E; Colaizzo D; Cappucci F; Cocomazzi N; Margaglione M:** Protein Z levels and unexplained fetal losses. Fertil Steril 2004, 82: 982-983.

**Grandone E; Favuzzi G; De Stefano V; Chinni E; Rossi E; Capucci F; Margaglione M:** Protein Z g-42a variant and the risk of pregnancy-related venous thromboembolism in a cohort of Italian patients.

Thromb Res 2009; 123: 848-850.

**Greten J, Kemkes-Matthes B, Nawroth PP:** Prothrombin complex concentrate contains protein Z and prevents bleeding in a patient with protein Z deficiency. Thromb. Haemost. 1995, 74:992-993.

**Gul KM, Ahmadi N, Wang Z, Jamieson C, Nasir K, Metcalfe R, Hecht HS, Hartley CJ, Naghavi M:** Digital thermal monitoring of vascular function: a novel tool to improve cardiovascular risk assessment. Vasc. Med. 2009, 14(2):143-148.

**Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr:** Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(16):9250-9255.

**Han X, Huang Z-F, Fiehler R, Broze GJ Jr:** Protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin. Biochemistry. 1999, 38:11073-11078.

**Han X, Fiehler R, Broze GJ Jr:** Characterization of the protein Z-dependent protease inhibitor, Blood. 2000, 96(9):3049-3055.

**Heeb M, Paganini-Hill A, Griffin J, Fisher M.** Low protein Z levels and risk of ischemic stroke; differences by diabetic status and gender. Blood Cells Mol. Dis. 2002, 29:139–144.

**Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzler NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WR, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM Jr, White CJ, White J, White RA, Antman EM, Smith SC Jr, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B; American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions; Society for Vascular Medicine and Biology; Society of Interventional Radiology; ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines: ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients with Peripheral Arterial Disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Associations for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (writing committee to develop guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease)--summary of recommendations. J. Vasc. Interv. Radiol. 2006, 17(9):1383-1397.**

**Højrup P, Roepstorff P, Petersen TE:** Amino-acid sequence of the vitamin-K-dependent part of protein Z. Eur. J. Biochem. 1982, 126(2):343-348.

**Hollborn M, Kohen L, Werschnik C, Tietz L, Wiedemann P, Bringmann A:** Activated blood coagulation factor X (FXa) induces angiogenic growth factor expression in human retinal pigment epithelial cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012, 53(9):5930-5939.

**Hogg PJ, Stenflo J:** Interaction of human protein Z with thrombin: evaluation of the species difference in the interaction between bovine and human protein Z and thrombin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991, 178(3):801-807.

**Hogg PJ, Stenflo J:** Interaction of vitamin K-dependent protein Z with thrombin. Consequences for the amidolytic activity of thrombin and the interaction of thrombin with phospholipid vesicles. J. Biol. Chem. 1991, 266(17):10953-10958.

**Huang X, Yan Y, u Y, Gatti J, Broze GJ Jr, Zhou A, Olson ST:** Structural basis for catalytic activation of protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) by protein Z. Blood 2012, 120:1726–173.

**Huang KF, Huang XP, Xiao GQ, Yang HY, Lin JS, Diao Y:** Kallistatin, a novel anti-angiogenesis agent, inhibits angiogenesis via inhibition of the NF-κB signaling pathway. Biomed. Pharmacother. 2014a, 68(4):455-461.

**Huang KF, Yang HY, Xing YM, Lin JS, Diao Y:** Recombinant human kallistatin inhibits angiogenesis by blocking VEGF signaling pathway. J. Cell. Biochem. 2014b, 115(3):575-584.

**Hojrup P, Roepstorff P., Petersen TE:** Amino-Acid Sequence of the Vitamin-K-Dependent Part of Protein Z. Eur. J. Biochem. 1982, 126:343-348.

**Ikeda Y, Aihara K, Yoshida S, Iwase T, Tajima S, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, Tsuchiya K, Sata M, Akaike M, Kato S, Matsumoto T, Tamaki T:** Heparin cofactor II, a serine protease inhibitor, promotes angiogenesis via activation of the AMP-activated protein kinase-endothelial nitric-oxide synthase signaling pathway. J. Biol. Chem. 2012, 287(41):34256-34263

**Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S:** Signaling events underlying thrombus formation. J Thromb. Haemost. 2003, 1:1602-1612.

**Kemkes-Matthes** B, Matthes KJ: Protein Z deficiency: a new cause of bleeding tendency. Thromb. Res. 1995a, 79(1):49-55.

**Kemkes-Matthes** B, Matthes KJ: Protein Z, a new haemostatic factor, in liver diseases. Haemostasis. 1995b, 25(6):312-316.

**Kemkes-Matthes** B, Wozniak G, Bauer J, Matthes KJ: Protein Z in der Kinder-Kardiochirurgie. Ann. Hematol. 1998; 76-86(Abst).

**Kemkes-Matthes** B, Rettig-Gammel A, Hoerster W, Matthes KJ: Plasmaprotein Z-Verminderung-Perioperatives Blutungsrisiko bei kieferchirurgischen Eingriffen. Scharrer I, Schramm W, eds. Twenty-eighth Hemophilia Symposium Hamburg-1997. 428. Berlin: Springer-Verlag 1999: 468-470.

**Kemkes-Matthes** B, Matthes KJ: Rolle von Protein Z in der Blutgerinnung. Med. Welt. 2000, 11:321-325.

**Kemkes-Matthes** B, Matzdorff A, Matthes KJ: Protein Z influences prothrombotic phenotype of factor V Leiden in humans. Blood. 2000a, 96:534a(Abst).

**Kemkes-Matthes** B, Hammermann H, Glanz H, Matthes KJ: Correlation between blood loss and protein Z levels in tonsillectomy and adenotomy. Ann. Hematol. 2000b; 79-63(Abst).

**Kemkes-Matthes** B, Nees M, Kühnel G, Matzdorff A, Matthes KJ: ProteinZ influences the prothrombotic phenotype in Factor V Leiden patients. Thromb. Res. 2002, 106: 183–185.

**Kitano** H, Mamiya A, Tomomi I, Shinichiro K, Chiaki H: Coagulation factor IX regulates cell migration and adhesion in vitro. Cell. Biol. Int. 2015, 39(10):1162-1172.

**Kobelt** K; Demarmels Biasiutti F; Mattle HP; Lämmle B; Wuillemin WA: Protein Z in ischemic stroke. Br J Haematol 2001, 114: 169–173.

**Kolaitis NJ, Felekitis T, Dova L:** A high normal value of plasma protein Z is an uncommon finding in non-arteritic ischemic optic neuropathy (N-AION) patients. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5:101.

**Koren-Michowitz M; Eting E; Rahimi-Levene N; Garach-Jehoshua O; Volcheck Y; Kornberg A:** Protein Z levels and central retinal vein or artery occlusion. *Eur J Haematol* 2005; 75: 401–405.

**Krychtiuk KA, Kastl SP, Speidl WS, Wojta J:** Inflammation and coagulation in atherosclerosis. *Hamostaseologie*. 2013, 33(4):269-282.

**Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ:** Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol.* 1988, 107(4):1589-1598.

**Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC:** An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol.* 2006;7(5):216.

**Le Cam-Duchez V; Soria C; Sollier CBD; Borg JY; Coudert M; Montalescot G; Esposito G; Drouet L; Collet JP:** Rare genotypes of protein Z gene are a risk factor for premature myocardial infarction but not protein Z plasma level. *Thromb Haemost* 2009; 102: 131-136.

**Li W, McIntyre TM, Silverstein RL:** Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology. *Redox. Biol.* 2013, 1:50-55.

**Liao WY, Ho CC, Hou HH, Hsu TH, Tsai MF, Chen KY, Chen HY, Lee YC, Yu CJ, Lee CH, Yang PC:** Heparin co-factor II enhances cell motility and promotes metastasis in non-small cell lung cancer. *J. Pathol.* 2015, 235(1):50-64.

**Libby P:** Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002, 420 (6917): 868–874.

**Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP:** Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat. Protoc.* 2009, 4(12):1737-1746.

**Lipinski S, Bremer L, Lammers T, Thieme F, Schreiber S, Rosenstiel P:** Coagulation and inflammation. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2003, 38(9):605-608.

**Lipinski S, Bremer L, Lammers T, Thieme F, Schreiber S, Rosenstiel P:** Coagulation and inflammation. Molecular insights and diagnostic implications. *Hamostaseologie.* 2011, 31(2):94-102.

**Loeffen R, Spronk HM, ten Cate H:** The impact of blood coagulability on atherosclerosis and cardiovascular disease. *J. Thromb. Haemost.* 2012, 10(7):1207-1216.

**Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, Czlonkowska A, Kuczynska- Zardzewialy A:** Protein Z in young survivors of ischemic stroke. *Thromb. Haemost.* 2002, 88:536.

**Luengo-Gil G, Calvo MI, Martín-Villar E, Águila S, Bohdan N1, Antón AI, Espín S, Ayala de la Peña F, Vicente V, Corral J, Quintanilla M, Martínez-Martínez I:** Antithrombin controls tumor migration, invasion and angiogenesis by inhibition of enteropeptidase. *Sci. Rep.* 2016, 6:27544.

**Martinelli I, Razzari C, Biguzzi E, Bucciarelli P, Mannucci PM:** Low levels of protein Z and the risk of venous thromboembolism. *J. Thromb. Haemost.* 2005, 3: 2817-2819.

**McQuillan A, Eikelboom J, Hankey G, Baker R, Thom J, Staton J, Yi Q, Cole V:** Protein Z in ischemic stroke and its etiologic subtypes. *Stroke.* 2003, 34:2415-2419.

**Mattock P, Esnouf MP:** A form of bovine factor X with a single polypeptide chain. *Nat New Biol.* 1973, 242(116):90-92.

**Meadows TA, Bhatt DL:** Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ. Res.* 2007, 100(9):1261-7125.

**Miao RQ, Agata J, Chao L, Chao J:** Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Blood.* 2002, 100(9):3245-3252.

**Miletich JP, Broze GJ Jr:** Human plasma protein Z antigen: range in normal subjects and the effect of warfarin therapy. *Blood,* 1987, 69:1580–1586.

**Morange PE, Juhan-Vague I:** the PRIME study group. Protein Z plasma levels are not associated with the risk of coronary heart disease: the PRIME study. *J. Thromb. Haemost.* 2004, 2:2050–2051.

**O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, Brass LF:** Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene* 2001, 20(13):1570-1581.

**O' Brien ER, Ma X, Simard T, Pourdjabbar A, Hibbert B:** Pathogenesis of neointima formation following vascular injury. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 2011, 11(1):30-39.

**Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S, Gettins PG:** Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 2010, 92:1587–1596.

**O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J:** Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 1999, 285:1926–1928

**Minhas N, Xue M, Fukudome K, Jackson CJ:** Activated protein C utilizes the angiopoietin/Tie2 axis to promote endothelial barrier function. *Faseb J.* 2010, 24(3):873-881.

**Prowse CV, Esnouf MP:** The isolation of a new warfarin-sensitive protein from bovine plasma. *Biochem Soc Trans.* 1977; 5(1):255-256.

**Rao LV, Pendurthi UR:** Factor VIIIa-induced gene expression: potential implications in pathophysiology. *Trends Cardiovasc. Med.* 2001, 11(1):14-21.

**Ravi S, Mauron T, Lämmle B, Wuillemin WA:** Protein Z in healthy human individuals and in patients with bleeding tendency. *Br. J. Haematol.* 1998, 102:1219-1223.

**Refaai MA, Ahn C, Lu L, Wu K, Broze GJ Jr:** Protein Z and ZPI levels and cardiovascular events. *J. Thromb. Haemost.* 2006, 4:1628–1629.

**Razzari C, Marinelli I, Bucciarelli P, Viscardi Y, Biguzzi E:** Polymorphisms of the protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) gene and the risk of venous thromboembolism. *Thromb. Haemost.* 2006, 95:909–910.

**Rosendaal FR:** Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 2009, 353:1167–1173.

**Sanz J, Moreno PR, Fuster V:** The year in atherothrombosis. *JACC* 2012, 60(10):932-942.

**Santacroce R, Sarno M, Cappucci F, Sessa F, Colaizzo D, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M:** Low protein Z levels and risk of occurrence of deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 2006, 4: 2417–2422.

**Schick C, Pemberton PA, Shi GP, Kamachi Y, Cataltepe S, Bartuski AJ, Gornstein ER, Brömmel D, Chapman HA, Silverman GA:** Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochem.* 1998, 37(15):5258-5266.

**Sejima H, Hayashi T, Deyashiki Y, Nishioka J, Suzuki K:** Primary structure of vitamin K-dependent human protein Z. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1990, 171(2):661-668.

**Silverman** GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, et al.: The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 33293–33296.

**Silverstein** RL, Li W, Park YM, Rahaman SO: Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 2010, 121:206-220.

**Simons** M, Ware JA: Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003, 2(11):863-871.

**Sofi** F, Cesari F, Tu Y, Pratesi G, Pulli R, Pratesi C, Gensini GF, Abbate R, Fedi S, Broze GJ Jr: Protein Z-dependent protease inhibitor and protein Z in peripheral arterial disease patients. *J. Thromb. Haemost.* 2009, 7(5):731-735.

**Sofi** F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Broze G Jr, Fedi S: A meta-analysis of potential risks of low levels of protein Z for diseases related to vascular thrombosis. *Thromb. Haemost.* 2010, 103(4):749-56.

**Stefansson** S, Petitclerc E, Wong MK, McMahon GA, Brooks PC, Lawrence DA: Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *J. Biol. Chem.* 2001, 276:8135–81341.

**Szumowska** A, Galar M2, Bolkun L, Kloczko J: Plasma Concentrations of Protein Z and Protein Z-Dependent Protease Inhibitor in Patients With Essential Thrombocythemia. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2016, 22(7):679-684.

**Tabatabai** A, Fiehler R, Broze GJ Jr: Protein Z circulates in plasma in a complex with protein Z-dependent protease inhibitor. *Thromb. Haemost.* 2001, 85, 655–660.

**Uchiba M, Okajima K, Oike Y, Ito Y, Fukudome K, Isobe H, Suda T:** Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ. Res.* 2004, 95(1):34-41.

**Vasse M, Guegan-Massardier E, Borg JY, Woimant F, Soria C:** Frequency of protein Z deficiency in patients with ischaemic stroke. *Lancet* 2001, 357:933–934.

**Van de Water N, Tan T, Ashton F, O'Grady A, Day T, Browett P, Ockelford P, Harper P:** Mutations within the protein Z-dependent protease inhibitor gene are associated with venous thromboembolic disease: a new form of thrombophilia. *Br. J. Haematol.* 2004, 127(2):190-194.

**Vasse M:** Protein Z, a protein seeking a pathology. *Thromb. Haemost.* 2008, 100(4):548-556.

**Wagner NM, Bierhansl L, Butschkau A, Noeldge-Schomburg G, Roesner JP, Vollmar B:** TLR2-deficiency of cKit+ bone marrow cells is associated with augmented potency to stimulate angiogenic processes. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013a, 6(12):2813-2823.

**Wagner NM; Bierhansl L; Nöldge-Schomburg G, Vollmar B, Roesner JP:** Toll-like receptor 2-blocking antibodies promote angiogenesis and induce ERK1/2 and AKT signaling via CXCR4 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013b, 33 (8):1943-1951.

**Walter-Yohrling J, Morgenbesser S, Rouleau C, Bagley R, Callahan M, Weber W, Teicher BA:** Murine endothelial cell lines as models of tumor endothelial cells. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10(6):2179-2189.

**Wang L, Schmitz V, Perez-Mediavilla A, Izal I, Prieto J, Qian C:** Suppression of angiogenesis and tumor growth by adenoviral-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor. *Mol. Ther.* 2003, 8(1):72-79.

**Whinna HC:** Overview of murine thrombosis models. *Throm. Res.* 2008, 122(1):64–69.

**Yin ZF, Huang ZF, Cui J:** Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000, 97:6734-6738.

**Young LK, Birch NP, Browett PJ, Coughlin PB, Horvath AJ, Van de Water NS, Ockelford PA, Harper PL:** Two missense mutations identified in venous thrombosis patients impair the inhibitory function of the protein Z dependent protease inhibitor. Thromb. Haemost. 2012, 107(5):854-863.

**Zhang J, Tu Y, Lu L, Lasky N, Broze GJ Jr:** Protein Z-dependent protease inhibitor deficiency produces a more severe murine phenotype than protein Z deficiency. Blood. 2008, 111(10):4973-4978.

**Zhou A.; Huntington JA, Carrell RW:** Formation of the antithrombin heterodimer in vivo and the onset of thrombosis. Blood 1999, 94:3388-3396.

Internetquelle:

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html;jsessionid=CA14279B5F31ECFA98D14D89FD435BB1.cae1;>  
28.2.17 11:54 Uhr

## 9 Anhang

### 9.1. Polymerasekettenreaktion - Reaktionsprotokoll

#### ZPI<sup>+/+</sup>:

Reagenz	finale Konzentration	Volumina [µl]
H <sub>2</sub> O		13,5
10x Buffer (15 mM MgCl)	1x	2
10x Primermix ZPI	0,5 µM	2
10 mM dNTPs	200 µM	0,4
Taq Polymerase (5000 u/ml)	24 u/ml	0,1
genomische DNA-Lösung		2

Primersequenzen ZPI<sup>+/+:</sup>

**ZPIIntA:** GGC ACA ACT CAG AGC CAG GTT TCG GAT CTG

**ZPIIntAdel:** CAG AGT TCC CGA TAG GTC TTC TTT CAG TCC

#### ZPI<sup>-/-</sup>:

Reagenz	finale Konzentration	Volumina [µl]
H <sub>2</sub> O		12,7
10x Buffer (15 mM MgCl)	1x	2
MgCl (25mM)	2,5mM	0,8
10x Primermix	0,5 µM	2
10 mM dNTPs	200 µM	0,4
Taq Polymerase (5000 u/ml)	25 u/ml	0,1
genomische DNA-Lösung		2

Primersequenzen ZPI<sup>-/-</sup>:

**ZPIIntA:** GGC ACA ACT CAG AGC CAG GTT TCG GAT CTG

**ZPIneok:** CCA TCT GCA CGA GAC TAG TGA GAC GTG CTA

**PZ<sup>+/+</sup>:**

Reagenz	finale Konzentration	Volumina [µl]
H <sub>2</sub> O		12,7
10x Buffer (15 mM MgCl)	1x	2
MgCl (25mM)	2,5 mM	0,8
10x Primermix ZPI	0,5 µM	2
10 mM dNTPs	200 µM	0,4
Taq Polymerase (5000 u/ml)	24 u/ml	0,1
genomische DNA-Lösung		2

Primersequenzen PZ<sup>+/+</sup>:**PZEx2del:** AAA CAA CGT TCT GCG GAG GTG GA**PZInt2:** AAC GAA CTA GTT AGT CCT GAG ACA**PZ<sup>-/-</sup>:**

Reagenz	finale Konzentration	Volumina [µl]
H <sub>2</sub> O		11,9
10x Buffer (15 mM MgCl)	1x	2
MgCl (25mM)	3,5 mM	1,6
10x Primermix ZPI	0,5 µM	2
10 mM dNTPs	200 µM	0,4
Polymerase (5000 u/ml)	24 u/ml	0,1
genomische DNA-Lösung		2

Primersequenzen PZ<sup>-/-</sup>:**NewPZIntfp:** TGC TCA CAC TGT TCT GCC TCT CTA C**NewNeorp:** TTC CTG ACT AGG GGA GGA GTA GAA G**PCR Programm PZ<sup>+/+</sup> und ZPI<sup>+/+</sup>****PCR Programm PZ<sup>-/-</sup> und ZPI<sup>-/-</sup>**

Zeit [s]	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Temperatur [°C]
120	95	95	95
37 Zyklen:			42 Zyklen:
15	94	15	94
30	69	30	69
30	72	30	72
120	72	120	72
∞	4	∞	4

## 9.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Schematisch dargestellter Ablauf der sekundären Hämostase.....	5
Abbildung 2. Serpine und ihre Funktionen. ....	6
Abbildung 3. Kristallographische Darstellung des PZ/ZPI-Komplexes. ....	8
Abbildung 4. Schematische Darstellung von PZ.....	9
Abbildung 5. Thermografieaufnahmen prä und post operativ.....	21
Abbildung 6. Schematische Darstellung der Vermessung der HE-gefärbten Carotidensegmente..	27
Abbildung 7. Wundverschluss von humanen glatten Muskelzellen nach Applikation von TNF- $\alpha$ , PZ und ZPI sowie den entsprechenden Trägersubstanzen.....	30
Abbildung 8. Morphometrische Analyse der Thrombusbildung in der A. carotis von ZPI $^{/-}$ - und ZPI $^{+/+}$ -Mäusen nach Applikation von 10%-igem Eisen-(iii)-Chlorid.. ..	32
Abbildung 9. Morphometrische Analyse der Thrombusbildung in der A. carotis von PZ $^{/-}/$ ZPI $^{/-}$ - und PZ $^{+/+}/$ ZPI $^{+/+}$ -Mäusen nach Applikation von 10%-igem Eisen-(iii)-Chlorid. ....	34
Abbildung 10. Wundverschluss von humanen Endothelzellen nach Applikation von SDF-1 $\alpha$ , PZ und ZPI.....	36
Abbildung 11. Netzwerkformation von humanen Endothelzellen <i>in vitro</i> ....	39
Abbildung 12. Thermografie im Hinterlaufischämiedmodell von ZPI $^{+/+}$ und ZPI $^{/-}$ -Mäusen.....	41
Abbildung 13. Immunhistochemische Auswertung des M. <i>gastrocnemius</i> im Hinterlaufischämiedmodell von ZPI $^{/-}$ - und ZPI $^{+/+}$ -Tieren.. ..	44
Abbildung 14. Thermografie im Hinterlaufischämiedmodell von PZ $^{+/+}/$ ZPI $^{+/+}$ - und PZ $^{/-}/$ ZPI $^{/-}$ -Mäusen.....	46
Abbildung 15. Immunhistochemische Auswertung des M. <i>gastrocnemius</i> im Hinterlaufischämiedmodell von PZ $^{+/+}/$ ZPI $^{+/+}$ - und PZ $^{/-}/$ ZPI $^{/-}$ -Mäusen.....	48

### 9.3. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> Bandengrößen der zu erwartenden PCR-Produkte der PZ- und ZPI-Genotypisierung ...	19
<b>Tabelle 2.</b> Ablauf für die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	26

#### 9.4. Abkürzungsverzeichnis

PZ	<u>P</u> rotein <u>Z</u>
ZPI	<u>Z</u> u <u>P</u> rotein <u>Z</u> abhängiger <u>P</u> rotease <u>I</u> nhibitor
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
ml	<u>M</u> illiliter
ng	<u>N</u> anogramm
SDF-1 $\alpha$	<u>S</u> tromal <u>d</u> erived <u>f</u> actor-1 <u><math>\alpha</math></u>
TNF- $\alpha$	<u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor <u><math>\alpha</math></u>
h	Stunde
vs	<u>v</u> ersus
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>S</u> aline
kg	<u>K</u> ilogramm
min	<u>M</u> inute
mm	<u>M</u> illimeter
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
PE	<u>p</u> ulmonary <u>e</u> mbolism
vWF	<u>v</u> on <u>W</u> illebrand- <u>F</u> aktor
TF	<u>t</u> issue <u>f</u> actor
RCL	<u>r</u> eactive <u>c</u> enter <u>l</u> oop
kDa	<u>K</u> ilodalton
EGF	<u>E</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
VEGF	<u>V</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
PDGF	<u>P</u> latelet <u>d</u> erived <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
aPC	<u>a</u> ktiviertes <u>P</u> rotein <u>C</u>
PAI-1	<u>P</u> lasminogen- <u>A</u> ktivator- <u>I</u> nhibitor 1
HUVEC	<u>h</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells

FCS	<u>fetal calf serum</u>
Ktrl	<u>Kontrolle</u>
HCL	<u>Salzsäure</u>
NaCl	<u>Natriumchlorid</u>
PCR	<u>Polymerasekettenreaktion</u>
NaOH	<u>Natriumhydroxit</u>
DNA	<u>Desoxyribonucleic acid</u>
POT	<u>post operativer Tag</u>
Ig	<u>Immunglobulin</u>
DAPI	<u>4,6-diamidino-2-phenylindole</u>
FeCl <sub>3</sub>	<u>Eisen (iii)-Chlorid</u>
HE	<u>Hämalaun-Eosin</u>
hAoSMC	<u>human aortic smooth muscle cells</u>
PAD	<u>peripheral artery disease</u>
bFGF	<u>basic fibroblast growth factor</u>
PCI	<u>Protein C Inhibitor</u>
HIF-1a	<u>hypoxia-inducible transcription factor 1a</u>
t-PA	<u>tissue plasminogen activator</u>

## **9.5. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die hier vorliegende Arbeit mit dem Titel „Relevanz von Protein Z (PZ) Protein Z-abhängigem Protease Inhibitor (ZPI) in der vaskulären Homöostase“ selbstständig verfasst habe und mir dabei keine externe Hilfe zuteilgeworden ist.

Ich versichere, dass ich bei der Anfertigung dieser Dissertation keine andere die in dieser Arbeit genannten Hilfsmittel genutzt habe.

Kösterbeck,

Antje Ladwig

## 9.6. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name:	Antje Ladwig, geb. Müller
Geburtsdatum:	04. Januar 1989
Geburtsort:	Rostock/Mecklenburg- Vorpommern
Familienstand:	verheiratet

### Karriereprofil:

01/2014 – 11/2015	Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock wissenschaftliche Assistenz: „Relevanz von Protein Z und Protein Z-abhängigem Protease Inhibitor (ZPI) in der vaskulären Homöostase“ Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
02/2013 – 09/2013	Institut für Biomedizinische Technik, Universität Rostock Masterarbeit zum Thema: „Development of molecular markers for the biological activity of local drug delivery systems“ Betreuer: PD Dr. rer. nat. Marian Löbler
10/2011 – 09/2013	Universität Rostock Studiengang: Medizinische Biotechnologie Abschluss: Master of Science (M. Sc., 09/2013) Abschlussnote: 1,5
03/2011 – 06/2011	Forschungslabor für kardialen Gewebe- und Organersatz, Universität Rostock Bachelorarbeit zum Thema: „In vitro establishment for microRNA functional studies“ Betreuerin: Dr. rer. nat. Cornelia A. Lux
10/2008 – 07/2011	Universität Rostock Studiengang: Medizinische Biotechnologie Abschluss: Bachelor of Science (Ba. Sc., 07/2011) Abschlussnote: 2,2
08/1999 – 07/2008	Ostseegymnasium Rostock, Rostock (Mecklenburg-Vorpommern) Erwerb der allgemeinen Hochschulreife Abschlussnote: 1,8

## 9.7. Danksagung

Mein persönlicher Dank geht in erster Linie an das Rudolf-Zenker-Institut für experimentelle Chirurgie, besonders an die Direktorin Frau **Prof. Brigitte Vollmar**, die mir die Chance gegeben hat, diese Arbeit anzufertigen. Über die Zeit ergaben sich einige Hürden, aber ich konnte mit stets ihrer Unterstützung und motivierender Worte sicher sein.

Weiterhin möchte ich gerne den wissenschaftlichen Mitarbeiter Frau **Dr. Kerstin Abshagen**, Frau **PD Angela Kuhla** und Herrn **Dietmar Zechner** danken, die mir gerade in der Endphase ihr Wissen und Erfahrungen zuteil haben werden lassen. Ebenso geht ein sehr großer Dank an die technischen Assistentinnen Frau **Berit Blendow**, **Maren Nerowski**, **Dorothea Franz** und **Eva Lorbeer-Rehfeld**, die mir bei der Durchführung der Versuche immer sehr behilflich waren.

Den Mitarbeitern der Zentralen Versuchstierhaltung gilt ebenso ein besonderer Dank, besonders hervorzuheben sind dabei Frau **Ilona Klamfuss** und Frau **Mareike Degener**, die immer ihr Bestes tun, damit es den Versuchstieren an nichts fehlt und die Wissenschaftler und Studenten ihrer Betreuungspflicht nachgehen. Danke, es braucht Menschen wie euch.

Ein sehr großes Dankeschön geht an meine „Leidensgenossinnen“ Frau **Marie Liebig**, **Claire Rühlmann** und **Simona Kumstel**. Ohne euch wäre es nur halb so schön gewesen! Vielen Dank für die vielen super tollen Gespräche und Momente!

Als letztes möchte ich natürlich meinen Freunden und Familie danken. Geteiltes Leid ist halbes Leid, liebe Mädels, wenn ich euch nicht hätte...! Danke für die vielen schönen Stunden, die einen merken lassen, dass man weder alleine ist, noch, dass man die Einzige mit Problemen ist.

Liebe Mutti, der Schulaufsatz „*der Hahn, der Fuchs, der Fuchs, der Hahn*“ war einschlagender und prägender als 13 Jahre Schulbildung und Studium zusammen. Ich hätte trotzdem nicht gedacht, dass es eine Neuauflage von „es wurde“ geben würde.

Vielen Dank an Alle.